

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Associação de fármacos antiproliferativos para o tratamento da
aterosclerose em coelhos: uso de nanoemulsão lipídica como veículo
para etoposídeo e metotrexato

Antonio Carlos de Arruda Leite Júnior

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof. Tit. Raul Cavalcante Maranhão

São Paulo

2010

Antonio Carlos de Arruda Leite Júnior

Associação de fármacos antiproliferativos para o tratamento da aterosclerose em coelhos:
uso de nanoemulsão lipídica como veículo para etoposídeo e metotrexato

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Tit. Raul Cavalcante Maranhão

orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

DEDICATÓRIAS

Aos meus pais, Antonio e Aparecida pelo amor, apoio e dedicação que recebi desde
meu nascimento.

Aos meus avós, Lisino e Maria, pelo incentivo e auxílio em todos os momentos.

A minha irmã Francine pelas limitações que foram consequência de minha jornada.

A minha companheira Priscilla, pela ajuda, compreensão e pelos momentos
especiais que tenho a oportunidade de viver ao seu lado.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Raul Cavalcante Maranhão, por ter me recebido em seu laboratório e pelos seus valiosos ensinamentos que contribuíram de maneira muito importante para meu crescimento pessoal e profissional.

A Michele Patricínio Rocha, pela amizade e pelas oportunidades de trabalho e aprendizado em conjunto.

A Ivana Ferreira Lima, pela amizade e colaboração durante meu período de estágio.

A Fernanda Maniero, por ter me recebido com carinho e solidariedade em minha chegada ao Instituto do Coração.

A Amanda Felipe Padoveze e Tatiana Vanessa pelas oportunidades de trabalho e aprendizado.

A Tatiana Solano, pela amizade e valiosa colaboração no desenvolvimento de meu mestrado.

Ao amigo Vanderlei, pelos valiosos conselhos, pela palavra fraterna e sincera que traz calma e admiração.

A Rosane Stefani, pelas valiosas orientações, pelas horas de dedicação ao trabalho e ao estudo e pelas importantes discussões que contribuíram de maneira notável para meu aprendizado.

A professora Maria Rita Marques de Oliveira, ao professor Luiz Madaleno Franco e ao professor Sérgio Rochelle, pelo apoio e confiança.

A todos os amigos do Laboratório de Metabolismo de Lípidos, todos os funcionários, estagiários e pós-graduandos.

Aos animais que cederam suas vidas para que fosse possível a realização deste trabalho.

1. INTRODUÇÃO.....	6
1.1. Inflamação e aterosclerose	6
1.2. Tratamento com fármacos antiproliferativos	11
1.3. Direcionamento de fármacos (“Drug Targeting”).....	12
1.4. Metotrexato	14
1.5. Etoposídeo	15
2. JUSTIFICATIVA.....	18
3. OBJETIVO	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1. Preparo da nanoemulsão	21
4.2. Síntese do di-dodecil metotrexato.....	21
4.3. Incorporação do oleato de etoposídeo e do metotrexato modificado à LDE ...	22
4.4. Tratamento da aterosclerose induzida em coelhos.....	22
4.4.1. Preparo da dieta rica em colesterol.....	23
4.5. Determinações de toxicidade dos fármacos	23
4.6. Perfil lipídico.....	24
4.7. Imunohistoquímica, análise morfométrica das áreas de lesão e apoptose.	24
4.8. Análise estatística	25
5. RESULTADOS	26
5.1. Avaliação da toxicidade	26
5.1.1. Consumo de ração e peso corporal	26
5.1.2. Perfil hematológico.....	27
5.2. Perfil lipídico.....	28
5.3. Avaliação das lesões ateroscleróticas	29
6. DISCUSSÃO.....	36
7. CONCLUSÕES.....	43
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perfil hematológico dos animais controle (n=8) e tratados com a associação NE-ETO, NE-MTX (n=8) na 4ª semana, antes do início do tratamento, e com 8 semanas, ao final do tratamento.....	28
Tabela 2. Perfil lipídico dos animais controle e tratados com a associação NE- ETO, NE-MTX antes no início da dieta rica em colesterol, antes do início do tratamento (4ª semana) e ao final do tratamento.	29
Tabela 3. Morfometria microscópica da camada íntima e média do arco aórtico de coelhos controle (n=8) e coelhos tratados com a associação NE-ETO, NE-MTX (n=8), valores em μm^2	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Consumo de ração dos animais controle e dos animais tratados com a associação NE-ETO (6 mg/kg, n=8) e NE-MTX (4 mg/Kg, n=8).	26
Figura 2. Peso corporal (kg) dos animais controle e dos animais tratados com a associação NE-ETO (6 mg/kg, n=8) e NE-MTX (4 mg/Kg, n=8).	27
Figura 3. Aorta de coelhos controle e tratados	30
Figura 4. Fotomicrografia de cortes do arco aórtico corados com hematoxilina-eosina.	31
Figura 5. Fotomicrografia de cortes do arco aórtico corados por imunohistoquímica com anticorpo anti-RAM-11 e anti-MMP-9	32
Figura 6. Porcentagem de linfócitos T CD3 positivos nos animais controle e tratados	32
Figura 7. Porcentagem de linfócitos T regulatórios Foxp3 positivos	32
Figura 8. Células apoptóticas na camada íntima da artéria de um animal controle	34
Figura 9. Fotomicrografia de segmento da artéria aorta de animal tratado.....	34
Figura 10. Fotomicrografia de cortes histológicos de fígado.....	36
Figura 11. Fotomicrografia de cortes histológicos de rim.....	37

LEITE-JÚNIOR, A.C. Associação de fármacos antiproliferativos para o tratamento da aterosclerose em coelhos: uso de nanoemulsão lipídica como veículo para etoposídeo e metotrexato. – **Dissertação de Mestrado, 2010 [Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].**

RESUMO

Fármacos antiproliferativos vêm sendo utilizados em procedimentos de angioplastia, onde são administrados localmente por meio de “stents” farmacológicos. Embora seja possível que um tratamento sistêmico apresente maior eficiência, os efeitos colaterais dos fármacos antiproliferativos disponíveis constituem uma grande limitação. Estudos recentes em nosso laboratório demonstraram que uma nanoemulsão lipídica rica em colesterol concentra-se em regiões onde a proliferação celular é maior, possivelmente devido a uma maior demanda por colesterol para a síntese de membranas celulares. Assim, consideramos a possibilidade de utilização desta nanoemulsão como veículo de fármacos antiproliferativos para o tratamento da aterosclerose. No presente trabalho, dezesseis coelhos brancos, machos, da raça New Zealand, pesando aproximadamente 3 kg, foram submetidos a uma dieta contendo 1% de colesterol durante quatro semanas e divididos em dois grupos: um grupo recebendo uma injeção endovenosa contendo apenas solução salina e outro grupo tratado com uma associação de etoposídeo e metotrexato, veiculados na nanoemulsão lipídica. A análise da morfometria macroscópica mostra que o tratamento reduz as áreas de lesão aterosclerótica em aproximadamente 84% (razão da área de lesão sobre área total $0,57 \pm 0,2$ nos animais controle versus $0,089 \pm 0,05$ nos animais tratados, $p < 0,05$). Houve redução de aproximadamente 3 vezes na razão da íntima-média dos animais tratados em relação aos animais controle. Adicionalmente, observamos que o tratamento reduz a migração de macrófagos na camada íntima do arco aórtico destes animais. Houve amplificação do efeito terapêutico em função da associação destes fármacos e redução na toxicidade. Portanto, a associação destes fármacos antiproliferativos veiculados em um sistema nanoparticulado pode ser promissora para o tratamento da aterosclerose. Estudos em humanos deverão confirmar o potencial desta proposta na terapêutica cardiovascular.

Palavras-chave: Aterosclerose, Inflamação, Metotrexato, Etoposídeo.

LEITE-JÚNIOR, A.C. **Combined chemotherapy of antiproliferative drugs for atherosclerosis treatment in the rabbit: lipidic nanoemulsion as a vehicle for etoposide and methotrexate.** – Dissertation (Masters Degree), 2010 [Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

Abstract

Drug eluting stents have been used in angioplastic procedures to deliver antiproliferative drugs directly to arterial tissue. Presumably, a systemic treatment could be more effective than local administration, but the side-effects of available antiproliferative drugs limit this approach. In recent studies, we have shown that a cholesterol-rich nanoemulsion concentrates in sites of high cell proliferation, possibly due to a high demand of cholesterol to membrane cell synthesis. Thus, we sought to test the emerging hypothesis that our nanoemulsion could be used as a vehicle to antiproliferative drugs for systemic treatment of atherosclerosis. In the present study, sixteen New Zealand White rabbits weighing from 3.2 to 3.8 kg were submitted to a diet containing 1% cholesterol during 4 weeks and then they were split in two groups: a group treated with an intravenous injection of saline solution and a group treated with an association of etoposide and methotrexate delivered in our lipid nanoemulsion. We have shown by macroscopic morphometry that the treatment reduced the lesion areas by roughly 84% (lesion area/total area ratio $0,57\pm 0,2$ in control animals, versus $0,089\pm 0,05$ in treated animals, $p<0,05$). The intima-media ratio was reduced by three fold in treated animals. Furthermore, we have observed a reduction in macrophage migration to the arterial intima. The association of etoposide and methotrexate resulted in a synergistic effect without increasing the toxicity. In conclusion, the association of antiproliferative drugs delivered in a nanoemulsion is a promising approach for atherosclerosis treatment. Further studies in humans are needed to confirm the potential of this treatment in cardiovascular therapeutics.

Keywords; Atherosclerosis, Inflammation, Methotrexate, Etoposide.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Inflamação e aterosclerose

Desde o início do século XX, a aterosclerose foi considerada como uma doença caracterizada fundamentalmente por um acúmulo de lípidos na parede arterial. Entretanto inúmeras evidências têm demonstrado nas últimas décadas a importância de mecanismos inflamatórios no desenvolvimento do processo aterosclerótico (ROSS, 1999; Libby, Ridker e Maseri, 2002).

O início do processo aterogênico é marcado por alterações no endotélio vascular que geralmente surgem como consequência de fatores de risco como hipercolesterolemia, hipertensão arterial, diabetes mellitus e tabagismo. Estes fatores promovem um aumento na permeabilidade vascular, facilitando a penetração de lipoproteínas no espaço subendotelial, particularmente as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) pequenas e densas. Quando retidas na camada íntima das artérias, devido a sua ligação a proteoglicanos, estas lipoproteínas sofrem oxidação e as partículas oxidadas estimulam a produção de citocinas e moléculas de adesão em células endoteliais. Deste modo, ocorre recrutamento de leucócitos para a camada íntima, principalmente monócitos, que se diferenciam em macrófagos e captam de maneira intensa as partículas de LDL oxidada, formando células espumosas. Sob o estímulo deste meio pró-inflamatório, células musculares lisas migram da camada média para a camada íntima arterial e entram em processo de proliferação celular. Adicionalmente, estas células podem acumular lípidos, particularmente ésteres de colesterol, formando também células espumosas. A progressão destes eventos de proliferação celular e de acúmulo de lípidos resulta no espessamento da parede dos vasos (ROSS, 1999; Libby, Ridker e Maseri, 2002).

Assim, a formação das placas ateroscleróticas é caracterizada por um acúmulo de lípidos, de células inflamatórias e imunes derivadas do sangue periférico, principalmente monócitos e células T. O centro da placa aterosclerótica contém células espumosas, componentes residuais de células mortas e gotículas de lípidos, incluindo colesterol esterificado e cristais de colesterol. Esta região central é envolvida por uma capa fibrosa contendo células musculares lisas e uma matriz rica em fibras de colágeno que estabilizam a placa. Células imunes como macrófagos, células T estão frequentemente em um estado de ativação inflamatória, produzindo citocinas, proteases, moléculas pró-trombóticas e substâncias vasoativas que podem afetar a função vascular (Jonasson, Holm, *et al.*, 1986). Outras células presentes nas placas ateroscleróticas incluem células dendríticas, mastócitos, célula B e células T “natural killers” (Bobryshev e Lord, 1995; Kovanen, Kaartinen e Paavonen, 1994).

As células T estão entre as primeiras a infiltrar na camada íntima durante os estágios iniciais da aterosclerose. Embora a maioria das células inflamatórias presentes nas lesões ateroscleróticas sejam macrófagos, aproximadamente 20% destas células são células T, sendo que a maior parte destas células pode ser identificada pela presença do receptor CD3 e uma menor porção apresenta o receptor CD8 (Boer, 2007; Jonasson, Holm, *et al.*, 1986).

A ativação das células T influencia de maneira negativa a estabilidade das placas ateroscleróticas, o que pode levar a ruptura destas placas e o desenvolvimento de síndromes coronárias agudas. Um aumento significativo na quantidade de células T periféricas foi reportado em pacientes com síndrome coronária aguda e, além disso, há evidências de aumento na expressão de marcadores de ativação das células T nesses pacientes. (Dworacka, 2007; Turk,

2008). De fato, existem evidências de que células T estimulam macrófagos a secretar metaloproteinases, que degradam a matriz extracelular, desestabilizando as placas. Em geral, as funções efetoras das células T estão sob rígido controle de uma subclasse de células T, denominadas células T regulatórias (Treg). As células Treg apresentam um papel central na indução ou manutenção da tolerância imunológica, e no término das respostas imunes (Dworacka, 2007).

Uma importante população de células Treg é conhecida como célula T regulatória de ocorrência natural. Em tecidos, estas células são identificadas pela presença do fator de transcrição FOXP3 (*Forkhead Box Protein P3*), um membro da família de fatores de transcrição *Forkhead*. Há evidências de que o aumento no número e na atividade destas células reduz o desenvolvimento da aterosclerose (Bacchetta, Gregori e Roncarolo; Boer, 2007). Anticorpos dirigidos contra a molécula CD3 de camundongos diabéticos não obesos promoveram a remissão do diabetes por estimular as células T regulatórias de ocorrência natural (Chatenoud, Thervet, *et al.*, 1994). Steffens e colaboradores demonstraram que a administração de anticorpos específicos para a molécula CD3 promove redução no tamanho e diminuição na progressão de lesões ateroscleróticas estabelecidas em aortas de camundongos com “knock-out” do receptor de LDL. Além disso, houve aumento de aproximadamente duas vezes na expressão de RNA-mensageiro do fator de transcrição FOXP3 (Steffens, Burger, *et al.*, 2006).

Uma característica marcante da aterosclerose consiste na disfunção no remodelamento vascular, que ocorre devido à degradação de componentes da matriz extracelular (Galis Z.S., 2002). As metaloproteinases de matriz constituem uma família de endopeptidases, produzidas principalmente por macrófagos, células endoteliais e células musculares lisas, que degradam os componentes da matriz

extracelular por meio de um mecanismo catalítico dependente de zinco. Embora a ação das metaloproteinases seja essencial para a homeostase vascular, alterações em sua atividade podem contribuir para a progressão do processo aterosclerótico e também reduzir a estabilidade de placas ateroscleróticas avançadas (McMillan, Patterson, *et al.*, 1995; Newby, 2005).

Algumas evidências sugerem que o aumento na expressão de inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMP) poderia contrabalancear os efeitos do aumento na expressão de metaloproteinases. Entretanto, esta ação inibitória dos TIMPs parece não ser suficiente para deter o processo aterogênico, como sugerido por estudos que demonstraram que a razão entre metaloproteinases e TIMP é significativamente aumentada em artérias que apresentaram ruptura de placa e evidências de menor concentração de TIMP-1 em pacientes com placas instáveis em comparação a pacientes com placas estáveis e voluntários saudáveis (Sapienza, di Marzo e Borrelli, 2005; Higashikata, Yamagishi e T., 2006).

As metaloproteinases 1 (MMP-1) e 9 (MMP-9) estão entre as principais detectadas em placas ateroscleróticas humanas, particularmente em regiões de formação de células espumosas, onde colocalizam com fragmentos de degradação de colágeno. A MMP-1 cliva o colágeno fibrilar intersticial do tipo 1 e 3, enquanto a MMP-9 apresenta proeminente atividade contra componentes da membrana basal incluindo colágeno do tipo 4, laminina e elastina (Visse, 2003; Sukhova, Schonbeck, *et al.*, 1999; Newby, 2008).

Há evidências de que a presença de células apoptóticas na parede arterial pode apresentar um efeito pró-inflamatório por estimular a liberação de citocinas e fatores quimiotáticos. Schijvers *et al.*, 2005 demonstraram que a remoção de células

apoptóticas por fagocitose, evento denominado como eferocitose, ocorre com menor eficiência na aterosclerose (Schrijvers, De Meyer, *et al.*, 2005). Esta redução na eficiência da eferocitose se deve possivelmente devido a fatores como, sobrecarga citoplasmática dos macrófagos e presença de LDL oxidada. O maior número de células apoptóticas contribui para a posterior formação de um núcleo necrótico que está associado à menor estabilidade das placas ateroscleróticas. De fato, Haider et al 2009 demonstraram que há uma relação direta entre a presença de células apoptóticas e a liberação de metaloproteinases (Haider, Hartung, *et al.*, 2009).

Situações caracterizadas pela presença de inflamação crônica como o lúpus eritematoso sistêmico e a artrite reumatóide apresentam um aumento na morbidade e mortalidade cardiovascular. Existem evidências de que em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide, os mediadores inflamatórios estão associados com a aterosclerose de maneira independente dos fatores de risco cardiovascular tradicionais (Wolfe, Freundlich e Straus, 2003; del Rincon, Williams, *et al.*, 2001).

De fato, o processo aterosclerótico que ocorre na artrite reumatóide apresenta similaridades com a aterosclerose que se desenvolve em indivíduos que não apresentam artrite (Aubry, Maradit-Kremers, *et al.*, 2007). De modo semelhante, a aterosclerose e a formação de tumores, caracterizada por intensa proliferação celular, apresentam mecanismos em comum (Morganti, Carpi, *et al.*, 2002; Li e Gao, 2005). Assim, a aterosclerose pode ser entendida como uma doença vascular proliferativa e conseqüentemente, os processos de proliferação vascular são alvos terapêuticos relevantes.

1.2. Tratamento com fármacos antiproliferativos

Os avanços no entendimento das doenças vasculares proliferativas têm possibilitado o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento que visam inibir ou bloquear os processos patológicos da proliferação vascular (DZAU, BRAUN-DULLAEUS e SEDDING, 2002). Fármacos de ação antiproliferativa têm sido utilizados como adjuvantes em procedimentos de angioplastia, bem como no revestimento de endopróteses expansíveis conhecidas como *stents*, com o objetivo de se evitar a reestenose, ou seja, a reoclusão dos vasos que ocorre devido ao processo proliferativo que predomina após a implantação dos *stents* (LINCOFF, TOPOL e ELLIS, 1994; SOUSA, COSTA, *et al.*, 2001).

A rapamicina e o paclitaxel são potentes agentes antiproliferativos que inibem a proliferação de células musculares lisas e o crescimento da matriz extracelular, prevenindo a formação neointimal e a reestenose. Entretanto, evidências recentes sugerem que os *stents* farmacológicos prejudicam a função endotelial nos locais de implante (Inoue e Node, 2009).

Embora *stents* farmacológicos permitam que os agentes antiproliferativos entrem em contato direto com a parede arterial e sejam efetivos na prevenção da reestenose, o custo do tratamento e a ausência de redução nas taxas de mortalidade deixam abertas as portas para novas propostas de tratamento (STONE, ELLIS, *et al.*, 2005; HILL, BOLAND, *et al.*, 2007). Uma possível alternativa seria um tratamento sistêmico que presumivelmente, poderia promover uma ação em toda a árvore coronária, sendo uma antiga aspiração dos farmacologistas da área (MARANHÃO, TAVARES, *et al.*, 2008).

Entretanto, para obter uma boa eficácia farmacológica seria necessária uma dose que promoveria severos efeitos colaterais na maioria dos fármacos disponíveis.

De fato, a administração de agentes imunossupressores ou antiproliferativos por via oral não tem apresentado benefícios na redução da reestenose e é acompanhada de efeitos colaterais limitantes (Brara, Moussavian, *et al.*, 2003). Portanto, para viabilizar o tratamento da aterosclerose por via sistêmica, seria necessário um direcionamento específico dos fármacos ao tecido arterial, de modo a evitar estes efeitos colaterais e aumentar a eficácia terapêutica.

1.3. Direcionamento de fármacos (“Drug Targeting”)

Sistemas de direcionamento de fármacos como lipossomos, anticorpos, transportadores poliméricos e nanoemulsões lipídicas vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de otimizar o tratamento com fármacos antiproliferativos (MARANHAO, TERCYAK e REDGRAVE, 1986; JURCIC, SCHEINBERG e HOUGHTON, 1996; MORENO, de ILARDUYA, *et al.*, 2008; TYAG, SENGUPTA, *et al.*, 1999). Maranhão e Garicochea *et al.*, demonstraram que uma nanoemulsão rica em colesterol é captada pelos receptores de LDL após injeção na corrente sanguínea (MARANHAO, GARICOCHEA, *et al.*, 1992). Esta nanoemulsão lipídica é produzida sem proteínas, mas em contato com o plasma, adquire apo E, e outras apolipoproteínas das demais lipoproteínas plasmáticas. A apo E é reconhecida pelos receptores de LDL e permite a ligação da nanoemulsão aos receptores, com conseqüente captação pelas células (MARANHAO, GARICOCHEA, *et al.*, 1992; MARANHAO, ROLAND e TOFFOLETTO, 1997).

Quando a nanoemulsão foi injetada em pacientes com doença arterial coronária que foram submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio, foram observadas consideráveis taxas de captação pelo tecido arterial descartado durante o procedimento (DAVID-COUTO, DALLAN e LISBOA, 2003). Uma possível

explicação para este fenômeno pode ser o fato de que nas doenças que envolvem proliferação celular como a aterosclerose, há uma maior demanda por colesterol para a síntese de membranas celulares e deste modo, ocorre um aumento no número de receptores de LDL (BROWN e GOLDSTEIN, 1986). Este experimento nos levou a considerar a possibilidade de utilizar esta nanoemulsão como veículo de fármacos antiproliferativos para o tratamento da doença arterial coronária, com o objetivo de concentrar o fármaco no tecido alvo e ao mesmo tempo evitar os efeitos colaterais.

De fato, foi observado que em coelhos com intenso processo aterosclerótico induzido por dieta rica em colesterol, a nanoemulsão se concentra nas artérias lesionadas, particularmente no arco aórtico, no caso deste modelo experimental (MARANHAO, TAVARES, *et al.*, 2008). Quando o paclitaxel, fármaco de ação antiproliferativa, foi associado à nanoemulsão e administrado nesses animais por via sistêmica houve uma redução de aproximadamente 60% das áreas de lesão e uma redução da relação íntima-média de quatro vezes. Cabe ressaltar que o tratamento apresentou excelente tolerabilidade, de modo semelhante aos resultados previamente documentados por nosso grupo de pesquisa, quando agentes quimioterápicos foram associados a esta nanoemulsão para o tratamento de pacientes com câncer (MARANHÃO, TAVARES *et al.*, 2008; 1992; VALDUGA *et al.* 2003; AZEVEDO *et al.* 2005; PINHEIRO *et al.*; 2006).

A administração sistêmica de agentes antiproliferativos veiculados em nanopartículas lipídicas poderia abrir a possibilidade de promover a regressão da DAC independente da indicação de angioplastia, em casos onde se constate a presença da doença, seja para prevenir suas complicações seja como agente secundário. Dentro dessa perspectiva, seria importante a associação de novos

fármacos de ação antiproliferativa ao sistema nanoparticulado desenvolvido em nosso laboratório, para o tratamento da aterosclerose.

1.4. Metotrexato

O metotrexato é um agente antiproliferativo, antiinflamatório e imunossupressor, utilizado principalmente no tratamento de cânceres e doenças inflamatórias crônicas como artrite reumatóide e psoríase. Sua vasta aplicação clínica inclui o tratamento de tumores trofoblásticos em mulheres, osteocarcinoma, linfomas de Burkitt e não hodkin, leucemia linfoblástica aguda infantil, carcinomas de cabeça, pescoço, mama, bexiga e ovário. Além disso, o metotrexato tem sido utilizado como agente imunossupressor em transplante de órgãos e na terapia da asma severa (Alisson, 2000).

Trata-se de um antimetabólito que inibe as enzimas dihidrofolato redutase (DHFR), timidilato sintase (TS) e aminoimidazol carboximida ribonucleotídeo formil transferase (AICAR), atuando na fase S do ciclo celular (BERTINO, 1963; GENESTIER, PAILLOT, *et al.*, 2000). A AICAR e a TS são enzimas importantes na síntese de timidilato e purina, respectivamente. Como consequência, ocorre inibição da síntese e replicação do DNA. O metotrexato é transportado para o meio intracelular por meio de um transportador de folato reduzido e é sujeito à formação de poliglutamatos intracelulares pela ação da enzima folilpoliglutamato sintase (FPGS). Neste processo, cerca de seis moléculas de glutamato são adicionadas para a formação de poliglutamatos de metotrexato. Estes poliglutamatos são hidrolizados pela folilpoliglutamil hidrolase. A formação de poliglutamatos do metotrexato aumenta sua retenção intracelular e os metabólitos destes

poliglutamatos aumentam significativamente o tempo de retenção celular e a potência do fármaco como inibidos das enzimas ES e AICAR. As principais reações de hipersensibilidade do metotrexato incluem anafilaxia, urticária, vasculite cutânea, anemia hemolítica, citopenia e hepatite. Tais efeitos ocorrem devido à inespecificidade do metotrexato em relação às células alvo, o que pode ser superado pela utilização de transportadores específicos (GENESTIER, PAILLOT, *et al.*, 2000).

A apresentação comercial deste fármaco encontra-se na forma de um sal dissódico, o que dificulta sua associação à nossa nanoemulsão. Recentemente, o método de incorporação do metotrexato à nanoemulsão lipídica foi desenvolvido em nosso laboratório (MOURA, 2007). A taxa de associação à nanoemulsão foi aumentada pela esterificação dos dois grupos carboxila da molécula, formando o complexo nanoemulsão-di-dodecil metotrexato (NE-MTX) e a formulação apresentou-se bastante estável (MOURA 2007). Experimentos de citotoxicidade e toxicidade animal vêm sendo realizados para avaliar a atividade farmacológica da forma modificada em comparação à forma comercial do fármaco. Resultados preliminares indicam que a modificação química não altera a atividade farmacológica e que o complexo NE-MTX apresenta toxicidade hematológica reduzida em animais (dados não publicados).

1.5. Etoposídeo

Outro fármaco com potencial para o tratamento da aterosclerose é o etoposídeo. O etoposídeo é um derivado semi-sintético da podofilotoxina, extraído da mandrágora americana (*Podophyllum peltatum*). Este fármaco bloqueia o ciclo

celular na fase S tardia ou no início da fase G₂. O etoposídeo forma uma associação ternária com a enzima topoisomerase II α e o DNA, causando quebras nas fitas duplas e simples do DNA. A enzima permanece ligada à extremidade do filamento quebrado, levando ao acúmulo de quebras de DNA e morte celular (HANDE, 1998). O etoposídeo tem uma baixa taxa de associação à nanoemulsão, que foi aumentada pela adição de um grupo oleíla à molécula para torná-la mais lipofílica (VALDUGA, FERNANDES, *et al.*, 2003). A eficácia terapêutica foi mantida e a toxicidade foi reduzida pela associação com a nanoemulsão lipídica, como demonstrado em camundongos com melanoma B16 (Lo PRETE, MARIA, *et al.*, 2006). Quando testado em pacientes com câncer, verificou-se que o complexo nanoemulsão-oleato de etoposídeo (NE-ETO) se concentrou no tumor (AZEVEDO, CARVALHO, *et al.*, 2005). Em pacientes com linfoma Hodgkin e não-Hodgkin, a associação NE-ETO não mostrou toxicidade aparente e teve excelente tolerabilidade (PINHEIRO, HUNGRIA, *et al.*, 2006).

Algumas evidências indicam que o etoposídeo inibe a proliferação celular que ocorre na aterosclerose e reduz a formação de placas na parede arterial de coelhos (MOYA, ROTHBLAT, *et al.*, 1992). Entretanto, a toxicidade do fármaco constitui uma importante limitação para o tratamento em humanos. Devido ao potencial da nanoemulsão desenvolvida em nosso laboratório para o direcionamento de fármacos e a menor toxicidade associada à sua utilização (MARANHÃO *et al.* 2008; MARANHÃO *et al.* 1992; VALDUGA *et al.* 2003; AZEVEDO *et al.* 2005; PINHEIRO *et al.*; 2006), pretendemos verificar se a associação do complexo NE-MTX ao NE-ETO seria eficiente no tratamento da aterosclerose e se esta associação aumentaria o efeito antiproliferativo, pois estes fármacos agem em diferentes fases do ciclo celular. Além disso, o fato de que ambos os fármacos apresentam maior eficácia em

áreas onde a proliferação celular é maior, reforça a hipótese de que esta associação atuaria de forma sinérgica no tratamento das doenças vasculares proliferativas.

2. JUSTIFICATIVA

A aterosclerose, maior causa de morbidade e mortalidade no mundo ocidental é uma doença inflamatória crônica, onde eventos de proliferação celular, infiltração de macrófagos e células musculares lisas têm grande importância (Libby, Ridker e Maseri, 2002). A utilização de fármacos antiproliferativos por via sistêmica para o tratamento da aterosclerose poderia representar uma alternativa não invasiva e de baixo custo, mas esta possibilidade é limitada pelos efeitos colaterais associados a este tipo de terapia. A utilização da nanoemulsão desenvolvida em nosso laboratório como veículo de quimioterápicos têm resultado em drástica redução na toxicidade dos fármacos veiculados, sem redução na eficácia do tratamento. Além disso, a expressiva redução nas lesões ateroscleróticas e a ausência de toxicidade quando esta nanoemulsão foi utilizada como veículo para o paclitaxel, sugerem a possibilidade da associação de outros fármacos antiproliferativos a esse sistema (MARANHÃO et al. 2008; MARANHÃO et al. 1992; VALDUGA et al. 2003; AZEVEDO et al. 2005; PINHEIRO et al; 2006). O metotrexato, embora não tenha sido testado especificamente no tratamento da aterosclerose, tem potencial no tratamento das lesões ateroscleróticas, já que possui efeito antiinflamatório e há evidências de redução na incidência de doenças cardiovasculares em pacientes portadores de artrite reumatóide (Wolfe, Freundlich e Straus, 2003; del Rincon, Williams, *et al.*, 2001). O etoposídeo, devido à sua ação no bloqueio da divisão celular, também pode ser promissor para o tratamento das lesões ateroscleróticas. Presumivelmente, a associação do etoposídeo e do metotrexato no tratamento sistêmico da aterosclerose amplificaria o efeito terapêutico devido a combinação dos efeitos imunomoduladores do metotrexato aos efeitos antiproliferativos do

etoposídeo, e por agirem em fases diferentes da divisão celular. Espera-se que devido à sua incorporação à nanoemulsão, os fármacos se concentrem na lesão aumentando a eficiência do tratamento, com redução na toxicidade.

3. Objetivo

Avaliar os efeitos da associação dos complexos NE-ETO e NE-MTX, no tratamento da aterosclerose induzida em coelhos e sua efetividade na redução das lesões.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Preparo da nanoemulsão

A nanoemulsão foi preparada segundo a técnica descrita por Ginsburg *et al.* modificada por Maranhão *et al.* (GINSBURG, SMALL e ATKINSON, 1982; MARANHÃO, CESAR, *et al.*, 1993). Foram pipetados em um frasco, 40 mg de fosfatidilcolina, 20 mg de oleato de colesterol, 1 mg de trioleína e 0,5 mg de colesterol livre diluídos em clorofórmio:metanol (2:1). Os solventes residuais foram evaporados da mistura sob fluxo de nitrogênio e dessecação a vácuo, por 16h, a 4°C. A emulsificação dos lipídeos foi realizada por meio de irradiação ultrassônica (125W de potência) em 10 mL de solução tampão Tris-HCl 0,01M, pH 8,0 durante 3 horas com temperatura entre 51 e 55°C. As nanopartículas foram purificadas por ultracentrifugação a 200.000 x g em duas etapas, a partir da flotação (densidade em 1,21g/mL por adição de KBr) da fração de partículas com tamanho e composição desejados e dialisadas contra solução tampão Tris-HCl 0,01M, pH 8,0. Finalmente, a nanopartícula é esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µ de porosidade sob fluxo laminar e armazenada a 4°C. Todo o material a ser utilizado deverá passar por esterilização em autoclave a 120 °C e despirogenizado em estufa a 180 °C durante 90 minutos.

4.2. Síntese do di-dodecil metotrexato

O metotrexato (adquirido da Purifarma - São Paulo-SP, Brasil) é di-esterificado com brometo de dodecila em presença de carbonato de cézio como catalisador, seguindo procedimento descrito na literatura (ROSOWSKY, FORSCH, *et al.*, 1987). O di-dodecil metotrexato é obtido com bom rendimento (85 %).

4.3. Incorporação do oleato de etoposídeo e do metotrexato modificado à LDE

O oleato de etoposídeo, modificado conforme descrito por Valduga et al., e o di-dodecil metotrexato serão incorporados à nanoemulsão separadamente numa razão 5:1 em massa de lipídios:fármaco (VALDUGA, FERNANDES, *et al.*, 2003). Os fármacos são dissolvidos em 300 µL de etanol e misturados com 3,0 mL de nanoemulsão. A incorporação é realizada utilizando-se irradiação ultrassônica por 40 minutos a 55 °C em banho de água/gelo. A taxa de associação à nanoemulsão é determinada pela diálise dos fármacos incorporados à nanoemulsão, com quantificação do derivado que atravessa a membrana por HPLC (High-Pressure Liquid Chromatography). As preparações são realizadas no mesmo dia do experimento e esterilizadas em filtro Millipore 0,22 µm.

4.4. Tratamento da aterosclerose induzida em coelhos

Coelhos brancos machos da raça New Zealand, pesando aproximadamente 3 kg, são acondicionados em gaiolas individuais em sala com temperatura controlada (20-22 °C) e sob ciclo claro/escuro de 12 horas no Biotério da Divisão Experimental do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob protocolo número 0013/2009 e pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, sob protocolo de número 219. Água foi fornecida *ad libitum*. Inicialmente, os coelhos consumiram ração comercial usual (Purina Inc.) constituída de 16% de proteínas, 7% de lipídeos, 14% de fibra bruta, 7% de cinzas e 50% de extrato não-nitrogenado por uma semana para adaptação às condições ambientais do biotério. Após a

primeira semana, todos os coelhos foram submetidos a uma dieta rica em colesterol durante oito semanas (150 gramas de ração/dia enriquecida com 1% de colesterol). Após 4 semanas de administração da dieta rica em colesterol os coelhos são divididos em 2 grupos, sendo 8 animais em cada grupo, de acordo com o tratamento a ser administrado: o grupo 1 (controle) recebeu uma injeção endovenosa contendo solução salina e o grupo 2 foi tratado com a associação de NE-ETO com NE-MTX. Todos os tratamentos foram administrados uma vez por semana, pelo período de quatro semanas. Ao fim das oito semanas, os animais foram sacrificados com injeção endovenosa de uma dose letal de pentobarbital sódico (5%).

4.4.1. Preparo da dieta rica em colesterol

A dieta rica em colesterol é preparada pela vaporização de uma solução de colesterol, éter etílico e etanol a 70% sobre a ração comercial usual, na proporção de 1 g de colesterol para 100g de ração. O colesterol foi dissolvido adicionando-se 50 ml de éter etílico e 100 ml de álcool a 70%/g de colesterol, a 40°C sob agitação. Após a adição da solução, a ração permanece em repouso por 24 horas em câmara de fluxo laminar para evaporação completa dos solventes. A ração rica em colesterol é pesada e separada em porções individuais de 150g em sacos plásticos lacrados e armazenada a -20°C.

4.5. Determinações de toxicidade dos fármacos

A análise das mudanças no perfil hematológico foi realizada antes do início da dieta, antes do início e após o final do tratamento em todos os animais. Os animais foram pesados semanalmente para avaliação do peso corporal. O consumo de ração foi avaliado diariamente, pesando-se o resíduo de ração. Cortes histológicos

de amostras de fígado e rim foram corados com hematoxilina-eosina e analisados em microscópio óptico.

4.6. Perfil lipídico

O perfil lipídico dos animais foi determinado antes do início do consumo da dieta rica em colesterol, antes do início do tratamento (4ª semana) e ao final do tratamento (8ª semana) em todos os animais. Amostras de sangue dos coelhos foram coletadas da veia auricular marginal após jejum de 12h e centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos a 4°C para separação do soro. Os níveis séricos de triglicérides e colesterol total foram determinados pelo método enzimático Triglicérides GPO-ANA e Colesterol Liquiform Labtest, respectivamente, e pelo sistema de medida colorimétrica (Life Science UV/Vis Spectrophotometer , DU530, Beckman). O colesterol de HDL foi determinado pelo mesmo método utilizado para o colesterol total, após precipitação das VLDL e LDL. Para as dosagens foram utilizados os kits enzimáticos comerciais da Labtest Diagnóstica S. A. (Minas Gerais, Brasil). Para controle interno de qualidade, foi utilizada a preparação estabilizada Qualitrol 1 da Labtest Diagnóstica S. A.

4.7. Imunohistoquímica, análise morfométrica das áreas de lesão e apoptose.

A artéria aorta foi removida, desde o arco aórtico até a artéria abdominal, aberta longitudinalmente, lavada com solução salina e imersa em solução tamponada de formalina a 10%. Após a fixação, cada aorta é corada com Scarlet R e fotografias foram obtidas para mensuração das lesões macroscópicas. O arco aórtico foi seccionado em segmentos de 5 milímetros, que são embebidos em parafina. Os cortes de cada segmento foram corados com hematoxilina-eosina para a mensuração da área total das lesões. A porcentagem de lesão aterosclerótica

microscópica é obtida pela razão entre a porcentagem de área lesionada e a área total. Secções adicionais foram coradas com anticorpos anti-alfa actina para células de músculo liso vascular (Sigma-Ildrich, Saint Louis, MO), anticorpos anti-RAM 11 para macrófagos (Lab Vision, Fremont, CA), anticorpos anti-CD3 e anti-Foxp3 (Sigma-Ildrich, Saint Louis, MO). Todas as mensurações são realizadas utilizando o software Leica QWIN Image Analysis (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). A avaliação da presença de células apoptóticas, foi realizada pelo método de TUNEL, por meio de um kit de detecção “*in situ*” de células apoptóticas, de acordo com as instruções do fabricante (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany). Foi realizada contagem de células TUNEL-positivas na camada íntima.

4.8. Análise estatística

Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão. Para avaliar as diferenças entre os grupos estudados foram utilizados os teste t de student ou o teste de Mann-Whitney de acordo com a distribuição paramétrica ou não-paramétrica dos dados. A probabilidade de significância considerada foi de $p < 0,05$ em todas as comparações efetuadas.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação da toxicidade

5.1.1. Consumo de ração e peso corporal

O tratamento com a associação das formulações NE-ETO e NE-MTX ou com solução salina não modifica o consumo de ração dos animais em ambos os grupos (figura1). O consumo diário médio dos animais controle na semana anterior ao tratamento foi de $111 \pm 10,86$ g e na última semana de tratamento foi de $109 \pm 26,65$ g. Nos animais tratados, o consumo na semana anterior ao tratamento foi de $101,9 \pm 36$ g e na última semana de tratamento foi de $99,75 \pm 12$ g.

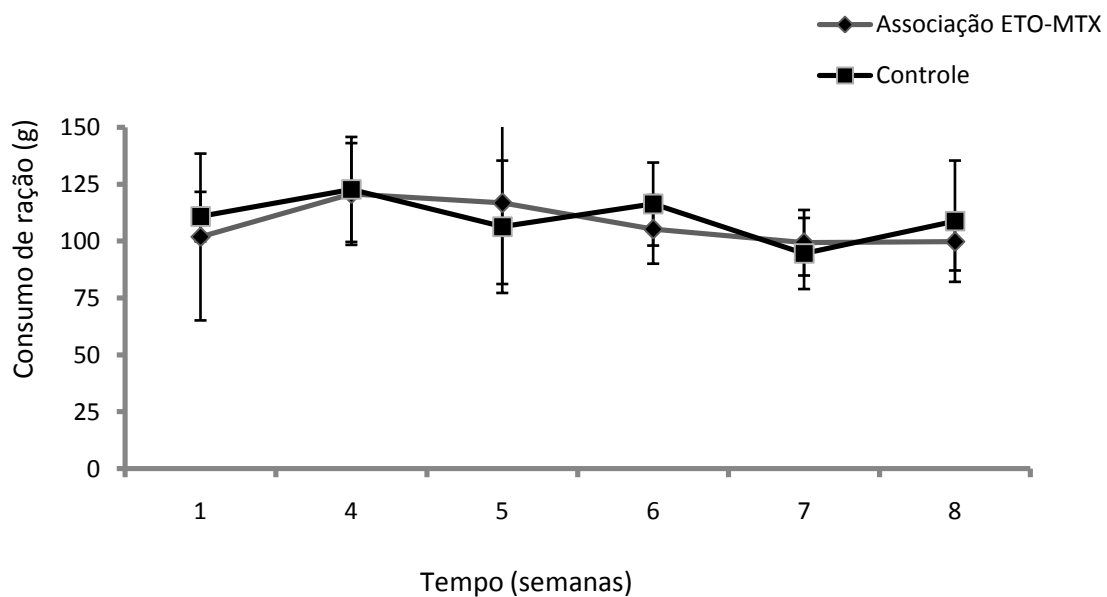


Figura 1. Consumo de ração (média do consumo semanal em g) dos animais controle (■) e dos animais tratados com a associação NE-ETO (6 mg/kg, n=8) e NE-MTX (4 mg/Kg, n=8) (◊).

De maneira semelhante, não houve diferença entre os dois grupos com relação à variação do peso corporal durante o tratamento (figura 2). O peso corporal entre os dois grupos estudados não apresentou alterações significativas, variando entre $3,23\pm 0,49$ a $3,76\pm 0,37$ kg do início ao final do tratamento no grupo controle, e entre $3,3\pm 0,3$ e $3,8\pm 0,2$ kg no grupo tratado.

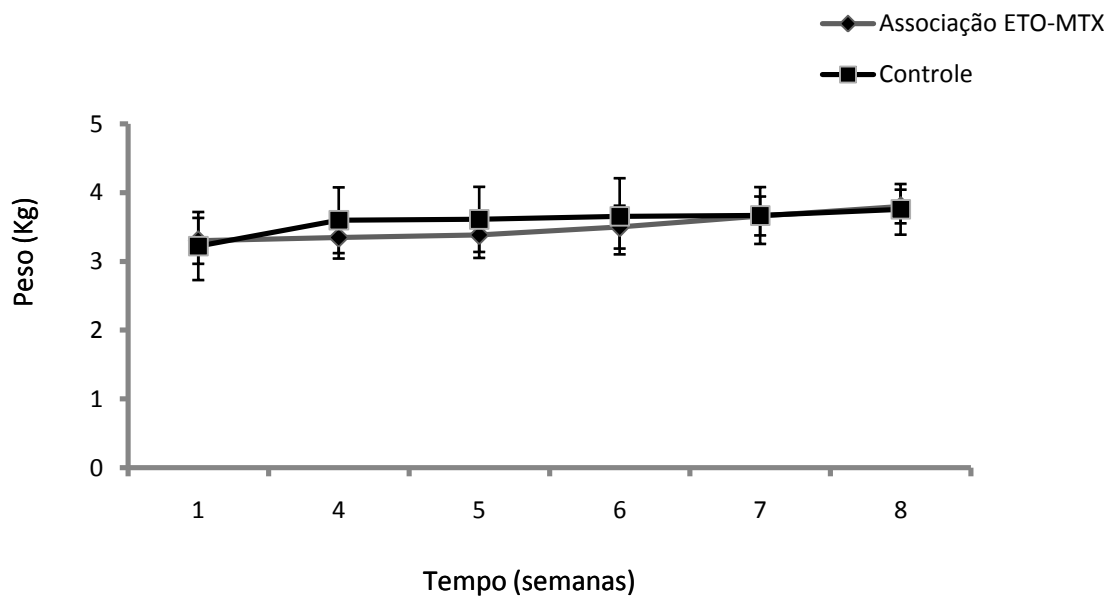


Figura 2. Peso corporal (kg) dos animais controle (■) e dos animais tratados com a associação NE-ETO (6 mg/kg, n=8) e NE-MTX (4 mg/Kg, n=8) (●).

5.1.2. Perfil hematológico

A tabela 1 mostra os valores do perfil hematológico dos coelhos controle e tratados com a associação NE-ETO e NE-MTX. Na oitava semana, ao final do tratamento, o grupo tratado apresentou discreta redução na contagem de hemácias em relação ao início do tratamento e em comparação ao final do tratamento do

grupo controle ($p < 0,05$). Os valores de leucócitos se mantiveram estáveis durante todo o tratamento em ambos os grupos.

Tabela 1. Perfil hematológico dos animais controle ($n=8$) e tratados com a associação NE- ETO, NE-MTX ($n=8$) antes do início da dieta rica em colesterol, antes do início do tratamento (4 semanas) e ao final do tratamento.

	Controle			Tratado		
	Pré-dieta	4 semanas	8 semanas	Pré-dieta	4 semanas	8 semanas
Hemácias ($10^{12}/L$)	6,1±0,8	5,9±1	5,3±0,7	5±1	5,2±0,6	3,8±0,5*†
Leucócitos ($10^9/L$)	6,5±1	10±1	9±2	5,0±1	6,5±3	5,8±1
Linfócitos	73±4	63±5	48±5	67±17	66±4,1	56±10
Monócitos	2±0	0,2±0,4	0,3±0,8	2±1	2±1	3±1
Neutrófilos	24±4	23±4	32±2	29±16	31±3	39±10

* $p < 0,05$ teste t pareado, comparado com grupo tratado (4 semanas).

† $p < 0,05$, teste t de student, comparado com controle (8 semanas).

5.2. Perfil lipídico

A tabela 2 mostra o perfil lipídico dos animais antes do início da dieta rica em colesterol, antes do início do tratamento e ao final do tratamento, nos grupos controle e tratado. A dieta rica em colesterol aumentou os valores de colesterol total em aproximadamente 35 vezes. Após oito semanas, os valores de triglicérides aumentaram por volta de 2 a 5 vezes em função da dieta em ambos os grupos. Surpreendentemente, os níveis de colesterol de HDL (HDL-C) se mantiveram constantes nos animais tratados e apresentaram redução nos animais controle no final do tratamento, em comparação ao início.

Tabela 2. Perfil lipídico dos animais controle e tratados com a associação NE- ETO, NE-MTX antes no início da dieta rica em colesterol, antes do início do tratamento (4ª semana) e ao final do tratamento.

Perfil lipídico (mg/dL)	Pré-dieta	Controle		Tratado		
		4 semanas	8 semanas	Pré-dieta	4 semanas	8 semanas
Colesterol Total	36±18	1286±214	1340±93	75±6	1348±262	1291±192
HDL-C	11±8	27±13	14±3	19±2	28±3	28±2†
Triglicerídeos	53±33	244±96*	276±198*	83±5	130±11*	195±43*

* p<0,05, teste t de student comparado com controle (pré-dieta).

†p<0,05, teste de Mann-Whitney comparado com controle (8 semanas).

5.3. Avaliação das lesões ateroscleróticas

A figura 3 mostra a aorta de um coelho controle (A) e um coelho tratado com a associação NE-ETO, NE-MTX (B). Esta ilustração, que representa o principal achado deste experimento, mostra que há drástica redução nas lesões ateroscleróticas dos animais tratados com a associação NE-ETO, NE-MTX. De fato, a análise da morfometria macroscópica indica uma redução de aproximadamente 84% nas áreas de lesão, em oito coelhos tratados com a associação NE-ETO, NE-MTX em comparação a oito coelhos controle. A razão entre área total e área da lesão foi de $0,57 \pm 0,2$ nos coelhos controle e de $0,089 \pm 0,05$ nos animais tratados ($p < 0,05$).



Figura 3. Aorta de coelhos controle (A) e tratados com a associação NE-ETO, NE-MTX (B).

A figura 4 mostra uma fotomicrografia de segmentos do arco aórtico, corados com hematoxilina-eosina. A imagem ilustra de forma representativa as placas tipicamente encontradas em cada grupo.

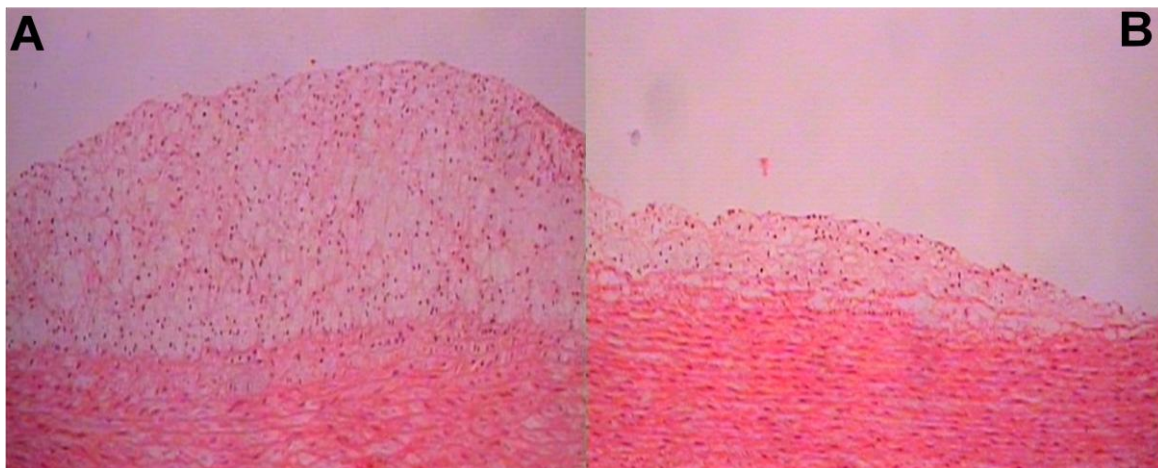


Figura 4. Fotomicrografia de cortes do arco aórtico corados com hematoxilina-eosina, de coelhos controle (A) e tratados com a associação NE-ETO e NE-MTX (B). (aumento de 100X).

É possível observar que a espessura da camada íntima é substancialmente menor após o tratamento com a associação NE-ETO, NE-MTX. Houve redução na razão íntima-média de aproximadamente três vezes, conforme mostra a tabela 3.

Tabela 3. Morfometria microscópica da camada íntima e média do arco aórtico de coelhos controle (n=8) e coelhos tratados com a associação NE-ETO, NE-MTX (n=8), valores em μm^2 .

	Controle	NE-ETO, NE-MTX
Área da íntima (μm^2)	2,58±0,87	0,22±0,10*
Área da média (μm^2)	1,6±0,84	0,55±0,35*
Área íntima/média	1,59±1,12	0,50±0,29*
Porcentagem de CML	27,4±13,5	26,8±9,9
Porcentagem de macrófagos	74,5±12,6	31,5±26,9*

*p<0,05 comparado com controle.

CML =célula muscular lisa.

A figura 5 apresenta uma fotomicrografia de segmentos do arco aórtico, corados por imunohistoquímica para RAM-11 e MMP-9. O tratamento resultou em redução de aproximadamente duas vezes na presença de macrófagos na camada íntima e os níveis relativos de MMP-9 baixaram de 37±0,2% no grupo controle para 10±0,2% no grupo tratado (p<0,05). A porcentagem de células musculares lisas permaneceu inalterada, sendo 27±13 nos animais controle e 26±9 nos animais tratados.

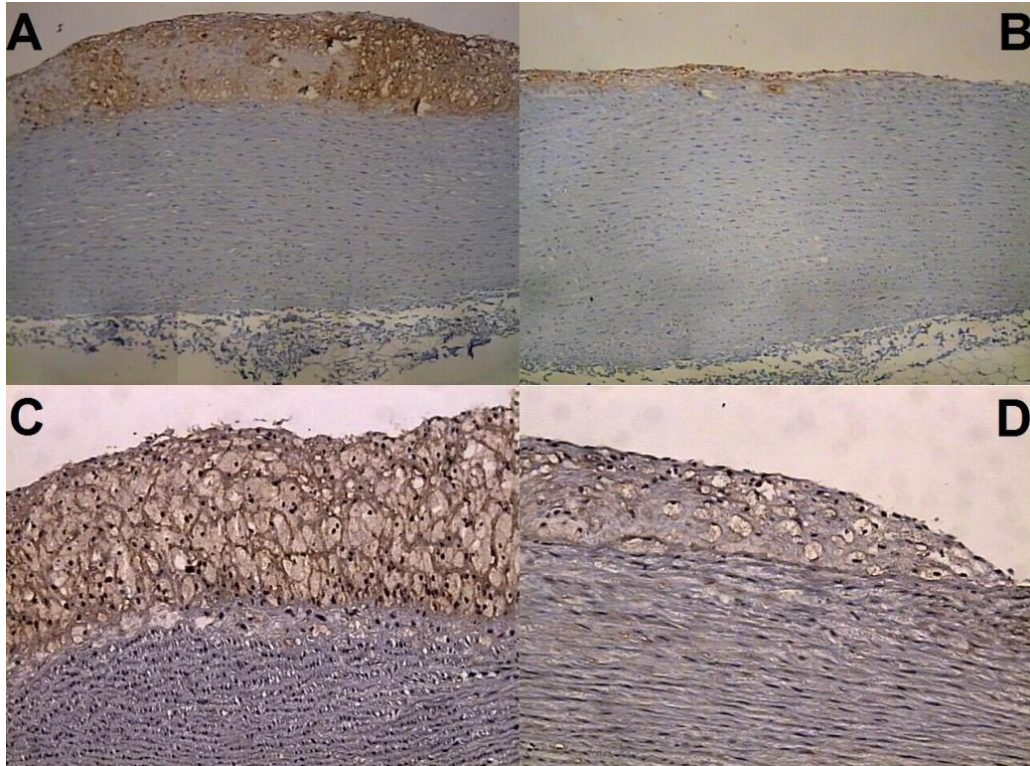


Figura 5. Fotomicrografia de cortes do arco aórtico, de coelhos controle (A e C) e tratados com a associação NE-ETO e NE-MTX (B e D). A e B foram corados por imunohistoquímica com anticorpo anti-RAM-11 e C e D com anti-MMP-9 (aumento de 100X).

Cortes adicionais foram corados por imunohistoquímica com anticorpo anti-CD3 e anti-Foxp3. Não houve diferença entre os grupos controle e tratado com relação à presença de linfócitos CD3 positivos, conforme mostra a figura 6.

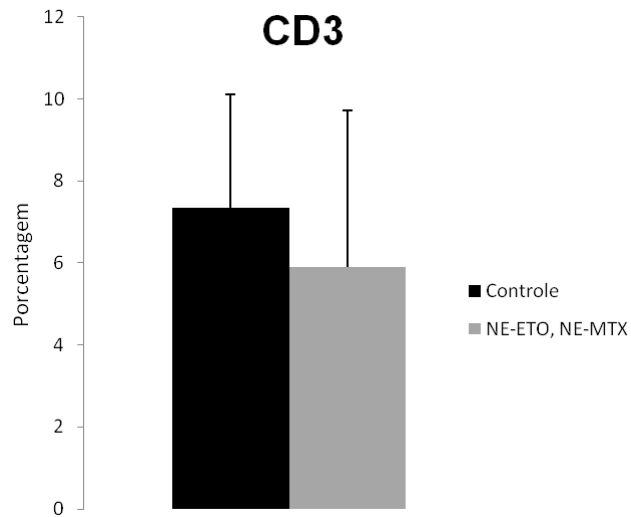


Figura 6. Porcentagem de linfócitos T CD3 positivos nos animais controle e tratados.

Entretanto, quando avaliamos a subpopulação de linfócitos positivos para Foxp3, houve um aumento na porcentagem destas células no grupo tratado em comparação ao grupo controle, conforme mostra a figura 7.

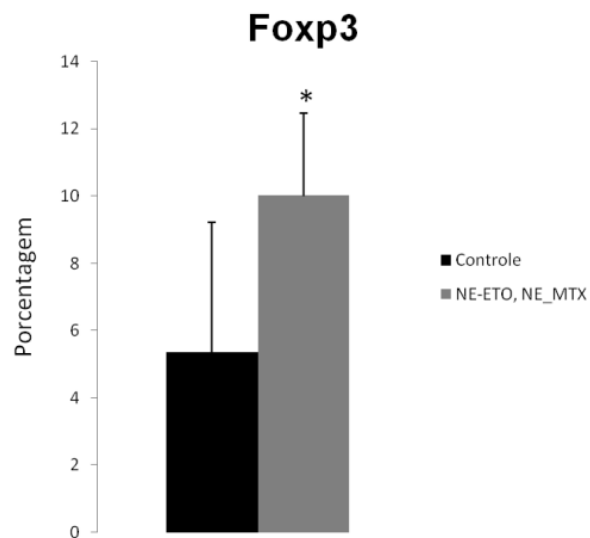


Figura 7. Porcentagem de linfócitos T regulatórios Foxp3 positivos. * $p < 0,05$ vs controle.

A figuras 8 e 9 apresentam fotomicrografias de lâminas submetidas à técnica de TUNEL, para verificação da presença de células apoptóticas por microscopia de fluorescência nos animais controle e tratados, respectivamente.

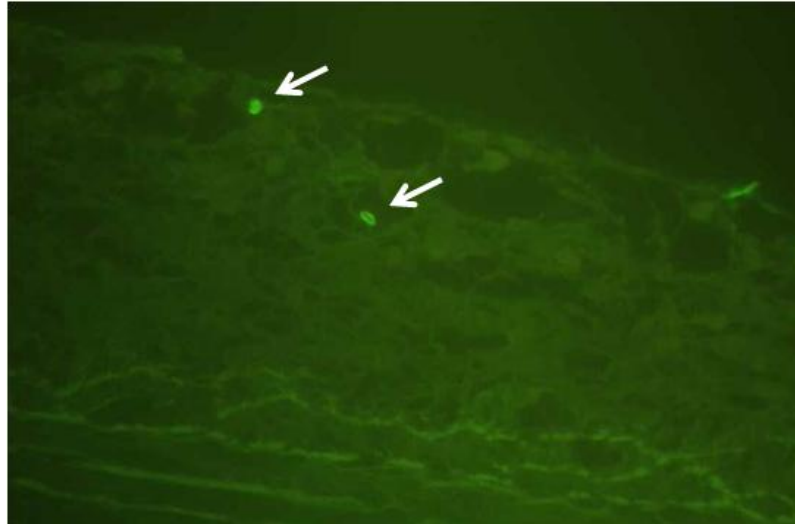


Figura 8. Setas indicam células apoptóticas na camada íntima da artéria aorta de um animal controle.

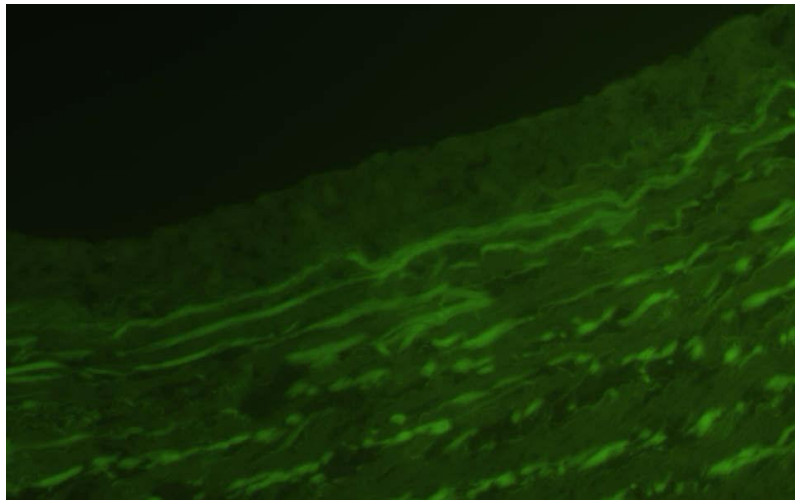


Figura 9. Fotomicrografia de segmento da artéria aorta de animal tratado com a associação NE-ETO, NE-MTX.

Devido a características das lesões ateroscleróticas deste modelo experimental, um baixo número de células apoptóticas foi encontrado em ambos os

grupos. Entretanto, o grupo controle apresentou quantidade significativamente maior de células apoptóticas em relação ao grupo tratado (12 ± 8 células nos animais controle vs 1 ± 0.8 nos animais tratados, $p < 0,05$).

3.5. Avaliação histológica dos tecidos hepáticos e renais.

A figura 10 mostra uma fotomicrografia de cortes de fígado dos animais controle e tratados com a associação NE-ETO, NE-MTX. Em ambos os grupos foi possível observar presença discreta de pequenos vacúolos brancos no citoplasma dos hepatócitos, indicando o início de uma esteatose do tipo microvesicular. Os hepatócitos apresentaram tamanho semelhante, a arquitetura hexagonal dos lóbulos hepáticos apresentou-se preservada e não houve evidência de fibrose nos tratos portais.

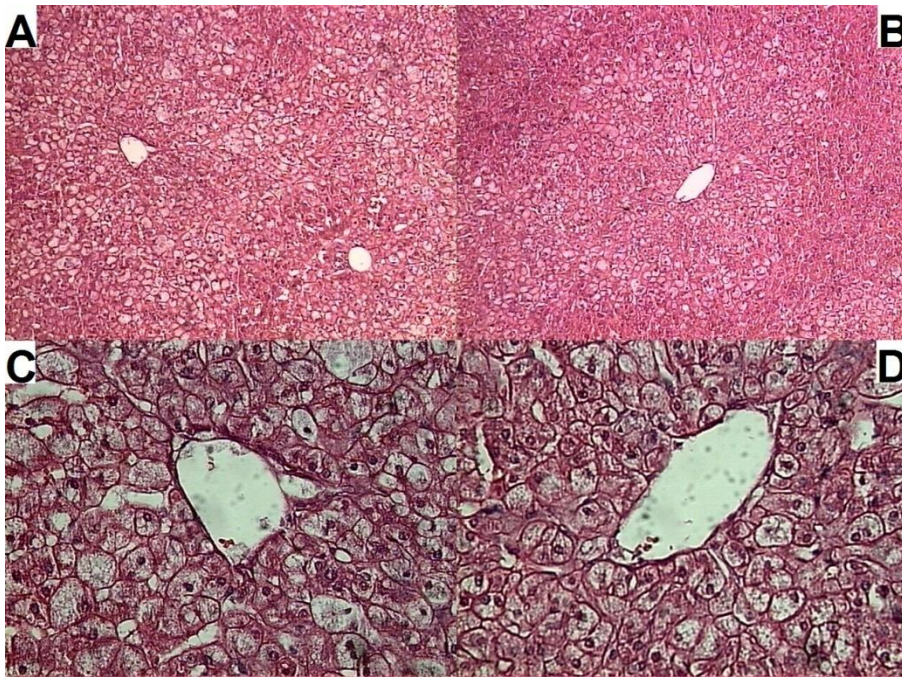


Figura 10. Fotomicrografia de cortes de fígado de animais controle (A e C) e tratados (B e D). Aumento de 100X (A e B) e 400X (C e D).

Cortes histológicos do rim dos animais controle e tratados são apresentados na figura 11. Nenhuma alteração significativa foi observada. O número de glomérulos na região justa-glomerular é similar em ambos os grupos. A forma, volume e celularidade dos glomérulos não apresentaram alterações. Não houve evidência de alterações no espaço de bowman, túbulos, região intersticial, artérias arqueadas e interlobulares ou arteríolas.

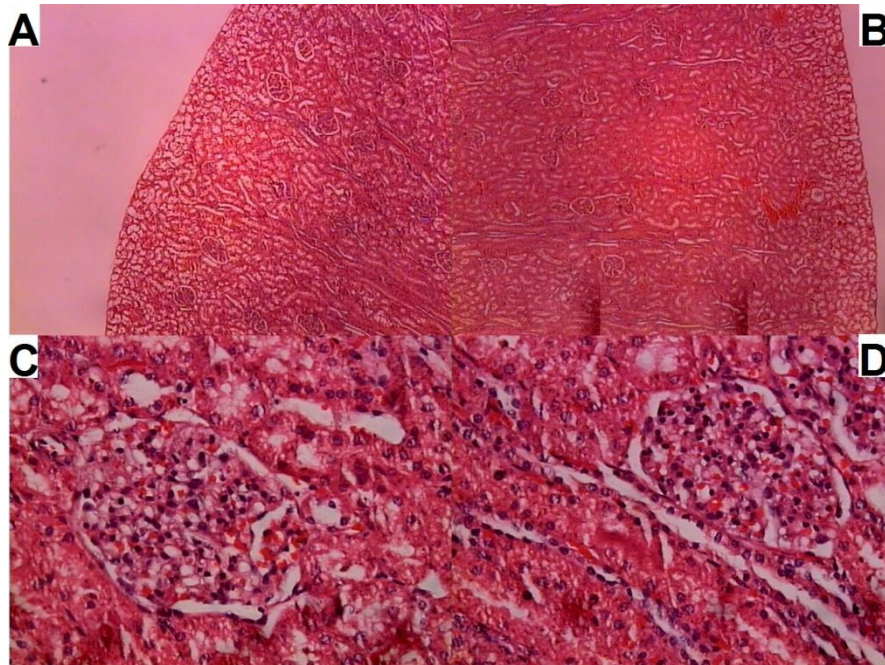


Figura 11. Fotomicrografia de cortes de rim de animais controle (A e C) e tratados (B e D). Aumento de 100X (A e B) e 400X (C e D). A e B mostram a região cortical e C e D mostram um glomérulo.

6. Discussão

No presente estudo, mostramos que a associação NE-ETO, NE-MTX reduz drasticamente as lesões ateroscleróticas na aorta de coelhos submetidos a uma dieta rica em colesterol.

Estudos prévios de nosso laboratório mostram que a utilização de nanopartículas como veículo para quimioterápicos reduz a toxicidade associada a

estes fármacos e aumenta sua eficiência terapêutica no tratamento de alguns tipos de câncer, bem como no tratamento da aterosclerose (MARANHÃO et al. 2008; MARANHÃO et al. 1992; VALDUGA et al. 2003; AZEVEDO et al. 2005; PINHEIRO et al.; 2006).

O paclitaxel, fármaco antiproliferativo utilizado no revestimento de stents farmacológicos, foi associado a uma nanoemulsão lipídica rica em colesterol, de composição semelhante à utilizada neste estudo. Coelhos submetidos a uma dieta contendo 1% de colesterol foram tratados com o paclitaxel associado à nanoemulsão, resultando em uma redução de 60% nas áreas de lesão aterosclerótica, sem apresentar toxicidade (MARANHAO, TAVARES, *et al.*, 2008).

Um estudo em andamento em nosso laboratório mostra que o metotrexato associado à nanoemulsão lipídica em monoterapia reduz as lesões ateroscleróticas em aproximadamente 65% e não apresenta toxicidade. Em contraste, o tratamento com a formulação comercial apresentou a mesma eficiência terapêutica, porém, com acentuada toxicidade hematológica (BULGARELLI, ALMEIDA, *et al.*, 2009).

A ausência de toxicidade do tratamento em monoterapia com fármacos antiproliferativos associados à nanoemulsão nos levou a considerar a possibilidade da associação de dois fármacos visando aumentar a eficácia do tratamento, de modo semelhante ao que ocorre na quimioterapia do câncer. De fato, o tratamento com a associação de metotrexato e paclitaxel, ambos veiculados em nossa nanoemulsão lipídica, reduz as lesões ateroscleróticas em aproximadamente 80% (Vitorio, Higushi e Maranhão, 2009).

A redução de aproximadamente 84% das lesões ateroscleróticas encontrada no presente estudo sugere que os efeitos imunomoduladores do metotrexato,

associados aos efeitos antiproliferativos do etoposídeo atuam de maneira sinérgica ou aditiva no processo aterogênico.

Nossos resultados mostram que a redução da aterosclerose ocorreu fundamentalmente por meio de interferência nos processos inflamatórios e proliferativos, visto que os animais permaneceram em um estado constante de hipercolesterolemia durante todo o tratamento. Esta demonstração reforça a importância da inflamação como alvo terapêutico da aterosclerose.

A redução na porcentagem de macrófagos na parede arterial pode ser atribuída aos efeitos imunomoduladores do metotrexato, associados aos efeitos antiproliferativos do etoposídeo, sendo de grande importância a inibição de citocinas e moléculas de adesão. Apesar de não haver redução na porcentagem de células musculares lisas, a quantidade total destas células é menor, devido à redução da camada íntima.

A MMP-9, também conhecida como gelatinase B promove degradação de proteínas da matrix extracelular, sendo um importante fator para a instabilidade das placas ateroscleróticas (JONESA, 2009). Além disso, há evidências de que a MMP-9 estimula a migração e diferenciação de monócitos em macrófagos, tendo como consequência o aumento da captação de lipoproteínas modificadas, o que facilita o desenvolvimento do processo aterogênico. No presente estudo, observamos uma redução significativa da presença desta proteína nos animais tratados com a associação NE-ETO, NE-MTX (JONESA, 2009). Assim, além de ser um fator positivo no sentido de reduzir a invasão de células inflamatórias, a menor quantidade de MMP-9 pode contribuir para a estabilidade das placas ateroscleróticas.

A presença de células apoptóticas na camada íntima constitui outro fator que altera negativamente a estabilidade das placas ateroscleróticas. Os animais tratados com a associação NE-ETO, NE-MTX apresentaram menor quantidade de células apoptóticas em relação aos animais controle. Thorp et al 2008, demonstraram que um receptor do tipo tirosinaquinase denominado Merkt , também conhecido como Eyk, Nyk e Tyro-12, que serve como intermediário na ligação entre células fagócitos e células apoptóticas apresenta disfunções na aterosclerose. Assim, a eficiência da eferocitose é reduzida, resultando em maior número de células apoptóticas, cuja presença na camada íntima estimula a liberação de citocinas e contribui para o aumento do núcleo necrótico, deixando a placa mais suscetível a ruptura (Thorp, Cui, *et al.*, 2008). Mais ainda, Haider et al 2009, observaram uma relação direta entre a quantidade de células apoptóticas e a liberação de metaloproteinases em coelhos submetidos a dieta hipercolesterolêmica (Haider, Hartung, *et al.*, 2009). Possivelmente, a redução do processo inflamatório induzida pela associação de fármacos utilizada no presente trabalho previne a formação de células apoptóticas, embora os mecanismos envolvidos nesta redução permaneçam desconhecidos.

Os principais efeitos potencialmente antiaterogênicos do metotrexato, além da inibição da proliferação celular, incluem principalmente a modulação da função das células T, redução na produção de citocinas, moléculas de adesão e liberação de adenosina (GENESTIER, PAILLOT, *et al.*, 2000).

Células T ativadas estão presentes em placas ateroscleróticas e produzem citocinas que promovem ativação inflamatória nas áreas de lesão. Inúmeros estudos demonstram que o tratamento com metotrexato inibe a produção de citocinas inflamatórias e moléculas de adesão como as interleucinas 4, 6 e 13, interferon

gamma, TNF-alfa, ICAM-1 (“intracellular adhesion molecule-1”) e MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1). Estas moléculas são reconhecidamente importantes na formação das placas ateroscleróticas (Chan e Cronstein, 2002). Gehards et al. e Genestier et. al. observaram que o metotrexato induz apoptose em células T ativadas, enquanto que as células T não ativadas não são afetadas. Adicionalmente, Gehards et al. mostraram que o metotrexato inibe a produção de citocinas inflamatórias em células T ativadas (Gerards, Lathouder, *et al.*, 2003; Genestier, , *et al.*, 1998). Uma possível explicação para esta observação pode ser o aumento na quantidade e atividade de linfócitos T regulatórios, que exercem efeitos imunomoduladores, reduzindo o desenvolvimento da aterosclerose. De fato, há evidências de que a redução nos efeitos supressores das células T regulatórias promove expansão e ativação de células pró-aterogênicas (Goronzy e Weyand, 2006). No presente estudo, não observamos alterações na porcentagem total de linfócitos T CD3 positivos, mas houve aumento na subpopulação de linfócitos T regulatórios Foxp3 positivos, indicando que o metotrexato mantém seus efeitos imunomoduladores mesmo quando associado aos efeitos antiproliferativos do etoposídeo.

É possível que a liberação de adenosina induzida pelo metotrexato apresente um importante papel em seus efeitos antiinflamatórios. Dubey et al demonstraram que células musculares lisas sintetizam adenosina, resultando em inibição da proliferação destas mesmas células, e síntese de colágeno, por meio da ativação dos receptores A2 de adenosina (Dubey, Gillespie e al., 1998). Reiss et al observaram que a ativação de receptores de adenosina A2-alfa estimula a expressão de proteínas envolvidas no transporte reverso do colesterol e inibe a formação de células espumosas (Reiss, Rahman, *et al.*, 2004).

Em estudo realizado por Krainer et al, a retenção de LDL isotopicamente marcada foi avaliada em 72 coelhos alimentados com uma dieta contendo 1% de colesterol que foram tratados com etoposídeo em sua forma comercial. Surpreendentemente, houve menor retenção de LDL na parede arterial destes animais e maior decaimento plasmático de LDL nos animais tratados com etoposídeo. Neste estudo, houve redução de aproximadamente 40% nas áreas de lesão aterosclerótica (Krainer, Rodrigues, *et al.*, 1999).

Moya et al submeteram coelhos New Zealand alimentados com uma dieta contendo 2% de colesterol ao tratamento com etoposídeo em sua forma comercial e verificaram uma redução de aproximadamente 32% nas áreas de lesão. Os animais tratados por Moya et al apresentaram uma redução de aproximadamente 37% na contagem de eritrócitos e não houve alterações na contagem de leucócitos (MOYA, ROTHBLAT, *et al.*, 1992). De modo semelhante, observamos em nosso estudo uma redução de aproximadamente 30% na contagem de eritrócitos, sem alterações na contagem de leucócitos.

A acentuada toxicidade hematológica apresentada pelo etoposídeo, em sua formulação comercial, e a discreta alteração hematológica observada no presente estudo indica que a associação NE-ETO e NE-MTX aumenta a eficácia terapêutica sem potencializar os efeitos tóxicos destes fármacos. De fato, a análise histopatológica do fígado e rim não demonstrou evidências de toxicidade. O início de esteatose do tipo microvesicular observada em ambos os grupos é característico deste modelo experimental, devido à dieta hipercolesterolêmica que é mantida durante todo o tratamento. A ausência de alterações no consumo de dieta e no peso corporal também indica que a toxicidade do tratamento foi evitada.

Outra importante observação provém do fato de que a hipertrigliceridemia induzida pela dieta rica em colesterol não afetou os níveis de HDL-C nos animais tratados como poderia ser esperado. Estados de inflamação crônica alteram as partículas de HDL, reduzindo proteínas que se associam a ela, incluindo a paraoxonase, LCAT, CETP, PLTP, lipase hepática e apo A1. Estas partículas de HDL alteradas possuem menor quantidade de ésteres de colesterol e são enriquecidas de colesterol livre, triacilgliceróis e ácidos graxos livres (Hahn, Grossman, *et al.*, 2008). Como resultado, estas partículas são removidas de maneira mais intensa, apresentam deficiência no transporte reverso do colesterol e menor função antioxidante. Adicionalmente, existem evidências de que estas partículas não apenas perdem suas funções antiinflamatórias, mas de modo contrário, adquirem propriedades pró-inflamatórias, intensificando a oxidação das partículas de LDL e por conseqüência, promovendo a atração de monócitos que deverão captar estas partículas oxidadas (Hahn, Grossman, *et al.*, 2008). Assim, é possível que a redução do processo inflamatório que deve ocorrer em função do tratamento com a associação NE-ETO, NE-MTX reduza a degradação das partículas de HDL e melhore suas propriedades funcionais.

A redução na porcentagem de macrófagos na parede arterial pode ser atribuída aos efeitos imunomoduladores do metotrexato, associados aos efeitos antiproliferativos do etoposídeo, sendo de grande importância a inibição de citocinas e moléculas de adesão. Apesar de não haver redução na porcentagem de células musculares lisas, a quantidade total destas células é melhor, devido à redução da camada íntima.

7. Conclusões

O tratamento com a associação de etoposídeo e metotrexato, veiculados em uma nanoemulsão lipídica reduz de maneira notável as lesões ateroscleróticas em coelhos submetidos a uma dieta hipercolesterolêmica. Houve efeito sinérgico ou aditivo em função da associação destes fármacos, com redução na toxicidade.

Os níveis de HDL-C se mantiveram constantes nos animais tratados, apesar da hipertrigliceridemia, possivelmente devido à redução do processo inflamatório.

Portanto, a associação destes fármacos antiproliferativos veiculados em um sistema nanoparticulado pode ser promissora para o tratamento da aterosclerose e estudos clínicos devem ser realizados para verificar sua possibilidade de utilização em humanos.

8. Referências Bibliográficas

ALISSON, A. C. Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward. **Immunopharmacology**, v. 47, p. 63-83, 2000.

AUBRY, M. C. et al. Differences in atherosclerotic coronary heart disease between subjects with and without rheumatoid arthritis. **J Rheumatol**, v. 34, n. 5, p. 937-42, 15 março 2007.

AZEVEDO, C. et al. Plasma kinetics and uptake by the tumor of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) associated to etoposide oleate in patients with ovarian carcinoma. **Gynecol Oncol**, v. 97, p. 178-182, 2005.

BACCHETTA, R.; GREGORI, S.; RONCAROLO, M. G. CD4+ regulatory T cells: mechanisms of induction and effector function. **Autoimmun Rev**. 4.

BERTINO, J. R. The mechanism of action of the folate antagonists in man. **Cancer Res**, p. 1286-1306, 1963.

BOBRY SHEV, Y. V.; LORD, R. S. A. S-100 positive cells in human arterial intima and in atherosclerotic lesions. **Cardiovasc Res**, v. 29, p. 689-696, 1995.

BOER, O. J. Low numbers of foxp3 positive regulatory t cells are present in all developmental stages of human atherosclerotic lesions. **PlosOne**, v. 8, 2007.

BRARA, P. S. et al. Pilot trial of oral rapamycin for recalcitrant restenosis. **Circulation**, v. 107, p. 1722-24, 2003.

BROWN, M.; GOLDSTEIN, J. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science**, p. 34-47, 1986.

BULGARELLI, A. et al. Methotrexate associated to lipid nanoemulsion reduces atherosclerosis induced in rabbits and has minimal side effects. **XV International Symposium on Atherosclerosis**. Boston, 2009.

CHAN, E. S.; CRONSTEIN, B. N. Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases. **Arthritis Res**, v. 4, p. 266-73, 2002.

CHATENOUD, L. et al. Anti-CD3 antibody induces long-term remission of overt autoimmunity in nonobese diabetic mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 1994. 123-127.

DAVID-COUTO, R.; DALLAN, L.; LISBOA, L. Deposition of cholesterol from a lipid microemulsion in fragments of blood vessels excised from patients during coronary bypass surgery. **Atheroscler Suppl**, v. 2, p. 227-8, 2003.

DEL RINCON, I. D. et al. A High incidence of cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by tradicional cardiac risk factors. **Arthritis Rheum**, v. 44, p. 2793-45, 2001.

DUBEY, R. K.; GILLESPIE, D. G.; AL., M. E. Adenosine inhibits growth of human aortic smooth muscle cells via A2B receptors. **Hypertension**, v. 31, p. 516-21, 1998.

DWORACKA, M. . W. H. B. M. . E. A. Pro-atherogenic alterations in t-lymphocyte subpopulations related to acute hyperglycaemia. **Circulation Journal**, v. 71, p. 962-967, 2007.

DZAU, V. J.; BRAUN-DULLAEUS, R. C.; SEDDING, D. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. **Nat Med**, p. 1249-56, 2002.

GALIS Z.S., K. J. J. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherosclerosis: The good, the bad and the ugly. **Circ Res**, 2002. 251–262.

GENESTIER, L. et al. Immunosuppressive properties of methotrexate: apoptosis and clonal deletion of activated peripheral cells. **J Clin Invest**, v. 108, p. 322-8, 1998.

GENESTIER, L. et al. Mechanisms of action of methotrexate. **Immunopharmacology**, v. 47, p. 247-57, 2000.

GERARDS, A. H. et al. Inhibition of cytokine production by methotrexate. Studies in healthy volunteers and patients with rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford)**, v. 42, p. 1189-96, 2003.

GINSBURG, G. S.; SMALL, D. M.; ATKINSON, D. Microemulsions of phospholipids and cholesterol esters. **J Biol Chem**, v. 257, p. 8216, 1982.

GORONZY, J. J.; WEYAND, C. M. Immunosuppression in atherosclerosis: mobilizing the opposition within. **Circulation**. 2006 Oct 31;114(18):1901-4., out 2006. 1901-1904.

HAHN, B. H. et al. Altered lipoprotein metabolism in chronic inflammatory states: proinflammatory high-density lipoprotein and accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 10, p. 213, 2008.

HAIDER, N. et al. Dual molecular imaging for targeting metalloproteinase activity and apoptosis in atherosclerosis: molecular imaging facilitates understanding of pathogenesis. **J Nucl Cardiol**, set-out 2009. 753-762.

HANDE, K. R. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. **Eur J Cancer**, v. 34, p. 1514-21, 1998.

HIGASHIKATA, T.; YAMAGISHI, M.; T., H. Altered expression balance of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human carotid plaque disruption: results of quantitative tissue analysis using real-time RT-PCR method. **Atherosclerosis**, 172, 2006. 165-172.

HILL, R. et al. Drug-eluting stents: a systematic review and economic evaluation. **Health Technol Assess**, v. 11, p. 221, 2007.

INOUE, T.; NODE, K. Molecular basis of restenosis and novel issues of drug-eluting stents. **Circ J**, v. 73, p. 615-21, 2009.

JONASSON, L. et al. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. **Arteriosclerosis**, p. 131-138, 1986.

JONESA, G. T. Active matrix metalloproteinases 3 and 9 are independently associated with coronary in-stent restenosis. **Atherosclerosis**, 2009.

JURCIC, J.; SCHEINBERG, D.; HOUGHTON, A. Monoclonal antibody therapy of cancer. **Cancer Chemother Biol Response Modif**, v. 16, p. 168-88, 1996.

KOVANEN, P. T.; KAARTINEN, M.; PAAVONEN, T. Infiltrates of activated mast cells at the site of coronary atheromatous erosion or rupture in myocardial infarction. **Circulation**, v. 92, p. 1084-1088, 1994.

KRAINER, M. et al. Influence of etoposide on the retention of radiolabeled low-density lipoprotein in the arterial wall. **Arch Pathol Lab Med**, p. 514-8, 1999.

LI, J. J.; GAO, R. L. Should atherosclerosis be considered a cancer of the vascular wall? **Med Hypotheses**, v. 64, p. 694-8, 2005.

LIBBY, P.; RIDKER, P.; MASERI, A. Inflammation and atherosclerosis. **Circulation**, v. 105, p. 1135-43, 2002.

LINCOFF, A.; TOPOL, E.; ELLIS, S. Local drug delivery for the prevention of restenosis: fact, fancy, and future. **Circulation**, v. 90, p. 2070-84, 1994.

LO PRETE, A. et al. Evaluation in melanoma-bearing mice of an etoposide derivative associated to a cholesterol-rich nanoemulsion. **J Pharm Pharmacol**, v. 58, p. 801-808, 2006.

MARANHÃO, R. C. et al. Metabolic behavior in rats of a non-protein microemulsion resembling LDL. **Lipids**, v. 28, p. 691-696, 1993.

MARANHAO, R. et al. Increased plasma removal of microemulsions resembling the lipid phase of low-density lipoproteins (LDL) in patients with acute myeloid leukemia: a possible new strategy for the treatment of the disease. **Braz J Med Biol Res**, v. 25, p. 1003-1007, 1992.

MARANHAO, R. et al. Paclitaxel associated with cholesterol-rich nanoemulsions promotes atherosclerosis regression in the rabbit. *Atherosclerosis*. **Atherosclerosis**, v. 197, p. 959-66, 2008.

MARANHAO, R.; ROLAND, I. A.; TOFFOLETTO, O. Plasma kinetic behavior in hyperlipidemic subjects of a lipidic microemulsion that binds to low density lipoprotein receptors. **Lipids**, v. 32, p. 627-33, 1997.

MARANHAO, R.; TERCYAK, A.; REDGRAVE, T. G. Effects of cholesterol content on the metabolism of protein-free emulsion models of lipoproteins. **Biochem Biophys Acta**, v. 875, p. 247-255, 1986.

MCMILLAN, W. D. et al. In situ localization. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 15, 1995. 1139–1144.

MORENO, D. et al. Characterization of cisplatin cytotoxicity delivered from PLGA-systems. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 12, p. 503-12, 2008.

MORGANTI, M. et al. Atherosclerosis and cancer: common pathways on the vascular endothelium. **Biomed Pharmacother**, p. 317-24, setembro 2002.

MOURA, J. Uso de uma nanoemulsão rica em colesterol (LDE) como veículo para o di-dodecil metotrexato. **Dissertação. Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2007.

MOYA, M. et al. Etoposide treatment suppresses atherosclerotic plaque development in cholesterol-fed rabbits. **Arterioscler Thromb**, v. 12, p. 1363-1370, 1992.

NEWBY, A. C. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. **Physiol Rev**, 85, 2005. 1–31.

NEWBY, A. C. Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** , 2008. 2108-2014.

PINHEIRO, K. et al. Plasma kinetics of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) in patients with Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma and a preliminary study on the toxicity of etoposide associated with LDE. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 57, p. 624-30, 2006.

REISS, A. B. et al. Adenosine A2A receptor occupancy stimulates expression of proteins involved in reverse cholesterol transport and inhibits foam cell formation in macrophages. **J Leukoc Biol**, v. 76, p. 727-34, 2004.

ROSOWSKY, A. et al. Methotrexate analogues. Divergent influence of alkyl chain length on the dihydrofolate reductase affinity and cytotoxicity of methotrexate monoesters. **J Med Chem**, v. 27, p. 605-9, 1987.

ROSS, R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. **New England Journal of Medicine**, v. 340, p. 115-126, 1999.

SAPIENZA, P.; DI MARZO, L.; BORRELLI, V. Metalloproteinases and their inhibitors are markers of plaque instability. **Surgery**, 2005. 355-363.

SCHRIJVERS, D. M. et al. Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages is impaired in atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 25, jun 2005. 1256-1261.

SOUSA, J. et al. Lack of neointimal proliferation after implantation of sirolimus-coated stents in human coronary arteries: a quantitative coronary angiography and three-dimensional intravascular ultrasound study. **Circulation**, v. 16, p. 192-95, 2001.

STEFFENS, S. et al. Short-term treatment with anti-CD3 antibody reduces the development and progression of atherosclerosis in mice. **Circulation**, 2006. 1977–1984.

STONE, G. et al. Investigators. Comparison of a polymer-based paclitaxel-eluting stent with a bare metal stent in patients with complex coronary artery disease: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 294, p. 1215-23, 2005.

SUKHOVA, G. K. et al. Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. **Circulation**, 1999. 2503-2509.

THORP, E. et al. Merck receptor mutation reduces efferocytosis efficiency and promotes apoptotic cell accumulation and plaque necrosis in atherosclerotic lesions of apoe^{-/-} mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, agosto 2008. 1421-1428.

TURK, U. Statin use is associated with decreased cd-40 ligand expression on t lymphocytes of coronary atheroma plaque in patients with stable coronary artery disease. **Anadolu Kardiyol Derg**, v. 8, p. 93-103, 2008.

TYAG, P. et al. Evaluation of the antitumour activity of liposomal formulations of etoposide against choriocarcinoma xenografts in Balb/c nu/nu mice. **Pharm Commun**, v. 5, p. 595, 1999.

VALDUGA, C. et al. Use of a cholesterol-rich microemulsion that binds to low-density lipoprotein receptors as vehicle for etoposide. **J Pharm Pharmacol**, v. 55, p. 1615-22, 2003.

VISSE, R. . N. H. Visse R, Nagase H: Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circ Res**, 2003. 827-839.

VITORIO, T. S.; HIGUSHI, M. L.; MARANHÃO, R. C. Combined chemotherapy associated with lipidic nanoemulsions achieves marked atherosclerosis regression in the rabbit. **Atherosclerosis Supplements**, Boston, 10, 2009.

WOLFE, F.; FREUNDLICH, B.; STRAUS, W. L. Increase in cardiovascular and cerebrovascular disease prevalence in rheumatoid arthritis. **J Rheumatol**, v. 30, p. 36-40, 2003.