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

**Paclitaxel e metotrexato associados a uma nanoemulsão
lipídica no tratamento da aterosclerose em coelhos**

Tatiana Solano Vitório

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão

São Paulo
2009

TATIANA SOLANO VITÓRIO

**Paclitaxel e metotrexato associados a uma nanoemulsão lipídica no
tratamento da aterosclerose em coelhos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Análises Clínicas

Orientador: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão

São Paulo
2009

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

V845p Vitório, Tatiana Solano
Paclitaxel e metotrexato associados a uma nanoemulsão
lipídica no tratamento da aterosclerose em coelhos / Tatiana
Solano Vitório. -- São Paulo, 2009.
68p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.
Orientador: Maranhão, Raul Cavalcante

I. Aterosclerose I. T. II. Maranhão, Raul Cavalcante,
orientador.

616.136 CDD

Tatiana Solano Vitório

Paclitaxel e metotrexato associados a uma nanoemulsão lipídica no
tratamento da aterosclerose em coelhos

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais,

Elza e João Roberto,

por me ensinarem a buscar

o meu caminho,

por me darem a base

para tal,

e pelo apoio incondicional,

sempre.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Raul Cavalcante Maranhão, pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

A todos os funcionários do Laboratório de Metabolismo de Lípidos do InCor, pelo suporte na realização deste trabalho.

Aos funcionários da Secretaria do Departamento de Análises Clínicas e da Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da FCF-USP, pelas dúvidas esclarecidas e auxílio na parte burocrática.

A todos os companheiros de pós-graduação do Laboratório de Metabolismo de Lípidos do InCor pelo apoio e amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro.

Ao César, pelo companheirismo, apoio, paciência, e por sempre me ajudar a segurar as pontas.

E aos amigos, por tudo.

EPÍGRAFE

..."De tudo, ficaram três coisas: a certeza de que ele estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sono uma ponte, da procura um encontro"...

Fernando Sabino

RESUMO

VITÓRIO, T. S. **Paclitaxel e metotrexato associados a uma nanoemulsão lipídica no tratamento da aterosclerose em coelhos**. 2009. 68 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Em estudos anteriores, mostramos que uma nanoemulsão artificial (NEm) de composição semelhante à da lipoproteína de baixa densidade se liga a receptores de lipoproteínas de baixa densidade após sua injeção na corrente sanguínea. Como tais receptores estão superexpressos em células com altas taxas de proliferação, como ocorre no câncer e na aterosclerose, a NEm pode ser utilizada como veículo para direcionar drogas a estas células, diminuindo sua toxicidade e aumentando sua ação farmacológica. Recentemente, reportamos que a associação de um derivado do agente antiproliferativo paclitaxel, o oleato de paclitaxel (OPTX) à NEm reduziu em 60% a área lesionada de aortas de coelhos submetidos à dieta rica em colesterol. Neste estudo, testamos o efeito sinérgico da terapia combinada do OPTX-NEm com um derivado do metotrexato, o di-dodecil metotrexato (DMTX), também associado à NEm. O MTX, além de sua ação antiproliferativa, também possui propriedades imunossupressoras. Coelhos machos da raça Nova Zelândia foram submetidos à dieta enriquecida com 1% de colesterol durante 8 semanas. A partir da quinta semana de consumo da dieta, 8 animais foram injetados semanalmente com solução salina por via endovenosa (grupo controle) e 8 receberam o tratamento combinado de OPTX-NEm (4mg/Kg) com DMTX-NEm (4mg/Kg), por 4 semanas. Ao final das 8 semanas, os animais foram sacrificados. As aortas dos animais foram retiradas, abertas longitudinalmente, fixadas em formalina tamponada a 10% e coradas com Escarlata R para a análise macroscópica da lesão. Os arcos aórticos foram seccionados em fragmentos de 5mm, embebidos em parafina e os cortes realizados foram corados com hematoxilina-eosina, para a determinação da área das camadas íntima e média. O tratamento combinado de OPTX-NEm com DMTX-NEm reduziu a área das lesões em 82%, em comparação ao grupo controle, e a razão da área da camada íntima/área da camada média diminuiu de $0,82 \pm 0,08$ para $0,08 \pm 0,06$ ($p < 0,01$). Por meio das avaliações da variação do consumo de ração, peso corporal e contagem de leucócitos totais ($p > 0,05$), pode-se afirmar que os tratamentos não apresentaram toxicidade significativa, exceto pela queda na contagem de eritrócitos ($p < 0,05$). Como conclusão, a quimioterapia combinada de OPTX e DMTX associados à NEm como veículo mostrou-se eficaz na redução da área de lesão aterosclerótica em coelhos e a toxicidade relacionada aos fármacos foi nitidamente reduzida.

Palavras-chave: Aterosclerose. Nanoemulsão. Paclitaxel. Metotrexato. Direcionamento farmacológico.

ABSTRACT

VITÓRIO, T. S. **Paclitaxel and methotrexate associated with a lipidic nanoemulsion in the treatment of atherosclerosis in rabbits.** 2009. 68 p. Dissertation (Master Degree) – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2009.

In previous studies we have shown that an artificial nanoemulsion (NEm) that resemble LDL composition are taken-up by LDL receptors after injection into the bloodstream. As those receptors are upregulated in cells with higher proliferation rates, as occurs in cancer and atherosclerosis, NEm can be used as vehicle to direct drugs against those cells, diminishing toxicity and increasing pharmacological action. Recently, we reported that association of antiproliferative agent paclitaxel derivative, paclitaxel oleate (OPTX) to NEm reduced by 60% the lesion area of cholesterol-fed rabbits. In this study, the combined chemotherapy of OPTX-NEm with a methotrexate derivative, di-dodecil methotrexate (DMTX), also associated with NEm, was tested for synergistic effects. MTX, besides antiproliferative action, has also immunosuppressant properties. Male New Zealand rabbits were fed a 1% cholesterol diet for 60 days. Starting from day 30, 8 animals were treated with 4 weekly I.V. saline solution injections (control group) and 8 with combined OPTX-NEm (4 mg/kg) plus DMTX-NEm (4 mg/kg) for additional 30 days. On day 60, the animals were sacrificed for analysis. Aorta was excised, open longitudinally, placed in 10% buffered formalin and stained in Scarlet R for lesion macroscopic analysis. Segments of 5mm of the aortic arch were embedded in paraffin and sections were taken and stained in hematoxylin-eosin for intima and media area measurement. In comparison with controls, treatment with combined OPTX-NEm plus DMTX-NEm reduced the lesion area by 82% and the intima layer/media layer area ratio was decreased from $0,82 \pm 0,08$ to $0,08 \pm 0,06$ ($p < 0.01$). Except for decrease in erythrocyte count ($p < 0.05$), treatments were devoid of significant toxicity, as evaluated by food intake, body weight and leucocyte count ($p > 0.05$). In conclusion, this novel approach consisting in combined chemotherapy of OPTX and DMTX using NEm as a drug-targeting vehicle showed effective lesion area regression in rabbits and marked toxicity reduction.

Keywords: Atherosclerosis. Nanoemulsion. Paclitaxel. Methotrexate. Drug-targeting.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Paclitaxel	14
1.2	Metotrexato	16
1.3	Nanopartículas lipídicas artificiais como transportadoras de fármacos	17
1.4	Quimioterapia combinada	22
2	JUSTIFICATIVA	24
3	OBJETIVO	26
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	Material utilizado	29
4.2	Preparo da NEm	29
4.3	Incorporação do OPTX e do DMTX à NEm	30
4.4	Animais utilizados no estudo	31
4.5	Preparo da dieta rica em colesterol	31
4.6	Protocolo experimental	32
4.7	Avaliação do consumo de ração e do peso corporal dos animais	33
4.8	Avaliação dos efeitos hematológicos do tratamento	33
4.9	Avaliação do perfil lipídico dos animais	33
4.10	Análise macroscópica das aortas	34
4.11	Análise microscópica dos arcos aórticos	34
4.12	Análise imunohistoquímica dos arcos aórticos	35

4.13	Análise estatística	35
5	RESULTADOS	36
5.1	Avaliação do consumo de ração e do peso corporal dos animais	37
5.2	Avaliação dos efeitos hematológicos do tratamento	39
5.2.1	Contagem de eritrócitos e leucócitos totais	39
5.2.2	Contagem diferencial de leucócitos	40
5.3	Avaliação do perfil lipídico dos animais	41
5.4	Análise macroscópica das aortas	42
5.5	Análise microscópica dos arcos aórticos	43
5.6	Análise imunohistoquímica dos arcos aórticos	45
6	DISCUSSÃO	47
7	CONCLUSÕES	53
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
	ANEXOS	65

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A aterosclerose é uma doença progressiva caracterizada pelo espessamento e acúmulo de lípidos, células inflamatórias e elementos fibrosos na camada íntima das artérias, principalmente as de calibre médio e grande, produzindo placas ateromatosas (YLÄ-HERTTUALA *et al.*, 1996; LUSIS; MAR; PAJUKANTA, 2004). Estas, também denominadas fibrogordurosas, são formadas de uma placa focal elevada no interior da íntima com centro lipídico, principalmente colesterol e ésteres de colesterol, que se projeta na luz das artérias (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000; ZIPES, 2005). Múltiplos processos estão envolvidos na fisiopatologia da aterosclerose, incluindo disfunção endotelial, inflamação, proliferação vascular e alterações da matriz (DZAU; BRAUN-DULLAEUS; SEDDING, 2002).

Diversos fatores, como hipertensão arterial, *diabetes mellitus*, tabagismo e hipercolesterolemia podem alterar a homeostase do endotélio vascular, prejudicando suas funções na vasoconstrição, na coagulação e aumentando a permeabilidade vascular (EATON, 2005). Tal comprometimento funcional do endotélio facilita a penetração no espaço subendotelial de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) pequenas e densas e remanescentes de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) (HOMMA, 2004).

Quando elevadas na circulação, estas lipoproteínas se ligam a proteoglicanos, aumentam seu tempo de retenção na íntima arterial e podem sofrer oxidação por radicais livres produzidos por células endoteliais adjacentes, células musculares lisas ou macrófagos isolados (ZIPES, 2005; CHOY, 2004). A retenção e modificação destas lipoproteínas são eventos iniciais do processo aterogênico que

desencadeiam a resposta inflamatória na parede arterial (WILLIAMS; TABAS, 1995; STAELS, 2002). O processo inflamatório em si também prejudica a função de barreira do endotélio, aumentando a permeabilidade vascular (VAN NIEUW AMERONGEN; VAN HINSBERGH, 2003).

As partículas de LDL oxidadas (oxLDL), altamente aterogênicas, estimulam as células endoteliais a expressar moléculas de adesão (VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina) e a secretar citocinas (IL-1, IL-6 e TNF- α) e fatores quimiotáticos para monócitos (MCP-1), desencadeando a migração de monócitos aos sítios de lesão e sua transformação em macrófagos (CHOY, 2004; BERLINER, 1990; LIBBY; THEROUX, 2005). Os macrófagos ativados fagocitam as oxLDL por meio dos receptores scavenger expressos em sua superfície, formando as células espumosas (YLÄ-HERTTUALA *et al.*, 1989; WU; MOULTON; GLASS, 1992; GLASS; WITZTUM, 2001; STOCKER; KEANEY JUNIOR, 2004).

Como consequência da resposta inflamatória, as células musculares lisas migram da camada média e se acumulam na íntima, onde proliferam. Estas células também são capazes de acumular lípidos, principalmente ésteres de colesterol, provavelmente pela presença de receptores de oxLDL (CD36 scavenger e "lectinlike Ox-LDL receptor 1", LOX-1) (KATAOKA *et al.*, 1999; RICCIARELLI; ZINGG; AZZI, 2000), ocorrendo assim a formação de mais células espumosas (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

Em conjunto com células endoteliais e monócitos, as células musculares lisas, em resposta a diversos sinais oxidativos, hemodinâmicos, inflamatórios e auto-imunes, secretam metaloproteinases, que degradam a matriz extracelular e modulam diversas funções das células vasculares como ativação, proliferação, migração e morte celular (LIBBY; THEROUX, 2005).

Enquanto os fatores que estimulem a disfunção endotelial persistirem, haverá adesão de monócitos, migração subendotelial de células musculares lisas e acúmulo de lípides no interior dos macrófagos e das células musculares lisas, produzindo finalmente agregados de células espumosas na íntima, que aparecem macroscopicamente como estrias gordurosas (GLASS; WITZTUM, 2001; STOCKEY; KEANEY JUNIOR, 2004).

A proliferação das células musculares lisas e a deposição de matriz extracelular são processos que se crônicos, transformarão a estria gordurosa em ateroma fibrogorduroso, pela deposição adicional de colágeno e proteoglicanos, além da formação da cápsula fibrosa pelo tecido conjuntivo proeminente na face da íntima. A proliferação celular contínua sobre os ateromas produz então as placas fibrosas (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000; PLUTZKY, 2003), que quando comprometidas por trombose, hemorragia e/ou calcificação, desencadeiam eventos clínicos agudos, como isquemia cardíaca e infarto do miocárdio, decorrentes da oclusão arterial.

A proliferação vascular tem um papel importante na fisiopatologia da aterosclerose e está relacionada a outros processos celulares, como inflamação, apoptose e alterações da matriz (DZAU; BRAUN-DULLAEUS; SEDDING, 2002). Alguns procedimentos utilizados para tratar a redução do lúmen vascular, como a angioplastia com balão e o implante de *stents*, podem desencadear a proliferação de células musculares lisas no local por lesão mecânica, o que inicia uma cascata de eventos, levando à restenose (KADAR; GLASZ, 2001).

Desse modo, o melhor conhecimento do mecanismo das doenças vasculares levou a um maior interesse pela terapia antiproliferativa, possibilitando o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento que podem inibir o processo da

proliferação vascular, por meio de agentes farmacológicos que bloqueiam fases específicas do ciclo celular (DZAU; BRAUN-DULLAEUS; SEDDING, 2002), como o paclitaxel e o metotrexato.

1.1 Paclitaxel

No começo dos anos 70, o paclitaxel (PTX) foi isolado por Wani e colaboradores a partir do extrato da casca do teixo do Pacífico, chamado *Taxus brevifolia* (WANI *et al.*, 1971). O PTX age nos microtúbulos, promovendo a polimerização da tubulina (SCHIFF; FANT; HORWITZ, 1979). Os microtúbulos têm como principal função promover a divisão celular durante a mitose, mas também estão envolvidos em outras funções essenciais à célula, como funções de interface, excreção, mobilidade e transmissão de sinais no transporte intracelular de organelas.

Os microtúbulos formados pela indução do PTX são estáveis e disfuncionais, o que leva a um desequilíbrio entre a formação de microtúbulos e sua dissociação em tubulina (PARNESS; HORWITZ, 1981). Este desequilíbrio compromete as fases G2 (intervalo pré-mitótico) e M (mitose), bloqueando a divisão, proliferação e funções vitais das células e provocando, desse modo, morte celular por apoptose. Por sua atividade citotóxica, o PTX tem sido utilizado no tratamento de câncer de ovário e mama (PAZDUR *et al.*, 1993; DZAU; BRAUN-DULLAEUS; SEDDING, 2002). O mecanismo preciso pelo qual o PTX é transportado para o interior das células é desconhecido. Supõe-se que devido à sua natureza hidrofóbica, o PTX possa entrar na célula por difusão passiva (MANFREDI *et al.*, 1984; RODRIGUES, 2004).

Um dos problemas iniciais encontrados no uso do PTX estava relacionado com sua fraca solubilidade em água, o que dificultava o desenvolvimento de uma formulação para seu uso clínico (HORWITZ, 1992). O problema de solubilidade foi resolvido, com a formulação do PTX em Cremophor EL. Porém, a utilização do Cremophor EL como veículo trouxeram efeitos secundários indesejados, como reações de hipersensibilidade (KINGSTON, 2001).

Brahn foi o primeiro a reportar, em 1994, que o PTX não só preveniu a indução, mas causou a regressão de artrite pré-existente em um modelo de artrite induzida em ratos (BRAHN; TANG; BANQUERIGO, 1994). O PTX tem sido avaliado em modelos animais de outras diversas doenças. O agente inibiu a progressão de doença policística renal congênita em camundongos, teve efeito protetor em modelos de pancreatite em ratos e inibiu o acúmulo de células musculares lisas após angioplastia em ratos. Esta última observação foi adaptada e hoje, o PTX tem sido utilizado para recobrir *stents* utilizados em angioplastia para evitar a restenose (FITZPATRICK; WHEELER, 2003). Essa técnica permite um contato imediato do fármaco com a parede do vaso, favorecendo seu rápido acúmulo no tecido arterial (HELDMAN *et al.*, 2001). Entretanto, os *stents* eluídos com fármacos, apesar de prevenir a restenose, não reduzem as taxas de mortalidade dos pacientes (STONE *et al.*, 2005).

A ação local do PTX poderia ser substituída por uma ação em toda a árvore coronária. Contudo, para se alcançar as concentrações necessárias para a eficácia terapêutica no tratamento sistêmico, a dose deve ser maior que a dose para ação local, o que leva ao aumento da toxicidade (ONETO *et al.*, 1993). A neutropenia é a principal manifestação da toxicidade do PTX, além das reações de hipersensibilidade associadas ao cremophor EL (WEISS *et al.*, 1990; ROWINSKY *et*

al.,1993), como por exemplo, toxicidade gastrointestinal, que leva à perda de peso (PAZDUR *et al.*, 1993). O veículo também tem influência na função do endotélio e músculos, causando vasodilatação, dificuldade respiratória, letargia e hipotensão (WEISS *et al.*, 1990; ROWINSKY *et al.*, 1990; PAZDUR *et al.*, 1993).

1.2 Metotrexato

O metotrexato (MTX) foi desenvolvido nos anos 40 como um antagonista do ácido fólico. É um quimioterápico de vasta aplicação clínica, sendo utilizado no tratamento de leucemia linfoblástica aguda infantil, coriocarcinoma, tumores trofoblásticos em mulheres, osteosarcoma, linfomas de Burkitt e não-Hodgkin, carcinomas de mama, cabeça, pescoço, ovário e bexiga e micose fúngica.

O mecanismo de ação do MTX é complexo. O MTX requer transporte de membrana especializado, via transportador de folato reduzido, e é um substrato para poliglutamação intracelular, formando metotrexato poliglutamatos. A poliglutamação aumenta o tempo de retenção intracelular do MTX. Dessa maneira, o MTX parece ser um composto que é convertido no agente ativo somente após sua captação pelas células (CHAN; CRONSTEIN, 2002). A ação do MTX resulta na inibição da proliferação de células malignas, por meio da inibição da síntese de novo de purinas e pirimidinas e, conseqüentemente, na síntese e replicação do DNA. (TIAN; CRONSTEIN, 2007).

O MTX também tem sido amplamente utilizado como antiinflamatório no tratamento de doenças auto-imunes, tais como psoríase e artrite reumatóide, bem como um agente imunossupressivo em transplante de órgãos e na terapia de asma

severa (ALLISON, 2000). Existem evidências de redução no risco de doença cardiovascular em pacientes portadores de artrite reumatóide sob uso desse fármaco, por ter efeito antiinflamatório e vasculoprotetor (PRODANOWICH *et al.*, 2005; GONZALES-GAY; GONZALEZ-JUANATEY; MARTIN, 2005).

A ação do MTX se reflete tanto em sua eficácia na terapia de doenças proliferativas como em algumas de suas manifestações de toxicidade (TIAN; CRONSTEIN, 2007). Dentre as várias reações de hipersensibilidade, o MTX pode desencadear anafilaxia, urticária, angioedema, pneumonites aguda, vasculite cutânea, toxicidade epidermóide, anemia hemolítica, citopenia e hepatite. Esses efeitos colaterais ocorrem em virtude da inespecificidade desse agente em relação às células alvo, o que pode ser revertido a partir da ligação do MTX a transportadores que aumentam sua especificidade. Alguns transportadores têm sido desenvolvidos e testados, tais como lipoproteínas de baixa densidade (LDL), transportadores poliméricos, anticorpos, emulsões e liposomas (MARANHÃO; TERCYAK; REDGRAVE, 1986; LUNDBERG, 1994; KAN *et al.*, 1999; JURCIC; SCHEINBERG; HOUGHTON, 1996; TYAGI *et al.*, 1999; SENGUPTA *et al.*, 2000; BELLOT; POUNA; ROBERT, 2001).

1.3 Nanopartículas lipídicas artificiais como transportadoras de fármacos

A LDL é o principal carreador de colesterol no plasma. A apo B-100 constitui a parte protéica da LDL e é o componente que liga as partículas da LDL a receptores específicos, os receptores de LDL, situados na superfície da membrana plasmática celular (BROWN; GOLDSTEIN, 1986). O receptor de LDL está sujeito à regulação

retroativa (feedback) e sua regulação é o principal fator para o controle da concentração plasmática de LDL (BROWN; GOLDSTEIN, 1990). Em processos proliferativos, há um aumento da demanda de colesterol e de outros lípidos necessários para a síntese de membranas celulares. Dessa maneira, as células com altas taxas de mitoses apresentam superexpressão de receptores de LDL.

Ho e colaboradores observaram um aumento na atividade dos receptores de LDL nas células leucêmicas do sangue periférico de pacientes com leucemia mielocítica aguda (LMA), em relação às células mononucleares de indivíduos saudáveis (HO *et al.*, 1978). Em outro estudo, Gal e colaboradores demonstraram que as células de linhagem neoplásica (carcinoma epidermóide vaginal, carcinoma epidermóide cervical e adenocarcinoma endometrial) expressam cerca de 15 a 30 vezes mais receptores de LDL do que as células de linhagem normal (células fibroblásticas cervicais e células epiteliais de glândula endometrial proliferativa) (GAL *et al.*, 1981). Zhu e colaboradores observaram uma superexpressão de receptores de LDL na superfície celular de células de músculo liso vascular localizadas na íntima hiperplásica de lesões ateroscleróticas (ZHU *et al.*, 2002).

O fenômeno de superexpressão dos receptores de LDL em processos proliferativos propicia uma nova estratégia de direcionamento específico de fármacos a tecidos acometidos (MOSLEY *et al.*, 1981). Essa possibilidade está baseada no fato de que a LDL é capaz de transportar grandes quantidades de componentes lipofílicos que podem ter efeitos citotóxicos, sendo internalizada pelo mesmo receptor celular. Conseqüentemente, há uma maior concentração do fármaco incorporado nas células alvo e uma diminuição da toxicidade celular não-específica.

A utilização da LDL natural está restrita às experiências de laboratório, pois sua obtenção a partir do plasma humano e os procedimentos de incorporação dos fármacos e armazenamento dos complexos inviabilizam sua utilização na prática clínica. Além disso, por ser um hemoderivado, pode provocar respostas imunológicas e contaminação por vírus da hepatite ou do HIV.

Maranhão e colaboradores observaram que uma nanoemulsão lipídica (NEm) de composição parecida com a LDL são reconhecidas pelos LDL-r após injeção na corrente sanguínea. Embora a NEm não possua apoproteína, em contato com o plasma adquire a apoproteína E (Apo E), que é reconhecida pelos LDL-r e permite sua ligação a estes receptores (MARANHÃO *et al.*, 1993).

Estudos realizados em pacientes com câncer de ovário e mama mostraram que a NEm se concentra nos tecidos neoplásicos. As células de câncer de ovário, por exemplo, tiveram uma captação em média 10 vezes maior da NEm em relação ao tecido normal enquanto que, em carcinoma de mama, a captação tumoral foi, em média, 4,5 vezes maior em relação ao tecido mamário normal (ADES *et al.*, 2001; GRAZIANI *et al.*, 2002). Estes experimentos comprovam a capacidade do veículo de direcionamento para o tecido proliferativo.

Fármacos associados à NEm têm diminuído drasticamente a sua toxicidade sem diminuir sua ação farmacológica. A associação daunorrubicina-NEm provocou a morte de 46,7% das células blásticas neoplásicas e 20,2% das células normais da medula óssea, demonstrando especificidade na associação às células neoplásicas (DORLHIAC-LLACER *et al.*, 2001). Em estudos desenvolvidos com um derivado do etoposide, o oleato de etoposide, associado à NEm, observou-se que a associação apresentou toxicidade animal em torno de 5 vezes menor que a preparação comercial. A regressão tumoral foi mais eficiente para a associação oleato de

etoposide-NEm, em comparação ao etoposide comercial (LO PRETE *et al.*, 2006). Em ensaios clínicos com pacientes portadores de câncer de ovário, a captação do oleato de etoposide-NEm pelo tecido tumoral foi quatro vezes superior ao tecido ovariano contralateral normal (AZEVEDO *et al.*, 2005).

A NEm também foi utilizada como veículo do PTX. A associação do PTX à NEm apresentou-se estável, a atividade citotóxica do fármaco foi preservada e a toxicidade em camundongos foi menor (RODRIGUES *et al.*, 2002). Com o objetivo de melhorar ainda mais a preparação, o taxol foi transformado, pela ligação de ácidos graxos à sua molécula, em um derivado mais lipofílico, o oleato de paclitaxel. De fato, a associação oleato de paclitaxel-NEm (OPTX-NEm) apresentou-se mais estável que a anterior sem reduzir a ação citotóxica do fármaco. Além disso, a toxicidade animal foi em torno de doze vezes inferior à do fármaco comercial e, em ensaios de regressão tumoral, a preparação foi novamente superior à formulação comercial (RODRIGUES *et al.*, 2005). Em pacientes com câncer de mama, a associação OPTX-NEm não apresentou toxicidade (dados não publicados).

O fenômeno de superexpressão de LDL-r não ocorre somente em células neoplásicas, mas também em células envolvidas em processos proliferativos não-neoplásicos como o processo de aterogênese. Desse modo, a NEm também tem sido utilizada como uma ferramenta no estudo da aterosclerose.

A NEm foi utilizada em um estudo com indivíduos normolipidêmicos e em portadores de hipercolesterolemia, onde há diminuição da atividade dos receptores B/E, resultando na captação deficiente de LDL e seu acúmulo no plasma (RIDKER *et al.*, 2001). Nesses pacientes, a NEm foi removida da circulação muito lentamente, confirmando o comportamento esperado (MARANHÃO *et al.*, 1997).

Quando injetada em pacientes com doença coronária submetidos à cirurgia de revascularização, foi verificado que quantidades consideráveis da NEm foram captadas pelo tecido arterial desprezado durante o procedimento (DAVID-COUTO *et al.*, 2007).

Em um estudo realizado em coelhos com aterosclerose induzida por dieta, a captação da NEm pela aorta foi 2 vezes maior que em coelhos controles. Além disso, foi demonstrado que a NEm concentrou-se no arco aórtico dos coelhos que receberam a dieta enriquecida com colesterol. O tratamento desses animais com OPTX-NEm reduziu em cerca de 60% a área lesionada em comparação aos animais controles, além de inibir a migração de macrófagos para os locais de lesão e diminuir a proliferação de células musculares lisas. O tratamento demonstrou não ter toxicidade para os animais (MARANHÃO *et al.*, 2008).

Recentemente, desenvolvemos o método de incorporação do MTX à NEm. Com esta finalidade, a molécula do MTX foi modificada, com o objetivo de aumentar o rendimento da incorporação e a estabilizar a associação. Foram introduzidos dois grupos dodecila em ambos os grupos carboxila. Esta modificação aumentou muito a taxa de incorporação do MTX à NEm, uma vez que na sua formulação comercial, o fármaco encontra-se na forma de sal dissódico, solúvel em água, o que impossibilita sua associação à NEm. A associação do di-dodecil metotrexato à NEm (DMTX-NEm) apresentou-se bastante estável, quando submetida a experimentos de diálise contra plasma (dados não publicados).

O DMTX-NEm também foi utilizado no tratamento de aterosclerose induzida em coelhos. Houve uma redução de cerca de 65% da área lesionada, em comparação aos coelhos controles (dados não publicados). Outras avaliações de

toxicidade vêm sendo realizadas *in vitro* e *em vivo* para avaliar o efeito terapêutico desse fármaco associado à NEm, em comparação à sua formulação comercial.

1.4 Quimioterapia combinada

As alterações que ocorrem nos efeitos farmacológicos por interação entre fármacos podem ser no sentido de aumentar ou diminuir a eficácia terapêutica. Dois fármacos, administrados em combinação, podem exercer efeitos semelhantes por terem mecanismos de ação semelhantes, podem somar efeitos semelhantes por meio de mecanismos de ação diferentes, ou mesmo exercer um efeito sinérgico, que resulta da potencialização dos efeitos de cada um dos fármacos (SEIZI, 2002).

De um modo geral, em doenças proliferativas, como o câncer, a quimioterapia combinada de fármacos provou ser mais efetiva e portanto é mais utilizada do que a monoterapia, pelos resultados importantes que a associação de fármacos permite (DEVITA; HELLMAN; ROSENBERG, 2005). O objetivo principal do uso da quimioterapia combinada é a associação de medicamentos citotóxicos que atuem sobre diferentes partes do processo metabólico das células, na tentativa de melhorar a eficácia terapêutica ou reduzir os efeitos adversos dos agentes farmacológicos. Por outro lado, a interação pode acentuar estes efeitos indesejados (SEIZI, 2002).

No tratamento da aterosclerose, o fator limitante da utilização de quimioterapia combinada está relacionado aos graves efeitos adversos observados com o uso dos quimioterápicos em suas formulações comerciais.

No entanto, o direcionamento específico dos fármacos às células alvo, atribuídos à sua associação à NEm, pode viabilizar a terapia combinada, minimizando os efeitos colaterais associados ao PTX e ao MTX. A demonstração de que a NEm concentra-se na artéria com aterosclerose e a obtenção de preparações estáveis e com bom rendimento de fármacos-NEm fundamentam seu uso como veículo no direcionamento de fármacos para a lesão aterosclerótica.

2 JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

Estudos prévios em modelos animais de tratamento da aterosclerose com a administração isolada do OPTX ou do DMTX relataram que sua associação à NEm diminuiu a toxicidade dos quimioterápicos, sem diminuir sua ação farmacológica.

A obtenção de diferentes preparações NEm-fármacos estáveis e com bom rendimento possibilita a estratégia de terapia combinada, visando a utilização de fármacos que atuem em diferentes fases do processo metabólico das células, levando à destruição de uma maior quantidade de células proliferativas.

O fator limitante do uso combinado de agentes quimioterápicos no tratamento da aterosclerose é relacionado aos graves efeitos adversos observados. Nesse sentido, a superexpressão de LDL-r nas células que participam da lesão aterosclerótica a demonstração de que a NEm concentra-se na artéria com aterosclerose pode viabilizar a terapia combinada, pelo direcionamento específico dos fármacos aos tecidos lesionados, diminuindo dessa forma a toxicidade do tratamento.

3 OBJETIVO

3 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é avaliar a eficácia da terapia combinada de OPTX-NEm com DMTX-NEm no tratamento da aterosclerose em coelhos, assim como a toxicidade hematológica do tratamento e seus efeitos sobre o perfil lipídico dos animais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material utilizado

Os lipídeos trioleína, oleato de colesterol e colesterol utilizados na produção das emulsões, foram adquiridos da Nu-Check Prep. (Elysian, EUA). A fosfatidilcolina foi obtida da Lipid Products (Surrey, Inglaterra). O MTX e o PTX utilizados nas formulações foram adquiridos da Calbiochem (Calbiochem-Novabiochem corporation, La Jolla, EUA). Os reagentes e solventes foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO) e Merck (Darmstadt, Germany). Os coelhos do estudo foram provenientes da Criex (São Paulo). A ração comercial usual para coelhos e ratos foi adquirida da Purina, Inc. O colesterol utilizado para o preparo da dieta rica em colesterol foi obtido da Dolder AG (Basel, Suíça). Os anticorpos e reagentes utilizados na imunohistoquímica foram adquiridos da LabVision. Os kits para determinação enzimática da concentração sérica de triglicérides, colesterol total e colesterol de HDL foram obtidos da Labtest Diagnostica S. A. (Minas Gerais, Brasil).

4.2 Preparo da NEm

A NEm foi preparada segundo a técnica descrita por Ginsburg (GINSBURG; SMALL; ATKINSON, 1982) e modificada por Maranhão (MARANHÃO *et al.*, 1993). Em um frasco de vidro foram adicionados 40 mg de fosfatidilcolina, 20 mg de oleato

de colesterol, 1,0 mg de trioleína e 0,5 mg de colesterol. A seguir, a mistura foi evaporada sob fluxo de nitrogênio e mantida em dessecador a vácuo, por 16 horas a 4 °C para remoção dos solventes residuais. Após a adição de 10 mL de solução tris HCl 0,01 M, pH 8,05, a mistura de lipídios foi sonicada por 3 h. A emulsão foi então centrifugada por duas vezes e sua densidade foi ajustada para 1,21 g/mL, adicionando-se brometo de potássio. A fração da parte superior do tubo que corresponde a 20 % do total é a NEm. O excesso de brometo de potássio foi removido através de diálise e a NEm foi então esterilizada utilizando-se filtros de 0,22 µm de diâmetro e armazenada em frascos estéreis a 4 °C por até 30 dias.

4.3 Incorporação do OPTX e do DMTX à NEm

O OPTX foi modificado como descrito anteriormente (RODRIGUES et al., 2005). O MTX foi di-esterificado com brometo de dodecila em presença de carbonato de cério como catalisador, seguindo procedimento descrito na literatura (ROSOWSKY et al., 1984). O OPTX e o DMTX obtidos foram incorporados à NEm separadamente numa razão 5:1 em massa de lipídios:fármaco. Os fármacos foram dissolvidos em 300µL de etanol e misturado com 3,0 mL de NEm. A incorporação foi realizada utilizando-se irradiação ultrassônica por 40 minutos a 55°C em banho de água/gelo. A taxa de associação foi determinada pela diálise dos fármacos incorporados à NEm, com quantificação do derivado que atravessa a membrana por HPLC (High-Pressure Liquid Chromatography). As preparações foram realizadas no mesmo dia do experimento e esterilizadas em filtro Millipore 0,22µm.

4.4 Animais utilizados no estudo

Foram utilizados 16 coelhos machos da raça Nova Zelândia brancos com peso de 3,0 a 3,5 kg. Os animais foram mantidos em temperatura controlada e em ciclos de claro/escuro de 12 horas no Biotério da Divisão Experimental do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. Água foi fornecida *ad libitum*. Para adaptação às condições ambientais do biotério, os coelhos consumiram ração comercial usual, constituída de 16% de proteínas, 7% de lipídeos, 14% de fibra bruta, 7% de cinzas e 50% de extrato não-nitrogenado, por uma semana.

4.5 Preparo da dieta rica em colesterol

A dieta enriquecida com 1% de colesterol foi 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 permaneceu em repouso por 24 horas em capela para evaporação completa dos solventes. A ração rica em colesterol foi pesada, separada em porções individuais de 150g em sacos plásticos lacrados e armazenada a -20°C.

4.6 Protocolo experimental

Após a primeira semana de adaptação, todos os coelhos foram submetidos à indução de aterosclerose pela dieta rica em colesterol durante oito semanas (150 gramas de ração/dia). Na quinta semana de consumo da dieta, os coelhos foram divididos em dois grupos de acordo com o tratamento administrado:

- O Grupo Controle (n=8) foi injetado endovenosamente com solução salina (0,9%);
- O Grupo OPTX-NEm + DMTX-NEm (n=8) foi tratado com a combinação de OPTX (4mg/Kg/semana) e DMTX (4mg/Kg/semana), ambos associados à NEm.

Estudos dos parâmetros farmacocinéticos do DMTX-NEm realizados em nosso laboratório mostraram um rápido decaimento plasmático do fármaco nas primeiras duas horas após a injeção endovenosa (dados não publicados). Desse modo, no grupo tratado, foi realizada a injeção de DMTX-NEm e, após um intervalo de 2 horas, a injeção de OPTX-NEm.

Todos os tratamentos foram administrados uma vez por semana, pelo período de quatro semanas. Ao fim de oito semanas, os animais foram sacrificados com injeção endovenosa de uma dose letal de pentobarbital sódico (5%).

Este protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal das unidades envolvidas no estudo (Faculdade de Ciências Farmacêuticas – FCF/USP e Instituto do Coração – InCor/HCFMUSP).

4.7 Avaliação do consumo de ração e do peso corporal dos animais

O consumo de ração foi avaliado diariamente, pesando-se o resíduo de ração. Os animais foram pesados semanalmente para avaliação da variação do peso corporal.

4.8 Avaliação dos efeitos hematológicos do tratamento

Amostras de sangue dos coelhos foram coletadas da veia auricular marginal antes do início da dieta, antes do início do tratamento e após o término do tratamento. O sangue total foi diluído em solução de Turk (1/20) para a contagem de leucócitos (10^6 células/mL) e em solução de NaCl 0,9% (1/1000) para a contagem de hemácias (10^9 células/ mL). A contagem das células sanguíneas foi realizadaas em câmara de Neubauer.

A partir do sangue total, foram confeccionados esfregaços sanguíneos corados com corante panótico e a porcentagem de linfócitos, monócitos e neutrófilos foi determinada.

4.9 Avaliação do perfil lipídico dos animais

Amostras de sangue dos coelhos foram coletadas da veia auricular marginal antes do início da dieta, antes do início do tratamento e após o término do

tratamento, após jejum de 12h e centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos a 4°C para separação do soro.

A concentração sérica de triglicérides e colesterol total foram determinados por método enzimático. A concentração de colesterol de HDL foi determinado pelo mesmo método utilizado para o colesterol total, após precipitação das VLDL e LDL.

4.10 Análise macroscópica das aortas

As aortas foram retiradas a partir do arco aórtico até a artéria abdominal e abertas longitudinalmente ao longo da parede anterior. Em seguida, foram lavadas com salina, fixadas em formalina tamponada a 10% e coradas com Escarlata R. Fotos das artérias foram tiradas e a porcentagem de lesão foi quantificada por planimetria macroscópica ($\text{área de lesão} \times 100 / \text{área total da artéria}$), com a utilização do equipamento Leica QWin Image Analysis System (Cambridge, UK).

4.11 Análise microscópica dos arcos aórticos

O arco aórtico das artérias de cada grupo foi seccionado em fragmentos de 5 mm, que foram embebidos em parafina para a realização de cortes histológicos corados com hematoxilina/eosina (HE). Após a confecção das lâminas, foram realizadas medições das áreas das camadas média e íntima de cada fragmento. As medições foram realizadas, com a utilização do equipamento Leica QWin Image Analysis System (Cambridge, UK) e do programa UTHSCSA Image Tool versão 3.0.

4.12 Análise imunohistoquímica dos arcos aórticos

Lâminas em branco dos fragmentos do arco aórtico de ambos os grupos foram utilizadas para a realização de ensaios de imunohistoquímica, para a diferenciação das células presentes na lesão. Foram utilizados anticorpos para identificação de células musculares lisas (anti-alfa actina) e para identificação de macrófagos na neoíntima (anti-macrófago de coelhos, clone RAM-11). As análises foram realizadas com a utilização do equipamento Leica QWin Image Analysis System (Cambridge, UK).

4.13 Análise estatística

Os dados foram tabelados como média $\pm$ desvio padrão ($M \pm DP$). As diferenças dos dados de consumo de ração, peso corporal, contagem de eritrócitos e leucócitos totais e perfil lipídico dos animais durante as semanas de tratamento foram avaliadas pelo teste de Friedman seguido do teste de Dunns (comparação intragrupo) e pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunns (comparação intergrupos).

A contagem diferencial de leucócitos foi avaliada pelo teste t de Student (comparação intragrupo) e pelo teste de Mann-Whitney (comparação intergrupos). O teste de Mann-Whitney também foi utilizado na comparação da porcentagem de lesões arteriais e da área das camadas média e íntima entre os grupos.

A probabilidade de significância considerada foi de $p < 0,05$ em todas as comparações realizadas.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do consumo de ração e do peso corporal dos animais

O tratamento com a associação de fármacos não alterou o consumo semanal de ração dos animais, comparado ao grupo controle. No grupo tratado, o consumo de ração foi de $110,7 \pm 9,2$ g/dia na primeira semana de tratamento e $123,6 \pm 18,5$ g/dia, na última semana de tratamento ($p=0,08$). No grupo controle, o consumo de ração foi de $102,7 \pm 19,2$ g/dia e $104,8 \pm 23,7$ g/dia, respectivamente ($p=0,4$). A figura 1 mostra a variação da quantidade de ração consumida pelos animais durante as semanas de tratamento.

Figura 1– Consumo de ração pelos grupos Controle (n=8) e OPTX-NEm + DMTX-NEm (n=8) durante as quatro semanas de tratamento (●, Grupo Controle; ■, Grupo Tratado). Dados expressos em $M \pm DP$.

De maneira similar, não houve diferença no peso corporal dos animais após o tratamento, comparado ao grupo controle. No grupo tratado, o peso corporal variou de $3,36 \pm 0,18$ Kg na primeira semana de tratamento a $3,47 \pm 0,08$ Kg, na última semana de tratamento ($p=0,1$). Nos animais do grupo controle, o peso variou de $3,56 \pm 0,33$ kg a $3,59 \pm 0,27$ kg ($p=0,5$). A variação no peso dos animais é mostrada na figura 2.

Figura 2– Variação de peso dos animais dos grupos Controle (n=8) e OPTX-NEm + DMTX-NEm (n=8), durante as quatro semanas de tratamento (●, Grupo Controle; ■, Grupo Tratado). Dados expressos em $M \pm DP$.

5.2 Avaliação dos efeitos hematológicos do tratamento

5.2.1 Contagem de eritrócitos e leucócitos totais

Ao longo das semanas do estudo, não houve alterações no número de eritrócitos do grupo controle ($p=1,0$). Porém, no grupo tratado com a associação de fármacos, houve uma queda de 46% no número de eritrócitos ($p<0,05$).

Em relação ao número de leucócitos, não houve diferença no grupo tratado ($p=0,09$), assim como no grupo controle ($p=0,05$). As contagens de eritrócitos e leucócitos totais são mostradas na tabela 1.

Tabela 1– Contagem de eritrócitos e leucócitos totais nos grupos Controle (n=8) e OPTX-NEm + DMTX-NEm (n=8), antes do início da dieta (basal), antes do início do tratamento e após o término do tratamento. Dados expressos em $M \pm DP$.

	Controle (salina)			OPTX-NEm + DMTX-NEm		
	Basal	Pré-tratamento	Pós-tratamento	Basal	Pré-tratamento	Pós-tratamento
Eritrócitos (10^9 céls./mL)	6,1 $\pm$ 0,8	5,9 $\pm$ 1,8	5,3 $\pm$ 0,7	4,9 $\pm$ 1,6	4,1 $\pm$ 0,6	2,6 $\pm$ 0,7*
Leucócitos (10^6 céls./mL)	6,5 $\pm$ 1,1	10,0 $\pm$ 1,2	9,4 $\pm$ 3,3	5,5 $\pm$ 1,2	8,4 $\pm$ 3,6	8,2 $\pm$ 1,5

* $p<0,05$, teste de Friedman seguido do teste de Dunns, grupo tratado, basal vs. pós-tratamento.

5.2.2 Contagem diferencial de leucócitos

Em relação ao perfil da série branca dos animais, determinado antes do início da dieta e após os tratamentos, não houve variação na porcentagem de linfócitos (grupo controle, $p=0,9$ e grupo tratado, $p=0,1$), monócitos (grupo controle, $p=0,2$ e grupo tratado, $p=0,7$) ou neutrófilos (grupo controle, $p=0,6$ e grupo tratado, $p=0,1$). Na comparação intergrupos, encontramos uma diferença na porcentagem de linfócitos ($p<0,05$) e neutrófilos ($p<0,05$) após o término do tratamento. A porcentagem de monócitos, neutrófilos e linfócitos encontrados nos grupos controle e OPTX-NEm + DMTX-NEm é mostrada na tabela 2.

Tabela 2– Porcentagem de monócitos, neutrófilos e linfócitos circulantes nos grupos Controle ($n=8$) e OPTX-NEm + DMTX-NEm ($n=8$), antes do início da dieta e após o término do tratamento. Dados expressos em $M\pm DP$.

	Controle (salina)		OPTX-NEm + DMTX-NEm	
	Pré-dieta	Pós-tratamento	Pré-dieta	Pós-tratamento
Monócitos (%)	4 $\pm$ 3	6 $\pm$ 5	7 $\pm$ 3	7 $\pm$ 4
Neutrófilos (%)	30 $\pm$ 13	28 $\pm$ 7	26 $\pm$ 10	14 $\pm$ 8*
Linfócitos (%)	65 $\pm$ 15	66 $\pm$ 8	68 $\pm$ 9	79 $\pm$ 9*

* $p<0,05$, teste de Mann-Whitney, grupo tratado vs. grupo controle, pós tratamento.

5.3 Avaliação do perfil lipídico dos animais

A tabela 3 mostra a concentração sérica de colesterol total, colesterol de HDL e triglicérides dos coelhos de ambos os grupos. Não houve alteração na concentração sérica de HDL-C no grupo tratado ($p=0,06$) e no grupo controle ($p=0,07$). Houve um aumento de 11 vezes na concentração de CT no grupo tratado e de 17 vezes no grupo controle ($p<0,05$). A concentração de TG em ambos os grupos teve um aumento de 2 vezes ($p<0,01$). Não houve diferença nos valores encontrados na comparação entre os dois grupos.

Tabela 3 – Perfil lipídico dos animais do grupo Controle (n=8) e do grupo OPTX-NEm + DMTX-NEm (n=8), determinado antes do início da dieta (basal), antes do início do tratamento e após o término do tratamento. Dados expressos em $M \pm DP$.

	Controle (salina)			OPTX-NEm + DMTX-NEm		
	Basal	Pré-tratamento	Pós-tratamento	Basal	Pré-tratamento	Pós-tratamento
CT (mg/dL)	87 $\pm$ 26	896 $\pm$ 507	1478 $\pm$ 655*	109 $\pm$ 13	527 $\pm$ 102	1197 $\pm$ 537*
HDL-C (mg/dL)	22 $\pm$ 4	28 $\pm$ 13	20 $\pm$ 7	25 $\pm$ 5	27 $\pm$ 4	25 $\pm$ 2
TG (mg/dL)	107 $\pm$ 30	171 $\pm$ 93	255 $\pm$ 114†	125 $\pm$ 30	196 $\pm$ 75	285 $\pm$ 44†

CT, colesterol total; HDL-C, colesterol de HDL; TG, triglicérides.

* $p<0,05$ e † $p<0,01$, teste de Friedman, seguido do teste de Dunns, basal vs. pós-tratamento.

5.4 Análise macroscópica das aortas

A macroscopia das aortas está representada nas figuras 3, onde observamos as lesões ateroscleróticas encontradas nos animais de cada grupo, e na figura 4, onde temos a porcentagem de lesão encontrada em cada grupo, em relação à área total da artéria. A razão da área de lesão/área total da aorta foi de $0,12 \pm 0,10$ no grupo OPTX-NEm + DMTX-NEm e de $0,66 \pm 0,13$ no grupo controle. Estes valores equivalem a uma redução em 82% de lesões nos animais tratados, quando comparado aos controles ($p < 0,01$).

Figura 3 – Macroscopia da aorta dos animais dos grupos Controle (A) e OPTX-NEm + DMTX-NEm (B).

Figura 4 –Porcentagem de área com lesões ateroscleróticas da aorta dos coelhos dos grupos Controle (n=8) e OPTX-NEm + DMTX-NEm (n=8), quantificadas por planimetria macroscópica.

* $p < 0,01$, teste de Mann-Whitney, grupo controle vs. grupo tratado.

5.5 Análise microscópica dos arcos aórticos

A microscopia dos segmentos do arco aórtico corados com H/E do grupo controle e do grupo tratado com OPTX-NEm + DMTX-NEm é ilustrada na figura 5. As fotomicrografias representam as placas ateroscleróticas encontradas nos animais de cada grupo.

Não houve diferença na área da camada média do arco aórtico do grupo tratado com a associação de fármacos, em comparação ao grupo controle ($p=0,6$). Entretanto, a área da camada íntima foi significativamente menor nos coelhos tratados, quando comparados aos controles ($p < 0,01$). Na tabela 4 é mostrada a quantificação por planimetria microscópica das camadas íntima e média do arco aórtico dos animais de ambos os grupos.

Figura 5 – Fotomicrografias de segmentos do arco aórtico dos animais do grupo controle (A) e do grupo OPTX-NEm + DMTX-NEm (B), corados com Hematoxilina/Eosina. Aumento de 100x.

Tabela 4 - Planimetria microscópica das camadas íntima e média do arco aórtico de coelhos controles (n=8) e coelhos tratados com OPTX-NEm + DMTX-NEm (n=8).

Microscopia	Controle (salina)	OPTX-NEm + DMTX-NEm
Área da íntima e média (mm ²)	1,71±0,27	0,89±0,33*
Área da média (mm ²)	0,95±0,18	0,84±0,34
Área da íntima (mm ²)	0,76±0,09	0,05±0,01*
Área da íntima/área média (mm ²)	0,82±0,08	0,08±0,06*

*p<0,01, teste de Mann-Whitney, grupo controle vs. grupo tratado.

5.6 Análise imunohistoquímica dos arcos aórticos

A figura 6 representa as lesões encontradas no arco aórtico dos animais de ambos os grupos, coradas por imunohistoquímica eletiva para macrófagos (anti-RAM 11). Observa-se menor presença de macrófagos na camada íntima do arco aórtico dos animais tratados com OPTX-NEm + DMTX-NEm, quando comparados aos controles.

Figura 6— Fotomicrografias de segmentos do arco aórtico dos animais do grupo controle (A) e do grupo OPTX-NEm + DMTX-NEm (B), corados por imunohistoquímica eletiva para macrófagos (anti-RAM 11). Aumento de 100x.

A figura 7 mostra o arco aórtico dos animais de ambos os grupos após coloração eletiva para alfa-actina, representando a presença de células musculares lisas. Nota-se que o tratamento com OPTX-NEm + DMTX-NEm, além de diminuir a espessura da íntima do arco aórtico dos animais, diminuiu a presença de células musculares lisas nessa camada, comparado aos controles.

Figura 7– Fotomicrografias de segmentos do arco aórtico dos animais do grupo controle (A) e do grupo OPTX-NEm + DMTX-NEm (B), corados por imunohistoquímica eletiva para alfa-actina (células musculares lisas). Aumento de 100x.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Em estudos anteriores de nosso grupo, o tratamento de aterosclerose induzida em coelhos com a administração isolada do OPTX ou do DMTX relataram que sua associação à NEm diminuiu a toxicidade dos quimioterápicos, sem diminuir sua ação farmacológica, resultando em redução de 60% (MARANHÃO *et al.*, 2008) e 65% (dados não publicados), respectivamente, da área de lesão nas aortas dos coelhos, em comparação a coelhos que não receberam os tratamentos.

Neste estudo, testamos a eficácia da terapia com o OPTX-NEm em combinação com o DMTX-NEm no tratamento de coelhos com aterosclerose induzida por dieta.

A associação dos fármacos à NEm tornou possível a terapia combinada, minimizando os efeitos colaterais associados ao PTX e ao MTX. A dose dos fármacos utilizada neste trabalho foi perfeitamente tolerável para os animais. A ausência de redução no consumo de ração e no peso corporal dos animais durante o tratamento são indicações de que a toxicidade da terapia combinada foi evitada pela associação dos fármacos à NEm.

O efeito tóxico mais comum associado ao uso do PTX é a depressão da medula óssea, manifestada principalmente por neutropenia (WIERNIK *et al.*, 1987). O MTX, por ser um antagonista do folato, também pode levar à neutropenia moderada (TIAN; CRONSTEIN, 2007). Embora este efeito seja comum a ambos os fármacos, de acordo com os resultados do leucograma realizado nos animais, não observamos tal fenômeno.

A queda no número de eritrócitos foi a única manifestação de toxicidade hematológica encontrada após o tratamento com a terapia combinada. Segundo a literatura, a incidência de anemia após o uso de PTX é incomum (PAZDUR *et al.*, 2003), já o uso de MTX pode levar à anemia hemolítica moderada (TIAN; CRONSTEIN, 2007).

Coelhos submetidos à dietas ricas em colesterol mantêm reservas substanciais de colesterol no fígado, e mesmo após interrupção da dieta, a secreção hepática contínua de lipoproteínas aterogênicas permite que a hipercolesterolemia persista e promova a progressão do quadro de aterosclerose (STEIN, Y; STEIN, O, 2001).

Apesar dos benefícios das terapias hipolipemiantes, a redução da concentração de colesterol plasmático muitas vezes ainda é insuficiente para regredir a aterosclerose (RODRIGUEZA *et al.*, 1998). Em um estudo realizado em coelhos Watanabe, um modelo no qual há o desenvolvimento de aterosclerose pela deficiência de receptores de LDL, mesmo após 8 meses de tratamento com estatina, não houve redução das lesões ateroscleróticas (SHIOMI; ITO, 1999). Neste trabalho, os animais foram submetidos à dieta enriquecida com 1% de colesterol continuamente durante todo o período do tratamento, e a dieta administrada foi suficiente para gerar hipercolesterolemia e consequente formação de lesão aterosclerótica nos 3 segmentos arteriais analisados, isto é, arco aórtico, aorta torácica e aorta abdominal, como pudemos observar pela análise das aortas dos animais controles.

O tratamento não teve influência sobre o perfil lipídico dos animais, porém, mesmo com a dieta contínua e concentração elevada de colesterol sérico persistente, o tratamento com a combinação dos quimioterápicos mostrou ser capaz

de gerar uma grande redução da área das lesões ateroscleróticas, em comparação às aortas dos animais que não receberam o tratamento, e maior, em comparação aos resultados dos estudos prévios das monoterapias com os mesmos fármacos aqui utilizados.

Na resposta inflamatória que ocorre durante a aterogênese, a expressão de moléculas de adesão pelo endotélio é um evento importante que leva ao recrutamento e penetração de leucócitos ao local de inflamação. Os macrófagos, por sua vez, sintetizam e liberam citocinas, que têm um papel importante no desencadeamento de resposta inflamatória e de lesão tecidual.

Neste estudo, a menor presença de macrófagos nas áreas de lesão dos animais tratados com a associação de fármacos pode sugerir não apenas uma resposta ao efeito antiproliferativo de ambos os fármacos, já que os macrófagos também proliferam no interior da placa (GENG; LIBBY, 2002), mas também a um efeito anti-inflamatório gerado pelo MTX.

Estudos de tratamento da artrite reumatóide demonstraram que o MTX inibiu o recrutamento de monócitos imaturos ao local de inflamação e reduziu a sobrevivência destas células no tecido inflamado (CUTOLO *et al.*, 2000). Também segundo a literatura, a quebra no ciclo de duplicação do DNA celular advindo do uso do MTX resulta na liberação para o meio extracelular de adenosina, que funciona como um mediador na supressão da inflamação, por estimular a função de barreira do endotélio e suprimir a produção de citocinas inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF- α , e de moléculas de adesão, como ICAM-1 e E-selectina (CHAN, 2002).

A progressão da estria gordurosa para lesões mais complexas requer não só a infiltração de células inflamatórias, mas também a participação das células musculares lisas, que são a principal fonte de matriz extracelular, que

frequentemente constitui o maior volume do ateroma avançado (GENG; LIBBY, 2002).

De maneira interessante, o tratamento pareceu inibir a proliferação e invasão da íntima por células musculares lisas, de acordo com a microscopia do arco aórtico dos animais. Em coelhos, o arco aórtico é o primeiro e o principal segmento arterial a desenvolver lesões ateroscleróticas (WANG *et al.*, 1994).

Na literatura, foi descrito que o PTX interfere na proliferação e acúmulo de células musculares lisas em áreas com injúria mecânica do endotélio de carótidas de ratos (SOLLOT *et al.*, 1995). Além disso, o PTX também inibe a migração celular (WANG, T.H.; WANG, S.H.; SOONG, 2000). Da mesma forma, foi sugerido que a ruptura do ciclo celular causado pelo tratamento com MTX leva à apoptose, o que explica o efeito antiproliferativo do fármaco (CUTOLO *et al.*, 2001).

Devemos destacar que o grande efeito antiproliferativo do tratamento aqui obtido não tem relação com o veículo em si. Dados de nosso laboratório mostraram que animais submetidos à mesma dieta e que receberam exclusivamente a NEm tiveram um quadro de agravamento da doença semelhante ao dos animais controles, com formação de lesões ateroscleróticas também nos 3 segmentos da aorta (dados não publicados).

Até os dias atuais, afora as técnicas invasivas, o progresso na exploração de estratégias para o tratamento da aterosclerose que levaram à maior sobrevida e diminuição de eventos mórbidos foram todos resultantes de intervenções nos fatores de risco da doença. Neste sentido, as estatinas são um exemplo de fármacos comumente utilizados em pacientes portadores de hipercolesterolemia, já que reduzem a concentração de colesterol plasmático.

Portanto, os progressos ficam restritos a um melhor controle dos fatores de risco e não existe até agora terapêutica medicamentosa eficaz voltada para o processo proliferativo-inflamatório da patologia de base. A rápida estabilização e regressão da aterosclerose encontra dificuldades muitas vezes nos efeitos adversos observados ou mesmo em vias de administração inconvenientes.

Dessa maneira, a rápida regressão da aterosclerose alcançada aqui pode proporcionar benefícios a pacientes hipercolesterolêmicos por mecanismos que se somam, e não competem, com terapias atualmente disponíveis.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

- O tratamento com a associação de OPTX-NEm e de DMTX-NEm mostrou ser eficaz na redução da área das lesões ateroscleróticas em coelhos, em comparação a coelhos que não receberam o tratamento.

- A queda do número de eritrócitos foi a única manifestação de toxicidade hematológica observada nos coelhos tratados com a associação de OPTX-NEm e de DMTX-NEm.

- O tratamento com a associação de OPTX-NEm e de DMTX-NEm mostrou não ter influência sobre o perfil lipídico dos coelhos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADES, A.; CARVALHO, J. P.; GRAZIANI, S. R.; AMÂNCIO, R. F.; SOUEN, J. S.; PINOTTI, J. A.; MARANHÃO, R. C. Uptake of a cholesterol-rich emulsion by neoplastic ovarian tissues. **Gynecol. Oncol.** v. 82(1), p. 84-87, 2001.

ALLISON, A. C. Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward. **Immunopharmacology**. v. 47(2-3), p. 63-83, 2000.

AZEVEDO, C. H.; CARVALHO, J. P.; VALDUGA, C. J.; MARANHÃO, R. C. 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(1), p. 178-182, 2005.

BELLOT, R.; POUNA, P.; ROBERT, J. Separation and determination of liposomal and non-liposomal daunorubicin from the plasma of patients treated with daunoxone. **J. Chromatogr B.** v. 757, p. 257, 2001.

BERLINER, J. A.; TERRITO, M. C.; SEVANIAN, A.; RAMIN, S.; KIM, J. A.; BAMSHAD, B.; ESTERSON, M.; FOGELMAN, A. M. Minimally modified low densitylipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. **J. Clin. Invest.**, v. 85, p.1260-1266, 1990.

BRAHN, E.; TANG, C.; BANQUERIGO, M. L. Regression of collagen-induced arthritis with taxol, a microtubule stabilizer. **Arthritis Rheum.** v. 37, p. 839, 1994.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Atherosclerosis. Scavenging for receptors. **Nature.** v. 343(6258), p. 508-509, 1990.

CHAN, E. S. L.; CRONSTEIN, B. N. Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases. **Arthritis Res.** v. 4, p. 266-273, 2002.

CHOY, P. C.; SIOW, Y. L.; MYMIN, D.; KARMIN, O. Lipids and atherosclerosis. **Biochem. Cell Biol.**, v.82, p. 212-224, 2004.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins**: patologia estrutural e funcional. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan S. A., p. 445-456, 2000.

CUTOLO, M.; BISSO, A.; SULLI, A.; FELLI, L.; BRIATA, M.; PIZZORNI, C. Antiproliferative and antiinflammatory effects of methotrexate on cultured differentiating myeloid monocytic cells (THP-1) but not on synovial macrophages from rheumatoid arthritis patients. **J Rheumatol.** v. 27, p. 2551-2557, 2000.

CUTOLO, M.; SULLI, A.; PIZZORNI, C.; SERIOLO, B.; STRAUB, R. H. Anti-inflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis.** v. 60, p. 729-735, 2001.

DAVID-COUTO, R.; DALLAN, L. A. O.; LISBOA, L. A. F.; KAWABE, L. T.; DE OLIVEIRA, S. A.; MARANHÃO, R. C. Deposition of cholesterol from a lipid microemulsion in fragments of blood vessels excised from patients during coronary bypass surgery. **Lipids.** v. 42(5), p. 411-418, 2007.

DEGEORGE, J. J.; AHN, C. H.; ANDREWS, P. A.; BROWER, M. E.; GIORGIO, D. W.; GOHEER, M. A.; HAM, D. Y. L.; MCGUINN, W. D.; SUN, C. J.; TRIPATHI, S. C. Regulatory considerations for preclinical development of anticancer drugs. **Journal of Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v.41(3), p.173-185, 1997.

DEVITA, V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. **Cancer: Principles & Practice of Oncology.** 7th Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. CD-ROM.

DORLHIAC-LLACER, P. E.; MARQUEZINI, M. V.; TOFFOLETTO, O.; CARNEIRO, R. C. G.; MARANHÃO, R. C.; CHAMONE, D. A. F. In vitro cytotoxicity of the LDE: daunorubicin complex in acute myelogenous leukemia blast cells. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 34(10), p. 1257-1263, 2001.

DZAU, V. J.; BRAUN-DULLAEUS, R. C.; SEDDING, D. G. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. **Nat Med**, v. 8(11), p.1249-1256, 2002.

EATON, C. B. Traditional and emerging risk factors for cardiovascular disease. **Prim. Care**, v. 32, p. 963-976i, 2005.

ELKIND, M. S. V.; SCIACCA, R.; BODEN-ABDALA, B. Leukocyte count is associated with aortic arch plaque thickness. **Stroke.** v. 33, p. 2587-2592, 2002.

FITZPATRICK, F.A.; WHEELER, R. The immunopharmacology of paclitaxel (Taxol®), docetaxel (Taxotere®), and related agents. **International Immunopharmacology.** v. 3, p. 1699-1714, 2003.

GAL, D.; MACDONALD, P. C.; PORTER, J. C.; SMITH, J. W.; SIMPSON, E. R. Effect of cell density and confluency on cholesterol metabolism in cancer cells in monolayer culture. **Cancer Res.** v. 41(2), p. 473-477, 1981.

GENG, y.j.; LIBBY, P. Progression of atheroma: a struggle between death and procreation. **Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.** v. 22, p. 1370-1380, 2002.

GINSBURG, G. S.; SMALL, D. M.; ATKINSON, D. Microemulsions of phospholipids and cholesterol esters. Protein-free models of low density lipoprotein. **J. Biol. Chem.**, v.57, p.8216-8227, 1982.

GLASS, C. K; WITZTUM, J. L. Atherosclerosis: The road ahead. **Cell.**, v.104, p.503-516, 2001.

GONZALEZ-GAY, M. A.; GONZALEZ-JUANATEY, C.; MARTIN, J. Rheumatoid arthritis: a disease associated with accelerated atherogenesis. **Semin Arthritis Rheum.** v. 35(1), p. 8-17, 2005.

GRAZIANI, S. R.; IGREJA, F. A. F.; HEGG, R.; MENEGHETTI, C.; BRANDIZZI, L. I.; BARBOZA, R.; AMÂNCIO, R. F.; PINOTTI, J. A.; MARANHÃO, R. C. Uptake of a cholesterol rich-emulsion by breast cancer. **Gynecol Oncol.** v. 85, p. 493-497, 2002.

HELDMAN, A. W.; CHENG, L.; JENKINS, G. M.; HELLER, P.F.; KIM, D. W.; WARE, M. J. R.; NATER, C.; HRUBAN, R. H.; REZAI, B.; ABELLA, B.S.; BUNGE, K. E.; KINSELLA, J. L.; SOLLITT, S. J.; LAKATTA, E. G.; BRINKER, J. A.; HUNTER, W. L.; FROELICH, J. P. Paclitaxel stent coating inhibits neointimal hyperplasia at 4 weeks in a porcine model of coronary restenosis. **Circulation.** v. 103, p. 2289-2295, 2001.

HO, Y. K.; SMITH, R. G.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Low-Density Lipoprotein (LDL) Receptor Activity in Human Acute Myelogenous Leukemia Cells. **Blood.** v. 52, p. 1099, 1978.

HOMMA, Y. Predictors of atherosclerosis. **J. Atheroscler Thromb.**, v.11, p.265-270, 2004.

HORWITZ, S. B. Mechanism of action of taxol. **Science.** v. 13, p. 134-136, 1992.

JURCIC, J. G.; SCHEINBERG, D. A.; HOUGHTON, A. N. Monoclonal antibody therapy of cancer. **Cancer Chemother Biol Response Modif.** v. 16, p. 168-188, 1996.

KADAR A, GLASZ T. Development of atherosclerosis and plaque biology. **Cardiovasc Surg.** v. 9(2), p. 109-121, 2001.

KAN, P.; CHEN, Z. B.; LEE, C. J.; CHU, I. M. Development of nonionic surfactant/phospholipid o/w emulsion as a paclitaxel delivery system. **J Control Release.** v. 58(3), p. 271-278, 1999.

KATAOKA, H.; KUME, N.; MIYAMOTO, S.; MINAMI, M.; MORIWAKI, H.; MURASE, T.; SAWAMURA, T.; MASAKI, T.; HASHIMOTO, N.; KITA, T.; Expression of lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in human atherosclerotic lesions. **Circulation**, v.99, p.3110-3117, 1999.

KINGSTON, D. G. I.; Taxol, a molecule for all seasons. **Chem. Commun.** p. 867-880, 2001.

LEE, R.M.; MASAKI, T.; YANG, H.S.; LIU, J.; CHEN, J.; LI, L.; BLUMENTHAL, D.K.; CHEUNG, A.K. Different Signaling Responses to Anti-Proliferative Agents in Human Aortic and Venous Smooth Muscle Cells. **Journal of Cellular Biochemistry.** v. 99, p. 835-844, 2006.

LIBBY, P.; THEROUX, P. Pathophysiology of coronary artery disease. **Circulation**, v.111, p.3481-3488, 2005.

LO PRETE, A. C.; MARIA, D. A.; RODRIGUES, D. G.; VALDUGA, C. J.; IBAÑEZ, O. C. M.; MARANHÃO, R. C. Evaluation in melanoma-bearing mice of an etoposide derivative associated to a cholesterol rich-microemulsion. **J Pharm Pharmacol** (in press).

LUNDBERG, B. The solubilization of lipophilic derivatives of podophyllotoxins in sub-micron sized lipid emulsions and their cytotoxic activity against cancer cells in culture. **Int. J. Pharm.** v.109, p. 73, 1994.

LUSIS, A. J.; MAR, R.; PAJUKANTA, P. Genetics of atherosclerosis. **Annu. Ver. Hum. Genet**, v. 5, p.189-218, 2004

MANFREDI, J. J.; HORWITZ, S. B. Taxol: an antimitotic agent with a unique mechanism of action. **Pharmacol. Ther.** v. 25, p. 83-125, 1984.

MARANHÃO, R. C.; CESAR, T. B.; PEDROSO, M. T. B.; HIRATA, M. H.; MESQUITA, C. H. Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling low density lipoprotein. **Lipids.** v. 28, p. 691-696, 1993.

MARANHÃO, R. C.; FERES, M. C.; MARTINS, M. T.; MESQUITA, C. H.; TOFFOLETTO, O.; VINAGRE, C. G. C.; GIANINNI, S. D.; PILEGGI, F.; Plasma kinetic behavior in hyperlipidemic subjects of a lipidic microemulsion that binds to LDL receptors. **Lipids.** v. 32, p. 627-633, 1997.

MARANHÃO, R. C.; TAVARES, E. R.; PADOVEZE, A. F.; VALDUGA, C. J.; RODRIGUES, D. G.; PEREIRA, M. D. Paclitaxel associated with cholesterol-rich nanoemulsions promotes atherosclerosis regression in the rabbit. **Atherosclerosis.** v. 197, p. 959-966, 2008.

MARANHAO, R. C.; TERCYAK, A. M.; REDGRAVE, T. G. Effects of cholesterol content on the metabolism of protein-free emulsion models of lipoproteins. **Biochem. Biophys. Acta.** v. 875(2), p. 247-255, 1986.

MOSLEY, S. T.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S.; FALCK, J. R.; ANDERSON, R. G. Targeted killing of cultured cells by receptor-dependent photosensitization. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 78(9), p. 5717-5721, 1981.

OGA, S. Associação Medicamentosa. In: OGA, S.; BASILE, A.C.; CARVALHO, M.F. **Guia Zanini-Oga de interações medicamentosas.** São Paulo. Atheneu. 2002. p. 3-22.

ONETTO, N.; CANETTA, R.; WINOGRAD, B.; CATANE, R.; DOUGAN, M.; GRECHKO, J.; BURROUGHS, J.; ROZENCWEIG, M. Overview of Taxol safety. **J Natl Cancer Inst Monogr.** v. 15, p. 131-139, 1993.

PARNESS, J.; HORWITZ, S. B. Taxol binds to polymerized tubulin in vitro. **J Cell Biol.** v. 91, p. 479-487, 1981.

PAZDUR, R.; KUDELKA, A. P.; KAVANAGH, J. J.; COHEN, P. R.; RABER, M. N. The taxoids: paclitaxel (Taxol®) and docetaxel (Taxotere®). **Cancer treatment reviews.** v. 19, 351-386, 1993.

PLUTZKY, J. The vascular biology of atherosclerosis. **Am. J. Med.**, v.115, p.55S-61S, 2003.

PRODANOWICH, S.; MA, F.; TAYLOR, J. R.; PEZON, C.; FASIHI, T.; KIRSNER, R. S. Methotrexate reduces incidence of vascular diseases in veterans with psoriasis and rheumatoid arthritis. **J Am Acad Dermatol**. v. 2(2), p. 262-267, 2005.

RICCIARELLI, R., ZINGG, J-M., AZZI, A. Vitamin E reduces the uptake of oxidized LDL by inhibiting CD 36 scavenger receptor expression in cultured aortic smooth muscle cells. **Circulation**, v.102, p.82-87, 2000.

RIDKER, P. M.; GENEST, J.; LIBBY, P. Risk factors of atherosclerotic disease. *In* **Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine**. E. Braunwald, D. P. Zipes, P. Libby, editors. Philadelphia: WB Saunders Company, 2001. p. 1010-1039.

RODRIGUES, D.G. **Associação do quimioterápico paclitaxel a uma microemulsão rica em colesterol (LDE): estudos de toxicidade, biodistribuição e atividade terapêutica em modelo animal**. 2004. 110f. Tese (Doutorado em Farmácia)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

RODRIGUES, D. G.; COVOLAN, C. C.; CORADI, S. T.; BARBOZA, R.; MARANHÃO, R. C. Use of a cholesterol- rich emulsion that binds to low-density lipoprotein receptors as a vehicle for paclitaxel. **J. Pharm. and Pharmacol**. v. 54(6), p. 765-772, 2002.

RODRIGUES, D. G.; MARIA, D. A.; FERNANDES, D. C.; VALDUGA, C. J.; COUTO, R. D.; IBANEZ, O. C.; MARANHÃO, R. C. Improvement of paclitaxel therapeutic index by derivatization and association to a cholesterol-rich microemulsion: *in vitro* and *in vivo* studies. **Cancer Chemother Pharmacol**. v. 55(6), p. 565-576, 2005.

RODRIGUEZA, W. V.; KLIMUK, S. K.; PRITCHARD, P. H.; HOPE, M. J. Cholesterol mobilization and regression of atheroma in cholesterol-fed rabbits induced by large unilamellar vesicles. **Biochem Biophys Acta**. v. 1368, p. 306-320, 1998.

ROSOWSKY, A.; FORSCH, R. A.; YU, C. S.; LAZARUS, H.; BEARDSLEY, G. P. Methotrexate analogues. 21. Divergent influence of alkyl chain length on the dihydrofolate reductase affinity and cytotoxicity of methotrexate monoesters. **J Med Chem**. v. 27(5), p. 605-609, 1984.

ROWINSKY, E. K.; CAZENAVE, L. A. DONEHOWER, R. C. Taxol - a novel investigational antimicrotubule agent. **J. Natl. Cancer Inst.** v.82, p. 1247-1259, 1990.

ROWINSKY, E. K.; EISENHAUER, E. A.; CHAUDHRY, V.; ARBUCK, S. G.; DONEHOWER, R. C. Clinical toxicities encountered with paclitaxel (Taxol). **Semin Oncol.** v. 4(3), p. 1-15, 1993.

SCHIFF, P. B.; FANT, J.; HORWITZ, S. B. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. **Nature.** v. 7, p. 277:665, 1979.

SENGUPTA, S.; TYAGI, P.; VELPADIAN, T.; GUPTA, Y. K.; GUPTA, S. K. Etoposide encapsulated in positively charged liposomes: pharmacokinetic studies in mice and formulation stability studies. **Pharmacol. Res.** v. 42(5), p. 459-464, 2000.

SHIOMI M, ITO T. Effect of cerivastatin sodium, a new inhibitor of HMG-CoA reductase, on plasma lipid levels, progression of atherosclerosis, and the lesional composition in the plaques of WHHL rabbits. **Br J Pharmacol.** v. 126, p. 961–968, 1999.

SOLLIT, S. J.; CHENG, L.; PAULY, R. R.; JENKINS, G. M.; MONTICONE, R. E.; KUZUYA, M.; FROELICH, J. P.; CROW, M. T.; LAKATTA, E. K.; KINSELLA, J. L. Taxol Inhibits Neointimal Smooth Muscle Cell Accumulation after Angioplasty in the Rat. **The Journal of Clinical Investigation.** v. 95, p. 1869-1735, 1995.

STAELS, B. A cholesterol tether. **Nature.** v. 417, p. 699-701, 2002.

STEIN, Y.; STEIN, O. Does therapeutic intervention achieve slowing of progression or bona fide regression of atherosclerotic lesions? **Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.** v. 21, p. 183-188, 2001.

STOCKER, R.; KEANEY JUNIOR, J. F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiol. Rev.**, v.84, p.1381-1478, 2004.

STONE, G.W.; ELLIS, S. G.; CANNON, L.; MANN, J. T.; GREENBERG, J. D.; SPRIGGS, D.; O'SHAUGHNESSY, C. D.; DEMAIO, S.; HALL, P.; POPMA, J. J.; KOGLIN, J.; RUSSELL, M. E. 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(10), p. 1215-1223, 2005.

TIAN, H.; CRONSTEIN, B. N. Understanding the mechanisms of action of methotrexate. **Bull NYU Hosp Jt Dis.** v. 65(3), 168-173, 2007.

TYAGI, P.; SENGUPTA, S.; VELPADIAN, T.; GUPTA, Y. K.; KOCHUPILLAI, V.; GUPTA, S. K. 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.

VAN NIEUW AMERONGEN, G. P.; VAN HINSBERGH, V. W. M. Targets for pharmacological intervention of endothelial hyperpermeability and barrier function. **Vascular Pharmacology.** v. 39, p. 257– 272, 2003.

WANI MC, TAYLOR HL, WALL, ME, COGGON P, MCPHAIL AT. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic agent from *Taxus brevifolia*. **J. Am. Chem. Soc.** v. 93, p. 2325-2327, 1971.

WEISS, R.B.; DONEHOWER, R. C.; WIERNIK, P. H.; OHNUMA, T.; GRALLA, R. J.; TRUMP, D. L.; BAKER, J. R.; VAN ECHO, D. A.; VON HOFF, D. D.; LEYLAND-JONES, B. Hypersensitivity reactions from taxol. **J Clin Oncol.** v. 8(7), p. 1263-1268, 1990.

WIERNIK, P.; SCHWARTZ, E. L.; STRAUMAN, J. J.; DUTCHER, J. P.; LIPTON, R. B.; PAIETTA, E. Phase I clinical and pharmacokinetic study of taxol. **Cancer Res.** v. 47, p. 2485-2493, 1987.

WILLIAMS, K. J.; TABAS, I. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** v. 15, p. 551–561, 1995.

WITTES, R. E.; GOLDIN, A. Unresolved issues in combination chemotherapy. **Cancer Treat. Rep.** v.70(1), p.105-125, 1986.

WU, H.; MOULTON, K. S.; GLASS, C. K. Macrophage scavenger receptors and atherosclerosis. **Trends Cardiovasc. Med.**, v.2, p. 220-225, 1992.

YLÄ-HERTTUALA, S.; LUOMA, J.; KALLIONPPAA, H.; LAUKKANEN, M.; LEHTOLAINEN, P.; VIITA, H. Pathogenesis of atherosclerosis. **Maturitas**, v.23, p.47-49, 1996.

YLÄ-HERTTUALA, S.; PALINSKI, W.; ROSENFELD, M. E.; PARTHASARATHY, S.; CAREW, T.E.; BUTLER, S.; WITZTUM, J. L.; STEINBERG, D. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. **J. Clin. Invest.**, v.84, p.1086-1095, 1989.

ZHU, Y.; BUJO, H.; YAMAZAKI, H.; HIRAYAMA, S.; KANAKI, T.; TAKAHASHI, K.; SHIBASAKI, M.; SCHNEIDER, W. J.; SAITO, Y. Enhanced expression of the LDL receptor family member LR11 increases migration of smooth muscle cells in vitro. **Circulation**. v. 105(15), p. 1830-1836, 2002.

ZIPES, D. P.; LIBBY, P.; BONOW, R. O.; BRAUNWD, E. **Braunwald's heart disease**: a textbook of cardiovascular disease. 7 ed. Philadelphia: Saunders, 2005.

ANEXOS

3.11.08/080

APROVAÇÃO

A 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, em sessão de 08/10/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0712/08**, intitulado: **"ASSOCIAÇÃO DE QUIMIOTERÁPICOS NO TRATAMENTO DA ATROSCLEROSE: DIRECIONAMENTO FARMACOLÓGICO POR NANOEMULSÃO LIPÍDICA EM COELHOS"** apresentado pela **COMISSÃO CIENTÍFICA do InCor**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Raul Cavalcante Maranhão**

Pesquisador (a) Executante: **Tatiana Solano Vitorio**

CAPPesq, 16 de Outubro de 2008

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

COMISSÃO CIENTÍFICA
RECEBIDO

16/10/08

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 255, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA

Ofício CEEA/FCF nº 70/2008

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "**Associação de quimioterápicos no tratamento da aterosclerose**" (Protocolo nº 201), de responsabilidade da pesquisadora **Tatiana Solano Vitorio** sob a orientação do(a) Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA, desta Faculdade, em 10 de novembro de 2008.

São Paulo, 8 de dezembro de 2008.

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da Comissão de Ética
em Experimentação Animal