

ELAINE RUFO TAVARES

**Veiculação de quimioterápicos isolados ou em combinação  
através de nanoemulsões lipídicas para o tratamento da  
aterosclerose: estudos em coelho**

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina da Universidade de São Paulo  
para obtenção do título de Doutor em  
Ciências.

Programa: Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Jayme Diament

São Paulo

2011

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Tavares, Elaine Rufo

Veiculação de quimioterápicos isolados ou em combinação através de nanoemulsões lipídicas para o tratamento da aterosclerose : estudos em coelho / Elaine Rufo Tavares. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.  
Programa de Cardiologia.

Orientador: Jayme Diamant.

Descritores: 1.Nanopartículas 2.Aterosclerose 3.Colesterol 4.Paclitaxel 5.Etoposide

USP/FM/DBD-051/11

# Dedicatória

*Dedico esta tese à minha mãe que, com sua força,  
amor e muito trabalho, foi essencial em todas as  
etapas da minha vida.*

# Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Jayme Diament, orientador desta tese, por ter me recebido como orientanda e por sua dedicação e disponibilidade.

Ao Prof. Raul C. Maranhão, pela oportunidade, pelo incentivo acadêmico e pela confiança depositada em mim, sem os quais este trabalho não seria possível.

Aos membros da banca pela atenção dispensada a esta tese.

Às secretárias da Pós-Graduação do Programa de Cardiologia, Neusa, Juliana e Eva pela atenção, paciência e disponibilidade em ajudar sempre.

À equipe da Divisão Experimental do Instituto do Coração, especialmente Dra. Edna, Nelson, Vicente e Dario, pelo apoio e auxílio desde que comecei a trabalhar com experimentação animal no Laboratório de Metabolismo de Lípidos.

À equipe do Laboratório de Anatomia Patológica do InCor, especialmente Dra. Lourdes Higuchi, Nadia, Márcia, Sueli, Renata, Joyce, Wagner, Denis e Solange. Obrigada pelos ensinamentos, apoio e por autorizar o uso do Quantimet, essencial para a execução do trabalho.

A todos os meus colegas do Laboratório de Metabolismo de Lípidos do InCor, pelo apoio nesta jornada.

À Fatima Rodrigues Sousa e Freitas, pela ajuda inestimável e pela amizade.

À Ana Elisa e Maria Claudia pela grande ajuda com a manipulação diária dos animais e pelo carinho.

À Elaine Daminelli, pela dedicação nas etapas finais deste trabalho e pelas longas conversas durante as horas de uso do Quantimet.

À Claudete, Juliana e Iara pelos desabafos, pela força e por serem simplesmente minhas amigas.

Ao Dr. Domingos Lourenço Filho, pela amizade, apoio e companheirismo,  
até em shows de rock.

E especialmente à minha mãe, Nair. Sem ela, certamente eu não teria  
conseguido realizar tantos sonhos.

*“São todos maus descobridores, os que pensam que  
não há terra quando conseguem ver apenas o mar.”*

*Francis Bacon*

## NORMALIZAÇÃO

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.



## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1-	INTRODUÇÃO.....	01
2-	OBJETIVOS.....	14
3-	MÉTODOS.....	15
3.1-	Preparo da LDE.....	15
3.2-	Associação do oleato de paclitaxel e do oleato de etoposide à LDE.....	16
3.3-	Protocolo experimental.....	16
3.4-	Determinação do perfil lipídico.....	18
3.5-	Determinação do perfil hematológico.....	19
3.6-	Avaliação macroscópica das lesões ateroscleróticas.....	20
3.7-	Análise morfométrica de cortes histológicos de arco aórtico.....	20

3.8-	Execução das reações imunohistoquímicas.....	21
3.9-	Análise estatística.....	24
4-	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
4.1-	Perfil ponderal.....	25
4.2-	Análise do consumo de ração.....	26
4.3-	Perfil lipídico.....	27
4.4-	Perfil hematológico.....	28
4.5-	Avaliação macroscópica das lesões ateroscleróticas.....	29
4.6-	Análise morfométrica de cortes histológicos de arco aórtico.....	31
4.7-	Análise imunohistoquímica.....	34
4.7.1-	Quantificação de macrófagos e células de músculo liso.....	34
4.7.2-	Quantificação da expressão protéica de receptores de lipoproteínas.....	37
4.7.3-	Quantificação da expressão protéica de citocinas inflamatórias.....	43
4.7.4-	Quantificação da expressão protéica de MMP9.....	46

4.7.5-	Quantificação da expressão protéica de marcadores de proliferação celular.....	47
5-	DISCUSSÃO.....	51
6-	CONCLUSÕES.....	57
7-	REFERÊNCIAS.....	58

## Lista de Figuras

<b>Figura 1-</b>	Representação da variação de peso (Kg) dos grupos Controle, LDE-etoposide e Combinação LDE-etoposide/LDE-paclitaxel.....	25
<b>Figura 2-</b>	Representação do consumo de ração (g) dos grupos Controle, LDE-etoposide e Combinação LDE-etoposide/LDE-paclitaxel.....	26
<b>Figura 3-</b>	Aortas de coelhos dos grupos Controle, LDE-etoposide e Combinação com os depósitos lipídicos das lesões ateroscleróticas evidenciados por ScarlatR.....	31
<b>Figura 4-</b>	Cortes histológicos de arco aórtico representativos de lesão aterosclerótica nos grupos Controle, LDE-etoposide e Combinação LDE-etoposide/LDE-paclitaxel. Coloração: hematoxilina-eosina.....	33
<b>Figura 5-</b>	Cortes histológicos de arco aórtico de animais dos grupos Controle, LDE-etoposide e Combinação LDE-etoposide/LDE-paclitaxel imuno-marcados para macrófagos e células de músculo liso.....	36
<b>Figura 6-</b>	Cortes histológicos de arco aórtico de animais dos grupos Controle e LDE-etoposide imuno-marcados para os receptores de lipoproteínas LDL-R e LRP-1.....	39
<b>Figura 7-</b>	Cortes histológicos de arco aórtico de animais dos grupos Controle e LDE-etoposide imuno-marcados para os receptores de lipoproteínas CD36 e SRB-1.....	42
<b>Figura 8-</b>	Cortes histológicos de arco aórtico de animais dos grupos Controle e	

	LDE-etoposide imuno-marcados para as citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ .....	45
<b>Figura 9-</b>	Cortes histológicos de arco aórtico de animais dos grupos Controle e LDE-etoposide imuno-marcados para MMP9.....	47
<b>Figura 10-</b>	Cortes histológicos de arco aórtico de animais dos grupos Controle e LDE-etoposide imuno-marcados para os marcadores de proliferação celular PCNA, topoisomerase II $\alpha$ e tubulina.....	50

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1-</b>	Perfil lipídico dos coelhos dosado antes do início da dieta rica em colesterol (basal) e ao final do protocolo.....	27
<b>Tabela 2-</b>	Perfil hematológico dos grupos controle, tratado com LDE-etoposide e tratado com a combinação LDE-etoposide/LDE-paclitaxel.....	28
<b>Tabela 3-</b>	Medidas da área e das lesões macroscópicas das artérias dos coelhos dos grupos Controle, LDE-etoposide e Combinação LDE-etoposide/LDE-paclitaxel.....	30
<b>Tabela 4-</b>	Morfometria das áreas e das espessuras totais e da camada íntima do arco aórtico de coelhos dos grupos Controle, LDE-etoposide e Combinação LDE-etoposide/LDE-paclitaxel.....	32
<b>Tabela 5-</b>	Morfometria da área da camada íntima, da área imuno-marcada e porcentagem de área imuno-marcada por macrófagos e células de músculo liso presentes no arco aórtico de coelhos dos grupos Controle, LDE-etoposide e Combinação LDE-etoposide/LDE-paclitaxel.....	35
<b>Tabela 6-</b>	Morfometria da área da camada íntima, da área imuno-marcada e porcentagem de área imuno-marcada pelos receptores de lipoproteína LDL-R e LRP-1 presentes no arco aórtico de coelhos dos grupos Controle e LDE-etoposide.....	38

<b>Tabela 7-</b>	Morfometria da área da camada íntima, da área imuno-marcada e porcentagem de área imuno-marcada pelos receptores de lipoproteína CD36 e SR-B1 presentes no arco aórtico de coelhos dos grupos Controle e LDE-etoposide.....	40
<b>Tabela 8-</b>	Morfometria da área da camada íntima, da área imuno-marcada e porcentagem de área imuno-marcada pelas citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ presentes em arco aórtico de coelhos dos grupos Controle e LDE-etoposide.....	44
<b>Tabela 9-</b>	Morfometria da área da camada íntima, da área imuno-marcada e porcentagem de área imuno-marcada pela metaloproteinase da matriz MMP9 presente em arco aórtico de coelhos dos grupos Controle e LDE-etoposide.....	46
<b>Tabela 10-</b>	Morfometria da área da camada íntima, da área imuno-marcada e porcentagem de área imuno-marcada pelos marcadores de proliferação PCNA, topoisomerase II $\alpha$ e tubulina presentes em arco aórtico de coelhos dos grupos Controle e LDE-etoposide.....	48

## RESUMO

TAVARES, E. R. **Veiculação de quimioterápicos isolados ou em combinação através de nanoemulsões lipídicas para o tratamento da aterosclerose: estudos em coelho.** [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011. 70p.

Aterosclerose é uma doença inflamatória e proliferativa que tem início quando fatores de risco alteram o endotélio vascular. Células inflamatórias e vasculares liberam citocinas e fatores de crescimento que estimulam a proliferação e migração das células de músculo liso e a síntese de componentes da matriz extracelular. A nanoemulsão lipídica LDE se concentra em regiões onde a proliferação celular e a inflamação são maiores, tornando-se um veículo para fármacos. O etoposide, fármaco antiproliferativo, ainda não foi explorado no tratamento da aterosclerose. O paclitaxel recobre *stents* utilizados em angioplastia para evitar a reestenose. A associação do LDE-etoposide ao LDE-paclitaxel aumentaria o efeito antiproliferativo dos fármacos isolados, por agirem em diferentes fases do ciclo celular. Este estudo tem por objetivos avaliar a eficácia do tratamento com LDE-etoposide e com a combinação LDE-etoposide/LDE-paclitaxel da aterosclerose induzida por dieta rica em colesterol em coelhos; comparar a eficácia dos tratamentos; no grupo de tratamento mais eficaz e no grupo Controle, avalia a expressão protéica de receptores de lipoproteínas, citocinas, MMP9 e marcadores de proliferação celular. Para tanto, 27 coelhos receberam dieta rica em colesterol por 8 semanas. Depois de 4 semanas, foram divididos em 3 grupos: grupo Controle, que recebeu 6 mL de solução salina intravenosa; LDE-etoposide, que recebeu dose de 6mg/kg; e grupo Combinação, que recebeu LDE-etoposide/LDE-paclitaxel nas doses de 6mg/kg e 4mg/kg, respectivamente. Os tratamentos foram administrados uma vez por semana durante 4 semanas. Foram avaliados perfil lipídico, hematológico, ponderal e o consumo de ração. Após a eutanásia, as lesões ateroscleróticas macroscópicas foram medidas. Depois, o arco aórtico foi analisado por morfometria e por imunohistoquímica. Foi observado que não houve diferença no perfil ponderal e no consumo de ração entre os grupos de estudo. No perfil lipídico, ao final do estudo, as concentrações de colesterol total e de triglicérides aumentaram em todos os grupos. O perfil hematológico mostrou redução do número de hemácias nos grupos de tratamento ao final do estudo. Em comparação com o grupo Controle, os animais tratados com LDE-etoposide apresentaram lesões ateroscleróticas



11 vezes menores e o grupo Combinação, apresentou lesões 3 vezes menores. Na análise morfométrica, a área total e a espessura da aorta foram menores no grupo LDE-etoposide quando comparado com os outros dois grupos. O grupo tratado com LDE-etoposide apresentou presença de macrófagos e de células de músculo liso menor que os grupos Controle e Combinação. Como o tratamento com LDE-etoposide apresentou uma maior eficácia, a avaliação dos outros fatores foi feita apenas neste grupo e no grupo Controle para comparação. O grupo LDE-etoposide apresentou menor expressão protéica dos receptores de lipoproteínas, das citocinas inflamatórias, da MMP9 e dos marcadores de proliferação celular topoisomerase II $\alpha$  e tubulina. As avaliações mostraram que o tratamento com LDE-etoposide foi mais eficaz no tratamento das lesões ateroscleróticas induzidas em coelhos do que a combinação entre LDE-etoposide/LDE-paclitaxel.

*Descritores: Nanopartículas, Aterosclerose, Colesterol, Paclitaxel, Etoposide.*

## SUMMARY

TAVARES, E. R. **Vehiculation of chemotherapeutic agents isolated or in combination by lipid nanoemulsions in atherosclerosis treatment. Studies in rabbit.** [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (Brazil); 2011. 70p.

Atherosclerosis is an inflammatory and proliferative disease that is triggered by risk factors damaging vascular endothelium. Inflammatory and vascular cells release cytokines and growth factors, promoting the proliferation and migration of smooth muscle cells and extracellular matrix elements synthesis. LDE, an artificial nanoemulsion, concentrates in areas of greater proliferation and inflammation rates and can be used as a vehicle to direct drugs to those cells. Etoposide, an antiproliferative drug, have not been studied in atherosclerosis treatment. Paclitaxel is used in drug-eluting stents to avoid restenosis. The association of LDE-etoposide and LDE-paclitaxel would enhance the antiproliferative effect of the isolated drugs, due to act in different cell cycle phase. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of the treatment with LDE-etoposide and with LDE-etoposide/LDE-paclitaxel of atherosclerosis induced by a cholesterol-rich diet in rabbits; compare the effectiveness of these treatments; in the most effective treatment group and in Control group, evaluate the protein expression of lipoprotein receptors, cytokines, MMP9 and cell proliferation markers. To do so, 3 groups of 9 rabbits were fed a cholesterol-rich diet during 8 weeks then the animals were separated in 3 groups: Control, intravenously injected with 6mL of saline solution; LDE-etoposide, injected with a dose 6mg/kg; and Combination, injected with LDE-etoposide/LDE-paclitaxel in a dose of 6mg/kg and 4mg/kg, respectively. Treatments were administered once a week during 4 weeks. Lipids, blood cell count, weight and food intake were evaluated. The animals were sacrificed and the macroscopic atherosclerotic lesions were measured. Later, the aortic arch was analyzed by microscopic morphometry and by immunohistochemistry. It was seen that there was no difference in food intake and weight between study groups. Total cholesterol and triglycerides concentration increased in all groups. Blood cell count showed reduction of red blood cell in treatment groups at the end of the study. Animals treated with LDE-etoposide showed 11-fold less lesions and Combination group showed 3-fold less lesions than Control group. By morphometric analysis, total area and thickness of aorta were smaller in LDE-etoposide group than the other groups. LDE-etoposide group showed less macrophages and smooth muscle cells than Control and Combination groups. As treatment with LDE-etoposide showed a better

efficacy, evaluation of other factor were performed only in LDE-etoposide and Control group, to perform a comparison. LDE-etoposide showed less protein expression of lipoprotein receptors, cytokines, MMP9, and of cell proliferation markers topoisomerase II $\alpha$  and tubulina. The analysis showed that LDE-etoposide treatment was more effective in treating atherosclerotic-induced lesions in rabbits than the combination between LDE-etoposide/LDE-paclitaxel.

*Descriptors: Nanoparticles, Atherosclerosis, Cholesterol, Paclitaxel, Etoposide.*

# INTRODUÇÃO

---

---

## 1- INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no Brasil, responsáveis por 29,4% dos óbitos por doenças crônicas não transmissíveis (Saúde Brasil, 2009, Ministério da Saúde). A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica caracterizada pelo gradual espessamento e enrijecimento das artérias que leva à redução do diâmetro do lúmen do vaso, podendo levar ao rompimento da placa e conseqüente isquemia (Liuzzo et al., 2005). O desenvolvimento da doença está intimamente ligado à presença de fatores de risco como fumo, hipertensão, diabetes, alterações genéticas, altas concentrações de colesterol e obesidade (Ross, 1999).

Acredita-se que o primeiro passo para o início do processo inflamatório seja a infiltração de LDL na camada íntima da artéria, que é oxidada pela ação de macrófagos presentes no tecido ou pelas células endoteliais. O acúmulo de lípidos pode iniciar uma resposta inflamatória na parede arterial um aumento de expressão das moléculas de adesão secretadas pelo endotélio disfuncional (Hansson et al., 2009).

As moléculas de adesão recrutam monócitos e linfócitos circulantes, que migram para o espaço subendotelial. A diferenciação de monócitos em macrófagos é um ponto importante na progressão da aterosclerose, tanto na doença em humanos quanto em modelos experimentais com animais que

recebem dieta rica em colesterol (Fazio & Linton, 2001). Macrófagos ativados produzem citocinas inflamatórias, proteases e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Collot-Teixeira et al., 2007; Luizzo et al., 2005).

Entre as citocinas inflamatórias produzidas pelos macrófagos, estão a IL-1 $\beta$  (interleucina 1 $\beta$ ) e o TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral  $\alpha$ ). Estas citocinas estão entre os mais importantes mediadores da resposta inflamatória e um grande número de estudos vem tentando retratar o papel destas citocinas na aterogênese (Kleemann et al., 2008).

A IL-1 $\beta$  é uma citocina multifuncional altamente inflamatória produzida por macrófagos ativados, que afeta quase todos os tipos celulares. Induz a expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais, levando ao recrutamento de mais células inflamatórias. Além disso, a IL-1 $\beta$  contribui para o dano vascular, por estimular a proliferação e diferenciação celular e a liberação de proteinases (Dinarello, 1996; Kleemann et al., 2008).

O TNF- $\alpha$  é uma citocina produzida em vários tipos de células, incluindo macrófagos, células endoteliais e células de músculo liso (Kleemann et al., 2008). Exerce grande efeito inflamatório na aterosclerose. Estudos mostram a presença desta citocina em placas ateroscleróticas humanas e a concentração de TNF- $\alpha$  circulante está associada com maior

risco de infarto do miocárdio, espessamento de carótida, distúrbios na homeostasia dos triglicérides e da glicose (McKellar et al., 2009).

Há evidências consistentes que as citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  tem ação sinérgica, provavelmente devido ao fato de que ambas são produzidas praticamente ao mesmo tempo no decorrer da doença (Dinarello, 1996).

Os macrófagos presentes na lesão expressam receptores *scavenger* para captar lipoproteínas oxidadas. Conforme ocorre a captação de LDL oxidada, o citoplasma dos macrófagos se torna repleto de partículas de lípidos, formando as chamadas células espumosas (Libby et al, 2010).

Há dois receptores da classe B de receptores *scavenger* que tem funções importantes, mas diferentes, na aterosclerose: CD36 e SR-B1.

O CD36 é um dos principais receptores *scavenger*. Está presente em monócitos, macrófagos, adipócitos, endotélio microvascular e plaquetas. O CD36 presente nos macrófagos está envolvido no desenvolvimento da lesão aterosclerótica por sua habilidade de captar LDL oxidada além de outros

ligantes, como trombospondina-1, colágeno e lipoproteínas nativas (Moore & Freeman, 2006).

O SR-B1 (receptor *scavenger* classe B tipo 1) é um componente chave do transporte reverso de colesterol. É expresso principalmente no fígado e nos macrófagos. Atua por dois mecanismos: mediando a transferência de colesterol das células para a HDL (lipoproteína de alta densidade) e facilita a transferência seletiva deste colesterol da HDL para o fígado. O transporte reverso de colesterol da parede da artéria pode reduzir o acúmulo de colesterol e prevenir o desenvolvimento da aterosclerose (Kaur & Bansal, 2010).

Conforme a lesão progride, os macrófagos proliferam na camada íntima, aumentando o processo inflamatório e liberando também enzimas que destroem a matriz extracelular arterial, como as metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs). As MMPs podem degradar várias proteínas da matriz extracelular, como o colágeno. A presença de citocinas inflamatórias inibe a produção de colágeno e outras proteínas estruturais pelas células de músculo liso e a produção de IL-1 $\beta$  na lesão aumenta a expressão das metaloproteinases da matriz extracelular (Plutzky, 2001; Apostolakis et al., 2008). A MMP9, uma gelatinase, contribui para várias patologias como câncer, inflamação e doenças vasculares (Nair & Boyd, 2005).



A proliferação e migração de células de músculo liso contribuem para a patogenia da aterosclerose. O acúmulo focal de células musculares lisas é um dos precursores do desenvolvimento das lesões ateroscleróticas humanas. Estas células parecem agir como um foco para o desenvolvimento das lesões, talvez acelerando o acúmulo de lípidos e a quimiotaxia para macrófagos (Dzau et al., 2002).

Além disso, alguns procedimentos utilizados para tratar a redução do lúmen, como a angioplastia com balão e o implante de stent podem desencadear a proliferação de células musculares lisas no local por lesão mecânica, o que inicia uma cascata de eventos, levando à reestenose (Kadar & Glatz, 2001).

Em outras doenças proliferativas e inflamatórias como câncer e aterosclerose, ocorre um aumento do número de receptores de LDL (LDL-R) na superfície das células, devido a uma maior demanda por colesterol para síntese de novas membranas celulares (Ho et al., 1978; Zhu et al., 2002).

Desde a descoberta deste aumento do número de receptores, a possibilidade de se utilizar a LDL como agente direcionador de fármacos para as células neoplásicas tem sido analisada por vários pesquisadores (Rudling et al., 1983; Lundberg, 1987; Samadi-Baboli et al., 1993; Xiao et al.,

1999). A LDL permitiria o transporte de fármacos lipofílicos que podem ter efeito citotóxico, protegeria o fármaco do ataque de biomoléculas plasmáticas e água e o fármaco incorporado à LDL se concentraria mais nas células proliferativas e inflamatórias que apresentam aumento de expressão de LDL-R em relação às células normais.

A LDL apresenta sérios problemas quanto à sua utilização na rotina de tratamento. A obtenção da lipoproteína por plasmaferese do sangue de doadores é um processo excessivamente laborioso e caro. Devido ao fato de ser um hemoderivado, a LDL pode provocar respostas imunológicas ou provocar contaminação por vírus da hepatite ou do HIV. Além disso, a incorporação de um fármaco na partícula de LDL pode resultar na perda da apoB-100, parte protéica da lipoproteína, e ter a capacidade de ligação aos LDL-R prejudicada. Este processo pode também alterar ou até mesmo quebrar a sua estrutura (Rensen et al., 1997).

Outros transportadores para fármacos antineoplásicas têm sido desenvolvidos: transportadores poliméricos (Kan et al., 1999), emulsões (Lundberg, 1994), liposomas (Bellott et al., 2001) e liposomas carregados positivamente (Sengupta et al., 2000).

Em 1993, Maranhão et al. demonstraram que uma nanoemulsão lipídica com composição semelhante à da LDL humana sem a parte protéica

(LDE), ligava-se aos LDL-R e era captada pelas células. A LDE não tem proteína, mas ao ser injetada na circulação, entra em contato com as lipoproteínas naturais e adquire, principalmente a apo E, que é reconhecida pelos LDL-R, sendo captada pela célula (Maranhão et al., 1993). A apo E tem mais afinidade pelos receptores de LDL do que a própria apo B-100 da LDL natural (Hirata et al., 1999).

Levantou-se então a hipótese de que a LDE poderia substituir a LDL natural como veículo para direcionar fármacos antineoplásicos para os tecidos malignos, evitando atingir órgãos e tecidos normais (Maranhão et al., 1992; Maranhão et al., 1994). Assim, os fármacos se ligariam preferencialmente aos LDL-R das células neoplásicas, onde estes receptores apresentam-se em número muito maior do que nas células normais.

A LDE foi injetada em pacientes com doença coronária submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio e foi captada em níveis consideráveis pelo tecido arterial desprezado durante o procedimento (Couto et al., 2007). Além disso, em coelhos com aterosclerose induzida por dieta, a captação da LDE na artéria foi maior que em coelhos controle normais (Maranhão et al., 2008).

Outro receptor que pode estar envolvido na captação da LDE é o LRP-1 (proteína relacionada ao receptor de LDL), já que na circulação a LDE adquire apo E. O LRP-1 foi originalmente identificado como receptor para lipoproteínas com apo E na sua composição e para formas ativadas de  $\alpha_2$ -macroglobulina. Hoje, já se conhece cerca de 30 diferentes ligantes, como lipoproteínas, proteínas de matriz, proteínas intracelulares, fatores de crescimento e proteases como a MMP9 (Lillis, et al, 2005; Mantuano, et al 2008).

O melhor conhecimento do mecanismo das doenças vasculares tem possibilitado o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento que podem inibir ou bloquear os processos patológicos da proliferação vascular. O interesse na terapia antiproliferativa levou a uma busca pela inibição de fases específicas do ciclo celular, que pode ser alcançada através de agentes farmacológicos que bloqueiam a proliferação celular, como o paclitaxel e o etoposide (Dzau et al., 2002).

O paclitaxel foi extraído no começo dos anos 60 a partir do extrato da casca do teixo do Pacífico, chamado *Taxus brevifolia*. O seu uso foi inicialmente dificultado pelo suprimento limitado da árvore e pela baixa solubilidade da molécula em água (Wani et al., 1971; Horwitz, 1992). O paclitaxel age nos microtúbulos, promovendo a polimerização da tubulina, bloqueando o ciclo celular na fase  $G_2$  (intervalo pré-mitótico) e na mitose, o

que impede a divisão e a proliferação celular (Manfredi & Horwitz, 1984; Horwitz et al., 1993; Kavallaris, 2010). Devido ao aumento dos microtúbulos durante a mitose, tubulina pode ser um bom marcador de proliferação celular (Perez, 2009).

Este agente tem sido utilizado para recobrir *stents* utilizados em angioplastia para evitar a reestenose. Essa técnica permite um contato imediato do fármaco com a parede do vaso, favorecendo sua rápida acumulação no tecido arterial (Heldman et al., 2001). Entretanto, os *stents* eluídos com fármacos, apesar de prevenir a reestenose, não reduzem as taxas de mortalidade dos pacientes (Stone et al., 2005).

A ação local do paclitaxel 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 (Onetto et al., 1993). A neutropenia é a principal toxicidade do paclitaxel, além de reações de hipersensibilidade, associadas ao seu veículo, o Cremophor EL (Rowinsky et al., 1993; Weiss et al., 1990).

Recentemente, associou-se um derivado mais lipofílico do paclitaxel, o oleato de paclitaxel, a uma nanoemulsão lipídica, a LDE e comprovou-se que a associação é estável e que a ação farmacológica do fármaco não foi

modificada e a toxicidade animal foi 12 vezes menor do que a forma comercial, aumentando a tolerabilidade (Rodrigues et al., 2005). Em pacientes com câncer de mama, a associação LDE-oleato de paclitaxel não apresentou toxicidade (Pires et al., 2009).

Em um estudo realizado com coelhos submetidos a uma dieta aterogênica, nos animais tratados com LDE-paclitaxel numa dose de 4mg/kg/semana, houve redução da área lesionada de cerca de 60% em comparação com os coelhos injetados com solução salina. Além disso, o tratamento demonstrou não ter de toxicidade para os animais (Maranhão et al., 2008).

Outro composto com potencial aplicação na doença coronariana é o etoposide. O etoposide é um derivado semi-sintético da podofilotoxina, isolada da mandrágora americana (*Podophyllum peltatum* e *Podophyllum emodi*). Este fármaco bloqueia o ciclo celular na fase S tardia (síntese de DNA) ou no início da fase G<sub>2</sub> (Stahelin, 1973). O etoposide não bloqueia as células em mitose, ao invés disso, eles formam uma associação ternária com a enzima topoisomerase II  $\alpha$  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 (Goodman & Gilman, 1996; Heisig, 2009).

A topoisomerase II  $\alpha$  é expressa em fases específicas do ciclo celular e pode ser um importante marcador do número de células em divisão, pois quanto maior o número de núcleos reativos, maior a taxa de mitose no tecido (Willman & Holden, 2000).

O etoposide tem uma baixa taxa de associação à LDE, que foi aumentada pela adição de um grupo oleíla à molécula para torná-la mais lipofílica (Valduga et al., 2003). A eficácia terapêutica foi mantida e a toxicidade foi reduzida pela associação com a LDE, como demonstrado em camundongos com melanoma B16 (Lo Prete et al., 2006). Quando testado em pacientes com câncer, verificou-se que o complexo LDE-oleato de etoposide se concentrou no tumor (Azevedo et al., 2005). Em pacientes com linfoma Hodgkin e não-Hodgkin, a associação LDE-oleato de etoposide não mostrou toxicidade aparente e teve excelente tolerabilidade (Pinheiro et al., 2006).

Embora existam alguns estudos avaliando a eficácia do etoposide em reduzir a proliferação celular que ocorre na aterosclerose, este fármaco foi pouco explorado no tratamento da doença arterial coronária. Um desses estudos demonstrou que o tratamento de coelhos com aterosclerose induzida por dieta rica em colesterol reduz a formação de estrias de gordura na aorta dos animais. Além disso, as placas formadas durante o tratamento com etoposide são menos espessas e tem menos tecido fibroso e células

espumosas do que os coelhos controle não-tratados. A toxicidade hematológica foi um grande limitador para o tratamento, que era interrompido sempre que os níveis do hematócrito chegavam 30% abaixo dos valores normais (de la Llera-Moya et al., 1992).

Em outro trabalho, Krainer *et al.* (1999) com o intuito de verificar se o etoposide poderia ser uma causa de aterogênese em pacientes com câncer de testículo, avaliou a retenção de LDL radiomarcada pela parede arterial de coelhos. Os resultados demonstraram que, ao contrário do que se esperava, a captação da LDL radiomarcada pela parede arterial nos animais tratados com etoposide foi menor que nos animais controle. Além disso, o decaimento plasmático da LDL radiomarcada foi mais rápido e os níveis de colesterol plasmático eram mais baixos no grupo tratado com etoposide, o que excluiu este fármaco como potencial causador de aterosclerose neste modelo.

Mais recentemente, um estudo verificou a eficiência da combinação de fármacos como o etoposide com outros agentes e esta associação mostrou bons resultados na redução da proliferação de células musculares lisas vasculares *in vitro* (Parry et al., 2006).



Esses resultados nos levam a crer que o uso do LDE-oleato de etoposide poderia ser eficiente no tratamento da aterosclerose e sua associação ao LDE-oleato de paclitaxel aumentaria o efeito antiproliferativo, pois estes fármacos agem em diferentes fases do ciclo celular e, como tendem a se concentrar em áreas onde a proliferação celular é maior, esta associação aumentaria a eficácia do tratamento da aterosclerose.

## **OBJETIVOS**

---

---

## 2- OBJETIVOS

- 1- Avaliar a eficácia terapêutica do tratamento com LDE-etoposide em aterosclerose induzida por dieta rica em colesterol em coelhos;
- 2- Avaliar a eficácia terapêutica do tratamento com a combinação do LDE-etoposide/LDE-paclitaxel em aterosclerose induzida por dieta rica em colesterol em coelhos;
- 3- Comparar a eficácia dos tratamentos;
- 4- No grupo de tratamento com maior eficácia terapêutica e no grupo Controle, quantificar a expressão protéica dos receptores de lipoproteína LDL-R, LRP-1, CD36 e SR-B1, as citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , a metaloproteinase MMP9 e os marcadores de proliferação celular PCNA, topoisomerase II $\alpha$  e tubulina nas lesões ateroscleróticas dos coelhos.

# MÉTODOS

---

---

### 3- MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1- Preparo da LDE

A LDE foi preparada segundo a técnica descrita por Maranhão RC et al. (1993). Em um frasco 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 emulsificada por irradiação ultrassônica por 3 h em equipamento Branson, modelo 450A (Arruda Ultra-Som, São Paulo, Brasil). Para seleção do tamanho desejado de partículas, a nanoemulsão foi ultracentrifugada e a fração superior do tubo foi retirada. A densidade da emulsão foi ajustada para 1,21 g/mL, adicionando-se brometo de potássio e foi novamente ultracentrifugada. A fração da parte superior do tubo corresponde à LDE, que foi retirada por aspiração. O brometo de potássio foi removido através de diálise em tampão Tris HCl 0,01 M, pH 8,0. Finalmente, a emulsão foi esterilizada utilizando-se filtros de 0,22 µm de diâmetro sob fluxo laminar e armazenada em frascos estéreis a 4 °C por até 30 dias.

### **3.2- Associação do oleato de paclitaxel e do oleato de etoposide à LDE**

O oleato de etoposide e o oleato de paclitaxel, modificados como descrito anteriormente (Valduga et al., 2003; Rodrigues et al., 2005), foram incorporados à LDE separadamente numa razão 5:1 em massa de lípides:fármaco. Cada fármaco foi dissolvido em 300µL de etanol e misturado com 3,0 mL de LDE. A incorporação foi realizada utilizando-se irradiação ultrassônica por 40 minutos a 55°C em banho de água/gelo. As associações foram preparadas no mesmo dia do experimento e esterilizadas em filtro Millipore 0,22µm.

### **3.3- Protocolo experimental**

Foram utilizados coelhos brancos da raça New Zealand de aproximadamente 3 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 será fornecida *ad libitum*.

Para a indução da aterosclerose, foi utilizada ração comercial (Purina Inc., São Paulo, Brasil) suplementada com 1% de colesterol (peso/peso) (Goldlab, São Paulo, Brasil). O colesterol foi dissolvido em uma solução de 200 mL de éter etílico e 100 mL de álcool etílico absoluto para cada 30 gramas de colesterol, sob agitação. Após a adição desta solução, a ração permaneceu em repouso em capela por 24 horas para evaporação dos solventes. A ração suplementada com 1% de colesterol foi pesada em alíquotas de 150g, colocada em embalagens individuais e armazenada a -20°C.

A aterosclerose foi induzida em 27 coelhos através da administração de dieta rica em colesterol durante 8 semanas (150 gramas de ração/dia suplementado com 1% de colesterol). Todos os dias a ração restante foi coletada e pesada para avaliar a quantidade que foi consumida durante o período do estudo. As mudanças de peso de cada animal foram observadas semanalmente.

Após 4 semanas de administração da dieta, os animais foram divididos em 3 grupos de 9 animais: grupo Controle salina, grupo LDE-etoposide e grupo Combinação LDE-etoposide/LDE-paclitaxel. Os animais receberam o tratamento uma vez por semana durante quatro semanas. No grupo controle foi administrado 6 mL de salina, que corresponde ao mesmo volume administrado aos animais dos outros grupos. O grupo LDE-etoposide

foi tratado com dose de 6mg/kg. O grupo Combinação recebeu LDE-etoposide/LDE-paclitaxel nas doses de 6mg/kg e 4mg/kg, respectivamente. A ação do paclitaxel é muito dependente da duração da exposição das células ao fármaco e do esquema terapêutico quando administrado com outros fármacos metabolizados pelo sistema citocromo p450, caso do etoposide (Wood, 1995; Goble & Bear, 2003). Por conta disso, foi dado um intervalo na administração dos fármacos de 2 horas para reduzir a toxicidade do tratamento (Lokich et al., 1998). Uma semana após a última dose do tratamento, pentobarbital sódico (5%) foi administrado para eutanásia dos animais.

Este protocolo foi aprovado pela Comissão Científica e pela Comissão de Ética sob número de protocolo SDC 2866/06/111.

### **3.4- Perfil lipídico**

Para dosagem da concentração dos lípidos, amostras de sangue foram coletadas da veia marginal das orelhas dos animais antes do início da dieta rica em colesterol e no dia da eutanásia. O soro foi obtido por centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos a 4°C. Colesterol total, HDL (lipoproteína de alta densidade) e triglicérides foram dosados utilizando-se



os kits enzimático-colorimétricos comerciais da Labtest Diagnóstica S.A. (Minas Gerais, Brasil). A leitura foi feita em espectrofotômetro (Hitachi, Columbia, USA).

### **3.5- Perfil hematológico**

A análise das mudanças no perfil hematológico dos coelhos dos três grupos de estudo foi realizada antes do início da dieta rica em colesterol e ao final do tratamento através da contagem de hemácias, leucócitos e contagem diferencial dos leucócitos.

Amostras de 100µL foram coletadas com anticoagulante EDTA. A contagem de hemácias foi feita em câmara de Neubauer após diluição 1/1000 do sangue total em solução salina 0,9%. A contagem de leucócitos foi feita em câmara de Neubauer após diluição 1/200 de sangue total em Líquido de Turk. A contagem diferencial foi feita em lâmina de extensão sanguínea corada com Panótico Rápido (Laborclin, Pinhais, Brasil). Os resultados foram expressos em porcentagem de neutrófilos, monócitos e linfócitos.

### **3.6- Análise macroscópica das lesões ateroscleróticas**

Após a eutanásia, a aorta dos coelhos dos três grupos foi retirada a partir arco aórtico até a aorta abdominal, aberta longitudinalmente ao longo da parede posterior e fixada em formalina 10%. Os lípidos presentes na aorta foram evidenciados por Scarlat R (SudanIV) (Sigma, Saint Louis, USA). As aortas foram fotografadas e seu tamanho total e o tamanho das lesões foram medidos por planimetria através do programa computacional Image Analysis System Quantimet 500+ (Leica Cambridge Ltd., Cambridge, UK). A proporção de lesões ateroscleróticas macroscópicas observadas foi calculada (área de lesão/área total).

### **3.7- Análise morfométrica de cortes histológicos de arco aórtico**

Após a realização da análise macroscópica, a região do arco aórtico das artérias dos animais foi cortada transversalmente em fragmentos de 0,5 cm e foram embebidos em parafina e seccionados em cortes de 5 $\mu$ m. A desparafinização das lâminas foi feita com 3 banhos de xilol de 10 minutos cada, seguidos de 3 banhos de etanol absoluto, 2 banhos de etanol 95% e um banho de etanol 75%. As lâminas com os cortes histológicos foram então lavadas em água corrente.

Para a coloração hematoxilina-eosina, as lâminas foram coradas por 2 minutos em hematoxilina, lavadas e coradas com eosina por mais 2 minutos.

A análise morfométrica foi realizada em imagens de 3 campos de cada corte histológico do arco aórtico dos animais dos grupos Controle, LDE-etoposide e Combinação LDE-etoposide/LDE-paclitaxel corados com hematoxilina/eosina que foram capturadas no aumento de 100 vezes em microscópio ótico equipado com o software de análise de imagens Image Analysis System Quantimet 500+ (Leica Cambridge Ltd., Cambridge, UK). Em cada imagem dos campos fotografados a área total da aorta e área da íntima foram medidas para cálculo da razão entre a área de lesão e a área total. Foram medidas também a espessura total e a espessura da íntima da aorta para cálculo da razão entre a espessura da lesão e a espessura total da aorta.

### **3.8- Execução das reações de imunohistoquímica**

No grupo com o tratamento mais eficaz e no grupo Controle foram realizadas as reações de imunohistoquímica.

As lâminas passaram pelo procedimento de desparafinização como descrito no item acima.

Para realização da imunohistoquímica, a recuperação de antígenos foi realizada por calor úmido e pressão em câmara de pressão para recuperação antigênica Pascal (Dako, Carpinteria, EUA) com tampão citrato 10mM pH 6,0 para os antígenos LRP-1, macrófagos de coelho (clone RAM-11), MMP-9, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , tubulina, SR-B1 e PCNA. A recuperação de antígenos por calor úmido e pressão com tampão Tris 10mM/EDTA 1mM foi realizada para os antígenos CD36,  $\alpha$  actina para identificação de células de músculo liso e topoisomerase II $\alpha$ . Para o antígeno anti-LDL-R não foi necessário proceder a recuperação antigênica.

A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com 4 banhos de 5 minutos de peróxido de hidrogênio a 3%. O bloqueio de reações inespecíficas foi feito com soro fetal bovino diluído em solução salina tamponada com sais fosfato (PBS) durante 1 hora em estufa umidificada a 37°C. Os anticorpos primários anti-LRP-1 (Calbiochem, Darmstadt, Alemanha), anti-LDL-R (Lifespan, Seattle, EUA), anti-macrófagos de coelho (clone RAM-11) (Dako, Carpinteria, EUA), anti-MMP-9 (AbCam, Cambridge, EUA), anti-TNF- $\alpha$  (R&D Systems, Minneapolis, EUA), anti-IL-1 $\beta$  (R&D Systems, Minneapolis, EUA), anti-tubulina (AbCam, Cambridge, EUA), anti-SR-B1 (Millipore, Billerica, EUA) , anti-PCNA (AbCam, Cambridge, EUA),

anti-CD36 (Genetex, Irvine, EUA), anti- $\alpha$  actina (Dako, Carpinteria, EUA) e anti-topoisomerase II $\alpha$  (AbCam, Cambridge, EUA) previamente padronizados, foram diluídos em PBS contendo 1% de albumina bovina. As lâminas foram incubadas por 18 horas a 4° C.

O sistema de detecção foi o polímero Envision (Dako, Carpinteria, EUA) para os anticorpos anti-macrófagos de coelho, anti- $\alpha$  actina, anti-tubulina, anti-MMP9, anti-LRP-1, anti-CD36, anti-topoisomerase II $\alpha$ . Para o anticorpo anti-LDL-R, o sistema de detecção foi o polímero SuperPicture (Dako, Carpinteria, EUA) e para os anticorpos anti-TNF- $\alpha$  e anti-IL-1 $\beta$  foi utilizado o sistema Streptavidina-Biotina-Peroxidase (LSAB+) (Dako, Carpinteria, EUA). A reação foi revelada com diaminobenzidina (DAB) (Dako, Carpinteria, EUA) e contracorado com hematoxilina de Harris.

Para a análise quantitativa da expressão protéica dos antígenos LRP-1, CD36, SR-B1, LDL-R, RAM-11, MMP-9, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , tubulina, PCNA,  $\alpha$  actina e topoisomerase II $\alpha$ , também foi utilizado microscópio ótico equipado com o software de análise de imagens Image Analysis System Quantimet 500+. O limiar de detecção de cor foi determinado para cromógeno DAB tendo como base uma região do tecido marcada. Imagens de 3 campos de cada corte capturadas em aumento de 100 vezes foram usadas para medir área total da aorta, área da íntima, área de marcação marrom do cromógeno DAB na íntima, espessura total da aorta e espessura da íntima. A área

marcada pelo cromógeno DAB foi calculada como porcentagem da área da íntima de cada campo. A expressão de cada antígeno em cada animal foi calculada como média de todos os campos medidos para cada corte histológico.

### **3.9- Análise estatística**

O teste ANOVA com pós-teste de Tukey foi realizado para a análise do perfil lipídico, do perfil hematológico, da variação de peso dos animais antes e depois do tratamento, das lesões macroscópicas, da morfometria e da análise da expressão protéica de  $\alpha$ -actina e do clone RAM 11 de macrófagos de coelho. O teste *t* de Student foi utilizado para análise da expressão protéica de LRP-1, CD36, SR-B1, LDL-R, MMP-9, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , tubulina, PCNA, e topoisomerase II $\alpha$ . As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para  $p < 0,05$ .

# RESULTADOS

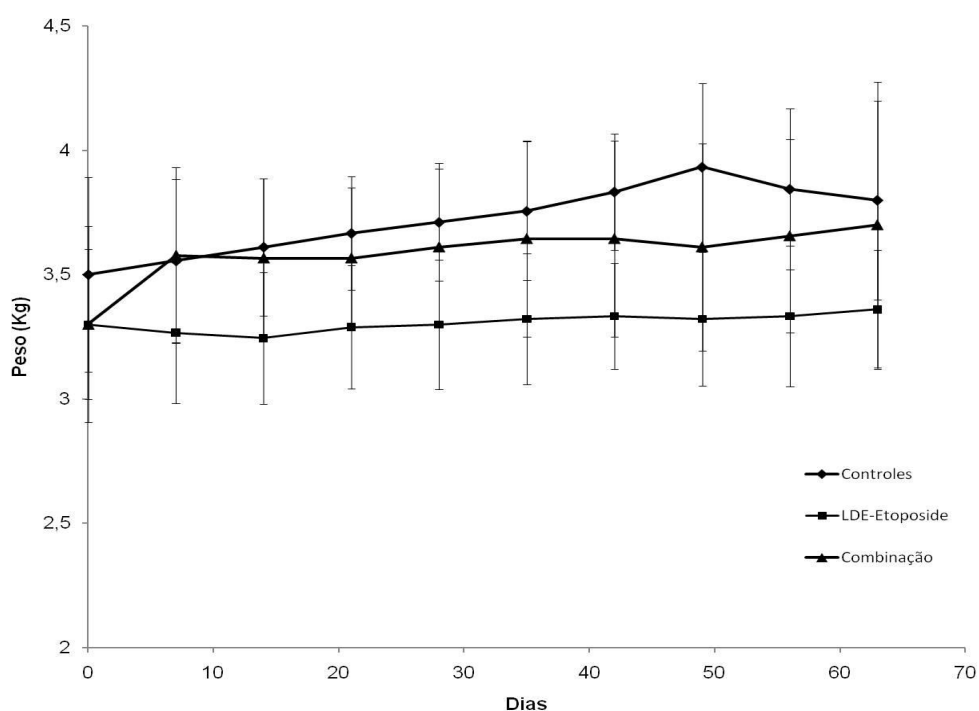
---

---

## 4- RESULTADOS

### 4.1- Perfil ponderal

A Figura 1 mostra a evolução do peso dos animais dos grupos Controle, LDE-etoposide e Combinação LDE-etoposide/LDE-paclitaxel. Não houve diferença de peso entre os grupos no início do protocolo ou entre o início e o final do protocolo.

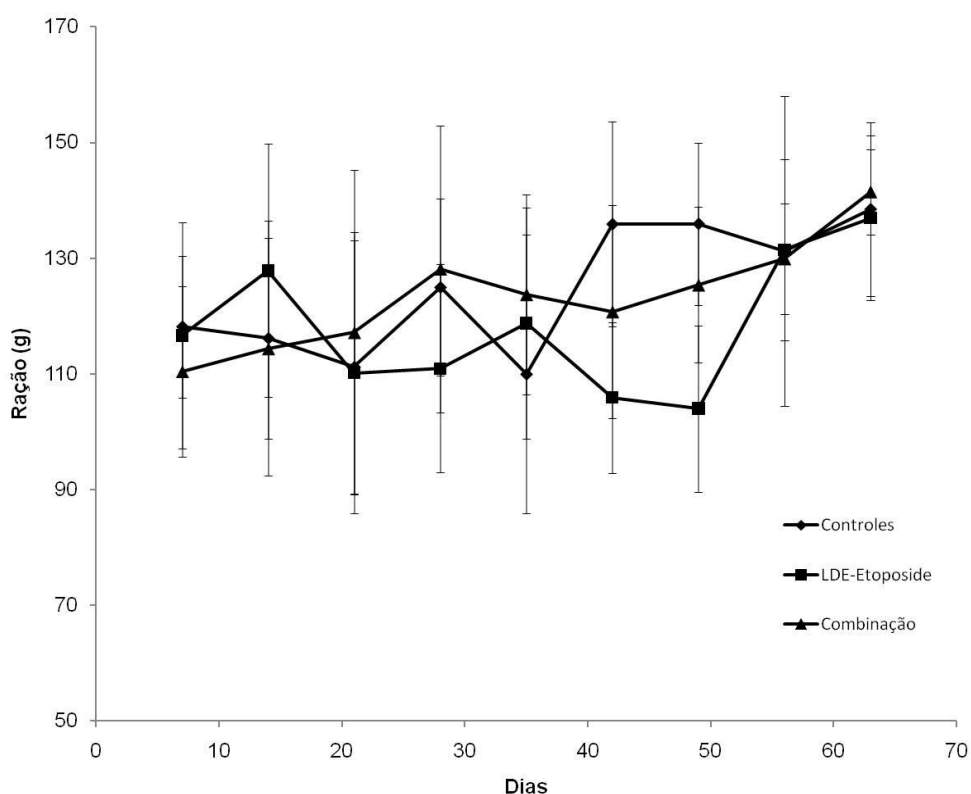


**Figura 1:** Representação da variação de peso (kg) dos grupos Controle, LDE-etoposide e Combinação LDE-etoposide/LDE-paclitaxel. Dados expressos em Média $\pm$ DP.



#### 4.2- Análise do Consumo de Ração

A Figura 2 mostra a média de consumo diário de ração suplementada com 1% de colesterol pelos coelhos dos grupos Controle, LDE-etoposide e Combinação LDE-etoposide/LDE-paclitaxel durante todo o protocolo. Não houve diferença de consumo entre os grupos, apenas entre o consumo inicial e final dos animais dentro de cada grupo ( $p < 0,001$  entre o início e o final do protocolo em todos os grupos). Essa diferença se deve à fase de adaptação pela qual os animais passam no início do protocolo e ao aumento de peso constante.



**Figura 2:** Representação do consumo de ração (g) dos grupos Controle, LDE-etoposide e Combinação LDE-etoposide/LDE-paclitaxel. Dados expressos em Média $\pm$ DP.

### 4.3- Perfil lipídico

O perfil lipídico dos animais variou de acordo com a Tabela 1. Pode-se observar que a concentração de colesterol total aumentou mais de 10 vezes em todos os grupos. No grupo LDE-etoposide houve o maior aumento da concentração, sendo 20 vezes maior que a concentração inicial. A concentração de triglicérides também aumentou cerca de 10 vezes em todos os grupos do estudo. Não houve diferença na concentração de colesterol de HDL.

**Tabela 1:** Perfil lipídico dos coelhos dosado antes do início da dieta rica em colesterol (basal) e ao final do protocolo. Dados expressos em Média±D.P.

<b>Perfil Lipídico (mg/dL)</b>	<b>Controle</b>		<b>LDE-etoposide</b>		<b>Combinação</b>	
	Basal	Final	Basal	Final	Basal	Final
Colesterol Total	42±29	1369±279*	36±25	2250±321*†	31±13	1667±642*#
HDL-C	13±8	18±8	12±4	19±6	24±14	24±11
Triglicérides	53±33	354±231&	35±48	694±234*	47±37	459±330†

\*p<0,001 versus basal; †p<0,001 versus final Controle; #p<0,01 versus final LDE-etoposide; &p<0,05 versus basal; ‡p<0,01 versus final Controle.

#### 4.4- Perfil Hematológico

Na Tabela 2 estão expressos os dados dos hemogramas dos animais dos grupos Controle, LDE-etoposide e Combinação. Foi observada uma redução no número de hemácias nos grupos LDE-etoposide e Combinação após o final do tratamento. A redução foi observada em relação ao grupo Controle e em relação ao estado basal de cada grupo. O número de hemácias ao final do estudo chegou à metade do valor basal. Não houve diferença no número de leucócitos totais nem na contagem diferencial de leucócitos.

**Tabela 2:** Perfil hematológico dos grupos Controle, tratado com LDE-etoposide e tratado com a combinação LDE-etoposide/LDE-paclitaxel. Dados expressos em Média±D.P.

<b>Perfil</b>	<b>Controle</b>		<b>LDE-etoposide</b>		<b>Combinação</b>	
	Basal	Final	Basal	Final	Basal	Final
<b>Hematológico</b>						
Hemácias ( $10^9$ /mL)	5,7±1	4,4±1,6	6,0±1	2,9±0,8*†#	4,5±1	2,4±0,4*#
Leucócitos ( $10^6$ /mL)	6,6±1	7,6±3,1	7,6±3,5	6,9±2,9	5,0±1,6	6,2±10
Linfócitos(%)	72,8±4,7	62,7±11,6	68,2±7,9	73,7±9,9	77,1±11,4	66±11
Monócitos (%)	5,6±5	10,8±5,4	7±3,9	5,9±3,7	4,2±3,8	8,9±5,8
Neutrófilos (%)	18,9±9,9	26,6±10,2	25,9±7,4	20,4±9,3	18,7±9,8	25,1±12,7

\*p<0,001 versus basal; †p<0,001 versus final Controle; #p<0,01 versus final Controle.

#### **4.5- Análise macroscópica das lesões ateroscleróticas**

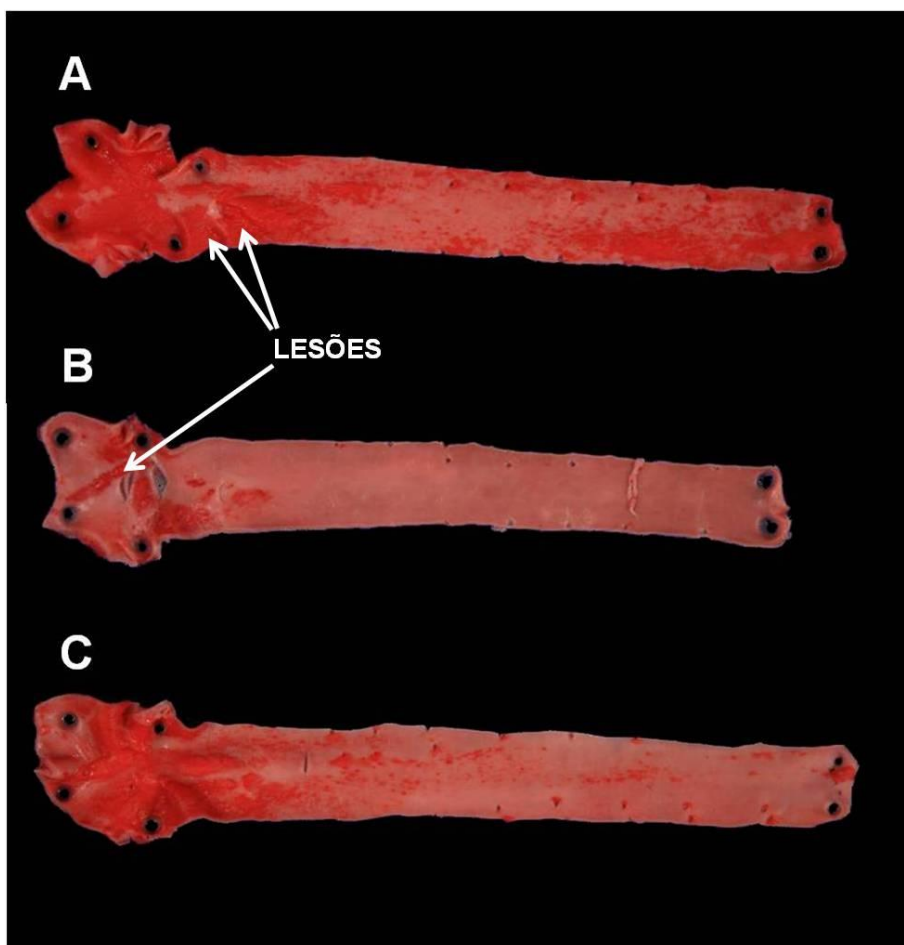
A Figura 3 ilustra os depósitos lipídicos das lesões ateroscleróticas nas aortas dos coelhos dos grupos Controle, LDE-etoposide e Combinação LDE-etoposide/LDE-paclitaxel. Na Tabela 3 estão dispostas as medidas das aortas e das lesões ateroscleróticas macroscópicas dos animais dos grupos Controle, LDE-etoposide e tratado com a combinação LDE-etoposide/LDE-paclitaxel.

Houve diferença na razão área de lesão/área total dos dois grupos tratados em relação ao controle e também do grupo LDE-etoposide em relação ao grupo Combinação LDE-etoposide/LDE-paclitaxel. Nos coelhos tratados com LDE-etoposide, a razão área de lesão/área total da aorta foi 11 vezes menor do que no grupo Controle. Nos coelhos tratados com a combinação esta razão foi cerca de 3 vezes menor em relação ao grupo Controle. Entre os grupos de animais tratados, a razão entre área de lesão/área total foi aproximadamente 3 vezes menor nos coelhos tratados com LDE-etoposide isolado. O grupo tratado somente com LDE-etoposide foi o grupo que apresentou menos lesões macroscópicas.

**Tabela 3:** Medidas da área e das lesões macroscópicas das artérias dos coelhos dos grupos Controle, LDE-etoposide e Combinação LDE-etoposide/LDE-paclitaxel. Dados expressos em Média±D.P.

<b>Macroscopia</b>	<b>Controle</b>	<b>LDE-etoposide</b>	<b>Combinação</b>
Área total da aorta (pixel <sup>2</sup> ) (10 <sup>-6</sup> )	0,54±0,44	1,05±0,17	1,17±0,20
Área de lesão (pixel <sup>2</sup> ) (10 <sup>-6</sup> )	0,40±0,32	0,06±0,04	0,25±0,19
Área de lesão/área total	0,68±0,17	0,06±0,04*†	0,20±0,14*

\*p<0,001 versus Controle; †p<0,05 versus Combinação.



**Figura 3:** Aortas de coelhos dos grupos Controle (A), LDE-etoposide (B) e Combinação (C) com os depósitos lipídicos das lesões ateroscleróticas evidenciados por ScarlatR.

#### 4.6- Análise morfométrica de cortes histológicos de arco aórtico

A análise morfométrica dos cortes histológicos das aortas dos coelhos dos grupos Controle, LDE-etoposide e Combinação LDE-etoposide/LDE-paclitaxel está apresentada na Tabela 4. Não houve diferença entre a área total da aorta entre os grupos Controle e Combinação. Já entre os animais

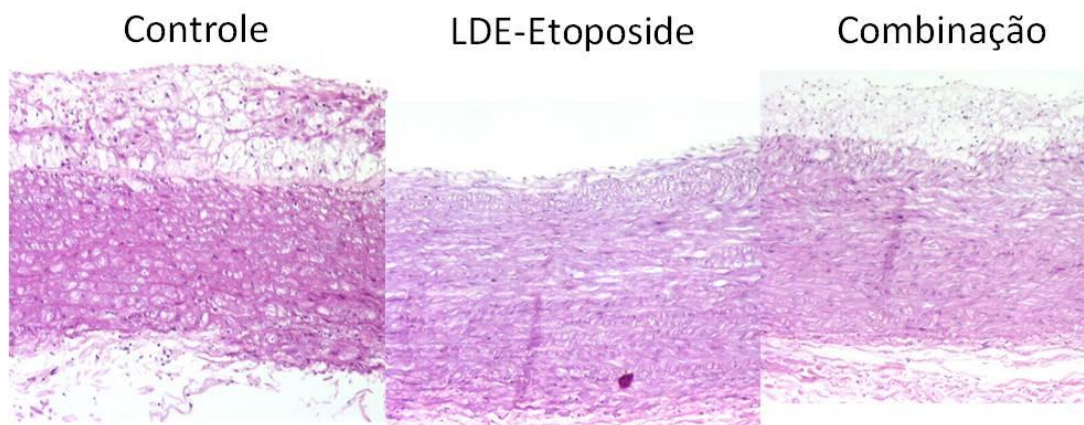
LDE-etoposide e os animais dos grupos Controle e Combinação houve diferença significativa.

**Tabela 4:** Morfometria das áreas e das espessuras totais e da camada íntima do arco aórtico de coelhos dos grupos Controle, LDE-etoposide e Combinação LDE-etoposide/LDE-paclitaxel. Dados expressos em Média±D.P.

<b>Morfometria</b>	<b>Controle</b>	<b>LDE-etoposide</b>	<b>Combinação</b>
Área total ( $\mu\text{m}^2$ ) ( $10^{-3}$ )	403,08±46,36	302,82±15,15*†	408,52±92,65
Área da íntima ( $\mu\text{m}^2$ ) ( $10^{-3}$ )	104,07±12,03	27,00±8,39*	71,40±81,75
Área da íntima/área total	0,26±0,03	0,09±0,03#	0,15±0,15&
Espessura total ( $\mu\text{m}^2$ )	533,95±24,17	413,53±20,77*†	546,86±124,98
Espessura da íntima ( $\mu\text{m}^2$ )	139,51±16,68	34,81±10,61*	100,14±111,82
Espessura da íntima/espessura total	0,26±0,02	0,08±0,02#	0,16±0,15&

\*p<0,01 versus Controle; †<0,001 versus Combinação; #p<0,001 versus Controle; &p<0,05 versus Controle.

A da área da camada íntima da aorta do grupo LDE-etoposide foi cerca de 4 vezes menor que no grupo Controle. A área da camada íntima do grupo Combinação foi mais de duas vezes maior que no grupo LDE-etoposide. A razão entre a área da camada íntima e a área total da aorta do grupo LDE-etoposide foi menor que no grupo Controle, assim como no grupo Combinação, apesar deste apresentar razão de área maior que o grupo LDE-etoposide (Figura 4).



**Figura 4:** Cortes histológicos de arco aórtico representativos de lesão aterosclerótica nos grupos Controle, LDE-etoposide e Combinação LDE-etoposide/LDE-paclitaxel. Coloração: hematoxilina-eosina. Aumento de 100X.

Em relação à espessura total das aortas, o grupo LDE-etoposide apresentou uma espessura menor em relação aos grupos Controle e Combinação, sendo que a maior diferença foi verificada em relação ao grupo Combinação.

A espessura da camada íntima do grupo LDE-etoposide também apresentou diferença significativa em relação à espessura da íntima do grupo Controle, sendo 4 vezes menor.

A razão entre a espessura da camada íntima e a espessura total da aorta do grupo LDE-etoposide foi 3 vezes menor que a razão do grupo



Controle. A razão da espessura entre o grupo Combinação e o grupo Controle foi menor. Ainda assim, a razão de espessura do grupo Combinação foi o dobro da razão do grupo LDE-etoposide.

#### **4.7- Análise imunohistoquímica**

##### **4.7.1- Quantificação de macrófagos e células de músculo liso**

A Tabela 5 apresenta os resultados da imuno-marcação para identificação de macrófagos e células de músculo liso na camada íntima do arco aórtico dos coelhos dos grupos Controle, LDE-etoposide e Combinação LDE-etoposide/LDE-paclitaxel.

**Tabela 5:** Morfometria da área da camada íntima, da área imuno-marcada e porcentagem de área imuno-marcada por macrófagos e células de músculo liso presentes no arco aórtico de coelhos dos grupos Controle, LDE-etoposide e Combinação LDE-etoposide/LDE-paclitaxel. Dados expressos em Média±D.P.

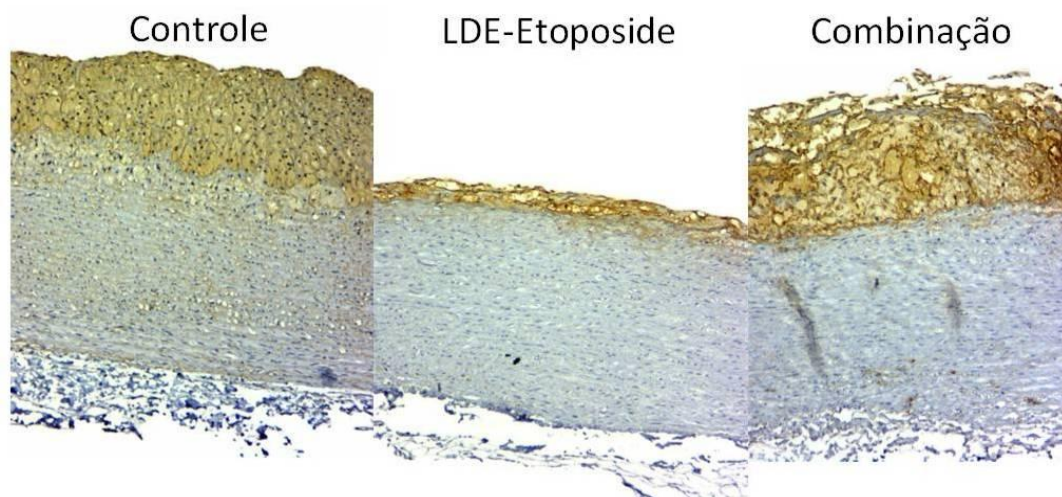
<i>Tipo celular</i>	<b>Controle</b>	<b>LDE-etoposide</b>	<b>Combinação</b>
<i>Macrófagos</i>			
Área total da íntima ( $\mu\text{m}^2$ ) ( $10^{-3}$ )	123,52±51,30	18,40±15,26*	86,22±92,39
Área marcada ( $\mu\text{m}^2$ ) ( $10^{-3}$ )	81,13±29,99	9,80±11,02†	62,76±76,26
% de área marcada na íntima	67,73±13,03	26,96±28,46*	45,31±30,76
<i>Células de músculo liso</i>			
Área total da íntima ( $\mu\text{m}^2$ ) ( $10^{-3}$ )	122,93±44,70	32,34±42,22*	56,57±71,91†
Área marcada ( $\mu\text{m}^2$ ) ( $10^{-3}$ )	29,01±7,89	7,29±9,42#	12,10±14,20*
% de área marcada na íntima	27,52±10,63	7,89±9,06*	13,16±12,05†

\*p<0,01 versus Controle; †p<0,05 versus Controle; #p<0,001 versus Controle.

Em relação à presença de macrófagos, a área imuno-marcada no grupo LDE-etoposide foi 8 vezes menor do que no grupo Controle (Figura 5). Já o grupo Combinação LDE-etoposide/LDE-paclitaxel apresentou uma área de marcação semelhante à do grupo Controle. Esta observação é também corroborada pelos valores de porcentagem de área de marcação da íntima. A porcentagem de imuno-marcação para macrófagos no grupo LDE-etoposide é cerca de metade da porcentagem do grupo Controle. Já o grupo Combinação não apresentou diferença em relação ao grupo Controle, apresentando valores mais altos que o grupo LDE-etoposide.

A presença de células de músculo liso (Figura 5) no grupo LDE-etoposide foi 3 vezes menor que no grupo Controle, tanto em relação à área marcada quanto em relação à porcentagem de área imuno-marcada. O grupo Combinação apresentou menor presença de macrófagos em relação ao grupo Controle. Esta diferença foi de 2 vezes, mas este valor representa o dobro da área imuno-marcada no grupo LDE-etoposide.

### Macrófagos



### Células de músculo liso



**Figura 5:** Cortes histológicos de arco aórtico de animais dos grupos Controle, LDE-etoposide e Combinação LDE-etoposide/LDE-paclitaxel imuno-marcados para macrófagos e células de músculo liso. Aumento de 100X.

O tratamento que apresentou maior eficácia foi o tratamento com LDE-etoposide, portanto as análises imunohistoquímicas para receptores de lipoproteínas, citocinas inflamatórias, MMP9 e marcadores de proliferação celular foram feitas apenas neste grupo e no grupo Controle para comparação.

#### **4.7.2- Quantificação da expressão protéica de receptores de lipoproteínas**

Os valores da morfometria da imuno-marcação para os receptores de lipoproteínas LDL-R e LRP-1 estão expressos na Tabela 6.

**Tabela 6:** Morfometria da área da camada íntima, da área imuno-marcada e porcentagem de área imuno-marcada pelos receptores de lipoproteína LDL-R e LRP-1 presentes no arco aórtico de coelhos dos grupos Controle e LDE-etoposide. Dados expressos em Média±D.P.

<i>Receptores de Lipoproteínas</i>	<b>Controle</b>	<b>LDE-etoposide</b>
<i>LDL-R</i>		
Área total da íntima ( $\mu\text{m}^2$ ) ( $10^{-3}$ )	91,08±51,41	25,41±32,46†
Área marcada ( $\mu\text{m}^2$ ) ( $10^{-3}$ )	34,65±29,31	6,58±9,89*
% de área marcada na íntima	35,13±20,13	11,28±16,80*
<i>LRP-1</i>		
Área total da íntima ( $\mu\text{m}^2$ ) ( $10^{-3}$ )	107,58±55,33	16,26±16,42#
Área marcada ( $\mu\text{m}^2$ ) ( $10^{-3}$ )	47,50±36,19	1,56±2,77†
% de área marcada na íntima	41,94±21,35	5,11±9,92#

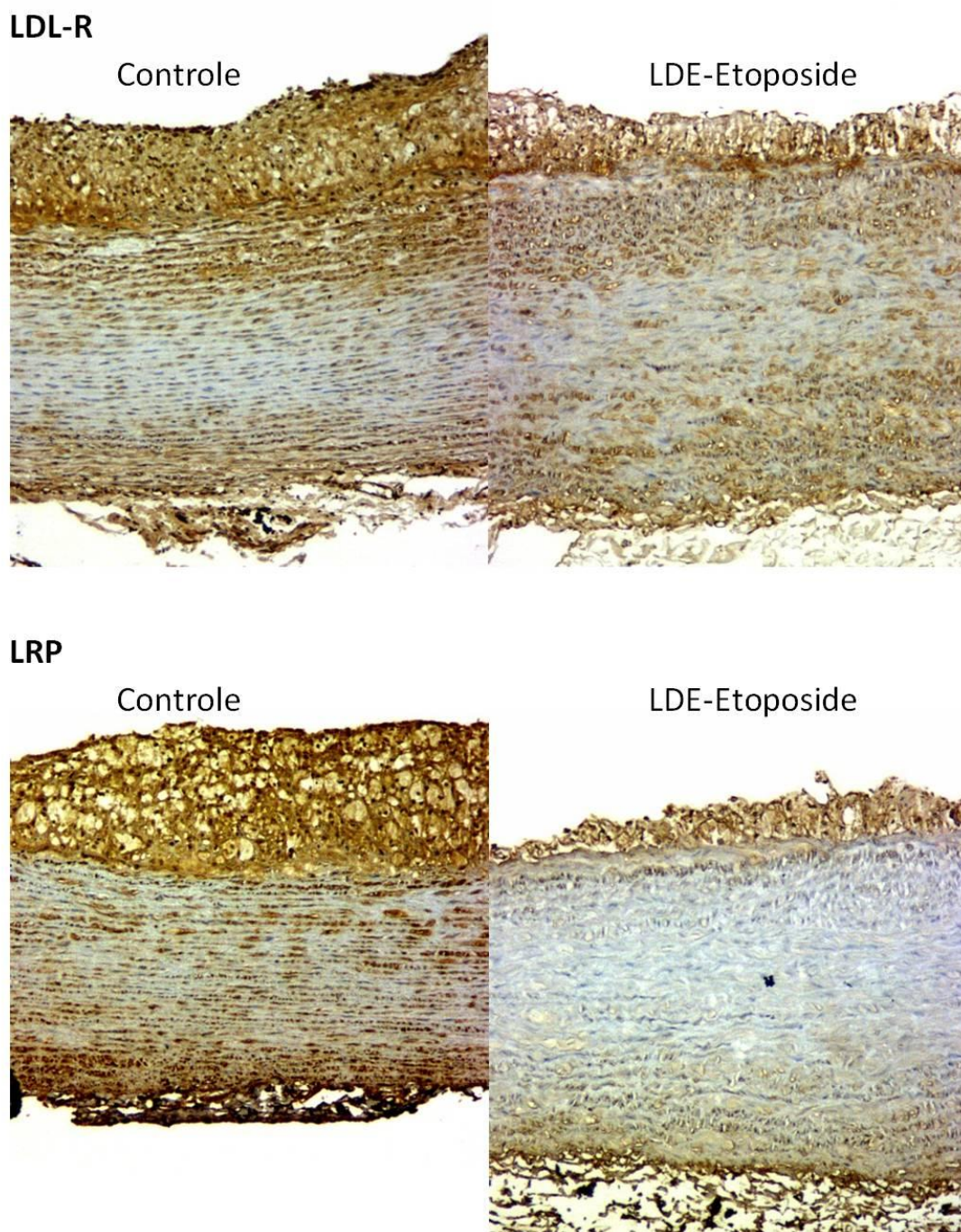
\*p<0,05; †p<0,01; #p<0,001.

A expressão protéica observada para o LDL-R foi menor no grupo LDE-etoposide em relação ao grupo Controle. Os valores de área imuno-marcada foi 5 vezes menor em relação ao grupo Controle e a porcentagem de área marcada foi 3 vezes menor no grupo LDE-etoposide em relação ao grupo Controle (Figura 6).

A expressão protéica de LRP-1 foi menor no grupo LDE-etoposide em relação ao grupo Controle. A área marcada foi quase 30 vezes menor no



grupo LDE-etoposide em relação ao grupo Controle e a porcentagem de área marcada foi 8 vezes menor (Figura 6).



**Figura 6:** Cortes histológicos de arco aórtico de animais dos grupos Controle e LDE-etoposide imuno-marcados para os receptores de lipoproteínas LDL-R e LRP-1. Aumento de 100X.

A Tabela 7 apresenta os valores da área imuno-marcada para os receptores CD36 e SR-B1.

**Tabela 7:** Morfometria da área da camada íntima, da área imuno-marcada e porcentagem de área imuno-marcada pelos receptores de lipoproteína CD36 e SR-B1 presentes no arco aórtico de coelhos dos grupos Controle e LDE-etoposide. Dados expressos em Média±D.P.

<i>Receptores de Lipoproteínas</i>	<b>Controle</b>	<b>LDE-etoposide</b>
<i>CD36</i>		
Área total da íntima ( $\mu\text{m}^2$ ) ( $10^{-3}$ )	100,77±40,02	23,74±32,42#
Área marcada ( $\mu\text{m}^2$ ) ( $10^{-3}$ )	41,17±24,96	5,29±8,73#
% de área marcada na íntima	40,13±15,26	8,60±13,54#
<i>SR-B1</i>		
Área total da íntima ( $\mu\text{m}^2$ ) ( $10^{-3}$ )	93,00±41,11	27,42±41,74†
Área marcada ( $\mu\text{m}^2$ ) ( $10^{-3}$ )	19,04±12,47	4,69±9,16*
% de área marcada na íntima	19,86±8,26	4,87±8,65†

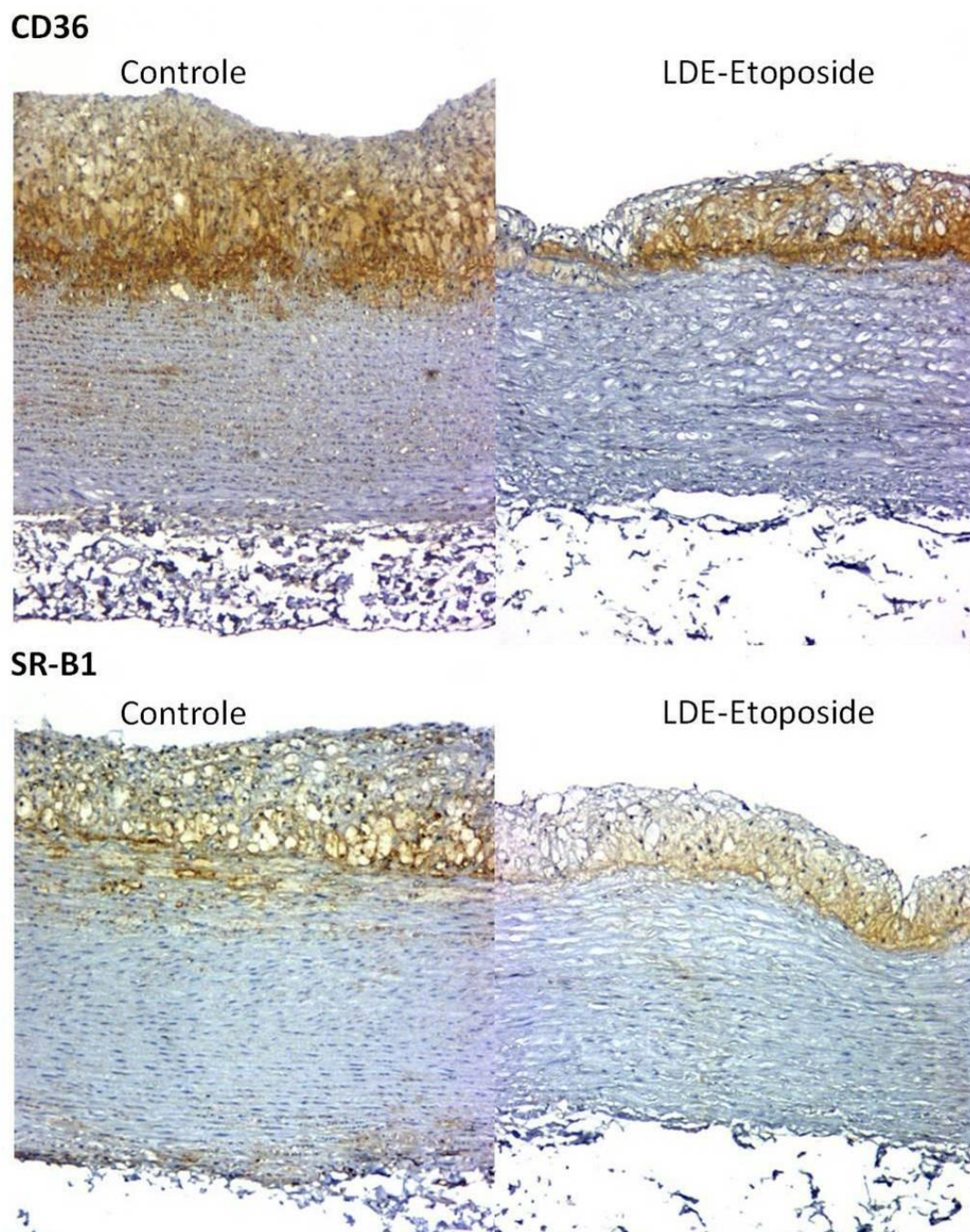
\*p<0,05; †p<0,01; #p<0,001.

A área imuno-marcada para o receptor CD36 foi 8 vezes menor no grupo LDE-etoposide comparado com o grupo Controle. A porcentagem de área marcada no grupo LDE-etoposide também foi menor, cerca de 4 vezes, em relação ao grupo Controle (Figura 7).

A expressão protéica de SR-B1 foi cerca de 4 vezes menor no grupo LDE-etoposide. A porcentagem de área marcada também foi cerca de 4 vezes menor no grupo LDE-etoposide em comparação com o grupo Controle (Figura 7).

Os receptores LRP-1, CD36 E SR-B1 tiveram uma porcentagem de área marcada similar. O LDL-R apresentou uma porcentagem de expressão protéica um pouco maior em relação aos demais receptores.





**Figura 7:** Cortes histológicos de arco aórtico de animais dos grupos Controle e LDE-etoposide imuno-marcados para os receptores de lipoproteínas CD36 e SRB-1. Aumento de 100X.

#### **4.7.3- Quantificação da expressão protéica de citocinas inflamatórias**

Na Tabela 8 estão expressos os valores da expressão protéica das citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ .

A expressão protéica medida em área da IL-1 $\beta$  foi menor no grupo LDE-etoposide do que no grupo Controle, uma expressão cerca de 3 vezes menor. Em relação à porcentagem de área marcada, a diferença foi 2 vezes menor (Figura 8).

A área imuno-marcada por TNF- $\alpha$ , assim como no caso da IL-1 $\beta$ , foi menor no grupo LDE-etoposide do que no grupo Controle. A área imuno-marcada foi quase 7 vezes maior no grupo Controle. Quando se compara a porcentagem de área marcada, a diferença foi de mais de 3 vezes (Figura8).

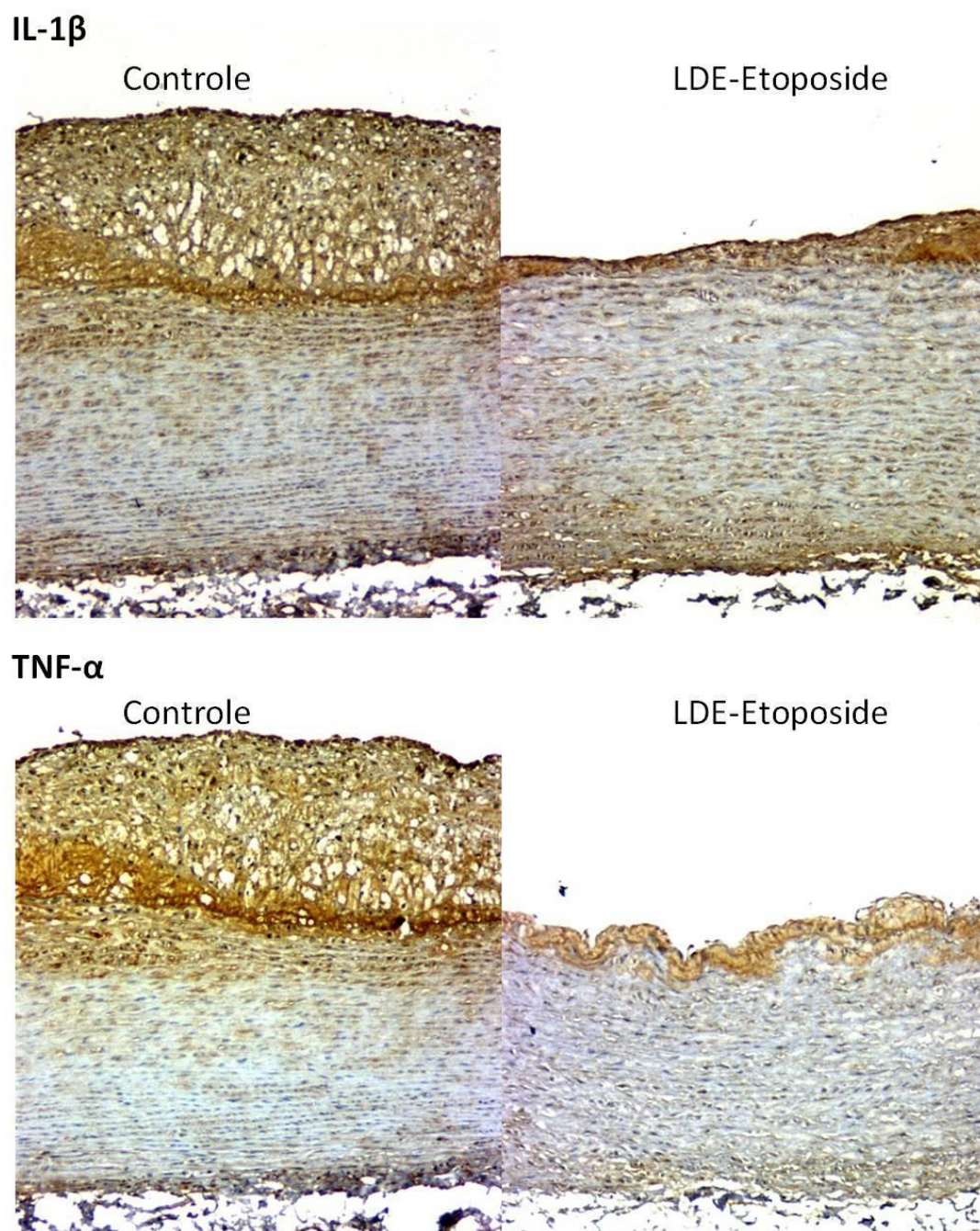
As duas citocinas tiveram porcentagens de expressão parecida, somente a área imuno-marcada por TNF- $\alpha$  foi muito maior.

**Tabela 8:** Morfometria da área da camada íntima, da área imuno-marcada e porcentagem de área imuno-marcada pelas citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  presentes em arco aórtico de coelhos dos grupos Controle e LDE-etoposide. Dados expressos em Média $\pm$ D.P.

<i>Citocinas inflamatórias</i>	<b>Controle</b>	<b>LDE-etoposide</b>
<i>IL-1<math>\beta</math></i>		
Área total da íntima ( $\mu\text{m}^2$ ) ( $10^{-3}$ )	95,07 $\pm$ 54,34	34,98 $\pm$ 45,28*
Área marcada ( $\mu\text{m}^2$ ) ( $10^{-3}$ )	52,41 $\pm$ 32,37	16,00 $\pm$ 20,93*
% de área marcada na íntima	55,41 $\pm$ 17,82	24,82 $\pm$ 22,69†
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>		
Área total da íntima ( $\mu\text{m}^2$ ) ( $10^{-3}$ )	85,75 $\pm$ 34,87	36,59 $\pm$ 61,84
Área marcada ( $\mu\text{m}^2$ ) ( $10^{-3}$ )	17,84 $\pm$ 10,16	2,65 $\pm$ 4,40#
% de área marcada na íntima	20,04 $\pm$ 15,77	5,57 $\pm$ 6,42#

\*p<0,05; †p<0,01; #p<0,001.





**Figura 8:** Cortes histológicas de arco aórtico de animais dos grupos Controle e LDE-etoposide imuno-marcados para as citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Aumento de 100X.

#### 4.7.4- Quantificação da expressão protéica de MMP9

A Tabela 9 apresenta os valores da imuno-marcação para MMP9. A área de expressão protéica foi 4 vezes menor no grupo LDE-etoposide comparado com o grupo Controle. A porcentagem de área marcada foi cerca de 2 vezes menor no grupo LDE-etoposide (Figura 9).

**Tabela 9:** Morfometria da área da camada íntima, da área imuno-marcada e porcentagem de área imuno-marcada pela metaloproteinase da matriz MMP9 presente em arco aórtico de coelhos dos grupos Controle e LDE-etoposide. Dados expressos em Média±D.P.

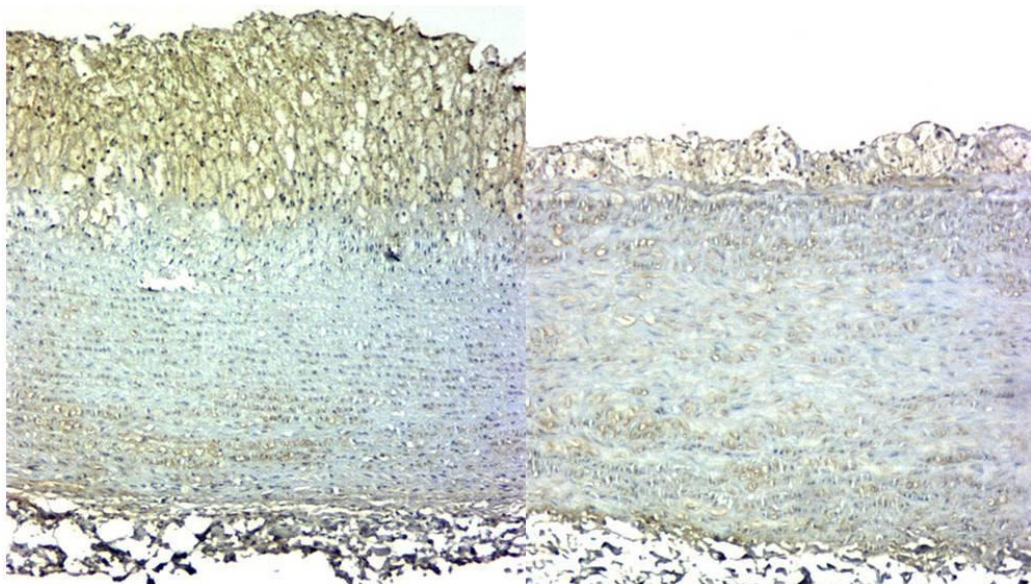
<b>MMP9</b>	<b>Controle</b>	<b>LDE-etoposide</b>
Área total da íntima ( $\mu\text{m}^2$ ) ( $10^{-3}$ )	108,19±48,68	20,84±31,63#
Área marcada ( $\mu\text{m}^2$ ) ( $10^{-3}$ )	14,58±8,98	3,37±4,88†
% de área marcada na íntima	14,98±8,59	6,44±8,41*

\*p<0,05; †p<0,01; #p<0,001.

**MMP9**

Controle

LDE-Etoposide



**Figura 9:** Cortes histológicos de arco aórtico de animais dos grupos Controle e LDE-etoposide imuno-marcados para MMP9. Aumento de 100X.

#### **4.7.5- Quantificação da expressa protéica de marcadores de proliferação celular**

A Tabela 10 apresenta os valores de expressão protéica para os marcadores de proliferação celular PCNA, topoisomerase II $\alpha$  e tubulina na camada íntima da aorta.

**Tabela 10:** Morfometria da área da camada íntima, da área imuno-marcada e porcentagem de área imuno-marcada pelos marcadores de proliferação PCNA, topoisomerase II $\alpha$  e tubulina presentes em arco aórtico de coelhos dos grupos Controle e LDE-etoposide. Dados expressos em Média $\pm$ D.P.

<b>Marcadores de proliferação</b>	<b>Controle</b>	<b>LDE-etoposide</b>
<i>PCNA</i>		
Área total da íntima ( $\mu\text{m}^2$ ) ( $10^{-3}$ )	101,80 $\pm$ 62,00	19,11 $\pm$ 20,65†
Área marcada ( $\mu\text{m}^2$ ) ( $10^{-3}$ )	2,09 $\pm$ 2,20	1,42 $\pm$ 1,48
% de área marcada na íntima	3,53 $\pm$ 3,92	4,51 $\pm$ 4,55
<i>Topoisomerase II<math>\alpha</math></i>		
Área total da íntima ( $\mu\text{m}^2$ ) ( $10^{-3}$ )	104,79 $\pm$ 57,36	25,08 $\pm$ 31,94†
Área marcada ( $\mu\text{m}^2$ ) ( $10^{-3}$ )	51,50 $\pm$ 40,34	4,82 $\pm$ 5,79†
% de área marcada na íntima	42,46 $\pm$ 15,77	8,51 $\pm$ 10,35&
<i>Tubulina</i>		
Área total da íntima ( $\mu\text{m}^2$ ) ( $10^{-3}$ )	114,33 $\pm$ 61,45	43,82 $\pm$ 53,83*
Área marcada ( $\mu\text{m}^2$ ) ( $10^{-3}$ )	54,90 $\pm$ 32,87	16,31 $\pm$ 25,52*
% de área marcada na íntima	47,40 $\pm$ 15,38	16,01 $\pm$ 19,82†

\*p<0,05; †p<0,01; &p<0,0001.

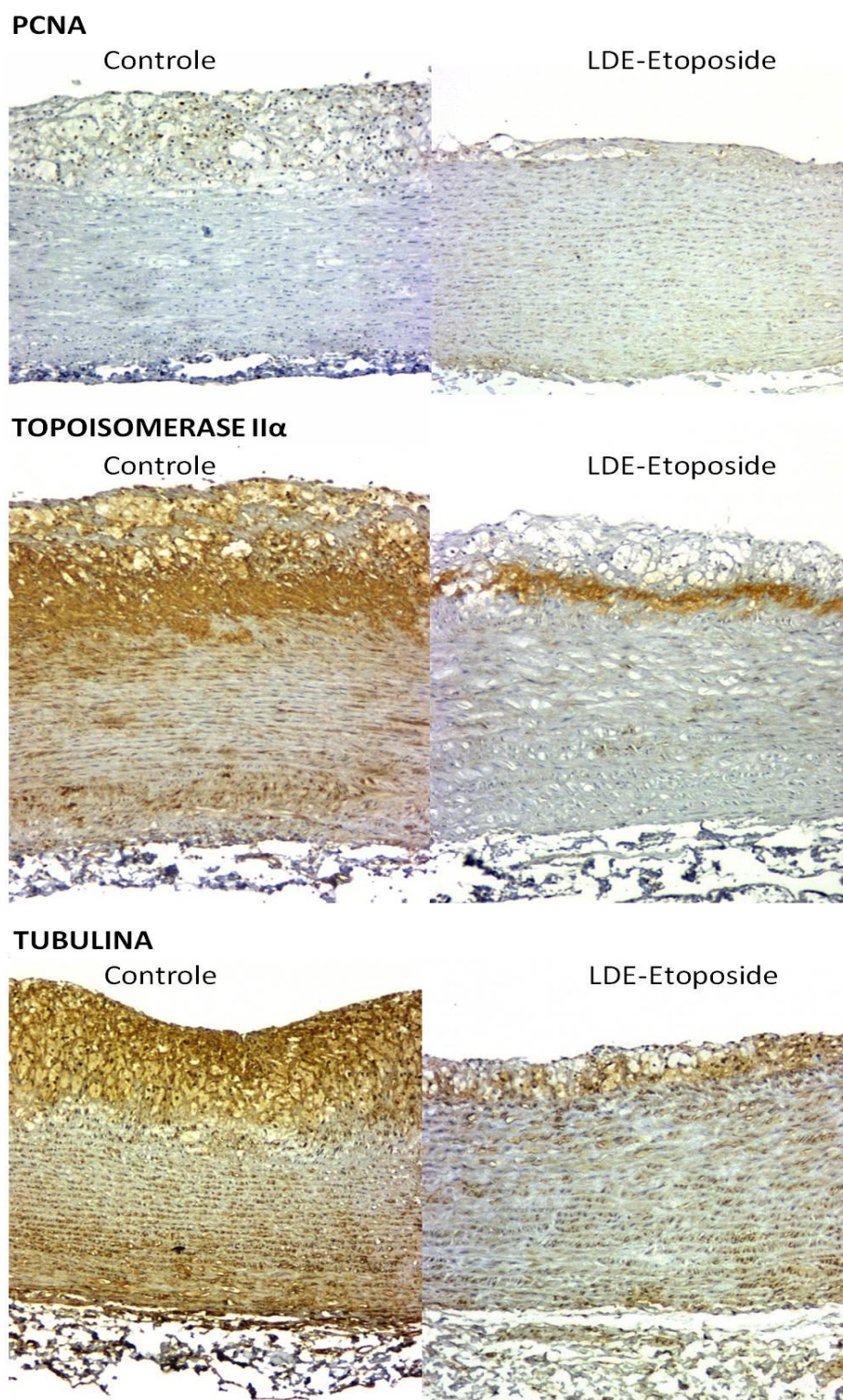
A expressão protéica de PCNA foi similar nos dois grupos, não apresentando diferença significativa.

A área marcada para topoisomerase II $\alpha$  na camada íntima foi cerca de 7 vezes menor no grupo LDE-etoposide comparada com o grupo Controle e a porcentagem de marcação foi 5 vezes menor no grupo LDE-etoposide.

A expressão de tubulina foi mais de 3 vezes maior na medida da área marcada. Em relação à porcentagem de expressão, o grupo LDE-etoposide apresentou uma expressão 3 vezes menor que o grupo Controle.

Entre os marcadores de proliferação celular, o único que não apresentou diferença de expressão entre os grupos foi o PCNA. Já a topoisomerase II $\alpha$  e a tubulina apresentaram expressão menor no grupo LDE-etoposide (Figura 10).





**Figura 10:** Cortes histológicos de arco aórtico de animais dos grupos Controle e LDE-etoposide imuno-marcados para os marcadores de proliferação celular PCNA, topoisomerase II $\alpha$  e tubulina. Aumento de 100X.

# DISCUSSÃO

---

---

## 5- DISCUSSÃO

Neste estudo foi avaliada a eficácia terapêutica dos tratamentos com etoposide e com a combinação dos fármacos etoposide e paclitaxel veiculados em uma emulsão lipídica, a LDE. A associação de quimioterápicos à LDE aumenta a concentração do fármaco no tecido alvo, por conta do aumento dos receptores de LDL em células com alta taxa de proliferação (Ho et al., 1974). Esta maior concentração do fármaco no tecido alvo reduz a toxicidade e aumenta a efetividade do fármaco.

Em trabalhos anteriores do grupo foi observada maior concentração de LDE em tumores quando comparado com tecido normal, tanto em modelos experimentais quanto em pacientes e em lesões ateroscleróticas induzidas em coelhos (Rodrigues et AL., 2005; Azevedo et. al, 2005; Maranhão et al., 2008) e uma maior eficácia terapêutica da terapia de fármacos associados à LDE em modelos tumorais do que as respectivas formulações comerciais, além de menor toxicidade do tratamento mesmo em doses mais altas (Rodrigues et al., 2005; Lo Prete et al., 2006).

Por conta da menor toxicidade observada em trabalhos anteriores e pela característica proliferativa e inflamatória das lesões ateroscleróticas, foi feita uma experiência de tratamento de aterosclerose induzida em coelhos

com LDE-paclitaxel, que obteve uma redução das lesões ateroscleróticas de cerca de 60% e não apresentou toxicidade hematológica significativa, abrindo caminho para o uso desse fármaco em estudos clínicos (Maranhão, 2008).

Considerou-se então a possibilidade do uso de outros quimioterápicos, como o etoposide, no tratamento da aterosclerose. O etoposide tem um mecanismo de ação diferente do paclitaxel e age em fases diferentes do ciclo celular. Por conta disso, a combinação dos fármacos poderia levar a um sinergismo, aumentando a eficácia do tratamento. Em trabalho anterior, a quimioterapia combinada de LDE-etoposide e LDE-paclitaxel foi aplicada em modelo experimental de tumor e mostrou maior eficácia terapêutica do que os mesmos quimioterápicos na sua formulação comercial, com menor toxicidade hematológica (Kretzer, 2007).

O tratamento com LDE-etoposide foi eficaz em tratar as lesões ateroscleróticas, mas, surpreendentemente, o efeito aditivo esperado da combinação dos fármacos não foi observado no presente estudo. A monoterapia com LDE-etoposide teve eficácia terapêutica maior do que a combinação LDE-etoposide/LDE-paclitaxel neste modelo experimental de aterosclerose induzida por dieta rica em colesterol em coelhos.

O tratamento com LDE-etoposide foi mais eficaz em reduzir as de lesões macroscópicas e microscópicas. Em relação a dois dos principais marcadores de aterosclerose em modelos experimentais, a presença de macrófagos e de células de músculo liso na camada íntima da artéria, a monoterapia também se mostrou muito mais eficaz.

Diversos estudos clínicos avaliaram a combinação de etoposide e paclitaxel em tratamento de câncer. Em câncer de células pequenas de pulmão, um estudo mostrou sinergismo quando se administrou paclitaxel junto a um regime de etoposide/carboplatina e a tolerabilidade do tratamento foi mantida (Reck et al,2003). Outro estudo mostrou que o fator limitante na decisão das doses e intervalos de administração no tratamento combinado de paclitaxel e etoposide foi a toxicidade, além de regimes diferentes apresentarem diferentes respostas (Lokich, et al., 1998).

A combinação entre os fármacos LDE-etoposide e LDE-paclitaxel apresentou efeito antagônico neste modelo experimental de aterosclerose, o que pode ser devido ao esquema terapêutico utilizado. São necessários mais estudos para avaliar o melhor esquema terapêutico para o uso desta combinação neste modelo experimental, já que em trabalhos anteriores a combinação teve sucesso no tratamento de tumores experimentais em camundongo (Kretzer, 2007).

A principal toxicidade associada ao etoposide comercial é a neutropenia, que não foi observada no neste estudo (Rowinsky et al., 1993). O tratamento com LDE-etoposide levou a uma redução do número de hemácias nos animais, efeito observado em alguns estudos outros estudos com o fármaco comercial em pacientes (Chewaskulyong & Thongprasert, 1998) e em estudos em animais (de la Llera-Moya et al., 1992). A anemia não afetou o peso dos animais ou o consumo de ração, e talvez poderia ser minimizada pela redução de dose ou mudanças no esquema de administração do fármaco.

O tratamento com LDE-etoposide mostrou maior eficácia no tratamento da aterosclerose experimental. Houve uma redução de 8 vezes na presença de macrófagos na íntima das artérias dos coelhos do grupo LDE-etoposide, uma causa importante para a redução de outros parâmetros inflamatórios estudados, como expressão protéica de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e MMP9, já que o processo inflamatório causado por macrófagos ativados na íntima é retroalimentado: quanto mais macrófagos, maior a inflamação local (Libby, 2010).

A menor presença de macrófagos nas lesões ateroscleróticas dos coelhos tratados com LDE-etoposide também pode ter levado à menor expressão do receptor *scavenger* CD36. O receptor *scavenger* CD36 é um dos principais responsáveis pela captação de LDL oxidada nas lesões

aterosclerótica. Como os depósitos lipídicos nas artérias dos animais tratados com LDE-etoposide foi 6 vezes menor, como observado na macroscopia, houve menor formação de células espumosas e menor expressão protéica de CD36 (Collot-Teixeira et al, 2007). Além disso, este fato também pode ter influenciado na expressão de SR-B1, principal responsável pelo transporte reverso das células (Moore & Freeman, 2006).

A menor expressão de marcadores de proliferação celular leva a pensar em uma progressão mais lenta da lesão no grupo tratado com LDE-etoposide. Além disso, a menor taxa de proliferação celular leva a uma menor avidéz por colesterol para síntese de novas membranas celulares, o que explica a menor expressão dos receptores de LDL-R.

O receptor LRP-1, além da captação de lipoproteínas ricas em apo E, também tem papel importante na clivagem e endocitose de outros componentes da lesão, como a MMP9 (Lillis et al, 2005). Estudos mostram que em camundongos que não expressam LRP-1 em células de músculo liso tem mais lesões ateroscleróticas (Boucher et al, 2003). No presente trabalho caso, a progressão mais lenta da lesão e a menor presença de inflamação e conseqüente menor número de ligantes para o LRP-1 pode ter levado a essa expressão de LRP-1 menor no grupo tratado com LDE-etoposide e muito maior no grupo Controle.

A análise dos resultados dos grupos de estudo leva a crer que o tratamento com LDE-etoposide é viável no tratamento da aterosclerose, mas a combinação desse fármaco com o LDE-paclitaxel necessita de mais estudos para melhor entendimento da interação entre seus mecanismos de ação no modelo experimental de aterosclerose.



# **CONCLUSÕES**

---

---

## 5- CONCLUSÕES

- O tratamento com LDE-etoposide foi mais eficaz em reduzir as lesões ateroscleróticas induzidas em coelho por dieta rica em colesterol do que o tratamento com a combinação entre LDE-etoposide e LDE-paclitaxel.
- O tratamento com LDE-etoposide foi eficaz em reduzir os parâmetros inflamatórios estudados, como presença de macrófagos, citocinas inflamatórias e MMP9.
- O tratamento com LDE-etoposide reduziu também a proliferação celular e a expressão de receptores de lipoproteínas, o que mostra sua eficácia em diminuir a progressão da lesão.

## **REFERÊNCIAS**

---

---

## 6- REFERÊNCIAS

Apostolakis S, Vogiatzi K, Krambovitis E, Spandidos DA. IL-1 cytokines in cardiovascular disease: diagnostic, prognostic and therapeutic implications. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2008. 6:150-8.

Azevedo CH, Carvalho JP, Valduga CJ, Maranhão RC. Plasma kinetics and uptake by the tumor of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) associated to etoposide oleate in patients with ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2005;97(1):178-182.

Bellott 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 Biomed Sci Appl*. 2001; 757:257-267.

Boucher P, Gotthardt M, Li WP, Anderson RG, Herz J. LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis. *Science*. 2003;300:329-332.

Chewaskulyong B, Thongprasert S. Preliminary study of efficacy of intravenous cisplatin plus oral etoposide in small cell lung cancer. *J Med Assoc Thai*. 1998; 8:37-41.

Collot-Teixeira S, Martin J, McDermott-Roe C, Poston R, McGregor JL. CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 2007;75:468-77.

Couto RD, Dallan LA, Lisboa LA, Mesquita CH, Vinagre CG, Maranhão RC. Deposition of free cholesterol in the blood vessels of patients with coronary artery disease: a possible novel mechanism for atherogenesis. *Lipids.* 2007;42(5):411-418.

de la Llera-Moya M, Rothblat GH, Glick JM, England JM. Etoposide treatment suppresses atherosclerotic plaque development in cholesterol-fed rabbits. *Arterioscler Thromb.* 1992;12(11):1363-1370.

Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood.* 1996. 87:2095-2147.

Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med.* 2002;8(11):1249-1256.

Fazio S, Linton MF. The inflamed plaque: cytokine production and cellular cholesterol balance in the vessel wall. *Am J Cardiol.* 2001;88:12E-15E.

Geng YJ, Libby P. Progression of atheroma: a struggle between death and procreation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(9):1370-1380.

Goble S, Bear HD. Emerging role of taxanes in adjuvant and neoadjuvant therapy for breast cancer: the potential and the questions. *Surg Clin North Am.* 2003; 83:943-71.

Goodman LS, Gilman A. As Bases farmacológicas da terapêutica. 11a ed., Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana Editores, 2006.

Hansson GK. Inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *J Thromb Haemost.* 2009;7 Suppl 1:328-331.

Heisig P. Type II topoisomerases--inhibitors, repair mechanisms and mutations. *Mutagenesis.* 2009;24(6):465-469.

Heldman AW, Cheng L, Jenkins GM, Heller PF, Kim DW, Ware M Jr, Nater C, Hruban RH, Rezai B, Abella BS, Bunge KE, Kinsella JL, Sollott SJ, Lakatta EG, Brinker JA, Hunter WL, Froehlich JP. Paclitaxel stent coating

inhibits neointimal hyperplasia at 4 weeks in a porcine model of coronary restenosis. *Circulation*. 2001;103:2289-2295.

Hirata RD, Hirata MH, Mesquita CH, Cesar TB, Maranhão RC. Effects of apolipoprotein B-100 on the metabolism of a lipid microemulsion model in rats. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1437:1453.

Ho YK, Smith RG, Brown MS, Goldstein JL. Low-Density Lipoprotein (LDL) Receptor Activity in Human Acute Myelogenous Leukemia Cells. *Blood*. 1978;52:1099-1114.

Horwitz SB, Cohen D, Rao S, Ringel I, Shen HJ, Yang CP. Taxol: mechanisms of action and resistant. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr*. 1993;15:55-61.

Horwitz SB. Mechanism of action of taxol. *Science*. 1992;13:134-136.

Kadar A, Glasz T. Development of atherosclerosis and plaque biology. *Cardiovasc Surg*. 2001;9(2):109-121.

Kan P, Chen Z, Chu I. Development of Nonionic Surfactant o/w Emulsion as a Paclitaxel Delivery System. *J Control Release*. 1999; 58: 271-278.

Kaur H, Bansal MP. Studies on Scavenger Receptors under Experimental Hypercholesterolemia: Modulation on Selenium Supplementation. *Biol Trace Elem Res.* 2010. [on line]

Kavallaris M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(3):194-204.

Kleemann R, Zadelaar S, Kooistra T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res.* 2008. 79:360-376.

Krainer M, Rodrigues M, ZielinskiMD C, Sinzinger H. Influence of etoposide on the retention of radiolabeled low-density lipoprotein in the arterial wall. *Arch Pathol Lab Med.* 1999;123(6):514-518.

Libby P, Okamoto Y, Rocha VZ, Folco E. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. *Circ J.* 2010. 4(2):213-220.

Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002;19-26;420(6917):868-874.

Lillis AP, Mikhailenko I, Strickland DK. Beyond endocytosis: LRP function in



cell migration, proliferation and vascular permeability. *J Thromb Haemost.* 2005; 3:1884-1893.

Liuzzo G, Giubilato G, Pinnelli M. T cells and cytokines in atherogenesis. *Lupus.* 2005;14:732-735.

Lo Prete A, Maria DA, Rodrigues DG, Valduga CJ, Ibanez OCM, Maranhão RC. Evaluation in melanoma-bearing mice of an etoposide derivative associated to a cholesterol-rich nanoemulsion. *J Pharm Pharmacol.* 2006;58(6):801-808.

Lokich J, Anderson N, Bern M, Coco F, Gotthardt S, Oliynyk P, Dow E. Paclitaxel, cisplatin, etoposide combination chemotherapy: a multifractionated bolus dose schedule for non-small cell lung cancer. *Eur. J. Cancer.* 1998;34(5):659-663.

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.* 1994; 109:73-81, 1994.

Lundberg B. Preparation of drug- low density lipoprotein complexes for delivery of antitumoral drugs via the low density lipoprotein pathway. *Cancer*

Res. 1987; 47:4105-4108.

Manfredi JJ, Horwitz SB. Taxol: an antimitotic agent with a unique mechanism of action. *Pharmacol. Ther.* 1984;25:83-125.

Mantuano E, Inoue G, Li X, Takahashi K, Gaultier A, Gonias SL, Campana WM. The hemopexin domain of matrix metalloproteinase-9 activates cell signaling and promotes migration of schwann cells by binding to low-density lipoprotein receptor-related protein. *J Neurosci.* 2008. 28:11571-11582.

Maranhão RC, Cesar TB, Pedroso MTB, Hirata MH, Mesquita CH. Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling LDL. *Lipids.* 1993; 28:691-696.

Maranhão RC, Cesar TB, Pedroso-Mariani SR, Hirata MH, Mesquita CH. Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling low-density lipoprotein. *Lipids.* 1993;28(8):691-696.

Maranhão RC, Garicochea B, Silva EL, Llacer PD, Pileggi FJC, Chamone DAF. 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. *Brazilian*

*J Med Res* 1992; 25:1003-1007.

Maranhão RC, Garicochea B, Silve EL, Dorlhiac-Llacer P, Cadena SMS, Coelho IJC, Meneghetti JC, Pileggi FJC, Chamone DAF. Plasma kinetics and biodistribution of a lipid emulsion resembling low-density lipoprotein in patients with acute leukemia. *Cancer Res.* 1994; 54:4660-4666.

Maranhão RC, Tavares ER, Padoveze AF, Valduga CJ, Rodrigues DG, Pereira MD. Paclitaxel associated with cholesterol-rich nanoemulsions promotes atherosclerosis regression in the rabbit. *Atherosclerosis.* 2008;197(2):959-66.

McKellar GE, McCarey DW, Sattar N, McInnes IB. Role for TNF in atherosclerosis? Lessons from autoimmune disease. *Nat Rev Cardiol.* 2009. 6:410-417.

Moore KJ, Freeman MW. Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006. 26:1702-1711.

Nair RR, Boyd DD. Expression cloning of novel regulators of 92 kDa type IV collagenase expression. *Biochem Soc Trans.* 2005. 33:1135-1136.

Onetto N, Canetta R, Winograd B, Catane R, Dougan M, Grechko J, Burroughs J, Rozenzweig M. Overview of Taxol safety. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 1993;(15):131-139.

Parry TJ, Thyagarajan R, Argentieri D, Falotico R, Siekierka J, Tallarida RJ. Effects of drug combinations on smooth muscle cell proliferation: an isobolographic analysis. *Eur J Pharmacol.* 2006;532(1-2):38-43.

Pinheiro KV, Hungria VT, Ficker ES, Valduga CJ, Mesquita CH, Maranhão RC. 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.* 2006;57(5):624-630.

Pires, L.A., Hegg, R., Valduga, C.J., Graziani, S.R., Rodrigues, D.G., Maranhão, R.C. Use of cholesterol-rich nanoparticles that bind to lipoprotein receptors as a vehicle to paclitaxel in the treatment of breast cancer: pharmacokinetics, tumor uptake and a pilot clinical study. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2009;63(2):281-287.

Plutzky J. Inflammatory pathways in atherosclerosis and acute coronary syndromes. *Am J Cardiol.* 2001.88:10K-15K.

Reck M, Jagos U, Grunwald F, Kaukel E, Koschel G, von Pawel J, Hessler S, Gatzemeier U. Long-term survival in SCLC after treatment with paclitaxel, carboplatin and etoposide--a phase II study. *Lung Cancer*. 2003; 39:63-69.

Rensen PC, Schiffelers RM, Versluis AJ, Bijstbosch MK, Van Kuijk-Meuwissen ME, Van Berkel TJ. Human recombinant apolipoprotein E-enriched liposomes can mimic low-density lipoproteins as carriers for the site-specific delivery of antitumor agents. *Mol Pharmacol*. 1997; 52:445-455.

Rodrigues DG, Maria DA, Fernandes DC, Valduga CJ, Couto RD, Ibanez OC, Maranhão RC. Improvement of paclitaxel therapeutic index by derivatization and association to a cholesterol-rich microemulsion: *in vitro* and *in vivo* studies. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2005;55(6):565-576.

Rowinsky EK, Eisenhauer EA, Chaudhry V, Arbuck SG, Donehower RC. Clinical toxicities encountered with paclitaxel (Taxol). *Semin Oncol*. 1993;20(4 Suppl 3):1-15.

Rudling MJ, Collins VP, Peterson CO. Delivery of Aclacinomycin A to human glioma cells in vitro by the low-density lipoprotein pathway. *Cancer Res*. 1983; 43:4600-4605.

Samadi-Baboli M, Favre G, Canal P, Soula G. Low density lipoprotein for cytotoxic drug targeting: improved activity of elliptinium derivative against B16 melanoma in mice. *Br J Cancer*. 1993; 68:319-326.

Saúde Brasil 2009 – Uma análise da situação de saúde e da agenda nacional e internacional de prioridades em saúde [on line]. Brasília:Ministério da Saúde; 2010. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/SAUDE\\_BRASIL\\_2009\\_COLETIVA.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/SAUDE_BRASIL_2009_COLETIVA.pdf)

Sengupta S, Tyagi P, Velpadian T, Gupta YK, Gupta SK. Etoposide encapsulated in positively charged liposomes: pharmacokinetic studies in mice and formulation stability studies. *Pharmacol Res*. 2000; 42:459-464.

Stahelin H. Activity of new glycosidic derivative (VP 16-213) related to podophyllotoxin in experimental tumors. *Eur. J. Cancer*. 1973;9:215-221.

Stone GW, Ellis SG, Cannon L, Mann JT, Greenberg JD, Spriggs D, O'Shaughnessy CD, DeMaio S, Hall P, Popma JJ, Koglin J, Russell ME; TAXUS V 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*. 2005;294(10):1215-1223.

Valduga CJ, Fernandes DC, Lo Prete AC, Azevedo CH, Rodrigues DG, Maranhão RC. Use of a cholesterol-rich microemulsion that binds to low-density lipoprotein receptors as vehicle for etoposide. *J Pharm Pharmacol.* 2003;55(12):1615-1622.

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.* 1971;93:2325-2327.

Weiss RB, Donehower RC, Wiernik PH, Ohnuma T, Gralla RJ, Trump DL, Baker JR Jr, Van Echo DA, Von Hoff DD, Leyland-Jones B. Hypersensitivity reactions from taxol. *J Clin Oncol.* 1990;8(7):1263-1268.

Willman JH, Holden JA. Immunohistochemical staining for DNA topoisomerase II-alpha in benign, premalignant, and malignant lesions of the prostate. *Prostate.* 2000;42(4):280-286.

Wood, AJ. Paclitaxel (Taxol). *New Eng J Med.* 1995; 332:1004-1014.

Xiao W, Wang L, Ryan JM, Pater A, Liu H. Incorporation of na(125)I-labeled hexa-iodinated diglyceride analog into low-density lipoprotein and high specific uptake by cells of cervical carcinoma cell lines. *J Drug Target.*

1999;152:250-256.

Zhu Y, Bujo H, Yamazaki H, Hirayama S, Kanaki T, Takahashi K, Shibasaki M, Schneider WJ, Saito Y. Enhanced expression of the LDL receptor family member LR11 increases migration of smooth muscle cells in vitro. *Circulation*. 2002;105(15):1830-1836.