

SHÉRRIRA MENEZES GARAVELO

Estudo experimental avaliando os efeitos de nanopartículas naturais e transialidase - componentes do PTCTS – no combate à aterosclerose em coelhos

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

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dra. Maria de Lourdes Higuchi
Coorientador: Prof. Dr. Abdelali Agouni

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Garavelo, Shérrira Menezes

Estudo experimental avaliando os efeitos de nanopartículas naturais e
transialidase – componetes do PTCTS – no combate à aterosclerose em coelhos /
Shérrira Menezes Garavelo. -- São Paulo, 2016.

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

Programa de Cardiologia.

Orientadora: Maria de Lourdes Higuchi.

Coorientador: Abdelali Agouni.

Descritores: 1.Aterosclerose 2.PTCTS 3.Partículas orgânicas 4.Transialidase
5.*Mycoplasma pneumoniae* 6.Coelhos

USP/FM/DBD-379/16

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Maria de Lourdes Higuchi, obrigada pela orientação, confiança, oportunidade de realizar este trabalho. Obrigada pelo constante incentivo, pelo exemplo de profissionalismo e dedicação aos objetivos. Obrigada principalmente pelos valiosos ensinamentos durante esta importante trajetória.

Ao Prof. Dr. Abdelali Agouni, pela recepção, pelos ensinamentos, pela paciência e disposição em sempre ajudar.

Às minhas amigas e companheiras de trabalho: Márcia, Suely, Joyce, Renata e Jaqueline, sempre dispostas a me ensinar, ajudar, aconselhar e repreender quando necessário. Obrigada pelo apoio, por toda ajuda, pelo carinho e pela paciência. Vocês têm e sempre terão um lugar especial no meu coração.

À equipe do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina, especialmente ao Dr. Eduardo, Vicente, Donizete e Clóvis, por toda ajuda, por estarem sempre disponíveis, e pelas risadas. Vocês são pessoas iluminadas.

Às equipes dos Laboratórios de Anatomia Patológica e de Análises Clínicas do InCor.

Aos meus professores, sem os quais eu jamais chegaria onde estou, em especial à Adriana Grosso, que me apresentou ao fascinante mundo da Ciência e Pesquisa e me guiou em meus primeiros passos.

Aos membros da banca, pelo tempo e atenção dispensados a esta tese.

À CAPES e FAPESP, pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, Marilza e Pedro, Édio e Sande, pelo apoio, carinho, amor, paciência, e lições de vida e para a vida. Meus exemplos. Amos vocês.

À toda minha família, em especial aos meus tios, Clemilda e Adailton, e primos Renata, William e Cristiano, meus pais e irmãos de coração, e minha avó, Marina, agradeço pela força, pelas risadas e pelos conselhos.

Ao Daniel Oka, pela compreensão, confiança, carinho e principalmente paciência.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste estudo.

Principalmente a Deus, que me deu forças para lutar contra adversidades e superar obstáculos em busca desse sonho.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Aterosclerose e inflamação	2
1.2 <i>Mycoplasma pneumoniae</i> e micropartículas no desenvolvimento da aterosclerose	3
1.3 PTCTS e seus compostos no tratamento da aterosclerose	5
2. OBJETIVOS	8
2.1 Objetivos primários	9
2.2 Objetivos secundários	9
3. MÉTODOS	10
3.1 Ambientação da pesquisa	11
3.2 Desenho do estudo	11
3.3 Preparo da dieta enriquecida com colesterol	14
3.4 Procedimentos cirúrgicos, técnicas laboratoriais e análises..	15
3.4.1 Coleta de sangue e métodos laboratoriais	15
3.4.2 Sacrifício dos animais	16
3.4.3 Análises morfométricas e histológicas	16
3.4.4 Análise de micropartículas contendo antígenos de <i>Mycoplasma pneumoniae</i> e LDL-oxidada	19
3.4.5 Análise imunohistoquímica da composição e vulnerabilidade da placa de ateroma	21
3.5 Análises estatísticas	23
4. RESULTADOS	25
4.1 Peso e consumo de ração	26
4.2 Controle negativo vs Controle positivo	26

4.3 PTCTS	30
4.4 Nanopartículas orgânicas naturais – PTC	32
4.5 Transialidase – TS	33
4.6 PDTC	34
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÕES	50
7. REFERÊNCIAS	54
ANEXOS	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho do estudo.....	13
Figura 2. A – Medida feita no ImageScope para obtenção dos valores do comprimento, altura e área da aorta. B – Quantificação da porcentagem de área com placa, marcada em amarelo, através da análise colorimétrica para identificação do corante Sudan IV dentro da área selecionada.....	17
Figura 3. Variáveis avaliadas no corte histológico da porção ascendente da aorta	18
Figura 4. Variáveis avaliadas no corte histológico das porções torácica e abdominal da aorta	19
Figura 5. Quantificação de MPs associadas a antígenos de Mic e LDLox pela técnica de imunofluorescência. Aumento x20.....	21
Figura 6. A – Seleção de área de placa a ser analisada pelo Aperio ImageScope. B – Área analisada por diferença de coloração onde as áreas positivas estão marcadas em amarelo.....	23
Figura 7. Valores séricos de colesterol total, HDL colesterol, n-HDL colesterol e triglicérides em mg/dL nas coletas basal, pré e pós tratamento e ΔT	

dos grupos CNeg, CPos e PTCTS.....38

Figura 8. Análise macroscópica das porções torácica e abdominal das aortas representativas dos coelhos de cada grupo.....39

Figura 9. Análise histológica da porção ascendente das aortas representativas dos coelhos de cada grupo.....39

Figura 10. Quantidade de MPs associadas a antígenos de *Mycoplasma pneumoniae* e LDLox nos animais dos grupos CNeg, CPos e PTCTS nas coletas Basal, pré e pós-tratamento, bem como a diferença entre esses valores (ΔT)40

Figura 11. Histologia do fígado representativa dos animais de cada grupo. Aumento x10.....40

Figura 12. Histologia dos rins representativa dos animais de cada grupo. Aumento x10.....41

Figura 13. Histologia do baço representativa dos animais de cada grupo. Aumento x10.....41

Figura 14. Área de placa nas porções ascendente, torácica e abdominal da aorta dos animais dos grupos controle e tratados.....42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média \pm DP do peso dos animais de cada grupo nas fases basal, pré e pós-tratamento e ΔT , e do consumo de ração nas fases pré e pós-tratamento com comparação do peso e consumo de ração pelo teste t pareado.....**36**

Tabela 2. Média \pm DP dos valores de colesterol total e frações, triglicérides e transaminases dos grupos controle negativo, positivo e tratados, nas fases basal pré e pós-tratamento, e comparações pelo teste t pareado.....**36**

Tabela 3. Média \pm DP das medidas das porções torácica e abdominal da aorta dos animais de cada grupo.....**37**

Tabela 4. Média \pm DP das medidas da aorta ascendente dos animais de cada grupo analisados pelo H&E.....**37**

Tabela 5. Média \pm DP das medidas das porções torácica e abdominal da aorta dos animais de cada grupo analisados pelo H&E.....**37**

Tabela 6. Média \pm DP da quantificação de MPs associadas a antígenos de *Mycoplasma pneumoniae* dos animais de cada grupo.....**37**

Tabela 7. Média \pm DP da quantificação de MPs associadas a antígenos de LDLox no soro das coletas basais, pré e pós tratamento dos grupos controle negativo, positivo e tratados.....**38**

Tabela 8. Média \pm DP da porcentagem de marcação positiva para MMP9, LDLox e RAM11 na área de placa dos animais de cada grupo.....**38**

Tabela 9. Média \pm DP do peso dos órgãos dos animais de cada grupo...**38**

RESUMO

Garavelo SM. *Estudo experimental avaliando os efeitos de nanopartículas naturais e transialidase - componentes do PTCTS – no combate à aterosclerose em coelhos*. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

A aterosclerose é um processo sistêmico crônico, caracterizado pela presença de lesões, espessamento da parede arterial com acúmulo de lipídeos, e resposta inflamatória e fibroproliferativa. Muitos processos associados à oxidação da LDL, ao aumento de expressão de fatores pró-trombóticos, moléculas de adesão pró-inflamatórias, citocinas e fatores quimiotáticos estão envolvidos na fisiopatologia da doença aterosclerótica. Trabalhos anteriores mostraram a presença de *Mycoplasma pneumoniae* (Mic) em placas lipídicas vulneráveis, associada à liberação de micropartículas (MPs) capazes de interagir com o ambiente e influenciar o processo aterogênico. Assim, a H&S Ciência e Biotecnologia, desenvolveu o complexo PTCTS que tem em sua composição nanopartículas naturais provenientes de plantas medicinais (PTC) associadas à enzima transialidase (TS) para combater as MPs e o Mic, além de ter efeito anti-lipemiante e anti-aterosclerótico. O presente estudo teve como objetivo verificar os efeitos dos diferentes componentes do PTCTS administrados por via oral em relação à eficácia, toxicidade e mecanismo de ação na terapia anti-aterosclerótica em coelhos hipercolesterolêmicos. Foram estudados coelhos da raça Nova Zelândia separados randomicamente em 6 grupos de tratamento: Controle Negativo (CNeg n=6), Controle Positivo (CPos n=6), Partículas orgânicas (PTC n=6), Transialidase (TS n=5), Partículas orgânicas associadas à transialidase (PTCTS n=6), e PTCTS com adição de PDTC (n=6). Os animais foram alimentados com dieta enriquecida com 1% de colesterol por 12 semanas, exceto o CNeg, e receberam seus respectivos tratamentos durante as últimas seis semanas. Tiveram sangue coletado durante as fases basal, pré e pós tratamento, para avaliação bioquímica do perfil lipídico, transaminases hepáticas e quantificação de MPs associadas a antígenos de Mic e LDLox no soro. Ao fim do experimento, foram sacrificados, e tiveram a aorta colhida em conjunto com o monobloco de órgãos para análises morfométrica, histológica, e imunohistoquímica, de forma a se verificar os efeitos do PTCTS e seus compostos. O composto PTCTS via oral reduziu significativamente MPs associadas tanto a antígenos de Mic como de LDLox, e os níveis de colesterol no sangue e reduziu não significativamente a área de placa na porção abdominal da aorta, induziu a aorta a remodelamento positivo, permitindo um fluxo livre mesmo com uma grande área de placa, e evitando assim a obstrução do vaso. Seus componentes, quando administrados isoladamente tiveram efeitos parciais, as PTC sobre o remodelamento do vaso e redução de placa na aorta abdominal, e a TS sobre a redução do colesterol total, comprovando que a associação de ambos possui atividade mais completa e balanceada. A adição do PDTC ao complexo levou ao efeito oposto, não removendo MPs do soro como com PTCTS somente, e induzindo a remodelamento negativo da aorta. Nenhum dos componentes apresentou toxicidade nos órgãos estudados. Os dados encontrados neste trabalho experimental reforçam a teoria infecciosa na patogenia da aterosclerose, bem como a de que MPs originadas de micro-organismos possam estar induzindo a produção de radicais livres e influenciando a oxidação de lipídeos, de forma que a remoção de tais MPs do sangue circulante pode ser um novo caminho terapêutico no tratamento da aterosclerose.

Descritores: Aterosclerose, PTCTS, partículas orgânicas, transialidase, *Mycoplasma pneumoniae*, coelhos

ABSTRACT

Garavelo SM. *Experimental study evaluating the effects of natural nanoparticles and transialidase - PTCTS components - combating atherosclerosis in rabbits*. [Thesis]. Sao Paulo: Faculty of Medicine, University of São Paulo; 2016.

Atherosclerosis is a chronic systemic process, characterized by lesions, thickening of the arterial wall with accumulation of lipids, inflammatory and fibro-proliferative response. Many processes associated with the oxidation of LDL, increase expression of pro-thrombotic factors, adhesion molecules, pro-inflammatory cytokines and chemotactic factors are involved in the pathophysiology of atherosclerosis. Previous works have shown the presence of *Mycoplasma pneumoniae* (Mic) in vulnerable lipid plaques, associated with the release of microparticles (MPs) able to interact with the environment and influence the atherogenic process. Thus, H&S Science and Biotechnology developed the PTCTS complex, which has in its composition natural nanoparticles from medicinal plants (PTC) associated with transialidase enzyme (TS), to combat MPs and Mic, that together have anti-atherosclerotic effects. This study aimed to determine the effects of different components of PTCTS administered orally regarding the efficacy, toxicity and mechanism of action in anti-atherosclerotic therapy in hypercholesterolemic rabbits. It was studied White New Zealand rabbits separated randomly into six treatment groups: Negative Control (CNeg n=6), Positive Control (CPos n=6), organic particles (PTC n=6), transialidase (TS n=5) organic particles attached to transialidase (PTCTS n=6) and PTCTS with addition of PDTC (n=6). The animals were fed with a diet enriched with cholesterol for twelve weeks, except the CNeg, and received their treatments during the last six weeks, concurrently with hypercholesterolemic diet. Blood samples were taken during the baseline, pre and post treatment phases for biochemical evaluation of the lipid profile, liver transaminases and quantification of MPs associated with Mic antigens and oxLDL in the serum. At the end of the experiment they were sacrificed and the aorta was harvested together with the monoblock of organs for morphometric analysis, histology and immunohistochemistry, so we could check the effects of PTCTS and their compounds. The compound PTCTS orally is effective at removing MPs associated with both Mic and oxLDL antigens, and despite not having had the expected anti-atherosclerotic effects, reduced not significantly plaque area in the abdominal portion of aorta, and induced its ascendant portion to positive remodeling, allowing a free flow even with large plate area, avoiding obstruction of the vessel. Its components when administered alone had partial effects, PTC on the remodeling of the vessel and plaque reduction in the abdominal aorta, and TS on the reduction of total cholesterol, proving that the combination of both has more complete and balanced activity. The addition of PDTC to the complex led to the opposite effect to inhibit MPs scavenging activity displayed by PTCTS as well as to induce negative remodeling of vessels. None of the components presented toxicity in the organs studied. The data found in experimental work reinforce the infectious theory on the pathogenesis of atherosclerosis as well as that originating MPs such microorganisms may be inducing the production of free radicals and oxidation of lipids, so that the removal of such pathogens from circulating blood may be a new therapeutic approach in the treatment of atherosclerosis.

Keywords: Atherosclerosis, PTCTS, organic particles, transialidase, *Mycoplasma pneumoniae*, rabbits

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1 Aterosclerose e inflamação

A aterosclerose humana é um processo sistêmico crônico, caracterizado pela presença de lesões de espessamento da parede arterial com acúmulo de lipídeos, e resposta inflamatória e fibroproliferativa, principalmente em vasos de médio e grande calibre, formando placas ateromatosas.

Muitos processos estão envolvidos na fisiopatologia da doença aterosclerótica, desde a lesão e disfunção endotelial, até a inflamação, proliferação vascular e alterações de matriz¹.

O endotélio lesionado e disfuncional permite a passagem de lipídeos, principalmente lipoproteínas de baixa densidade (LDL), para dentro do espaço subendotelial.

Sabe-se que, quando há níveis altos de LDL na circulação, estas se ligam a proteoglicanos e aumentam seu tempo de retenção na camada íntima da artéria, fixando-se na mesma, onde são oxidadas por radicais livres produzidos pelas células endoteliais adjacentes, células musculares lisas ou macrófagos isolados, desencadeando o processo inflamatório, que prejudica a função de barreira do endotélio, aumentando a permeabilidade vascular².

As partículas de LDL oxidadas (LDL_{ox}) induzem as células a secretar citocinas pró-inflamatórias, expressar ICAM-1, VCAM-1, MCP-1 e liberar fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF). O M-CSF promove a migração

de monócitos do sangue circulante para o tecido lesado assim como sua diferenciação em macrófagos^{3,4} que fagocitam a LDLox transformando-os em células xantomatosas⁵.

Em conjunto, as células endoteliais e células musculares lisas, em resposta a diversos sinais oxidativos, inflamatórios e autoimunes secretam metaloproteinases, como a MMP9, que degradam a matriz extracelular e modulam diversas funções das células vasculares, como ativação, proliferação, migração e morte celular, muitas vezes fragilizando a capa fibrosa que inibe o desenvolvimento da placa, tornado-a vulnerável à ruptura e conseqüentemente à formação de trombos⁶.

1.2 *Mycoplasma pneumoniae* e micropartículas no desenvolvimento da aterosclerose

Apesar dos intensos avanços ainda faltam evidências para um entendimento completo de processos como o de oxidação de lipoproteínas, inflamação e imunidade, que participam no desenvolvimento da aterosclerose⁷, e a infecção tem sido proposta como um outro fator que poderia esclarecer aspectos ainda não respondidos.

Trabalhos anteriores do nosso laboratório mostraram que, na aterosclerose humana, a bactéria *Mycoplasma pneumoniae* (Mic) estava presente nas placas de ateroma, e em maior quantidade em placas lipídicas vulneráveis, que romperam e levaram ao infarto agudo do miocárdio, quando associada com *Chlamydomphila pneumoniae*⁸.

Micoplasmas estão entre os poucos procariotes que podem crescer em simbiose com outros micro-organismos, interagindo fortemente com células hospedeiras de mamíferos por longos períodos⁹.

Essas bactérias são capazes de sintetizar lipoproteínas, como a MALP-404. Derivado da MALP-404, o MALP-2, um lipopeptídeo ativador de macrófago, é responsável pela alta resposta imune a produtos de micoplasma induzindo respostas de citocinas, quimiocinas e prostaglandinas através da ativação de macrófagos¹⁰.

Além disso, no corpo humano os efeitos dos micoplasmas podem ser tanto pré-apoptóticos, ao promover a fragmentação do DNA internucleosomal, induzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias e ativação do NF- κ B, como pós-apoptóticos, através da ativação de linfócitos e indução de sua proliferação¹¹.

Quando expostos a situações de estresse, os micoplasmas são capazes de liberar micropartículas (MPs) contendo proteínas e genes reativos a tal estresse, permitindo assim sua adaptação nos mais diversos ambientes^{12,13}.

MPs são vesículas de 100nm a 1 μ m de diâmetro, revestidas por membrana e liberadas durante a ativação celular ou apoptose, cujas características diferem de acordo com a origem celular¹⁴.

Seus efeitos podem variar entre propriedades pró-coagulantes e pró-inflamatórias, indução de disfunção endotelial pela alteração nos níveis NO e da via metabólica da prostaciclina, diminuição da expressão de NO sintase (NOS), estímulo da liberação de citocinas como IL-8, IL-1 β , IL-6 e TNF- α , além de expressão de moléculas de adesão celular¹⁵, dentre outras, fundamentais na formação e desenvolvimento da placa de ateroma¹⁶.

1.3 PTCTS e seus compostos no tratamento da aterosclerose

Com intuito de prevenir e tratar a aterosclerose, a H&S Ciência e Biotecnologia, desenvolveu um composto que combate as MPs: o PTCTS (*particulated transialidase* - registrado nos Estados Unidos *INCI name PTCTS*, No. 5-11-2013-1386) que tem em sua composição partículas orgânicas naturais (PTC) provenientes de plantas medicinais associadas à enzima transialidase (TS). Seu método de obtenção e preparação está protegido por patentes concedidas nos Estados Unidos (nº. 7.914.781, em 29 de março de 2011), Europa e Canadá, e em fase de concessão no Brasil.

Para a produção do PTCTS, partículas foram produzidas em grandes concentrações em condições de baixo conteúdo de oxigênio e alto teor alcoólico, a partir de *Dendrobium spp.*, conhecida por seus efeitos antioxidantes¹⁷. Observou-se que esta planta produz nanopartículas de aproximadamente de 10nm, e que aumentam de tamanho e se mantêm estáveis quando incluídas em água termal¹⁸.

Após muito estudo, Higuchi¹⁹ propôs que o uso da TS poderia levar à regressão do processo aterosclerótico ao eliminar micoplasmas através sua capacidade de realocação de ácidos siálicos.

Os ácidos siálicos, uma família de amino-açúcares, estão envolvidos em interações célula-célula e tem funções de sinalização nos sistemas hematopoiético, nervoso e imune²⁰.

Sabe-se há muito tempo que os ácidos siálicos agem como ligantes para receptores de patógenos, em especial as siglecs (*sialic-acid-binding*

immunoglobulin-like lectins), lecitinas semelhantes a imunoglobulinas²¹, tendo papel essencial no controle da intensidade da resposta imune.

Entretanto, o ácido siálico também é um importante nutriente para a manutenção *in vivo* dos micoplasmas²², de forma que sua realocação do meio próximo às bactérias para o contato com as siglecs, servindo assim de ligantes para as mesmas, se mostrou uma via de tratamento para a eliminação de tais bactérias.

Assim, Higuchi e col. injetaram TS e PTC, via intramuscular, em coelhos e conseguiram regredir a aterosclerose e os níveis séricos de colesterol total e suas frações.

Com o intuito de intensificar os efeitos da TS e das PTC, associou-as e adicionou PDTC. Em animais tratados com tal associação, observou-se desaparecimento quase total das placas, sendo que as poucas existentes eram fibróticas, tendo retornado os CT e o n-HDL colesterol a níveis normais²³.

O PDTC é um composto contendo tiol que pode atuar como um antioxidante, ao atuar como um inibidor da ativação de NF- κ B e suprimir transcrição de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas dependentes de NF- κ B²⁴, bem como por sua capacidade de redução de apoptose em linfócitos normais e células endoteliais^{25,26}, de forma que muitos estudos concluíram que o PDTC pode atuar como um captador de radicais e antioxidantes livres²⁷, protegendo os tecidos normais de lesões.

Entretanto, estudos recentes demonstram que o PDTC é capaz de induzir redução de viabilidade celular e alterações morfológicas associadas à lesão celular devido atividades pró-oxidantes²⁸, relacionando-se assim ao desenvolvimento de cânceres em humanos^{29,30}.

Desta forma, o presente projeto pretende avançar neste estudo experimental utilizando a via oral de administração do PTCTS, buscando entender melhor os efeitos dos componentes deste composto e seus prováveis efeitos no tratamento da aterosclerose, bem como analisar eventuais complicações nos diferentes órgãos e os possíveis benefícios da remoção do PDTC de sua composição.

2.OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1 Objetivos primários

a) avaliar os efeitos dos componentes do PTCTS (PTC e TS) isoladamente, comparando-os ao uso do composto PTCTS em relação à regressão, estabilidade (MMP-9) e composição (RAM11 e LDLox) da placa de ateroma em coelhos hipercolesterolêmicos;

2.2 Objetivos secundários

a) avaliar os efeitos do PTCTS e seus compostos quanto ao perfil lipídico e transaminases, bem como em relação à presença e eliminação de MPs associadas ao *Mycoplasma pneumoniae* e à LDLox no soro de coelhos hipercolesterolêmicos;

b) verificar se o PTCTS e seus compostos causam efeitos adversos através da avaliação macroscópica do fígado, rins e baço;

c) avaliar a diferença do composto PTCTS com e sem adição de PDTC.

3. MÉTODOS

3. Métodos

3.1 Ambientação da pesquisa

Os animais de todos os grupos foram mantidos por 12 semanas e sacrificados no Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, onde foram colhidas as amostras para estudo posterior.

Todos os procedimentos envolvendo a experimentação com os animais foram realizados de acordo com princípios éticos estabelecidos internacionalmente (NRC, 1996).

As análises bioquímicas de colesterol total e frações, bem como enzimas hepáticas foram realizadas no laboratório de Análises Clínicas e as análises de imunohistoquímica, microscopia eletrônica, histologia e imunofluorescência foram realizadas no Laboratório de Patologia Cardíaca, ambos do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor HC-FMUSP).

3.2 Desenho do estudo

Nesta pesquisa foram estudados coelhos da raça Nova Zelândia (*White New Zealand*), provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina – USP, com aproximadamente 60 dias de idade, machos e fêmeas, pesando 3,0

± 0,5 kg. Os mesmos foram acondicionados em gaioleiros de aço inoxidável adequados à espécie, mantidos com ração específica para a espécie e água *ad libitum*, com intervalos de luz e escuridão a cada 14/10 horas.

Entraram no protocolo apenas os animais que após 30 dias sendo alimentados com dieta enriquecida em colesterol apresentaram nível de colesterol total circulante >200 mg/dL. A amostra foi calculada segundo o método de distribuição de *Student*³¹.

Os coelhos incluídos neste estudo foram divididos randomicamente em 6 grupos conforme disposto abaixo.

Dieta Normal:

- Grupo Controle Negativo – **CNeg** – (Normal, sem dieta hipercolesterolêmica): Composto de 6 coelhos (3 machos e 3 fêmeas), receberam 400µL água/dia no lugar do tratamento.

Dieta rica em colesterol:

- Grupo Controle Positivo – **CPos** – (dieta hipercolesterolêmica 12 semanas, sem tratamento): Composto por 6 coelhos (3 machos e 3 fêmeas) receberam 400µL água/dia no lugar do tratamento.
- Grupo partículas orgânicas – **PTC** – (dieta hipercolesterolêmica 12 semanas, tratamento com nanopartículas de plantas): Composto por 6 coelhos (3 machos e 3 fêmeas), tratados apenas com partículas orgânicas naturais 300µL/dia.
- Grupo Transialidase – **TS** – (dieta hipercolesterolêmica 12 semanas, tratamento com a enzima transialidase): Composto por 5 coelhos (3 machos e 2 fêmeas), tratados apenas com a enzima transialidase

300µL/dia.

- Grupo **PTCTS** (dieta hipercolesterolêmica 12 semanas, tratamento com associação de partículas orgânicas naturais + transialidase): Composto por 6 coelhos (3 machos e 3 fêmeas), tratados com PTCTS 400µL/dia.
- Grupo **PDTC** (dieta hipercolesterolêmica 12 semanas, tratamento com PTCTS + PDTC): Composto por 6 coelhos (3 machos e 3 fêmeas), tratados com PDTC 400µL/dia.

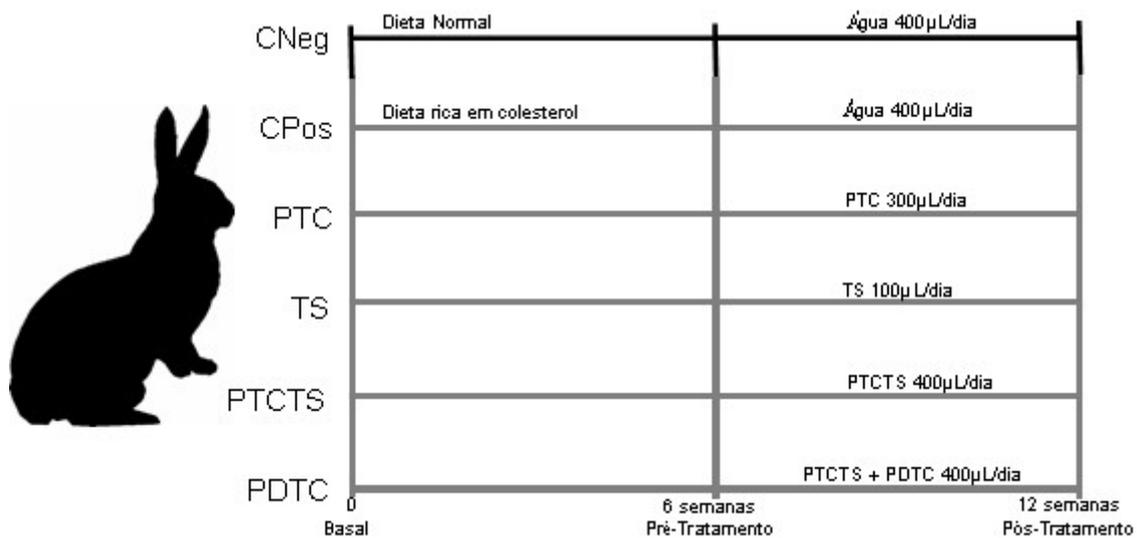


Figura 1. Desenho do estudo.

O grupo de animais alimentados com dieta normal foi utilizado como controle negativo, de forma que os dados obtidos através das análises destes animais foram considerados valores de referência para animais saudáveis.

Tal grupo foi comparado aos animais do grupo controle positivo, que receberam dieta rica em colesterol, porém sem nenhum tratamento, com o

intuito de comprovar as alterações lipídicas, hepáticas e teciduais que ocorrem durante o processo aterosclerótico. Utilizamos tais dados como valores referência para animais doentes.

3.3 Preparo da dieta enriquecida com colesterol

A dieta enriquecida com 1% de colesterol foi preparada através da pulverização de uma solução contendo colesterol, éter etílico e etanol P.A. absoluto sobre ração comercial usual, na proporção de 1g de colesterol para 100g de ração.

O colesterol foi dissolvido adicionando-se 100mL de éter etílico e 50mL de etanol P.A. absoluto/g constante agitação. A solução foi misturada com a ração usual e deixada em capela de exaustão para a evaporação completa dos solventes por 24h.

A ração rica em colesterol foi pesada separadamente em porções individuais de 150g e armazenadas a -20°C em sacos plásticos lacrados.

O consumo de ração foi avaliado através da pesagem diária do resíduo deixado pelos animais subtraindo-se o valor obtido dos 150g iniciais servidos a cada animal.

Os animais foram pesados semanalmente para avaliação de seu peso corporal.

3.4 Procedimentos cirúrgicos, técnicas laboratoriais e análises.

3.4.1 Coleta de sangue e métodos laboratoriais

No início do experimento, antes da inserção da dieta rica em colesterol, foram coletadas amostras de sangue de veia auricular marginal, de cada animal para dosagem bioquímica do colesterol total (CT) e frações e as transaminases hepáticas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). O mesmo procedimento foi realizado antes do início do tratamento e ao fim do experimento durante o sacrifício dos animais, e nomeadas coletas Basal, Pré-tratamento e Pós-tratamento, respectivamente.

As amostras de sangue foram centrifugadas a 2000 rpm e o soro obtido, fracionado, acondicionado em micro tubos Eppendorfe mantido à temperatura de -32°C.

O colesterol total e as lipoproteínas de alta densidade (HDL) foram dosados pelo método enzimático CHOD-PAP (Merck, E.U.A.), sendo os níveis séricos de HDL, medidos após precipitação com ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio. O valor do colesterol não HDL (n-HDL) foi calculado através da subtração $n\text{-HDL} = \text{CT} - \text{HDL}$, e os valores dos triglicerídeos (TG) foram obtidos por método enzimático de cor (GPO-PAP) com uso do aparelho Cobas Mira (Roche).

As dosagens de lipídeos foram realizadas no Laboratório Clínico do InCor-HC FMUSP, todos com referências conforme as Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias.

3.4.2 Sacrifício dos animais

O sacrifício foi realizado após pesagem dos animais com injeção prévia de anestésicos (ketamina 25-50 mg/kg associado à xilazina 2-5 mg/kg via intramuscular), cuja ação foi aprofundada com barbitúrico (Tiopental) e administração de cloreto de potássio 3ml, via intra-cardíaca.

Os animais foram imediatamente submetidos à necropsia no qual a aorta foi retirada na íntegra, acompanhada de todo o monobloco dos órgãos.

3.4.3 Análises morfométricas e histológicas

A aorta foi dissecada do monobloco, seccionada à altura de sua raiz e da bifurcação ilíaca. Foi feito um corte transversal junto da raiz da aorta, contendo cerca de 1 cm de extensão de artéria ascendente, e posteriormente seccionado em 2 partes, sendo uma para técnica de microscopia eletrônica e uma para emblocamento em parafina.

O restante da artéria foi aberto longitudinalmente em seguida e preso em superfície lisa de cartolina com alfinetes, fixado em formol tamponado 10%, pH 7.4, por 24 horas. A seguir, corado pelo método histoquímico Scarlet R (SUDAN IV), o qual, cora a gordura em vermelho.

Esse material posteriormente foi fotografado em câmera digital, cujo arquivo foi importado ao programa de análise de imagem Aperio ImageScope Software® (Aperio Technologies, Inc. CA, USA).

Utilizamos a ferramenta *Rule Tool* para medir o comprimento total do

vaso, bem como a altura (perímetro da circunferência do vaso) do mesmo em três diferentes pontos (extremidades e o meio do vaso) para obtenção da média desses valores.

Contornamos o vaso com a ferramenta *Pen Tool*, obtendo desta forma o valor da área total do mesmo, e utilizamos o contorno como delimitação da área a ser analisada pelo software para quantificar a porcentagem de área corada com o SUDAN IV (Figura 2).

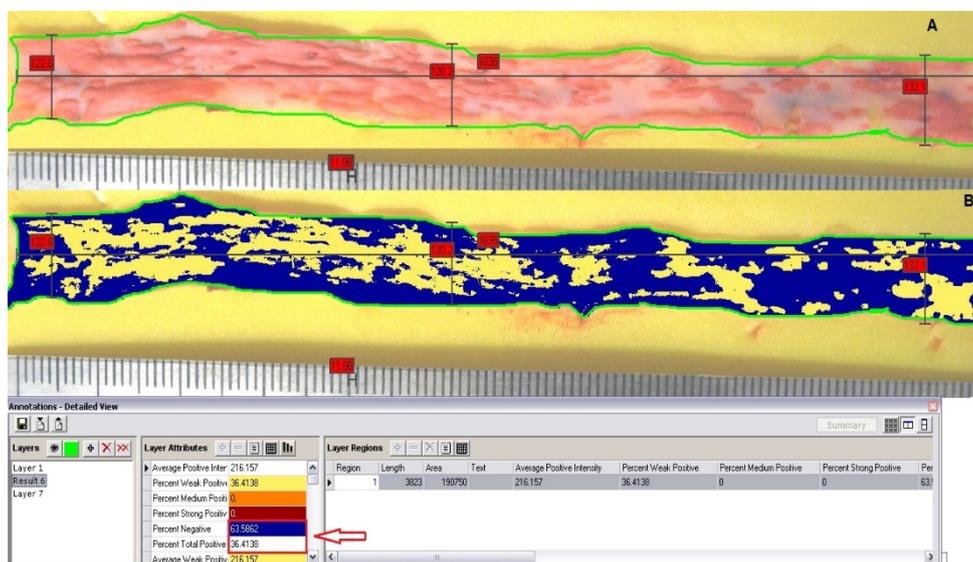


Figura 2: A- Medida feita no ImageScope para obtenção dos valores do comprimento, altura e área da aorta. B- Quantificação de da porcentagem de área com placa, marcada em amarelo, através da análise colorimétrica de identificação do corante Sudan IV dentro da área seleccionada.

Após a análise macroscópica da aorta, foi feito na mesma um corte transversal de aproximadamente 2mm acima dos ramos bronquiais e 2mm abaixo da saída das artérias renais para análise histológica das porções torácica e abdominal da aorta.

Dos fragmentos retirados das porções ascendente, torácica e abdominal da aorta, foram realizados cortes seriados de 5µm das secções emblocadas em parafina, corados por Hematoxilina & Eosina (H&E) e escaneadas através

do aparelho ScanScope CS System® (Aperio Tecnologia, Inc. CA, USA) com uma objetiva Olympus UPlanSApo 20x acoplada ao escâner que gerou arquivos de imagem ".svs" para serem analisadas no programa Aperio ImageScope Software.

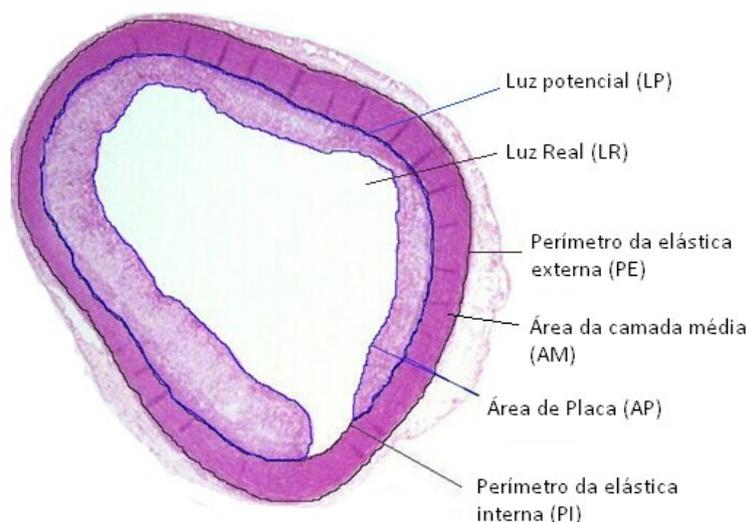


Figura 3: Variáveis avaliadas no corte histológico da porção ascendente da aorta.

Através do software, medimos na porção ascendente o perímetro da lâmina elástica externa (PE); o perímetro da lâmina elástica interna (PI); a área da camada média (AM); a luz potencial do vaso (LP) – lúmen do vaso sem a placa; a luz real do vaso (LR) – lúmen do vaso com a placa; a área da placa de ateroma (AP) e a porcentagem de obstrução do vaso (%Obs), conforme demonstrado na Figura 3.

Nas porções torácica e abdominal foram avaliados a extensão total do fragmento (Et), a extensão da base da placa de ateroma (Ep) e sua área total (AP), demonstrado na figura 4.

Durante o sacrifício fígado, rins e baço foram colhidos e pesados, e então tiveram fragmentos cortados axialmente que foram fixados em formol tamponado 10%, pH 7.4, por 24 horas, para serem emblocados em parafina.

Cortes seriados de 5µm foram corados em H&E, escaneadas através do aparelho ScanScope CS System® (Aperio Tecnologia, Inc. CA, USA) com uma objetiva Olympus UPlanSApo 20x acoplada ao escâner que gerou arquivos de imagem para serem analisadas qualitativamente no programa Aperio ImageScope View Software (Apreio Technologies, Inc. CA, USA).

A análise dos órgãos se deu através da avaliação da integridade dos tecidos e células, presença de lesões e alterações celulares.

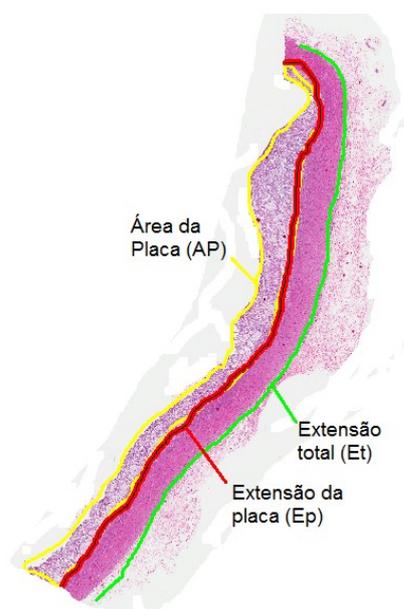


Figura 4. Variáveis avaliadas no corte histológico das porções torácica e abdominal da aorta.

3.4.4 Análise de micropartículas contendo antígenos de *Mycoplasma pneumoniae* e LDL oxidada

Estudos recentes do grupo mostraram MPs carregando antígenos do agente infeccioso *Mycoplasma pneumoniae* e de LDL oxidada no interior de placas de ateroma e valva aórtica calcificada humanas³².

No presente trabalho, quantificamos as MPs contendo esses mesmos

antígenos no soro dos coelhos, uma vez que poderiam ter relação com o agravamento da placa de ateroma.

Foi utilizada a técnica de imunofluorescência para tal análise, a qual foi aplicada no soro obtido em 3 diferentes fases do experimento: Soro proveniente da coleta basal, antes do início da dieta rica em colesterol; soro proveniente da coleta pré-tratamento; e soro proveniente da coleta pós tratamento, durante o sacrifício.

Para que fosse possível a separação das MPs, as reações de imunofluorescência se deram a partir da mistura do soro total com solução de meio H (D-manitol, sacarose, HEPES e BSA) e sua centrifugação, sendo assim separado em duas fases: pellet e sobrenadante. Ambas as frações foram analisadas a fresco e escolheu-se o sobrenadante para estudo por apresentarem as MPs de interesse.

O sobrenadante do soro dos animais de cada grupo foi incubado por uma hora a 25°C com o anticorpo primário LDLox (clone 2C7OSF10, preparado e doado pela Dra. Dulcineia Abdalla, Faculdade de Ciências Farmacêutica - USP) e com o anticorpo primário *Mycoplasma pneumoniae* (clone B748M, *anti-mouse* – Abcam) em alíquotas distintas.

Após esse período de incubação, foram adicionados os anticorpos secundários. Nas alíquotas marcadas com o anticorpo LDLox adicionou-se o anticorpo secundário Alexa flúor 488, *donkey anti-mouse* IgG H+L – Invitrogen, enquanto nas alíquotas marcadas com o anticorpo *Mycoplasma pneumoniae*, adicionou-se o anticorpo secundário (Alexa flúor 555, *donkey anti-mouse* IgG H+L – Invitrogen), as quais foram incubadas por mais uma hora a 25°C.

As imagens das lâminas imunomarcadas com os respectivos fluoróforos

foram captadas no microscópio de fluorescência Evos FL Cell Imaging System (MG Advanced Microscopy Group), com objetiva de x20 e salvas em JPG para serem quantificadas no programa IrfanView.

Foram quantificadas MPs de 0,5 μ m em dois campos opostos de 4 fotos no aumento de 20x (Figura 5), das quais foram feitas as médias para análise estatística.

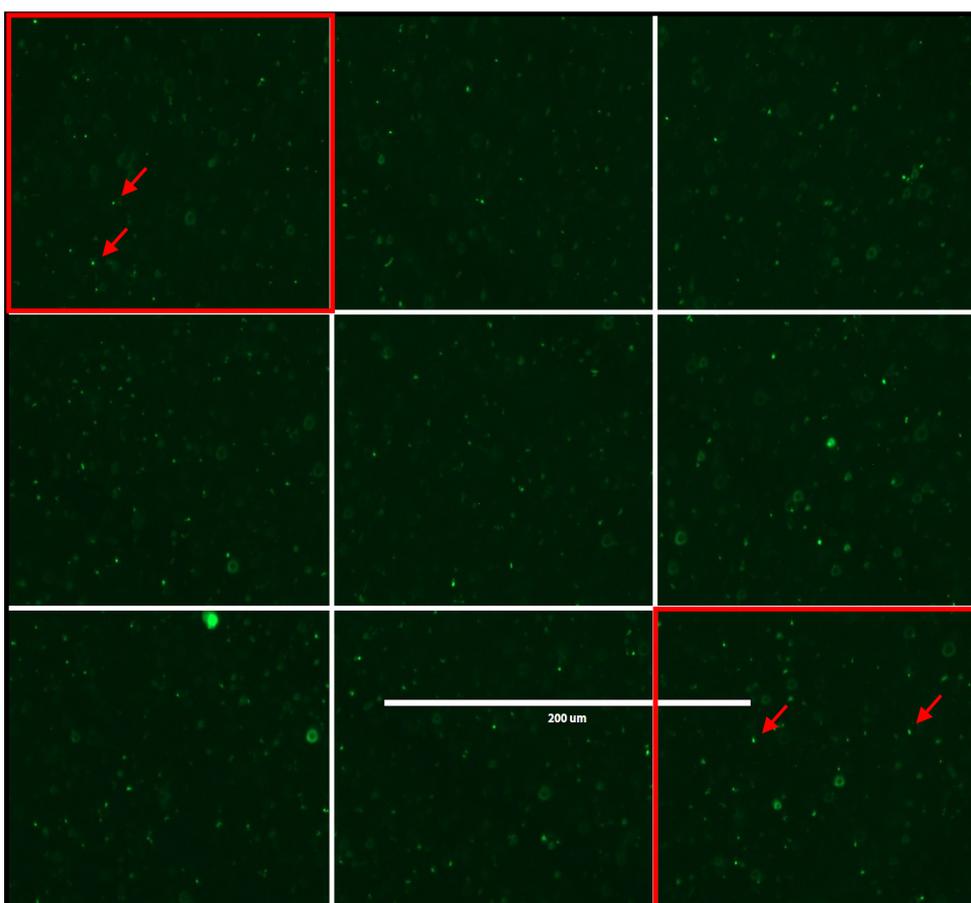


Figura 5. Quantificação de MPs associadas a antígenos de Mic e LDLox pela técnica de imunofluorescência. Aumento x20.

3.4.5 Análise imunohistoquímica da composição e vulnerabilidade da placa de ateroma

Os cortes histológicos foram fixados em formol, parafinados, cortados a

5µm e dispostos em lâminas com 3-aminopropylethoxysilane (Sigma). A seguir foram desparafinados em xilol, hidratados em álcool de diferentes concentrações (100%, 95%, 70%) e água.

Quando necessária, a recuperação antigênica foi realizada com enzima Tripsina (15 minutos a 37°C) ou com tampões (TRIS-EDTA 10mM pH 9.0 ou Citrato 10mM pH6.0) em panela de pressão (DakoCytomation- California/ Code N° S2800).

Após a lavagem do material em água foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com Peróxido de Hidrogênio 6%, com 2 banhos de 8 minutos a temperatura ambiente. O bloqueio de proteínas inespecíficas foi realizado com CAS Block (Invitrogen Cód. 008120) 30 minutos a temperatura ambiente.

De acordo com a padronização e orientação do fabricante, os anticorpos primários (Anti-Macrófago de Coelho, clone RAM11 – DAKO; anti-MMP9, clone 56-2^a4 – Abcam; anti-LDLox clone 2C7OSF10) foram diluídos em Antibody Diluente (Invitrogen) e cada corte incubado durante 1 hora à temperatura ambiente.

A seguir, após lavagem em PBS pH 7.4, foi realizada a detecção do antígeno/anticorpo utilizando o Kit EnVision HRP Mouse (Dako).

Para a revelação das reações utilizou-se o substrato cromógeno DAB, (DakoCytomation- California) e a contra-coloração foi feita com Hematoxilina de Harris (Easy Path).

As lâminas com as reações foram desidratadas em álcool de diferentes concentrações (70%, 95% e 100%), diafanizadas com xilol e montadas com lamínulas e resina sintética Entellan (Merk) para então serem escaneadas

através do equipamento de obtenção de imagens ScanScope.

A análise se deu na área total de placa. Uma vez selecionadas as áreas, utilizamos o contorno como delimitação da área a ser analisada pelo software Aperio ImageScope Software® (Aperio Technologies, Inc. CA, USA) para quantificar a porcentagem de área marcada com o anticorpo a ser estudado (Figura 6).

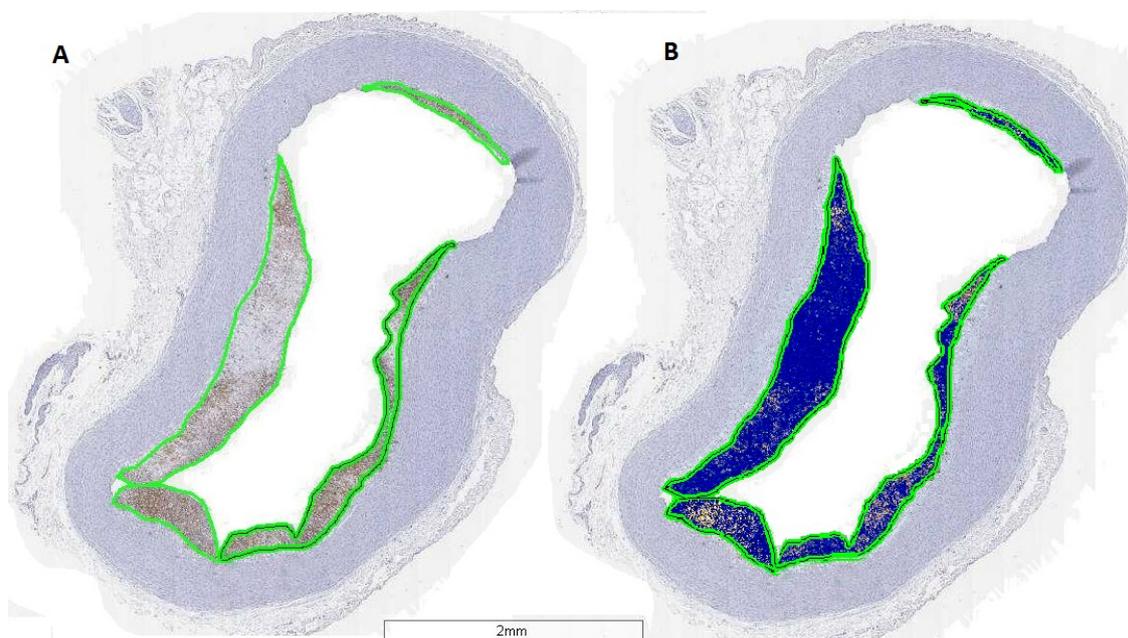


Figura 6. A - Seleção de área de placa a ser analisada pelo Aperio ImageScope. B – Área analisada por diferença de coloração onde as áreas positivas estão marcadas em amarelo.

3.5 Análises estatísticas

As variáveis quantitativas obtidas foram expressas nas tabelas em média \pm DP. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa SigmaStat para Windows versão 3.5.

As diferenças entre CNeg x CPos foram calculadas através do teste t de *Student*.

Aplicamos o teste t pareado para comparar dados em animais do mesmo grupo, em tempos de coleta diferentes (Pré x Pós-tratamento) nas análises do soro, peso e consumo de ração.

Para a comparação das análises do soro entre os grupos, utilizamos a diferença entre os valores das coletas pré e pós-tratamento (ΔT) através do ANOVA, de forma a verificar se houve diferença induzida pelo tratamento.

Como o composto completo é o PTCTS, os resultados deste grupo foram comparados com o grupo CPos) através do teste t de *Student*.

Posteriormente os dados do PTCTS e do CPos comparados com os demais grupos através do teste ANOVA (CPos x PTCTS x demais tratamentos). Quando o teste ANOVA apresentava diferença significativa, a comparação entre grupos foi feita usando o teste t de Bonferroni para dados que passaram no teste de normalidade e o teste de Dunn para análises que não passaram no teste, estabelecendo sempre o CPos como controle.

Consideramos $p < 0,05$ estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS

4. Resultados

4.1 Peso e consumo de ração

Não houve diferença significativa em nenhum dos grupos quanto ao peso Pré vs. Pós-tratamento, bem como entre grupos ($P=0,24$).

Os grupos que receberam dieta rica em colesterol não apresentaram diferença nas fases pré ($P=0,13$) e pós-tratamento ($P=0,33$), porém apresentaram redução significativa na quantidade de ração consumida após o início do tratamento, incluindo o grupo CPos, todavia o grupo CNeg, que recebeu ração normal, manteve a média de consumo ao longo de todo o experimento.

Os dados de média \pm DP, bem como de comparação das fases pré vs pós-tratamento de ambas as análises estão dispostos na Tabela 1.

4.2 Controle negativo vs controle positivo

Através das análises bioquímicas (Tabela 2) notou-se que todos os grupos com dieta rica em colesterol tiveram níveis de CT e suas frações, bem como TG, alterados entre as fases basal e pré tratamento.

O grupo CPos apresentou aumento significativo entre as coletas pré vs pós-tratamento em relação ao CT ($P=0,03$), n-HDL colesterol ($P=0,005$) e

triglicérides ($P=0,04$), e queda significativa nos níveis de ALT ($P=0,006$). Quando comparado ao grupo CNeg, o CPos apresentou aumento significativo quanto aos níveis de CT ($P=0,009$) e n-HDL colesterol ($P=0,002$), sem diferenças referentes às demais variáveis (HDL $P=0,82$; TG $P=0,09$; AST $P=0,98$ e ALT $P=0,64$), Figura 7.

A análise macroscópica das porções torácica e abdominal da aorta (Tabela 3) não mostrou diferença em relação ao comprimento ($P=0,46$), altura média ($P=0,67$) e área ($P=0,99$) entre os grupos controle negativo, positivo e grupos tratados, todavia, o grupo CPos apresentou maior porcentagem da área de superfície com placas de ateroma (Figura 8) do que o CNeg ($P=0,002$).

Na análise da porção ascendente da aorta pelo H&E, o grupo CPos não apresentou diferença do grupo CNeg em relação ao tamanho do vaso (PE $P=0,99$, PI $P=0,77$, LP $P=0,42$, e AM $P=0,73$), contudo apresentou grande área de placa $P=0,003$, aumento da %Obs do vaso ($P=0,004$) e diminuição da LR ($P=0,04$), conforme mostrado na Tabela 4.

O estudo da histologia da porção ascendente da aorta mostrou que os animais do grupo CPos apresentavam áreas de alteração na camada média, sugestivas de calcificação. Tais alterações foram observadas apenas neste grupo (Figura 9).

A análise da porção torácica mostrou que ambos os grupos apresentaram Et similares ($P=0,73$), contudo, CPos apresentou maior Ep ($P=0,004$) e Ap ($P=0,002$). O mesmo foi observado na porção abdominal da aorta (Et $P=0,8$, Ep $P=0,002$, AP $P=0,002$). Dados de média \pm DP dispostos na tabela 5.

A avaliação de MPs associadas a antígenos de *Mycoplasma pneumoniae* e LDLox no soro mostrou que, mesmo tendo sido separados de forma

randomizada, os animais do CPos e TS já apresentavam grande quantidade de MPs associadas a antígenos de Mic (Tabela 6), enquanto os grupos CNeg e TS tinham maior quantidade de MPs associadas a antígenos de LDLox na coleta basal do que os demais grupos (Tabela 7). Assim, avaliamos a diferença dos valores pré e pós-tratamento (ΔT), para determinar se houve efeito dos tratamentos sobre estas variáveis (Figura 10).

Através desta análise, foi possível notar que houve aumento significativo nos demais grupos quanto à quantidade de MPs associadas tanto a antígenos de Mic como de LDLox entre as coletas basal e pré-tratamento.

A análise pré vs pós-tratamento mostrou que o grupo CPos teve aumento significativo da quantidade de MPs associadas ao Mic ($P=0,02$), e não significativo quanto à LDLox ($P=0,57$).

O grupo CNeg não apresentou diferença significativa em relação a nenhum dos antígenos presente no soro através da técnica de imunofluorescência.

Quando os grupos são comparados entre si, através do ΔT , observou-se que o grupo CPos apresenta quantidade de MPs associadas ao Mic significativamente maior que o CNeg ($P=0,002$), sem diferença quanto ao antígeno de LDLox ($P=0,37$).

Não puderam ser realizadas análises estatísticas com os dados obtidos do grupo CNeg através da técnica de imunohistoquímica para avaliação da composição e estabilidade da placa de ateroma, uma vez que esses animais não apresentaram área de placa no fragmento da porção ascendente estudado.

Entretanto, os animais do CPos apresentaram placa de ateroma

marcação positiva para antígeno de RAM11 e LDLox, assim como de MMP9 (Tabela 8).

As análises histológicas dos órgãos dos animais do grupo CNeg apresentaram órgãos com tamanho (Tabela 9) e estruturas íntegras e ausência de lesões macroscópicas.

A histologia do fígado demonstrou hepatócitos íntegros, espaço-porta, artérias, ductos e septos livres, ausência inflamação e de alterações ou morte celular de característica patológica (Figura 11).

Os rins apresentavam glomérulos e túbulos íntegros, ausência de hemorragia, infiltração linfocitária ou alteração celular (Figura 12).

O baço também apresentou estrutura íntegra com polpas vermelha e branca preservadas, ausência de infiltração de macrófagos e/ou de gordura, alteração ou morte celular (Figura 13).

O grupo CPos apresentava órgãos com aspectos alterados, sendo o fígado significativamente maior que no grupo CNeg ($P=0,02$), com infiltração intensa de linfócitos e macrófagos xantomatosos, além da presença de gordura.

Os rins dos animais do grupo CPos apresentaram infiltração linfocitária, presença de gordura e alteração celular típica de processo fibrótico, enquanto o baço continha infiltração de macrófagos xantomatosos e gordura, além de apresentar difusão das polpas vermelha e branca.

Uma vez demonstradas diferenças entre animais saudáveis e doentes, foram comparados os dados do grupo CPos (não tratado) com os, de forma a verificar os efeitos do PTCTS, com e sem adição do PDTTC, e seus compostos.

4.3 PTCTS

A análise bioquímica dos animais deste grupo mostrou que, apesar do tratamento, houve aumento significativo nos valores de CT ($P=0,02$), n-HDL ($P=0,02$) e triglicérides ($P=0,005$), e diminuição significativa dos níveis da transaminase ALT ($P=0,03$) e não significativa na quantidade de HDL sérico ($P=0,07$), sem diferenças quanto aos níveis de AST ($P=0,82$) quando comparado às coletas pré vs pós-tratamento.

Através da comparação do ΔT dos itens do perfil lipídico e das transaminases, notou-se que o grupo PTCTS não apresentou diferenças estatísticas significantes (CT $P=0,1$; HDL $P=0,49$; n-HDL $P=0,18$; TG $P=0,82$; AST $P=0,75$ e AST $P=0,68$) quando comparado ao CPos.

A avaliação macroscópica da aorta mostrou que o grupo PTCTS não apresentou diferença significativa em relação à porcentagem de área de placa na superfície das porções torácica e abdominal da aorta quando comparado ao CPos ($P=0,53$).

A análise do fragmento de aorta ascendente demonstrou que os animais tratados com o composto PTCTS apresentaram aumento significativo em relação aos PE ($P=0,01$), PI ($P=0,04$), LP ($P=0,01$), LR ($P=0,04$) e AM ($P=0,01$), sem diferenças quanto às demais variáveis (AP $P=0,41$ e %Obs $P=0,69$).

A avaliação tanto da porção torácica não mostrou diferença no vaso dos animais tratados com PTCTS quando comparado ao CPos (Et $P=0,31$, Ep $P=0,68$, e AP $P=0,82$).

Todavia, a porção abdominal da aorta apresentou menor extensão de placa e de área de placa no grupo tratado com PTCTS (CPos Ep $4,07 \pm 2,54$;

AP $0,74 \pm 0,25$ vs PTCTS Ep $3,11 \pm 2,53$; AP $0,32 \pm 0,29$), ainda que não significativamente (Et $P=0,87$, Ep $P=0,55$ e AP $P=0,25$), melhor representado na figura 14.

Análise do soro pela imunofluorescência mostrou que o tratamento com PTCTS reduziu significativamente o número de MPs associadas a antígenos de Mic e LDLox ao comparamos as fases pré vs pós-tratamento ($P=0,01$ e $P=0,04$ respectivamente), enquanto a avaliação do ΔT comparativamente ao grupo CPos mostrou que o tratamento teve efeito evidente na redução de tais MPs (Mic $P<,001$ e LDLox $P=0,06$).

A avaliação pela imunohistoquímica relativa à composição da placa de ateroma mostrou que o grupo PTCTS não apresentou diferenças do CPOS quanto a porcentagem de RAM11 ($P=0,74$) ou de LDLox ($P=0,79$). O mesmo pode ser dito quanto à presença de MMP9 ($P=0,84$).

Quanto à histologia dos órgãos, o grupo tratado com PTCTS apresentou fígado com hepatócitos vacuolizados, infiltrado linfocitário discreto e presença de macrófagos xantomatosos e gordura em menor quantidade quando comparado ao CPos.

Os rins desses animais continham infiltração discreta de gordura e hemorragia leve, além de infiltrado linfocitário intenso nos túbulos renais enquanto os glomérulos não apresentaram alterações evidentes, mostrando-se bastante similar ao grupo CNeg.

No baço dos animais deste grupo notou-se infiltração discreta de macrófagos xantomatosos, com polpas branca e polpa vermelha íntegras quando comparado aos CNeg e CPos.

4.4 Nanopartículas orgânicas naturais – PTC

O grupo PTC não mostrou efeitos redutores no perfil lipídico, ou nas transaminases quando comparadas suas fases pré vs pós-tratamento (CT $P=0,2$; HDL $P=0,42$; n-HDL $P=0,11$; TG $P=0,14$; AST $P=0,12$ e AST $P=0,43$) ou mesmo tendo seu ΔT comparado aos grupos CPos e PTCTS através do teste ANOVA (CT $P=0,4$; HDL $P=0,59$; n-HDL $P=0,62$; TG $P=0,95$; AST $P=0,14$ e AST $P=0,42$).

A avaliação macroscópica das porções torácica e abdominal da aorta mostrou que não houve diferença quanto à porcentagem de área de placa do grupo PTC comparado ao CPos ($P=0,8$).

Na análise histológica na porção ascendente mostrou que o tratamento com partículas teve efeito sobre a estrutura do vaso, ao aumentar os valores do PE ($P=0,03$), PI ($P=0,03$) e da LR ($P=0,03$) significativamente, quando comparado ao CPos e PTCTS. Enquanto as demais variáveis não apresentaram diferença (LR $P=0,06$; AP $P=0,52$, AM $P=0,06$ e %Obs $P=0,86$).

Não foram encontradas diferenças significativas na porção torácica (Et $P=0,45$, Ep $P=0,44$ e AP $P=0,33$) ou na porção abdominal da aorta (Et $P=0,99$, Ep $P=0,55$ e AP $P=0,67$) quando comparamos a análise histológica do grupo PTC com os grupos CPos o PTCTS.

Quando comparamos o soro pré vs pós-tratamento dos animais do grupo PTC, notamos que este tratamento não foi capaz de reduzir a quantidade de MPs associadas a antígenos de LDLox ($P=0,28$) e apresentou apenas uma tendência a remover MPs associadas a antígenos de Mic ($P=0,06$). A comparação do ΔT mostrou que o tratamento com PTCs não apresentou

redução significativa de MPs associadas a antígenos de Mic ($P > 0,05$ – teste de Dunn), ou de LDLox ($P = 0,11$).

O tratamento com PTC não apresentou diferença quanto à presença de RAM11 ($P = 0,94$), LDLox ($P = 0,34$) ou MMP9 ($P = 0,57$) na placa de ateroma quando comparado ao CPos e ao PTCTS.

No grupo PTC os animais apresentaram fígado com menor presença de macrófagos xantomatosos e gordura, entretanto com infiltrado linfocitário intenso. Notou-se um efeito semelhante nos rins, enquanto o baço continha infiltração moderada de macrófagos xantomatosos e dispersão das polpas vermelha e branca.

4.5 Transialidase – TS

O grupo TS apresentou efeito de redução do HDL colesterol ($P = 0,03$) e aumentou, não significativamente, os níveis de n-HDL colesterol ($P = 0,08$) quando comparadas às fases pré vs pós-tratamento, sem alterações significativas das demais variáveis (CT $P = 0,95$; TG $P = 0,12$; AST $P = 0,74$ e AST $P = 0,24$).

Ao comparar seu ΔT aos grupos CPos e PTCTS através do teste ANOVA apresentou diferença redução dos níveis de CT ($P = 0,05$) sem diferença quanto às demais variáveis (HDL $P = 0,32$; n-HDL $P = 0,15$; TG $P = 0,89$; AST $P = 0,92$ e AST $P = 0,97$).

A avaliação macroscópica das porções torácica e abdominal da aorta

mostrou que não houve diferença quanto à porcentagem da área da superfície com placa de ateroma do grupo TS ($P=0,16$).

O grupo TS não apresentou diferenças quanto a estrutura do vaso na análise histológica da porção ascendente (PE $P=0,39$; PI $P=0,07$; LP $P=0,51$; LR $P=0,13$; AP $P=0,63$; AM $P=0,09$ e %Obs $P=0,89$), torácica (Et $P=0,61$, Ep $P=0,91$ e AP $P=0,88$) ou abdominal (Et $P=0,43$, Ep $P=0,6$ e AP $P=0,19$) quando comparado aos grupos CPos e PTCTS.

Na comparação do soro pré vs pós-tratamento, o grupo TS não foi capaz de reduzir a quantidade de MPs associadas a antígenos de LDLox ($P=0,13$) e Mic ($P=0,42$). Assim como na comparação do ΔT com os grupos CPos e PTCTS (Mic $P=0,11$ – teste t de Bonferroni; LDLox $P>0,05$ – teste de Dunn).

A administração da TS não apresentou efeito sobre a porcentagem de RAM11 ($P=0,69$), LDLox ($P=0,49$) ou MMP9 ($P=0,81$) presentes na placa de ateroma quando comparado ao CPos e ao PTCTS.

Os animais tratados com TS apresentaram infiltração linfocitária e de macrófagos xantomatosos moderadas no fígado, rins e baço, sendo que este último apresentou dispersão moderada das polpas vermelha e branca.

4.6PDTC

A avaliação do perfil lipídico pré vs pós-tratamento mostrou que houve aumento significativo de CT ($P=0,02$) e de n-HDL colesterol ($P=0,004$) e não significativa de TG ($P=0,07$), além de redução significativa da transaminase ALT ($P=0,03$), sem diferenças quanto às demais variáveis (HDL $P=0,28$ e AST

$P=0,51$).

Enquanto a comparação com os grupos CPos e PTCTS através do teste ANOVA não apresentou diferenças em nenhuma das variáveis (CT $P=0,18$; HDL $P=0,81$; n-HDL $P=0,33$; TG $P=0,92$; ASTP= $0,51$ e ASTP= $0,38$).

A avaliação macroscópica das porções torácica e abdominal da aorta mostrou que não houve diferença quanto à porcentagem de área de placa do grupo TS comparado aos grupos CPos e PTCTS ($P=0,63$).

A análise histológica da porção ascendente apresentou diferença apenas quanto ao PE ($P<0,001$) através do teste ANOVA quando comparado ao CPos e ao PTCTS, entretanto não houve alterações em relação às demais variáveis (PI $P>0,05$; LP $P=1,0$; LR $P=1,0$; AP não testado; AM $P>0,05$ e %Obs $P=0,86$), ou quanto à porção torácica (Et $P=0,36$, Ep $P=0,73$ e AP $P=0,92$). Enquanto a porção abdominal apresentou redução não significativa da AP ($P=0,23$) sem diferenças quanto a Et ($P=0,67$) ou a Ep ($P=0,41$).

A comparação de MPs no soro pré vs pós-tratamento dos animais do grupo PDTC pela técnica de imunofluorescência mostrou que este tratamento foi capaz de reduzir a quantidade de MPs associadas a antígenos de LDLox ($P=0,01$) e Mic ($P=0,03$). E a comparação do ΔT mostrou que o tratamento levou a redução de MPs associadas a antígenos de LDLox ($P=0,002$ – teste t de Bonferroni), sem diferenças quanto a antígenos de Mic ($P=0,09$).

O grupo PDTC não apresentou diferenças em relação à composição ou vulnerabilidade da placa quanto à porcentagem de antígenos para RAM11 ($P=0,59$), LDLox ($P=0,46$) ou MMP9 ($P=0,73$) quando comparado ao CPos e PTCTS na área de placa avaliada pela técnica de imunohistoquímica.

Na análise histológica dos órgãos, o grupo PDTC apresentou o fígado com menor infiltração de macrófagos xantomatosos e infiltração linfocitária moderada. No baço, houve infiltração leve de macrófagos xantomatosos e dispersão leve das polpas vermelha e branca. Os rins apresentaram grande acúmulo de macrófagos xantomatosos e gordura, além de infiltrado linfocitário intenso e hemorragia leve nos túbulos renais.

Tabela 1. Média \pm DP do peso dos animais de cada grupo nas fases basal, pré e pós-tratamento e ΔT , e do consumo de ração nas fases pré e pós-tratamento com comparação do peso e consumo de ração pelo teste t pareado.

	Peso (Kg)					Ração (g)		
	Basal	Pré Trat	Pós Trat	ΔT	<i>P</i>	Pré Trat	Pós Trat	<i>P</i>
CNeg	3,1 \pm 0,2	3,6 \pm 0,3	0,8 \pm 0,4	0,2 \pm 0,2	0,1	118,4 \pm 17,82	115,1 \pm 21,8	0,5
CPos	3,3 \pm 0,2	3,4 \pm 0,3	3,4 \pm 0,5	0,0 \pm 0,2	1,0	98,9 \pm 9,9	77,4 \pm 17,2	0,02
PTC	3,4 \pm 0,2	3,6 \pm 0,2	3,4 \pm 0,3	-0,2 \pm 0,3	0,15	104,6 \pm 9,6	72 \pm 20,7	0,02
TS	3,4 \pm 0,3	3,7 \pm 0,5	3,7 \pm 0,4	-0,04 \pm 0,2	0,65	115,4 \pm 22,2	84,9 \pm 80,4	0,02
PTCTS	3,3 \pm 0,3	3,5 \pm 0,2	3,5 \pm 0,4	-0,05 \pm 0,2	0,64	103,5 \pm 8,8	90,4 \pm 11,2	0,01
PDTC	3,3 \pm 0,2	0,4 \pm 0,2	0,2 \pm 0,3	-0,1 \pm 0,2	0,16	96,1 \pm 6,6	78,8 \pm 16,6	0,01

Tabela 2. Média \pm DP dos valores de colesterol total e frações, triglicérides e transaminases dos grupos controle negativo, positivo e tratados nas fases basal pré e pós-tratamento, e comparações pelo teste t pareado.

	Colesterol total (mg/dL)				<i>P</i>	<i>P</i>
	Basal	Pré-trat.	Pós-trat.	ΔT	Basal x Pré	Pré x Pós
CNeg	100 \pm 85	88 \pm 43	84 \pm 55	-4 \pm 17	0,32	0,58
CPos	65 \pm 39	979 \pm 274	1418 \pm 383	439 \pm 345	<0,001	0,03
PTC	74 \pm 51	1183 \pm 318	1534 \pm 426	352 \pm 586	<0,001	0,2
TS	74 \pm 36	971 \pm 145	960 \pm 376	-9 \pm 336	<0,001	0,95
PTCTS	89 \pm 56	968 \pm 293	1137 \pm 273	169 \pm 120	<0,001	0,02
PDTC	71 \pm 35	902 \pm 187	1174 \pm 298	272 \pm 197	<0,001	0,02
	HDL (mg/dL)				<i>P</i>	<i>P</i>
	Basal	Pré-trat.	Pós-trat.	ΔT	Basal x Pré	Pré x Pós
CNeg	37 \pm 19	42 \pm 17	32 \pm 20	-10 \pm 18	0,17	0,22
CPos	32 \pm 17	506 \pm 279	445 \pm 131	-61 \pm 193	0,004	0,47
PTC	32 \pm 18	531 \pm 91	487 \pm 125	-44 \pm 123	<0,001	0,42
TS	42 \pm 14	615 \pm 189	344 \pm 137	-225 \pm 205	0,001	0,03
PTCTS	39 \pm 20	573 \pm 158	442 \pm 98	-131 \pm 140	<0,001	0,07
PDTC	36 \pm 14	551 \pm 127	430 \pm 175	-120 \pm 245	<0,001	0,28
	n-HDL (mg/dL)				<i>P</i>	<i>P</i>
	Basal	Pré-trat.	Pós-trat.	ΔT	Basal x Pré	Pré x Pós
CNeg	63 \pm 75	46 \pm 31	52 \pm 37	6 \pm 14	0,26	0,33
CPos	33 \pm 25	473 \pm 193	973 \pm 385	500 \pm 256	0,002	0,005
PTC	42 \pm 34	652 \pm 292	1047 \pm 375	395 \pm 502	0,002	0,11
TS	32 \pm 24	357 \pm 206	616 \pm 333	216 \pm 246	0,01	0,08
PTCTS	50 \pm 37	395 \pm 395	696 \pm 197	300 \pm 229	0,01	0,02
PDTC	35 \pm 39	351 \pm 243	743 \pm 164	392 \pm 187	0,01	0,004
	Triglicérides (mg/dL)				<i>P</i>	<i>P</i>
	Basal	Pré-trat.	Pós-trat.	ΔT	Basal x Pré	Pré x Pós
CNeg	83 \pm 27	56 \pm 26	203 \pm 335	147 \pm 349	0,1	0,44
CPos	83 \pm 59	134 \pm 50	377 \pm 201	244 \pm 210	0,1	0,04
PTC	77 \pm 27	205 \pm 115	600 \pm 556	396 \pm 562	0,02	0,14
TS	51 \pm 18	94 \pm 44	344 \pm 322	208 \pm 277	0,02	0,12
PTCTS	69 \pm 27	119 \pm 91	386 \pm 225	267 \pm 139	0,35	0,005
PDTC	70 \pm 43	81 \pm 38	380 \pm 309	299 \pm 324	0,14	0,07

	AST (U/L)				P	P
	Basal	Pré-trat.	Pós-trat.	ΔT	Basal x Pré	Pré x Pós
CNeg	38 ± 12	41 ± 13	42 ± 9	13 ± 17	0,33	0,85
CPos	42 ± 10	46 ± 10	47 ± 8	1 ± 10	0,29	0,8
PTC	45 ± 13	53 ± 17	78 ± 28	25 ± 33	0,16	0,12
TS	64 ± 35	78 ± 21	85 ± 23	7 ± 42	0,14	0,74
PTCTS	49 ± 19	61 ± 20	59 ± 30	-2 ± 26	0,37	0,82
PDTC	57 ± 43	64 ± 18	57 ± 19	-7 ± 24	0,09	0,51

	ALT (U/L)				P	P
	Basal	Pré-trat.	Pós-trat.	ΔT	Basal x Pré	Pré x Pós
CNeg	81 ± 15	108 ± 45	86 ± 55	-23 ± 71	0,09	0,47
CPos	98 ± 26	90 ± 24	53 ± 18	-37 ± 20	0,15	0,006
PTC	109 ± 23	97 ± 32	80 ± 28	-17 ± 49	0,21	0,43
TS	148 ± 61	131 ± 74	72 ± 32	-49 ± 89	0,16	0,24
PTCTS	127 ± 34	101 ± 32	56 ± 14	-44 ± 36	0,34	0,03
PDTC	113 ± 42	130 ± 83	52 ± 10	-78 ± 82	0,11	0,03

Tabela 3. Média ± DP da análise macroscópica das porções torácica e abdominal da aorta dos animais de cada grupo.

	Comprimento (mm)	Altura (mm)	Área (mm ²)	% Placa
CNeg	92,5 ± 12,7	8,1 ± 0,6	752,5 ± 130,7	7,9 ± 11,3
CPos	103,2 ± 11,4	8,3 ± 0,7	862,8 ± 159,6	39 ± 18
PTC	95,12 ± 15,3	8,8 ± 0,8	840,6 ± 198,7	26,9 ± 5,5
TS	101,4 ± 11,5	9,3 ± 1,2	947,9 ± 189,5	58,7 ± 26,6
PTCTS	114,7 ± 23,9	9,2 ± 2,8	1091,4 ± 500,1	39,3 ± 21,2
PDTC	103,7 ± 22,1	8,3 ± 1,8	883 ± 349,5	43,4 ± 15,6

Tabela 4. Média ± DP das medidas da aorta ascendente dos animais de cada grupo analisados pelo H&E.

	PE (mm)	PI (mm)	LP (mm ²)	LR (mm ²)	AP (mm ²)	AM (mm ²)	%Obs
CNeg	15,1 ± 1,3	12,3 ± 1,5	6,8 ± 1,6	6,8 ± 1,6	0 ± 0	5,9 ± 0,8	0 ± 0
CPos	15,1 ± 1,1	12,5 ± 1	5,9 ± 1,8	4,3 ± 1,7	2,1 ± 1,6	5,7 ± 0,4	28,6 ± 17,6
PTC	17,2 ± 1,7	14,7 ± 1,6	9,9 ± 3,1	7,3 ± 1,7	3 ± 2,6	6,7 ± 1,9	24,3 ± 11,7
TS	15,9 ± 0,6	13,2 ± 0,6	7,5 ± 2,5	5,9 ± 3	1,7 ± 1,7	6,3 ± 1,9	24,4 ± 17,7
PTCTS	17,1 ± 1,1	14,1 ± 1,3	9,7 ± 2,3	7,4 ± 2,8	2,3 ± 1,5	7,3 ± 1,1	24,5 ± 16,9
PDTC	12,1 ± 0,6	8 ± 1,7	5,3 ± 2,3	3,9 ± 2,2	1,4 ± 0,7	6,3 ± 1,3	29,1 ± 13

Tabela 5. Média ± DP das medidas das porções torácica e abdominal da aorta dos animais de cada grupo analisados pelo H&E.

	Porção torácica da aorta			Porção abdominal da aorta		
	Extensão total (mm)	Extensão da placa (mm)	Área de Placa (mm ²)	Extensão total (mm)	Extensão da placa (mm)	Área de Placa (mm ²)
CNeg	10 ± 0,4	0,5 ± 1,2	0,03 ± 0,1	7,4 ± 2,3	0,1 ± 0,3	0,01 ± 0,02
CPos	9,7 ± 1,6	4,7 ± 3,6	0,8 ± 0,9	7,8 ± 2,4	4,1 ± 2,5	0,7 ± 0,8
PTC	10,6 ± 3,6	6,5 ± 3,7	1,4 ± 1,2	7,7 ± 2,8	2,6 ± 2,2	0,4 ± 0,4
TS	8,9 ± 2,2	4,4 ± 2,7	0,6 ± 0,4	8,9 ± 0,8	5 ± 3,6	1,1 ± 0,9
PTCTS	8,7 ± 1,8	3,9 ± 2,8	0,7 ± 0,4	7,6 ± 1,4	3,1 ± 2,5	0,3 ± 0,3
PDTC	8,6 ± 0,9	3,5 ± 0,8	0,8 ± 0,5	8,4 ± 1,2	2,2 ± 1,9	0,3 ± 0,2

Tabela 6. Média ± DP da quantificação de MPs associadas a antígenos de *Mycoplasma pneumoniae* com comparação das fases basal, pré e pós-tratamento nos animais de cada grupo.

	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>				Basal x Pré	Pré vs Pós
	Basal	Pré Trat	Pós Trat	ΔT	P	P
CNeg	45 ± 15,6	71,3 ± 25,5	49,33 ± 17,33	-22 ± 29,2	0,02	0,12
CPos	209,2 ± 104,3	285,7 ± 105,9	437,5 ± 198,99	151,8 ± 112,4	0,001	0,02
PTC	62 ± 42	105,7 ± 43,1	70 ± 14,27	-35,7 ± 48,8	0,08	0,06
TS	369,2 ± 243,1	286,4 ± 158,4	361,2 ± 135,08	74,8 ± 87,2	0,31	0,13
PTCTS	102,3 ± 59,1	296 ± 183,6	158,67 ± 103,51	-137,3 ± 88,4	0,02	0,01
PDTC	58,2 ± 26,5	140,5 ± 49,7	89 ± 46,6	-51,5 ± 48,5	0,001	0,03

Tabela 7. Média ± DP da quantificação de MPs associadas a antígenos de LDLox com comparação das fases basal, pré e pós-tratamento nos animais de cada grupo.

	LDLox				Basal x Pré <i>P</i>	Pré x Pós <i>P</i>
	Basal	Pré Trat	Pós Trat	ΔT		
CNeg	335,3 ± 250,1	386,7 ± 232,4	301 ± 203,3	-85,7 ± 277,2	0,13	0,48
CPos	185,3 ± 112,6	305,8 ± 239,6	407,8 ± 254,6	102 ± 406,6	0,09	0,57
PTC	206,3 ± 127,4	314,7 ± 76,1	223 ± 154,1	-91,7 ± 187,1	0,07	0,28
TS	267,4 ± 171,1	261 ± 190,3	311,6 ± 169,4	50,6 ± 45,9	0,26	0,07
PTCTS	236,7 ± 120,7	350,5 ± 86,3	204,5 ± 57,9	-146 ± 126,6	0,05	0,04
PDTC	193 ± 67,9	455,8 ± 199,1	201,3 ± 48,1	-254,5 ± 162	0,006	0,01

Tabela 8. Média ± DP da porcentagem de marcação positiva para MMP9, LDLox e RAM11 na área de placa dos animais de cada grupo.

	MMP9	LDLox	RAM11
CPos	8,5 ± 8,9	12,6 ± 7,9	24,5 ± 15
PTC	4,8 ± 4	22,1 ± 13,8	25,9 ± 11,9
TS	11 ± 11,5	21,3 ± 17,9	20,1 ± 14,2
PTCTS	7,7 ± 4,7	14,5 ± 15,8	27,1 ± 10,4
PDTC	5,8 ± 3,5	18,3 ± 13	21,5 ± 5,6

Tabela 9. Média ± DP do peso dos órgãos dos animais de cada grupo.

	Fígado (g)	Rins (g)	Baço (g)
CNeg	95,3 ± 20,5	22,5 ± 3,4	2,8 ± 0,7
CPos	131,4 ± 25,7	21,2 ± 6,2	3,9 ± 1,4
PTC	145,2 ± 12,5	23,9 ± 3,7	7 ± 3,4
TS	143,9 ± 24	26,8 ± 7,5	6,2 ± 2,2
PTCTS	146,8 ± 16,6	23,7 ± 2,1	5,7 ± 1,7
PDTC	135,2 ± 24,2	22,9 ± 4,6	5,4 ± 2,8

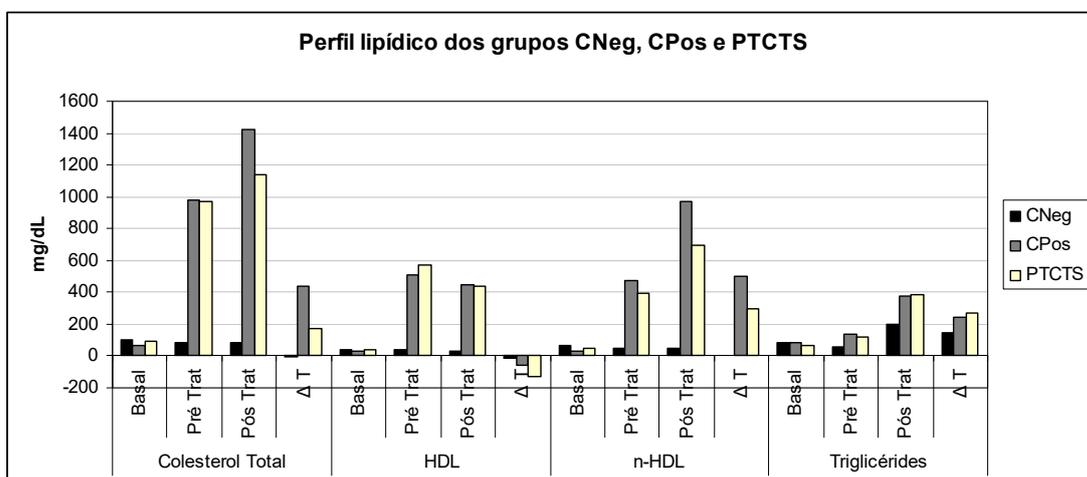


Figura 7. Valores séricos de colesterol total, HDL colesterol, n-HDL colesterol e triglicérides em mg/dL nas coletas basal, pré e pós tratamento e ΔT dos grupos CNeg, CPos e PTCTS.

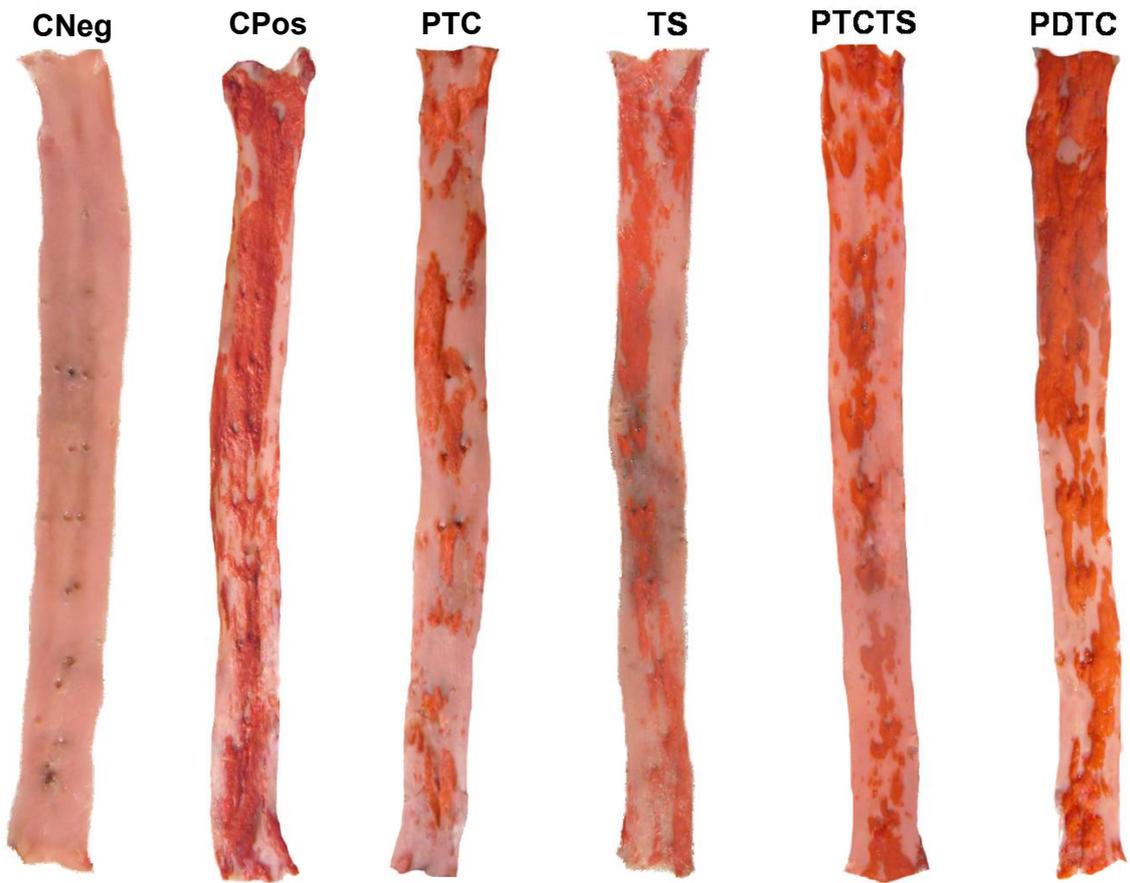


Figura 8. Análise macroscópica das porções torácica e abdominal das aortas representativas dos coelhos de cada grupo.

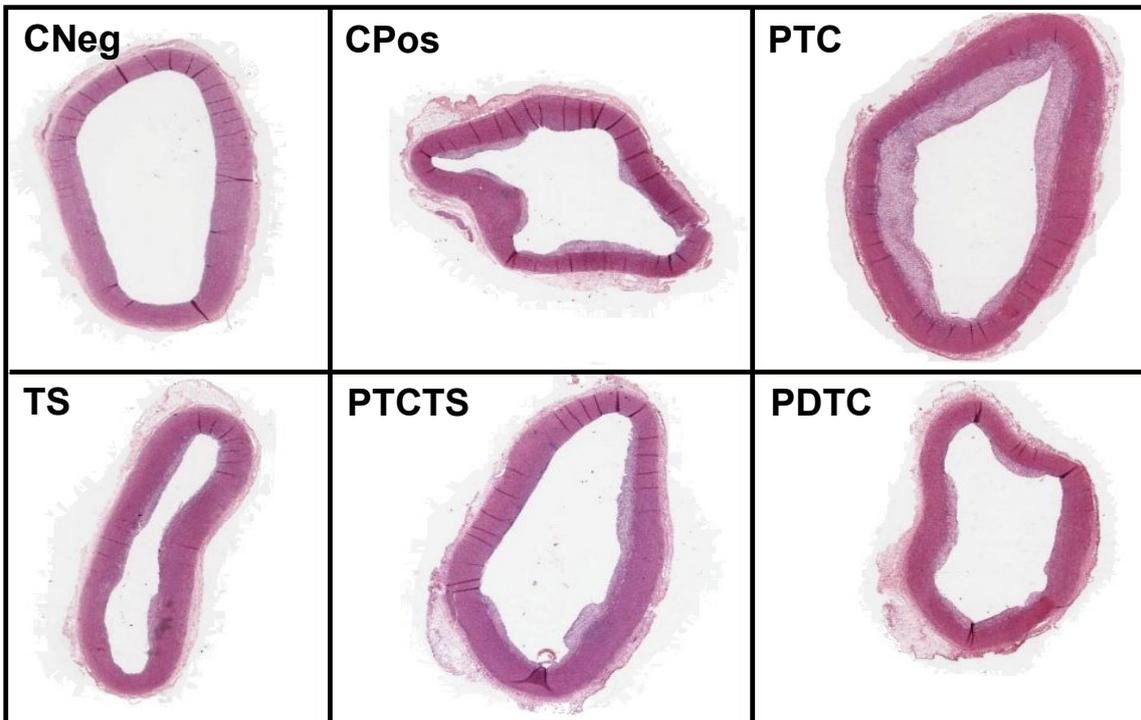


Figura 9. Análise histológica da porção ascendente das aortas representativas dos coelhos de cada grupo.

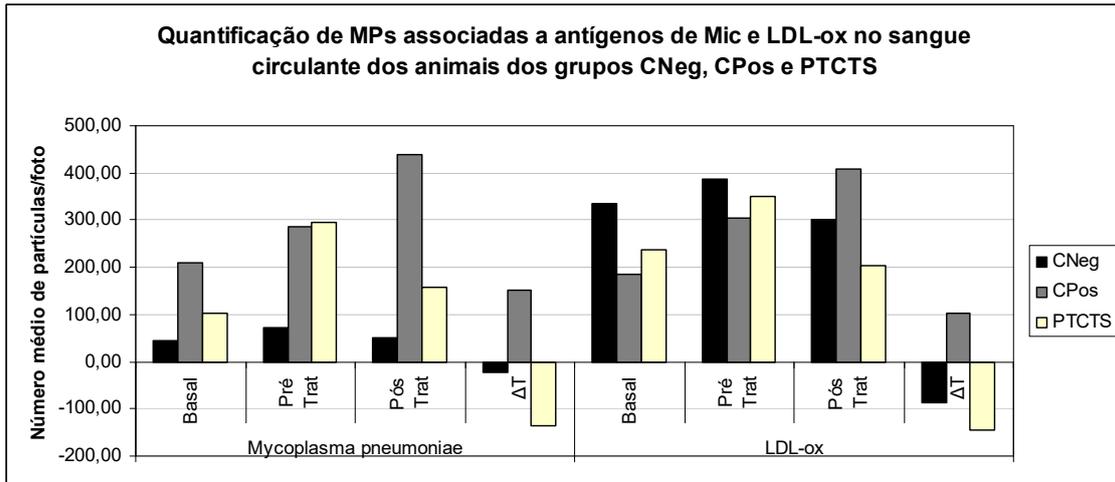


Figura 10. Quantidade de MPs associadas a antígenos de *Mycoplasma pneumoniae* e LDLox nos animais dos grupos controle negativo, positivo e PTCTS nas coletas Basal, pré e pós-tratamento, e a diferença entre esses valores (ΔT).

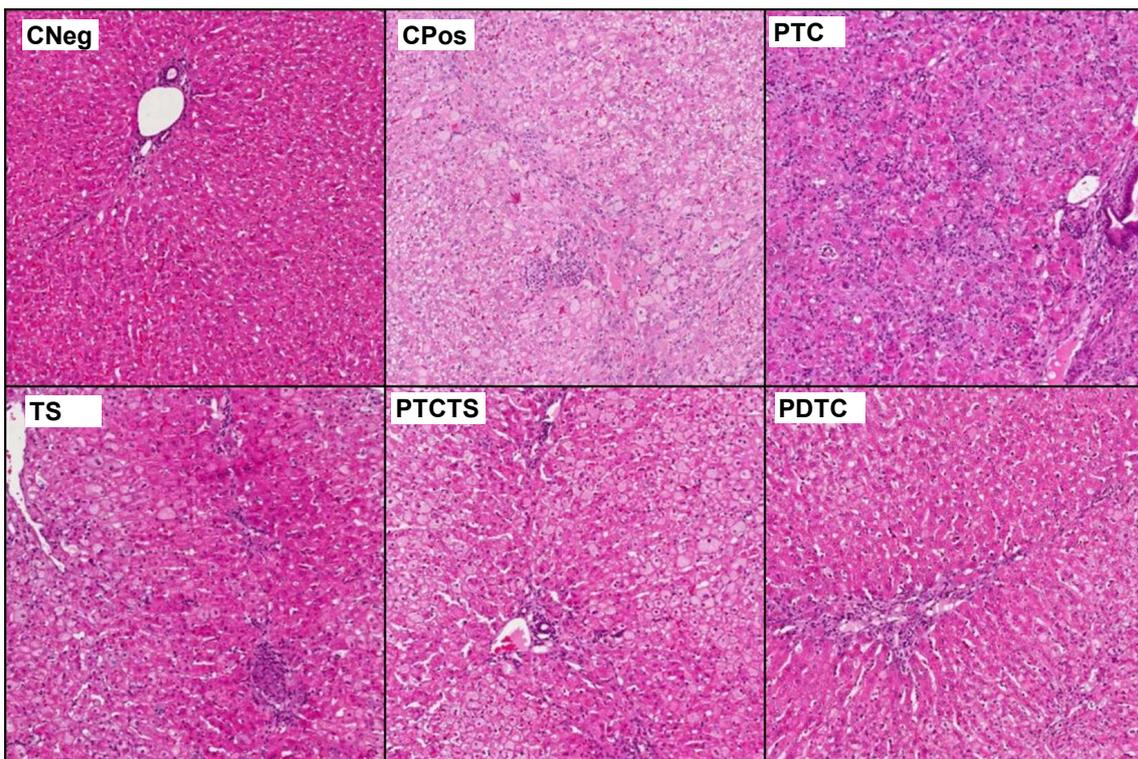


Figura 11. Histologia do fígado representativa dos animais de cada grupo. Aumento x10.

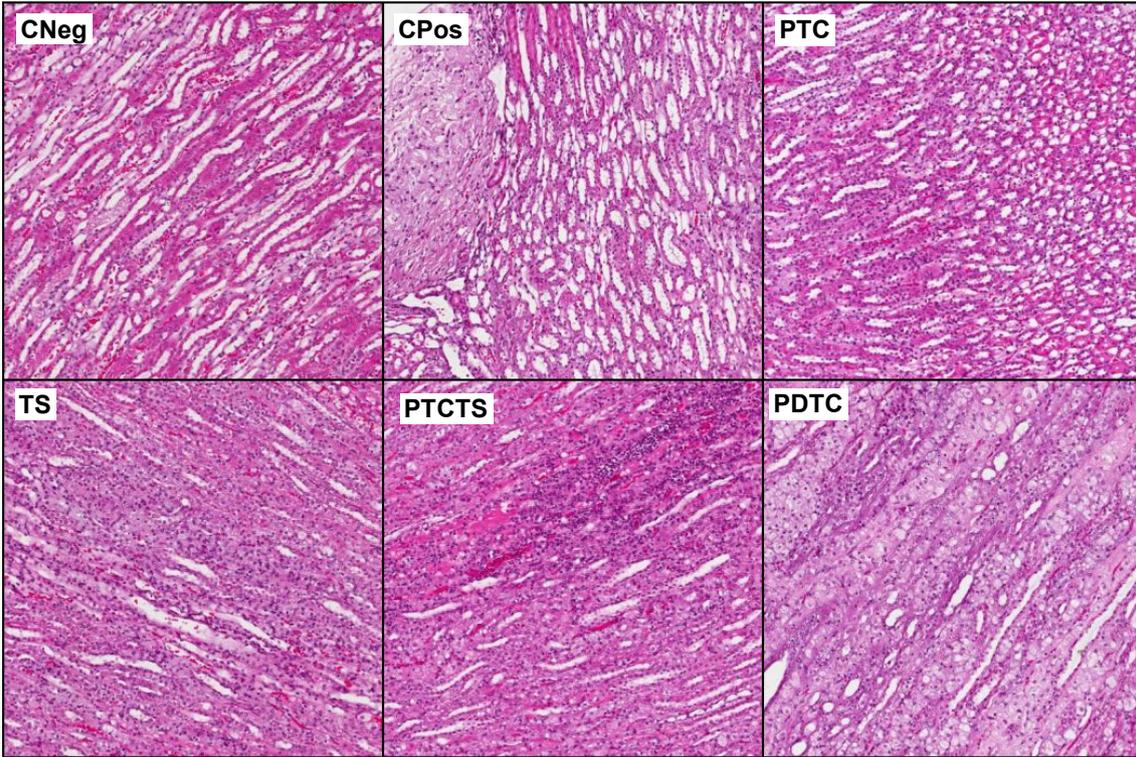


Figura 12. Histologia dos rins representativa dos animais de cada grupo. Aumento x10.

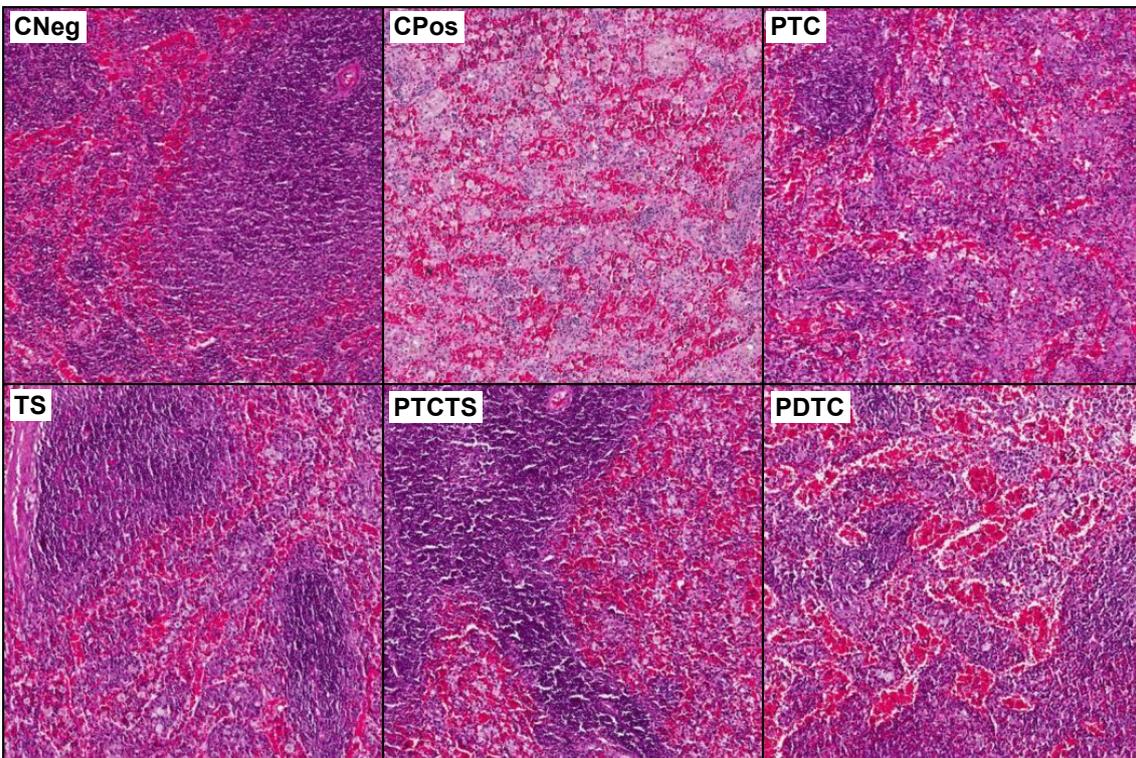


Figura 13. Histologia do baço representativa dos animais de cada grupo. Aumento x10.

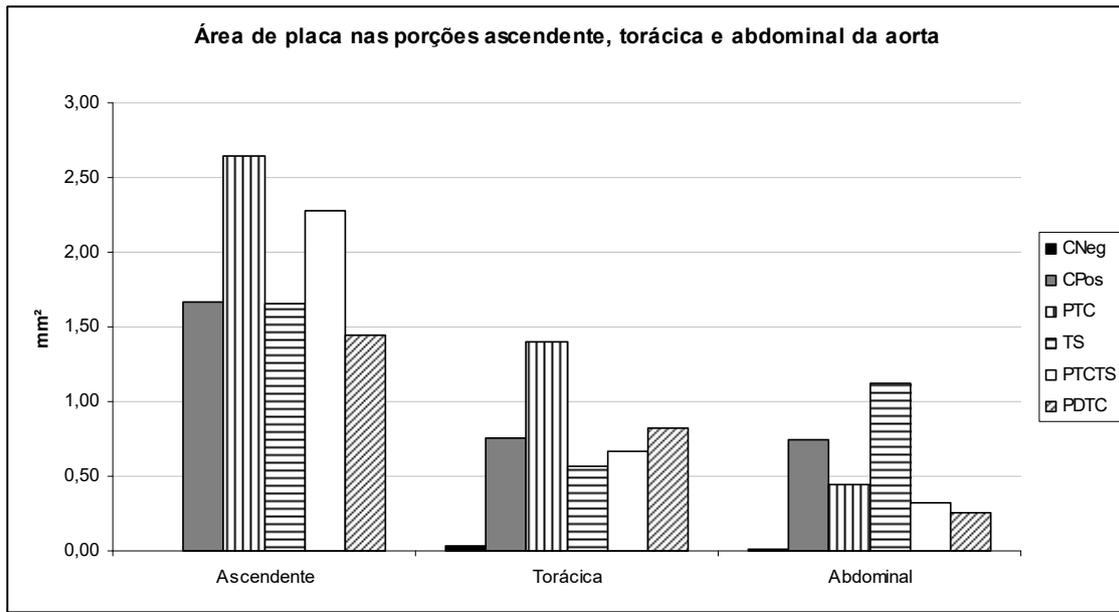


Figura 14. Área de placa nas porções ascendente, torácica e abdominal da aorta dos animais dos grupos controle e tratados.

5. DISCUSSÃO

5. Discussão

A aterosclerose é formada a partir do acúmulo de monócitos/macrófagos que invadem o espaço subendotelial atraídos pela presença de LDL oxidada, e passa a fagocitá-las, dando origem às células xantomatosas, a base da formação da placa de ateroma³³.

Apesar das pesquisas intensas procurando esclarecer a patogenia da aterosclerose e suas complicações, ainda não se conseguiu explicar o porquê da oxidação da LDL na região subintimal, que leva à atração de monócitos do sangue e o acúmulo de macrófagos xantomatosos. Como discorrido na introdução, procuramos em trabalhos anteriores verificar se agentes infecciosos poderiam estar envolvidos.

Estudos do grupo mostraram antígenos e formas compatíveis com as bactérias *Mycoplasma pneumoniae* e *Chlamydomphila pneumoniae* nas placas de ateroma e em maior quantidade nas placas rotas, que causaram infarto agudo do miocárdio¹⁴. Verificou-se a presença de MPs em íntimo contato com as bactérias acima descritas³⁴, bem como no sangue de pacientes infartados^{35,36}.

Assim, o presente trabalho buscou avaliar se MPs contendo antígenos de Mic e LDLox estão presentes no sangue circulante de coelhos alimentados com dieta rica em colesterol ao longo de 12 semanas, e se poderiam estar atuando na progressão da doença, aumentando em número, conforme o avanço do experimento.

Também verificamos se a remoção das MPs pelo tratamento com PTCTS, droga desenvolvida pela HS Ciência e Biotecnologia, seria capaz de regredir a aterosclerose comparando com o grupo não tratado. Quais componentes presentes no PTCTS são capazes de eliminar tais MPs, mesmo mantendo-se a dieta hipercolesterolêmica durante o tratamento, bem como os possíveis efeitos adversos dos componentes deste complexo quando administrados individualmente.

Antes do início dos tratamentos foi possível notar que, conforme o esperado, a dieta hipercolesterolêmica aumentou os níveis séricos de colesterol total e suas frações, assim como alterou os níveis de transaminases hepáticas nos animais que a consumiram, quando avaliamos as fases basal e pré-tratamento.

Além disso, também notamos que houve aumento no número de MPs séricas associadas a antígenos de Mic e LDLox, mesmo no CPos, que já apresentava valores altos de MPs associadas ao Mic, falando a favor de que micoplasmas e MPs contendo seus antígenos têm participação no desenvolvimento da doença aterosclerótica.

O tratamento apenas com PTC não apresentou capacidade de redução de CT sérico e suas frações e TG, bem como transaminases hepáticas, seja comparando as fases pré e pós-tratamento, ou a diferença entre tais fases com o grupo CPos.

Contudo, foram capazes de reduzir o número de MPs associadas a antígenos de Mic, ainda que não significativamente, quando comparadas as fases pré e pós tratamento, entretanto, tal efeito não se aplicou às MPs associadas a LDLox ou quando foram comparados ao grupo CPos.

Quanto à composição da placa de ateroma, os animais que receberam tratamento com PTC não se diferenciaram dos animais do grupo CPos, apresentando porcentagens próximas a ele de antígenos de RAM11 e LDLox, o que pode ser justificado pela grande área de placa de ateroma, conhecida por conter grande quantidade de macrófagos xantomatosos contendo LDLox em seu interior.

O tratamento apenas com PTC também não foi capaz de influenciar no desenvolvimento da placa de ateroma quanto sua estabilidade, uma vez que os animais que receberam este tratamento apresentaram quantidades similares de MMP9 às do grupo CPos, indicativas de placa vulnerável.

Além disso, o PTC não apresentou efeitos anti-ateroscleróticos significantes, uma vez que não foi capaz de reduzir a área da placa encontrada na porção ascendente da aorta, local conhecido por ser mais afetado pela doença aterosclerótica, junto com o arco aórtico, devido à alta pressão sanguínea e conseqüentemente maior chance de lesão endotelial³⁷.

Contudo, a análise da porção abdominal da aorta indicou menor quantidade de placa, ainda que não significativa estatisticamente. Tal fator poderia ser justificado pela menor pressão sanguínea e lesão endotelial, assim como por ser a região mais próxima ao local de absorção das partículas orgânicas, sendo a primeira área a apresentar os efeitos do tratamento.

Este tratamento também apresentou a estrutura da aorta diferenciada, com valores dos perímetros externos e internos maiores quando comparados ao CPos, o que indica que o diâmetro do vaso dos animais deste grupo era maior. Tais dados associados com os valores de lúmen potencial e real maiores que os dos animais do grupo CPos, mesmo com os valores de área de placa

similares, são indicativos de remodelamento positivo, fenômeno descrito por Glasgow³⁸, em 1987, como alargamento compensatório das artérias coronárias ao abrigar grandes quantidades de placa de ateroma, permitindo assim a manutenção do fluxo sanguíneo.

O tratamento com TS foi capaz de reduzir significativamente os níveis de HDL sérico, embora os níveis de TG, n-HDL colesterol, e colesterol total tenham se mantido altos, o que consideramos um passo rumo à ação anti-lipemiantes. Entretanto, administrada sozinha, não apresentou efeitos anti-ateroscleróticos em nenhuma das porções avaliadas da aorta.

A administração da TS isoladamente não demonstrou capacidade de remover MPs associadas ao Mic e a LDLox do sangue circulante, sendo tal resultado, provavelmente devido à via de administração da mesma, uma vez que apenas diluída em água, a enzima não seja capaz de se manter estável no pH ácido do estômago, e seja degradada.

O tratamento com TS também não se mostrou eficaz em influenciar a composição da placa de ateroma quanto a presença de RAM11 ou de LDLox, bem como a sua vulnerabilidade devido a presença de MMP9 em quantidades próximas ao CPos.

A associação das PTC com a TS, o PTCTS, sem a adição do PDTC se mostrou eficaz em vários aspectos, como na remoção de MPs associadas a antígenos de Mic e LDLox no soro dos coelhos após o tratamento, dois itens de extrema importância no desenvolvimento da resposta anti-inflamatória e antiaterogênica.

Além disso, o PTCTS demonstrou efeitos quanto à modificação da estrutura da aorta, induzindo alterações no calibre do vaso quando comparado

aos controles negativo e positivo pela morfometria microscópica da aorta. Tais diferenças são indicativas de remodelamento positivo, assim como ocorreu no grupo PTC.

O tratamento com PTCTS também reduziu, não significativamente, a quantidade de placa presente na porção abdominal da aorta, sugerindo um efeito anti-ateroscleróticos mais eficaz que o PTC isoladamente.

Os efeitos do tratamento com TS se mostraram diferentes do tratamento com PTC, porém, ambos semelhantes ao PTCTS, indicando que a associação dos dois componentes é mais completa e balanceada.

Quando o PDTC é adicionado ao tratamento com PTCTS apresenta efeitos opostos, pois parece inibir a atividade do composto de eliminação de MPs, bem como alterar a estrutura do vaso no sentido contrário, indicando possível remodelamento negativo, descrita inicialmente por Pasterkamp³⁹ como uma resposta contrária ao remodelamento positivo de Glasgow, na qual o vaso encolhe de tal forma que mesmo uma pequena quantidade de placa de ateroma poderia levar a obstrução do vaso e perda luminal significativa.

Ainda, segundo Pasterkamp, tal comportamento é observado em processos ateroscleróticos em que a placa é estável, contudo, assim como os demais tratamentos, o grupo tratado com PDTC não apresentou diferenças quanto a quantidade de MMP9 na placa, característico de placa vulnerável.

Este tratamento, assim como os demais, não apresentou diferenças quanto a composição da placa de ateroma referente à quantidade de RAM11 e LDLox.

O desenvolvimento deste trabalho se deu baseado em um trabalho prévio, no qual o PTCTS foi administrado via intramuscular e removeu quase

completamente a área de placa tanto nas porções torácica e abdominal, quanto na porção ascendente da aorta, além de reduzir o colesterol total sérico e suas frações a níveis basais. Todavia, o tratamento por via oral com a mesma droga não apresentou resultados semelhantes.

É sabido que a administração de medicamentos por via oral tem muitas vantagens, como o fato de ser uma via segura e prática, que permite autoadministração além de ser mais econômica, entretanto, sabe-se que também apresenta desvantagens que devem ser levadas em consideração, como por exemplo, sua absorção pode variar de moderada a lenta bem como a alta probabilidade de perda parcial da concentração da droga pela inativação dos princípios ativos através da ação de enzimas digestivas e do pH ácido do meio, enquanto a via de administração intramuscular tem uma absorção rápida e sistêmica.

Sendo assim, a diferença de resultados em relação às ações antilipemiantes e anti-ateroscleróticas do composto PTCTS pode ser devida tanto à menor concentração do mesmo a atingir a corrente sanguínea, como à perda de atividade de parte do complexo causado pela ação de enzimas gástricas quando administrado por via oral.

Desta forma, pretendemos em trabalhos futuros, ajustar a dose, tempo de tratamento, e também veículo de administração, de forma que o composto mantenha sua integridade mesmo em ambiente com pH alto, ou em presença de enzimas digestivas, como no estômago. Atualmente, estamos testando a aplicação do composto em gel estabilizante, que futuramente possa ser incluído em cápsulas de gelatina, permitindo que uma maior concentração da droga chegue ao sangue e atinja seu alvo, sendo capaz de atuar conforme o

esperado, sofrendo menor perda do composto.

6.CONCLUSÕES

6. Conclusões

- Os compostos do PTCTS apresentam efeitos diferentes quando administrados isoladamente, sendo PTC responsável pela melhor resposta dos órgãos frente ao consumo de grandes quantidades de colesterol, bem como pelo efeito de remodelamento positivo do vaso, enquanto a TS age sobre a redução de CT e normalização de ALT.
- Quando associadas, as PTCs e a TS se complementam, tendo assim seus efeitos complementares e intensificados, permitindo que o PTCTS tenha ações mais abrangentes, levando ao melhor tratamento, seja quanto à melhora do perfil lipídico e hepático, a eliminação de MPs ou ao remodelamento positivo do vaso.
- A presença do PDTC inibiu parcialmente a ação do PTCTS, de forma que tem efeitos opostos quanto ao perfil lipídico e remodelamento do vaso ao permitir o aumento de CT e levar ao remodelamento negativo.
- As dosagem, composição e/ou tempo de tratamento do composto PTCTS por via oral ainda não estão adequadas ao tratamento da aterosclerose, uma vez que não apresentou efeitos anti-lipemiantes e anti-ateroscleróticos, como o ocorrido com tratamento injetável por via intramuscular, devendo ser melhorado em trabalhos futuros.

- Os dados encontrados neste trabalho experimental reforçam a teoria infecciosa na patogenia da aterosclerose, bem como a de que MPs originadas de tais micro-organismos possam estar induzindo a produção de radicais livres e influenciando a oxidação de lípidos, de forma que a remoção de tais patógenos do sangue circulante pode ser um novo caminho terapêutico no tratamento da aterosclerose.

7. REFERÊNCIAS

7. Referências

-
- 1 Honma Y. Predictors of atherosclerosis. *J. Atheroscler Thromb.* 2004;11(5): 265-70.
 - 2 Alptekin Y, Davut O, Metin K, Harun C. Effect of atorvastatin and ezetimibe treatment on serum lipid profile and oxidative state in rats fed with a high-cholesterol diet. *Am J Med Sci.* 2010;339(5):448-52.
 - 3 Berliner J A, Territo MC, Sevanian A, Ramin S, Kim JA, Bamshad B, Esterson M, Fogelman AM. Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *J. Clin. Invest.* 1990;85(4): 1260-6.
 - 4 Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation.* 2005;111(25):3481-8.
 - 5 Stocker R, Keaney JF Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol. Rev.* 2004; 84(4):1381-478.
 - 6 Libby P. The Molecular Mechanisms of the Thrombotic Complications of Atherosclerosis. *J Intern Med.* 2008 May; 263(5): 517–27.
 - 7 Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature.* 2011;19;473(7347):317-25.
 - 8 Higuchi ML, Sambiasi N, Palomino SAP, Gutierrez P, Demarchi LM, Aiello VD, Ramires JAF. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in ruptured atherosclerotic plaques. *Braz J Med Biol Res* 2000;33(9):1023-6
 - 9 Iyama K, Zhang S, Lo SC. Effects of mycoplasmal LAMPs on receptor responses to steroid hormones in mammalian cells. *Curr Microbiol.* 2001;43(3)163-9.
 - 10 Wise KS, Kim MF, Theiss PM, Lo SC. A family of strain-variant surface lipoproteins of *Mycoplasma fermentans*. *Infect Immun.* 1993;61(8):3327-33.

-
- 11 Pucci B, Kasten M, Giordano A. Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia*. 2000;2(4):291-9.
 - 12 Medvedeva ES, Baranova NB, Mouzykantov AA, Grigoreva TY, Davydova MN, Chernova OA, Chernov VM. Extracellular vesicles of mycoplasmas and development of resistance to quinolones in bacteria. *Dokl Biochem Biophys*. 2014;454(1):34–7
 - 13 Ikegami RN, Kawakami JT, Abdalla DSP, Santos RD, Filho RK, Ramires JAF, Higuchi ML. Infection and microparticles may cause complication of atherosclerotic plaques. *Journal of Diabetes & Metabolism*. 2015;6:1-4.
 - 14 Leroyer AS, Isobe H, Leseche G, et al. Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49(7):772–7.
 - 15 Nomura S, Tandon NN, Nakamura T, Cone J, Fukuhara S, and Kambayashi J. High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2001;158(2):277–87.
 - 16 Mesri M, Altieri DC. Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway. *J Biol Chem*. 1999;274(33):23111–8.
 - 17 Meng L-Z, Lv G-P, Hu D-J, Cheong K-L, Xie J, Zhao J, Li S-P. Effects of polysaccharides from different species of *Dendrobium* (Shihu) on macrophage function. *Molecules*. 2013;18:5779-91
 - 18 Sousa ECP, Chacra NAB, Kawakami JT, Higuchi ML. Characterization of organic nanoparticles for the production of the topical medications. *GJERSM*. 2016; 3(7):106-12
 - 19 Higuchi ML. Trypanosoma cruzi's trans-sialidase as a new therapeutic tool in the treatment of chronic inflammatory diseases: possible action against mycoplasma and chlamydia. *Med Hypotheses*. 2004;63(4):616–23.
 - 20 Crocker PR. Siglecs: sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins in cell–cell interactions and signaling. *Curr Opin Struct Biol*. 2002;12(5):609-15.
 - 21 Powell LD, Varki A. I-type lectins. *J Biol Chem*. 1995;270(24):14243-6.
 - 22 McDonald ND, Lubin J-B, Chowdhury N, Boyd EF. Host-derived sialic

acids are an important nutrient source required for optimal bacterial fitness in vivo. *mBio* 7(2):e02237-15.

- 23 Santos MH, Ikegami RN, Reis MM, Fagundes R, Higuchi ML. A new therapeutic proposal for lipid lowering treatment: association of transialidase and anti-oxidant elements. An experimental study in rabbits. *DALM 2007 - J of Clin Lipidol.* 2007;1(5):474.
- 24 Németh ZH, Haskó G, Vizi ES. Pyrrolidine dithiocarbamate augments IL-10, inhibits TNF-alpha, MIP-1alpha, IL-12, and nitric oxide production and protects from the lethal effect of endotoxin. *Shock.* 1998;10(1):49–53.
- 25 Hallahan DE, Virudachalam S, Kuchibhotia J. Nuclear factor kappaB dominant negative genetic constructs inhibit X-ray induction of cell adhesion molecules in the vascular endothelium. *Cancer Res.* 1998; 58(23):5484–5485
- 26 Moellering D, McAndrew J, Jo H, Darley-Usmar VM. Effects of pyrrolidine dithiocarbamate on endothelial cells: protection against oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 1999;26(9-10):1138–45
- 27 Shao DZ, Lee JJ, Huang WT, Liao JF, Lin MT. Inhibition of nuclear factor-kappaB prevents staphylococcal enterotoxin A-induced fever. *Mol Cell Biochem.* 2004;262(1-2):177–85.
- 28 Tahata S, Yuan B, Kikuchi H, Takagi N, Hirano T, Toyoda H. Cytotoxic effects of pyrrolidine dithiocarbamate in small-cell lung cancer cells, alone and in combination with cisplatin. *Int J Oncol.* 2014;45(4):1749-59.
- 29 Donadelli M, Dalla Pozza E, Costanzo C, et al. Increased stability of P21(WAF1/CIP1) mRNA is required for ROS/ERK-dependent pancreatic adenocarcinoma cell growth inhibition by pyrrolidine dithiocarbamate. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1763(9):917–26.
- 30 Morais C, Gobe G, Johnson DW and Healy H: Inhibition of nuclear factor kappa B transcription activity drives a synergistic effect of pyrrolidine dithiocarbamate and cisplatin for treatment of renal cell carcinoma. *Apoptosis.* 2010;15(4):412–25.
- 31 Weyne GRS. Determinação do tamanho da amostra em pesquisas na Área da Saúde. *Arq Med ABC.* 2004;29(2):87-90

-
- 32** Santos MHH, Pierri H, Higuchi ML, Nussbacher A, Palomino SAP, Sambiase NV, Ramires JAF, Wajngarten M. Chlamydia pneumoniae e Mycoplasma pneumoniae nos nódulos de calcificação da estenose da valva aórtica. *Arq. Bras. Cardiol.* 2005; 84(6):443-8.
- 33** Zhao Y, Yan L, Luo XM, Peng Lu, Guo H, Jing Z, Yang LC, Hu R, Wang X, Huang XF, Wang YQ, Jin X. A novel PPAR α agonist propane-2-sulfonic acid octadec-9-enyl-amide inhibits inflammation in THP-1 cells. *Eur J Pharmacol.* 2016;788:104-112.
- 34** Higuchi ML, Santos MHH, Rogério A, Kawakami JT, Bezerra HG, Canzian M. A role for archaeal organisms in development of atherosclerotic vulnerable plaques and myxoid matrices. *Clinics.* 2006;61(5):473-8.
- 35** Hartopo AB, Puspitawati I, Gharini PP, Setianto BY. Platelet microparticle number is associated with the extent of myocardial damage in acute myocardial infarction. *Arch Med Sci.* 2016;12(3):529-37.
- 36** Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Cardiac Extracellular Vesicles in Normal and Infarcted Heart. *Int J Mol Sci.* 2016; 5;17(1).pii: E63.
- 37** Todua FI, Beraya MV. Hemodynamic physiology in aortic arch and trigger factors of atherosclerosis. *Bull Exp Biol Med.* 2005;140(6):664-7.
- 38** Glasgow S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med.* 1987;316(22):1371-5.
- 39** Pasterkamp G, Wensing PJ, Post MJ, Hillen B, Mali WP, Borst C. Paradoxical arterial wall shrinkage may contribute to luminal narrowing of human atherosclerotic femoral arteries. *Circulation.* 1995;91(5):1444-9.

ANEXOS

Aprovação do comitê de ética em pesquisa



A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 19/09/2012, **APROVOU ad referendum** o Protocolo de Pesquisa nº **293/12** intitulado: **“MICROPARTÍCULAS E NANOPARTÍCULAS NA ATEROSCLEROSE: DA ATEROGÊNESE AO TRATAMENTO”** que utilizará **36** animais da espécie **Coelhos espécie Nova Zelândia, machos e fêmeas com aproximadamente 60 dias de idade e pesando 2,2+/-0,5KG**, apresentado pela **COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Maria de Lourdes Higuchi

Pesquisador (a) Executante: Shérrira Menezes Garavelo

CEP-FMUSP, 20 de Setembro de 2012.

**Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais**

**Prof. Dr. Paulo Eurípedes Marchiori
Vice-Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa**

COMISSÃO CIENTÍFICA
RECEBIDO
24/09/12
Caive