

Sheila Cristina Monteiro Paiva Freitas

**Veiculação do quimioterápico paclitaxel em nanoemulsões
lipídicas no tratamento da aterosclerose experimental:
importância do tamanho das partículas da nanoemulsão**

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

Programa de Cardiologia
Orientador: Prof. Dr. Raul Cavalcante
Maranhão

**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

Freitas, Sheila Cristina Monteiro Paiva

Veiculação do quimioterápico paclitaxel em nanoemulsões lipídicas no tratamento da aterosclerose experimental : importância do tamanho das partículas da nanoemulsão / Sheila Cristina Monteiro Paiva Freitas. -- São Paulo, 2016.

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

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, que me capacitou e me sustentou durante todo o tempo. Graças a Ele estou nesta jornada e somente por Ele é que eu finalizo mais esta etapa de minha vida.

Dedico também a meu esposo Antônio, que muitas vezes acreditou mais em minha capacidade que eu mesma e à minha filha Elisa, para quem eu desejo ser sempre um bom exemplo.

AGRADECIMENTOS

Neste momento, em que um sonho está para ser realizado, me sinto imensamente feliz por ter a quem agradecer. Sinto que minha vitória é verdadeiramente compartilhada por meus familiares, meus amigos, meus colegas. Durante toda esta jornada, até o ponto em que estou para alcançar, pessoas maravilhosas encheram minha vida de experiências que vou guardar para sempre! Parece até um velho e clichê, não me importo, pois sei que ter um coração agradecido só me faz crescer. Então...

- A Deus, por fazer o impossível ser possível em minha vida, por colocar em meu caminho pessoas dispostas a me ensinar, por me sustentar em todas as circunstâncias e por me capacitar em toda dificuldade.
- A meu esposo, amigo, companheiro e amado Antônio Freitas, muito obrigada por aceitar minhas aventuras e fazer das minhas vitórias, as nossas vitórias!
- A minha filha, Elisa Freitas, por enxergar em mim só as coisas boas e positivas. Te amo, bebêzinha da mamãe!
- Ao Prof. Raul Maranhão, que abriu as portas de seu Laboratório para esta Anapolina crescer, por sua paciência e dedicação em minha formação.
- A minha família, que me incentivou, apoiou e acreditou em mim, todos vocês são muito importantes em minha história, meus irmãos, tios, primos, sobrinhos. Amo muito vocês.

- A meus pais, d. Alice (*in memoriam*), que estaria tão exultante quanto eu estou agora, ao sr. Edmar, que está muito orgulhoso de sua “menininha do disquinho” e à minha segunda mãe Neide, que esteve presente em todos os importantes momentos desta jornada, “você é muito importante pra mim, viu?”
- Às minhas amigas do Laboratório de Lípidos, AlêTiemi, por sua amizade e por me ajudar em vários momentos difíceis; Fátima, sua amizade foi fundamental para mim, eu não chegaria até aqui sem você; Bruna, por “colocar a mão na massa” comigo, sempre disponível a me ajudar; Ana Elisa, por sempre ser uma companheira maravilhosa; Aline Derísio, por sua amizade e companheirismo; Débora Deus, por sua amizade e conselhos.
- Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Lípidos, Andréia, a espirituosa, Carol Graziani, a virtuosa, Dalila, a aplicada, Elaine Daminelli, a formidável, Elaine Rufo, a excepcional, Fernanda, a esplêndida, Guta, a divertida, Josefa, a rara, Keila, a sublime, Oscar, o Dr. Paciência, Priscila, a solidária, Tauani, a destemida, Vanderlei, o gentil, Wilson, o bondoso.
- Aos demais colegas do Laboratório de Metabolismo e Lípidos, por todo ambiente de aprendizado que proporcionam.
- Às singulares Débora Levy, Thatiana Melo, Suelen Feitosa, não tenho como agradecer tudo que fizeram por mim.
- À Prof^a Ludmila Hajjar e Sr^a Neusa, pelo respeito que dedicaram a mim, durante os dois anos de representante discente. Foi um privilégio aprender e conviver um pouquinho com vocês, obrigada!

- Às funcionárias da Pós-Graduação, pela paciência e profissionalismo que me trataram durante estes anos. À Julia pelas consultorias estatísticas.
- Aos professores que me inspiraram, durante suas aulas: Prof^a Maria Aparecida Basille, Prof. Paulo Saldiva, Prof^a Maria Lúcia Bueno Garcia, Prof^aNadja C Souza Pinto, Prof^a Cristina Krokon, foi um privilégio assistir suas aulas.
- Aos colegas de disciplinas, pelo sofrimento e alegrias compartilhados em muitas delas, vocês são inesquecíveis, Railmara, Andrews, Daniel, Leonardo, Carol Bras, Denise, Aline Alfonso, Mariana, Ana Stern, Rita Callegari.
- Aos funcionários do Biotério do InCor e do Departamento Experimental, pelas inúmeras vezes que me ajudaram.
- A todos os meus amigos e irmãos da Igreja Presbiteriana do Brasil, pelas orações, pela amizade e pela torcida.

Todos vocês são co-autores deste trabalho!

Obrigada!

“A sabedoria é a coisa principal; adquiere pois a sabedoria,
emprega tudo o que possuis na aquisição de entendimento.

Exalta-a, e ela te exaltará; e, abraçando-a tu, ela te honrará.

Dará à tua cabeça um diadema de graça
e uma coroa de glória te entregará.”

Provérbios 4:7-9

NORMALIZAÇÃO

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

Referências bibliográficas: 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 Júlia 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 abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	13
3	MÉTODOS	15
3.1	LDE-paclitaxel	16
3.1.1	Preparação da nanopartícula	16
3.1.2	Separação das partículas	17
3.1.3	Análise do diâmetro e polidispersidade	20
3.1.4	Eficiência de incorporação do fármaco	20
3.2	ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	21
3.2.1	Cultura celular	21
3.2.2	Citotoxicidade	21

3.2.3	Captação celular.....	23
3.2.4	Detecção da apoptose / necrose	24
3.3	PROTOCOLO EXPERIMENTAL EM COELHOS.....	26
3.3.1	Animais	26
3.3.2	Preparo da dieta rica em colesterol	27
3.3.3	Protocolo de indução e tratamento das lesões ateroscleróticas	27
3.3.4	Análises laboratoriais	29
3.3.5	Análise macroscópica das lesões ateroscleróticas	30
3.3.6	Análise morfométrica de cortes histológicos de arco aórtico ..	30
3.3.7	Imunohistoquímica	31
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
4	RESULTADOS.....	34
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA LDE-PACLITAXEL.....	35
4.2	ENSAIOS <i>IN VITRO</i>.....	37
4.2.1	Citotoxicidade	37
4.2.3	Captação celular	38
4.2.3.1	Captação da LDE original, LDE grande e LDE pequena	39
4.2.3.2	Captação da LDE-paclitaxel original, LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena	41
4.2.4	Detecção de apoptose e necrose celular	44
4.2.4.1	Detecção de apoptose e necrose da LDE original, LDE grande e LDE pequena	45

4.2.4.2	Detecção de apoptose e necrose da LDE-paclitaxel original, LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena	49
4.3	PROTOCOLO EXPERIMENTAL EM COELHOS	54
4.3.1	Perfil ponderal	54
4.3.2	Análise do Consumo de Ração	55
4.3.3	Perfil lipídico	56
4.3.4	Glicemia e enzimas hepáticas	57
4.3.5	Eritrograma	59
4.3.6	Leucograma	60
4.3.7	Análise macroscópica das lesões ateroscleróticas	62
4.3.8	Análise morfométrica de cortes histológicos de arco aórtico	63
4.3.9	Análise imunohistoquímica	65
4.3.9.1	Quantificação de macrófagos	65
4.3.9.2	Quantificação de células de músculo liso	67
5	DISCUSSÃO	68
6	CONCLUSÕES.....	77
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática da separação das nanopartículas, partindo da LDE-paclitaxel original até a formação de duas faixas de tamanho distintas, LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena	19
Figura 2	Representação esquemática do protocolo experimental com período de indução da aterosclerose e regime de tratamento dos grupos LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena	28
Figura 3	Gráfico de distribuição de tamanhos pelo método de espalhamento dinâmico de luz a 90°. Em azul LDE-paclitaxel original antes da ultracentrifugação. Em vermelho LDE-paclitaxel grande e em verde LDE-paclitaxel pequena, após ultracentrifugação	36
Figura 4	Viabilidade celular da HUVEC avaliado por ensaio de MTT após 24 horas de incubação com concentrações crescentes de LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena	38
Figura 5	Percentagem de células positivas para fluorescência das nanopartículas marcadas com FITC, incubadas por 4 horas com LDE original, grande e pequena	39
Figura 6	Percentagem de células positivas para fluorescência das nanopartículas marcadas com FITC, incubadas por 24 horas com LDE original, grande e pequena	41

Figura 7	Percentagem de células positivas pela fluorescência das nanopartículas marcadas com FITC, incubadas por 4 horas, com LDE-paclitaxel original, grande e pequena.....	42
Figura 8	Percentagem de células positivas pela fluorescência das nanopartículas marcadas com FITC, incubadas por 24 horas, com LDE-paclitaxel original, grande e pequena.....	44
Figura 9	Percentagem de células viáveis, incubadas por 4 horas com LDE original, grande e pequena e controle.....	45
Figura 10	Estudo do tipo de morte celular. A: Percentagem de células marcadas para apoptose, incubadas por 4 horas com LDE original, grande e pequena e controle.B: Percentagem de células marcadas para necrose, incubadas por 4 horas com LDE original, grande e pequena e controle	46
Figura 11	Percentagem de células viáveis, incubadas por 24 horas com LDE original, grande e pequena e controle.....	47
Figura 12	Estudo do tipo de morte celular. A: Percentagem de células marcadas para apoptose, incubadas por 24 horas com LDE original, grande e pequena e controle. B: Percentagem de células marcadas para necrose, incubadas por 24 horas com LDE original, grande e pequena e controle	48
Figura 13	Percentagem de células viáveis, incubadas por 4 horas com LDE-paclitaxel original, grande e pequena e controle	49

Figura 14	Estudo do tipo de morte celular. A: Percentagem de células marcadas para apoptose, incubadas por 4 horas com LDE original, grande e pequena e controle.B: Percentagem de células marcadas para necrose, incubadas por 4 horas com LDE original, grande e pequena e controle.....	50
Figura 15	Percentagem de células viáveis, incubadas por 24 horas com LDE-paclitaxel original, grande e pequena e controle.....	51
Figura 16	Estudo do tipo de morte celular. A: Percentagem de células marcadas para apoptose, incubadas por 4 horas com LDE-paclitaxel original, grande e pequena e controle, *** p<0,001.B: Percentagem de células marcadas para necrose, incubadas por 4 horas com LDE-paclitaxel original, grande e pequena e controle	52
Figura 17	Peso corporal dos grupos LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena	54
Figura 18	Consumo de ração (g) dos grupos LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena.....	55
Figura 19	Imagem representativa das aortas dos grupos LDE-paclitaxel grande (A) e LDE-paclitaxel pequena (B), com os depósitos lipídicos das lesões ateroscleróticas evidenciados por Scarlat R	62
Figura 20	Cortes histológicos de arco aórtico representativos de lesão aterosclerótica nos grupos LDE-paclitaxel grande e pequena. Coloração: hematoxilina-eosina. Aumento 40x	64

Figura 21	Cortes histológicos do arco aórtico representativos dos grupos LDE-paclitaxel grande (A) e LDE-paclitaxel pequena (B). Coloração por Tricrômio de Masson, para evidenciar colágeno (em azul) da região íntima. Aumento 100x	65
Figura 22	Imuno-marcação para macrófagos (RAM-11) em cortes histológicos de arco aórtico dos grupos LDE-paclitaxel grande (A) e LDE-paclitaxel pequena (B). Aumento de 100X	66
Figura 23	Imuno-marcação para alfa-actina no arco aórtico dos grupos LDE-paclitaxel grande (A) e LDE-paclitaxel pequena (B) Aumento de 100X	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Diâmetro médio, índice de polidispersividade, pH e concentração de paclitaxel de LDE-paclitaxel original, grande e pequena	36
Tabela 2	Perfil lipídico dos coelhos dos grupos LDE-paclitaxel, dosagem basal, pré-tratamento e eutanásia	57
Tabela 3	Glicemia e enzimas hepáticas alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST) e fosfatase alcalina dos grupos LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena	58
Tabela 4	Eritrograma dos grupos LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena	60
Tabela 5	Leucograma dos grupos LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena	61
Tabela 6	Medidas macroscópicas da aorta dos grupos LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena	63
Tabela 7	Análise morfometria das aortas dos grupos LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena	64
Tabela 8	Análise morfométrica da camada íntima de aortas dos grupos LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena	65
Tabela 9	Análise da imuno-marcação de macrófagos na camada íntima do arco aórtico dos grupos LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena	66

Tabela 10	Análise da imuno-marcação de alfa-actina na camada íntima do arco aórtico dos grupos LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena	67
-----------	---	----

RESUMO

Freitas SCMP. *Veiculação do quimioterápico paclitaxel em nanoemulsões lipídicas no tratamento da aterosclerose experimental : importância do tamanho das partículas da nanoemulsão [Tese]. São Paulo: Faculdade Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.*

INTRODUÇÃO: Sistemas nanométricos carreadores de fármacos, ao alcançarem a circulação sanguínea, se concentram em seus sítios de ação (“*drug-targeting*”), evitando tecidos saudáveis. O diâmetro médio e a polidispersidade de nanopartículas são parâmetros relevantes, pois podem influenciar no percurso pelo fluxo sanguíneo da partícula e na interação celular. A LDE, uma nanopartícula lipídica que mimetiza a lipoproteína de baixa densidade (LDL), é capaz de carrear fármacos como o quimioterápico paclitaxel para tecidos com alta taxa de proliferação celular, como por exemplo, lesões ateroscleróticas e tecidos neoplásicos. Assim, é relevante investigar a influência de diferentes tamanhos da LDE na captação celular e na eficácia terapêutica em aterosclerose experimental. **OBJETIVO:** Avaliar a influência de duas faixas de tamanhos da nanopartícula lipídica carreadora do quimioterápico paclitaxel (LDE-paclitaxel), na captação celular e na resposta terapêutica do tratamento da aterosclerose em coelhos submetidos à dieta rica em colesterol. **MÉTODOS:** A associação LDE-paclitaxel foi preparada por emulsificação por alta pressão. A separação da LDE-paclitaxel original em LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena foi feita por ultracentrifugação por gradientes de densidade. Nos estudos com células endoteliais HUVEC foram avaliados citotoxicidade, internalização celular e detecção de apoptose/necrose. Para estudo em animal, foram utilizados coelhos *New Zealand* machos, com aterosclerose induzida por dieta, divididos em dois grupos: LDE-paclitaxel-grande (n=9) e LDE-paclitaxel-pequena (n=10). O tratamento com LDE-paclitaxel foi iniciado após 4 semanas da dieta. Aortas dos coelhos foram coletadas para análise macro e microscópica das lesões ateroscleróticas. **RESULTADOS:** A LDE-paclitaxel original foi caracterizada com diâmetro médio de 75nm; após a ultracentrifugação, a LDE-paclitaxel grande apresentou diâmetro médio de 83nm e a LDE-paclitaxel pequena de 40nm. Os ensaios de citotoxicidade mostraram que, após incubação por 24

horas, a LDE-paclitaxel pequena alcançou o IC50 com menor concentração que a LDE-paclitaxel grande. No ensaio de internalização, a LDE-paclitaxel pequena foi internalizada em menores concentrações e em menor tempo em comparação com as partículas da LDE-paclitaxel original ou LDE-paclitaxel grande. Nos ensaios para detecção de apoptose/necrose, LDE-paclitaxel, independentemente do tamanho, aumentou a porcentagem de células necróticas. A LDE-paclitaxel pequena também aumentou a porcentagem de células apoptóticas, em comparação às outras partículas. No estudo *in vivo*, não houve diferença entre os tratamentos LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena: a razão área de lesão/área total foi igual entre os grupos, assim como a quantificação de macrófagos e de células de músculo liso na íntima das aortas. **CONCLUSÃO:** O tamanho da LDE, apesar de ser um relevante parâmetro físico-químico, não influenciou no efeito anti-aterosclerótico da associação LDE-paclitaxel. Portanto, em relação ao tamanho das partículas, a LDE-paclitaxel original, que possui ambas as populações, é eficiente no tratamento da aterosclerose experimental induzida por dieta rica em colesterol.

Descritores: Nanopartículas; Lipídeos; Paclitaxel; Aterosclerose; Citotoxicidade; Portadores de Fármacos; Sistemas de Liberação de Medicamentos; Emulsões.

ABSTRACT

Freitas SCMP. Paclitaxel chemotherapy using lipid nanoemulsions as carriers in the treatment of experimental atherosclerosis: importance of the particle size of the nanoparticles [Thesis]. São Paulo: "Faculdade Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

INTRODUCTION: As nanometric drug carriers enter the blood circulation, they concentrate on their action sites, avoiding healthy tissue. The average diameter and polydispersity of nanoparticles are relevant parameters because they have influence on the particles course through the blood flow and on cell interaction. LDE, a lipid nanoparticle that mimics low-density lipoprotein (LDL), is capable of carrying chemotherapeutic drugs such as paclitaxel, for tissues with a high rate of cell proliferation, such as atherosclerotic lesions. Thus, it is important to investigate the influence of different sizes in the cellular uptake of LDE and therapeutic efficacy in experimental atherosclerosis. **OBJECTIVE:** To evaluate the influence of two size ranges of the lipid nanoparticle carrier of the chemotherapeutic drug paclitaxel (LDE-paclitaxel) in cellular uptake and therapeutic response in experimental atherosclerosis. **METHODS:** LDE-paclitaxel was prepared by emulsification by high energy. The separation of original-LDE-paclitaxel in large-LDE-paclitaxel particles and small-LDE-paclitaxel particles was performed by ultracentrifugation by density gradients. In studies with HUVEC endothelial cells, cytotoxicity, cell internalization and detection of apoptosis/necrosis were assessed. In *in vivo* study, New Zealand male rabbits, with atherosclerosis induced by cholesterol-rich diet, were divided into two groups: large-LDE-paclitaxel (n=9) and small-LDE-paclitaxel (n=10). Treatment with LDE-paclitaxel started after 4 weeks of diet. Aortas of the rabbits were collected for macroscopic and microscopic analysis of atherosclerotic lesions. **RESULTS:** The original-LDE-paclitaxel was characterized with an average diameter of 75nm. After ultracentrifugation, the large-LDE-paclitaxel showed average diameter of 83nm and small-LDE-paclitaxel 40nm. The

cytotoxicity assay showed that, after incubation for 24 hours, small-LDE paclitaxel reached the IC50 in lower concentration than large-LDE paclitaxel. In internalization assays, small-LDE-paclitaxel was internalized in lower concentrations and shorter time as compared with the original and large particles. LDE-paclitaxel, independently of particle size, increased the percentage of necrotic cells. Small-LDE-paclitaxel was also able to increase the percentage of apoptotic cells as compared with the original and large particles. In experimental study, there was no difference between large-LDE-paclitaxel and small-LDE-paclitaxel treatment: lesion area / total area ratio was similar between groups as well as the quantification of macrophages and smooth muscle cells of the intima of aortas. CONCLUSION: The size of the LDE, although an important physicochemical parameter, did not influence the anti-atherosclerotic effect of LDE-paclitaxel. Therefore, with respect to particle size, the original-LDE-paclitaxel that has both populations is efficient to treat experimental atherosclerosis induced by a cholesterol-rich diet.

Descriptors: Nanoparticles; Lipids; Paclitaxel; Atherosclerosis; Cytotoxicity; Drug Carriers; Drug Delivery Systems; Emulsions.

1. INTRODUÇÃO

1.INTRODUÇÃO

O objetivo principal da Nanomedicina é desenvolver sistemas carreadores de agentes terapêuticos que, ao alcançarem a circulação sistêmica, sejam concentrados em seus sítios de ação (*“drug-targeting”*), evitando que alcancem tecidos saudáveis (Matuszak *et al.*, 2016). Neste sentido a seletividade de interação do sistema carreador com o alvo terapêutico é uma estratégia muito vantajosa em relação à terapia convencional (Feng e Mumper, 2013; Talevi *et al.*, 2014).

Nanopartículas são definidas pelo *International Organization for Standardization* (IOS) como material que possui dimensão em nanoescala entre 1 e 100 nm e podem ser produzidas a partir de materiais orgânicos, como os lípides, ou materiais inorgânicos, como os óxidos de ferro ou de ouro, ou ainda serem constituídos pela combinação destes (Lobatto *et al.*, 2011; Boverhof *et al.*, 2015; Matuszak *et al.*, 2016).

Sistemas nanoparticulados podem ser desenvolvidos utilizando duas estratégias: a modificação física, relacionada com o processo de produção das partículas e a modificação química, relacionada com a capacidade de reconhecimento da partícula pelas células. As modificações físicas incluem o tamanho ou a forma, que influenciam na concentração da partícula no sítio de

INTRODUÇÃO

ação, assim como na interação, adesão e captação celular. As modificações químicas dizem respeito à composição da partícula ou a elementos anexos à partícula que auxiliam no reconhecimento pela célula alvo, como a conjugação de anticorpos ou ligantes (Morachis *et al.*, 2012).

O tamanho das nanopartículas pode influenciar a sua circulação sanguínea. Partículas muito pequenas podem ser rapidamente eliminadas pela filtração renal, enquanto partículas maiores podem ter seu tempo de meia-vida aumentado, mas com redução na eficiência de captação celular (Jain e Stylianopoulos, 2010).

Estudos em Oncologia mostraram a influência do tamanho demonstrando que partículas pequenas (20 nm ou menores) se difundiram em massas tumorais mais profunda e facilmente que tamanhos maiores (Morachis *et al.*, 2012).

Outro estudo demonstra o sinergismo da combinação de tamanhos de partícula, através da liberação controlada em vários estágios (*Multistage Nanoparticle Systems*). Os pesquisadores exploraram o efeito de tempo de retenção e permeabilidade da matriz extracelular da nanopartícula de gelatina de 100 nm em tecidos tumorais, simultaneamente com a capacidade de difusão na massa tumoral de partículas de carbono de 10 nm (Wong *et al.*, 2011; Morachis *et al.*, 2012).

INTRODUÇÃO

A caracterização de tamanhos de partículas por espalhamento dinâmico de luz a 90° (DLS) é considerada uma técnica rápida, simples e eficiente de análise. Os dados obtidos do diâmetro médio das partículas na população analisada são correlacionados com o índice de polidispersividade, que é considerado um parâmetro de qualidade básico da preparação. O alto índice de polidispersividade indica heterogeneidade do diâmetro das partículas, e índices menores que 0,2 sugerem que a distribuição das partículas se encontra em uma estreita faixa de diâmetros e, portanto, monodispersa (Morachis *et al.*, 2012; Kathe *et al.*, 2014).

A morfologia das nanopartículas também é um relevante parâmetro físico que pode influenciar na interação da partícula com a célula-alvo. Um estudo mostrou que partículas de sílica em forma de bastonetes foram mais captadas por células de melanoma humano que partículas esféricas. Outro estudo com partículas de ouro mostrou que partículas esféricas foram mais captadas por células neoplásicas da linhagem HeLa que outras partículas. (Morachis *et al.*, 2012) Estas características também podem estar relacionadas com toxicidade de partículas de materiais inertes, por exemplo, fibras de dióxido de titânio mostraram toxicidade ao provocar resposta inflamatória em macrófagos alveolares. (Palombo *et al.*, 2014)

A composição da partícula é uma modificação química de fundamental importância, pois está diretamente relacionada com a biocompatibilidade e com

INTRODUÇÃO

a estabilidade com o fármaco carregado, evitando sua eliminação precoce da circulação, ou a toxicidade pela degradação de sua estrutura durante o percurso até o alvo terapêutico. (Feng e Mumper, 2013; Palombo *et al.*, 2014; Sercombe *et al.*, 2015). Neste sentido, nanopartículas lipídicas oferecem inúmeras vantagens em comparação com nanopartículas de materiais inorgânicos, pois são consideradas o modelo menos tóxico dentre as partículas já utilizadas na clínica e seus constituintes lipídicos proporcionam um ambiente adequado para os fármacos hidrofóbicos (Feng e Mumper, 2013; Ruiz *et al.*, 2014). A biocompatibilidade da nanopartícula lipídica pode ocultar sua presença da circulação sanguínea, mascarando sua identificação para as células mononucleares fagocíticas do sistema imunológico e seus componentes lipídicos podem ser reciclados, após a liberação do fármaco no interior da célula, com facilidade (Huang *et al.*, 2015).

Com o propósito de fornecer seus componentes lipídicos para síntese de membrana, as partículas lipídicas são capazes de direcionar fármacos às células presentes em processos de natureza inflamatória e proliferativa, características presentes tanto em neoplasias como na aterosclerose (Libby, 2012; Hanahan, 2014). Estas células geralmente apresentam uma alta expressão dos receptores de LDL (LDLR), necessários para que as células aumentem a captação de colesterol e fosfolípidos para síntese de membranas, requerida pela aceleração na taxa de mitose nos processos de proliferação celular (Ho *et al.*, 1978).

INTRODUÇÃO

Assim, partículas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) podem ser mais facilmente captadas pelas células com superexpressão de LDLR (Vitols *et al.*, 1990; Nakagawa *et al.*, 1995). A utilização de um hemoderivado como carreador de fármaco para células proliferativas seria possível, porém dispendiosa e contraproducente, pelo conjunto de procedimentos necessários para isolar e processar LDL de plasma humano, além da possibilidade de contaminação viral, impossibilitando a aplicação no tratamento clínico (Dorlhac-Llacer *et al.*, 2001).

Estudos do campo da Nanomedicina desenvolvidos no Laboratório de Metabolismo e Lípidos – Instituto do Coração, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo – Maranhão e colaboradores desenvolveram uma nanopartícula lipídica (LDE), que se assemelha em sua composição à LDL natural (Maranhão *et al.*, 1993; Maranhão *et al.*, 1994; Almeida *et al.*, 2010). A LDE é uma nanopartícula lipídica artificial, aniônica, esférica, que possui o diâmetro médio de 60 nm e índice de polidispersidade de 0,145. Consiste em um núcleo formado por ésteres de colesterol com pequena porção de triglicérides, conferindo ambiente favorável para fármacos lipofílicos, envolta por uma monocamada de fosfolípidos e colesterol livre (Pires *et al.*, 2009). Apesar de ser preparada sem a porção proteica, quando injetada na circulação sanguínea, a LDE adquire a apolipoproteína E (apoE), pela colisão com lipoproteínas naturais, e então é reconhecida por LDLR e é captada para o interior da célula através de

INTRODUÇÃO

endocitose mediada por LDLR (Hungria *et al.*, 2004; Maranhão *et al.*, 2008; Pires *et al.*, 2009).

Para estudar a captação da nanopartícula lipídica LDE por tecidos neoplásicos, um estudo realizado com pacientes submetidas à mastectomia demonstrou que a LDE foi 4,5 vezes mais captada por tecido tumoral (Graziani *et al.*, 2002), e em outro estudo posterior, a LDE foi 15 vezes mais captada por tecido tumoral que por tecido adjacente normal (Mendes *et al.*, 2009). Em pacientes submetidas à ooforectomia, a LDE foi 8 vezes mais captada pelo tecido tumoral de ovário, que o contralateral normal (Ades *et al.*, 2001). Em seguida foram realizados estudos para avaliar a capacidade “*drug-targeting*” da LDE, pela associação de agentes antiproliferativos à partícula, como o paclitaxel (Rodrigues *et al.*, 2002).

O paclitaxel é um agente antineoplásico fitogênico, isolado da casca da árvore teixo do Pacífico (*Taxus brevifolia*) (Wani e Horwitz, 2014). Este quimioterápico é um modulador de tubulinas, que estabiliza os microtúbulos na sua forma polimerizada, bloqueando o ciclo celular entre fase pré-mitótica G2 e fase M mitótica, impedindo a divisão celular, e levando-a à morte (Wani e Horwitz, 2014; Churchill *et al.*, 2015). O paclitaxel é indicado para tratamento de neoplasias como de ovário, de mama e Sarcoma de Kaposi (Zhang *et al.*, 2014). Na cardiologia é utilizado no revestimento de *stents* farmacológicos para prevenir a reestenose após angioplastia (Churchill *et al.*, 2015; Ontario, 2015).

INTRODUÇÃO

Ao investigar a toxicidade do quimioterápico paclitaxel associado à nanopartícula LDE, em ratos Wistar, a dose letal 50 da LDE-paclitaxel foi 10 vezes maior que a formulação comercial (Rodrigues *et al.*, 2002). Em estudo com camundongos com melanoma, a concentração de LDE-paclitaxel foi 4 vezes maior no tecido tumoral que no tecido normal adjacente e a toxicidade do fármaco permaneceu baixa em relação à formulação comercial (Rodrigues *et al.*, 2005). Em pacientes com neoplasias ginecológicas (ovários, endométrio e colo do útero), a preparação LDE-paclitaxel foi 3,5 vezes maior nos tecidos com os tumores que nos tecidos normais (Dias *et al.*, 2007).

As associações da nanoemulsão lipídica com outros quimioterápicos como daunorrubicina (Dorlhiac-Llacer *et al.*, 2001; Teixeira *et al.*, 2008; Contente *et al.*, 2014), carmustina (Maranhão *et al.*, 2002; Teixeira *et al.*, 2004) e etoposídeo (Valduga *et al.*, 2003; Azevedo *et al.*, 2005) mostraram importante ação *drug-targeting*, se concentrando nos sítios de proliferação tumoral, e potencializando a ação anti-neoplásica dos quimioterápicos. Em animais com implantação de tumores, houve também uma drástica redução da toxicidade, menor crescimento tumoral e aumento da taxa de sobrevivência (Valduga *et al.*, 2003; Kretzer *et al.*, 2012; Contente *et al.*, 2014).

Muitos dos eventos que acompanham o desenvolvimento de diversas neoplasias também podem ocorrer na doença aterosclerótica, como disfunção endotelial, inflamação, permeabilidade vascular e a presença de componentes

INTRODUÇÃO

pró-inflamatórios associada à alta taxa de mitose da proliferação celular (Maranhão *et al.*, 2008).

A aterosclerose é uma doença vascular, progressiva, multifatorial que acomete principalmente artérias de médio e grande calibres em toda a extensão do sistema circulatório. (Libby, 2012; Pfenniger *et al.*, 2013). É uma patologia resultante de um desequilíbrio no metabolismo lipídico e uma resposta inflamatória mal adaptada com proliferação celular excessiva na região subendotelial (Libby, 2012).

A progressão da aterosclerose resulta na formação de placas de ateroma, que são cronicamente alimentadas pela continuidade do processo de lesão endotelial, infiltração de partículas lipídicas e de monócitos da circulação (Libby, 2012). A infiltração, retenção e modificação oxidativa da LDL na região íntima arterial também ativa células vasculares, que produzem fatores inflamatórios e moléculas de adesão. Esta intensa atividade celular provoca a liberação de citocinas e o recrutamento monócitos circulantes, exacerbando a inflamação local (Lahoute *et al.*, 2011; Matoba e Egashira, 2014). As complicações inerentes podem suscitar eventos trombóticos ou complicações severas, como infarto do miocárdio (Gimbrone e García-Cardena, 2016).

Atualmente, não existem fármacos específicos para o tratamento clínico da aterosclerose assintomática. A tentativa de conter a progressão da doença está relacionada ao controle dos fatores de risco mais evidentes, como o uso

INTRODUÇÃO

de hipolipemiantes, como estatinas e fibratos, antiagregantes plaquetários e drogas anti-hipertensivas (Bulgarelli *et al.*, 2013). A estratégia de interferir nos processos patológicos de proliferação vascular levou a estudos com agentes antiproliferativos na prevenção e tratamento de doenças vasculares proliferativas. No entanto, estes agentes têm toxicidade muito alta, intolerável em esquemas para tratamento de doenças cardiovasculares (Dzau *et al.*, 2002).

A associação de quimioterápicos à LDE foi empregada com sucesso em protocolos de tratamento experimental da aterosclerose (Maranhão *et al.*, 2008). O paclitaxel, que na Cardiologia já revestia *stents* farmacológicos, foi o primeiro fármaco associado à LDE para o tratamento da aterosclerose experimental em coelhos, induzida por dieta enriquecida com 1% de colesterol (Maranhão *et al.*, 2008). Neste estudo, foi demonstrado que a LDE foi captada 2 vezes mais pelo arco aórtico dos coelhos com aterosclerose do que nos animais sem a doença. A LDE-paclitaxel também reduziu as lesões ateroscleróticas dos coelhos tratados em 60%, inibiu a proliferação de células de músculo liso em 8 vezes e a infiltração de macrófagos na área de lesão aterosclerótica em 7 vezes, em comparação com os coelhos que receberam solução salina. Além disso, não houve toxicidade referente ao quimioterápico utilizado no protocolo (Maranhão *et al.*, 2008).

INTRODUÇÃO

A nanopartícula LDE também foi utilizada para carrear outros quimioterápicos no tratamento da aterosclerose experimental. No tratamento de coelhos com aterosclerose com a preparação LDE-etoposídeo, houve redução de 85% na área de lesão e 50% na área íntima da aorta, em comparação com controle não tratado (Tavares *et al.*, 2011). O tratamento com a associação da nanopartícula ao metotrexato reduziu áreas de lesões ateroscleróticas em 65%, reduziu a infiltração de macrófagos em 67%, células apoptóticas em 88% e citocinas inflamatórias nas áreas de lesão em comparação a coelhos que receberam apenas LDE (Bulgarelli *et al.*, 2013).

Com o intuito de amplificar o efeito antiaterosclerótico destes fármacos associados à nanopartícula, foi investigado o uso de dois quimioterápicos concomitantemente, no tratamento da aterosclerose experimental. A combinação dos tratamentos LDE-etoposídeo e LDE-metotrexato foi utilizada no tratamento experimental da aterosclerose, com redução da área de lesão em 95% e a área da íntima foi reduzida em 5 vezes em relação aos coelhos que receberam apenas a nanopartícula LDE. No esquema terapêutico combinado, também não houve toxicidade hematológica nos animais (Leite *et al.*, 2015).

Outro desdobramento das linhas de pesquisa em tratamento quimioterápico veiculado pela nanopartícula lipídica em Cardiologia levou à proposta de uma nova abordagem terapêutica no pós-transplante cardíaco em

INTRODUÇÃO

coelhos. Neste estudo, a LDE foi 4 vezes mais captada pelo órgão enxertado que o nativo (Lourenço-Filho *et al.*, 2011). Nos coelhos tratados com a partícula LDE-paclitaxel, a área do lúmen arterial foi 3 vezes maior, a estenose foi reduzida em 50%, a destruição da camada média arterial foi inibida e a infiltração de macrófagos no miocárdio reduzida em 7 vezes, em comparação com os coelhos que não foram tratados com a preparação. Além disso, não foi observada toxicidade nos coelhos que receberam a nanopartícula LDE-paclitaxel (Lourenço-Filho *et al.*, 2011).

O conjunto destes resultados mostra que o uso da nanopartícula lipídica LDE com associação de quimioterápicos permite a introdução dos potentes quimioterápicos de ação antiproliferativa usados no tratamento das neoplasias malignas no arsenal terapêutico da Cardiologia. Isto é possível pela redução drástica da toxicidade desses quimioterápicos, que permite seu uso também em pacientes com doença cardiovascular. Neste contexto, é importante otimizar a eficiência do sistema LDE como carreador de quimioterápicos como o paclitaxel e outros que testamos até o momento e que mostraram excelente ação de redução das lesões ateroscleróticas em coelho. Uma questão importante consiste em saber se o tamanho das partículas da LDE pode influenciar a ação farmacológica, anti-aterosclerótica, e a toxicidade dos agentes quimioterápicos associados às nanopartículas.

2. OBJETIVOS

2.OBJETIVOS

- Investigar se o tamanho das nanopartículas da LDE associadas ao quimioterápico paclitaxel influencia o efeito antiaterosclerótico do paclitaxel.

- Investigar se o tamanho das nanopartículas influencia a toxicidade hematológica e hepática do paclitaxel associado à LDE.

- Investigar se o tamanho das nanopartículas da LDE associadas ou não ao quimioterápico paclitaxel influencia a captação das nanopartículas por células endoteliais (HUVEC) em cultivo.

3. MÉTODOS

3. MÉTODOS

3.1 LDE-PACLITAXEL

3.1.1 Preparação da LDE

A LDE-paclitaxel foi preparada conforme descrito anteriormente por Rodrigues *et al.* (2005), Maranhão *et al.*, (2008) e Contente *et al.* (2014).

A mistura de compostos lipídicos foi constituída por 135 mg de oleato de colesterol (Alfa Aesar, MA, EUA), 333 mg de fosfatidilcolina de ovo (Lipoid, Ludwigshafen, Alemanha), 132 mg de miglyol 812N (Sasol Germany GmbH, Hamburg, Alemanha), 6 mg de colesterol (Fabrichem, Trumbull, Ct, EUA) e 60 mg de oleato de paclitaxel (Pharmaceuticals Co., Shangai, China). A fase aquosa foi composta por 100 mg de polissorbato 80 (Merck, Darmstadt, Alemanha) e 10 ml de tampão Tris-HCl, pH 8,05. A emulsificação foi realizada por homogeneização sob alta pressão utilizando o Emulsiflex C5 (Avestin, Ottawa, Canadá).

A LDE foi esterilizada em filtro de policarbonato 0,22 µm (Merck Millipore Corporation, CA, EUA) e armazenada a 4° C.

3.1.2 Separação das partículas

A LDE-paclitaxel produzida possui partículas lipídicas polidispersas. Para que fosse possível realizar a seleção dos diferentes diâmetros das partículas, foi utilizada uma técnica baseada em separação de lipoproteínas por gradiente de densidade (Redgrave *et al.*, 1975).

Para aferir a densidade de todas as soluções, antes e após os ajustes com o sal brometo de potássio (KBr), foi utilizado um densitômetro digital (DA – 100M *Density Meter*, Mettler Toledo *International Inc.*, OH, EUA).

A densidade da nanopartícula foi ajustada para 1,21 g/mL com KBr. Dessa solução, foram adicionados 6 mL em tubos de 12,5 cm para ultracentrifugação (Polyallomer Centrifuge Tubes, Beckman, CA, EUA).

Para formar o primeiro gradiente, a cada um destes tubos foram acrescentados, lentamente, 2 mL de TRIS-HCl 0,001 M com densidade 1,045 g/mL. Acima desta solução, foram acrescentados 2mL de TRIS-HCl 0,001 M de densidade 1,020 g/mL, para formar o segundo gradiente.

Os tubos contendo as preparações foram ultracentrifugadas (Ultracentrifuge Optima XL 100K, rotor swing SW 41 Ti, Beckman, CA, EUA) a 38000 rpm, por 20 horas, a 4°C.

MÉTODOS

Ao final do processo de ultracentrifugação, houve formação de quatro frações separadas por gradiente de densidade. Na fração superior (densidade 1,020 mg/mL) estavam concentradas as partículas de diâmetro médio entre 70 a 90 nm, enquanto na terceira fração (densidade 1,045) estavam concentradas as partículas de 30 a 50 nm de diâmetro médio, conforme Figura 1.

Em seguida, cada fração foi aspirada e acondicionada em membranas de diálise por 24 horas em 2L de solução de TRIS-HCl 0,001 M para a retirada do KBr. Após diálise, as frações foram aspiradas e esterilizadas por filtro de policarbonato com 0,22 µm de porosidade.

A fração superior foi chamada de LDE-paclitaxel grande, com diâmetro de 70 a 90 nm, e a fração inferior de LDE-paclitaxel pequena, com diâmetro de 30 a 50 nm. Essas duas frações foram usadas nos experimentos *in vitro* e *in vivo*, descritos a seguir.

MÉTODOS

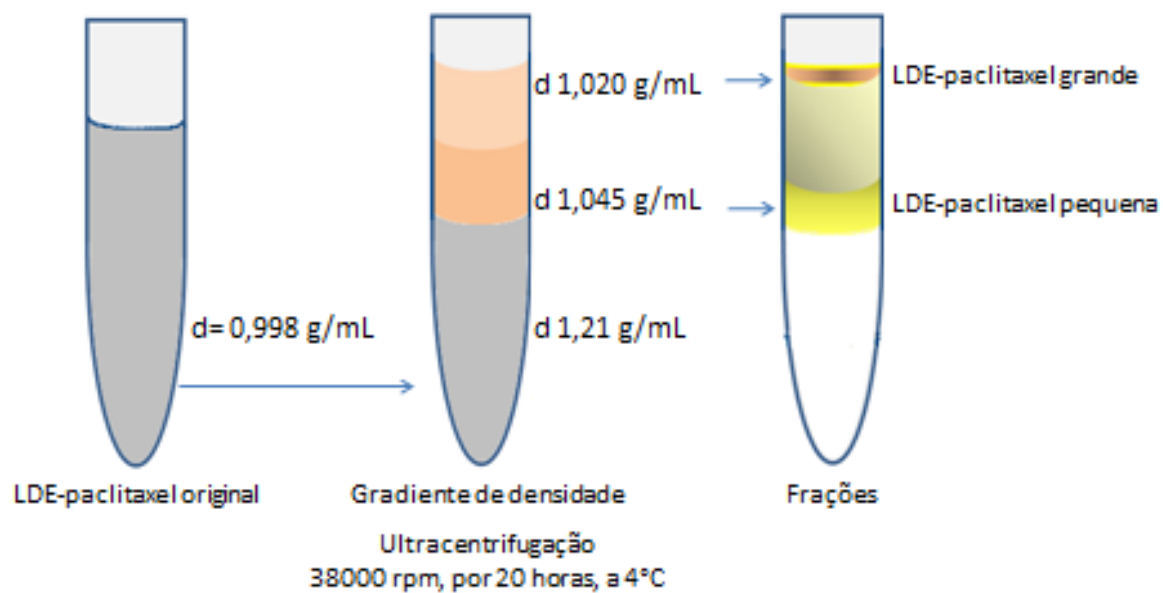


Figura 1 – Representação esquemática da separação das nanopartículas, partindo da LDE-paclitaxel original até a formação de duas faixas de tamanho distintas, LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena

3.1.3 Análise do diâmetro e polidispersidade

O diâmetro médio e o índice de polidispersividade das duas frações foram determinados pelo método de espalhamento dinâmico de luz em ângulo de 90°, utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, UK).

Em fluxo laminar de ar unidirecional foram diluídos 100 µL da amostra de cada fração em 1 mL de tampão TRIS-HCl 0,1 M, e colocadas em cubetas de poliacrilamida para a leitura do diâmetro das partículas. O resultado foi expresso pela média de 10 leituras do equipamento em nanômetros.

3.1.4 Eficiência de incorporação do fármaco

A incorporação do oleato de paclitaxel às nanopartículas original, grande e pequena, foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Shimadzu, Columbia, EUA), método previamente desenvolvido em modo isocrático, fase móvel 100% metanol e detector de UV-visível (234 nm). A concentração final de oleato de paclitaxel incorporado à LDE foi calculada usando curva de calibração (1 µg/ml a 1 mg/ml).

3.2 ENSAIOS *IN VITRO*

3.2.1 Cultura celular

As células endoteliais (linhagem HUVEC, *human umbilical vein endothelial cells* - ATCC® CRL-1730™) foram mantidas em meio de cultura DMEM-LOW, com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Ind. Brasileira) e 0,1% de penicilina/estreptomicina, em estufa a 37°C, 5% de CO₂, em garrafas de 75 cm² (Corning Inc., EUA) e a manutenção realizada a cada dois ou três dias.

3.2.2 Citotoxicidade

Para análise da citotoxicidade, foi empregado o método MTT (Mosmann, 1983). As células foram semeadas a uma densidade de 5x10⁵ células/mL em microplacas de 96 poços (Corning Inc., EUA) e incubadas por 24 horas para adesão aos poços.

Após este período, foram incubadas por 24 horas com as duas preparações de LDE-paclitaxel, conforme as concentrações descritas abaixo:

- LDE-paclitaxel grande: 0,25, 0,50, 0,75, 1,0, 1,25, 1,50, 1,75 e 2,0 µM.
- LDE-paclitaxel pequena: 0,25, 0,50, 0,75, 1,0, 1,25, 1,50, 1,75 e 2,0 µM.

MÉTODOS

Após a incubação foram adicionados 22 μ L de MTT (5 mg/mL) a cada poço. Após 4 horas, o sobrenadante foi totalmente removido e 100 μ L de DMSO foram adicionados. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de ELISA (Victor X3 Perkin Elmer, MA, EUA) em absorbância de 570 nm. Os dados obtidos de absorbância foram convertidos em percentagem de viabilidade celular, tendo como referência um controle não tratado, considerado 100% de viabilidade celular. Os resultados foram expressos em média da percentagem de sobrevivência celular em função da concentração de LDE-paclitaxel grande e pequena. O IC₅₀ é relativo à morte de 50% das células.

3.2.3 Captação celular

Os ensaios de captação celular foram realizados em triplicatas independentes, avaliada por microscopia automatizada pela plataforma de *High Content Screening*.

As células foram semeadas a uma densidade de 1×10^4 céls/mL e incubadas 24 horas em placa de 96 poços (3603 - Corning, MA, EUA).

Um miligrama de isotiocianato de fluoresceína isômero I (FITC, Sigma-Aldrich, MO, EUA) foi adicionado à preparação de 50mL de LDE e 50 mL de LDE-Paclitaxel. Após este período, foram incubadas por 4 e por 24 horas com as preparações de LDE e de LDE-paclitaxel, conforme descritas a seguir:

- LDE original: 10µL, 20µL, 30µL, 40µL e 50µL
- LDE grande: 10µL, 20µL, 30µL, 40µL e 50µL
- LDE pequena: 10µL, 20µL, 30µL, 40µL e 50µL
- LDE-paclitaxel original: 0,25, 0,50, 0,75, 1,0 µM.
- LDE-paclitaxel grande: 0,25, 0,50, 0,75, 1,0 µM.
- LDE-paclitaxel pequena: 0,25, 0,50, 0,75, 1,0 µM.

Após a incubação, as placas foram lavadas com 200 µL de DPBS duas vezes, coradas com *Hoechst 33342* (0,1µg/mL), para marcação do núcleo. As células foram analisadas em *Image X Press Micro High Content* (Molecular Devices, CA, EUA).

MÉTODOS

Imagens de nove sítios por poço foram adquiridas para posterior análise e foram avaliados três poços por tratamento. O software *Multi Score Meta Express* foi utilizado para analisar a captação da LDE.

3.2.4 Detecção da apoptose / necrose

As células endoteliais HUVEC foram semeadas em placas de 96 poços (3603- Corning, MA, EUA) em triplicata. Após atingirem a confluência de 80%, as células, foram incubadas por 4 e por 24 horas com as preparações de LDE e de LDE-paclitaxel, conforme descritas a seguir:

- LDE original: 10 μ L, 20 μ L, 30 μ L, 40 μ L e 50 μ L
- LDE grande: 10 μ L, 20 μ L, 30 μ L, 40 μ L e 50 μ L
- LDE pequena: 10 μ L, 20 μ L, 30 μ L, 40 μ L e 50 μ L
- LDE-paclitaxel original: 0,25, 0,50, 0,75, 1,0 μ M.
- LDE-paclitaxel grande: 0,25, 0,50, 0,75, 1,0 μ M.
- LDE-paclitaxel pequena: 0,25, 0,50, 0,75, 1,0 μ M.

O Kit I *Apoptosis Detection A* Anexina V FITC (556420-BD Biosciences, NJ, EUA) foi utilizado para determinar o percentual de células apoptóticas, como descrito pelo fabricante.

MÉTODOS

As células foram incubadas com 0,2 uL de FITC anexina V e 0,5 uL PI (iodeto de propídio) e incubadas durante 10 minutos à temperatura ambiente no escuro.

Os núcleos foram corados com 0,1 µg/mL *Hoechst* 33342. A presença de apoptose foi analisada dentro de 1 h usando ImageXpress.

Nove sítios de cada poço e três poços foram adquiridos. O percentual de apoptose foi determinado pela aplicação do software MetaXpress Cell Health. Células coradas somente com *Hoechst* 33342 foram consideradas vivas. O processo apoptótico foi definido pela presença de anexina V com *Hoechst* 33342 ou com anexina V/PI com *Hoechst* 33342. Células marcadas com PI e com *Hoechst* 33342 foram consideradas células necróticas.

3.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL EM COELHOS

3.3.1 Animais

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq), da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob protocolo número 2939/07/014, e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob número 050/14.

Foram utilizados coelhos machos da raça Nova Zelândia brancos com peso entre 3,0 a 3,5 kg. Os animais foram mantidos em temperatura controlada e em ciclos de claro/escuro de 12 horas no Biotério da Divisão Experimental do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. A água foi fornecida à vontade. Para adaptação as condições ambientais do biotério, os coelhos consumiram ração comercial usual, por uma semana (Nuvilab Coelhos – Ind. Brasileira), antes do início do protocolo de indução à aterosclerose.

3.3.2 Preparo da dieta rica em colesterol

Foi preparada uma dieta enriquecida com 1% de colesterol. O colesterol foi dissolvido adicionando-se 200 ml de éter etílico e 100 ml de etanol absoluto a 30 g de colesterol (Fabrichem, Trumbull, Connecticut, EUA), sob agitação. Imediatamente a solução foi misturada a 3 Kg de ração comercial usual (Nuvilab Coelhos – Ind. Brasileira) por pelo menos 5 minutos.

Após 24 horas em câmara de fluxo laminar unidirecional vertical para total evaporação dos solventes, a ração enriquecida de colesterol foi armazenada em sacos plásticos lacrados a -20°C até o uso.

3.3.3 Indução e tratamento das lesões ateroscleróticas

Para avaliar a eficácia do tratamento com tamanhos diferentes de partícula na aterosclerose, todos os coelhos receberam 150 gramas/dia da ração rica em colesterol. A cada dia, a ração restante foi coletada e pesada, para avaliação da quantidade de ração consumida por dia durante o estudo. A dieta rica em colesterol foi administrada por 8 semanas.

As alterações de peso de cada animal foram verificadas semanalmente.

MÉTODOS

Na quarta semana de dieta enriquecida com colesterol 1%, os coelhos foram divididos em dois grupos para o tratamento:

- Grupo LDE-paclitaxel grande (n=9): os animais receberam injeções endovenosas de LDE-paclitaxel grande (4mg/kg/semana).

- Grupo LDE-paclitaxel pequena (n=10): os animais receberam injeções endovenosas de LDE-paclitaxel pequena (4mg/kg/semana).

As injeções foram administradas uma vez por semana, pelo período de quatro semanas.

Os animais foram submetidos à eutanásia com injeção endovenosa de dose letal de tiopental (Tiopentax, Cristália, Brasil) ao final de oito semanas. O esquema de tratamento dos coelhos está mostrado na Figura 2.

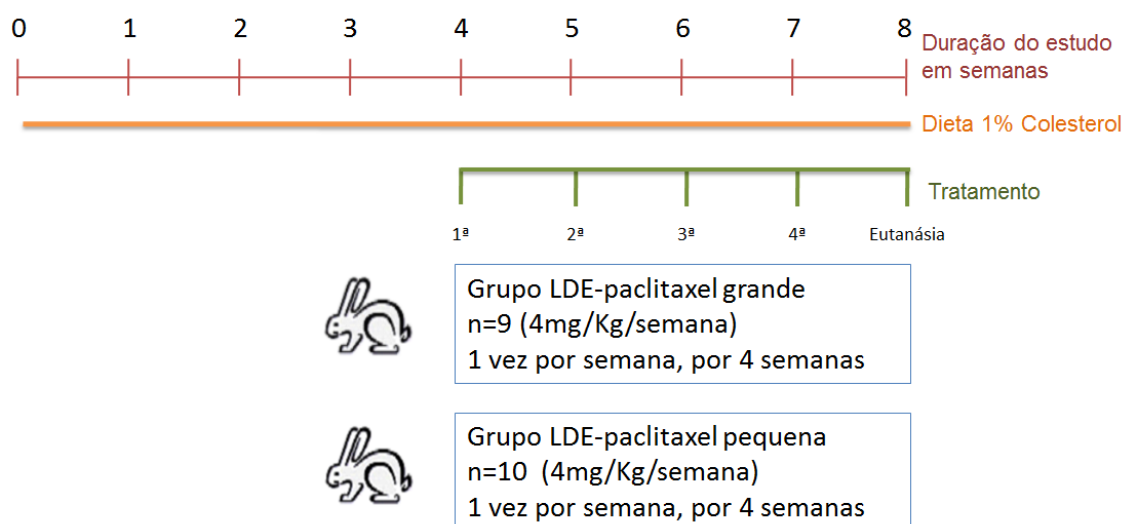


Figura 2 – Representação esquemática do protocolo experimental com período de indução da aterosclerose e regime de tratamento dos grupos LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena

3.3.4 Análises laboratoriais

As amostras de sangue dos coelhos foram coletadas por punção da veia auricular lateral, antes do início da dieta rica em colesterol, antes e após o tratamento com LDE-paclitaxel. As amostras foram coletadas com anticoagulante heparina para análises do perfil bioquímico e com EDTA para o perfil hematológico. As alíquotas foram encaminhadas para o Laboratório de Análises Especiais (LAR), Laboratório de Investigação Médica LIM 03, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo. O hemograma foi realizado em analisador hematológico automatizado veterinário Sysmex PochH 100iv (Roche, Basel, Switzerland). Foi utilizado o método enzimático colorimétrico, em equipamento COBAS 111 (Roche, Basel, Switzerland), para as determinações de colesterol total, HDL (Lipoproteína de alta densidade), triglicérides, glicemia e fosfatase alcalina. As transaminases alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST) foram analisadas por método cinético UV-IFCC (Ultravioleta - *International Federation of Clinical Chemistry*).

3.3.5 Análise macroscópica das lesões ateroscleróticas

Após a eutanásia, a aorta dos coelhos foi coletada, do arco aórtico à aorta abdominal, e então aberta longitudinalmente ao longo da parede posterior e fixada em formalina 10%. Os depósitos lipídicos presentes na aorta foram evidenciados por Scarlat R (SudanIV) (Sigma, Saint Louis, EUA). As aortas foram fotografadas com a utilização do microscópio Eclipse 80i com câmera acoplada DS-Ri1 (Nikon, Tóquio, Japão) e seu tamanho e as lesões foram medidos, pelo programa computacional Leica Microsystems (Leica Cambridge Ltd., Cambridge, UK). A proporção de lesões ateroscleróticas macroscópicas observadas foi calculada (área de lesão/área total).

3.3.6 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 μ 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.

MÉTODOS

Para análises morfológica foram realizadas colorações para hematoxilina/eosina e Tricrômio de Masson e também para imunohistoquímica. 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.

A morfometria foi realizada em 5 campos de cada corte histológico nos cortes histológicos do arco aórtico dos animais, corados com hematoxilina/eosina, com o auxílio de microscópio óptico com software de análise de imagens Leica Microsystems (Leica Cambridge Ltd., Cambridge, UK). Foram quantificadas a área total do arco aórtico, a área total das lesões e a razão entre elas.

Os cortes histológicos do arco aórtico foram corados por Tricrômio de Masson, para evidenciar colágeno na camada íntima. Foram quantificados 5 campos de cada corte histológico, a área total da região íntima do arco aórtico, a área total marcada e a razão entre elas.

3.3.7 Imunohistoquímica

Para realização da imunohistoquímica, as lâminas passaram pelo procedimento de desparafinização, como descrito no item acima, a recuperação antigenica foi realizada por calor úmido e pressão em Câmara de

MÉTODOS

Pressão para recuperação antigênica (Pascal, Dako, Carpinteria, EUA) com o tampão citrato 10 mM, pH 6,0 para o anticorpo anti-macrófago de coelho (clone RAM-11) e com tampão Tris 10 mM/EDTA 1 mM para o anticorpo anti- α actina, para identificação de células de músculo liso.

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 de fosfato (PBS) durante 1 hora em estufa umidificada a 37°C. Os cortes foram incubados com os anticorpos primários anti-macrófagos de coelho (Dako, Carpinteria, EUA) e anti- α actina (Dako, Carpinteria, EUA), nas titulações 1:400, por 18 horas a 4°C. Como anticorpo secundário, foi utilizado o polímero Envision (Dako), e a reação foi revelada com diaminobenzidina (DAB) e contracorada com hematoxilina de Harris.

Para análise quantitativa da expressão proteica dos antígenos RAM-11 e α -actina, foi utilizado microscópio ótico equipado com software de análise de imagens Leica Microsystems. O limiar de detecção de cor foi determinado para cromógeno DAB, baseado em uma região marcada. Imagens de 5 campos de cada corte histológico foram usadas para medir a área total da aorta, área da íntima, área de marcação marrom do cromógeno DAB na 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.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os grupos foram avaliados utilizando o programa GraphPad Prism® 5.0. Os valores estão expressos em média \pm desvio padrão, considerando-se uma significância ao nível de $p < 0,05$. A Análise de Variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey foi utilizado para a análise dos ensaios celulares e com os resultados do estudo em animal, como o consumo de ração, variação de peso dos animais e análises laboratoriais. O teste *t-student* foi utilizado para a análise morfométrica (planimetria macroscópica e planimetria microscópica) e imunohistoquímica (macrófagos e células de músculo liso) dos cortes histológicos do arco aórtico dos animais.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA LDE-PACLITAXEL

Após o preparo, foi obtida uma nanopartícula com diâmetro médio de 75,22 ($\pm 4,94$ nm), índice de polidispersividade de 0,145 ($\pm 0,01$) e o pH de 8,01 ($\pm 0,5$) conforme apresentado na Tabela 1. Após o processo de ultracentrifugação para a separação da LDE-paclitaxel original em dois tamanhos, a LDE-paclitaxel grande apresentou diâmetro médio de partículas de 83,61($\pm 4,54$) nm, índice de polidispersividade de 0,130 ($\pm 0,04$) e pH de 7,94 ($\pm 0,1$). O diâmetro médio da LDE-paclitaxel pequena foi de 40,69 ($\pm 3,53$) nm, índice de polidispersividade de 0,043 ($\pm 0,01$), e pH foi 7,95 ($\pm 0,1$), conforme apresentado na Tabela 1.

A concentração de fármaco foi analisada por HPLC, após cada processo de separação. A média de concentração do fármaco da LDE-paclitaxel original foi de 4,88 mg/mL ($\pm 0,32$), da LDE-paclitaxel grande foi de 7,27 mg/mL ($\pm 2,70$) e da LDE-paclitaxel pequena foi de 5,70 mg/mL ($\pm 0,85$), conforme apresentado na Tabela 1.

RESULTADOS

Tabela 1 – Diâmetro médio, índice de polidispersividade, pH e concentração de paclitaxel de LDE-paclitaxel original, grande e pequena

Nanopartícula	Diâmetro (nm)	Índice de polidispersividade	pH	Concentração de fármaco (mg/mL)
LDE-paclitaxel original	75,22 ± 4,94	0,145± 0,10	8,01±0,05	4,88±0,32
LDE-paclitaxel grande	83,61± 4,54	0,130± 0,04	7,94±0,10	7,27±2,70
LDE-paclitaxel pequena	40,69± 3,53	0,043± 0,01	7,95±0,11	5,70±0,85

Dados expressos em média ± desvio padrão

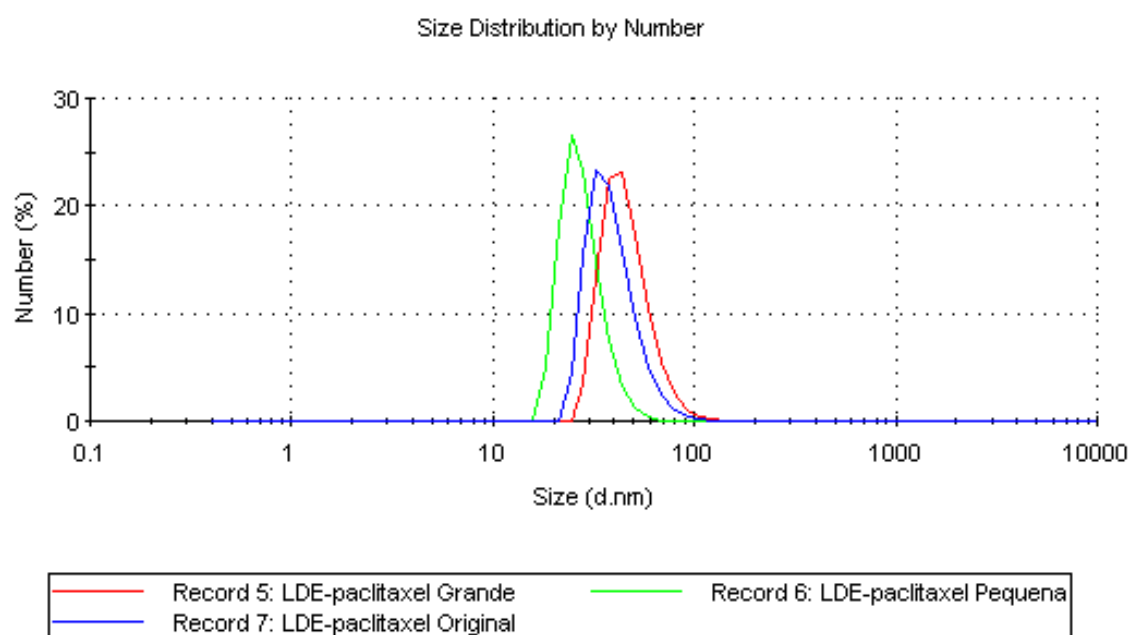


Figura 3 – Gráfico de distribuição de tamanhos pelo método de espalhamento dinâmico de luz a 90°. Em azul LDE-paclitaxel original antes da ultracentrifugação. Em vermelho LDE-paclitaxel grande e em verde LDE-paclitaxel pequena, após ultracentrifugação

4.2 ENSAIOS *IN VITRO*

4.2.1 Citotoxicidade

Durante 24 horas, células endoteliais da linhagem HUVEC foram incubadas com as duas frações da nanopartícula LDE-paclitaxel, em concentrações crescentes de 0,25 a 2,0 μM , como mostrado na Figura 4. A LDE-paclitaxel grande provocou a morte de aproximadamente 22% das células a partir da concentração 0,75 μM .

A maior taxa de morte celular foi de aproximadamente 40% na concentração 1,0 μM ; a partir dessa concentração da nanopartícula esta percentagem permaneceu igual. O IC50 da LDE-paclitaxel grande foi 0,44 μM . A LDE-paclitaxel pequena causou morte celular em 40% a partir da concentração 0,5 μM , e sua maior taxa de morte celular foi de 70% observada na concentração 1,75 μM . O IC50 dessas partículas foi 0,33 μM (Figura 4).

RESULTADOS

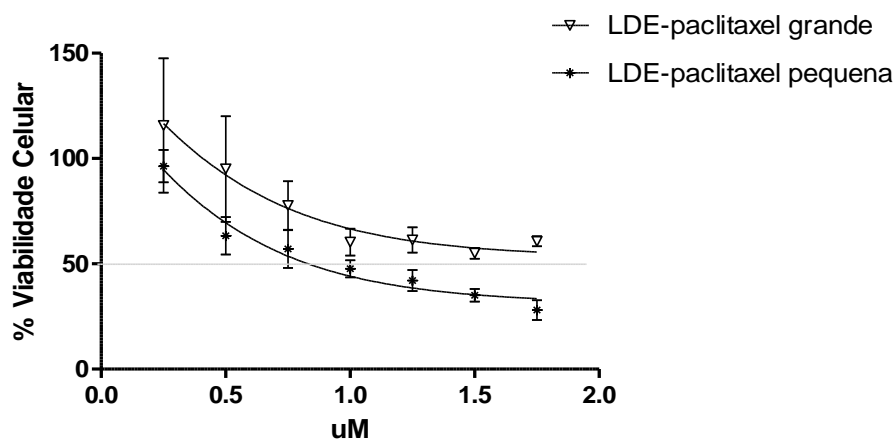


Figura 4 – Viabilidade celular da HUVEC avaliado por ensaio de MTT após 24 horas de incubação com concentrações crescentes de LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena

4.2.3 Captação celular

O ensaio de captação das nanopartículas pelas células endoteliais Huvec foi realizada pela quantificação da fluorescência (FITC) presente na LDE. Foram investigados volumes crescentes de LDE original, grande e pequena e concentrações de e LDE-paclitaxel original, grande e pequena, após 4 e 24 horas de incubação.

4.2.3.1 Captação da LDE original, LDE grande e LDE pequena

A captação das nanopartículas pelas células após 4 horas de incubação com as partículas fluorescentes pode ser observada na Figura 5. No tratamento com 10 μ L foi possível observar que 9,06% das células tratadas com a nanopartícula LDE original apresentaram fluorescência, 3,77% das tratadas

RESULTADOS

com LDE grande e 8,37% com a LDE pequena. Na incubação com 40 μ L da LDE fluorescente as células apresentaram captação em 7,2% quando incubadas com a LDE original, 18,57% com a LDE grande e 20% com a LDE pequena. Não se observou diferença estatística nas partículas e incubações testadas após 4 horas.

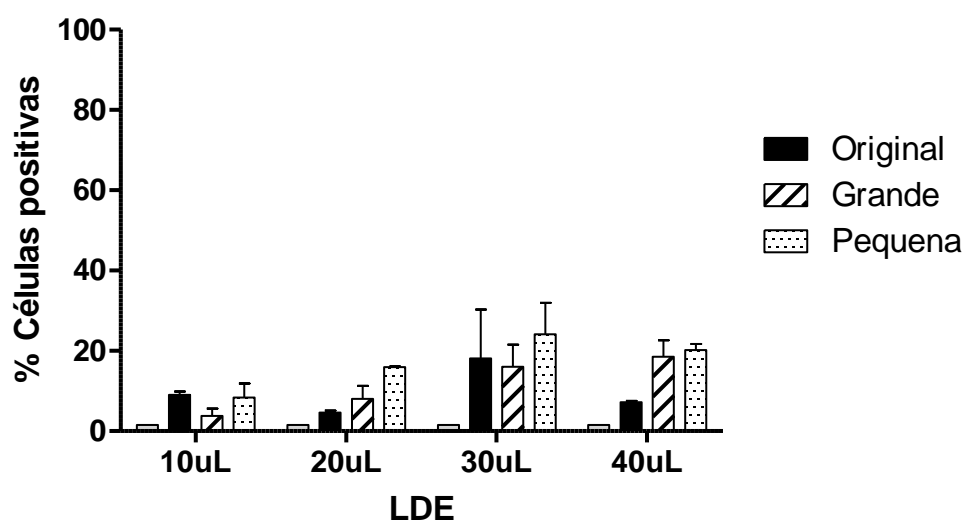


Figura 5 – Percentagem de células positivas para fluorescência das nanopartículas marcadas com FITC, incubadas por 4 horas com LDE original, grande e pequena

RESULTADOS

A Figura 6 representa a percentagem de captação pelas células, após 24 horas de incubação, através da fluorescência emitida pela LDE marcada com FITC.

Na incubação por 24 horas com 10 μ L apenas 7,7% das células captaram a LDE grande, porém 26% das células captaram a LDE original e a pequena ($p < 0,01$). Na incubação com 20 μ L, as células captaram 20% da LDE grande, 30,8% da LDE original e 40% da LDE pequena ($p < 0,001$).

A percentagem de captação do tratamento com 30 μ L das células tratadas com a LDE original foi de 24,4%, da LDE grande foi 13,53% e da nanopartícula LDE pequena foi 70,52%, ($p < 0,001$). Na maior concentração, 50 μ L, a captação da LDE original foi de 75,09%, da LDE grande foi 58,9% e da nanopartícula LDE pequena foi de 77,25%, ($p < 0,001$), conforme apresentado na Figura 6.

RESULTADOS

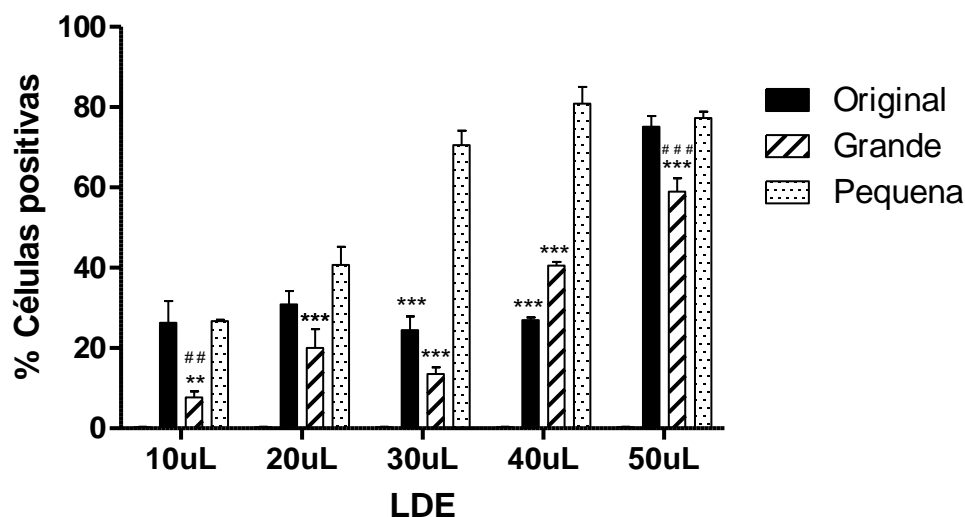


Figura 6 – Percentagem de células positivas para fluorescência das nanopartículas marcadas com FITC, incubadas por 24 horas com LDE original, grande e pequena, # # $p<0,01$, # # # $p<0,001$ vs LDE original e ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ vs pequena

4.2.3.2 Captação da LDE-paclitaxel original, LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena

A avaliação da captação das células endoteliais após 4 horas de incubação com as nanopartículas associadas á paclitaxel está representada na Figura 7. Após 4 horas de incubação com LDE-paclitaxel a percentagem de captação do tratamento com $0,5 \mu\text{M}$ das células tratadas com a LDE original foi de 10%, da LDE grande foi 7,2% e da nanopartícula LDE pequena foi de 31,3%, ($p<0,001$).

RESULTADOS

Na concentração 0,75 μM a LDE-paclitaxel original foi captada por aproximadamente 30% das células, a grande por 10% das células e a pequena por 43,2% das células ($p < 0,01$). Na maior concentração da incubação com LDE-paclitaxel, 1,0 μM , a percentagem de células positivas tratadas com LDE-paclitaxel original foi 37,65%, enquanto a LDE-paclitaxel grande foi 17,20% e a LDE-paclitaxel pequena foi 60,25% ($p < 0,01$).

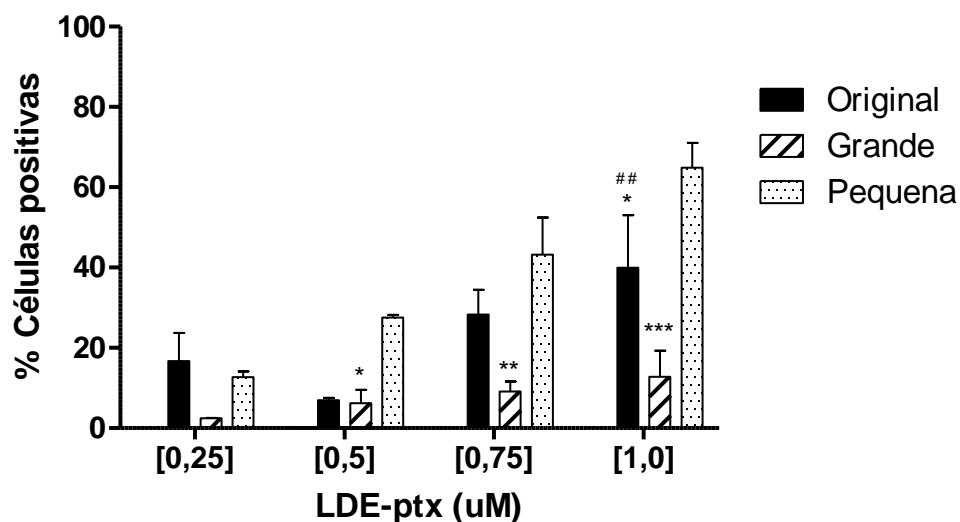


Figura 7 – Percentagem de células positivas pela fluorescência das nanopartículas marcadas com FITC, incubadas por 4 horas, com LDE-paclitaxel original, grande e pequena, # # $p < 0,01$ vs LDE-paclitaxel grande e * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs pequena

O melhor resultado de captação encontrado foi após a incubação por 4 horas com a LDE-paclitaxel pequena. Ela foi captada já na concentração de 0,5 μM com 27,5% das células positivas ($p < 0,001$). Na concentração de 0,75 μM 43,1% das células positivas ($p < 0,001$). A maior positividade foi encontrada na concentração de 1,0 μM com 64,8% das células marcadas ($p < 0,001$).

RESULTADOS

Ao analisar a captação das partículas pela percentagem de células positivas para LDE-paclitaxel em 24 horas, (Figura 8), no tratamento com a concentração 0,5 μM 41,75% das células foram positivas para LDE-paclitaxel original, 30,12% das tratadas com LDE-paclitaxel grande e 51,64% das tratadas com LDE-paclitaxel pequena ($p < 0,01$).

Na incubação por 24 horas com 0,75 μM 71% das células captaram a LDE-paclitaxel original, 48% a LDE-paclitaxel grande e 82% a LDE-paclitaxel pequena ($p < 0,001$).

Na concentração 1,0 μM , 72,7% das células apresentaram positividade para a fluorescência da marcação da LDE-paclitaxel original, 60% da LDE-paclitaxel grande e 90% da LDE-paclitaxel pequena ($p < 0,001$).

RESULTADOS

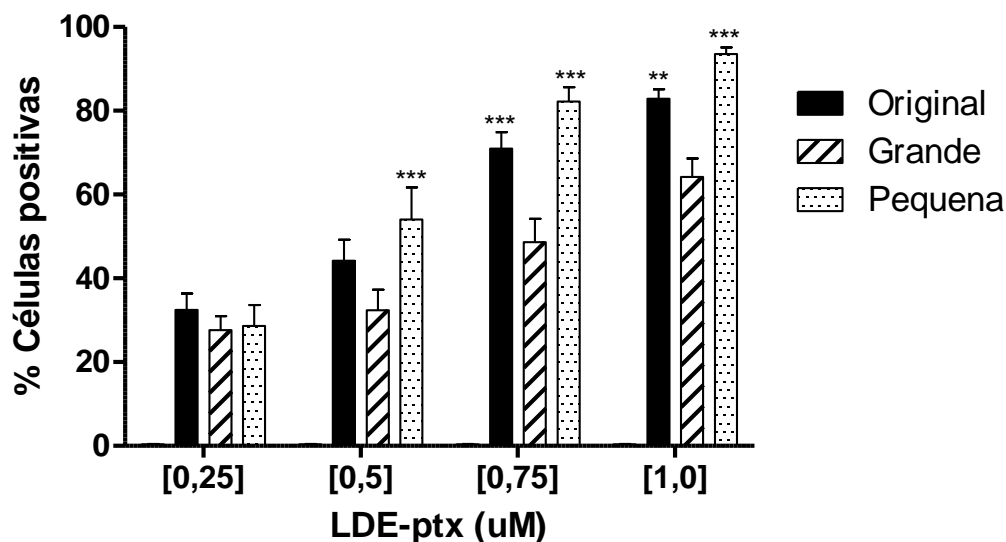


Figura 8 – Percentagem de células positivas pela fluorescência das nanopartículas marcadas com FITC, incubadas por 24 horas, com LDE-paclitaxel original, grande e pequena, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs LDE-paclitaxel grande

Novamente a LDE-paclitaxel pequena foi a nanopartícula que apresentou melhor captação, estando presente em 93,5% das células na maior concentração incubada por 24 horas ($p < 0,001$).

4.2.4 Detecção de apoptose e necrose celular

Foram investigados volumes crescentes de LDE original, grande e pequena e concentrações crescentes de LDE-paclitaxel original, grande e pequena, após 4 e 24 horas de incubação.

RESULTADOS

4.2.4.1 Detecção de apoptose e necrose da LDE original, LDE grande e LDE pequena

Após 4 horas de incubação das células com LDE original, grande e pequena as células foram analisadas para saber a percentagem de viabilidade celular (Figura 9).

Só foi possível observar alteração na viabilidade celular após incubação com 40 μ l da LDE pequena ($p < 0,001$), sendo que a presença de células mortas foi de 12,2%. Nenhum outro volume incubado ou tamanho de partícula foi capaz de alterar a viabilidade celular.

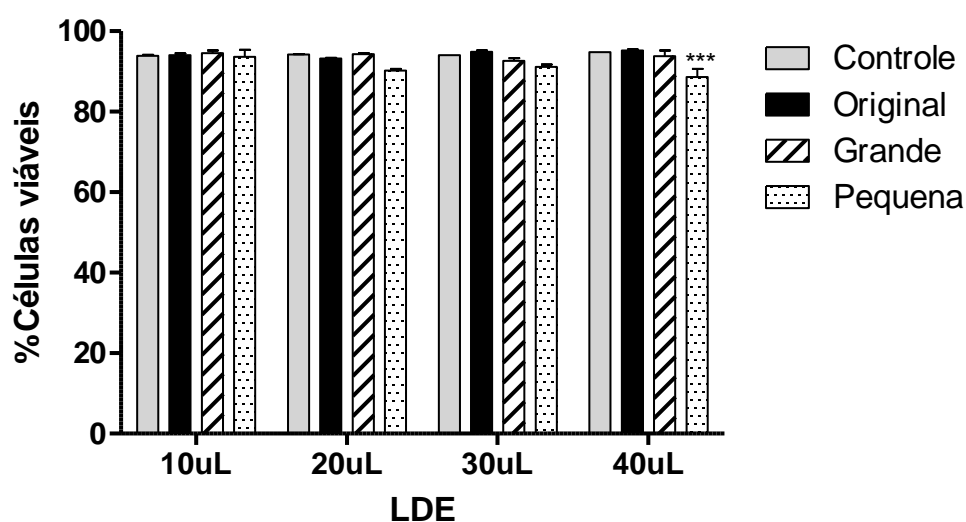


Figura 9 – Percentagem de células viáveis, incubadas por 4 horas com LDE original, grande e pequena e controle *** $p < 0,001$

RESULTADOS

A análise de apoptose (Figura 10A) mostrou-se positiva em 10,8% das células após tratamento com a LDE pequena ($p < 0,001$). Não foi observada a presença de apoptose após 4 horas de incubação em nenhuma outra concentração e LDE estudada. A Figura 10B mostra que nenhuma das incubações testadas foi capaz de induzir necrose.

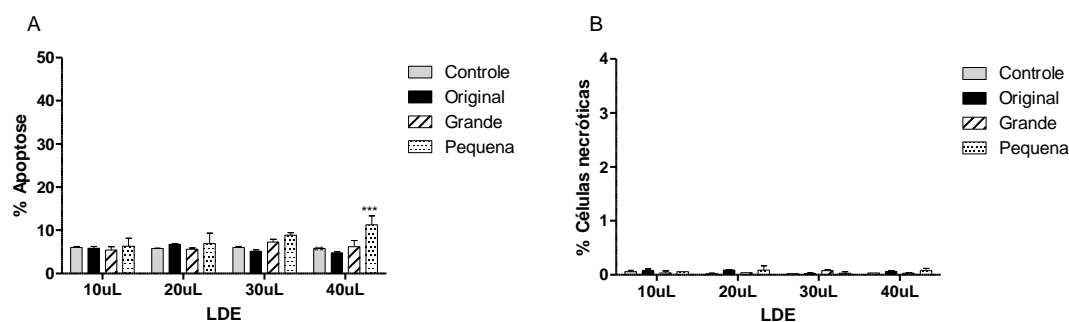


Figura 10 – Estudo do tipo de morte celular. A: Percentagem de células marcadas para apoptose, incubadas por 4 horas com LDE-paclitaxel original, grande e pequena e controle, *** $p < 0,001$. B: Percentagem de células marcadas para necrose, incubadas por 4 horas com LDE-paclitaxel original, grande e pequena e controle não tratado

Ao incubar as células por 24 horas com a LDE, observou-se um comportamento semelhante ao encontrado em 4 horas (Figura 11), somente a LDE pequena apresentou morte celular de 52% ($p < 0,001$).

RESULTADOS

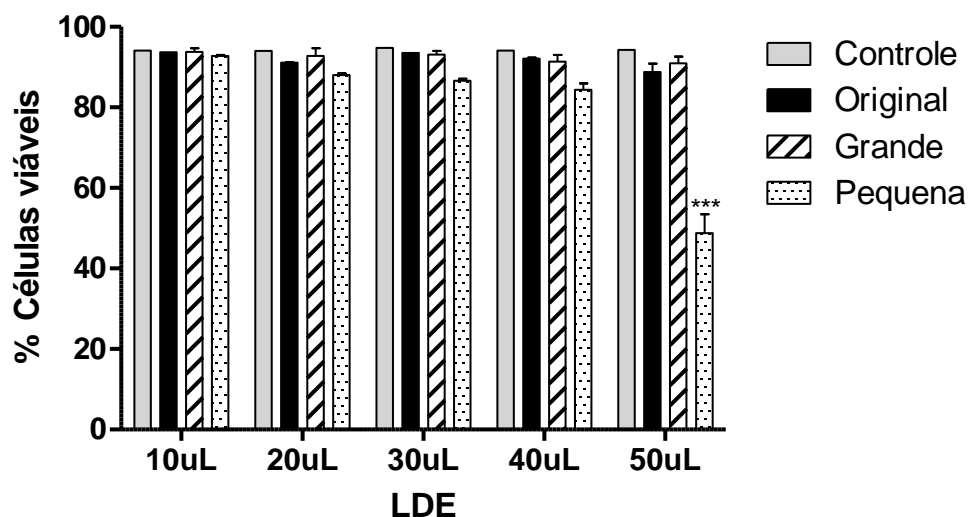


Figura 11 – Percentagem de células viáveis, incubadas por 24 horas com LDE original, grande e pequena e controle não tratado *** $p < 0,001$

O estudo de apoptose (figura 12A) mostrou que a LDE original e a LDE grande não são capazes de induzir apoptose após 24 horas.

A LDE pequena induziu a apoptose na incubação de 40 μl ($p < 0,05$), com 16,7% das células marcadas para a presença da fosfatidilserina. Com 50 μl , observou-se 34,4% das células positivas ($p < 0,001$).

Não observou-se a presença de células necróticas em nenhuma das nanopartículas e incubações testadas (figura 12B).

RESULTADOS

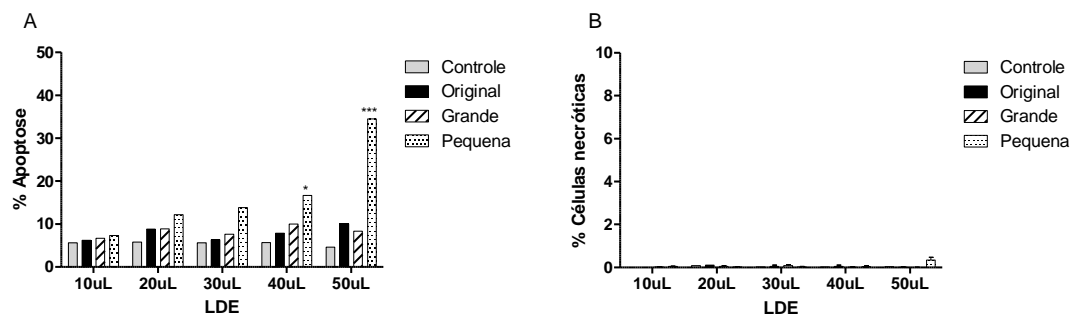


Figura 12 – Estudo do tipo de morte celular. A: Percentagem de células marcadas para apoptose, incubadas por 24 horas com LDE original, grande e pequena e controle, * $p < 0.05$; *** $p < 0,001$. B: Percentagem de células marcadas para necrose, incubadas por 24 horas com LDE original, grande e pequena e controle não tratado

4.2.4.2 Detecção de apoptose e necrose da LDE-paclitaxel original, LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena

Ao avaliar a percentagem de viabilidade celular após incubação por 4 horas com as nanopartículas associadas ao quimioterápico paclitaxel, o percentual das células da incubação com a LDE-paclitaxel pequena foi 11,3% menor que o controle na concentração de 1,0 μM ($p < 0,001$), conforme Figura 13.

As outras concentrações de LDE-paclitaxel pequena não tiveram efeito citotóxico, assim como a LDE-paclitaxel original e a LDE-paclitaxel grande.

RESULTADOS

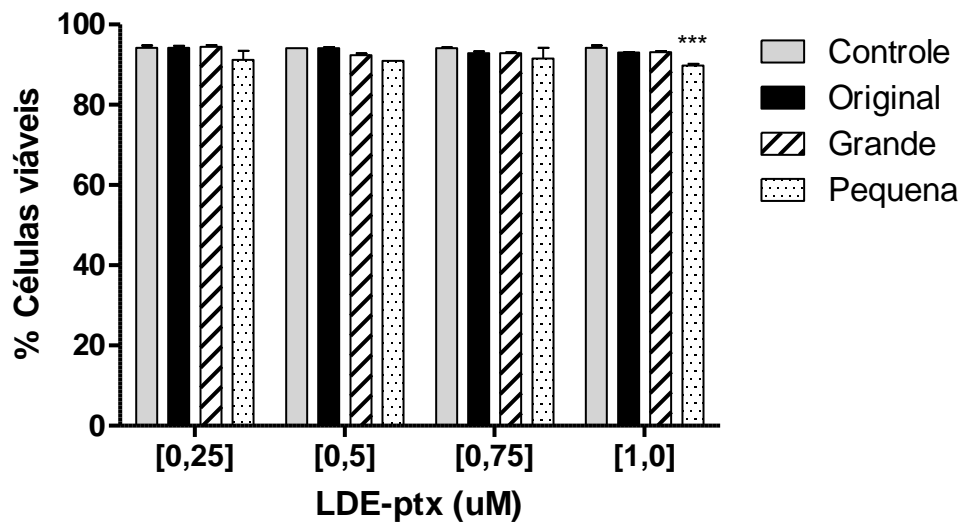


Figura 13 – Percentagem de células viáveis, incubadas por 4 horas com LDE-paclitaxel original, grande e pequena e controle não tratado *** $p < 0,001$

Após 4 horas de incubação com a LDE-paclitaxel original, LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena não foram capazes de induzir morte celular por apoptose nem por necrose (Figura 14).

RESULTADOS

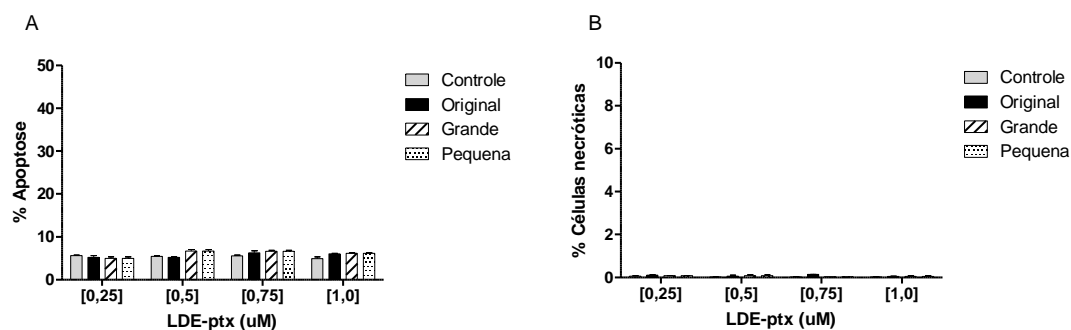


Figura 14 – Estudo do tipo de morte celular. A: Percentagem de células marcadas para apoptose, incubadas por 4 horas com LDE-paclitaxel original, grande e pequena e controle. B: Percentagem de células marcadas para necrose, incubadas por 4 horas com LDE-paclitaxel original, grande e pequena e controle não tratado

Ao investigar a incubação das partículas LDE-paclitaxel em 24 horas em células endoteliais, observou-se morte celular com a LDE-paclitaxel original, com a LDE-paclitaxel grande e a LDE-paclitaxel pequena, em todas as concentrações testadas (Figura 15).

RESULTADOS

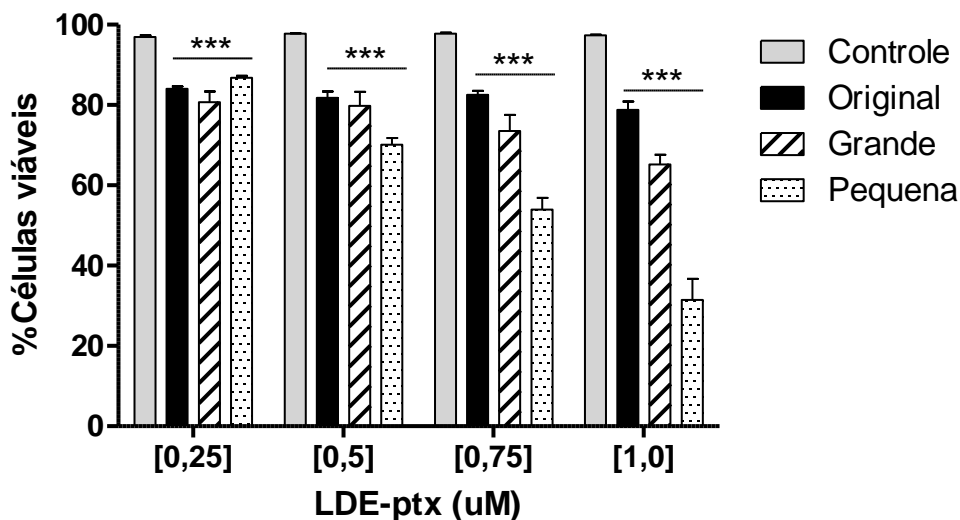


Figura 15 - Percentagem de células viáveis, incubadas por 24 horas com LDE-paclitaxel original, grande e pequena e controle não tratado *** $p < 0,001$

A LDE-paclitaxel original foi capaz de diminuir a viabilidade celular em aproximadamente 20% em todas as concentrações testadas ($p < 0,001$).

A LDE-paclitaxel grande apresentou morte celular de 20% nas concentrações de 0,25 e 0,50 μM ($p < 0,001$). Quando incubada com 0,75 μM a morte celular foi de 27,5% ($p < 0,001$), e com 1,0 μM observou-se 45,8% de células mortas ($p < 0,001$).

A LDE-paclitaxel pequena foi a partícula que apresentou maior efeito citotóxico, apresentou 14,2% de morte celular na concentração de 0,25 μM ($p < 0,001$), quando incubada com 0,50 μM levou 29,9% das células a morte ($p < 0,001$). Na concentração de 0,75 μM matou 46,1% das células ($p < 0,001$) e

RESULTADOS

na maior concentração (1,0 μM) causou morte em 68,6% das células ($p < 0,001$).

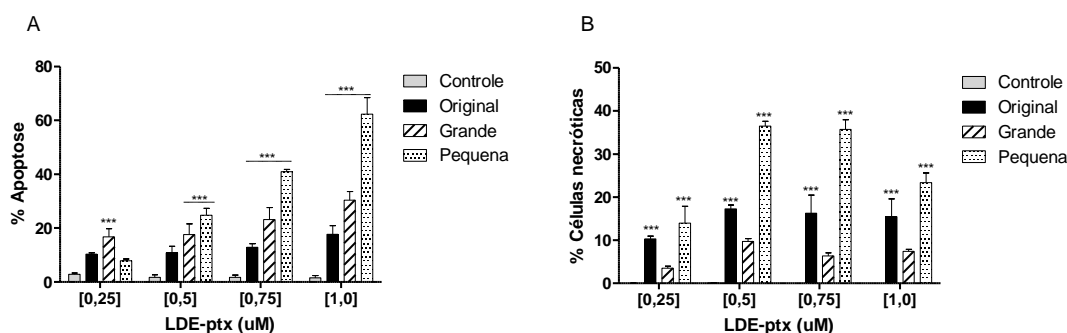


Figura 16 – Estudo do tipo de morte celular. A: Percentagem de células marcadas para apoptose, incubadas por 24 horas com LDE original, grande e pequena e controle. B: Percentagem de células marcadas para necrose, incubadas por 24 horas com LDE original, grande e pequena e controle não tratado

O estudo de apoptose na LDE-paclitaxel (Figura 16A) mostrou que na menor concentração testada (0,25 μM) somente a LDE-paclitaxel grande foi capaz de induzir apoptose em 16,7% das células ($p < 0,001$). A partir da concentração de 0,5 μM todas as nanopartículas contendo LDE-paclitaxel foram capazes de induzir apoptose ($p < 0,001$).

A LDE-paclitaxel original apresentou pequeno aumento do número de células apoptóticas dependente de concentração, sendo que em 0,5 e em 1,0 μM foi de aproximadamente 11% e na maior concentração testada (1,0 μM) foi de 17,7%.

RESULTADOS

A LDE-paclitaxel grande apresentou aumento de apoptose dependente da concentração. Em 0,5 μM foi de 17,5%, aumentando para 23,1% com a concentração de 0,75 μM . Quando testada a 1,0 μM apresentou 30,3% de células em apoptose.

A LDE-paclitaxel pequena também apresentou um comportamento dose dependente, porém com a taxa de apoptose muito maior que as outras nanopartículas. Na concentração de 0,5 μM induziu 24,8% das células a apoptose, em 0,75 μM foi 40,9% e na concentração de 1,0 μM , 62,3% das células estavam apoptóticas.

Em relação à necrose, a LDE-paclitaxel grande não foi capaz de induzir necrose em nenhuma das concentrações testadas. A LDE-paclitaxel original induziu a necrose de aproximadamente 15% das células em todas as concentrações testadas ($p < 0,001$). A LDE-paclitaxel pequena levou a necrose 14% das células na concentrações de 0,25 μM , esse número subiu para 20,0% das células nas concentrações de 0,5 e 0,75 μM e voltou a 14% na concentração de 1,0 μM ($p < 0,001$).

4.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL EM COELHOS

4.3.1 Perfil ponderal

Os coelhos do grupo LDE-paclitaxel grande não apresentaram alteração de peso corporal durante o período experimental. Por outro lado, o peso dos animais do grupo LDE-paclitaxel pequena diminuiu durante o protocolo ($p < 0,05$, basal vs eutanásia) e foi 10% menor do que os coelhos do grupo LDE-paclitaxel grande ($p < 0,05$) (Figura 17).

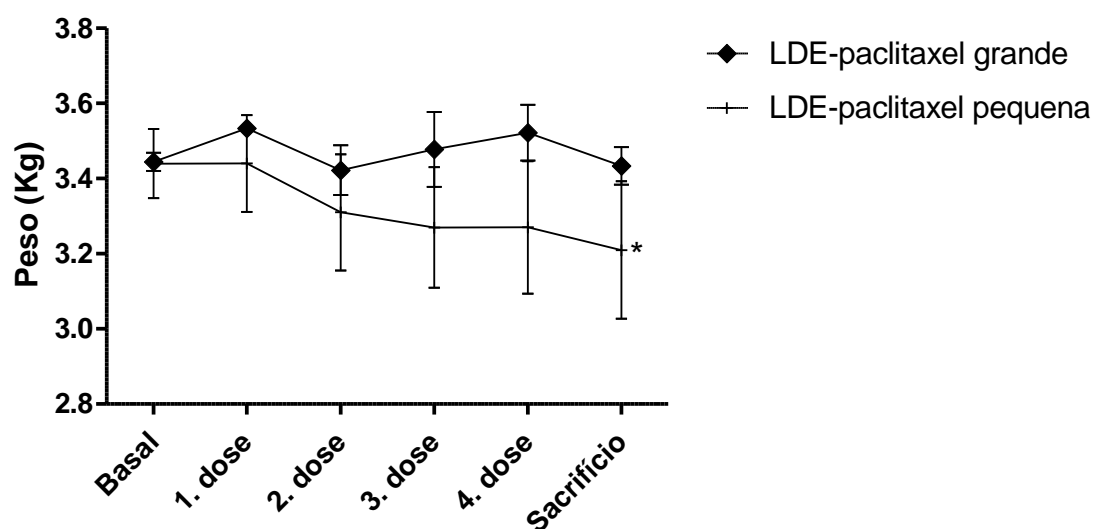


Figura 17 – Peso corporal dos grupos LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena. Dados expressos em média \pm desvio padrão * $p < 0,05$, vs basal

RESULTADOS

4.3.2 Análise do Consumo de Ração

A Figura 18 mostra a média de consumo de ração suplementada com 1% de colesterol pelos grupos LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena durante todo o protocolo. Não houve diferença de consumo de ração entre os grupos.

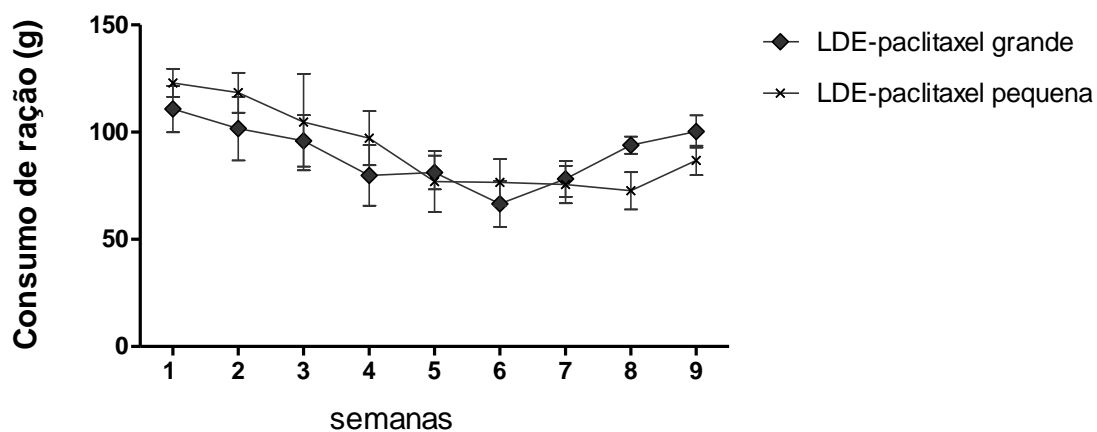


Figura 18 – Consumo de ração (g) dos grupos LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena. Dados expressos em média \pm desvio padrão

4.3.3 Perfil lipídico

Os resultados do perfil lipídico dos grupos LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena estão apresentados na Tabela 2.

Não houve diferença estatística nos valores entre os grupos, apenas entre os tempos do próprio grupo. Como esperado, os níveis de colesterol total aumentaram em mais de 20 vezes, no pré-tratamento e na eutanásia, em relação à amostra do tempo basal, ($p < 0,001$), em ambos os grupos.

Nos grupos LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena, os níveis de HDL também aumentaram, cerca de 10 vezes, no pré-tratamento e eutanásia relativamente à concentração basal ($p < 0,001$). No grupo LDE-paclitaxel pequena, também houve aumento entre o pré-tratamento em relação à eutanásia ($p < 0,001$).

Os níveis de triglicérides, em ambos os grupos, aumentaram mais de 2 vezes no pré-tratamento em relação à eutanásia ao ($p < 0,01$). No grupo LDE-paclitaxel pequena, também foi observado um aumento cerca de 3 vezes na eutanásia em relação ao basal ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Tabela 2 – Perfil lipídico dos coelhos dos grupos LDE-paclitaxel, dosagem basal, pré-tratamento e eutanásia

<i>Perfil lipídico</i>	LDE-paclitaxel grande (n=9)			LDE-paclitaxel pequena (n=10)		
	Basal	Pré-tratamento	Eutanásia	Basal	Pré-tratamento	Eutanásia
Colesterol total (mg/dL)	54 ± 4	1035 ± 580**	1054 ± 431**	40 ± 23	1209 ± 877**	1444 ± 757**
HDL-C (mg/dL)	16 ± 11	197 ± 106*	270 ± 109**	14 ± 9	166 ± 74*	318 ± 86** [#]
Triglicérides (mg/dL)	80 ± 27	71 ± 39	195 ± 166 [#]	82 ± 32	89 ± 60	229 ± 173 [#]

Dados expressos em média ± desvio padrão. * p<0,01, ** p<0,001 vs basal; [#]p<0,001 vs pré-tratamento

4.3.4 Glicemia e enzimas hepáticas

Foram analisadas a glicemia e as enzimas hepáticas plasmáticas transaminase alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST) e fosfatase alcalina, conforme a Tabela 3. Não houve diferença estatística nos resultados analisados da concentração glicêmica dos coelhos.

Os níveis séricos de ALT no grupo LDE-paclitaxel grande estavam aumentados em 2 vezes no pré-tratamento (p<0,05) e na eutanásia (p<0,01) em relação ao basal. No grupo LDE-paclitaxel pequena, os resultados do pré-tratamento e eutanásia estavam aumentados em 2 vezes, em relação ao basal (p<0,01 e p<0,05, respectivamente).

RESULTADOS

A concentração de AST no grupo LDE-paclitaxel grande foi aproximadamente 2 vezes maior na eutanásia em relação ao basal ($p < 0,05$). No grupo LDE-paclitaxel pequena, os resultados do pré-tratamento e eutanásia estavam aumentados em 2 vezes, ($p < 0,01$), em relação ao tempo basal.

A fosfatase alcalina aumentou apenas no grupo LDE-paclitaxel pequena na eutanásia em relação ao basal ($p < 0,05$).

Tabela 3 – Glicemia e enzimas hepáticas alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST) e fosfatase alcalina dos grupos LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena

<i>Glicemia e Enzimas hepáticas</i>	LDE-paclitaxel grande (n=9)			LDE-paclitaxel pequena (n=10)		
	Basal	Pré- tratamento	Eutanásia	Basal	Pré- tratamento	Eutanásia
Glicemia (mg/dL)	120 ± 8	104 ± 2	92 ± 9	108 ± 1	103 ± 1	91 ± 2
ALT (U/L)	24 ± 9	50 ± 2*	62 ± 2**	26 ± 1	55 ± 2**	50 ± 3*
AST (U/L)	37 ± 1	51 ± 2	62 ± 4*	30 ± 1	63 ± 2**	62 ± 3**
Fosfatase Alcalina(U/L)	47,8 ± 33,8	67,9 ± 23,5	60,7 ± 28,8	55,1 ± 17,4	67,3 ± 21,4	78,5 ± 21,1*

Dados expressos em média ± desvio padrão. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs basal

4.3.5 Eritrograma

Na Tabela 4, estão expressos os dados dos eritrócitos, hemoglobina e hematócrito. Não houve diferença estatística nos resultados entre os grupos LDE-paclitaxel grande ou LDE-paclitaxel pequena, apenas intra-grupo em relação ao basal.

Uma redução do número de eritrócitos foi observada no grupo LDE-paclitaxel grande, assim como a concentração de hemoglobina e a percentagem de hematócrito, no pré-tratamento e eutanásia em comparação ao basal ($p < 0,001$).

No grupo LDE-paclitaxel pequena, houve uma redução de eritrócitos no pré-tratamento ($p < 0,01$) e eutanásia ($p < 0,001$) em comparação ao basal, e também na eutanásia em comparação ao pré-tratamento ($p < 0,05$). A concentração de hemoglobina também foi reduzida pelo tratamento com LDE-paclitaxel pequena nos tempos pré-tratamento ($p < 0,05$) e eutanásia ($p < 0,001$), em relação ao basal. O hematócrito também reduziu no tempo pré-tratamento ($p < 0,01$) e eutanásia ($p < 0,001$) em comparação ao basal.

RESULTADOS

Tabela 4 – Eritrograma dos grupos LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena

Eritrograma	LDE-paclitaxel grande (n=9)			LDE-paclitaxel pequena (n=10)		
	Basal	Pré-tratamento	Eutanásia	Basal	Pré-tratamento	Eutanásia
Eritrócitos (milhões/mm ³)	6,03 ± 0,9	3,42 ± 1,5***	3,31 ± 0,6***	5,63 ± 0,6	4,14 ± 1,2**	2,83 ± 0,5*** #
Hemoglobina (g/dL)	12,48 ± 1,9	8,34 ± 2,6***	8,39 ± 1,5***	11,96 ± 1,2	9,56 ± 2,2*	6,74 ± 2,3*** #
Hematócrito (%)	39,46 ± 5,3	22,98 ± 9,8***	23,97 ± 4,3***	37,86 ± 3,0	27,53 ± 7,7*	19,57 ± 6,7***

Dados expressos em média ± desvio padrão. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 vs basal; # p<0,05, vs pré-tratamento

4.3.6 Leucograma

Nas dosagens de leucócitos não houve diferença estatística nos valores entre os grupos LDE-paclitaxel grande ou LDE-paclitaxel pequena, conforme descrito na Tabela 5. O grupo LDE-paclitaxel grande não apresentou nenhuma alteração no leucograma. O tratamento com LDE-paclitaxel pequena promoveu um aumento do número de leucócitos totais e linfócitos (p<0,01). Não houve diferença estatística nos resultados de neutrófilos, monócitos e plaquetas.

RESULTADOS

Tabela 5 – Leucograma dos grupos LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena

Leucograma	LDE-paclitaxel grande (n=9)			LDE-paclitaxel pequena (n=10)		
	Basal	Pré-tratamento	Eutanásia	Basal	Pré-tratamento	Eutanásia
Leucócitos (milhões/mm ³)	11,02 ± 2,3	11,07 ± 4,4	12,48 ± 3,9	9,43 ± 13,6	15,17 ± 5,6*	13,12 ± 6,2*
Neutrófilos (mil/mm ³)	4,40 ± 1,7	2,66 ± 1,5	4,43 ± 1,9	3,64 ± 1,5	5,07 ± 3,8	5,07 ± 2,5
%	39,2 ± 12,4	23,5 ± 9,6	34,7 ± 8,8	38,4 ± 13,6	31,7 ± 13,8	37,8 ± 16,3
Linfócitos (mil/mm ³)	6,18 ± 1,7	8,01 ± 1,5	7,55 ± 2,5	5,44 ± 2,0	9,66 ± 4,0*	6,43 ± 2,9
%	56,9 ± 13,4	73,0 ± 9,6	61,1 ± 9,2	57,9 ± 14,2	65,4 ± 14,4	48,6 ± 18,7
Monócitos (mil/mm ³)	0,43 ± 0,2	0,40 ± 0,2	0,47 ± 0,2	0,34 ± 0,1	0,45 ± 0,2	0,41 ± 0,2
%	3,8 ± 1,4	3,4 ± 1,5	3,9 ± 2,1	3,6 ± 1,4	3,0 ± 0,9	2,8 ± 1,5
Plaquetas (mil/mm ³)	187,78 ± 60,1	175,33 ± 93,6	183,44 ± 11,4	194,00 ± 63,9	262,00 ± 76,5	206,22 ± 83,4

Dados expressos em média ± desvio padrão. *p<0,01 vs basal

4.3.7 Análise macroscópica das lesões ateroscleróticas

A Figura 19 mostra uma aorta representativa das lesões ateroscleróticas dos grupos LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena, com os depósitos lipídicos marcados em vermelho. A Tabela 6 dispõe as medidas macroscópicas das lesões ateroscleróticas dos grupos LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena.

Não houve diferença na razão área de lesão/área total entre os dois grupos.

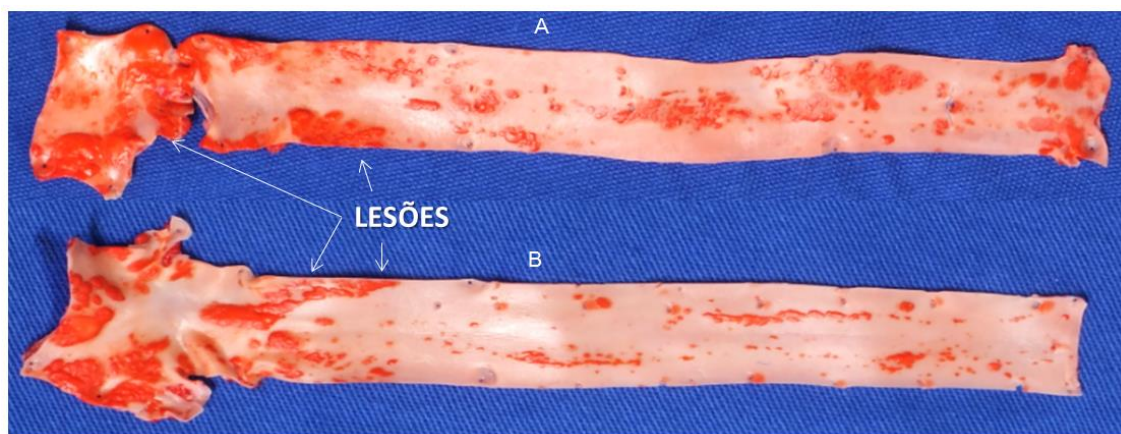


Figura 19 – Imagem representativa das aortas dos grupos LDE-paclitaxel grande (A) e LDE-paclitaxel pequena (B), com os depósitos lipídicos das lesões ateroscleróticas evidenciados por Scarlat R

RESULTADOS

Tabela 6 – Medidas macroscópicas da aorta dos grupos LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena

Macroscopia	LDE-paclitaxel grande (n=9)	LDE paclitaxel pequena (n=10)
Área total da aorta (pixel ²) (10 ⁻⁶)	1,28 ± 0,12	1,32 ± 0,15
Área de lesão (pixel ²) (10 ⁻⁶)	0,35 ± 0,33	0,41 ± 0,39
Área de lesão/área total (%)	27,34 ± 24,64	29,01 ± 24,32

Dados expressos em média ± desvio padrão

4.3.8 Análise morfométrica de cortes histológicos de arco aórtico

A análise morfométrica dos cortes histológicos do arco aórtico dos grupos LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena foi realizada medindo a área total dos cortes histológicos e as lesões ateroscleróticas. Na Figura 20 estão imagens representativas dos cortes corados por hematoxilina-eosina e os resultados das quantificações estão na Tabela 7. Não houve diferença entre a razão da área total e das lesões entre os grupos.

RESULTADOS

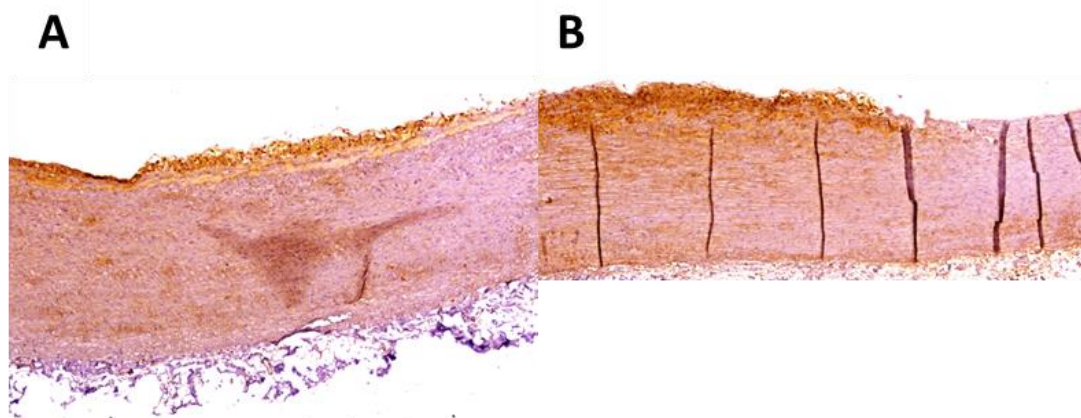


Figura 20 – Cortes histológicos de arco aórtico representativos de lesão aterosclerótica nos grupos LDE-paclitaxel grande e pequena. Coloração: hematoxilina-eosina. Aumento 40x

Tabela 7 – Análise morfometria das aortas dos grupos LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena

<i>Morfometria</i>	LDE-paclitaxel grande (n=9)	LDE-paclitaxel pequena (n=10)
Área total (μm^2) (10^{-4})	105,43 \pm 17,94	112,24 \pm 26,80
Área das lesões (μm^2) (10^{-4})	10,24 \pm 10,15	11,77 \pm 13,35
Área das lesões/área total (%)	8,70 \pm 7,84	10,50 \pm 9,52

Dados descritos em média \pm desvio padrão

Foi realizada a quantificação de fibras elásticas com coloração de Tricrômio de Masson, para evidenciar colágeno na camada íntima das aortas de coelhos tratados com a nanopartícula LDE-paclitaxel grande (A) ou LDE-paclitaxel pequena (B) conforme Figura 21. Não houve diferença entre os grupos, conforme demonstra a Tabela 8.

RESULTADOS

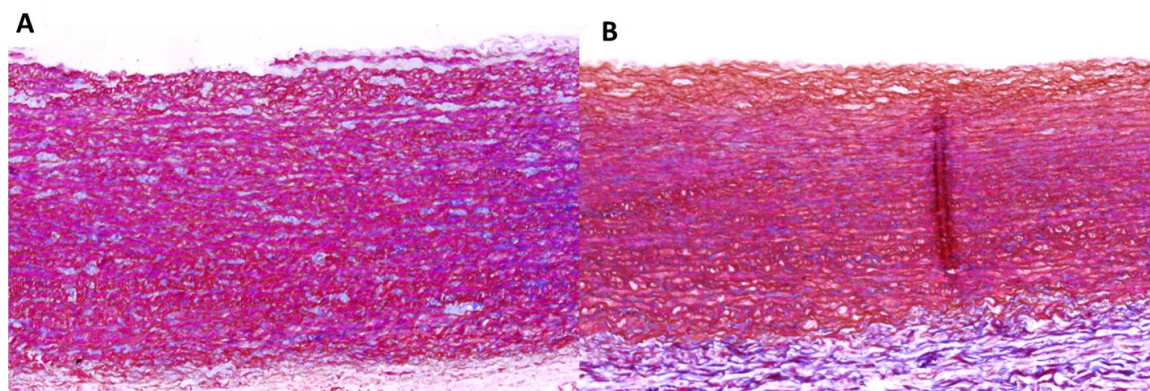


Figura 21 – Cortes histológicos do arco aórtico representativos dos grupos LDE-paclitaxel grande (A) e LDE-paclitaxel pequena (B). Coloração por Tricrômio de Masson, para evidenciar colágeno (em azul) da região íntima. Aumento 100x

Tabela 8 – Análise morfométrica da camada íntima de aortas dos grupos LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena

Morfometria	LDE-paclitaxel grande (n=9)	LDE-paclitaxel pequena (n=10)
Área da íntima (μm^2) (10^{-4})	44,63 \pm 20,9	37,97 \pm 7,25
Área marcada (μm^2) (10^{-4})	8,68 \pm 5,52	8,34 \pm 5,69
Área marcada/área da íntima (%)	19,44 \pm 2	21,96 \pm 7

Dados descritos em média \pm desvio padrão

4.3.9 Análise imunohistoquímica

4.3.9.1 Quantificação de macrófagos

A Tabela 9 apresenta os resultados da imuno-marcação para identificação de macrófagos na camada íntima do arco aórtico dos coelhos dos

RESULTADOS

grupos LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena, e imagens representativas dessa marcação são mostradas na Figura 22. Não foi observada diferença na marcação de RAM na camada íntima entre os tratamentos estudados.

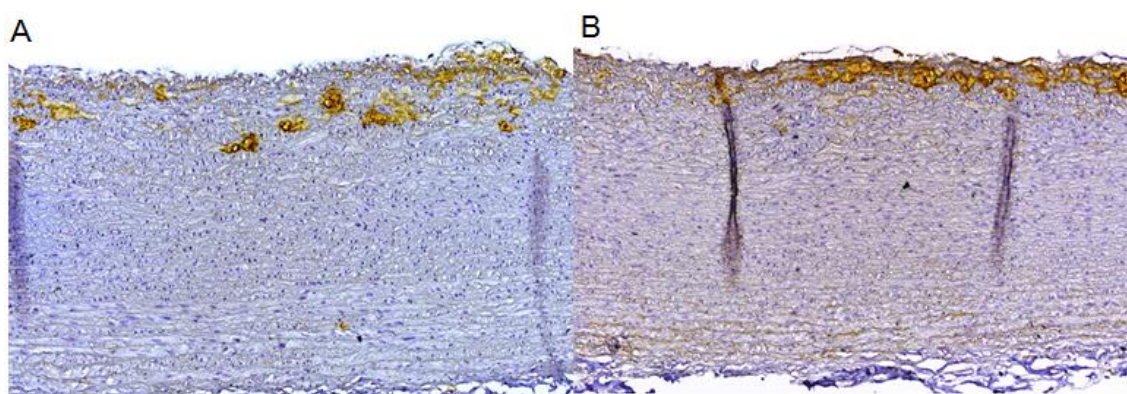


Figura 22 – Imuno-marcação para macrófagos (RAM-11) em cortes histológicos de arco aórtico dos grupos LDE-paclitaxel grande (A) e LDE-paclitaxel pequena (B). Aumento de 100X

Tabela 9 – Análise da imuno-marcação de macrófagos na camada íntima do arco aórtico dos grupos LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena

Macrófagos	LDE-paclitaxel grande (n=9)	LDE-paclitaxel pequena (n=10)
Área da íntima (μm^2) (10^{-3})	78,64 \pm 78,41	80,52 \pm 85,15
Área marcada (μm^2) (10^{-3})	42,10 \pm 40,54	50,04 \pm 48,24
Área da íntima / Área marcada (%)	53,53 \pm 14,18	31,97 \pm 20,01

Dados expressos em média \pm desvio padrão

RESULTADOS

4.3.9.2 Quantificação de células de músculo liso

A imunomarcção de alfa-actina na camada íntima das aortas dos grupos LDE-paclitaxel grande e pequena está apresentada na Figura 23 e Tabela 10. Não foi observada diferença entre os grupos LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena na marcação de células musculares lisas.

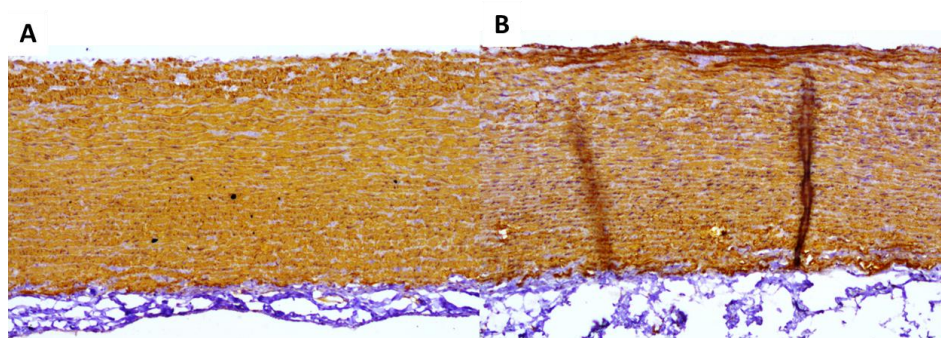


Figura 23 – Imuno-marcação para alfa-actina no arco aórtico dos grupos LDE-paclitaxel grande (A) e LDE-paclitaxel pequena (B). Aumento de 100X

Tabela 10 – Análise da imuno-marcação de alfa-actina na camada íntima do arco aórtico dos grupos LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel pequena

<i>α-actina</i>	LDE-paclitaxel grande (n=9)	LDE-paclitaxel pequena (n=10)
Área total (μm^2) (10^{-4})	42,55 ± 79,54	40 44 ± 51,66
Área íntima (μm^2) (10^{-4})	20,28 ± 45,92	18,33 ± 43,73
Área total / Área íntima (%)	47,66 ± 15,34	45,34 ± 56,82

Dados descritos em média ± desvio padrão

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A interação do nanomaterial com a célula não envolve apenas a nanopartícula, por si só, pois enquanto as propriedades físico-químicas e o comportamento de nanomateriais podem ser manipulados e controlados em ambientes tecnicamente estáveis, isso não é possível em um ambiente fisiológico complexo (Docter *et al.*, 2015). Além disso, os organismos complexos são ainda compostos por vários microambientes complexos adicionais, tais como órgãos e células, que também diferem bastante na sua composição físico-química (Docter *et al.*, 2015).

Para investigação das características físico-químicas da LDE, as partículas foram testadas em relação ao tamanho, polidispersidade, pH, e concentração do fármaco. Nos ensaios *in vitro*, as células endoteliais foram responsivas à nanopartícula LDE e, no estudo *in vivo*, o tratamento mostrou eficácia terapêutica independentemente do tamanho de partícula administrada. Assim sendo, a progressão da aterosclerose experimental pode ser tratada com fármacos antiproliferativos associados à LDE, sem que seja necessário fazer a seleção do tamanho das nanopartículas.

Para que a nanopartícula tenha efeito de longa circulação, é necessário que haja estabilidade na preparação, ou seja, uma alta afinidade entre o veículo e o medicamento carregado (Feng e Mumper, 2013). O fármaco

DISCUSSÃO

paclitaxel é um dos mais efetivos no tratamento de neoplasias, entretanto está relacionado com severas reações de hipersensibilidade (Wani e Horwitz, 2014). Estudos tem mostrado que a nanopartícula lipídica LDE promoveu um ambiente favorável para moléculas lipofílicas, como o paclitaxel (Rodrigues *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2005; Maranhão *et al.*, 2008). Após passar pelo processo de ultracentrifugação para separação dos tamanhos, a associação do paclitaxel à LDE estava mantida, como mostrada pela análise da concentração de fármaco de cada fração.

O tamanho de partículas pode influenciar nas propriedades químicas de um nanomaterial. Em alguns estudos foi demonstrado que partículas de ouro, considerado um material quimicamente inerte, são catalíticas quando reduzidas a escala nanométrica (Palombo *et al.*, 2014; Boverhof *et al.*, 2015).

As discussões a respeito da faixa de tamanho em que um nanomaterial está inserido são contraditórias, porém necessárias para que o conceito não seja utilizado de forma incorreta. Na maioria das legislações sobre nanopartículas, as definições são baseadas apenas em números absolutos (Palombo *et al.*, 2014). Existe a necessidade de incluir outros parâmetros que levam em consideração não apenas o tamanho em si, pois a resposta biológica pode ser correlacionada com a percentagem de distribuição das partículas em uma faixa de tamanho (Palombo *et al.*, 2014; Boverhof *et al.*, 2015).

DISCUSSÃO

A literatura aponta que poucas partículas são realmente monodispersas, ou seja, com o índice de polidispersidade $< 0,2$ e a distribuição das partículas com uma população representativa concentrada em uma estreita faixa de tamanhos (Boverhof *et al.*, 2015).

A LDE original, usada no presente estudo, possui populações distintas de partícula, porém a sua dispersidade é baixa, ou seja, a distribuição das populações se concentra entre 40 e 60 nm, enquanto a percentagem de partículas de tamanhos extremos é irrelevante. A técnica utilizada para caracterizar as partículas foi o espalhamento dinâmico de luz a 90° (DLS) que analisa partículas de 0,3 nm até 10 μm . Assim sendo, para garantir a homogeneidade das partículas no estudo, foi utilizado o método de separação por ultracentrifugação por gradientes de densidade baseado na técnica empregada para separar lipoproteínas nativas do plasma (Havel *et al.*, 1955; Redgrave *et al.*, 1975).

Com a separação realizada, obteve-se LDE-paclitaxel pequena muito homogênea, com um índice de polidispersidade de 0,043; as partículas LDE-paclitaxel grande e LDE-paclitaxel original apresentaram índice de polidispersidade, 0,130 e 0,145, respectivamente. Porém, na análise do diâmetro das partículas, a partícula grande está á direita da partícula original, indicando que grande parte da população analisada se concentrou na faixa entre 50 e 80 nm.

DISCUSSÃO

Outra importante característica de uma nanopartícula ideal é a capacidade de manter uma concentração significativa no sítio de ação e um acúmulo mínimo ou nulo em tecidos normais (Feng e Mumper, 2013). Em trabalhos anteriores do grupo, foi observada maior concentração da LDE em tumores e lesões ateroscleróticas em comparação com tecido normal (Rodrigues *et al.*, 2005; Maranhão *et al.*, 2008; Kretzer *et al.*, 2012). Também já tem sido demonstrado que a associação do paclitaxel à partícula não interferiu na captação da LDE por locais de lesão aterosclerótica, que foi maior que nos tecidos normais (Maranhão *et al.*, 2008). Isto porque durante o seu trajeto pela circulação, a LDE adquire a apo E, uma apolipoproteína fundamental para o seu reconhecimento por LDLR e para a sua captação por endocitose mediada por receptor (Hungria *et al.*, 2004; Ruiz *et al.*, 2005; Maranhão *et al.*, 2008; Pires *et al.*, 2009).

Matuszak *et al* (2016) avaliaram sistemas “candidatos” para aplicação intravascular. Foram avaliadas 10 nanopartículas de propriedades distintas, dentre elas 5 de composição lipídica, 2 poliméricas e 3 inorgânicas, quanto a características físico-químicas, estabilidade e citotoxicidade *in vitro*. A partícula lipídica com tamanho médio de 53,3 nm teve efeito mais pronunciado na alteração morfológica e na aderência de células HUVEC, em comparação com outras nanopartículas lipídicas maiores. O resultado foi devido ao efeito da alta concentração de surfactante da nanopartícula e ao seu tamanho reduzido ser um facilitador de captação celular (Matuszak *et al.*, 2016).

DISCUSSÃO

Outros estudos demonstraram que o tamanho das partículas também pode alterar as propriedades biológicas de nanomateriais, como solubilidade, e que partículas menores possuem uma área de superfície maior, o que interfere diretamente na sua bioatividade (Boverhof *et al.*, 2015; Setyawati *et al.*, 2015). Nos ensaios de citotoxicidade por MTT, demonstramos que a partícula LDE-paclitaxel pequena reduziu a viabilidade celular em 50% na concentração 0,75 μM , concentração na qual a partícula grande apresentou cerca de 70% de células viáveis.

No ensaio de captação, após 4 horas de incubação com LDE, sem o paclitaxel, entre 4 e 24% das células endoteliais captaram as partículas, independentemente dos tamanhos e da concentração. Por outro lado, após 24 horas de incubação, o tamanho das partículas e os volumes incubados interferiram na captação da LDE-paclitaxel pelas células endoteliais. Na incubação com 10 μL , a LDE original foi captada por 26% das células, a LDE grande por 8% e a LDE pequena por 27%. Na incubação com 50 μL , 75% das células captaram a partícula original e 77% a pequena, apenas 59% das células captaram a LDE grande. Isto demonstra que a captação das partículas LDE pelas células HUVEC é dependente de exposição prolongada, volume de partículas e em maior proporção quando incubadas com partículas de 40 nm.

No ensaio para detecção de apoptose e necrose, as células tratadas com LDE original e LDE grande apresentaram viabilidade em aproximadamente de 100% das células, independente do tempo de incubação

DISCUSSÃO

e da concentração em que foram incubadas. Esses resultados mostram que mesmo que as células internalizem a LDE sem o fármaco, o veículo não altera a viabilidade celular. Entretanto, em 24 horas de incubação com 50 μ L, a LDE pequena diminuiu a viabilidade celular em 51%, reafirmando que as partículas pequenas são mais citotóxicas, dependendo do tempo de exposição e volume de incubação.

Nas células endoteliais incubadas com LDE-paclitaxel por 4 horas, não houve redução na viabilidade celular e na percentagem de células apoptóticas ou necróticas. Entretanto, após incubação por 24 horas com LDE-paclitaxel, a viabilidade celular foi reduzida, com conseqüente aumento na percentagem de células apoptóticas e necróticas, demonstrando que ação farmacológica do paclitaxel, na associação à partícula LDE, foi potencializada em razão do tempo de incubação e da sua concentração na partícula carreadora. Nas células incubadas com a LDE-paclitaxel pequena, a viabilidade celular foi menor e a percentagem de células apoptóticas e necróticas foi maior que os outros tamanhos.

No presente estudo, também foi avaliado o efeito dos tamanhos da LDE-paclitaxel no tratamento de aterosclerose experimental. Como esperado, o perfil lipídico estava aumentado, já nas dosagens pré-tratamento, devido ao consumo de ração enriquecida com colesterol. Esse aumento se refletiu nas concentrações dos níveis séricos de ALT e AST. Do mesmo modo, a diminuição observada no eritrograma dos animais, pré-tratamento, foi devido a

DISCUSSÃO

ingestão de dieta rica em colesterol. Esses dados comprovam que o tratamento com LDE-paclitaxel, independente do tamanho das partículas, não causa toxicidade nos animais.

Quanto ao tamanho das lesões ateroscleróticas dos coelhos, foi observado que os tratamentos com partículas grandes e pequenas de LDE-paclitaxel promoveram efeitos similares. Como demonstrado pela planimetria e análise morfométrica das aortas, não houve diferença na razão da área da lesão e área total. Esses resultados foram confirmados pelos resultados da presença de macrófagos e células de músculo liso na camada íntima. Assim sendo, ambas as populações de partículas foram eficientemente capazes de tratar a doença aterosclerótica, o que pode ser devido à especificidade de ligação da LDE com os locais de lesão.

Quanto mais se agrega conhecimento a respeito da interação da LDE com o ambiente biológico, maior é a necessidade de uma abordagem multidisciplinar para continuar desvendando os caminhos da LDE na sua atividade de “*drug-delivery*”, para encontrar novas oportunidades de melhorar as aplicações futuras e fazer com que o conjunto dos resultados obtidos seja translacional.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- O tamanho da LDE, comparando-se partículas na faixa de 30-50 nm com as de 70-90 nm de diâmetro, não influenciou o efeito da associação LDE-paclitaxel em reduzir as lesões ateroscleróticas dos coelhos. O efeito das duas preparações, partículas menores e maiores, foi semelhante na redução da extensão das lesões e da invasão da camada íntima arterial por macrófagos e células musculares lisas.

- No tocante à toxicidade, avaliada por eritrograma, leucograma e enzimas hepáticas, nem as preparações de partículas de LDE-paclitaxel menores nem as maiores produziram toxicidade significativa.

- A captação por células HUVEC das partículas menores da LDE é maior que a das partículas maiores, independentemente da LDE ser associada ou não ao paclitaxel.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADES, A. et al. Uptake of a cholesterol-rich emulsion by neoplastic ovarian tissues. **Gynecol Oncol**, v. 82, n. 1, p. 84-7, Jul 2001.

ALMEIDA, C. P. et al. Modification of composition of a nanoemulsion with different cholesteryl ester molecular species: effects on stability, peroxidation, and cell uptake. **Int J Nanomedicine**, v. 5, p. 679-86, 2010.

AZEVEDO, C. H. et al. Plasma kinetics and uptake by the tumor of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) associated to etoposide oleate in patients with ovarian carcinoma. **Gynecol Oncol**, v. 97, n. 1, p. 178-82, Apr 2005.

BOVERHOF, D. R. et al. Comparative assessment of nanomaterial definitions and safety evaluation considerations. **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 73, n. 1, p. 137-50, Oct 2015.

BULGARELLI, A. et al. Anti-atherogenic effects of methotrexate carried by a lipid nanoemulsion that binds to LDL receptors in cholesterol-fed rabbits. **Cardiovasc Drugs Ther**, v. 27, n. 6, p. 531-9, Dec 2013.

CHURCHILL, C. D.; KLOBUKOWSKI, M.; TUSZYNSKI, J. A. Elucidating the mechanism of action of the clinically approved taxanes: a comprehensive comparison of local and allosteric effects. **Chem Biol Drug Des**, v. 86, n. 5, p. 1253-66, Nov 2015.

CONTENTE, T. C. et al. Association of daunorubicin to a lipid nanoemulsion that binds to low-density lipoprotein receptors enhances the antitumour action and decreases the toxicity of the drug in melanoma-bearing mice. **J Pharm Pharmacol**, v. 66, n. 12, p. 1698-709, Dec 2014.

DIAS, M. L. et al. Pharmacokinetics and tumor uptake of a derivatized form of paclitaxel associated to a cholesterol-rich nanoemulsion (LDE) in patients with gynecologic cancers. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 59, n. 1, p. 105-11, Jan 2007.

DOCTER, D. et al. The nanoparticle biomolecule corona: lessons learned - challenge accepted? **Chem Soc Rev**, v. 44, n. 17, p. 6094-121, Oct 2015.

DORLHIAC-LLACER, P. E. et al. In vitro cytotoxicity of the LDE: daunorubicin complex in acute myelogenous leukemia blast cells. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, n. 10, p. 1257-63, Oct 2001.

DZAU, V. J.; BRAUN-DULLAEUS, R. C.; SEDDING, D. G. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. **Nat Med**, v. 8, n. 11, p. 1249-56, Nov 2002.

FENG, L.; MUMPER, R. J. A critical review of lipid-based nanoparticles for taxane delivery. **Cancer Lett**, v. 334, n. 2, p. 157-75, Jul 2013.

GIMBRONE, M. A.; GARCÍA-CARDEÑA, G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. **Circ Res**, v. 118, n. 4, p. 620-36, Feb 2016.

GRAZIANI, S. R. et al. Uptake of a cholesterol-rich emulsion by breast cancer. **Gynecol Oncol**, v. 85, n. 3, p. 493-7, Jun 2002.

HANAHAN, D. Rethinking the war on cancer. **Lancet**, v. 383, n. 9916, p. 558-63, Feb 2014.

HAVEL, R. J.; EDER, H. A.; BRAGDON, J. H. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. **J Clin Invest**, v. 34, n. 9, p. 1345-53, Sep 1955.

HO, Y. K. et al. Low-density lipoprotein (LDL) receptor activity in human acute myelogenous leukemia cells. **Blood**, v. 52, n. 6, p. 1099-114, Dec 1978.

HUANG, H. et al. Learning from biology: synthetic lipoproteins for drug delivery. **Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol**, v. 7, n. 3, p. 298-314, 2015 May-Jun 2015.

HUNGRIA, V. T. et al. Metabolism of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) in patients with multiple myeloma and a preliminary clinical study of LDE as a drug vehicle for the treatment of the disease. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 53, n. 1, p. 51-60, Jan 2004.

JAIN, R. K.; STYLIANOPOULOS, T. Delivering nanomedicine to solid tumors. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 7, n. 11, p. 653-64, Nov 2010.

KATHE, N.; HENRIKSEN, B.; CHAUHAN, H. Physicochemical characterization techniques for solid lipid nanoparticles: principles and limitations. **Drug Dev Ind Pharm**, v. 40, n. 12, p. 1565-75, Dec 2014.

KRETZER, I. F.; MARIA, D. A.; MARANHÃO, R. C. Drug-targeting in combined cancer chemotherapy: tumor growth inhibition in mice by association of paclitaxel and etoposide with a cholesterol-rich nanoemulsion. **Cell Oncol (Dordr)**, v. 35, n. 6, p. 451-60, Dec 2012.

LAHOUTE, C. et al. Adaptive immunity in atherosclerosis: mechanisms and future therapeutic targets. **Nat Rev Cardiol**, v. 8, n. 6, p. 348-58, Jun 2011.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

LEITE, A. C. et al. Use of combined chemotherapy with etoposide and methotrexate, both associated to lipid nanoemulsions for atherosclerosis treatment in cholesterol-fed rabbits. **Cardiovasc Drugs Ther**, v. 29, n. 1, p. 15-22, Feb 2015.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 32, n. 9, p. 2045-51, Sep 2012.

LOBATTO, M. E. et al. Perspectives and opportunities for nanomedicine in the management of atherosclerosis. **Nat Rev Drug Discov**, v. 10, n. 11, p. 835-52, Nov 2011.

LOURENÇO-FILHO, D. D. et al. An artificial nanoemulsion carrying paclitaxel decreases the transplant heart vascular disease: a study in a rabbit graft model. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v. 141, n. 6, p. 1522-8, Jun 2011.

MARANHÃO, R. C. et al. Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling low-density lipoprotein. **Lipids**, v. 28, n. 8, p. 691-6, Aug 1993.

_____. Plasma kinetics and biodistribution of a lipid emulsion resembling low-density lipoprotein in patients with acute leukemia. **Cancer Res**, v. 54, n. 17, p. 4660-6, Sep 1994.

_____. Association of carmustine with a lipid emulsion: in vitro, in vivo and preliminary studies in cancer patients. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 49, n. 6, p. 487-98, Jun 2002.

_____. Paclitaxel associated with cholesterol-rich nanoemulsions promotes atherosclerosis regression in the rabbit. **Atherosclerosis**, v. 197, n. 2, p. 959-66, Apr 2008.

MATOBA, T.; EGASHIRA, K. Nanoparticle-mediated drug delivery system for cardiovascular disease. **Int Heart J**, v. 55, n. 4, p. 281-6, 2014.

MATUSZAK, J. et al. Nanoparticles for intravascular applications: physicochemical characterization and cytotoxicity testing. **Nanomedicine (Lond)**, v. 11, n. 6, p. 597-616, Mar 2016.

MENDES, S. et al. Uptake by breast carcinoma of a lipidic nanoemulsion after intralesional injection into the patients: a new strategy for neoadjuvant chemotherapy. **Gynecol Oncol**, v. 112, n. 2, p. 400-4, Feb 2009.

MORACHIS, J. M.; MAHMOUD, E. A.; ALMUTAIRI, A. Physical and chemical strategies for therapeutic delivery by using polymeric nanoparticles. **Pharmacol Rev**, v. 64, n. 3, p. 505-19, Jul 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 16 1983.

NAKAGAWA, T. et al. Marked hypocholesterolemia in a case with adrenal adenoma--enhanced catabolism of low density lipoprotein (LDL) via the LDL receptors of tumor cells. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 80, n. 1, p. 92-6, Jan 1995.

ONTARIO, H. Q. Paclitaxel Drug-Eluting Stents in Peripheral Arterial Disease: A Health Technology Assessment. **Ont Health Technol Assess Ser**, v. 15, n. 20, p. 1-62, 2015.

PALOMBO, M. et al. Pharmaceutical and toxicological properties of engineered nanomaterials for drug delivery. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 54, p. 581-98, 2014.

PFENNIGER, A.; CHANSON, M.; KWAK, B. R. Connexins in atherosclerosis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1828, n. 1, p. 157-66, Jan 2013.

PIRES, L. A. et al. 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**, v. 63, n. 2, p. 281-7, Jan 2009.

REDGRAVE, T. G.; ROBERTS, D. C.; WEST, C. E. Separation of plasma lipoproteins by density-gradient ultracentrifugation. **Anal Biochem**, v. 65, n. 1-2, p. 42-9, May 1975.

RODRIGUES, D. G. et al. Use of a cholesterol-rich emulsion that binds to low-density lipoprotein receptors as a vehicle for paclitaxel. **J Pharm Pharmacol**, v. 54, n. 6, p. 765-72, Jun 2002.

_____. Improvement of paclitaxel therapeutic index by derivatization and association to a cholesterol-rich microemulsion: in vitro and in vivo studies. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 55, n. 6, p. 565-76, Jun 2005.

RUIZ, J. et al. The apoE isoform binding properties of the VLDL receptor reveal marked differences from LRP and the LDL receptor. **J Lipid Res**, v. 46, n. 8, p. 1721-31, Aug 2005.

RUIZ, M. E.; GANTNER, M. E.; TALEVI, A. Applications of nanosystems to anticancer drug therapy (Part II. Dendrimers, micelles, lipid-based nanosystems). **Recent Pat Anticancer Drug Discov**, v. 9, n. 1, p. 99-128, Jan 2014.

SERCOMBE, L. et al. Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. **Front Pharmacol**, v. 6, p. 286, 2015.

SETYAWATI, M. I. et al. Understanding and exploiting nanoparticles' intimacy with the blood vessel and blood. **Chem Soc Rev**, v. 44, n. 22, p. 8174-99, Nov 2015.

TALEVI, A.; GANTNER, M. E.; RUIZ, M. E. Applications of nanosystems to anticancer drug therapy (Part I. Nanogels, nanospheres, nanocapsules). **Recent Pat Anticancer Drug Discov**, v. 9, n. 1, p. 83-98, Jan 2014.

TAVARES, E. R. et al. Reduction of atherosclerotic lesions in rabbits treated with etoposide associated with cholesterol-rich nanoemulsions. **Int J Nanomedicine**, v. 6, p. 2297-304, 2011.

TEIXEIRA, R. S.; CURI, R.; MARANHÃO, R. C. Effects on Walker 256 tumour of carmustine associated with a cholesterol-rich microemulsion (LDE). **J Pharm Pharmacol**, v. 56, n. 7, p. 909-14, Jul 2004.

TEIXEIRA, R. S. et al. Delivery of daunorubicin to cancer cells with decreased toxicity by association with a lipidic nanoemulsion that binds to LDL receptors. **J Pharm Pharmacol**, v. 60, n. 10, p. 1287-95, Oct 2008.

VALDUGA, C. J. et al. Use of a cholesterol-rich microemulsion that binds to low-density lipoprotein receptors as vehicle for etoposide. **J Pharm Pharmacol**, v. 55, n. 12, p. 1615-22, Dec 2003.

VITOLS, S. et al. Uptake of low density lipoproteins by human leukemic cells in vivo: relation to plasma lipoprotein levels and possible relevance for selective chemotherapy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 7, p. 2598-602, Apr 1990.

WANI, M. C.; HORWITZ, S. B. Nature as a remarkable chemist: a personal story of the discovery and development of Taxol. **Anticancer Drugs**, v. 25, n. 5, p. 482-7, May 2014.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

WONG, C. et al. Multistage nanoparticle delivery system for deep penetration into tumor tissue. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 6, p. 2426-31, Feb 2011.

ZHANG, D. et al. Paclitaxel: new uses for an old drug. **Drug Des Devel Ther**, v. 8, p. 279-84, 2014. ISSN 1177-8881.