

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

Uso de metotrexato associado à nanopartícula rica em colesterol
(LDE) para tratamento da aterosclerose

Adriana Bulgarelli

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão

São Paulo
2010

Ficha Catalográfica

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

Bulgarelli, Adriana
B933u Uso de metotrexato associado à nanopartícula rica em colesterol
(LDE) para tratamento da aterosclerose / Adriana Bulgarelli. --
São Paulo, 2010.
82p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Maranhão, Raul Cavalcante

1. Aterosclerose 2. Farmacoterapia I. T. II. Maranhão, Raul
Cavalcante, orientador.

616.136 CDD

Adriana Bulgarelli

Uso de metotrexato associado à nanopartícula rica em colesterol
(LDE) para tratamento da aterosclerose

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

“A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É esta a emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e arte. O homem que desconhece esse encanto, incapaz de sentir admiração e estupefação, esse já está, por assim dizer, morto e tem os olhos extintos.”

Albert Einstein

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Ivani e José Eduardo
e aos meus irmãos Fernanda e Thiago, pelo apoio e
amor incondicional

Ao meu amor Ruy, pelo
amor e carinho constante, pelo apoio e compreensão

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que participaram deste trabalho. De forma especial gostaria de agradecer:

A meu orientador Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão, por ter confiado a mim este trabalho, pela oportunidade de aprender e colaborar em seu grupo de pesquisa, pela orientação e incentivo, por todos os ensinamentos ao longo desses quatro anos;

À Dra. Adriana Abalen Martins Dias pela colaboração neste trabalho e pelas orientações nos experimentos de PCR em tempo real;

Aos meus grandes amigos Andrea Seixas, Andrea Trevisan, Fábio Piccoli, Fernanda Góes e Roberta Felix, pelos divertidos encontros, pelo carinho e amizade e por todas as risadas compartilhadas!;

À minha amiga 'mais querida' Cristina Pio de Almeida, pela grande amizade e carinho, pelo apoio e parceria, pela ajuda em todos os momentos alegres e difíceis, pelas discussões científicas, obrigada por tudo!;

Aos colegas do laboratório de Metabolismo de Lípidos, Iara Kretzer, Thaís Contente, Ana Carolina Gagliardi, Marília Oliveira, Juliana Vinagre, Fernanda Pozzi, Fernanda Maniero, Fabíola Filippin, Tatiane Oliveira, Tatiana Solano, Marina Bertato, Antônio Carlos Junior, Jeferson da Silva, Jane Oba, Débora Deus, Claudete Valduga, Priscila Carvalho, Carmen Vinagre, Maria da Conceição Latrilha e Maria das Dores pela amizade e incentivo, pelo apoio, pela paciência, pelos "cafés da tarde", pelo acolhimento e ensinamentos e pelos momentos de risos e desabafos!;

À Creusa Dal Bó pela ajuda nos cálculos estatísticos incluídos nesse trabalho;

Ao Nelson da equipe do Biotério do Instituto do Coração, pela ajuda nos experimentos com animais;

À secretária do laboratório de Metabolismo de Lípidos, Sheila Loyolla, pela enorme competência e eficiência nos assuntos relacionados aos alunos e orientador;

Ao Instituto do Coração - diretores, docentes e funcionários, pela oportunidade de trabalhar nesta instituição e ter usufruído de toda infraestrutura que viabilizou a realização deste trabalho;

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação em Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Jorge Lima e Elaine Ychico por serem sempre tão prestativos, pela competência e atenção;

Às funcionárias da secretaria do departamento de Análise Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Ana Dantas e Sueli Providelo, pela atenção e competência;

À FAPESP pela bolsa concedida e pelo suporte financeiro para o desenvolvimento deste projeto;

À Banca Julgadora pelo tempo atribuído à leitura desta tese;

Aos meus pais, Ivani e José Eduardo, por todos os ensinamentos de vida, por toda a dedicação e amor incondicional e por tornarem meus sonhos possíveis;

Aos meus irmãos, Fernanda e Thiago, pelo amor e amizade, por todo apoio e carinho;

Aos meus sogros, Antônia e Ruy, pelo apoio e carinho constante;

Ao meu amor, Ruy, pelo prazer de viver ao seu lado, pelo apoio silencioso e gentil, pelo amor puro e desinteressado!

RESUMO

Bulgarelli, A. **Uso de metotrexato associado à nanopartícula rica em colesterol (LDE) para tratamento da aterosclerose.** São Paulo; 2010. [Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo].

O Metotrexato (MTX) é um fármaco utilizado como anti-inflamatório no tratamento da artrite reumatóide (AR). O risco de doença cardiovascular em pacientes com AR é menor quando tratados com MTX. Apesar dessa evidência, há poucos relatos da utilização de MTX para o tratamento da aterosclerose. Foi desenvolvida em nosso laboratório uma nanopartícula rica em colesterol (LDE), a qual é reconhecida pelos receptores da lipoproteína de baixa densidade (LDLr) após injeção na corrente sanguínea. A LDE concentra-se em células com hiperexpressão de LDLr, em processos proliferativos como a aterosclerose. Dessa maneira, a LDE pode ser utilizada como veículo para o direcionamento de fármacos contra essas células. A molécula de MTX foi latenciada e a modificação do fármaco aumentou a sua incorporação à LDE. A proposta desse estudo foi avaliar a eficácia de MTX associado à LDE (LDE-MTX) no tratamento da aterosclerose em coelhos além de investigar o efeito desse complexo na expressão de genes inflamatórios que participam do processo aterogênico. Para realização do estudo foram utilizados quatro grupos de 10 coelhos (raça New Zealand) cada, sendo que todos foram submetidos a uma dieta rica em colesterol por 8 semanas. Após as primeiras 4 semanas de dieta, os grupos foram tratados com LDE-MTX (grupo LDE-MTX), MTX comercial (grupo MTX comercial), LDE (grupo controle LDE) ou solução salina (grupo controle Salina), via endovenosa por 4 semanas. O grupo LDE-MTX não apresentou toxicidade ao longo do tratamento de acordo com os parâmetros utilizados, enquanto que o grupo MTX comercial apresentou uma queda acentuada de eritrócitos ao final do tratamento ($p < 0,001$). A análise morfométrica macroscópica mostrou que os grupos LDE-MTX e MTX comercial reduziram as lesões ateroscleróticas quando comparados ao grupo controle Salina (66 e 76%, respectivamente) ($p < 0,001$). Por microscopia, a camada íntima do arco aórtico e torácico foi reduzida nos grupos LDE-MTX (67% e

75%) e MTX comercial (81% e 92%, respectivamente) quando comparados com os mesmos fragmentos do grupo controle Salina ($p < 0,05$). A presença de macrófagos na camada íntima dos grupos LDE-MTX e MTX comercial foi reduzida em 59% e 57% ($p < 0,001$) no arco aórtico e 37% e 38% na região da aorta torácica ($p = 0,016$) em relação ao grupo controle Salina, respectivamente. A porcentagem de MMP-9 no arco aórtico foi reduzida em 48% em ambos os grupos tratados ($p = 0,0003$), enquanto que na aorta torácica LDE-MTX e MTX comercial diminuíram 54% e 66% ($p < 0,0001$) respectivamente, em relação ao grupo controle Salina. Na região da aorta abdominal, a redução de MMP-9 também foi observada nos grupos LDE-MTX (68%) e MTX comercial (70%) ($p = 0,016$). Quando se comparou ao grupo controle LDE, os dois grupos tratados tiveram porcentagens semelhantes de redução em todas as análises morfométricas. Nos estudos de expressão gênica *in vivo*, 5 genes inflamatórios se mostraram hipoexpressos (TNF- α , MCP-1, IL-1 β , IL-18 e MMP-12) e um gene (IL-10) apresentou aumento de expressão no arco aórtico de coelhos tratados com LDE-MTX em relação ao grupo controle. No experimento *in vitro*, 5 dos 10 genes (TNF- α , VAP-1, IL-1 β , CXCL2 e TLR2) avaliados tiveram redução da expressão e 1 (TGF- β 1) se mostrou hiperexpresso na linhagem de endotélio humana (HUVEC) tratada com as duas formulações de MTX. Os resultados indicam que tanto a LDE-MTX quanto MTX comercial reduzem acentuadamente as lesões ateroscleróticas em coelhos e parecem minimizar a resposta inflamatória na doença aterosclerótica. Contudo, LDE-MTX apresentou uma tolerabilidade maior ao tratamento, pois não apresentou toxicidade hematológica em comparação com MTX comercial.

Palavras chaves: Aterosclerose. Nanopartícula. Metotrexato.

ABSTRACT

Bulgarelli, A. **[Use of methotrexate associated to a cholesterol-rich nanoparticle (LDE) for atherosclerosis treatment]**. São Paulo; 2010. [Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo].

Methotrexate (MTX) is the most frequently used drug for rheumatoid arthritis treatment. The incidence of vascular disease in these patients is lower when treated with MTX. However, few studies have been done using MTX for atherosclerosis treatment. In previous studies, we showed that, after injection into blood stream, a cholesterol-rich nanoparticle (LDE) binds to low density lipoprotein receptors (LDLr) and concentrates in tissues with intense cell proliferation such as atherosclerosis. LDE may thus carry drugs directed against those tissues reducing the toxicity of chemotherapeutic agents. For stable association with LDE, a lipophylic methotrexate derivative was used. The purpose of this study was to test MTX associated to LDE (LDE-MTX) in rabbits with atherosclerosis and investigate their anti-inflammatory effects on inflammatory mediators. Atherosclerosis was induced in rabbits by cholesterol rich diet during eight weeks. After 4 weeks from the introduction of the atherogenic diet, 4 groups of 10 animals were treated with LDE-MTX (LDE-MTX group), commercial MTX (commercial MTX Group), LDE (LDE control group) and saline solution (Saline control group). MTX dose in both preparations was 4mg/kg/week during 4 additional weeks. LDE-MTX group showed superior tolerability with pronouncedly lesser hematologic toxicity in comparison to commercial MTX ($p < 0.001$). By morphometric analysis, both LDE-MTX and commercial MTX treatment groups showed a pronounced reduction of lesion area compared with Saline control group (66-76% respectively) ($p < 0.001$). By microscopy, intimal width at aortic arch and thoracic segments was reduced by 67% and 75% in LDE-MTX group compared to Saline control group, respectively ($p < 0.05$). Commercial MTX group showed a reduction of 81% and 92% at aortic arch and thoracic segments compared to Saline control group, respectively ($p < 0.05$). Presence of macrophages in intima layer at aortic arch was reduced by 59% and 57% ($p < 0.001$) in LDE-MTX and commercial MTX

groups while at thoracic segments was diminished by 37% and 38% ($p=0.016$) compared to Saline control group, respectively. MMP-9 percentage was diminished by 48% in both treated groups at aortic arch ($p=0.0003$) while at thoracic segment, LDE-MTX and commercial MTX reduced by 54% and 66% ($p<0.0001$) compared to Saline control group, respectively. Furthermore, MMP-9 percentage also diminished at abdominal segment in LDE-MTX group (68%) and commercial MTX (70%) when compared to Saline control group ($p=0,016$). When compared to LDE control group, both treated groups had similar percentage reduction in all morphometric analysis. In vivo studies, the expression of 5 inflammatory genes was downregulated (TNF- α , MCP-1, IL-1 β , IL-18 and MMP-12) and 1 was upregulated (IL-10) when rabbits with induced atherosclerosis were treated with LDE-MTX. Besides, 5 inflammatory genes were downregulated (TNF- α , VAP-1, IL-1 β , CXCL2 e TLR2) and 1 was upregulated (TGF- β 1) when human endothelial cell line (HUVEC) was treated with both MTX preparations. Therefore, MTX can be an effective drug for atherosclerosis treatment and associated to LDE, side effects of this chemotherapeutic agent can be minimized.

Keywords: LDE, methotrexate, atherosclerosis