

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**Avaliação dos efeitos antitrombótico e antiinflamatório da
roxitromicina – experimento randomizado em coelhos**

Autor: Pitágoras Pinto Scipioni

Orientador: Paulo Dornelles Picon

Dissertação de Mestrado

**Porto Alegre
2004**

Agradecimentos

Ao meu pai, Gentil Scipioni, e à minha mãe, Dalja Martins Pinto Scipioni, por terem me dado a vida e me ensinarem a viver com amor e dignidade.

À minha avó Itália e minha tia Maria de Lourdes, pelo apoio, estímulo e carinho recebidos.

À minha esposa Cynthia Martini Scipioni e minha filha Laura Martini Scipioni, pela compreensão e infindável carinho.

Aos colegas de profissão que colaboraram nos dias difíceis: Edgar Augusto Bodanezi, Aristóteles Scipioni e Rubens Rodriguez.

Aos acadêmicos de medicina Carolina N. Feres, Dayana Volpato, Daniel L. Varela, Edelaide P. Raquel, Paula X. Picon e Marcos Mossman, que efetivamente atuaram no projeto com brilhante desempenho e que foram auxiliados pelos colegas Aiglon S. Neto, Ciro R. K. Bohrer, Luciano Manzato e Osvaldo Herrera, cuja atuação decidida e resoluta facilitou a realização deste trabalho.

Às Dras. Adriana Silveira de Almeida e Márcia Fontana, que deram início ao projeto de pesquisa que gerou esta tese.

Às secretárias da Faculdade de Medicina da UPF, Ionara Notari e Rosemari Laimer, que estiveram presentes em todos os dias desta caminhada.

Ao Prof. Dr. Paulo Dornelles Picon, orientador incansável, cientista e amigo, que me ensinou o prazer da pesquisa médica e da procura da verdade.

Ao Dr. Andry F. Costa, pela presença constante em todos os passos do estudo.

Ao Prof. Dr. Gilboé Lângaro Mendes, pelo permanente estímulo e auxílio na elaboração da tese.

Aos meus professores da UFRGS que fizeram parte do Programa de Pós-Graduação em Medicina, em especial à Prof. Dra. Sandra Fuchs, ao Prof. Dr. Hugo Lisboa e à Prof. Dra. Karen Oppermann Lisboa, por nos terem propiciado ensinamentos de mudança na nossa vida profissional.

Aos colegas de turma do segundo grupo de mestrados do Mestrado Interinstitucional UFRGS-UPF, pelo coleguismo, incentivo e apoio durante todo esse tempo.

Ao diretor da Faculdade de Medicina de Passo Fundo, Prof. Dr. Luís Carlos Manzato, bem como seu ex-diretor, Prof. Dr. Douglas Pedroso, pelo estímulo e carinho durante toda a jornada.

Ao Prof. Dr. Sérgio Machado Porto e funcionários do Biotério da UPF, pela atenção e trabalho de apoio.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
2. REVISÃO DA LITERATURA	8
2.1 Efeito Antitrombótico dos Macrolídeos.....	8
2.2 Efeito Antiinflamatório dos Macrolídeos	14
2.3 A Roxitromicina	16
2.4 Modelo experimental de aterosclerose e trombose arterial	18
2.5 Desendotelização aórtica com balão	18
2.6 Veneno de Víbora Russellis (vvR) e Adrenalina	19
2.7 Modelo de Edema de Orelha e Óleo de Cróton.....	21
3. OBJETIVOS.....	22
3.1 Gerais	22
3.2 Específicos.....	22
4. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....	23
5. ARTIGO CIENTÍFICO EM INGLÊS	30
6. ARTIGO CIENTÍFICO EM PORTUGUÊS	49

LISTA DE ABREVIATURAS

AIQ (amplitude interquartil)

vvR (veneno de víbora *Russellis*)

IAM (infarto agudo do miocárdio)

UPF (Universidade de Passo Fundo)

UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

1. INTRODUÇÃO

O papel da infecção na patogênese da aterosclerose foi proposto, primeiramente, por Sir Willian Osler, em 1908¹, porém essa visão não obteve grande aceitação. Atualmente, existe um interesse renovado em verificar a contribuição das infecções na patogênese e progressão da cardiopatia isquêmica. Roos² emitiu o conceito atual da aterosclerose, que se encontra centrado no modelo de “resposta à lesão” e sugere que a infecção possa contribuir para a formação da aterosclerose via lesão ao endotélio vascular, juntamente com mecanismos inflamatórios, metabólicos e hemostáticos. Na década de 70, foi demonstrada a formação de lesões ateroscleróticas em artérias de galinhas infectadas, experimentalmente, por um herpes virus³. O *Helicobacter pylori*, descoberta recente como agente etiológico da úlcera péptica, outra doença crônica, sugere que uma etiologia infecciosa para a aterosclerose não deve ser desconsiderada⁴. Desde então, têm sido relatadas associações entre cardiopatia isquêmica e algumas bactérias Gram negativas (*Chlamydia pneumoniae* e *Helicobacter pylori*) e certos vírus (herpes, citomegalovirus)⁵. A maioria dos trabalhos publicados consiste em estudos epidemiológicos baseados em associações entre sorologia dos respectivos anticorpos e cardiopatia isquêmica, ou em evidências imuno-histoquímicas da presença de bactérias ou vírus em lesões ateroscleróticas. Recentemente, ensaios clínicos randomizados mostraram novas evidências, reforçando a teoria infecciosa na patogênese da cardiopatia isquêmica⁶⁻⁸.

As propriedades antiinflamatórias dos macrolídeos nas doenças respiratórias foram estudadas por diversos autores em doenças como panbronquiolite difusa⁴⁰, asma⁴⁴, fibrose cística¹¹ e bronquiectasia¹².

Baseados na teoria infecciosa da aterosclerose e no provável efeito antiinflamatório dos macrolídeos, testou-se a roxitromicina para a diminuição da taxa de trombose após desendotelização e manipulação farmacológica, além da diminuição do índice de edema de orelha desencadeado por um agente irritante, em coelhos Nova Zelândia.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Efeito Antitrombótico dos Macrolídeos

Apesar de notáveis avanços (identificação dos fatores de risco, aliada ao esclarecimento de diversos mecanismos fisiopatológicos de instalação e progressão da doença, permitindo o estabelecimento de um tratamento preventivo), as doenças cardiovasculares constituem, ainda, a primeira causa de morte na maior parte dos países do mundo.

A aterosclerose, denominador comum das diversas doenças cardiovasculares, é um processo complexo, que geralmente começa vinte a trinta anos antes da apresentação clínica, para a qual alguns mecanismos foram propostos. Com relação ao desenvolvimento da doença, a teoria mais aceita hoje é a da “resposta a lesão”^{2,13}. Diversos fatores, entre os quais hipertensão arterial, dislipidemia, diabete melito e tabagismo, promoveriam alterações na função endotelial vascular, pedra fundamental para o início da lesão aterosclerótica. Outros mecanismos entrariam, então, em ação para promover o surgimento da lesão aterosclerótica madura. Como a maior parte desses, envolve mediadores inflamatórios, alguns autores caracterizaram a aterosclerose como doença inflamatória¹⁴. Como nem sempre é possível identificar, nos pacientes portadores de doenças cardiovasculares, os fatores de risco clássicos ou os mecanismos e mediadores inflamatórios envolvidos, novos mecanismos e fatores de risco foram propostos nos últimos anos. Dentre esses, a hipótese infecciosa é uma das mais importantes, não só por implicar fisiopatologia diferente como

pelo seu potencial significado terapêutico. Diversos agentes infecciosos já foram apontados como possivelmente envolvidos no processo aterosclerótico (herpes vírus, citomegalovírus, *Helicobacter pylori*, *Porphyromonas gengivalis*, *Streptococcus sanguis*, *Chlamydia pneumoniae* e uma eventual combinação de múltiplos agentes infecciosos). A *Chlamydia sp.* tem merecido maior atenção e sobre a qual existe maior número de publicações científicas.

A *Chlamydia pneumoniae* é um importante agente infeccioso do trato respiratório, que responde por até 10% dos casos de pneumonia adquirida na comunidade^{15,16}. Descrito pela primeira vez em 1989 por Grayston *et al.*¹⁵, esse agente apresenta elevada prevalência na população em geral. Inquéritos soropidemiológicos indicam que, virtualmente, todas as pessoas são infectadas ao menos uma vez durante a vida^{17,18}. As taxas de reinfecção oscilam de 9,2/100 pessoas-ano na infância a 1,5/100 pessoas-ano para maiores de vinte anos de idade¹⁹. A reinfecção desenvolve um processo respiratório menos intenso, mas alguns autores sugerem que pode induzir vasculite isolada e sistêmica em qualquer órgão do corpo²⁰. A infecção primária, associada ou não a episódios de reinfecção, pode conduzir a um estado de infecção crônica que, segundo diversos autores, é a base fundamental para o desenvolvimento da lesão aterosclerótica. As informações científicas sobre o envolvimento da *C. pneumoniae* com a aterosclerose podem ser classificadas como imunológicas, anatomopatológicas, experimentais e clínicas:

a) Imunológicas

Uma análise retrospectiva²¹ utilizando o plasma de pacientes incluídos no estudo de Helsinque, coletado três a seis meses antes do evento cardiovascular, revelou que títulos elevados de anticorpos contra *C. pneumoniae* indicam risco duas a três vezes maior de desenvolver infarto do miocárdio, independentemente de idade, hipertensão arterial ou tabagismo.

Outro estudo recente²² demonstrou que ocorre elevação significativa dos títulos de anticorpos específicos para *C. pneumoniae* em resposta à angioplastia coronariana. Esses

dados sugerem que a ruptura da placa pelo processo de angioplastia pode expor antígenos da *C. pneumoniae* ao sistema imune, induzindo resposta secundária ou reativação da memória imunológica.

Entretanto não foram demonstradas associações entre soropositividade para *C. pneumoniae* (IgG) e risco de infarto do miocárdio em um estudo envolvendo homens com perfil socioeconômico homogêneo e controlados para idade, fumo e outros fatores de risco²³.

b) Anatomopatológicas

Muhlestein *et al.*²⁴ encontraram evidências de *C. pneumoniae* em 79% do material proveniente de aterectomia em noventa pacientes sintomáticos com diagnóstico de doença isquêmica do coração.

Em um estudo retrospectivo²⁵, foi analisado o soro coletado, em média, 8,8 anos antes da morte e os tecidos de autópsia de sesenta índios nativos do Alasca, com baixo risco para doença isquêmica do coração. As causas de morte foram não vasculares em 97% das vezes. A *C. pneumoniae*, encontrada freqüentemente dentro dos macrófagos, foi observada em 22 indivíduos (36%). A razão de chance para o encontro de *C. pneumoniae* na placa de ateroma para títulos sorológicos de anticorpos da classe IgG maiores que 1:256, mais de oito anos antes, foi de 6,1. A conclusão foi que a evidência sorológica de infecção por *C. pneumoniae*, freqüentemente, precede as lesões ateroscleróticas que abrigam este agente infeccioso, sugerindo que a infecção crônica tem papel na gênese e no desenvolvimento da aterosclerose.

c) Experimentais

Muhlestein *et al.*²⁶ realizaram a inoculação de *C. pneumoniae* em vinte coelhos Nova Zelândia, em intervalos de três semanas, e os compararam a um grupo de dez controles inoculados com solução salina. Todos os animais receberam dieta com suplementação de colesterol e foram distribuídos aleatoriamente para receber ou não tratamento antibiótico com azitromicina por sete semanas. Após três meses, os animais

foram mortos e secções das aortas foram examinadas para pesquisa de espessamento da camada íntima, além da pesquisa da presença da *C. pneumoniae* por imunofluorescência. Os resultados demonstraram que o espessamento da íntima foi mais intenso nos animais infectados quando comparados aos de controle. Os autores observaram ainda que tais modificações não ocorreram nos animais tratados com a azitromicina. O antígeno da *C.pneumoniae* foi detectado em dois animais não tratados, em três tratados e não foi detectado nos animais do grupo de controle.

Em coelhos infectados via nasofaringe com *C. pneumoniae* e divididos em três grupos (grupo de controle, grupo que recebeu claritromicina precoce e grupo que recebeu claritromicina tardia), o tratamento precoce foi mais efetivo do que o tratamento tardio. Dos coelhos infectados e não tratados, oito desenvolveram lesões ateroscleróticas, ao passo que dois do grupo de tratamento precoce tiveram mudanças similares ($P=0,037$ – 75% de eficácia). No grupo de tratamento tardio, três coelhos desenvolveram lesões precoces de aterosclerose ($P=0,07$ – 62,5% de redução quando comparado ao grupo de controle não tratado), tendendo à significância estatística. Neste estudo, também foram comparados mais dois grupos de coelhos não infectados e alimentados com dieta enriquecida de colesterol (0,5%), sendo um deles tratado com claritromicina 30 mg/kg/dia por seis semanas para testar um possível efeito antiinflamatório dos macrolídeos. A claritromicina não apresentou efeito na redução da prevalência, mas reduziu a extensão da aterosclerose nos coelhos alimentados com colesterol para 17% quando comparados aos de controle não tratados²⁷.

d) Clínicas

No estudo Roxis⁶ foi avaliada uma população de pacientes com angina instável ou infarto do miocárdio não-Q; além do tratamento clássico, os indivíduos foram distribuídos aleatoriamente para receber ou não, por trinta dias, tratamento com o antibiótico roxitromicina, na dose de 150 mg duas vezes ao dia. Ao final de 31 dias, o número de eventos (isquemia recorrente grave, infarto do miocárdio não fatal e fatal) foi significativamente maior no grupo de pacientes não tratados com o antibiótico (9 contra 2

eventos, $P = 0,03$), sugerindo, assim, o efeito benéfico do tratamento. Em uma nova análise após 180 dias de acompanhamento, os autores não mais observaram diferença significativa entre os dois grupos com relação aos eventos cardiovasculares²⁸.

Uma população de sobreviventes de infarto do miocárdio foi avaliada com relação à presença de anticorpos contra *C. pneumoniae*⁷. A população na qual o título de anticorpos era elevado foi distribuída aleatoriamente para receber ou não tratamento com azitromicina. Os pacientes foram acompanhados por um período médio de 18 meses, tendo a incidência de eventos cardiovasculares apresentado relação direta com os títulos dos anticorpos. Por outro lado o risco de eventos na população tratada foi semelhante ao encontrado na população com sorologia negativa, sugerindo, dessa forma, um possível efeito do antibiótico em reduzir o risco de eventos cardiovasculares nos pacientes com infarto e títulos elevados de anticorpos contra *C. pneumoniae*.

O Academic⁸ foi um estudo de prevenção secundária, randomizado e duplo-cego, para testar a hipótese de que a azitromicina reduz os níveis séricos dos marcadores sistêmicos de inflamação (proteína C reativa, interleucina-1 e interleucina-6), os títulos de anticorpos contra *C. pneumoniae* e eventos cardiovasculares em pacientes com doença isquêmica do coração. Foram randomizados trezentos pacientes para receber, por três meses, azitromicina ou placebo. Os dados preliminares referentes a seis meses de acompanhamento não demonstraram diferenças entre os grupos no que se refere aos títulos de anticorpos e aos eventos cardiovasculares. Por outro lado, os autores observaram estabilização nos níveis dos marcadores inflamatórios (interleucina-6 e proteína C reativa) no grupo tratado com azitromicina.

O estudo de caso-controle²⁹ que avaliou uma base de dados referente a 3.315 casos de infarto do miocárdio com idade inferior a 75 anos e 13.139 controles sem infarto no período de 1992 a 1997 pesquisou os antibióticos utilizados por esses indivíduos. Observou que os pacientes que sofreram infarto do miocárdio tinham feito uso significativamente maior de tetraciclina ou quinolonas. Esse efeito não foi observado com os macrolídeos

(essencialmente eritromicina, já que os demais macrolídeos são mais recentes), sulfonamidas, penicilinas ou cefalosporinas. Esses achados, provenientes de uma análise de um grande estudo caso-controle, proporcionam evidência adicional, embora indireta, da associação entre infecções bacterianas por organismos sensíveis à tetraciclina ou quinolona e risco de infarto do miocárdio.

Outros estudos clínicos não demonstraram benefício no uso de macrolídeos e na redução de eventos cardíacos. O ensaio Wizard (*Weekly Intervention with Zithromax for Atherosclerosis and its Related Disorders*)³⁰ randomizou 7.747 pacientes com doença coronariana para um período de três meses de azitromicina (600 mg/dia) ou placebo. O estudo Azacs (*Azithromycin in Acute Coronary Syndrome*)³¹ avaliou a eficácia da azitromicina por um período de quatro dias em um ensaio controlado por placebo que recrutou 1.436 pacientes com síndrome coronariana aguda. Em ambos não houve benefício do tratamento com azitromicina em situações de doença coronariana estável ou aguda.

O ensaio Antibio (*Antibiotic Therapy after an Acute Myocardial Infarction*)³² não mostrou diferença entre os pacientes que receberam roxitromicina e aqueles que receberam placebo com referência à mortalidade, aos desfechos combinados ou outros eventos clínicos. Foram avaliados 872 pacientes internados com infarto agudo do miocárdio, sendo randomizados em 49 horas para tratamento habitual associado a seis semanas de tratamento com roxitromicina ou com placebo. Após 12 meses, as taxas de mortalidade foram semelhantes nos dois grupos ($P = 0,739$). As principais limitações desse ensaio foram o baixo poder estatístico, secundário ao recrutamento lento e insuficiente (3.922 pacientes originalmente planejados e apenas 872 estudados) e uma taxa de desistência de 18% dentro do braço da roxitromicina em virtude dos efeitos colaterais gastrointestinais.

O estudo Isar (*Intracoronary Stenting and Antibiotic Regimen Trial*)³³, ensaio clínico, duplo-cego, randomizado incluiu 1.010 pacientes que foram submetidos a implante de *stent* coronariano e avaliou os efeitos da proliferação da neoíntima. Os pacientes foram randomizados para placebo ($n=504$) ou roxitromicina 300 mg/dia ($n=506$) por 28 dias.

Concluiu-se que a administração de roxitromicina durante quatro semanas depois de uma angioplastia com implante de *stent*, não reduz a incidência de eventos cardíacos agudos maiores, a incidência de estenose e a necessidade de novos procedimentos de revascularização. Também não houve melhora da evolução clínica dos pacientes oito meses após o procedimento.

2.2 Efeito Antiinflamatório dos Macrolídeos

Em 1981 foi descrita uma nova doença, denominada “panbronquiolite difusa”, que cursa com sinusobronquite crônica, de etiologia desconhecida. Ocorre mais comumente em pacientes asiáticos e acima de vinte anos, sem predomínio de sexo, e apresenta elevado índice de mortalidade³⁴. O diagnóstico definitivo é feito por exame anatomo-patológico com visualização microscópica de linfócitos e plasmócitos infiltrados nas paredes dos bronquíolos terminais, ductos alveolares e alvéolos, formando a panbronquiolite difusa³⁵. Atentos ao alto índice de mortalidade encontrado em pacientes com esta patologia, sobrevivida de 42% em cinco anos nos indivíduos infectados por *Haemophilus influenza* e 8% nos infectados por *Pseudomonas aeruginosa*, um grupo de pesquisadores estimulados pelo Ministério da Saúde e Bem-Estar do Japão iniciou pesquisas com eritromicina para o tratamento desta doença, tendo obtido resultados promissores³⁶. Desde então, panbronquiolite difusa e eritromicina despertam interesse da comunidade científica ocidental, pois existem semelhanças entre esta patologia e fibrose cística no que diz respeito ao mecanismo inflamatório, à apresentação da doença pulmonar e à microbiologia do escarro¹¹.

Pacientes com doença crônica das vias aéreas, colonizados ou não por *Pseudomonas aeruginosa* (n =17), e voluntários saudáveis (n =8) tiveram lavado broncoalveolar analisado para verificar a presença de interleucina-8 (IL-8) e elastase de neutrófilo³⁷. Foram encontrados níveis elevados de IL-8 nos pacientes com doença crônica das vias aéreas colonizados ou não por *Pseudomonas aeruginosa* e aumento da elastase

de neutrófilo apenas nos doentes colonizados por esta bactéria. Três dos indivíduos colonizados e dois não colonizados receberam eritromicina por via oral na dose de 600 mg/dia num período de três meses e, após o término do tratamento apresentaram significativa redução nos níveis de IL-8 e elastase do neutrófilo.

Culturas de células epiteliais humanas foram tratadas com eritromicina, claritromicina e penicilina, sendo que níveis reduzidos de IL-8 foram encontrados nas culturas tratadas com macrolídeos, o que não ocorreu com o uso de penicilina, denotando uma possível exclusividade desse efeito a esta classe de antibióticos³⁸.

Células epiteliais de brônquio da linhagem BET-1A, conhecidas por regular a expressão de citocinas e quimiocinas, foram tratadas com eritromicina, observando-se supressão na expressão do RNA e liberação de IL-8, bem como inibição de fatores de transcrição e proteína ativadora-1 (AP-1)³⁹.

Células epiteliais brônquicas humanas, em um estudo *in vitro*, foram estimuladas com endotoxina do *Haemophilus influenzae*, às quais foi adicionado lactobionato de eritromicina, tendo havido conseqüente redução dos níveis séricos de moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) quando comparadas às culturas de controle⁹.

Nos pacientes com panbronquiolite difusa o lavado broncoalveolar tem leucotrieno B4 aumentado. Nove pacientes com essa patologia foram tratados com eritromicina 600 mg/dia por um período maior que seis meses, demonstrando ter havido redução dos níveis de leucotrieno B4 e melhora da função pulmonar desses doentes⁴⁰.

Redução do volume do escarro e melhora nas provas de função pulmonar também foram observados em pacientes com bronquiectasias tratados com eritromicina 500 mg duas vezes ao dia por oito semanas, quando comparados aos pacientes com bronquiectasias tratados com placebo¹².

A atividade imunossupressora dos antibióticos macrolídeos foi demonstrada em pacientes tratados com eritromicina 600 mg/dia e roxitromicina 150 mg/dia por um período

médio de dez meses em portadores de panbronquiolite difusa, através da redução importante na contagem da subpopulação de linfócitos T CD8+ no lavado bronco-alveolar⁴¹.

Pesquisando a inibição da secreção de cloro através do epitélio da traquéia de cães utilizando eritromicina, ampicilina, cefazolina e tetraciclina, verificou-se que apenas o macrolídeo apresentou atividade inibitória da secreção de íons cloretos no epitélio destes animais⁴².

Crianças com bronquiectasias, em um estudo duplo-cego controlado com placebo, receberam roxitromicina durante doze semanas para avaliar a hiper-reatividade brônquica; após esse prazo, houve redução da hiper-reatividade com aumento significativo da PD20. Essa redução da reatividade brônquica também foi encontrada em asmáticos atópicos e não atópicos após tratamento com eritromicina durante dez semanas¹⁰.

Para avaliar propriedades físicas da secreção nasal de pacientes com doença dos seios paranasais (n=10) e saudáveis (n=10) foi realizada uma análise *in vitro*, na qual ambos os grupos receberam por duas semanas claritromicina 500 mg duas vezes ao dia, ocorrendo redução da coesão, viscoelasticidade e do volume de secreção nasal⁴³.

Através de cultura, sorologia e reação de cadeia de polimerase foi demonstrada uma incidência de 9% dos pacientes asmáticos infectados por *Chlamydia pneumoniae*, evidenciando uma relação entre este microorganismo e asma. Três asmáticos graves usuários crônicos de corticóides e com títulos elevados de IgG anti-*Chlamydia pneumoniae* tratados com macrolídeos foram capazes de descontinuar a terapêutica com corticosteróides via oral, evidenciando que, além do efeito contra o microorganismo, houve ação antiinflamatória⁴⁴.

2.3 A Roxitromicina

Desde a descoberta da eritromicina em 1952, novos macrolídeos têm sido desenvolvidos. Esta classe de antimicrobianos tem apresentado ampla aceitação para uso, especialmente ambulatorial, por suas características⁴⁵: amplo espectro de ação

antibacteriana, excelente penetração tissular e intracelular, respeito ao ecossistema bacteriano, com pouca aparição de resistência bacteriana e grande segurança de emprego.

A principal limitação dos primeiros representantes desta classe antimicrobiana era sua farmacocinética. Os macrolídeos antigos têm absorção intestinal limitada, que se traduz por baixos níveis sangüíneos e pela necessidade de administração de múltiplas e elevadas doses, que podem ser causas de efeitos adversos digestivos.

Com o objetivo de melhorar a farmacocinética dos macrolídeos, foi desenvolvida uma molécula dotada de um espectro bacteriano similar ao da eritromicina - a roxitromicina - com as seguintes características: mesmo espectro de atividade *in vitro* que a eritromicina, com uma ligeira superioridade de ação sobre *Chlamydia sp.* e *Legionella sp.*; farmacocinética mais favorável, permitindo a administração de menores doses e a intervalos maiores; boa absorção (resistência à hidrólise gástrica); picos sangüíneos precoces, elevados e duráveis; meia-vida de eliminação de 12 horas (permitindo administração em duas vezes ao dia); boa e prolongada penetração tissular; elevadas concentrações intracelulares (indispensáveis à erradicação de germes intracelulares, como a *Chlamydia sp.* e *Legionella sp.*); apresentando ótimos resultados clínicos e tolerância⁴⁶⁻⁵¹.

A tolerância clínica estudada em 2165 pacientes foi de 96%, sendo que menos de 1,1% dos pacientes tiveram de interromper o tratamento.⁵²

O mecanismo de ação antimicrobiana da roxitromicina, como a dos outros macrolídeos, resulta da sua ligação entre as frações 50 S e 70 S dos ribossomos das bactérias alvo, inibindo a síntese protéica, apresentando uma ação essencialmente bacteriostática.⁵³

Após a ingestão de um comprimido de roxitromicina, a absorção é rápida e a estabilidade em meio ácido é superior à dos outros macrolídeos, visto que desde o décimo quinto minuto o antibiótico é encontrado no sangue⁵⁴. O pico sérico é atingido menos de duas horas após a ingestão em jejum. A roxitromicina liga-se de forma intensa (85-95%) à

alfa-1-glicoproteína ácida, sendo essa fixação saturável; no soro, fixa-se às proteínas em mais de 95%; a fixação na albumina é fraca e não saturável; somente a ligação sobre a alfa-1-glicoproteína ácida é importante e saturável; a fixação é nula sobre as gama-globulinas e as hemáceas⁵⁵.

2.4 Modelo experimental de aterosclerose e trombose arterial

Os pioneiros a descrever, em 1961, um modelo animal de indução de trombose arterial aguda através da manipulação farmacológica de fatores hemodinâmicos e da coagulação foram Constantinides e Chakravarti⁵⁶. Com a administração em seqüência de veneno de víbora Russellis (vvR) e de um vasopressor, reproduziam situações clínicas observadas em pacientes, como hipercoagulabilidade e alterações hemodinâmicas súbitas. Os animais eram tornados ateroscleróticos através de dieta rica em colesterol e, ao final de oito meses, eram mortos após a manipulação farmacológica (vvR e 30 minutos após vasopressor). A incidência de trombose observada foi de 25 a 38%.

Este modelo não foi utilizado durante mais de trinta anos, possivelmente porque somente na última década é que a ruptura da placa aterosclerótica foi reconhecida pela maioria dos investigadores como o fator primário e desencadeante de trombose. A evolução do conhecimento demonstrou que a trombose guarda íntima associação com a aterosclerose, superando a teoria vigente da década de 30, quando o processo trombótico era considerado secundário à hemorragia subplaca⁵⁷.

2.5 Desendotelização aórtica com balão

Foram dois pesquisadores russos os primeiros a lesar mecanicamente a parede arterial e, após, expor a hiperlipemia, observando que a aterosclerose se desenvolvia mais rápida e seletivamente nos sítios lesados.^{58,59} Esses dados foram confirmados e foi demonstrado que coelhos cuja aorta fora lesada desenvolveram em três semanas tanta

aterosclerose quanto os animais de controle desenvolveram em dois meses com dieta enriquecida com colesterol.⁶⁰

Em coelhos Nova Zelândia a lesão com balão associada à hiperlipidemia provoca infiltração de macrófagos nas camadas íntima, média e adventícia, hiperplasia intimal e diminui a vasodilatação dependente do endotélio.^{61,62}

A desendotelização com balão é uma das várias maneiras de se produzir lesão arterial e aceleração do processo aterosclerótico.⁶³ A técnica assemelha-se em muitos aspectos, à dilatação percutânea com balão, utilizada clinicamente desde 1978.⁶⁴ Apenas o cateter de Fogarty utilizado para a desendotelização em coelhos é menos robusto e requer menor pressão que aquele usado para dilatação arterial percutânea. Em ambas, a cicatrização é caracterizada pela remodelação da íntima e da média, regeneração endotelial, proliferação da média e da íntima e produção de matriz extracelular.⁶⁵ Dessa forma, a desendotelização com balão tem sido também utilizada para estudar processos celulares que envolvem a reestenose pós-angioplastia.⁶⁶

Abella *et al.*⁶⁷ realizaram desendotelização aórtica com balão (cateter de Fogarty 4F) em coelhos Nova Zelândia mantidos sob tratamento com dieta rica em colesterol a 1% por quatro a oito meses, através de uma incisão na artéria femoral dissecada. Foi estimada a distância entre a ferida e a raiz da aorta, introduzido o cateter retrogradamente, inflado com 1 ml de ar e então tracionado até que a sua extremidade distal atingisse a artéria femoral. Realizou-se o procedimento por mais duas vezes e, na última, o cateter foi retirado inflado. Ao final do tratamento dietético, foram administrados vVR e histamina e, após, os animais foram mortos para extração da aorta e análise.

2.6 Veneno de Víbora Russellis e Adrenalina

A víbora *Russellis* é encontrada na Índia, sul da China e sudeste da Ásia; é do gênero *Vipera* e pertence à subfamília *Viperinae* e à família *Viperidae*, sendo considerada extremamente perigosa.

Com uma mortalidade alta na Índia por mordida de cobra (15.000 mortes por ano), o vvR tem sido objeto de vários estudos clínicos e anátomopatológicos.⁶⁸⁻⁷⁰

Desde 1903, está demonstrado que a injeção intravenosa de vvR causa trombose maciça, com morte do animal. A dose letal para 50% dos animais é, aproximadamente, 2,5 mg/kg em coelhos.⁷¹

Investigando a ação coagulante de 22 variedades de venenos de cobras, foi demonstrado que o vvR é muito mais potente que qualquer um dos outros testados⁷². Porém, quando o veneno era testado em sangue citratado, perdia muito em sua potência coagulante⁷². Não somente cálcio, como também soro, fosfolipídio e fator V eram necessários para maior atividade conversora de protrombina do vvR⁷³. A remoção das plaquetas, bem como dos fosfolipídeos, através da centrifugação ou extração, reduz muito a atividade coagulante do veneno⁷³.

O vvR tornou-se disponível comercialmente na Europa na década de 40, como agente coagulante de uso tópico.

A seqüência de eventos produzida em humanos que são picados pela víbora *Russellis* atinge uma síndrome de coagulação intravascular disseminada, hemorragia espontânea, sangue incoagulável e desfibrinização^{70,71}. As alterações hemostáticas são detectáveis em alguns pacientes uma a duas horas após a picada e progridem para desfibrinização grave em quatro a oito horas⁷⁰.

Experimentalmente, foi reproduzido esse quadro clínico em coelhos Nova Zelândia, com a administração intravenosa de 2 a 3 mg/Kg do vvR.⁷⁴

A adrenalina e histamina apresentam um potente efeito vasoconstrictor sobre a macro e microcirculação de coelhos.⁷⁵

2.7 Modelo de Edema de Orelha e Óleo de Cróton

Para estudar a atividade antiedematogênica do composto poligodial, foi utilizado o modelo do edema de orelha em camundongos, induzido pela aplicação tópica de substâncias irritantes: capsaicina, óleo de cróton ou ácido araquidônico. As substâncias foram aplicadas diretamente nas superfícies interna e externa da orelha direita (20 microlitros de cada lado). A orelha esquerda recebeu o mesmo volume de acetona (solvente) e foi usada como controle. No período apropriado de tempo (trinta minutos para a capsaicina; seis horas para o óleo de cróton; uma hora para o ácido araquidônico), os animais foram sacrificados por descolamento cervical, sendo removido um disco de 6 mm de diâmetro de cada orelha com auxílio de um aparelho metálico, no local da aplicação. A resposta edematogênica foi avaliada através da diferença de peso em miligramas entre a orelha direita e a esquerda. O poligodial foi administrado trinta minutos antes das substâncias irritantes.^{76,77}

Lopez *et al.*⁷⁸ aplicaram o óleo de cróton na orelha de camundongos e utilizaram um *punch* de biópsia com 6 mm, para retirar os fragmentos das orelhas e comparar entre os grupos.

A aplicação ocular tópica de óleo de cróton 3% (40 microlitros) em coelhos, produziu edema no local e foi utilizada como modelo de inflamação para estudar as uveítes⁷⁹. Esta substância quando aplicada no local, induz a formação de granuloma e edema em ratos⁸⁰. A aplicação do óleo de cróton (10 microlitros) associado com outras substâncias edematogênicas (capsaicina=10 microlitros, ácido araquidônico=10 microlitros e *dithranol*=10 microlitros) foi feita para produzir edema de orelha em ratos e testar as propriedades antiinflamatórias das prostaglandinas⁸¹. Estes modelos simples de dermatite utilizando o óleo de cróton são apropriados para identificar novas drogas com efeito antiinflamatório tópico⁸². Outros estudos em ratos⁸³⁻⁸⁵ e em coelhos⁸⁶ avaliaram o efeito de agentes tópicos contra a inflamação produzida pelo óleo de cróton na orelha.

3. OBJETIVOS

3.1 Gerais

- Reproduzir o modelo de aterosclerose arterial em coelhos Nova Zelândia introduzido por Constantinides e Chakravarti em 1961 e aprimorado por Picon *et al.* em 1993.
- Avaliar o efeito da desendotelização aórtica com cateter balão, realizado no início do protocolo experimental, na formação de trombos.

3.2 Específicos

- Avaliar o efeito da suplementação de roxitromicina na prevenção na prevenção da aterosclerose e trombose aguda induzida farmacologicamente após desendotelização aórtica produzida em coelhos Nova Zelândia.
- Avaliar o efeito antiinflamatório da roxitromicina no edema de orelha produzido nestes animais.

4. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Osler W. Diseases of arteries. In: Osler W, editor. Modern medicine its theory and practice, in original contributions by American and foreign authors. Philadelphia: Lea brothers, 1907: 429-447.
2. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis--an update. *N Engl J Med* 1986; 314(8):488-500.
3. Fabricant CG, Fabricant J, Litrenta MM, Minick CR. Virus-induced atherosclerosis. *J Exp Med* 1978; 148(1):335-340.
4. Peterson WL. Helicobacter pylori and peptic ulcer disease. *N Engl J Med* 1991; 324(15):1043-1048.
5. Vallance P, Collier J, Bhagat K. Infection, inflammation, and infarction: does acute endothelial dysfunction provide a link? *Lancet* 1997; 349(9062):1391-1392.
6. Gurfinkel E, Bozovich G, Daroca A, Beck E, Mautner B. Randomised trial of roxithromycin in non-Q-wave coronary syndromes: ROXIS Pilot Study. ROXIS Study Group. *Lancet* 1997; 350(9075):404-407.
7. Gupta S, Leatham EW, Carrington D, Mendall MA, Kaski JC, Camm AJ. Elevated Chlamydia pneumoniae antibodies, cardiovascular events, and azithromycin in male survivors of myocardial infarction. *Circulation* 1997; 96(2):404-407.
8. Anderson JL, Muhlestein JB, Carlquist J, Allen A, Trehan S, Nielson C et al. Randomized secondary prevention trial of azithromycin in patients with coronary artery disease and serological evidence for Chlamydia pneumoniae infection: The Azithromycin in Coronary Artery Disease: Elimination of Myocardial Infection with Chlamydia (ACADEMIC) study. *Circulation* 1999; 99(12):1540-1547.
9. Khair OA, Devalia JL, Abdelaziz MM, Sapsford RJ, Davies RJ. Effect of erythromycin on Haemophilus influenzae endotoxin-induced release of IL-6, IL-8 and sICAM-1 by cultured human bronchial epithelial cells. *Eur Respir J* 1995; 8(9):1451-1457.
10. Koh YY, Lee MH, Sun YH, Sung KW, Chae JH. Effect of roxithromycin on airway responsiveness in children with bronchiectasis: a double-blind, placebo-controlled study. *Eur Respir J* 1997; 10(5):994-999.

11. Hoiby N. Diffuse panbronchiolitis and cystic fibrosis: East meets West. *Thorax* 1994; 49(6):531-532.
12. Tsang KW, Ho PI, Chan KN, Ip MS, Lam WK, Ho CS et al. A pilot study of low-dose erythromycin in bronchiectasis. *Eur Respir J* 1999; 13(2):361-364.
13. Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N Engl J Med* 1976; 295(7):369-377.
14. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340(2):115-126.
15. Grayston JT, Campbell LA, Kuo CC, Mordhorst CH, Saikku P, Thom DH et al. A new respiratory tract pathogen: *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. *J Infect Dis* 1990; 161(4):618-625.
16. Thom DH, Grayston JT, Campbell LA, Kuo CC, Diwan VK, Wang SP. Respiratory infection with *Chlamydia pneumoniae* in middle-aged and older adult outpatients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13(10):785-792.
17. Kuo CC, Jackson LA, Campbell LA, Grayston JT. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). *Clin Microbiol Rev* 1995; 8(4):451-461.
18. O'Neill C, Murray LJ, Ong GM, O'Reilly DP, Evans AE, Bamford KB. Epidemiology of *Chlamydia pneumoniae* infection in a randomly selected population in a developed country. *Epidemiol Infect* 1999; 122(1):111-116.
19. Aldous MB, Grayston JT, Wang SP, Foy HM. Seroepidemiology of *Chlamydia pneumoniae* TWAR infection in Seattle families, 1966-1979. *J Infect Dis* 1992; 166(3):646-649.
20. Ljungstrom L, Franzen C, Schlaug M, Elowson S, Viidas U. Reinfection with *Chlamydia pneumoniae* may induce isolated and systemic vasculitis in small and large vessels. *Scand J Infect Dis Suppl* 1997; 104:37-40.
21. Saikku P, Leinonen M, Tenkanen L, Linnanmaki E, Ekman MR, Manninen V et al. Chronic *Chlamydia pneumoniae* infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. *Ann Intern Med* 1992; 116(4):273-278.
22. Tiran A, Tio RA, Ossewaarde JM, Tiran B, den Heijer P, The TH et al. Coronary angioplasty induces rise in *Chlamydia pneumoniae*-specific antibodies. *J Clin Microbiol* 1999; 37(4):1013-1017.
23. Ridker PM, Kundsin RB, Stampfer MJ, Poulin S, Hennekens CH. Prospective study of *Chlamydia pneumoniae* IgG seropositivity and risks of future myocardial infarction. *Circulation* 1999; 99(9):1161-1164.
24. Muhlestein JB, Hammond EH, Carlquist JF, Radicke E, Thomson MJ, Karagounis LA et al. Increased incidence of *Chlamydia* species within the coronary arteries of patients with symptomatic atherosclerotic versus other forms of cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27(7):1555-1561.
25. Davidson M, Kuo CC, Middaugh JP, Campbell LA, Wang SP, Newman WP, III et al. Confirmed previous infection with *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) and its presence in early coronary atherosclerosis. *Circulation* 1998; 98(7):628-633.

26. Muhlestein JB, Anderson JL, Hammond EH, Zhao L, Trehan S, Schwobe EP et al. Infection with *Chlamydia pneumoniae* accelerates the development of atherosclerosis and treatment with azithromycin prevents it in a rabbit model. *Circulation* 1998; 97(7):633-636.
27. Fong IW, Chiu B, Viira E, Jang D, Mahony JB. Influence of clarithromycin on early atherosclerotic lesions after *Chlamydia pneumoniae* infection in a rabbit model. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(8):2321-2326.
28. Gurfinkel E, Bozovich G, Beck E, Testa E, Livellara B, Mautner B. Treatment with the antibiotic roxithromycin in patients with acute non-Q-wave coronary syndromes. The final report of the ROXIS Study. *Eur Heart J* 1999; 20(2):121-127.
29. Meier CR, Derby LE, Jick SS, Vasilakis C, Jick H. Antibiotics and risk of subsequent first-time acute myocardial infarction. *JAMA* 1999; 281(5):427-431.
30. Dunne MW. Rationale and design of a secondary prevention trial of antibiotic use in patients after myocardial infarction: the WIZARD (weekly intervention with zithromax [azithromycin] for atherosclerosis and its related disorders) trial. *J Infect Dis* 2000; 181 Suppl 3:S572-S578.
31. Cercek B, Shah PK, Noc M, Zahger D, Zeymer U, Matetzky S et al. Effect of short-term treatment with azithromycin on recurrent ischaemic events in patients with acute coronary syndrome in the Azithromycin in Acute Coronary Syndrome (AZACS) trial: a randomised controlled trial. *Lancet* 2003; 361(9360):809-813.
32. Zahn R, Schneider S, Frilling B, Seidl K, Tebbe U, Weber M et al. Antibiotic therapy after acute myocardial infarction: a prospective randomized study. *Circulation* 2003; 107(9):1253-1259.
33. Neumann F, Kastrati A, Miethke T, Pogatsa-Murray G, Mehilli J, Valina C et al. Treatment of *Chlamydia pneumoniae* infection with roxithromycin and effect on neointima proliferation after coronary stent placement (ISAR-3): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2001; 357(9274):2085-2089.
34. Homma H, Yamanaka A, Tanimoto S, Tamura M, Chijimatsu Y, Kira S et al. Diffuse panbronchiolitis. A disease of the transitional zone of the lung. *Chest* 1983; 83(1):63-69.
35. Iwata M, Colby TV, Kitaichi M. Diffuse panbronchiolitis: diagnosis and distinction from various pulmonary diseases with centrilobular interstitial foam cell accumulations. *Hum Pathol* 1994; 25(4):357-363.
36. Nakata K, Inatomi K. Case study on diffuse pan-bronchiolitis patients diagnosed via histopathological examination. *Annual Report of the Research Committee in Interticial Pneumonia*. Ministry of Health and Welfare Japan, 25. 1981.
37. Oishi K, Sonoda F, Kobayashi S, Iwagaki A, Nagatake T, Matsushima K et al. Role of interleukin-8 (IL-8) and an inhibitory effect of erythromycin on IL-8 release in the airways of patients with chronic airway diseases. *Infect Immun* 1994; 62(10):4145-4152.
38. Desaki M, Takizawa H, Ohtoshi T, Kasama T, Kobayashi K, Sunazuka T et al. Erythromycin suppresses nuclear factor-kappaB and activator protein-1 activation in

- human bronchial epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 267(1):124-128.
39. Takizawa H, Desaki M, Ohtoshi T, Kawasaki S, Kohyama T, Sato M et al. Erythromycin modulates IL-8 expression in normal and inflamed human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156(1):266-271.
 40. Oda H, Kadota J, Kohno S, Hara K. Leukotriene B4 in bronchoalveolar lavage fluid of patients with diffuse panbronchiolitis. *Chest* 1995; 108(1):116-122.
 41. Mukae H, Kadota J, Kohno S, Kusano S, Morikawa T, Matsukura S et al. Increase in activated CD8+ cells in bronchoalveolar lavage fluid in patients with diffuse panbronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152(2):613-618.
 42. Tamaoki J, Isono K, Sakai N, Kanemura T, Konno K. Erythromycin inhibits Cl secretion across canine tracheal epithelial cells. *Eur Respir J* 1992; 5(2):234-238.
 43. Rubin BK, Druce H, Ramirez OE, Palmer R. Effect of clarithromycin on nasal mucus properties in healthy subjects and in patients with purulent rhinitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155(6):2018-2023.
 44. Hahn DL, Bukstein D, Luskin A, Zeitz H. Evidence for *Chlamydia pneumoniae* infection in steroid-dependent asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998; 80(1):45-49.
 45. Goldsmith MF. New forms and new needs may make macrolides antibiotics of the decade. *JAMA* 1992; 267(7):903-904.
 46. Agache P, Amblard P, Moulin G, Barriere H, Texier L, Beylot C et al. Roxithromycin in skin and soft tissue infections. *J Antimicrob Chemother* 1987; 20 Suppl B:153-156.
 47. Botto H, Camey M, Chretien P, Safran C. Study of the diffusion of roxithromycin into prostatic tissue after replicate oral dosing. *Br J Clin Pract* 1988; 42(1 (suppl 55)):83.
 48. Gentry LO. Roxithromycin, a new macrolide antibiotic, in the treatment of infections in the lower respiratory tract: an overview. *J Antimicrob Chemother* 1987; 20 Suppl B:145-152.
 49. Herron JM. Roxithromycin in the therapy of *Streptococcus pyogenes* throat infections. *J Antimicrob Chemother* 1987; 20 Suppl B:139-144.
 50. Kafetzis D, Ligatskas C, Saint-Salvi B, Lefant B, Blanc F. Concentration of roxithromycin in tonsil and adenoid tissue after single and repeated administrations to children. *Br J Clin Pract* 1988; 42(1 (suppl 55)):80.
 51. van der Willigen AH, Tjiam KH, Wagenvoort JH, Polak-Vogelzang AA, Michel MF, Stolz E. Evaluation of roxithromycin in the treatment of non-gonococcal urethritis in males. *Eur J Clin Microbiol* 1986; 5(6):612-614.
 52. Blanc F, D'Enfert J, Fiessinger S, Lenoir A, Renault M, Rezvani Y. An evaluation of tolerance of roxithromycin in adults. *J Antimicrob Chemother* 1987; 20 Suppl B:179-183.
 53. Labro MT, Amit N, Babin-Chevaye C, Hakim J. Synergy between RU 28965 (roxithromycin) and human neutrophils for bactericidal activity in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 30(1):137-142.

54. Tremblay C, Couraud L, Saux M, Manuel C. Concentration of roxithromycin in lung tissue after repeat dosing. *Br J Clin Pract* 1982; 42(1 (suppl 55)):73.
55. Zini R, Fournet M, Barre J, Trembay D, Tillement J. In-Vitro study of roxithromycin binding to serum proteins and erythrocytes in humans. *Br J Clin Pract* 1988; 42(1 (suppl 55)):54.
56. Constantinides P, Chakravarti R. Rabbit arterial thrombosis production by systemic procedures. *Arch Pathol* 1961; 72:79-90.
57. Paterson J. Capillary rupture with intimal hemorrhagy as a causative factor in coronary thrombosis. *Arch Pathol* 1938; 25:474-487.
58. Sslowjew A. Experimentelleuntersuchungen über die bedeutung von lokader schädigung für die lipoidablagerung in der arterienwand. *Zeittschr F D Exper Med* 1929; 69:94-97.
59. Anitschkow N. Experimental Atherosclerosis in animals. In: Cowdry EV, editor. *Arteriosclerosis - A Survey to the Problem*. New York: MacMillan, 1933.
60. Constantinides P. The role of arterial wall injury in atherogenesis and arterial thrombogenesis. *Zentralbl Allg Pathol* 1989; 135(6):517-530.
61. Weidinger FF, McLenachan JM, Cybulsky MI, Gordon JB, Rennke HG, Hollenberg NK et al. Persistent dysfunction of regenerated endothelium after balloon angioplasty of rabbit iliac artery. *Circulation* 1990; 81(5):1667-1679.
62. Weidinger FF, McLenachan JM, Cybulsky MI, Fallon JT, Hollenberg NK, Cooke JP et al. Hypercholesterolemia enhances macrophage recruitment and dysfunction of regenerated endothelium after balloon injury of the rabbit iliac artery. *Circulation* 1991; 84(2):755-767.
63. Baumgartner HR. A new method for the induction of thrombi by controlled over-dilatation of the vascular wall. *Z Gesamte Exp Med* 1963; 137:227-247.
64. Gruntzig A. Transluminal dilatation of coronary-artery stenosis. *Lancet* 1978; 1(8058):263.
65. Forrester JS, Fishbein M, Helfant R, Fagin J. A paradigm for restenosis based on cell biology: clues for the development of new preventive therapies. *J Am Coll Cardiol* 1991; 17(3):758-769.
66. Ferns GA, Stewart-Lee AL, Anggard EE. Arterial response to mechanical injury: balloon catheter de-endothelialization. *Atherosclerosis* 1992; 92(2-3):89-104.
67. Abela GS, Picon PD, Friedl SE, Gebara OC, Miyamoto A, Federman M et al. Triggering of plaque disruption and arterial thrombosis in an atherosclerotic rabbit model. *Circulation* 1995; 91(3):776-784.
68. Myint L, Warrell DA, Phillips RE, Tin NS, Tun P, Maung ML. Bites by Russell's viper (*Vipera russelli siamensis*) in Burma: haemostatic, vascular, and renal disturbances and response to treatment. *Lancet* 1985; 2(8467):1259-1264.
69. Than T, Hutton RA, Myint L, Khin EH, Soe S, Tin NS et al. Haemostatic disturbances in patients bitten by Russell's viper (*Vipera russelli siamensis*) in Burma. *Br J Haematol* 1988; 69(4):513-520.

70. Than T, Khin EH, Hutton RA, Myint L, Tin NS, Phillips RE et al. Evolution of coagulation abnormalities following Russell's viper bite in Burma. *Br J Haematol* 1987; 65(2):193-198.
71. Aung-Khin M, Ma-Ma K, Zin T. Effects of Russell's viper venom on blood coagulation, platelets and the fibrinolytic enzyme system. *Jpn J Med Sci Biol* 1977; 30(2):101-108.
72. Mcfarlane R, Barnett B. The haemostatic possibilities of snake-venom. *Lancet* 1934; ii:985-987.
73. Mcfarlane R. The coagulant action of Russell's viper venom: the use of antivenom in defining its reaction with a serum factor. *Br J Haematol* 1961; 7:496-511.
74. Simon TL, Grace TG. Envenomation coagulopathy in wounds from pit vipers. *N Engl J Med* 1981; 305(8):443-447.
75. Gurbuz H, Onaran HO, Bokesoy TA. Regional histaminergic potencies in rabbit systemic circulation. *Gen Pharmacol* 1991; 22(4):659-661.
76. Calixto JB, Medeiros YS. Characterization of bradykinin mediating pertussis toxin-insensitive biphasic response in circular muscle of the isolated guinea pig ileum. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 259(2):659-665.
77. Neves C, Neves P, Zanini J, Medeiros Y, Calixto JB. Analgesic and antiinflammatory activity of the crude hydroalcoholic extract obtained from the bark of *Hymenaea martiana*. *Phytother Res* 1993; 7:356-362.
78. Lopez A, Sims DE, Ablett RF, Skinner RE, et al. Effect of emu oil on auricular inflammation induced croton with oil in mice. *Am J Vet Res* 1999;60(12):1558-1561.
79. Villena C, Vivas JM, Villar AM. Ocular inflammation models by topical application: croton-oil induced uveitis. *Curr Eye Res* 1999;18(1):3-9.
80. Ishii T, Kibushi N, Nakajima T, Kakuta T, Tanaka N, et al. Local anti-inflammatory activity and systemic side effects of NM-135, a new prodrug glucocorticoid, in an experimental inflammatory rat model. *Jpn J Pharmacol* 1998; 78(4):505-509.
81. Blazso G, Gabor M. Effects of prostaglandin antagonist phloretin derivatives on mouse ear edema induced with different skin irritants. *Prostaglandins* 1995;50(3):161-168.
82. Swingle KF, Reiter MJ, Schwartzmiller DH. Comparison of croton oil and cantharidin induced inflammations of the mouse ear and their modification by topically applied drugs. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1981;254(1):168-176.
83. Kemeny L, Farkas A, Dobozy A. Low-dose dithranol treatment and tape stripping induce tolerance to dithranol in a mouse ear oedema model. *Br J Dermatol* 2002;146(5):764-769.
84. Agut J, Tarrida N, Sacristan A, Ortiz JA . Antiinflammatory activity topically applied sertaconazole nitrate. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1996;18(4):233-234.

85. Tarayre JP, Aliaga M, Barbara M, Tisne-Versailles J. Hypotheses on a possible role of some mediators in various inflammatory reactions on mouse ear. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1988;10(10):623-627.
86. Weirich EG, Longauer JK, Kirkwood AH. New experimental model for the primary evaluation of topical contra-inflammatory agents. *Arc Dermatol Res* 1977;259(2):141-149.

5. ARTIGO INGLÊS

An evaluation of the anti-thrombotic and anti-inflammatory effects of roxithromycin - a randomized experiment with rabbits

Authors: Scipioni PP^{1*}, Mendes GL², Raquel EP³, Varela DL³, Volpato D³, Feres CN³; Mossman MP⁴, Picon PX⁴, Costa AF⁵, Picon PD^{1,6}

1. Post Graduation Program in Medicine: Masters Degree from the UFRGS (*The Federal University of the State of Rio Grande do Sul, Brazil*).
2. Professor of the Physiological Sciences Department at UPF.
3. Student at the Medical Faculty of UPF.
4. Student at the Medical Faculty of UFRGS.
5. Master in Medicine: Cardiology from UFRGS.
6. Titular Professor of Pharmacology at the UPF.

Please direct postal correspondence to:

Dr. Pitágoras Pinto Scipioni
Rua Capitão Araújo 551/1001
Bairro Centro
99010-200 Passo Fundo. RS - Brazil
Telephone: + 55 54 3122009
Fax: + 55 51 3122009
E-mail: pitagoras@zanellainfo.com.br

Summary

Introduction: Clinical and experimental evidence exists that inflammation and infection is associated with atherothrombotic coronary disease and cardiovascular events.

Objectives: An experimental model of desendotelization and acute arterial thrombosis in live New Zealand white rabbits was used to test the anti-thrombotic effects of roxithromycin. Simultaneously, by means of an ear edema model, we evaluated the anti-inflammatory effect.

Materials and Methods: The animals were distributed randomly in two groups – the intervention group denominated roxithromycin (n= 29) and the control group (n= 28). Arterial lesions were induced on all of them with a balloon catheter together with a procedure to induce thrombosis and the application of an edematogenic substance. The aortic and iliac thrombosis area was measured by video-planimetry. The circular ear fragments were weighed and compared between themselves and between the two groups. **Results:** In the intervention group nineteen animals (65.5%) presented arterial thrombosis and twelve (42.9%) in the control group (p=0.147). The thrombosis area in the roxithromycin intervention group showed a median (interquartile amplitude: AIQ) of 91 mm² (41.1-213.8) and of 46.4 mm² (8.9 –111.6) in the control group. (P=0,191). The ear edema index in the roxithromycin intervention group gave an AIQ of 140 mg (20-180) and the control group one of 175 mg (60-230) (P=0.10). Comparing the animals with thrombosis to those without, a tendency for the animals with thrombosis to demonstrate a lower ear edema index was observed, in numbers, 90 mg (20 –180) as against 175 mg (122.5 – 235) in those without thrombosis (P=0,071). **Conclusion:** Our results do not demonstrate that roxithromycin has a protective effect on arterial thrombosis and ear edema.

Key Words: Infection, Inflammation, arteriosclerosis, thrombosis, roxithromycin experimental model, rabbit.

Introduction

The part played by infection in the pathogenesis of atherosclerosis was first pointed out by Sir. William Osler¹ in 1908, but his view was not then widely accepted. Nowadays, however there is a renewed interest in the contribution that infections make to the pathogenesis and development of atherosclerosis. The modern view of atherosclerosis is centered on the "response to a lesion" model proposed by Ross² in 1986. This model suggests that infection may contribute to the formation of atherosclerosis through a lesion of the vascular endothelium, in association with metabolic and hemostatic inflammatory mechanisms². The formation of atherosclerotic lesions in chickens infected with the herpes virus was experimentally demonstrated in the seventies³. The discovery of *Helicobacter pylori* as an etiological agent in peptic ulcers (another chronic disease) suggests that infection etiologies for atherosclerosis should not be ignored⁴. Based on this theory, associations between ischemic cardio-pathology and some Gram negative bacteria (*Helicobacter pylori* e *Chlamydia pneumoniae*) and certain virus (herpes, cytomegalovirus)⁵ have been described. Most of the published work consists of epidemiological studies based on associations between the serology of the respective antibodies and ischemic cardio-pathology or in immunohistochemical evidence of the presence of bacteria or virus in atherosclerotic lesions^{6,7}. Recently, randomized clinical tests have supplied new evidence of the consistency of the association between infection and ischemic cardio-pathology⁸⁻¹⁰.

Amongst the various infectious agents indicated as possibly being involved in the atherosclerotic process, the *Chlamydia pneumoniae* has received the greatest attention and merited most of the existing scientific work published. It is an important infectious agent of the respiratory tract and is responsible for 10% of the community-acquired cases of pneumonia^{11,12}. Described originally by Grayston¹¹, this infectious agent causes high levels of infection in the general population. Serum-epidemiological research indicates that virtually every person is infected at least once in their lifetimes^{13,14}. The rate of re-infection¹³ varies

from 9,5/100 in infancy to 1,5/100 person-years for those more than 20 years of age. Re-infection results in a less intense respiratory process but some authors suggest that it can induce isolated and systemic vasculitis in almost any organ of the body¹⁵. The primary infection, associated or not to episodes of re-infection, can lead to a process of chronic infection which can be the fundamental base for the development of the atherosclerotic lesion. Scientific information of the involvement of *C. pneumoniae* with atherosclerosis may be classified as immunological¹⁶⁻¹⁸, anatomic-pathological^{19,20}, experimental^{21,25} and clinical^{8-10,22-24}. The inoculation of rabbits with a nasal spray of *Chlamydia sp* caused the acceleration of atherosclerotic lesions, but early treatment with clarithromycin reduced this effect²¹.

Roxithromycin is a macrolide with a bacterial spectrum similar to erythromycin and with a slightly superior action on against *Chlamydia e Legionella*. Its pharmacologic action permits use of a smaller dose; it is resistant to gastric hydrolysis, is easily absorbed and produces durable and rapidly plasmatic peaks, with a half-life of twelve hours before elimination, achieving high intracellular concentrations and clinical efficacy²⁶⁻³⁵.

The anti-inflammatory properties of the macrolides in respiratory diseases were studied by various authors in diseases such as diffuse panbronchiolitis^{36,37}, asthmatics³⁸, cystic fibrosis⁵² and bronchiectasis³⁹.

Based on the theory of infection in atherosclerosis and bearing in mind the probable anti-inflammatory effect of the macrolides we considered that roxithromycin could reduce the rate of thrombosis after desendotelization and pharmacological manipulation, as well as reducing the effect of ear edema produced by an irritant (croton oil)^{40,41}. We did not find in the literature any documents describing work designed to study these effects in experimental models of arterial thrombosis and edema.

Materials and Methods

Samples

The study commenced with sixty-four white New Zealand rabbits with an average age of three months and average weight of 2,5-3,5 kg, free of any sign of disease in the opinion of the veterinary doctor. After a period of seven days for acclimatization and observation in the Biotery the animals were distributed at random into two groups. Group 1 received roxithromycin and Group 2 (the control) were given only a saline solution. Seven losses occurred (three in the intervention and four in the control groups) so that fifty-seven completed the study, 29 in the intervention group and 28 in the control group. The deaths occurred in the first animals of the series and soon after the desendotelization period. Three losses were also suffered in the period between the production of the ear edema and death (last six hours). No autopsies were performed on these animals.

Procedures

This was an experimental open-label study for the measurement of ear edema. However, the measurements of the area of thrombosis were performed by researchers unaware of the distribution of the animals between the two groups. The study was conducted in the Biotery of the University of Passo Fundo (a town in the State of Rio Grande do Sul, Brazil) where the animals were maintained in individual cages, in rooms at ambient temperature, with natural illumination and given a normal diet. Two researchers observed the animals daily and administered the roxithromycin and the saline solution. In the handling and topical application of the croton oil, the researchers wore protective clothing (masks, aprons and gloves). Reports supplied by the Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMPRAPA - the Brazilian company for agricultural and animal husbandry research) the average temperatures in the three month period of the study was: 24,7 °C, 27,5 °C e 27,6 °C,

or, in other words, there was a variation of 2,9 °C between the hottest and coldest month of the study.

The administration of roxithromycin e saline solution

Two hours before desendotelization on the first day of the study, the intervention group received an oral dose of 8 mg/kg of roxithromycin (by means of a syringe inserted in the esophagus) and the control group physiological serum. Every day thereafter for the remaining twenty-seven days, the same doses were administered taking care that the full amount of the doses were swallowed. The last doses were administered six hours before death to coincide with the plasmatic peak of the roxithromycin. No adverse gastro-intestinal reactions (such as distension, palpation pain, vomiting or diarrhea) were observed during the whole observation period of twenty-eight days.

Aortic desendotelization using with a balloon

After seven days under observation, the animal was anesthetized by an intramuscular injection of a mixture of Ketamin (100mg/Kg) e Xylazin (50 mg/Kg). Tricotomy of the right inguinal region sterilized with iodized alcohol was performed using fields and sterilized surgical material to dissect the right femoral artery. A Fogarty© 3F catheter (Baxter) was introduced backwards in reverse as far as the aorta arch and the balloon was inflated with 0.8 ml of air and pulled to the point of the aortic incision. The procedure was repeated (2X) and at the last desendotelization the balloon was removed not deflate be sure of its integrity. The artery was connected and the operative wound closed.

Induction of pharmacological thrombosis

On the day twenty-seven, twenty-four hours before death, pharmacological thrombosis was induced by the intra-peritoneal injection of 150 micrograms/Kg, of Russell's viper venom (Rvv) followed thirty minutes later by an intravenous injection of 20 micrograms/Kg of epinephrine.

Induction of ear edema

Six hours before death, together with the last dose of roxithromycin a local application of croton oil 2% was done using a micro-pipette to the right ear (25 micro-liters internally and the same amount externally) and the dose of its solvent on the left ear in the same places.

Death

At the end of 28 days, that is, 24 hours after the pharmacological manipulation (Rvv+epinephrine) and 6 hours after the induction of the ear edema the animals were killed. The procedure involved general anesthesia with Ketamin e Xilazin, followed by the piercing of the heart to inject lidocain (1mg/Kg), thereby causing heart failure. The thorax was opened and the heart, aorta and iliac were removed as well as circular fragments of the right and left ears.

Procedures and measurements

The aorta and iliacs were opened longitudinally and secured with pins while four photographs were taken with a digital camera of each sample (the aorta and iliac, the crust of the aorta, the abdominal aorta and the bifurcation of the aorta with the iliac). The areas of thrombosis were determined in square millimeters (mm²) by video-planimetry.

Using a circular metallic instrument of 16 mm diameter, circular disks were cut from the right and left ears exactly in the areas where the croton oil and the acetone had been administered. With precision scales the circular ear fragment were weighed and the index of edema calculated from the difference between them in mg. While weighing, care was taken to maintain the scales always in the same place, to verify the tare before each use, to switch off the ventilators and close the windows as well as keeping the research people away from the scales.

Sample size

Starting with an estimate of 70% of thrombosis in the control group, it was calculated that, to detect a difference of 30% in relation to the intervention group, 54 animals would be needed (27 in each group) with $\alpha=0,05$ e $\beta=0,20$ (80% power).

Statistical Analysis

The thrombosis occurrence in the two groups was described as a percentage and the significance determine by the chi-quadrado test. The quantities of the area of the edema were described by median and interquartile amplitude (AIQ: percentile 25 to percentile 75) due to the important amount of asymmetry which was observed. The comparison between the groups was made with the Mann-Whitney U test. To adjust for simultaneous effects (roxithromycin and the presence of thrombosis) we used a model of factorial variance analysis applied to the ranks of values of the index of the edema (variable dependent). A significance level of 5% was used. The data was processed using computer running the SPSS (version10.0) software program.

The three losses which occurred in the period between the production of the ear edema and death (6 hours) did not effect the anti-thrombotic analysis because the aorta and iliac were removed and evaluated. As regards the anti-inflammatory effect, the missing values were replaced by the median of the series because they represented a proportion less than 10%.

Results

As may be seen in Table 1 and Figure 1, the roxithromycin group (n=29) presented a greater rate of arterial thrombosis (19 animals; 65,5%) when compared to the control group (n=28, 12 animals, 42,9%) but this difference did not show statistical significance in the chi-squared test (P=0,147).

The thrombosis area also was greater in the roxithromycin group, where a median (interquartile amplitude: AIQ) was registered of 96,1 mm² (41,1 to 213,8) as against a value of 46,4 mm² (8,9 to 111,6) for the controls group. Again, the observed difference did not attain statistical significance in the Mann-Whitney U test (P=0,191).

Also, the index of ear edema was lower in the roxithromycin group presenting a median (AIQ) of 140mg (20 to 180) while in the control group we obtained 175 mg (60 to 230). Once again this finding did not attain statistical significance in the Mann-Whitney U test (P=0,100). When we made the adjustments for the potential effects of confusion of the presence of arterial thrombosis in an analytical model of factorial variance (ANOVA), we also obtained results without statistical significance (P=0,197).

In considering the presence or absence of arterial thrombosis we observed that in the group with thrombosis the edema index was smaller, with median (AIQ) of 90 mg (20 to 180), while in the group without thrombosis the index was 175 mg (122,5 to 235). The difference almost reached significance in the Mann-Whitney U test (P=0.071), but was shown to be of minor importance after the ANOVA factorial adjustment for the effect of the treatment with roxithromycin (P=0,137).

Discussion

Experimental atherosclerosis models are useful for the evaluation of anti-thrombotic interventions. In 1960, Constantinides and Chakravarti⁴² developed a live experimental model with white New Zealand rabbits submitted to a cholesterol-rich diet. After 8 months of the diet treatment, thrombosis was induced on the advanced atherosclerotic plates by administering a pro-coagulant (Rvv) associated with a vessel constrictor (histamine) that produced a low incidence of thrombosis (25 to 38%). The desendotelization (physical lesion) with a balloon catheter was instituted by Baumgartner⁴³ to accelerate the atherosclerotic process by causing lesion of the arterial wall. This model continues in use at present and is undergoing adaptations and modification with the passage of time⁴⁴. With the additional

modification proposed by Picon *et al.*⁴⁶ of a mechanical lesion made by a balloon catheter associated with pharmacological manipulation (wR+ histamine) the time required for the development of thrombosis was reduced to four months. More recently, in animals treated with wR and adrenaline immediately after the lesion with a balloon catheter, only six hours was necessary to induce acute thrombosis in 71% of the animals⁴⁵. In our study, with normal diet, we showed that 28 days after the physical lesion and pharmacological manipulation (wR + adrenaline) were sufficient to produce arterial thrombosis in 54,4% of the test animals.

In a study where the animals were killed four months after aortic desendotelization having received two administrations of Rvv and adrenaline on two consecutive days, an average area of thrombosis of 194 mm² was found (DP 182)⁴⁶. In this study, for purposes of comparison, we calculated our results both as average and standard deviations although we consider that the median results best describe asymmetric data (as presented in Table 1). In our 28-day study, in which only one dose of Rvv and epinephrine were administered the average thrombosis area was 83,5 mm² (DP 113,5). In the study where the animals were killed after six hours of the injury with the balloon catheter and of the treatment to induce thrombosis⁴⁵ the area of thrombosis was 52,9 mm² (DP 50,5). Finally, in the study where the endothelial lesion was realized after two weeks⁴⁷ and the thrombosis induction after three hours the thrombosis area was 21,7% (DP 36,4). This relationship between the reduction of the time before death and the number and quantity of wR and adrenaline used, resulting in a smaller area of thrombosis, indicates a diminution of the capacity of the model to generate thrombosis.

The WIZARD study (*Weekly Intervention with Zithromax for Acute Coronary Syndrome*)⁴⁸ treated 7.747 patients with acute coronary syndrome selected at random for three months with azitromicina (600 mg/day) or a placebo. The AZACS (*Azithromycin in Acute Coronary Syndrome*)⁴⁹ evaluated the efficacy of azitromicina in a period of four days in a study placebo-controlled which involved 1.436 patients with acute coronary syndrome. In both studies, amongst the designated patients, no benefit was obtained for the group treated

with macrolide, even when the number of treatment day was increased. The present study with rabbits utilized roxithromycin for an intermediate period (28 days) and also did not demonstrate any anti-thrombosis benefit from the roxithromycin.

The rate of thrombosis in our study using normal diet was 54,4%, which is less than the 71% found in the study of a high cholesterol diet⁴⁵. In both studies the desendotelization techniques were similar but the pharmacological manipulation and the time to death were different.

In an animal model, New Zealand rabbits who had been were infected with *C. pneumoniae*²¹ by nasal spray were compared as to the presence of atherosclerotic lesions, the animals which had received early doses of clarithromycin showed a reduction of 75% in the atherosclerotic lesions when compared to the infected animals which had not been treated. Although we did not check for the presence of the *Chlamydia* infection in our animals, the anti-thrombotic and anti-inflammatory inefficacy of roxithromycin in this model may be attributed to the low rate of infection by this agent in these young and healthy animals which had not been submitted to inoculation of the bacteria, or to the absence of anti-inflammatory or anti-thrombotic effect of the drug.

The ANTIBIO (*Antibiotic Therapy after an Acute Myocardial Infarction*)⁵⁰ test did not show any differences between the patients who had received roxithromycin and those that had been given a placebo as regards deaths, or other clinical events are concerned. The 872 patients with acute myocardial strokes were distributed at random in 49 hours for six weeks of the traditional treatment plus roxithromycin for one group and the same period of the traditional treatment plus for the other group. After twelve months, the death rate (6%) in the two groups was similar (P=0,739). Perhaps the most serious problem with this test is the slow recruitment of the patients and a loss rate of 18% in the roxithromycin groups as a result of gastro-intestinal collateral effects. Our loss rate was 10.6% which is within the rate considered acceptable in the literature of 10 to 20%. In agreement with the ANTIBIO, test our

study did not show a reduction of the rate of arterial thrombosis in the animals. We did not observe adverse gastro-intestinal effects during the 28 days of roxithromycin use.

Previous studies indicate that rofecoxib, an anti-inflammatory agent, when used for longer than five days, might increase the risk of coronary events in older patients⁵¹. The occurrence of the events is related, with to the formation of thrombosis by a mechanism still not explained. Like rofecoxib, roxithromycin also has a potential anti-inflammatory effect. Therefore, it is possible that, by a similar mechanism, this drug may also be involved in a greater formation of thrombosis. In this manner, one could explain why we did not observe an anti-thrombotic effect in the intervention group but, in fact, the opposite.

Our data does not indicate that roxithromycin produces an anti-edema effect, so much so that the median index of ear edema in the animals using roxitromicina was 140 mg and in the control group 175 mg. Considering the great dispersion observed in the data which gave amplitude of 160 mg the first group and 170 mg in the second, the observed difference is of slight importance. Although we did not find in the literature references to the use of this measurement method in rabbits, Calixto e Medeiros have validated this method in mice^{40,41}. These authors used 40 µL of croton oil in each ear, while we used 50 µL. However, the diameter of the disks taken from the ears in our study, was greater (16mm) than that of the mice (6 mm), characterizing a smaller relative dose. If the total quantity of the irritating agent used had been greater in the rabbits, we could have increased our chances of producing more edema, and consequently, a better response to the treatment.

Conclusions

The study indicates that roxitromicina does not produce an anti-thrombotic effect, neither did we find any difference in the sizes of the thrombosis, or even, in the ear edema index. Comparing the group that developed thrombosis with that which did not, also did not observe differences in the ear edema index.

Therefore, our findings are in agreement with other studies which did not find an anti-thrombotic or anti-inflammatory effect with roxithromycin.

References

1. Osler W. Diseases of arteries. In: Osler W, editor. Modern medicine its theory and practice, in original contributions by American and foreign authors. Philadelphia: Lea brothers, 1907: 429-447.
2. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis--an update. *N Engl J Med* 1986; 314(8):488-500.
3. Fabricant CG, Fabricant J, Litrenta MM, Minick CR. Virus-induced atherosclerosis. *J Exp Med* 1978; 148(1):335-340.
4. Peterson WL. Helicobacter pylori and peptic ulcer disease. *N Engl J Med* 1991; 324(15):1043-1048.
5. Vallance P, Collier J, Bhagat K. Infection, inflammation, and infarction: does acute endothelial dysfunction provide a link? *Lancet* 1997; 349(9062):1391-1392.
6. Paton P, Tabib A, Loire R, Tete R. Coronary artery lesions and human immunodeficiency virus infection. *Res Virol* 1993; 144(3):225-231.
7. Gao SZ, Hunt SA, Schroeder JS, Alderman EL, Hill IR, Stinson EB. Early development of accelerated graft coronary artery disease: risk factors and course. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28(3):673-679.
8. Gurfinkel E, Bozovich G, Daroca A, Beck E, Mautner B. Randomised trial of roxithromycin in non-Q-wave coronary syndromes: ROXIS Pilot Study. ROXIS Study Group. *Lancet* 1997; 350(9075):404-407.
9. Stone AF, Mendall MA, Kaski JC, Edger TM, Risley P, Poloniecki J et al. Effect of treatment for Chlamydia pneumoniae and Helicobacter pylori on markers of inflammation and cardiac events in patients with acute coronary syndromes: South Thames Trial of Antibiotics in Myocardial Infarction and Unstable Angina (STAMINA). *Circulation* 2002; 106(10):1219-1223.
10. Neumann F, Kastrati A, Miethke T, Pogatsa-Murray G, Mehilli J, Valina C et al. Treatment of Chlamydia pneumoniae infection with roxithromycin and effect on neointima proliferation after coronary stent placement (ISAR-3): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2001; 357(9274):2085-2089.
11. Grayston JT, Campbell LA, Kuo CC, Mordhorst CH, Saikku P, Thom DH et al. A new respiratory tract pathogen: Chlamydia pneumoniae strain TWAR. *J Infect Dis* 1990; 161(4):618-625.
12. Kuo CC, Jackson LA, Campbell LA, Grayston JT. Chlamydia pneumoniae (TWAR). *Clin Microbiol Rev* 1995; 8(4):451-461.

13. Aldous MB, Grayston JT, Wang SP, Foy HM. Seroepidemiology of Chlamydia pneumoniae TWAR infection in Seattle families, 1966-1979. *J Infect Dis* 1992; 166(3):646-649.
14. O'Neill C, Murray LJ, Ong GM, O'Reilly DP, Evans AE, Bamford KB. Epidemiology of Chlamydia pneumoniae infection in a randomly selected population in a developed country. *Epidemiol Infect* 1999; 122(1):111-116.
15. Ljungstrom L, Franzen C, Schlaug M, Elowson S, Viidas U. Reinfection with Chlamydia pneumoniae may induce isolated and systemic vasculitis in small and large vessels. *Scand J Infect Dis Suppl* 1997; 104:37-40.
16. Ridker PM, Kundsin RB, Stampfer MJ, Poulin S, Hennekens CH. Prospective study of Chlamydia pneumoniae IgG seropositivity and risks of future myocardial infarction. *Circulation* 1999; 99(9):1161-1164.
17. Saikku P, Leinonen M, Tenkanen L, Linnanmaki E, Ekman MR, Manninen V et al. Chronic Chlamydia pneumoniae infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. *Ann Intern Med* 1992; 116(4):273-278.
18. Tiran A, Tio RA, Ossewaarde JM, Tiran B, den Heijer P, The TH et al. Coronary angioplasty induces rise in Chlamydia pneumoniae-specific antibodies. *J Clin Microbiol* 1999; 37(4):1013-1017.
19. Muhlestein JB, Hammond EH, Carlquist JF, Radicke E, Thomson MJ, Karagounis LA et al. Increased incidence of Chlamydia species within the coronary arteries of patients with symptomatic atherosclerotic versus other forms of cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27(7):1555-1561.
20. Davidson M, Kuo CC, Middaugh JP, Campbell LA, Wang SP, Newman WP, III et al. Confirmed previous infection with Chlamydia pneumoniae (TWAR) and its presence in early coronary atherosclerosis. *Circulation* 1998; 98(7):628-633.
21. Fong IW, Chiu B, Viira E, Jang D, Mahony JB. Influence of clarithromycin on early atherosclerotic lesions after Chlamydia pneumoniae infection in a rabbit model. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(8):2321-2326.
22. Anderson JL, Muhlestein JB, Carlquist J, Allen A, Trehan S, Nielson C et al. Randomized secondary prevention trial of azithromycin in patients with coronary artery disease and serological evidence for Chlamydia pneumoniae infection: The Azithromycin in Coronary Artery Disease: Elimination of Myocardial Infection with Chlamydia (ACADEMIC) study. *Circulation* 1999; 99(12):1540-1547.
23. Gupta S, Leatham EW, Carrington D, Mendall MA, Kaski JC, Camm AJ. Elevated Chlamydia pneumoniae antibodies, cardiovascular events, and azithromycin in male survivors of myocardial infarction. *Circulation* 1997; 96(2):404-407.
24. Meier CR, Derby LE, Jick SS, Vasilakis C, Jick H. Antibiotics and risk of subsequent first-time acute myocardial infarction. *JAMA* 1999; 281(5):427-431.
25. Muhlestein JB, Anderson JL, Hammond EH, Zhao L, Trehan S, Schwobe EP et al. Infection with Chlamydia pneumoniae accelerates the development of atherosclerosis and treatment with azithromycin prevents it in a rabbit model. *Circulation* 1998; 97(7):633-636.

26. Agache P, Amblard P, Moulin G, Barriere H, Texier L, Beylot C et al. Roxithromycin in skin and soft tissue infections. *J Antimicrob Chemother* 1987; 20 Suppl B:153-156.
27. Begue P, Lacombe H, Cotin G, Chaviere F, Chretien P, Safran C. Difusion of roxithromycin into tonsilar tissue in children. *Br J Clin Pract* 1988; 42(1 (suppl 55)):78-79.
28. Bertrand A, Jonquet O, Sauvaget J. Multicenter study of the clinical efficacy and tolerance of roxithromycin compared to erythromycin ethylsuccinate in lower respiratory tract infections. *Pathol Biol (Paris)* 1988; 36(5):544-547.
29. Botto H, Camey M, Chretien P, Safran C. Study of the diffusion of roxithromycin into prostatic tissue after repicate oral dosing. *Br J Clin Pract* 1988; 42(1 (suppl 55)):83.
30. Charpin J, Freour P, Marsac J. Multicenter study of the clinical efficacy and tolerance of roxithromycin compared to doxycycline in lower respiratory infections. *Pathol Biol (Paris)* 1988; 36(5):548-551.
31. Gentry LO. Roxithromycin, a new macrolide antibiotic, in the treatment of infections in the lower respiratory tract: an overview. *J Antimicrob Chemother* 1987; 20 Suppl B:145-152.
32. Herron JM. Roxithromycin in the therapy of *Streptococcus pyogenes* throat infections. *J Antimicrob Chemother* 1987; 20 Suppl B:139-144.
33. Kafetzis D, Ligatskas C, Saint-Salvi B, Lefant B, Blanc F. Concentration of roxithromycin in tonsil and adenoid tissue after single and repeated administrations to children. *Br J Clin Pract* 1988; 42(1 (suppl 55)):80.
34. Lachat JM, Anex JF, Regamey C. Roxithromycin (RU 28965), a new macrolide effective against pulmonary infections. *Schweiz Med Wochenschr* 1986; 116(49):1739-1741.
35. van der Willigen AH, Tjiam KH, Wagenvoort JH, Polak-Vogelzang AA, Michel MF, Stolz E. Evaluation of roxithromycin in the treatment of non-gonococcal urethritis in males. *Eur J Clin Microbiol* 1986; 5(6):612-614.
36. Homma H, Yamanaka A, Tanimoto S, Tamura M, Chijimatsu Y, Kira S et al. Diffuse panbronchiolitis. A disease of the transitional zone of the lung. *Chest* 1983; 83(1):63-69.
37. Kudoh S. Erythromycin treatment in diffuse panbronchiolitis. *Curr Opin Pulm Med* 1998; 4(2):116-121.
38. Suez D, Szeffler SJ. Excessive accumulation of mucus in children with asthma: a potential role for erythromycin? A case discussion. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 77(2):330-334.
39. Tsang KW, Ho PI, Chan KN, Ip MS, Lam WK, Ho CS et al. A pilot study of low-dose erythromycin in bronchiectasis. *Eur Respir J* 1999; 13(2):361-364.
40. Calixto JB, Medeiros YS. Characterization of bradykinin mediating pertussis toxin-insensitive biphasic response in circular muscle of the isolated guinea pig ileum. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 259(2):659-665.

41. Neves C, Neves P, Zanini J, Medeiros Y, Calixto JB. Analgesic and antiinflammatory activity of the crude hydroalcoholic extract obtained from the bark of *Hymenaea martiana*. *Phytother Res* 1993; 7:356-362.
42. Constantinides P, Chakravarti R. Rabbit arterial thrombosis production by systemic procedures. *Arch Pathol* 1961; 72:79-90.
43. Baumgartner HR. A new method for the induction of thrombi by controlled over-dilatation of the vascular wall. *Z Gesamte Exp Med* 1963; 137:227-247.
44. Johnstone MT, Botnar RM, Perez AS, Stewart R, Quist WC, Hamilton JA et al. In vivo magnetic resonance imaging of experimental thrombosis in a rabbit model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21(9):1556-1560.
45. Iturri-Yamamoto G, Battastini A, Martins N, Edelweiss M, Rosig L, Sarkis J et al. Acute arterial thrombosis induced by endothelial injury and activation of blood coagulation: the role of the ATP diphosphohydrolase (ecto-apyrase). *Tromb Haemost* 2003; (submitted).
46. Picon PD, Goncalves SC, Wainstein MV, Costa AF, Mengarda CV, Machado RP et al. Atherosclerosis and acute arterial thrombosis in rabbits: a model using balloon desendothelization without dietary intervention. *Braz J Med Biol Res* 1997; 30(3):415-417.
47. Costa AF, Gammerman P, Picon P, Mosmann M, Ketllun AM, Valenzuela M et al. Intravenous apyrase administration reduces arterial thrombosis in a rabbit model of endothelial denudation *in vivo*. *Blood Coagul Fibrinolysis*. In press.
48. Dunne MW. Rationale and design of a secondary prevention trial of antibiotic use in patients after myocardial infarction: the WIZARD (weekly intervention with zithromax [azithromycin] for atherosclerosis and its related disorders) trial. *J Infect Dis* 2000; 181 Suppl 3:S572-S578.
49. Cercek B, Shah PK, Noc M, Zahger D, Zeymer U, Matetzky S et al. Effect of short-term treatment with azithromycin on recurrent ischaemic events in patients with acute coronary syndrome in the Azithromycin in Acute Coronary Syndrome (AZACS) trial: a randomised controlled trial. *Lancet* 2003; 361(9360):809-813.
50. Zahn R, Schneider S, Frilling B, Seidl K, Tebbe U, Weber M et al. Antibiotic therapy after acute myocardial infarction: a prospective randomized study. *Circulation* 2003; 107(9):1253-1259.
51. Ray WA, Stein CM, Daugherty JR, Hall K, Arbogast PG, Griffin MR. COX-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of serious coronary heart disease. *Lancet* 2002; 360(9339):1071-1073.
52. Jaffé A, Francis J, Rosenthal M, Bush A. A long-term azithromycin may improve lung function in children with cystic fibrosis. *Lancet* 1998;351-420.

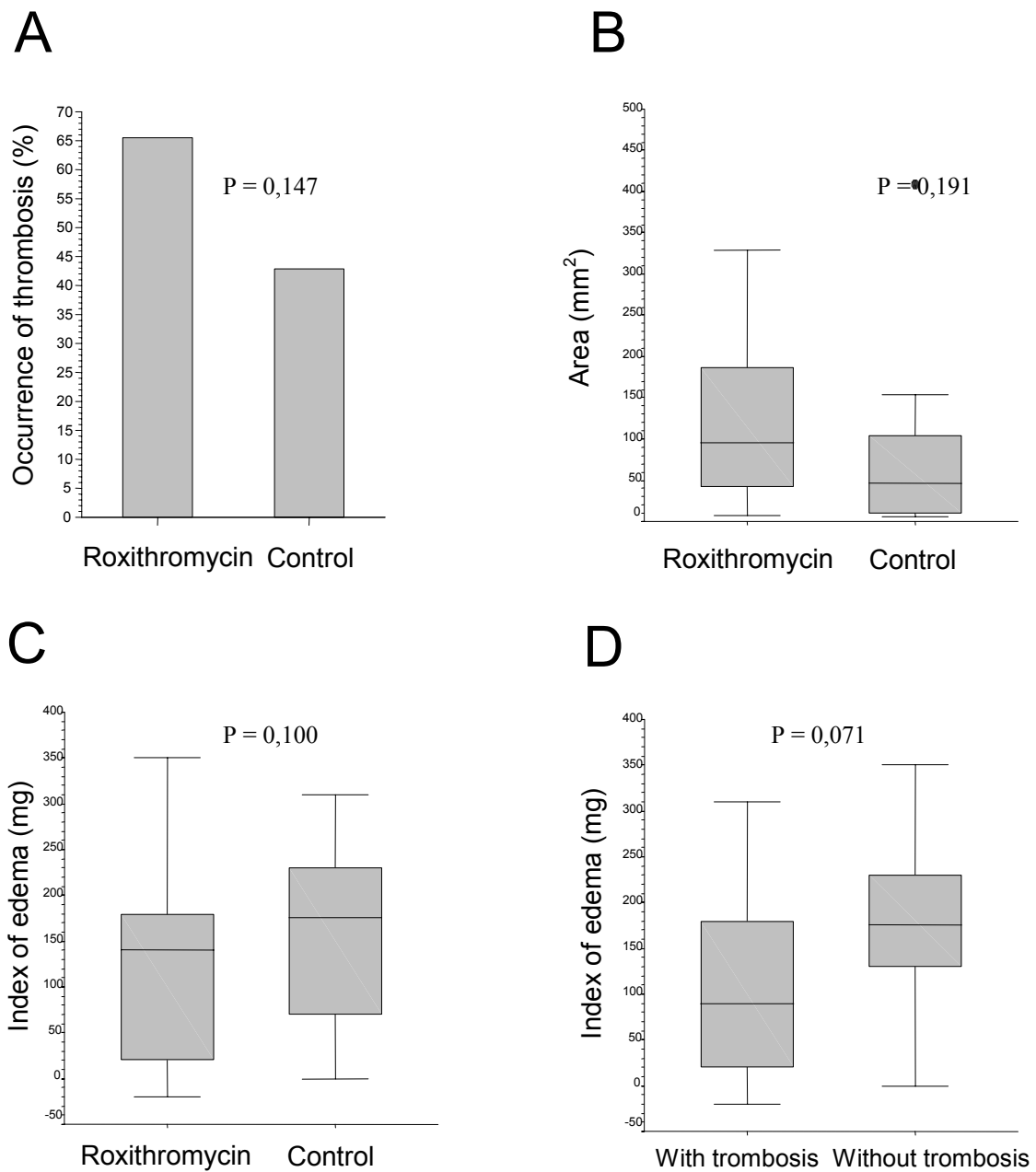


Figure 1. Graphical representation of the comparison between the roxithromycin and control groups for the proportion of the occurrence of thrombosis (A), the areas of the thrombosis (B) and the ear edema index (C). Between the groups with thrombosis and without thrombosis was representation the index of edema (D).

Table 1. Comparison of the occurrence of thrombosis, area of thrombosis, and the index of edema between the groups submitted to treatment with roxithromycin and a saline solution, and the index of edema between the animals presenting and free of thrombosis.

Variable	Roxithromycin	Control	P	P adjusted ^(c)
	n=29	n=28		
Occurrence of thrombosis (%)	19 (65.5)	12 (42.9)	0,147 ^(a)	
Area of thrombosis (mm ²)	96.1(41.1- 213.8)	46.4 (8.9 –111.6)	0,191 ^(b)	
Index of edema (mg)	140 (20 – 180)	175 (60 – 230)	0,100 ^(b)	0,197
	With Thrombo n=31	Without Thrombo n=26		
Index of edema (mg)	90 (20 – 180)	175 (122.5 –235)	0,071 ^(b)	0,137

The data is presented as frequency (percentage) and mean (interquartile amplitude: P25 – P75). (a) chi-squared test with Yates's correction; (b) Mann-Whitney; U test. (c) adjustment of the index of edema carried out on the factorial variance model containing the terms referring to the treatment group and the presence of thrombosis.

6. ARTIGO EM PORTUGUÊS

Avaliação dos efeitos antitrombótico e antiinflamatório da roxitromicina – experimento randomizado em coelhos

Autores: Scipioni PP^{1*}, Mendes GL², Raquel EP³, Varela DL³, Volpato D³,
Feres CN³; Mossman MP⁴, Picon PX⁴, Costa AF⁵, Picon PD^{1,6}

1. Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas da UFRGS.
2. Professor do Departamento de Ciências Fisiológicas da UPF.
3. Acadêmicos da Faculdade de Medicina da UPF.
4. Acadêmico da Faculdade de Medicina da UFRGS.
5. Mestre em Medicina: Cardiologia, pela Faculdade de Medicina da UFRGS.
6. Professor Titular de Farmacologia da UPF.

Correspondência:

Dr. Pitágoras Pinto Scipioni
Rua Capitão Araújo 551/1001
Bairro Centro
99010-200 Passo Fundo. RS-Brasil
Telefone: (54)3122009 Fax: 3122009
E-mail: pitagoras@zanellainfo.com.br

Resumo

Introdução: Existem evidências clínicas e experimentais de que inflamação e infecção estão associadas a doença aterotrombótica coronariana e a eventos cardiovasculares. **Objetivos:** Utilizou-se um modelo experimental *in vivo* de desendotelização e trombose arterial aguda em coelhos Nova Zelândia para testar o efeito antitrombótico da roxitromicina. Simultaneamente, através de um modelo de edema de orelha, avaliou-se o efeito antiinflamatório. **Material e Métodos:** Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: roxitromicina (n=29) e de controle (n=28). Todos foram submetidos a lesão arterial com cateter balão, seguindo um protocolo indutor de trombose e de instilação de substância edematogênica. A área de trombose aórtica e das ilíacas foi medida por videoplanimetria. Os fragmentos circulares das orelhas foram pesados, comparados entre si e nos dois grupos. **Resultados:** No grupo tratado, 19 animais (65,5%) apresentaram trombose arterial e 12 (42,9%) no grupo de controle (P=0,147). A área de trombose no grupo roxitromicina apresentou uma mediana (AIQ) de 91 mm² (41,1-213,8) e de 46,4 mm² (8,9 –111,6) no grupo de controle (P=0,191). O índice de edema de orelha no grupo tratado apresentou uma mediana (AIQ) de 140 mg (20-180) e de 175 mg (60-230) no grupo controle (P=0,10). Comparando-se os animais com trombo com aqueles sem trombo, foi observada uma tendência a um menor índice de edema de orelha nos animais com trombo, 90 mg (20–180) *versus* 175 mg (122,5–235) nos sem trombo (P=0,071). **Conclusão:** Os resultados não demonstram efeito protetor da roxitromicina sobre a trombose arterial e edema de orelha.

Palavras-chave: infecção, inflamação, aterosclerose, trombose, roxitromicina, modelo experimental, coelho.

Introdução

O papel da infecção na patogênese da aterosclerose foi proposto primariamente por Sir William Osler, em 1908¹, contudo essa visão não obteve grande aceitação na época. Atualmente, há um interesse renovado em verificar a contribuição das infecções na patogênese e progressão da aterosclerose. O conceito atual de aterosclerose encontra-se centrado no modelo de “resposta à lesão”, proposto por Ross em 1986². Esse modelo sugere que a infecção possa contribuir para a formação de aterosclerose via lesão ao endotélio vascular, juntamente com mecanismos inflamatórios, metabólicos e hemostáticos². Experimentalmente, foi demonstrada a formação de lesões ateroscleróticas em artérias de galinhas infectadas por um vírus herpes, na década de 70³. A descoberta do *Helicobacter pylori* como agente etiológico da úlcera péptica, outra doença crônica, sugere que uma etiologia infecciosa para a aterosclerose não deve ser desconsiderada⁴. Baseadas nessa teoria, têm sido relatadas associações entre cardiopatia isquêmica e algumas bactérias Gram negativas (*Helicobacter pylori* e *Chlamydia pneumoniae*) e certos vírus (herpes, citomegalovírus)⁵. A maioria dos trabalhos publicados consiste em estudos epidemiológicos baseados em associações entre sorologia dos respectivos anticorpos e cardiopatia isquêmica, ou em evidências imuno-histoquímicas da presença de bactérias ou vírus^{6,7} em lesões ateroscleróticas. Recentemente, ensaios clínicos randomizados apresentaram novas evidências e mostraram consistência na associação entre infecção e cardiopatia isquêmica⁸⁻¹⁰.

Entre os diversos agentes infecciosos apontados como possivelmente envolvidos no processo aterosclerótico, a *Chlamydia pneumoniae* é que tem merecido maior atenção e sobre a qual existe maior número de publicações científicas. Ela é um importante agente infeccioso do trato respiratório, que responde por até 10% dos casos de pneumonia adquirida na comunidade^{11,12}. Descrito pela primeira vez por Grayston¹¹, esse agente alcança altos índices de infecção na população em geral. Inquéritos soropidemiológicos indicam que, virtualmente, todas as pessoas são infectadas ao menos uma vez durante a

vida^{13,14}. As taxas de reinfecção oscilam de 9,2/100 na infância a 1,5/100 pessoas-ano para maiores de vinte anos de idade¹³. A reinfecção desenvolve um processo respiratório menos intenso, mas alguns autores sugerem que pode induzir vasculite isolada e sistêmica em qualquer órgão do corpo¹⁵. A infecção primária, associada ou não a episódios de reinfecção, pode conduzir a um estado de infecção crônica que seria a base fundamental para o desenvolvimento da lesão aterosclerótica. As informações científicas sobre o envolvimento da *C. pneumoniae* com aterosclerose podem ser classificadas como imunológicas¹⁶⁻¹⁸, anatomopatológicas^{19,20}, experimentais^{21,25} e clínicas^{8-10,22-24}. A inoculação de *Chlamydia SP* em coelhos via nasofaríngea produziu aceleração de lesões ateroscleróticas e o tratamento precoce com claritromicina reduziu esse efeito²¹.

A roxitromicina é um macrolídeo com espectro bacteriano similar ao da eritromicina, com ligeira superioridade de ação sobre *Chlamydia* e *Legionella*. Tem uma farmacocinética que permite uma dosagem menor; é resistente à hidrólise gástrica e bem absorvida, apresentando picos plasmáticos precoces, elevados e duráveis, com uma vida média de eliminação de 12 horas, atingindo concentrações intracelulares elevadas e eficácia clínica.²⁶⁻³⁵

As propriedades antiinflamatórias dos macrolídeos nas doenças respiratórias foram estudadas por diversos autores em doenças como panbronquiolite difusa^{36,37}, asma³⁸, fibrose cística⁵² e bronquiectasia³⁹.

Baseados na teoria infecciosa da aterosclerose e no provável efeito antiinflamatório dos macrolídeos, formulou-se a hipótese que a roxitromicina poderia diminuir a taxa de trombose após desendotelização e manipulação farmacológica, além da diminuição do índice de edema de orelha desencadeado por um agente irritante, o óleo de cróton^{40,41}. Não se encontrou na literatura nenhum trabalho com o propósito de estudar esses desfechos em modelo experimental de trombose arterial e edema.

Material e Métodos

Amostra

Iniciaram o estudo 64 coelhos machos, brancos, Nova Zelândia, com idade média de três meses e peso médio de 2,5–3,5 Kg, sem evidências de doenças na avaliação do médico veterinário. Após um período de sete dias de observação e ambientação no Biotério, os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos. Grupo 1, que recebeu roxitromicina, e Grupo 2, de controle que recebeu solução salina. Ocorreram sete perdas (três no grupo roxitromicina e quatro no de controle) e concluíram o estudo 57 animais, 29 no grupo roxitromicina e 28 no grupo de controle. As mortes ocorreram nos primeiros animais da série e logo após o período de desendotelização. Houve ainda três perdas no período compreendido entre a produção do edema de orelha e a morte (últimas seis horas). Não foram realizadas necrópsias desses animais.

Procedimentos

Trata-se de um estudo experimental aberto para a medida de edema de orelha. Entretanto, as medidas da área de trombose foram realizadas por pesquisadores cegos para a intervenção. O estudo foi realizado no Biotério da Universidade de Passo Fundo-RS, onde os animais foram mantidos em boxes individuais e com dieta normal; as salas, à temperatura ambiental com iluminação natural. Dois pesquisadores observaram os animais diariamente, administrando a roxitromicina e a solução salina. Durante o manuseio e a aplicação tópica do óleo de cróton, os pesquisadores utilizaram equipamento de proteção individual (máscara, avental e luva). Segundo relatórios da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), a temperatura média nos meses de realização do estudo foi de: 24,7 °C, 27,5 °C e 27,6 °C, ou seja, apresentou uma variação de 2,9 °C entre o mês mais frio e o mais quente.

Administração da roxitromicina e solução salina

Duas horas antes da desendotelização, no primeiro dia do estudo, o grupo tratado recebeu roxitromicina via oral na dose de 8 mg/Kg, através de uma seringa de insulina introduzida no esôfago, e o grupo de controle soro fisiológico. Após, diariamente foram administradas as doses de roxitromicina e solução salina, certificando-se de sua total deglutição, durante os 27 dias restantes; sendo que a última dose foi administrada seis horas antes da morte, para coincidir com o pico plasmático da roxitromicina. Não foram observadas reações adversas gastrointestinais (distensão, dor à manipulação, vômitos e diarreia) durante todo o período de observação de 28 dias.

Desendotelização aórtica com balão

Após sete dias de observação, os animais foram anestesiados com uma associação de quetamina (100mg/Kg) e xilazina (50 mg/Kg) via intramuscular. Foi realizada tricotomia da região inguinal direita, anti-sepsia com álcool iodado e utilizados campos e material cirúrgico esterilizados para a dissecação da artéria femoral direita. Um cateter de Fogarty® 3F (Baxter) foi introduzido retrogradamente até o arco da aorta, inflado o balão com 0,8 ml de ar e, então, tracionado até que este atingisse a incisão da artéria. Realizou-se o procedimento mais duas vezes e, na última desendotelização, o balão foi retirado inflado. A artéria foi ligada e a ferida operatória fechada por planos.

Indução da trombose farmacológica

No vigésimo sétimo dia, 24 horas antes da morte, foi induzida trombose farmacológica através da administração de veneno de víbora Russelis (vvR) na dose de 150 microgramas/Kg, via intraperitoneal, seguido de adrenalina 20 microgramas/Kg, via endovenosa, 30 minutos após o veneno.

Indução do edema de orelha

Seis horas antes da morte, junto com a última dose de roxitromicina, foi instilado topicamente, através de uma micropipeta, o óleo de cróton 2% na orelha direita (25 microlitros na face interna e 25 microlitros na face externa) e acetona na orelha esquerda na mesma dose e local.

Morte

Ao final de 28 dias, ou seja, 24 horas após a manipulação farmacológica (vvR + adrenalina) e após seis horas da indução de edema de orelha, os animais foram mortos. O protocolo de morte envolveu anestesia com quetamina e xilazina, seguida de uma punção cardíaca, para injetar lidocaína (1mg/Kg), provocando parada cardíaca. Abertos o tórax e abdômen, foi retirado o coração com a aorta e as ilíacas, além de fragmentos circulares da orelha direita e esquerda.

Procedimentos e medidas

A aorta e ilíacas foram abertas longitudinalmente e fixadas através de alfinetes para a retirada de quatro fotografias por peça com uma câmera digital (aorta e ilíacas, crossa da aorta, aorta abdominal e bifurcação da aorta com ilíacas). Através de videoplanimetria, foram realizadas as aferições das áreas de trombose em milímetros quadrados (mm²).

Com a utilização de um instrumento metálico circular de 16 mm de diâmetro, foram cortados discos das orelhas direita e esquerda, sempre no mesmo local em que haviam sido administrados o óleo de cróton e a acetona. Utilizando balança de precisão para miligramas, os fragmentos circulares das orelhas foram pesados e calculado o índice de edema de orelha pela diferença de peso entre elas (mg). Durante a pesagem, os seguintes cuidados foram tomados: manter a balança sempre no mesmo local e tarar previamente, desligar os circuladores de ar e fechar as janelas do local, além de os pesquisadores ficarem afastados da balança.

Tamanho da amostra

Partindo-se de uma estimativa de trombose arterial da ordem de 70% no grupo de controle, foi calculado que, para detectar uma diferença de 30% em relação ao grupo tratado com roxitromicina, seriam necessários 54 animais (27 em cada grupo), fixando-se $\alpha=0,05$ e $\beta=0,20$ (poder de 80%).

Análise estatística

A ocorrência de trombo nos dois grupos estudados foi descrita por percentual, sendo sua significância determinada pelo teste de qui-quadrado. Os dados quantitativos referentes à área do trombo e o índice de edema foram descritos por mediana e amplitude interquartil (AIQ: percentil 25 a percentil 75) em razão de importante assimetria observada. A comparação dos grupos foi realizada pelo teste U de Mann-Whitney. Para ajuste de efeitos simultâneos (roxitromicina e presença de trombos), utilizo-se um modelo de análise de variância fatorial sobre os *ranks* dos valores do índice de edema (variável dependente). O nível de significância adotado foi de 5%. Os dados foram processados e analisados com o auxílio do programa SPSS versão 10.0.

As três perdas ocorridas no período compreendido entre a produção do edema de orelha e a morte (últimas seis horas) não afetaram a análise do efeito antitrombótico, pois a aorta e íliacas foram retiradas e avaliadas. Com relação ao efeito antiinflamatório (edema de orelha), esses valores faltosos foram substituídos pela mediana da série, por representarem uma proporção menor que 10%.

Resultados

Como pode ser visto na Figura 1 e Tabela 1, o grupo roxitromicina (n=29) apresentou uma maior taxa de trombose arterial (19 animais; 65,5%) quando comparado com o grupo de controle (n=28; 12 animais; 42,9%), diferença que não apresentou significância estatística ao teste de qui-quadrado (P=0,147).

A área de trombose também foi maior no grupo roxitromicina, registrando-se para este uma mediana (amplitude interquartil: AIQ) de $96,1\text{mm}^2$ (41,1 a 213,8) e, no grupo de controle, o valor de $46,4\text{mm}^2$ (8,9 a 111,6). Da mesma forma, a diferença observada não foi considerada estatisticamente significativa pelo teste U de Mann-Whitney ($P = 0,191$).

Já o índice de edema de orelha foi menor no grupo roxitromicina apresentando mediana (AIQ) de 140mg (20 a 180) ao passo que no grupo de controle foi de 175mg (60 a 230). Novamente esse achado não atingiu significância estatística ao teste U de Mann-Whitney ($P=0,100$). Quando foi realizado o ajuste para o potencial efeito de confusão da presença de trombose arterial em modelo de análise de variância (ANOVA) fatorial, também se obteve um achado sem significância estatística ($P=0,197$).

Ao se considerar a presença ou não de trombose arterial, observou-se que, no grupo com trombose, o índice de edema foi menor, com mediana (AIQ) de 90mg (20 a 180), ao passo que, no grupo sem trombo, foi de 175mg (122,5 a 235). A diferença atingiu significância limítrofe no teste U de Mann-Whitney ($P=0,071$), mas mostrou-se de menor importância após o ajuste na ANOVA fatorial para o efeito do tratamento com roxitromicina ($P=0,137$).

Discussão

Nas últimas décadas, houve um avanço considerável na redução do tempo necessário para indução de trombose em modelos animais; além disso, esses modelos experimentais de aterosclerose são úteis para avaliar intervenções antitrombóticas. Em 1960, Constantinides e Chakravarti⁴² desenvolveram um modelo experimental *in vivo* com coelhos brancos Nova Zelândia submetidos a dieta rica em colesterol. Após oito meses de tratamento dietético, trombose foi induzida sobre placas ateroscleróticas avançadas através da administração de um pró-coagulante (vvR) associado a um vasoconstrictor (histamina), apresentando uma incidência de trombose baixa (25 a 38%). A desendotelização (lesão física) com cateter balão foi instituída por Baumgartner⁴³ para acelerar o processo

aterosclerótico por lesão da parede arterial. Este modelo continua sendo utilizado atualmente, tendo sofrido adaptações e modificações com o tempo⁴⁴. Com a modificação adicional proposta por Picon et al.⁴⁶, através da adição de lesão mecânica por cateter balão, associada com manipulação farmacológica (vvR + histamina), o tempo para o desenvolvimento de trombose foi reduzido para quatro meses. Mais recentemente, em animais tratados com vvR e adrenalina imediatamente após a lesão com cateter balão, somente seis horas foram suficientes para induzir trombose arterial aguda em 71% dos animais.⁴⁵ Em nosso estudo, com dieta normal, demonstrou-se que 28 dias após lesão física e manipulação farmacológica (vvR + adrenalina) foram suficientes para produzir 54,4% de trombose arterial.

No estudo em que os animais foram mortos após quatro meses da desendotelização aórtica e que receberam duas administrações de vvR e adrenalina em dois dias consecutivos, foi encontrada uma área média de trombose de 194 mm² (DP 182)⁴⁶. Para fins de comparação, calcularam-se neste trabalho os resultados como média e desvio-padrão, apesar de se considerar a mediana (segundo apresentado na Tabela 1) o melhor descritor de um dado assimétrico. No presente estudo, de 28 dias, no qual apenas uma dose de vvR e uma de adrenalina foram administradas, a área média de trombose no grupo de controle foi de 83,5 mm² (DP 113,5). No estudo em que os animais foram mortos após seis horas da injúria com balão e do tratamento indutor de trombose⁴⁵, a área média de trombose foi de 52,9 mm² (DP 50,5). No estudo de duas semanas⁴⁷, onde a lesão endotelial foi realizada no início, e a indução da trombose farmacológica ocorreu três horas antes da morte, a área de trombose foi de 21,7 mm² (DP 37,4). Essa correlação entre diminuição do tempo para a morte e do número e quantidade de vvR e adrenalina utilizadas, implicando uma área de trombose menor, indica uma diminuição da trombogenicidade do modelo.

O ensaio Wizard (*Weekly Intervention with Zithromax for Acute Coronary Syndrome*)⁴⁸ randomizou 7.747 pacientes com coronariopatia para um período de três meses de azitromicina (600 mg/dia) ou placebo. O estudo Azacs (*Azithromycin in Acute*

Coronary Syndrome)⁴⁹ avaliou a eficácia da azitromicina em um período de quatro dias em ensaio controlado por placebo que recrutou 1.436 pacientes com síndrome coronariana aguda. Em ambos não houve benefício entre os pacientes designados para o grupo de tratamento com macrolídeo, mesmo se alterando o número de dias de tratamento. O presente estudo em coelhos utilizou roxitromicina durante um período de tempo intermediário (28 dias) e também não demonstrou efeito antitrombótico da roxitromicina.

A taxa de trombose neste estudo utilizando dieta normal foi de 54,4%, menor que a encontrada quando se utilizou dieta rica em colesterol, que foi de 71%⁴⁵. Em ambos, utilizou-se semelhante técnica de desendotelização, mas a manipulação farmacológica e o tempo para a morte foram diferentes.

Em um modelo animal, no qual coelhos Nova Zelândia foram infectados por via nasofaringeana com *C. pneumoniae*²¹ e comparados quanto a presença de lesões ateroscleróticas, os animais que receberam claritromicina precocemente apresentaram uma redução de 75% das lesões ateroscleróticas, quando comparados aos infectados e não tratados. Apesar de não se aferir a presença de infecção por *Chlamydia* nos animais do presente estudo, a ineficácia antitrombótica e antiinflamatória da roxitromicina neste modelo pode ser atribuída à baixa taxa de infecção por este agente nesses animais jovens e saudáveis não submetidos à inoculação bacteriana, ou à ausência de efeito antiinflamatório e antitrombótico do fármaco.

O ensaio ANTIBIO (*Antibiotic Therapy after an Acute Myocardial Infarction*)⁵⁰ não mostrou diferença entre os pacientes que receberam roxitromicina e aqueles que receberam placebo, com referência à mortalidade, aos desfechos combinados, ou outros eventos clínicos. Os 872 pacientes com infarto agudo do miocárdio foram randomizados em 49 horas para tratamento habitual mais roxitromicina por seis semanas ou tratamento habitual mais placebo. Após 12 meses, as taxas de mortalidade foram semelhantes (6%) nos dois grupos (P=0,739). Talvez o problema mais sério com este ensaio tenha sido o recrutamento lento e uma taxa de perdas de 18% dentro do braço da roxitromicina em virtude dos efeitos

colaterais gastrointestinais. No presente estudo, a taxa de perdas foi de 10,6%, ficando dentro da faixa aceitável da literatura de 10 a 20%. Concordante com o ensaio ANTIBIO, o estudo não demonstrou redução da taxa de trombose arterial nos animais. Não foram observadas reações adversas gastrointestinais durante os 28 dias de utilização da roxitromicina.

Estudos anteriores indicaram que o rofecoxib, um agente antiinflamatório inibidor da COX-2, quando utilizado por períodos maiores que cinco dias, aumentou o risco de eventos coronarianos em idosos⁵¹. A ocorrência desses eventos estaria relacionada, por um mecanismo ainda não explicado, à formação de trombos. À semelhança do rofecoxib, a roxitromicina também possui um potencial efeito antiinflamatório. Assim, é possível que, por um mecanismo semelhante, esse fármaco estivesse também envolvido com uma maior formação de trombos. Desse modo, poder-se-ia se explicar o fato de não se ter observado um efeito antitrombótico no grupo tratado, mas o oposto.

Os dados desse estudo não indicam um efeito antiedema da utilização da roxitromicina, tanto que a mediana do índice de edema de orelha naqueles que utilizaram roxitromicina foi de 140 mg e nos de controle, de 175 mg. Considerando a grande dispersão observada nos dados, que levou a uma amplitude de 160 mg no primeiro grupo e de 170 mg no segundo, a diferença observada entre os grupos é de pequena monta. Apesar de se encontrar poucas referências na literatura sobre a utilização desse método de medida de edema em coelhos, Calixto e Medeiros validaram o método para camundongos^{40,41}. Estes autores utilizaram 40 µL de óleo de cróton por orelha; aqui, utilizaram-se 50 µL. Entretanto, o diâmetro do disco retirado da orelha, no presente estudo, foi maior (16 mm) do que o utilizado em camundongos (6 mm), caracterizando uma dose relativa menor. Se a quantidade total do agente irritante utilizado fosse maior nos coelhos, poder-se-ia aumentar a chance de produzir mais edema e, conseqüentemente, uma resposta maior ao tratamento.

Conclusões

O estudo não indica efeito antitrombótico da roxitromicina, nem foi encontrada diferença na área dos trombos, ou, sequer, no índice de edema de orelha. Comparando-se o grupo que desenvolveu trombo com o grupo sem trombose, também não foi observada uma diferença no índice de edema de orelha.

Desse modo, os achados são concordantes com os trabalhos que não encontraram um efeito antitrombótico e antiinflamatório da roxitromicina.

Referências

1. Osler W. Diseases of arteries. In: Osler W, editor. Modern medicine its theory and practice, in original contributions by American and foreign authors. Philadelphia: Lea brothers, 1907: 429-447.
2. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis--an update. *N Engl J Med* 1986; 314(8):488-500.
3. Fabricant CG, Fabricant J, Litrenta MM, Minick CR. Virus-induced atherosclerosis. *J Exp Med* 1978; 148(1):335-340.
4. Peterson WL. Helicobacter pylori and peptic ulcer disease. *N Engl J Med* 1991; 324(15):1043-1048.
5. Vallance P, Collier J, Bhagat K. Infection, inflammation, and infarction: does acute endothelial dysfunction provide a link? *Lancet* 1997; 349(9062):1391-1392.
6. Paton P, Tabib A, Loire R, Tete R. Coronary artery lesions and human immunodeficiency virus infection. *Res Virol* 1993; 144(3):225-231.
7. Gao SZ, Hunt SA, Schroeder JS, Alderman EL, Hill IR, Stinson EB. Early development of accelerated graft coronary artery disease: risk factors and course. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28(3):673-679.
8. Gurfinkel E, Bozovich G, Daroca A, Beck E, Mautner B. Randomised trial of roxithromycin in non-Q-wave coronary syndromes: ROXIS Pilot Study. ROXIS Study Group. *Lancet* 1997; 350(9075):404-407.
9. Stone AF, Mendall MA, Kaski JC, Edger TM, Risley P, Poloniecki J et al. Effect of treatment for Chlamydia pneumoniae and Helicobacter pylori on markers of inflammation and cardiac events in patients with acute coronary syndromes: South Thames Trial of Antibiotics in Myocardial Infarction and Unstable Angina (STAMINA). *Circulation* 2002; 106(10):1219-1223.
10. Neumann F, Kastrati A, Miethke T, Pogatsa-Murray G, Mehilli J, Valina C et al. Treatment of Chlamydia pneumoniae infection with roxithromycin and effect on neointima

- proliferation after coronary stent placement (ISAR-3): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2001; 357(9274):2085-2089.
11. Grayston JT, Campbell LA, Kuo CC, Mordhorst CH, Saikku P, Thom DH et al. A new respiratory tract pathogen: *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. *J Infect Dis* 1990; 161(4):618-625.
 12. Kuo CC, Jackson LA, Campbell LA, Grayston JT. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). *Clin Microbiol Rev* 1995; 8(4):451-461.
 13. Aldous MB, Grayston JT, Wang SP, Foy HM. Seroepidemiology of *Chlamydia pneumoniae* TWAR infection in Seattle families, 1966-1979. *J Infect Dis* 1992; 166(3):646-649.
 14. O'Neill C, Murray LJ, Ong GM, O'Reilly DP, Evans AE, Bamford KB. Epidemiology of *Chlamydia pneumoniae* infection in a randomly selected population in a developed country. *Epidemiol Infect* 1999; 122(1):111-116.
 15. Ljungstrom L, Franzen C, Schlaug M, Elowson S, Viidas U. Reinfection with *Chlamydia pneumoniae* may induce isolated and systemic vasculitis in small and large vessels. *Scand J Infect Dis Suppl* 1997; 104:37-40.
 16. Ridker PM, Kundsin RB, Stampfer MJ, Poulin S, Hennekens CH. Prospective study of *Chlamydia pneumoniae* IgG seropositivity and risks of future myocardial infarction. *Circulation* 1999; 99(9):1161-1164.
 17. Saikku P, Leinonen M, Tenkanen L, Linnanmaki E, Ekman MR, Manninen V et al. Chronic *Chlamydia pneumoniae* infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. *Ann Intern Med* 1992; 116(4):273-278.
 18. Tiran A, Tio RA, Ossewaarde JM, Tiran B, den Heijer P, The TH et al. Coronary angioplasty induces rise in *Chlamydia pneumoniae*-specific antibodies. *J Clin Microbiol* 1999; 37(4):1013-1017.
 19. Muhlestein JB, Hammond EH, Carlquist JF, Radicke E, Thomson MJ, Karagounis LA et al. Increased incidence of *Chlamydia* species within the coronary arteries of patients with symptomatic atherosclerotic versus other forms of cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27(7):1555-1561.
 20. Davidson M, Kuo CC, Middaugh JP, Campbell LA, Wang SP, Newman WP, III et al. Confirmed previous infection with *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) and its presence in early coronary atherosclerosis. *Circulation* 1998; 98(7):628-633.
 21. Fong IW, Chiu B, Viira E, Jang D, Mahony JB. Influence of clarithromycin on early atherosclerotic lesions after *Chlamydia pneumoniae* infection in a rabbit model. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(8):2321-2326.
 22. Anderson JL, Muhlestein JB, Carlquist J, Allen A, Trehan S, Nielson C et al. Randomized secondary prevention trial of azithromycin in patients with coronary artery disease and serological evidence for *Chlamydia pneumoniae* infection: The Azithromycin in Coronary Artery Disease: Elimination of Myocardial Infection with *Chlamydia* (ACADEMIC) study. *Circulation* 1999; 99(12):1540-1547.
 23. Gupta S, Leatham EW, Carrington D, Mendall MA, Kaski JC, Camm AJ. Elevated *Chlamydia pneumoniae* antibodies, cardiovascular events, and azithromycin in male survivors of myocardial infarction. *Circulation* 1997; 96(2):404-407.

24. Meier CR, Derby LE, Jick SS, Vasilakis C, Jick H. Antibiotics and risk of subsequent first-time acute myocardial infarction. *JAMA* 1999; 281(5):427-431.
25. Muhlestein JB, Anderson JL, Hammond EH, Zhao L, Trehan S, Schwobe EP et al. Infection with *Chlamydia pneumoniae* accelerates the development of atherosclerosis and treatment with azithromycin prevents it in a rabbit model. *Circulation* 1998; 97(7):633-636.
26. Agache P, Amblard P, Moulin G, Barriere H, Texier L, Beylot C et al. Roxithromycin in skin and soft tissue infections. *J Antimicrob Chemother* 1987; 20 Suppl B:153-156.
27. Begue P, Lacombe H, Cotin G, Chaviere F, Chretien P, Safran C. Diffusion of roxithromycin into tonsillar tissue in children. *Br J Clin Pract* 1988; 42(1 (suppl 55)):78-79.
28. Bertrand A, Jonquet O, Sauvaget J. Multicenter study of the clinical efficacy and tolerance of roxithromycin compared to erythromycin ethylsuccinate in lower respiratory tract infections. *Pathol Biol (Paris)* 1988; 36(5):544-547.
29. Botto H, Camey M, Chretien P, Safran C. Study of the diffusion of roxithromycin into prostatic tissue after replicate oral dosing. *Br J Clin Pract* 1988; 42(1 (suppl 55)):83.
30. Charpin J, Freour P, Marsac J. Multicenter study of the clinical efficacy and tolerance of roxithromycin compared to doxycycline in lower respiratory infections. *Pathol Biol (Paris)* 1988; 36(5):548-551.
31. Gentry LO. Roxithromycin, a new macrolide antibiotic, in the treatment of infections in the lower respiratory tract: an overview. *J Antimicrob Chemother* 1987; 20 Suppl B:145-152.
32. Herron JM. Roxithromycin in the therapy of *Streptococcus pyogenes* throat infections. *J Antimicrob Chemother* 1987; 20 Suppl B:139-144.
33. Kafetzis D, Ligatskas C, Saint-Salvi B, Lefant B, Blanc F. Concentration of roxithromycin in tonsil and adenoid tissue after single and repeated administrations to children. *Br J Clin Pract* 1988; 42(1 (suppl 55)):80.
34. Lachat JM, Anex JF, Regamey C. Roxithromycin (RU 28965), a new macrolide effective against pulmonary infections. *Schweiz Med Wochenschr* 1986; 116(49):1739-1741.
35. van der Willigen AH, Tjiam KH, Wagenvoort JH, Polak-Vogelzang AA, Michel MF, Stolz E. Evaluation of roxithromycin in the treatment of non-gonococcal urethritis in males. *Eur J Clin Microbiol* 1986; 5(6):612-614.
36. Homma H, Yamanaka A, Tanimoto S, Tamura M, Chijimatsu Y, Kira S et al. Diffuse panbronchiolitis. A disease of the transitional zone of the lung. *Chest* 1983; 83(1):63-69.
37. Kudoh S. Erythromycin treatment in diffuse panbronchiolitis. *Curr Opin Pulm Med* 1998; 4(2):116-121.
38. Suez D, Szeffler SJ. Excessive accumulation of mucus in children with asthma: a potential role for erythromycin? A case discussion. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 77(2):330-334.
39. Tsang KW, Ho PI, Chan KN, Ip MS, Lam WK, Ho CS et al. A pilot study of low-dose erythromycin in bronchiectasis. *Eur Respir J* 1999; 13(2):361-364.

40. Calixto JB, Medeiros YS. Characterization of bradykinin mediating pertussis toxin-insensitive biphasic response in circular muscle of the isolated guinea pig ileum. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 259(2):659-665.
41. Neves C, Neves P, Zanini J, Medeiros Y, Calixto JB. Analgesic and antiinflammatory activity of the crude hydroalcoholic extract obtained from the bark of *Hymenaea martiana*. *Phytother Res* 1993; 7:356-362.
42. Constantinides P, Chakravarti R. Rabbit arterial thrombosis production by systemic procedures. *Arch Pathol* 1961; 72:79-90.
43. Baumgartner HR. A new method for the induction of thrombi by controlled over-dilatation of the vascular wall. *Z Gesamte Exp Med* 1963; 137:227-247.
44. Johnstone MT, Botnar RM, Perez AS, Stewart R, Quist WC, Hamilton JA et al. In vivo magnetic resonance imaging of experimental thrombosis in a rabbit model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21(9):1556-1560.
45. Iturri-Yamamoto G, Battastini A, Martins N, Edelweiss M, Rosig L, Sarkis J et al. Acute arterial thrombosis induced by endothelial injury and activation of blood coagulation: the role of the ATP diphosphohydrolase (ecto-apyrase). *Tromb Haemost* 2003; (submitted).
46. Picon PD, Goncalves SC, Wainstein MV, Costa AF, Mengarda CV, Machado RP et al. Atherosclerosis and acute arterial thrombosis in rabbits: a model using balloon desendothelization without dietary intervention. *Braz J Med Biol Res* 1997; 30(3):415-417.
47. Costa AF, Gammerman P, Picon P, Mosmann M, Ketllun AM, Valenzuela M et al. Intravenous apyrase administration reduces arterial thrombosis in a rabbit model of endothelial denudation *in vivo*. *Blood Coagul Fibrinolysis*. In press.
48. Dunne MW. Rationale and design of a secondary prevention trial of antibiotic use in patients after myocardial infarction: the WIZARD (weekly intervention with zithromax [azithromycin] for atherosclerosis and its related disorders) trial. *J Infect Dis* 2000; 181 Suppl 3:S572-S578.
49. Cercek B, Shah PK, Noc M, Zahger D, Zeymer U, Matetzky S et al. Effect of short-term treatment with azithromycin on recurrent ischaemic events in patients with acute coronary syndrome in the Azithromycin in Acute Coronary Syndrome (AZACS) trial: a randomised controlled trial. *Lancet* 2003; 361(9360):809-813.
50. Zahn R, Schneider S, Frilling B, Seidl K, Tebbe U, Weber M et al. Antibiotic therapy after acute myocardial infarction: a prospective randomized study. *Circulation* 2003; 107(9):1253-1259.
51. Ray WA, Stein CM, Daugherty JR, Hall K, Arbogast PG, Griffin MR. COX-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of serious coronary heart disease. *Lancet* 2002; 360(9339):1071-1073.
52. Jaffé A, Francis J, Rosenthal M, Bush A. A long-term azithromycin may improve lung function in children with cystic fibrosis. *Lancet* 1998;351-420.

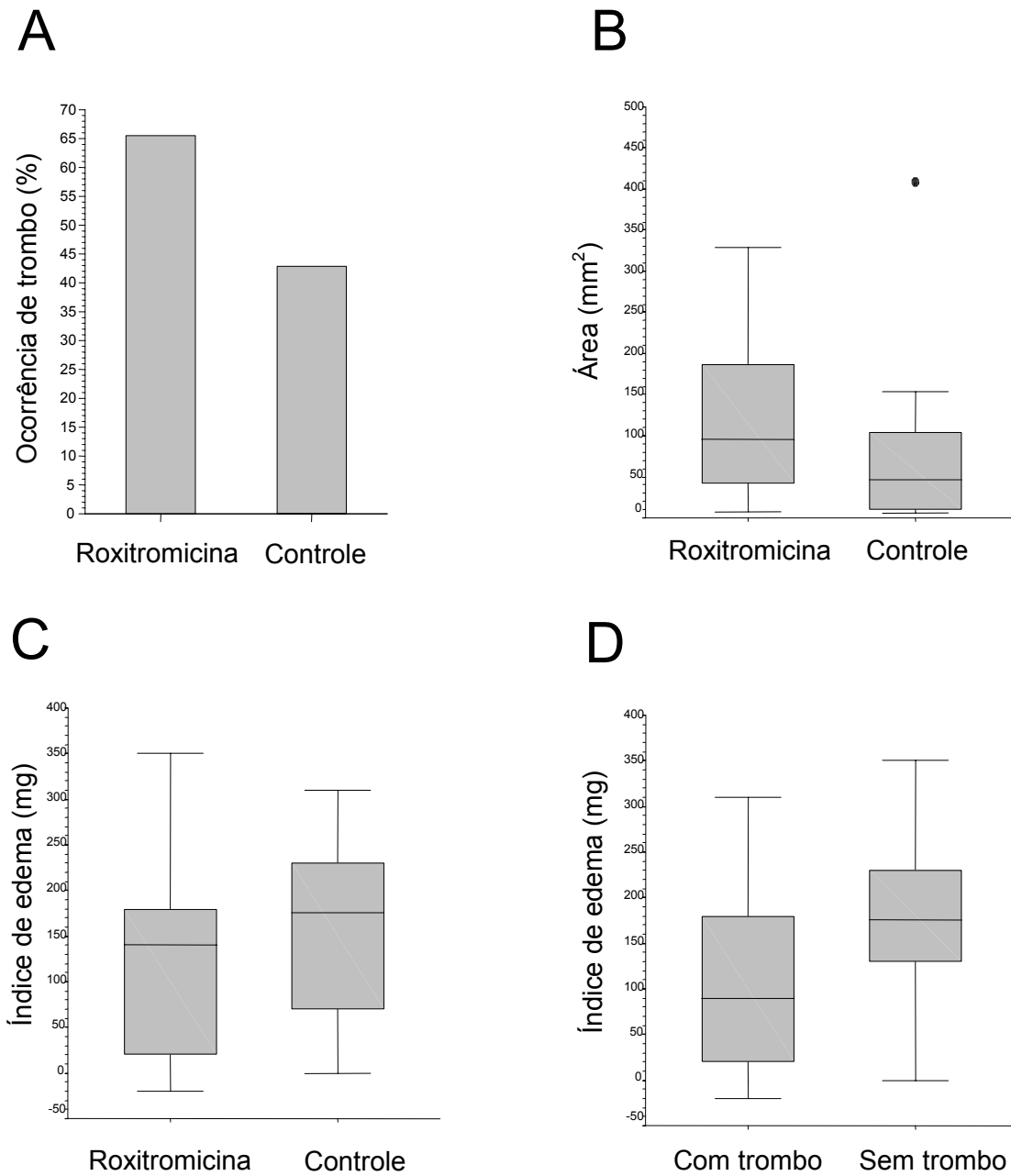


Figura 1: Representação gráfica das comparações entre os grupos roxitromicina e controle para a proporção de ocorrência de trombos (A), área dos trombos (B) e índice de edema (C). Entre os grupos com trombo e sem trombo foi representado o índice de edema (D).

Tabela 1: Comparação da ocorrência de trombo, área do trombo e índice de edema entre os grupos submetidos a tratamento com roxitromicina e salina, e índice de edema entre os animais que apresentaram trombo e os livres deste desfecho.

Variável	Roxitromicina	Controles	P	P ajustado ^(c)
	n=29	n=28		
Ocorrência de trombo (%)	19 (65.5)	12 (42.9)	0,147 ^(a)	
Área do trombo (mm ²)	96.1(41.1- 213.8)	46.4 (8.9 –111.6)	0,191 ^(b)	
Índice de edema (mg)	140 (20 – 180)	175 (60 – 230)	0,100 ^(b)	0,197
	Com trombo n=31	Sem Trombo n=26		
Índice de edema (mg)	90 (20 – 180)	175 (122.5 –235)	0,071 ^(b)	0,137

Os dados são apresentados como frequência (percentual) e mediana (amplitude interquartil: P25 – P75). (a) teste de qui-quadrado com correção de Yates; (b) teste U de Mann-Whitney; (c) ajuste sobre o índice de edema realizado em modelo de análise de variância fatorial contendo os termos referentes a grupo de tratamento e presença de trombo.

