

**FERNANDO LUIZ TORRES GOMES**

**Efeitos da associação de quimioterápicos na regressão de  
placa aterosclerótica e no perfil de marcadores inflamatórios  
em coelhos**

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

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Vicente  
Serrano Junior

**São Paulo  
2015**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Gomes, Fernando Luiz Torres

Efeitos da associação de quimioterápicos na regressão de placa  
aterosclerótica e no perfil de marcadores inflamatórios em coelhos / Fernando  
Luiz Torres Gomes. -- São Paulo, 2015.

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

Orientador: Carlos Vicente Serrano Junior.

Descritores: 1.Aterosclerose 2.Nanopartículas 3.Inflamação 4.Paclitaxel  
5.Metotrexato 6.Hipercolesterolemia 7.Coelhos

USP/FM/DBD-251/15

*Dedico esta tese à Katia e ao Francisco,  
amores da minha vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Carlos Vicente Serrano Junior, orientador desta tese, por sua dedicação e disponibilidade.

Ao Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão, pelo apoio técnico e pelos ensinamentos.

À equipe do Laboratório de Anatomia Patológica do InCor, especialmente, à Dra. Maria de Lourdes Higuchi, Márcia, Sueli, Renata, Joyce e Shérrira. Obrigado pelos ensinamentos, pelo apoio e por autorizar o uso do Aperio.

À equipe da Divisão Experimental da Faculdade de Medicina da USP, especialmente, a Dr. Eduardo, Donizete, Vicente e Clóvis, por toda ajuda.

Aos membros da banca, pela atenção dispensada a esta tese.

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

A todos os meus amigos do Laboratório de Metabolismo de Lípidos do InCor, pelo apoio. Aprendi muito com vocês. Em especial, às Elaine Tavares e Daminelli, Priscila e Fátima.

À equipe da Unidade Clínica de Coronariopatias Agudas, pelo apoio e incentivo.

À Simone e Monique, e a toda equipe do Departamento de Aterosclerose, pela ajuda nos últimos anos.

À minha família, por tudo.

## NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Aneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3<sup>a</sup> Ed. São Paulo: Serviços de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

## SUMÁRIO

### LISTA DE ABREVIATURAS

### LISTA DE TABELAS

### LISTA DE FIGURAS

### RESUMO

### SUMMARY

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>2</b>
1.1 Aterosclerose e doença cardiovascular: importância epidemiológica .....	2
1.2 Papel fisiopatológico da inflamação na aterosclerose .....	2
1.3 Citocinas inflamatórias.....	3
1.4 Proliferação celular e aterosclerose.....	6
1.5 Regressão da aterosclerose .....	7
1.6 Agentes antiproliferativos.....	10
1.6.1 Paclitaxel.....	10
1.6.2 Metotrexato .....	11
1.7 Nanopartículas lipídicas artificiais como transportadoras de fármacos .....	12
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>15</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
3.1 Primário.....	17
3.2 Secundários.....	17
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
4.1 Animais utilizados no estudo.....	19
4.2 Desenho do estudo.....	19
4.3 Preparo da dieta rica em colesterol .....	21
4.4 Indução de aterosclerose.....	21
4.5 Preparo da LDE .....	22
4.6 Associação do oleato de paclitaxel e do didoceil-metotrexato à LDE .....	23
4.7 Avaliação dos efeitos hematológicos do tratamento e no perfil lipídico dos animais.....	24
4.8 Avaliação dos marcadores inflamatórios de aterosclerose .....	24
4.9 Análise macroscópica das aortas .....	24
4.10 Análise morfométrica de cortes histológicos de arco aórtico .....	25

4.11	Análise imuno-histoquímica dos arcos aórticos .....	26
4.12	Análise de expressão gênica dos receptores de lipoproteínas e de fatores inflamatórios.....	27
4.12.1	Amostras de tecido de aorta .....	27
4.12.2	Extração de ácido ribonucleico (RNA) e síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA).....	27
4.12.3	Análise da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) .....	28
4.12.4	Reações de PCR em tempo real .....	29
4.13	Análise estatística .....	30
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
5.1	Perfil ponderal.....	32
5.2	Análise do consumo de ração.....	33
5.3	Perfil lipídico.....	34
5.4	Perfil hematológico .....	35
5.5	Perfil bioquímico .....	36
5.6	Perfil inflamatório .....	37
5.7	Análise macroscópica das lesões ateroscleróticas .....	38
5.8	Análise morfométrica de cortes histológicos de arco aórtico .....	40
5.9	Análise imuno-histoquímica .....	42
5.9.1	Quantificação de macrófagos e células de músculo liso.....	42
5.9.2	Quantificação da expressão proteica de MMP9.....	45
5.10	Análise da expressão gênica relativa dos marcadores inflamatórios nas aortas.....	46
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>58</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Perfil lipídico dos coelhos dosado antes do início da dieta rica em colesterol (basal), após a suspensão da dieta (8 semanas) e ao final do protocolo. Dados expressos em média±DP.....	34
<b>Tabela 2</b>	Perfil hematológico dos grupos DIETA, CONTROLE, PTX e PTX+MTX. Dados expressos em média±DP.....	35
<b>Tabela 3</b>	Perfil bioquímico dos grupos DIETA, CONTROLE, PTX e PTX+MTX. Dados expressos em média±DP.....	36
<b>Tabela 4</b>	Medidas das áreas totais, de lesões ateroscleróticas e porcentagem de placa nas aortas dos coelhos dos grupos CONTROLE, DIETA, PTX e PTX+MTX. Dados expressos em média±DP.....	39
<b>Tabela 5</b>	Morfometria das áreas e das espessuras totais e da camada íntima do arco aórtico de coelhos dos grupos DIETA, PTX e PTX+MTX. Dados expressos em Média±D.P.....	40
<b>Tabela 6</b>	Morfometria da área total da amostra, da porcentagem de área imunomarcada total e porcentagem de área imunomarcada na placa por macrófagos e células de músculo liso presentes no arco aórtico de coelhos dos grupos DIETA, PTX e PTX+MTX. Dados expressos em média±D.P.....	43
<b>Tabela 7</b>	Morfometria da área imuno-marcada e porcentagem de área imuno-marcada pela metaloproteinase da matriz MMP-9 presente em arco aórtico de coelhos dos grupos DIETA, PTX e PTX+MTX. Dados expressos em Média±D.P.....	45



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Desenho do estudo, divisão de grupos e sequência das intervenções. ....	20
<b>Figura 2</b>	Representação da variação de peso (kg) dos grupos DIETA, CONTROLE, PTX e PTX+MTX. Dados expressos em média±DP. ....	32
<b>Figura 3</b>	Representação do consumo de ração (g) dos grupos CONTROLE, DIETA, PTX e PTX+MTX. Dados expressos em média±DP. ....	33
<b>Figura 4</b>	Perfil de marcadores inflamatórios séricos dos grupos DIETA, PTX, PTX+MTX. Dados expressos em média±DP.....	37
<b>Figura 5</b>	Aortas de coelhos dos grupos CONTROLES (A), DIETA (B), PTX (C) e PTX+MTX (D) com os depósitos lipídicos das lesões ateroscleróticas evidenciados por SUDAN IV.....	39
<b>Figura 6</b>	Cortes histológicos de aorta dos coelhos dos grupos CONTROLE, DIETA, PTX e PTX+MTX corados em hematoxilina-eosina.....	42
<b>Figura 7</b>	Cortes histológicos de arco aórtico de animais dos grupos Controle, DIETA, PTX e PTX+MTX imuno-marcados para RAM-11.....	44
<b>Figura 8</b>	Cortes histológicos de arco aórtico de animais dos grupos Controle, DIETA, PTX e PTX+MTX imuno-marcados para actina-alfa. ....	44
<b>Figura 9</b>	Cortes histológicos de arco aórtico de animais dos grupos Controle, DIETA, PTX e PTX+MTX imuno-marcados para MMP-9. ....	45
<b>Figura 10</b>	Expressão gênica relativa dos marcadores de inflamação: IL-10, MCP-1, MMP-12, MMP-9, CD36, VCAM-1 e TNF-á, dos grupos DIETA, PTX e PTX+MTX. Valores expressos em média ± desvio padrão.....	47

## RESUMO

Gomes FLT. *Efeitos da associação de quimioterápicos na regressão de placa aterosclerótica e no perfil de marcadores inflamatórios em coelhos.* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

A aterosclerose é considerada, hoje, doença inflamatória e com intensa proliferação celular, daí o racional de se usar medicamentos antiproliferativos e com ação anti-inflamatória como o paclitaxel (PTX) e o metotrexato (MTX) no tratamento dessa condição. A nanoemulsão lipídica (LDE), de composição semelhante à da lipoproteína de baixa densidade (LDL), se liga a receptores de LDL após sua injeção endovenosa na corrente sanguínea. Como tais receptores estão superexpressos em células com altas taxas de proliferação, como ocorre no câncer e na aterosclerose, a LDE pode ser usada como veículo para direcionar agentes antiproliferativos a essas células, aumentando a sua eficácia e diminuindo a toxicidade. O paclitaxel é um quimioterápico com ação antiproliferativa usado em vários tipos de câncer e recobrando *stents* farmacológicos, trabalhos anteriores, usando coelhos submetidos a uma dieta aterogênica, nos animais tratados com LDE-PTX houve redução de 60% da área lesionada. O metotrexato, além de ser usado em vários esquemas quimioterápicos, possui, também, ação anti-inflamatória, sendo usado em doenças inflamatórias crônicas, como a artrite reumatoide. Em outro estudo envolvendo, coelhos hipercolesterolêmicos, o uso de MTX comercial por 4 semanas demonstrou uma redução de 75% na área de placa aterosclerótica. Esse estudo tem por objetivo avaliar macroscopicamente a eficácia das terapias quimioterápicas combinada, composta de PTX-LDE com MTX-LDE, e monoterapia, apenas com PTX-LDE, na regressão da aterosclerose experimental. No presente trabalho, vinte e oito coelhos machos da raça New Zealand receberam dieta rica em colesterol a 1% durante 8 semanas. Depois desse período, foram divididos em quatro grupos: grupo CONTROLE, que foi sacrificado e as aortas fixadas para análise posterior, grupo DIETA, que apenas teve a ração enriquecida com colesterol a 1% suspensa, PTX, que recebeu tratamento com injeções endovenosas semanais de LDE-paclitaxel na dose de 4 mg/kg por 8 semanas, e PTX+MTX, que recebeu LDE-paclitaxel e LDE-metotrexato na dose de 4 mg/kg/semana por 8 semanas. Foram avaliados perfil hematológico, lipídico, bioquímico, ponderal e o consumo de ração. Após a eutanásia, foram medidas as lesões ateroscleróticas macroscópicas nas aortas dos coelhos. Em seguida, o arco aórtico foi analisado por morfometria e por imuno-histoquímica. Os marcadores inflamatórios foram analisados no plasma, por ELISA e por meio de expressão gênica por Qrt-pcr. Observou-se que não houve diferença no perfil ponderal e no consumo de ração entre os grupos de estudo. Não houve toxicidade hematológica, hepática e renal

relacionada ao tratamento. No perfil lipídico, ao final do estudo, as concentrações de colesterol total, não HDL-C e triglicérides aumentaram significativamente em todos os grupos. Houve uma marcante regressão na área de placa aterosclerótica nos coelhos tratados com LDE-paclitaxel, da ordem de 64% e mais marcante no grupo LDE-metotrexato de 71%, quando comparados ao grupo CONTROLE. Na comparação com o grupo DIETA, houve, também, regressão, de 49% nos coelhos do grupo PTX e de 59% no grupo PTX+MTX. O tratamento quimioterápico também mostrou ação antiaterosclerótica nos outros parâmetros avaliados, destacando a intensa redução na relação íntima-média das aortas, na expressão proteica de MMP-9 e da redução na expressão gênica de TNF- $\alpha$  em relação ao grupo DIETA. Portanto, o tratamento quimioterápico com PTX e MTX associado à LDE possui potencial para uso clínico em pacientes com doença aterosclerótica, sendo muito eficaz e com boa tolerabilidade.

**Descritores:** Aterosclerose; Nanopartículas; Inflamação Vascular; Paclitaxel; Metotrexato; Hipercolesterolemia; Coelhos.

## SUMMARY

Gomes FLT. *Effects of chemotherapy association on atherosclerotic plaque regression and inflammatory markers profile in rabbits* [Thesis]. São Paulo: Faculty of Medicine, University of São Paulo; 2015.

Atherosclerosis is nowadays considered as an inflammatory disease with intense cell proliferation, hence the rationale of using antiproliferative drugs with an anti-inflammatory action such as paclitaxel (PTX) and methotrexate (MTX) in the treatment of this condition. The lipid nanoemulsion (LDE), with a similar composition to low density lipoprotein (LDL) binds to LDL receptors after their intravenous injection into the bloodstream. Since such receptors are overexpressed in cells with high proliferation rates, such as occurs in cancer and atherosclerosis, LDE can be used as a vehicle to direct antiproliferative agents to these cells, increasing their efficacy and reducing toxicity. Paclitaxel is a chemotherapeutic drug with an anti-proliferative action used in various types of cancer and drug-eluting stents. In previous studies using rabbits subjected to an atherogenic diet, animals treated with LDE-PTX had a 60% reduction in the injured area. Methotrexate in addition to being used in various chemotherapy regimens also has an anti-inflammatory action and is used for chronic inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis; another study involving hypercholesterolemic rabbits using commercial MTX for 4 weeks showed a 75% reduction of the atherosclerotic plaque area. This study aims to evaluate the effectiveness of combined chemotherapy treatments, composed of PTX-LDE with MTX-LDE, and PTX-LDE in monotherapy, on the regression of experimental atherosclerosis. In this study, twenty eight male New Zealand breed rabbits received a diet enriched with 1% cholesterol for 8 weeks. After that time, they were divided into four groups: the CONTROL group, which was sacrificed and the aortas kept for later analysis, the DIET group, which only had the diet supplemented with 1% cholesterol suspended; the PTX group which received treatment with weekly intravenous injections of LDE paclitaxel, at a dose of 4 mg/kg for 8 weeks and the PTX+MTX group which received PTX - LDE + MTX-LDE at a dose of 4 mg/kg per week for 8 weeks. The hematological, lipid, biochemical, weight and food intake profiles were evaluated. After euthanasia, macroscopic atherosclerotic lesions in the aortas of the rabbits were measured. Then, the aortic arch was analyzed by morphology and immunohistochemistry. The inflammatory markers were analyzed in the plasma by ELISA and gene expression by qRT-PCR. There was no difference in weight profile and feed intake among the study groups. There was no hematological, hepatic or renal toxicity related to treatment. The lipid profiles of all the groups at the end of the study showed significantly increased concentrations of total cholesterol, non-HDL-C and triglyceride levels. There was a marked regression of 64% in the atherosclerotic plaque area, in the LDE-paclitaxel treated rabbits, and an

even more striking 71% in the LDE-methotrexate group compared to the CONTROL group. There was also regression when compared to the DIET group, 49% in rabbits from the PTX group and 59% in the PTX+MTX group. The chemotherapy also showed an anti-atherosclerotic action in the other evaluated parameters, especially notable were the intense reduction in the intima-media ratio of the aortas in protein expression of MMP-9 and the reduction in gene expression of TNF-alpha compared to the DIET group. Therefore, chemotherapy with PTX and MTX associated with LDE, has potential for clinical use in patients with atherosclerotic disease, as it is very effective and well tolerated.

**Keywords:** Atherosclerosis; Nanoparticles; Vascular inflammation; Paclitaxel; Methotrexate; Hypercholesterolemia; Rabbits.

# **1 INTRODUÇÃO**

---

## **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 Aterosclerose e doença cardiovascular: importância epidemiológica**

As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de óbito em todo o mundo, aproximadamente, 17 milhões de pessoas morreram em 2011 – são quase 3 em cada 10 mortes devido a essa condição. Especificamente, 7 milhões faleceram por doenças isquêmicas do coração e 6,2 milhões devido a acidentes vasculares cerebrais. (WHO, 2011) No Brasil, ocorreram 335.213 óbitos por DCV em 2011, sendo 103.486 por doenças isquêmicas do coração e 100.751 por doenças cerebrovasculares, (DATASUS, 2012). Essas patologias apresentam como principal mecanismo fisiopatológico a aterosclerose.

### **1.2 Papel fisiopatológico da inflamação na aterosclerose**

Por muitos anos, a fisiopatologia da aterosclerose era considerada meramente como um acúmulo de lipídeos na parede arterial. Porém, nas últimas décadas, um maior desenvolvimento no campo da biologia vascular tem esclarecido que as lesões ateroscleróticas são, de fato, uma série de respostas celulares e moleculares altamente específicas, dinâmicas que são essencialmente inflamatórias por natureza. (Farzaneh; Serrano Jr. 2001; Libby, 2012).

Em pacientes vulneráveis, aterosclerose se desenvolve por meio da influência de condições que lesam o endotélio, como envelhecimento, hipertensão arterial sistêmica, hipercolesterolemia, diabetes melito, tabagismo e obesidade (Eaton, 2005). Esses fatores alteram a permeabilidade da camada endotelial, gerando uma condição de disfunção, isso facilita a penetração de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e remanescentes de

lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) no espaço subendotelial (Honma, 2004). Quando elevadas na circulação, essas lipoproteínas se ligam a proteoglicanos se fixando na camada íntima. Sofrem, então, oxidação pelos radicais livres produzidos por células endoteliais adjacentes, células musculares lisas ou macrófagos isolados, desencadeando o início do processo inflamatório (Choy, 2004; Libby & Theroux, 2005).

Os monócitos, atraídos por conta da lesão endotelial, penetram na íntima e no espaço subendotelial, se transformam em macrófagos ativados que fagocitam a LDL oxidada, formando, assim, as células espumosas (Wu *et al.*, 1992; Ylä-Herttuala *et al.*, 1996; Glass & Witztum, 2001; Stocker & Keaney Jr., 2004).

Os macrófagos possuem influência não só na formação da placa aterosclerótica, como na instabilização dessa (Feig & Feig, 2012). É conhecida a contribuição dos macrófagos para a formação do núcleo necrótico (Virmani *et al.*, 2002) e do afilamento da capa fibrosa da placa, seja por ativação de metaloproteinases de matriz (Tabas, 2010), ou por promover apoptose de células musculares lisas (Boyle *et al.*, 2003).

As células musculares lisas migram e se acumulam na íntima, em que se proliferam. A proliferação dessas células é devido, provavelmente, à presença de receptores para LDL (LDL-r) nestas células (Ikeda *et al.*, 1994) e receptores para LDL oxidada ("lectinlike Ox-LDL receptor 1", LOX-1) nas células endoteliais da camada íntima (Kataoka *et al.*, 1999; Ricciarelli *et al.*, 2000). Algumas células da musculatura lisa também são capazes de acumular lípidos, principalmente colesterol na forma esterificada, ocorrendo, assim, a formação de mais células espumosas (Cotran *et al.*, 2000).

### 1.3 Citocinas inflamatórias

Esse processo inflamatório/proliferativo na parede vascular é mediado por citocinas que levam à expressão de moléculas de adesão e substâncias quimiotáticas para vários tipos de células (Ross, 1999). As citocinas são



bastante diversificadas, possuindo tanto efeitos pró-inflamatórios quanto protetores (Lau, 2005). São exemplos dessas substâncias:

- O fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , uma citocina produzida em vários tipos de células, incluindo macrófagos, células endoteliais e células de músculo liso (Kleemann *et al.*, 2008). Exerce grande efeito inflamatório na aterosclerose. Estudos mostram a presença desta citocina em placas ateroscleróticas humanas (Rus *et al.* 1991) e a concentração de TNF- $\alpha$  circulante está associada a um maior risco de infarto do miocárdio, espessamento de carótida, distúrbios na homeostasia dos triglicérides e da glicose (McKellar *et al.*, 2009).
- A leptina é um hormônio derivado do adipócito que regula o balanço energético. O aumento de leptina circulante, denominado resistência à leptina, está independentemente associado à resistência insulínica e doença cardiovascular (Martin, 2008).
- A interleucina (IL)-6 possui ação de aumentar a expressão de moléculas de adesão nos leucócitos, aumentar a proliferação de células musculares lisas nas paredes dos vasos, além de atuar na diferenciação do pré-adipócito, e interferir na ação da insulina e na resistência a esse hormônio (Senn, 2003).
- A IL-10 está associada à estabilização de placa, pois atenua a produção de citocinas inflamatórias por macrófagos e neutrófilos polimorfonucleares; atua na diferenciação de monócitos a macrófagos, na supressão da atividade de apresentação de antígenos, diminuição da liberação de nitrogênio reativo e de produtos derivados de oxigênio, e inibição da expressão de ICAM (molécula de adesão intercelular) -1 (Von der Thüsen, 2003).
- A proteína C-reativa (PCR), proteína de fase aguda, encontra-se elevada em qualquer processo inflamatório, é um biomarcador de risco para doença cardiovascular (Ridker; Nissen, 2005) e, também, está envolvido no processo inflamatório da

aterosclerose, pois atua na ativação do complemento (Reifenberg, 2005), diminui os níveis de óxido nítrico (NO) intravascular, aumenta expressão de inibidor do ativador do plaminogênio (PAI)-1 (Verma, 2002; Devaraj, 2003).

- Moléculas de adesão celular, como a molécula de adesão da célula vascular (VCAM)-1, são expressas pelas células endoteliais e agem na aderência, transmigração e rolamento de leucócitos (Hope, 2003). Níveis plasmáticos de moléculas de adesão têm sido associados à doença aterosclerótica com manifestações clínicas, fatores de risco cardiovasculares e síndromes coronarianas agudas (Hope, 2003).
- As metaloproteinases (MMPs), que são enzimas liberadas por macrófagos na camada íntima, degradam a matriz extracelular. As MMPs podem degradar várias proteínas da matriz extracelular, como o colágeno. A presença de citocinas inflamatórias inibe a produção de colágeno e outras proteínas estruturais pelas células de músculo liso, e a produção de IL-1 $\beta$  na lesão aumenta a expressão das MMPs da matriz extracelular (Plutzky, 2001; Apostolakis *et al.*, 2008).

Como exemplo dessas enzimas, temos a MMP-9, uma gelatinase, que contribui na fisiopatologia de várias doenças como câncer e doenças vasculares (Nair & Boyd, 2005), e a MMP-12, que estimula a proliferação e a migração de células endoteliais durante a angiogênese (Dwiedi, 2009).

- *Cluster of differentiation* (CD) 36, uma glicoproteína de membrana que está presente em vários tipos de células incluindo monócitos, macrófagos, células endoteliais, adipócitos e plaquetas, tem papel significativo no processo aterogênico. Molécula de sinalização é um dos principais receptores *scavenger*, atua na formação das células espumosas, liberação de outros mediadores inflamatórios,

fagocitose de macrófagos e trombose (Moore & Freeman, 2006; Park, 2014).

#### **1.4 Proliferação celular e aterosclerose**

Fortes evidências indicam que a proliferação celular é um evento fundamental na patogênese da aterosclerose, tanto em modelos animais quanto em estudos em humanos. Proliferação celular na aterosclerose é um processo lento e por isso difícil de se estudar em humanos, daí o maior número de estudos experimentais existentes na literatura para avaliar esse fenômeno (Fuster, 2010).

Análise de placas ateroscleróticas e lesões re-estenóticas de coronárias angioplastadas demonstram que os principais tipos celulares envolvidos nesse processo são as células musculares lisas e os macrófagos. Estudos em modelos animais e em culturas celulares chegaram à conclusão que fatores de risco de doença cardiovascular promovem a proliferação desses tipos celulares (Liu, 1995; Chisolm, 2000).

A ocorrência de proliferação de células na doença obstrutiva vascular em humanos é demonstrada pela descoberta consistente de marcadores de proliferação celular em placas ateromatosas humanas (Gordon 1990; Pickering, 1993).

No entanto, deve-se notar que alguns estudos têm relatado taxas de proliferação muito baixas (Katsuda; O'Brien, 1993) enquanto outros demonstraram alta atividade proliferativa em lesões ateroscleróticas em humanos (Kearney; Wei, 1997).

Células proliferativas em placas ateroscleróticas humanas incluem células musculares lisas (CML)s, leucócitos e células endoteliais (CE). Rekhter e Gordon, em 1995, demonstraram diferenças nas taxas de proliferação de diferentes tipos celulares em artérias carótidas humanas. Enquanto monócitos/macrófagos são as células predominantes na camada íntima (46% de monócitos/macrófagos contra 9,7% de CMLs, 14,3% CEs e

13,1% linfócitos), CMLs proliferantes predominam na média (44,4% CMLs, 20% CEs e 13% monócitos/macrófagos e 14,3% linfócitos T). Esse estudo também revelou alta taxa de proliferação na lesão intimal, em comparação com a da camada média ( $1,61 \pm 0,35$  vs.  $0,05 \pm 0,03\%$ , respectivamente), sugerindo que a distribuição de proteínas reguladoras de crescimento seja diferente nas diferentes regiões das artérias.

### 1.5 Regressão da aterosclerose

Apesar de lesões avançadas conterem componentes como calcificação e necrose, estudos em animais e humanos demonstraram mudanças drásticas em placas, capazes de causar estabilização e regressão da aterosclerose em diferentes estágios de desenvolvimento (Ibanez, 2007).

A compreensão dos mecanismos envolvidos na progressão e regressão é a base para o desenvolvimento de intervenções que, por meio de agentes que miram processos biológicos específicos, sejam capazes de regredir a formação da placa aterosclerótica (Dave, 2013).

A regressão da placa ocorre devido à remoção do material necrótico, a reparo endotelial ou à interrupção da proliferação de células musculares lisas (Kalanuria, 2012). Vários mecanismos explicam esse processo de regressão, como ação da lipoproteína de alta densidade (HDL), destruição de células espumosas e macrófagos nos linfonodos, e a restauração do endotélio por células vizinhas ou células progenitoras circulantes (Francis, 2011).

O primeiro estudo intervencionista que demonstrou uma diminuição substancial do volume das lesões ateroscleróticas foi realizado em 1957 por Friedman *et al.* que tratou coelhos hipercolesterolêmicos com fosfatidilcolina intravenosa.

Várias classes de medicamentos, desde hipolipemiantes, como a niacina, passando por drogas que elevam HDL, como inibidores de proteína de transferência de colesteril-éster (CETP), até medicamentos com ação

anti-inflamatória, como antileucotrienos, foram usados em protocolos de estudo de regressão de placa aterosclerótica, com resultados variáveis (Arsenault, 2012).

As estatinas, classe de medicamentos mais testada em estudos clínicos de regressão de aterosclerose, demonstraram efeito de regressão do volume do ateroma, porém não se sabe se esse efeito é devido à ação anti-inflamatória do fármaco ou à redução do LDL-colesterol.

Reversal trial (Nissen, 2004) foi um estudo multicêntrico que comparou o uso de dois diferentes regimes de tratamento com estatinas (40 mg de pravastatina ou 80 mg de atorvastatina) procurando promover uma redução moderada e intensa nos níveis de LDL-colesterol em 654 pacientes. O objetivo principal era avaliar a redução no volume de placa aterosclerótica por meio de ultrassom intracoronário realizado na inclusão e com 18 meses de seguimento.

Os pacientes apresentavam um LDL basal de 150 mg/dl. No grupo redução intensiva de colesterol, esse nível foi diminuído para 79 mg/dl, enquanto que, no grupo de redução moderada, o LDL final foi de 110 mg/dl ( $p < 0,01$ ).

Houve redução nos níveis de proteína C reativa de 5,2% no grupo pravastatina contra 36,4% no grupo que fez uso de atorvastatina ( $p < 0,001$ ).

Quanto ao percentual de mudança no volume do ateroma, o grupo de redução intensiva de LDL apresentou menor taxa de progressão do que o grupo de redução moderada de LDL ( $p < 0,02$ ).

Com relação ao *end point* primário, foi detectada progressão de aterosclerose coronariana no grupo que usou pravastatina (2,7%; 95% [IC], 0,2% a 4,7%;  $p = 0,001$ ) comparado com o basal. O mesmo não ocorreu no grupo atorvastatina (-0,4% IC -2,4% a 1,5%;  $p = 0,98$ ), também comparado com o basal.

ASTEROID (*A Study To Evaluate the Effect of Rosuvastatin On Intravascular Ultrasound-Derived Coronary Atheroma Burden*) (Nissen, 2006) utilizou como metodologia o ultrassom intravascular (USIV) para avaliar o efeito da terapia com rosuvastatina na doença aterosclerótica em pacientes

com doença arterial coronária (DAC). O objetivo primário desse estudo foi investigar se a rosuvastatina 40 mg, em 2 anos de tratamento, faria regredir o volume do ateroma da artéria coronária, avaliado pelo volume percentual do ateroma (VPA) em todo o comprimento do segmento analisado da artéria e pelo volume total do ateroma (VTA) no segmento mais gravemente acometido.

O estudo demonstrou que a rosuvastatina 40 mg pode fazer regredir o ateroma coronário. Esses resultados foram associados a uma substancial redução dos níveis de LDL colesterol (53%) e a um aumento do HDLcolesterol (15%).

No estudo SATURN (Nicholls, 2011), 1.039 pacientes portadores de DAC crônica foram submetidos a ultrassom intracoronário após 104 semanas de uso de dois regimes de tratamento hipolipemiante agressivo com atorvastatina 80 mg por dia ou rosuvastatina 40 mg por dia. O objetivo era avaliar o efeito na progressão da placa aterosclerótica desses dois medicamentos e a tolerância, avaliando a incidência de efeitos colaterais.

A média do LDL após tratamento foi 63 mg/dl no grupo rosuvastatina e 70mg/dl no grupo da atorvastatina ( $p < 0,001$ ). O HDL final foi de 50 mg/dl e 49mg/dl para a rosuvastatina e atorvastatina, respectivamente ( $p = 0,01$ ). A alteração percentual do volume do ateroma foi -1,22% no grupo rosuvastatina *versus* -0,99% no grupo atorvastatina ( $p = 0,17$ ). A variação média no volume do ateroma total foi -6,4 mm<sup>3</sup> no grupo rosuvastatina *versus* -4,4 mm<sup>3</sup> no grupo da atorvastatina ( $p = 0,01$ ). Ambos os agentes induziram regressão da placa na maioria dos pacientes: 63,2% com atorvastatina e 68,5% com rosuvastatina para o volume percentual do ateroma ( $p = 0,07$ ); e 64,7% e 71,3%, respectivamente, para o volume total de ateroma ( $p = 0,02$ ). Ambas as estatinas também apresentaram perfil aceitável de efeitos colaterais, com incidência extremamente baixa de alterações laboratoriais (transaminases, creatino-fosfoquinase (CPK) e proteinúria) e de eventos cardiovasculares.

## 1.6 Agentes antiproliferativos

Daí o racional de se usar medicamentos antiproliferativos, como paclitaxel (PTX) e metotrexato (MTX), que, além de uma possível ação impedindo o processo de proliferação de macrófagos e células musculares lisas, podem ter também algum efeito anti-inflamatório.

### 1.6.1 Paclitaxel

O paclitaxel é um fármaco que promove a polimerização das tubulinas presentes nos microtúbulos (Schiff, 1979). Esses precisam estar em equilíbrio entre a sua formação e sua dissociação para que a divisão celular ocorra. Entretanto, quando os microtúbulos são produzidos por indução do PTX, a polimerização torna-se muito estável, havendo um desequilíbrio entre formação e dissociação (Parness, 1981) de maneira que a mitose fica comprometida e a célula entra em apoptose.

Por ser uma molécula hidrofóbica, acredita-se que o PTX se difunde passivamente pela membrana celular (Manfredi, 1984; Rodrigues, 2004). Sua baixa solubilidade em água é, contudo, um dos maiores obstáculos para sua utilização clínica (Horwitz, 1992). A solução para esse problema foi a formulação do PTX em cremophor EL. Entretanto, o uso desse veículo trouxe efeitos colaterais como reações de hipersensibilidade – toxicidade gastrointestinal que leva à perda de peso – e alterações na função endotelial e muscular, como vasodilatação, dificuldade respiratória, letargia e hipotensão (Kingston, 2001).

O PTX tem sido avaliado em diferentes formas de aplicação, agindo, por exemplo, na inibição do acúmulo de células musculares lisas após angioplastia em ratos. Graças aos resultados positivos, o uso de PTX foi adaptado para recobrir os *stents* utilizados em angioplastias para evitar a reestenose (Fitzpatrick, 2001).

Essa técnica permite o contato direto do fármaco com a parede do vaso favorecendo seu acúmulo no tecido arterial (Heldman, 2001). Apesar de evitar a reestenose, a aplicação de PTX não reduziu as taxas de mortalidade dos pacientes (Stone, 2003).

O uso de PTX pode ser aumentado para toda a árvore coronária, porém seria necessário elevar, também, sua dose, aumentando sua citotoxicidade (Onetto, 1993). A neutropenia foi o principal efeito colateral de PTX (Weiss, 1990).

### **1.6.2 Metotrexato**

O metotrexato é um quimioterápico amplamente utilizado por seus efeitos antiproliferativos, agindo na inibição da síntese de novas bases de purina e pirimidinas em suas células-alvo (Tian, 2007). Para ser transportado para o meio intracelular, o MTX exige transportador de ácido fólico reduzido, funcionando, já no interior da célula, como substrato para a poliglutamação intracelular. Sob a forma de MTX-poliglutamatos, esse fármaco fica retido por um período maior na célula em que será convertido para o agente ativo (Chan, 2002).

Além de seus efeitos antiproliferativos, o MTX também possui uma ação anti-inflamatória e vasculoprotetor, sendo utilizado, também, como agente imunossupressor em casos de transplantes de órgãos (Alisson, 2000). Em um estudo envolvendo coelhos hipercolesterolêmicos, o uso de MTX, por 4 semanas, demonstrou uma redução de 75% na área de placa aterosclerótica (Bulgarelli, 2012).

Contudo, assim como sua eficácia é refletida nos tratamentos antiproliferativos, sua toxicidade também é percebida (Lundberg, 2004). Anafilaxia, urticária, angioedema, pneumonites agudas, vasculite cutânea, toxicidade epidermoidal, anemia hemolítica, citopenia e hepatite são alguns exemplos. Essa vasta lista de reações se deve, principalmente, à falta de uma célula-alvo específica, fato que pode ser resolvido a partir da ligação de



MTX a transportadores que elevam sua especificidade. Alguns transportadores que poderiam ser utilizados são as LDL, transportadores poliméricos, anticorpos, liposomas, liposomas carregados positivamente e emulsões (Maranhão, 1986).

### **1.7 Nanopartículas lipídicas artificiais como transportadoras de fármacos**

O LDL é o principal meio de transporte de colesterol pelo plasma, sendo captado pelas células por meio de LDL-r. Em situações proliferativas, ocorre um aumento da demanda de colesterol e outros lipídeos, principalmente devido à síntese de novas membranas plasmáticas. Assim, em células com alta taxa de divisão celular, a expressão dos receptores de LDL é elevada. Em experiência, Zhu *et al.* (2002) averiguaram que, de fato, ocorre superexpressão de LDL-r nas células musculares lisas de vasos lesionados pela aterosclerose.

Graças a esses fatores, o tratamento de processos proliferativos pode ser mais eficiente, pois, além de ser possível concentrar fármacos lipofílicos de atividade citotóxica em LDL e direcioná-los às células-alvo em que serão internalizados pelos próprios LDL-r, ainda haverá uma redução da toxicidade antes causada pela inespecificidade ou pelo veículo.

Como o uso de LDL natural é inviável para a prática clínica, uma vez que pode desencadear resposta imunológica e contaminação por vírus da hepatite ou do vírus da imunodeficiência humana (HIV), vem se testando a aplicação de nanoemulsões lipídicas (LDE) de composição semelhante ao LDL, que também são reconhecidas pelos LDL-r presentes na superfície das células (Maranhão, 1993). Como conclusão, tem-se que fármacos associados à LDE diminuem drasticamente a sua toxicidade sem reduzir sua ação farmacológica.

Injetando LDE em pacientes coronariopatas submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica, foi observado que a LDE foi absorvida em

níveis consideráveis pelo tecido arterial descartado durante o procedimento (David-Couto, 2003).

Quando utilizado combinado com PTX, a LDE também manteve esses resultados, mantendo a atividade citotóxica ao mesmo tempo em que reduziu os efeitos colaterais em comparação com a preparação comercial do fármaco (Rodrigues & Maranhão, 2002). Houve, no entanto, uma alteração na estrutura de PTX para torná-lo mais estável e mais lipofílico, havendo transformação do taxol em oleato de paclitaxel pela ligação de ácidos graxos à sua molécula (Rodrigues & Maranhão, 2005).

Em estudo realizado com coelhos ateroscleróticos induzidos por dieta, a captação de LDE pela aorta foi duas vezes maior que nos coelhos controles. A associação PTX-LDE reduziu em 60% a área lesionada dos coelhos tratados, além de inibir a migração de macrófagos para o local da lesão e a proliferação de células musculares lisas. O tratamento demonstrou não ter toxicidade para os animais (Maranhão, 2008).

## **2 JUSTIFICATIVA**

---

## 2 JUSTIFICATIVA

A aterosclerose é considerada doença inflamatória e com importante componente de proliferação celular, principalmente por células musculares lisas e macrófagos, daí o racional de se usar drogas quimioterápicas para o tratamento dessa doença (Dzau, 2002).

Esse projeto consiste no uso de tratamentos antiproliferativos quimioterápicos, especificamente PTX e MTX, para regressão de aterosclerose, com base nos seus efeitos de inibição dos processos patológicos celulares e da diminuição da resposta inflamatória.

Por outro lado, é preciso entender que o obstáculo para o tratamento quimioterápico combinado da aterosclerose consiste nos efeitos colaterais sérios desses agentes. O PTX, além de poder desencadear reações no organismo, em sua formulação comercial, ainda apresenta a toxicidade de seu veículo, o Cremophor EL. O MTX já é amplamente utilizado de maneira combinada a outros fármacos, porém em baixas doses.

Assim, o desenvolvimento de PTX-LDE e MTX-LDE pode possibilitar uma nova forma de tratamento para a aterosclerose por meio do uso combinado desses dois fármacos, podendo haver um sinergismo terapêutico com danos colaterais minimizados graças às características do LDE.

Na literatura, os estudos que tentaram demonstrar regressão de aterosclerose utilizaram, em sua maioria, estatinas, e houve grande dificuldade de provar se os resultados obtidos se deram à custa de regressão ou a não progressão das placas ateroscleróticas (Singh, 2013).

Acreditamos que o desenho do nosso estudo, com a suspensão da dieta rica em colesterol, possa avaliar melhor o processo de regressão.

## **3 OBJETIVOS**

---

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Primário**

Avaliar macroscopicamente a eficácia das terapias quimioterápicas combinada, composta de PTX-LDE com MTX-LDE, e monoterapia, apenas com PTX-LDE, na regressão da aterosclerose experimental.

#### **3.2 Secundários**

1. Avaliar os efeitos no perfil lipídico, os efeitos hematológicos, a eficácia e a toxicidade na regressão da aterosclerose em coelhos com a associação de PTX-LDE e MTX-LDE, monoterapia com MTX-LDE e suspensão da dieta rica em colesterol.
2. Correlacionar a regressão de placa aterosclerótica na aorta dos coelhos com a mudança no perfil de marcadores inflamatórios de aterosclerose.
3. Análise imuno-histoquímica dos arcos aórticos de células musculares lisas e macrófagos, e MMP-9 na área total analisada e na placa aterosclerótica.
4. Avaliar a expressão de RNA mensageiro de marcadores inflamatórios de aterosclerose, por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR), correlacionando com o efeito da regressão da aterosclerose nos coelhos.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

---

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais utilizados no estudo

Foram incluídos 49 coelhos machos da raça Nova Zelândia, com peso maior do que 3 kg. Desse total, 6 coelhos morreram antes de completar o estudo.

Os animais foram provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina da USP, e também foram mantidos lá, em temperatura controlada (20-22°C) e em ciclos de claro/escuro de 12 horas. Os coelhos passaram por um período de sete dias de adaptação às condições do biotério consumindo ração comercial usual, composta de 16% de proteínas, 7% de lipídeos, 14% de fibra bruta, 7% de cinzas e 50% de extrato não nitrogenado e água *ad libitum*.

### 4.2 Desenho do estudo

Os coelhos incluídos no estudo foram divididos em três grupos: CONTROLE, DIETA e QUIMIOTERAPIA, que foi ainda dividido em dois subgrupos: PTX cujos coelhos foram tratados com LDE-paclitaxel e PTX+MTX que receberam tratamento com LDE-paclitaxel associado à LDE-metotrexato. A Figura 1 mostra o organograma do estudo com a divisão dos grupos e os tempos das intervenções.

Todos os coelhos iniciaram a indução da aterosclerose consumindo dieta rica em colesterol.





### 4.3 Preparo da dieta rica em colesterol

A dieta foi preparada por meio da vaporização de uma solução de colesterol, éter etílico e etanol a 70% sobre a ração comercial usual, na proporção de 1 g de colesterol para 100 g de ração. O colesterol foi dissolvido adicionando-se 50 ml de éter etílico e 100 ml de álcool a 70%/g de colesterol, a 40°C sob agitação. Após adição da solução, a ração permaneceu em repouso por 24 horas em capela para evaporação completa dos solventes. A ração rica em colesterol foi pesada, separada em porções individuais de 150g em sacos plásticos lacrados e armazenada a -20°C.

### 4.4 Indução de aterosclerose

Para cada coelho, foram oferecidos 150 gramas de ração, diariamente, por 8 semanas.

O consumo de ração foi avaliado todos os dias, pesando-se o resíduo de ração. Os animais também foram pesados semanalmente para análise de variação de peso corporal correlacionando com o tratamento.

Após esse período, a dieta enriquecida com colesterol a 1% foi suspensa e os coelhos divididos em três grupos: seis coelhos foram incluídos no grupo CONTROLE e, na nona semana de consumo da dieta, foram sacrificados para análise macroscópica das aortas a fim de se obter amostra do grau de aterosclerose induzida pela dieta rica em colesterol.

Um coelho, incluído no grupo controle 16 semanas, que fazia uso da dieta enriquecida com colesterol a 1% por 4 meses. O coelho acabou morrendo antes da época do sacrifício, apresentava escleras ictéricas, perda de peso e abdome globoso. Devido a esse efeito agressivo da dieta colesterol 1% por período prolongado, foi decidido pela exclusão desse grupo do estudo.

Onze coelhos foram incluídos no grupo DIETA, sendo mantidos até a décima sexta semana, consumindo dieta comercial usual, sendo sacrificados na décima sétima semana para análise macroscópica das aortas a fim de se obter amostra do grau de regressão de aterosclerose promovida pela suspensão da dieta.

Quatro coelhos incluídos nesse grupo desenvolveram os mesmos sinais do coelho do grupo controle 16 semanas e foram excluídos do estudo.

O grupo quimioterapia foi composto por vinte e um coelhos que iniciaram tratamento com as drogas antiproliferativas associadas à LDE após a suspensão da dieta rica em colesterol na nona semana do protocolo.

Sete coelhos incluídos nesse grupo desenvolveram os mesmos sinais do coelho do grupo controle 16 semanas e foram excluídos do estudo.

#### **4.5 Preparo da LDE**

A LDE foi preparada segundo a técnica descrita por Ginsburg em 1982 e modificada por Maranhão. Em um frasco de vidro, foram adicionados 40 mg de fosfatidilcolina, 20 mg de oleato de colesterol, 1,0 mg de trioleína e 0,5 mg de colesterol. A seguir, a mistura foi evaporada sob fluxo de nitrogênio e mantida em dessecador a vácuo, por 16 horas a 4°C para remoção dos solventes residuais. Após a adição de 10 ml de solução tris HCl 0,01M, pH 8,05, a mistura foi sonicada por 3 horas. A emulsão foi centrifugada por duas vezes e sua densidade ajustada para 1,21 g/mL, adicionando-se brometo de potássio.

A fração da parte superior do tubo que corresponde a 20% do total era a LDE. O excesso de brometo de potássio foi removido por diálise e a LDE foi esterilizada utilizando-se filtros de 0,22 µm de diâmetro e armazenada em frascos estéreis a 4°C.

#### 4.6 Associação do oleato de paclitaxel e do didoecil-metotrexato à LDE

Com o objetivo de melhorar a estabilidade da associação entre o paclitaxel e a LDE, o paclitaxel foi transformado, pela ligação de ácidos graxos a sua molécula, em um derivado mais lipofílico, o oleato de paclitaxel (OPTX), como descrito anteriormente por Rodrigues *et al.* em 2005.

O MTX foi diesterificado com brometo de dodecila em presença de carbonato de céσιο como catalisador, seguindo procedimento descrito na literatura (Rosowsky, 1984). Essa reação deu origem ao didodecil metotrexato (DMTX).

O OPTX e o DMTX foram incorporados à LDE separadamente numa razão 5:1 em massa de lipídios: fármaco. Os fármacos foram dissolvidos em 300µl de etanol e misturados com 3,0 ml de LDE. A incorporação foi realizada utilizando-se irradiação ultrassônica por 40 minutos a 55°C em banho de água/gelo. A taxa de associação foi determinada por diálise dos fármacos incorporados à LDE.

Dez coelhos foram incluídos no grupo PTX, com injeções endovenosas de oleato de paclitaxel associado à LDE, na dose de 4 mg/kg/semana, por 8 semanas, sendo sacrificados na nona semana.

Onze coelhos foram incluídos no grupo PTX/MTX, com injeções endovenosas de oleato de paclitaxel e de didodecil-metotrexato, ambos os associados à LDE e na dose de 4 mg/kg/semana, por 8 semanas. Com o intuito de promover um efeito sinérgico entre os fármacos, no grupo tratado, foi realizada a injeção de MTX-LDE e, após um intervalo de 2 horas, a injeção de PTX-LDE. Os coelhos foram sacrificados na nona semana.

Todos os coelhos foram sacrificados com injeção letal de 200 mg/kg de pentobarbital sódico a 5%.

#### **4.7 Avaliação dos efeitos hematológicos do tratamento e no perfil lipídico dos animais**

Todos os coelhos foram submetidos à coleta de sangue através da veia auricular marginal, após jejum de 12 horas, no início do estudo, após a oitava semana e à época do sacrifício (9<sup>a</sup> ou 17<sup>a</sup> semana). Estas amostras foram conservadas em gelo e, posteriormente, foram realizados hemograma completo com contagem de células sanguíneas em câmara de Neubauer, perfil lipídico, glicose, ureia, creatinina e dosagem de enzimas hepáticas pelo método enzimático-colorimétrico, usando kits comerciais da Labtest Diagnóstica S.A. (Minas Gerais, Brasil). A leitura foi feita em espectrofotômetro (Hitachi, Columbia, USA).

#### **4.8 Avaliação dos marcadores inflamatórios de aterosclerose**

Uma parte das amostras foi centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos, e, no soro obtido, foi realizada dosagem de IL-6 (Invitrogen, California-EUA), PCR (Kamiya, Seattle-EUA) TNF- $\alpha$  (Invitrogen, California-EUA), VCAM-1 (Invitrogen, California-EUA), MMP-9 (IBL America – Minneapolis, EUA) e leptina (B-bridge, Tóqui, Japão) pelo método *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Esses exames também foram realizados na 1<sup>a</sup>, 8<sup>a</sup> e 16<sup>a</sup> semanas.

#### **4.9 Análise macroscópica das aortas**

As aortas foram retiradas a partir do arco aórtico até a porção abdominal e abertas longitudinalmente ao longo da parede anterior.

Em seguida, foram lavadas com solução salina, fixadas em formalina tamponada a 10% e coradas com Scarlat R (Sudan IV) (Sigma, Saint Louis, USA).

Fotos das artérias foram tiradas para análise morfométrica e a área de lesões foi quantificada por meio do *software* NIS - Elements AR 3.2, usando o microscópio Eclipse 80i com câmera acoplada DS-Ri1 (Nikon, Tóquio, Japão).

#### **4.10 Análise morfométrica de cortes histológicos de arco aórtico**

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

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

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

#### 4.11 Análise imuno-histoquímica dos arcos aórticos

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

Para realização da imuno-histoquímica, a recuperação de antígenos foi realizada por calor úmido e pressão em câmara de pressão para recuperação antigênica Pascal (Dako, Carpinteria, EUA) com tampão citrato 10mM pH 6,0 para os antígenos de macrófagos de coelho (clone RAM-11) e MMP-9. A recuperação de antígenos por calor úmido e pressão com tampão Tris 10mM/EDTA 1mM foi realizada para os antígenos  $\alpha$  actina para identificação de células de músculo liso.

A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com 4 banhos de 5 minutos de peróxido de hidrogênio a 3%. O bloqueio de reações inespecíficas foi feito com soro fetal bovino diluído em solução salina tamponada com sais básicos de fosfato (PBS) durante 1 hora em estufa umidificada a 37°C. Os anticorpos primários antimacrófagos de coelho (clone RAM-11) (Dako, Carpinteria, EUA), anti-MMP-9 (AbCam, Cambridge, EUA) e anti- $\alpha$  actina (Dako, Carpinteria, EUA), previamente padronizados, foram diluídos em PBS contendo 1% de albumina bovina. As lâminas foram incubadas por 18 horas a 4°C.

O sistema de detecção foi o polímero Envision (Dako, Carpinteria, EUA) para os anticorpos antimacrófagos de coelho, anti- $\alpha$  actina e anti-MMP9. A reação foi revelada com diaminobenzidina (DAB) (Dako, Carpinteria, EUA) e contracorado com hematoxilina de Harris.

As imagens foram capturadas por meio do scanner de lâminas Aperio AT2 (Leica Biosystems, Cambridge, UK).

As áreas de marcação com os cromógenos específicos dos anticorpos acima descritos foram mensuradas por meio do *software* de análise de imagens ScanScope CS2 (Leica Biosystems, Cambridge, UK) e comparadas com a área total do seguimento de aorta analisado.

#### **4.12 Análise de expressão gênica dos receptores de lipoproteínas e de fatores inflamatórios**

##### **4.12.1 Amostras de tecido de aorta**

As amostras de aortas foram dissecadas dos animais eutanaziados, imediatamente armazenadas em solução de RNA<sup>later</sup>® (*Ambion Life Technology*, EUA) e estocadas a -70°C.

##### **4.12.2 Extração de ácido ribonucleico (RNA) e síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA)**

As aortas foram homogeneizadas com pistilo e cadinho mantendo seu reservatório com nitrogênio líquido para a preservação do tecido sem a degradação do RNA. Em seguida, foram adicionados ao homogenato 1 mL do reagente TRIzol® (*Invitrogen Life Technology*, EUA) e o RNA total foi isolado segundo especificações do fabricante.

A qualidade das amostras foi verificada por meio de corrida eletroforética em gel de agarose 1% e as concentrações dessas foram determinadas por meio de leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 260 e 280 nm no aparelho *NanoDrop 2000 Spectrophotometer* (*Thermo Scientific*, EUA), considerando-se satisfatórias as razões 260/280 entre 1,8 a 2,0. As amostras-mãe foram estocadas a -70°C e uma alíquota foi utilizada para a transcrição reversa.

Para cada 16 µL (0,5ug) de RNA a ser reversamente transcrito, acrescentou-se 4 µL do reagente *High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix 5x* (*Applied Biosystems Life Technologies*, EUA). Este produto foi incubado,



inicialmente, por 10 min. à temperatura de 25°C, por 60 min., à temperatura de 42°C e, por fim, por 5 min. a temperatura de 85°C. Após esta etapa, as amostras foram diluídas 10x em TE-4 e armazenadas em -20°C para futuras análises.

#### 4.12.3 Análise da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

A expressão gênica dos fatores inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-10, VCAM-1, MCP-1, MMP9 e MMP12) foi analisada pela técnica de PCR em tempo real por meio do método de detecção Taqman, que utiliza, além dos *primers*, sondas fluorescentes para a detecção do produto-alvo de PCR. Esse tipo de detecção é altamente específico, não necessitando a padronização da reação.

As reações de amplificação foram realizadas no equipamento *StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems Life Technologies, EUA)* em um volume final de 12  $\mu$ L, constituídos de 1,2  $\mu$ L de cDNA (1:5), 4,2  $\mu$ L de água MilliQ, 6  $\mu$ L de *Taqman Universal PCR Master Mix*, 0,6  $\mu$ L de sonda Taqman 20x (*Taqman Gene Expression Assays* customizados pela *Applied Biosystems Life Technologies, EUA*) específica de cada gene-alvo a ser analisado ou 0,6  $\mu$ L do gene normalizador (GAPDH).

O programa gera um gráfico de intensidade de fluorescência em função do número de ciclos de amplificação. Um limiar (*threshold*) é definido manualmente, no qual a intensidade de fluorescência é estatisticamente diferente da fluorescência de fundo (*background*) e a curva apresenta a fluorescência da amplificação aumentando exponencialmente. O número do ciclo cuja fluorescência da amostra intercepta o *threshold* é chamado Ct (*cycle threshold*). Para a determinação do Ct, o *software* deste equipamento exige a confecção de uma curva de diluição seriada para determinação do grau de eficiência de amplificação da reação e utiliza como critério de validação eficiência maior que 90%, pois uma reação 100% eficiente produz

um aumento de 10 vezes no amplicon da PCR a cada 3,2 ciclos durante a fase exponencial da reação. Os resultados obtidos foram analisados de acordo com o *software* deste equipamento.

Todas as reações foram realizadas em duplicata e foram consideradas aceitáveis reações cujo desvio padrão foi menor que 0,4 ou menor que um Ct de diferença.

A quantificação da expressão gênica foi realizada por meio do cálculo da expressão bruta ou Ct comparativo demonstrado pelo algoritmo  $2^{-\Delta Ct}$ . O valor de  $\Delta Ct$  equivale à diferença entre o Ct do gene de interesse e o Ct do gene normalizador. A diferença entre os valores de Ct ( $\Delta Ct$ ) entre as amostras para cada gene, após normalização pelo Ct do gene de expressão constante, reflete sua expressão diferencial (*housekeeping gene* ou *endogenous control gene*). O resultado representa o número de vezes que o gene analisado tem a sua expressão aumentada ou diminuída nos tecidos estudados.

#### 4.12.4 Reações de PCR em tempo real

O método de detecção utilizado foi o sistema Taqman, que utiliza sondas fluorescentes para permitir a detecção do produto de PCR-alvo. Esse tipo de detecção é altamente específica, por isso não requer padronização da reação.

Os resultados obtidos foram analisados com o programa 7900 System SDS Software. O programa gera um gráfico de intensidade de fluorescência em função do número de ciclos de amplificação. Um limiar (*threshold*) é definido manualmente, no qual a intensidade de fluorescência é estatisticamente diferente da fluorescência de fundo (*background*) e a curva encontra-se na fase logarítmica de amplificação. O ciclo da reação em que a fluorescência da amostra intercepta o *threshold* é chamado Ct (*cycle threshold*). A diferença entre os valores de Ct ( $\Delta Ct$ ) entre as amostras, após normalização com genes de expressão estável, reflete sua expressão

diferencial. Todas as reações foram realizadas em duplicata e foram consideradas aceitáveis reações cujo desvio padrão entre as duplicatas foi menor que 0,05.

A expressão gênica relativa foi calculada pela equação  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . O valor inferido à  $\Delta Ct$  equivale à diferença entre o Ct do gene de interesse e o Ct do gene normalizador, em que o valor do Ct representa o ciclo do PCR em que a quantidade de fluorescência produzida na reação atinge um limite pré-estabelecido. O cálculo da fórmula  $\Delta\Delta Ct$  envolve a subtração do valor de  $\Delta Ct$  de cada amostra de aorta tratada com LDE-MTX do valor de  $\Delta Ct$  da aorta controle tratada com solução fisiológica. O resultado representa o número de vezes que o gene analisado tem a sua expressão aumentada ou diminuída no tecido tratado com LDE-MTX em relação ao tecido controle.

Foi estabelecido um valor de corte de razão de expressão de  $-1 > ER > 1$ , indicando que valores de ER entre 1 e -1 foram considerados com expressão igual ao grupo referência (controle), o qual foi utilizado para comparar os valores de expressão com os grupos alvos de estudo (tratado).

#### **4.13 Análise estatística**

Foi realizado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov antes das comparações entre os grupos. O teste ANOVA com pós-teste de Tukey foi realizado para as variáveis paramétricas e o de Mann-Whitney para as não paramétricas. Essa metodologia estatística foi usada nas análises do perfil lipídico, do perfil hematológico, da variação de peso dos animais antes e depois do tratamento, das lesões macroscópicas das aortas, das dosagens de marcadores inflamatórios por ELISA, da análise imuno-histoquímica e da expressão gênica de marcadores inflamatórios na aorta por qRT-PCR. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para  $p < 0,05$ .

## **5 RESULTADOS**

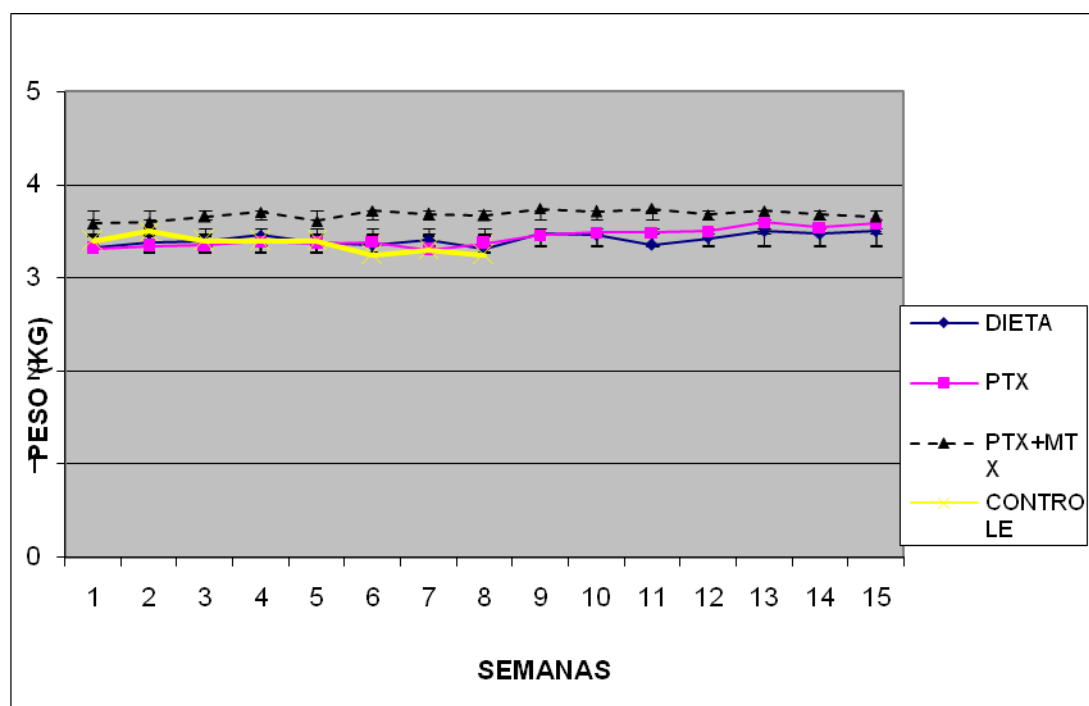
---

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Perfil ponderal

Os coelhos foram incluídos no estudo com média de peso de 3,4 kg±0,12. Após a fase de indução de aterosclerose, com 8 semanas do início do protocolo, os coelhos apresentaram média de peso de 3,4 kg±0,18. Após a 8ª semana, os coelhos do grupo CONTROLE foram sacrificados, restando, ao final das 16 semanas, término do tratamento somente coelhos dos grupos DIETA, PTX e PTX+MTX que tiveram média de peso de 3,6 kg±0,09.

A Figura 2 mostra a evolução do peso dos animais dos grupos CONTROLE, DIETA, PTX e PTX+MTX. Não houve diferença de peso entre os grupos em nenhuma das diferentes fases do estudo (1ª, 8ª e 16ª semana).

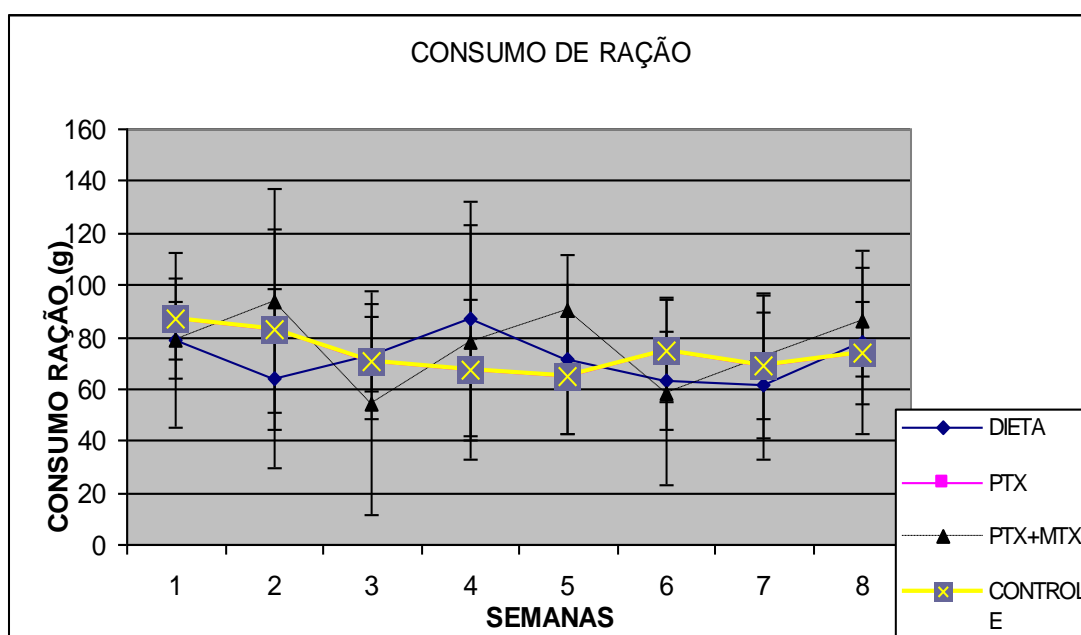


**Figura 2** - Representação da variação de peso (kg) dos grupos DIETA, CONTROLE, PTX e PTX+MTX. Dados expressos em média±DP.

## 5.2 Análise do consumo de ração

Os coelhos dos grupos CONTROLE, DIETA, PTX e PTX+MTX iniciaram o estudo com consumo médio de ração colesterol 1% de  $84,3 \pm 27$  gramas. Ao final da fase de indução de aterosclerose (8 semanas), a média de consumo de ração foi de  $76,0 \pm 8,4$  gramas. Os coelhos do grupo CONTROLE foram sacrificados ao final da 8ª semana e a ração enriquecida com colesterol 15 foi suspensa nesta fase, portanto, dentre os coelhos que finalizaram a 16ª semana de protocolo (DIETA, PTX e PTX+MTX), a média de consumo de ração comercial foi de  $79,2 \pm 6,0$  gramas.

A Figura 3 mostra a média de consumo diário de ração suplementada com 1% de colesterol pelos coelhos dos grupos DIETA, CONTROLE, PTX e PTX+MTX durante todo o protocolo. Não houve diferença de consumo no início e no final do estudo entre os grupos.



**Figura 3** - Representação do consumo de ração (g) dos grupos CONTROLE, DIETA, PTX e PTX+MTX. Dados expressos em média  $\pm$  DP.

### 5.3 Perfil lipídico

O perfil lipídico dos animais variou de acordo com a Tabela 1. Pode-se observar que a concentração de colesterol total aumentou mais de 30 vezes em todos os grupos, de forma semelhante, do início do estudo até a oitava semana, período de consumo da dieta enriquecida com colesterol 1%. No final do protocolo, a concentração de colesterol reduziu em torno de 50%, como esperado, devido à suspensão da dieta colesterol 1%.

Os níveis de HDL e triglicérides também aumentaram substancialmente durante o período de consumo da dieta colesterol 1%, nos três grupos, diminuindo substancialmente após suspensão da dieta enriquecida com colesterol e retorno da dieta comercial.

**Tabela 1** - Perfil lipídico dos coelhos dosado antes do início da dieta rica em colesterol (basal), após a suspensão da dieta (8 semanas) e ao final do protocolo. Dados expressos em média±DP.

Perfil Lipídico	Controles			Dieta		
	0	8	16	0	8	16
Semana	0	8	16	0	8	16
Col. total (mg/dl)	29±9	1920±569	489±454	29±11	1383±470*	448±202
HDL (mg/dl)	16±8	175±101	54±35	18±5	148±29*	75±37
Col. não HDL (mg/dl)	12±5	1475±482	430±424	11±6	1234±487*	395±206
TGD (mg/dl)	65±44	223±55	115±91	63±15	261±66*	92±21
Perfil Lipídico	PTX			PTX+MTX		
	0	8	16	0	8	16
Semana	0	8	16	0	8	16
Col. total (mg/dl)	31±11	1064±480*	489±454	32±18	1465±675*	540±418
HDL (mg/dl)	21±10	151±53*	54±35	19±11	185±70*	75±37
Col. não HDL (mg/dl)	10±2	913±426*	430±424	13±7	1281±606*	464±380
TGD (mg/dl)	68±23	114±72*	115±91	81±20	155±107*	134±111

\*p<0,05 versus basal.

#### 5.4 Perfil hematológico

Na Tabela 2, estão expressos os dados dos hemogramas dos animais dos grupos DIETA, CONTROLE, PTX e PTX+MTX. Foi observada uma redução no número de hemácias na coleta de 8 semanas no grupo PTX+MTX, em relação ao basal, essa queda não pareceu estar relacionada ao tratamento quimioterápico, uma vez que não foi observada queda nas taxas de hemácias após 16 semanas de estudo. Entre os grupos, não houve diferença com significância estatística na contagem de hemácias em nenhum dos três momentos.

Houve uma tendência à redução na contagem de leucócitos na coleta de 16 semanas, nos três grupos, sem significância estatística, em relação às contagens basais. Mais uma vez, não parece haver ação do tratamento quimioterápico nesse achado, uma vez que o grupo dieta apresentou a mesma tendência.

**Tabela 2** - Perfil hematológico dos grupos DIETA, CONTROLE, PTX e PTX+MTX. Dados expressos em média±DP.

Semana	Controles			Dieta		
	0	8	16	0	8	16
HM	457±94	466±47	328±21	215±68	312±57	328±35
Leuc	370±102	350±327	130±92	316±99	311±147	135±109
Semana	PTX			PTX+MTX		
	0	8	16	0	8	16
HM	367±51	269±50	328±21	506±30	257±47*	403±63
Leuc	361±56	332±64	130±92	257±121	281±151	170±68

HM x 10<sup>10</sup>, Leuc x 10<sup>7</sup>

\*p<0,05 versus basal.



### 5.5 Perfil bioquímico

Na Tabela 3, estão expressas as dosagens de aspartato transaminase (AST), alanina transaminase (ALT), ureia, creatinina e glicose dos coelhos incluídos no estudo.

Na comparação entre os grupos, não houve diferença em relação aos parâmetros de função renal, hepática ou glicemia.

Foi encontrada diferença com significância estatística no grupo DIETA com relação às dosagens de glicose e creatinina. A média de creatinina nos coelhos desse grupo foi de 1,5 mg/dl após 8 semanas de dieta colesterol 1% e de 1,0mg/dl após 16 semanas.

Em relação à glicemia, há, provavelmente, uma interferência de jejum inadequado nas dosagens, uma vez que a glicemia basal foi maior do que as demais medidas.

**Tabela 3** - Perfil bioquímico dos grupos DIETA, CONTROLE, PTX e PTX+MTX. Dados expressos em média±DP.

Perfil Bioquímico	Controles			Dieta		
	0	8	16	0	8	16
Semana	0	8	16	0	8	16
Glicose (mg/dl)	169,2±114	135,2±54	138±16,6 <sup>≠</sup>	102±7,8	96±16	
AST (U/L)	33±19,2	56±51,3	53±16,4	40±15	30±13	
ALT (U/L)	84,4±29,7	58,8±16	59±46	60,3±20	31,7±4	
Ureia (mg/dl)	34,4±9,9	56,8±22	58±22	40±15	30±13	
Creatinina (mg/dl)	0,94±0,3	1,66±0,9	1,4±0,15	1,5±0,4 <sup>†</sup>	1±0,1	

Perfil Bioquímico	PTX			PTX+MTX		
	0	8	16	0	8	16
Semana	0	8	16	0	8	16
Glicose (mg/dl)	120±17,3	105±17,3	101±30	117±21,6	103±9,9	108±58
AST (U/L)	23,7±5,3	29,5±14	19±7	32,3±14	21±6,6	28,6±11
ALT (U/L)	54±17,5	57,5±11,9	34,5±4,5	72,7±16	45±9,5	33±7,6
Ureia (mg/dl)	37±6	49±11,6	44±5	35±4	42±11	31±12
Creatinina (mg/dl)	1,1±0,2	1,5±0,5	1±0,2	1,1±0,2	1,1±0,5	0,8±0,3

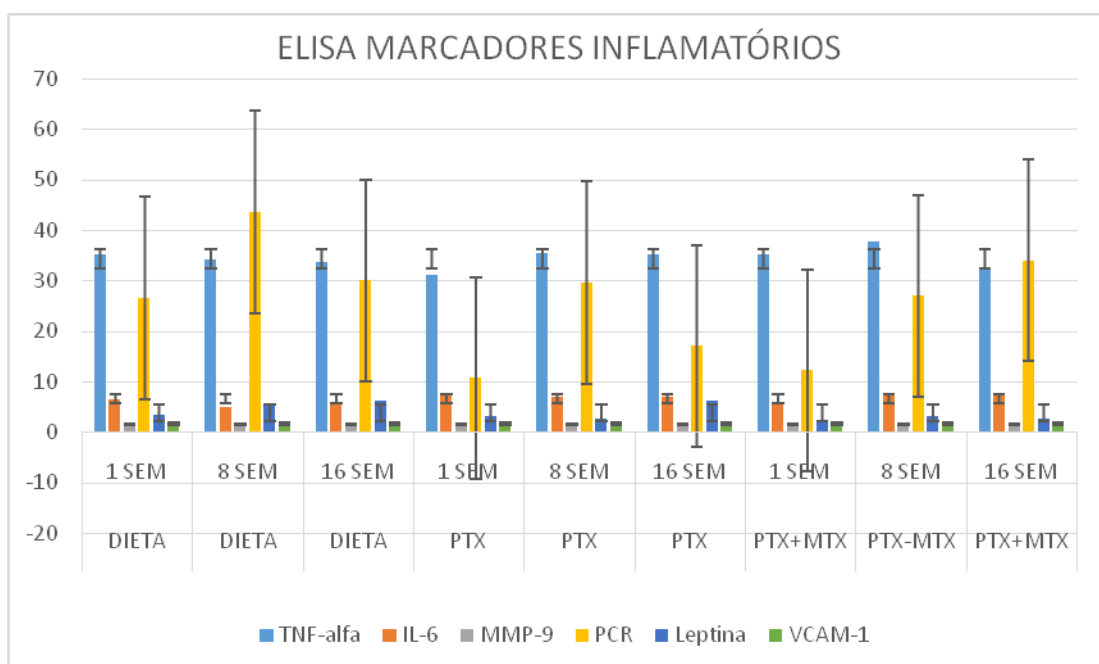
\*p<0,05 versus 8 e 16 semanas; †p<0,05 versus 16 semanas.

## 5.6 Perfil inflamatório

A Figura 4 mostra a concentração de marcadores inflamatórios no soro dos coelhos antes do início da dieta rica em colesterol (BASAL), após indução da aterosclerose (8 semanas) e após o término do tratamento (16 semanas).

Não foi encontrada diferença com significância estatística entre as dosagens de TNF- $\alpha$ , IL-6, VCAM-1, MMP-9, leptina e PCR na comparação entre os grupos DIETA, PTX e PTX+MTX, e nos diferentes períodos de coleta em cada um dos grupos isoladamente.

Houve uma tendência à elevação de PCR após 8 semanas da dieta enriquecida com colesterol a 1%, com relação ao basal e à diminuição da concentração sérica na coleta de 16 semanas nos grupos DIETA e PTX. Porém, também não foi encontrada significância estatística.



**Figura 4** - Perfil de marcadores inflamatórios séricos dos grupos DIETA, PTX, PTX+MTX. Dados expressos em média±DP.

### 5.7 Análise macroscópica das lesões ateroscleróticas

Os resultados das análises macroscópicas das aortas mostraram uma regressão da porcentagem de placa aterosclerótica nas aortas dos coelhos tratados com LDE-paclitaxel e com a combinação LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato, como mostrado na Tabela 5.

Quando comparados com o grupo dieta, os coelhos do grupo PTX apresentaram área de placa aterosclerótica 22% menor (IC 95%: 8,4 a 35%),  $p < 0,001$ . Isso representa uma regressão de 49%.

O grupo PTX+MTX obteve uma redução ainda mais significativa ao compararmos com o grupo dieta: 26,4% (IC 95%: 13 a 40%),  $p < 0,01$ . Isso representa uma regressão de 58% no grupo tratado em relação ao controle.

Não foi observada diferença estatística na comparação entre os grupos tratados com quimioterápicos. Houve uma tendência a haver redução de 18% na porcentagem de placa aterosclerótica nos coelhos tratados com a combinação de medicamentos, porém sem significância estatística: 4,4% a menos em favor do grupo combinação, IC 95%: -18 a +9%,  $p > 0,05$ .

Nós comparamos as medidas de lesões ateroscleróticas dos grupos de tratamento quimioterápico com o grupo CONTROLE a fim de melhor demonstrar o efeito de regressão de aterosclerose do tratamento sem influência da suspensão da dieta enriquecida com colesterol logo após a indução das placas ateroscleróticas.

Quando comparados com o grupo CONTROLE, os coelhos do grupo PTX apresentaram redução da área de placa aterosclerótica da ordem de 40%. Isso representa uma regressão de 63,5% (IC 95%: 0,4 a 6,6%),  $p < 0,001$ .

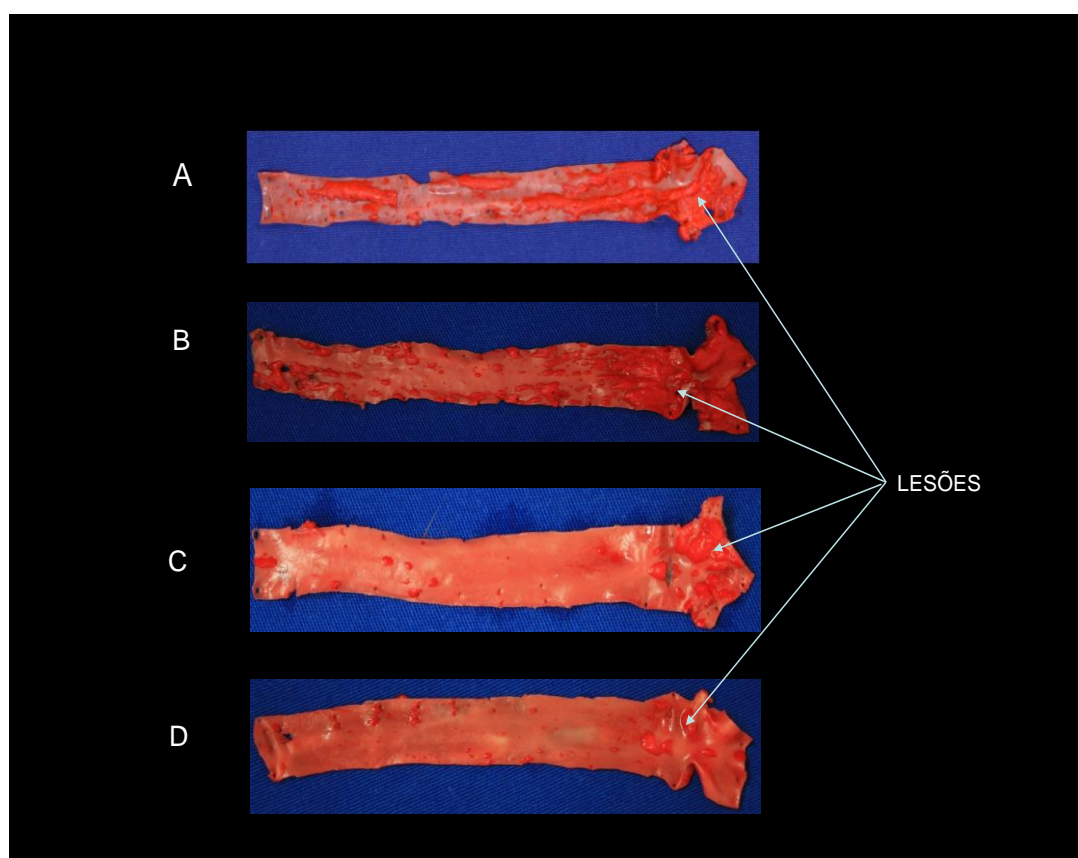
O grupo PTX+MTX obteve uma redução ainda mais significativa ao compararmos com o grupo CONTROLE: 45% (IC 95%: 0,4 a 7,7%),  $p < 0,01$ . Isso representa uma regressão de 71% no grupo tratado em relação ao controle.

**Tabela 4** - Medidas das áreas totais, de lesões ateroscleróticas e porcentagem de placa nas aortas dos coelhos dos grupos CONTROLE, DIETA, PTX e PTX+MTX. Dados expressos em média±DP.

Macroscopia	CONTROLES	DIETA	PTX	PTX+MTX
Área total da aorta (cm <sup>2</sup> )	10,6±1,4	11,9±2,0	13,5±2,5	13,3±2,4
Área de lesão (cm <sup>2</sup> )	6,8±2,1	5,4±0,28	3,1±0,5	2,5±0,3
Área de lesão/área total	0,63±14	0,45±14	0,23±20*†	0,19±13*

\*p<0,001 versus CONTROLES e DIETA; †p>0,05 versus PTX+MTX.

Essa diferença na macroscopia das lesões pode ser visualizada facilmente ao compararmos as fotos das aortas dos coelhos dos diferentes grupos, como ilustrado na Figura 5.



**Figura 5** - Aortas de coelhos dos grupos CONTROLES (A), DIETA (B), PTX (C) e PTX+MTX (D) com os depósitos lipídicos das lesões ateroscleróticas evidenciados por SUDAN IV.

### 5.8 Análise morfométrica de cortes histológicos de arco aórtico

A análise morfométrica dos cortes histológicos das aortas dos coelhos dos grupos Controle, DIETA, PTX e PTX+MTX está apresentada na Tabela 6.

**Tabela 5** - Morfometria das áreas e das espessuras totais e da camada íntima do arco aórtico de coelhos dos grupos DIETA, PTX e PTX+MTX. Dados expressos em Média±D.P.

<i>Morfometria</i>	CONTROLES	DIETA	PTX	PTX+MTX
Área total (mm <sup>2</sup> )	10,6±1,4	10,2±3,6	9,2±3,0	8,5±1,2
Área da íntima (mm <sup>2</sup> )	6,8±2,1	1,4±1,0*	1,0±0,6*	0,5±0,3*†
Área da íntima/área total	0,6±0,1	0,14±0,08*	0,11±0,04*	0,06±0,03*†
Espessura total (µm)	1.385±728	872±150&	665±133&	628±155&
Espessura da íntima (µm)	188±124	85,6±58,6	53,3±12,8&	35,4±22,7*
Espessura da íntima/espessura total	0,21±0,07	0,1±0,05&	0,09±0,04*	0,06±0,04#

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

Não houve diferença com significância estatística entre a área total das aortas dos coelhos dos grupos CONTROLE, DIETA, PTX e PTX+MTX.

A diferença entre as áreas das camadas íntimas das aortas dos coelhos dos grupos DIETA (-5,4 I.C.95% 3,3 a 7,4), PTX (-5,8 I.C.95% 3,8 a 7,7) e PTX+MTX (-6,3 I.C.95% 4,4 a 8,1) foi até 12 vezes menor do que a do grupo CONTROLE p<0,001. Comparando os grupos que sofreram intervenção, a área da camada íntima do grupo PTX+MTX foi mais de duas vezes menor do que no grupo DIETA (-0,9 I.C.95% -1,1 a 2,9) p<0,05. Não houve diferença entre as áreas das camadas íntimas entre os grupos DIETA e PTX, e entre os grupos PTX e PTX+MTX (-0,4 I.C.95% 1,6 a 2,5) e (-0,5 I.C.95% -1,4 a 2,4), respectivamente.

A razão entre a área da camada íntima e a área total da aorta dos grupos DIETA (-0,5 I.C.95% 0,3 a 0,6), PTX (-0,46 I.C.95% 0,3 a 0,6) e PTX+MTX (-0,56 I.C.95% 0,4 a 0,7) foi até 10 vezes menor do que a do grupo CONTROLE, p<0,001. Também houve diferença de 0,08 entre a

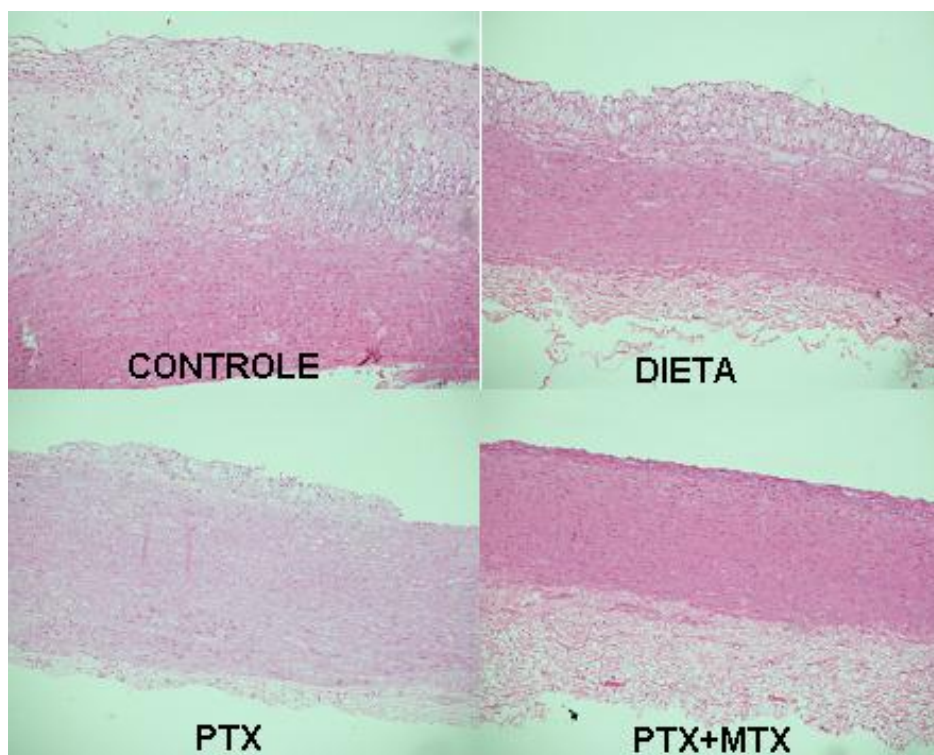
razão da área da íntima e a área total do grupo PTX+MTX comparada a do grupo DIETA ( $p < 0,05$ ). Mais uma vez, não houve diferença entre as razões das áreas da íntima e área total das aortas dos coelhos dos grupos PTX e DIETA, e entre os grupos PTX e PTX+MTX,  $p > 0,05$ .

Com relação às espessuras, o grupo CONTROLE apresentou uma espessura total da aorta maior do que as dos demais (+513  $\mu\text{m}$  vs. DIETA, I.C.95% 63 a 1287; +720  $\mu\text{m}$  vs. PTX, I.C. 73 a 1367 e +757  $\mu\text{m}$  vs. PTX+MTX, I.C.95% 110 a 1404),  $p < 0,05$ .

Com relação à espessura da íntima, os grupos que fizeram tratamento quimioterápico apresentaram essa variável até 2,2 vezes menor com relação ao grupo CONTROLE, porém, quando comparados ao grupo DIETA, embora os valores médios das espessuras íntimas dos grupos PTX e PTX+MTX tivessem sido menores, não houve diferença estatística entre os grupos -32 e -50  $\mu\text{m}$ , respectivamente, com  $p > 0,05$ . Também houve tendência à redução da média da espessura da íntima entre os grupos PTX e PTX+MTX (-17  $\mu\text{m}$ , I.C.95% -98 a 134),  $p > 0,05$ .

As relações espessura íntima/espessura total de todos os grupos de intervenção apresentaram valores menores do que o grupo CONTROLE (+0,12 vs. DIETA I.C. 95% 0,02 a 0,21,  $p < 0,05$ ; +0,12 vs. PTX I.C.95% 0,3 a 0,21,  $p < 0,01$  e +0,15 vs. PTX+MTX I.C.95% 0,07 a 0,24,  $p < 0,001$ ), porém não houve diferença estatística entre os grupos quimioterapia e o DIETA, nem entre o grupo PTX e o PTX+MTX.

A Figura 6 mostra cortes histológicos da aorta, ilustrando as diferenças entre os grupos.



**Figura 6** - Cortes histológicas de aorta dos coelhos dos grupos CONTROLE, DIETA, PTX e PTX+MTX corados em hematoxilina-eosina.

## 5.9 Análise imuno-histoquímica

### 5.9.1 Quantificação de macrófagos e células de músculo liso

A Tabela 6 apresenta os resultados da imunomarcção para identificação de macrófagos e células de músculo liso na placa aterosclerótica arco aórtico dos coelhos dos grupos DIETA, PTX e PTX+MTX.

Não houve diferença com significância estatística na porcentagem de imunomarcção para macrófagos ou células musculares lisas na área total analisada ou na área da placa entre os grupos estudados.

Houve uma redução de 30% nas porcentagens de área marcada total para macrófagos no grupo PTX em relação ao grupo DIETA, porém não foi estatisticamente significativa: redução de -3,1%; IC95%: -7,2 a +13,5,  $p > 0,05$ . Entre os grupos DIETA e PTX+MTX, a redução foi ainda maior,

40%, porém também não houve significância estatística:  $-3,8$ ; IC95%:  $-6,9$  a  $+14,5$ ;  $p>0,05$ .

Houve uma tendência mais forte à redução na área marcada para macrófagos na placa aterosclerótica do grupo PTX em relação ao grupo DIETA, 48% menor. Porém também sem significância estatística. Diferença de 15%; IC95%:  $6,6$  a  $26,4$ ,  $p=0,05$ .

Entre os grupos PTX+MTX e DIETA, a redução foi um pouco menor, de 43%:  $-9,3$ ; IC95%:  $-8,6$  a  $+27,3$ ,  $p>0,05$ .

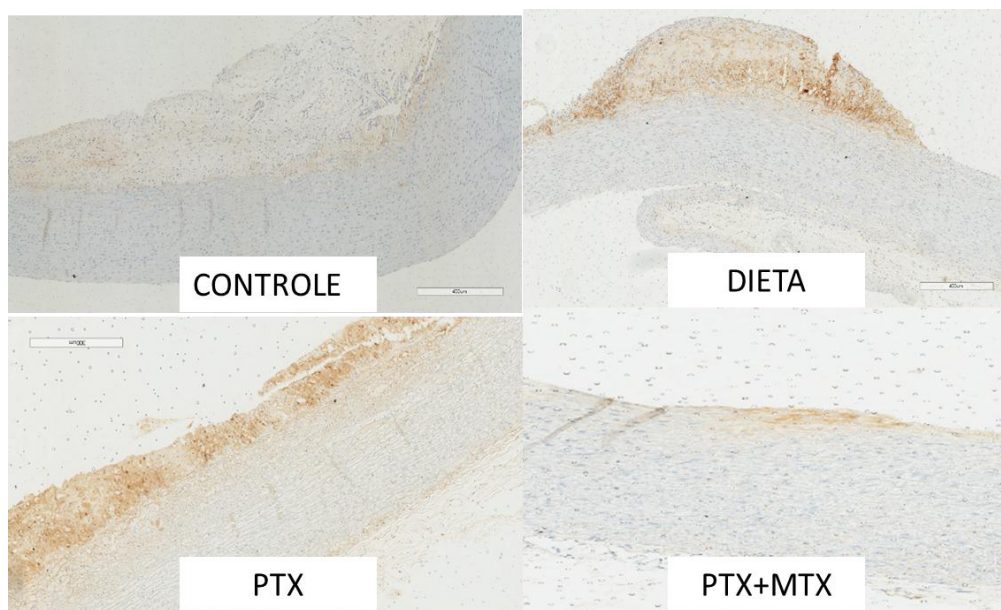
Com relação à análise de células musculares lisas, não houve diferença significativa de imunomarcações positivas entre os grupos, também não foi evidenciada a mesma tendência à redução, como na análise de macrófagos. A Tabela 7 mostra os resultados da análise imuno-histoquímica para macrófagos e CMLs dos coelhos dos grupos DIETA, PTX e PTX+MTX.

**Tabela 6** - Morfometria da área total da amostra, da porcentagem de área imunomarcada total e porcentagem de área imunomarcada na placa por macrófagos e células de músculo liso presentes no arco aórtico de coelhos dos grupos DIETA, PTX e PTX+MTX. Dados expressos em média $\pm$ D.P.

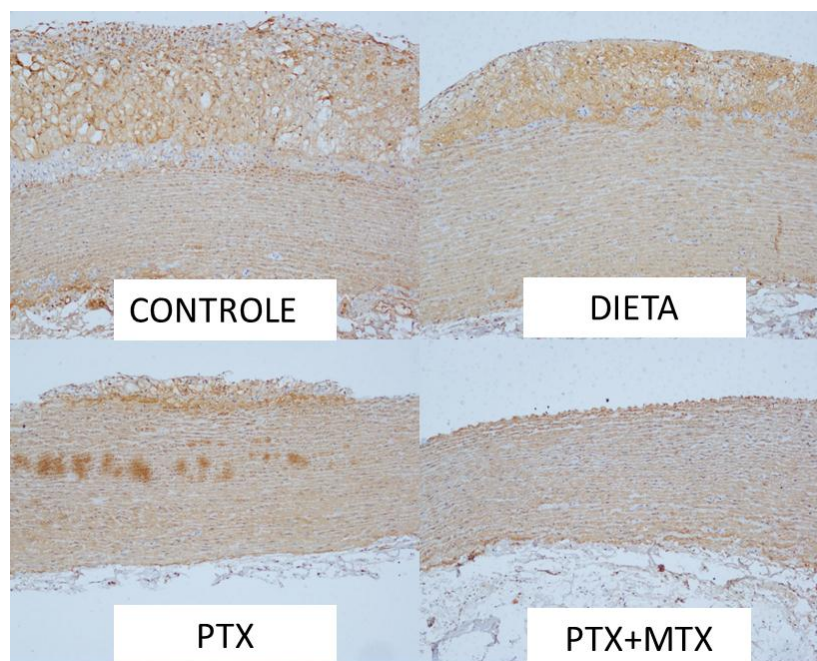
<i>Tipo celular</i>	DIETA	PTX	PTX+MTX
<i>Macrófagos</i>			
Área total da amostra (mm <sup>2</sup> )	9,8 $\pm$ 3,0	9,47 $\pm$ 2,9	8,1 $\pm$ 1,2
% área marcada total	10 $\pm$ 7,3	6,7 $\pm$ 5,6	6 $\pm$ 7,6
% de área marcada na placa	31,9 $\pm$ 14,4	16,5 $\pm$ 11,1*	18,2 $\pm$ 7,2
<i>Células de músculo liso</i>			
Área total da amostra (mm <sup>2</sup> )	9,1 $\pm$ 3,04	9,6 $\pm$ 4,1	7,1 $\pm$ 1,2
% área marcada total	39 $\pm$ 6,5	34,2 $\pm$ 8	39,4 $\pm$ 3,3
% de área marcada na placa	35,5 $\pm$ 11,2	29,4 $\pm$ 14,6	26,5 $\pm$ 15,8

\* $p=0,05$  versus DIETA





**Figura 7** - Cortes histológicos de arco aórtico de animais dos grupos Controle, DIETA, PTX e PTX+MTX imunomarcados para RAM-11.



**Figura 8** - Cortes histológicos de arco aórtico de animais dos grupos Controle, DIETA, PTX e PTX+MTX imunomarcados para actina-alfa.

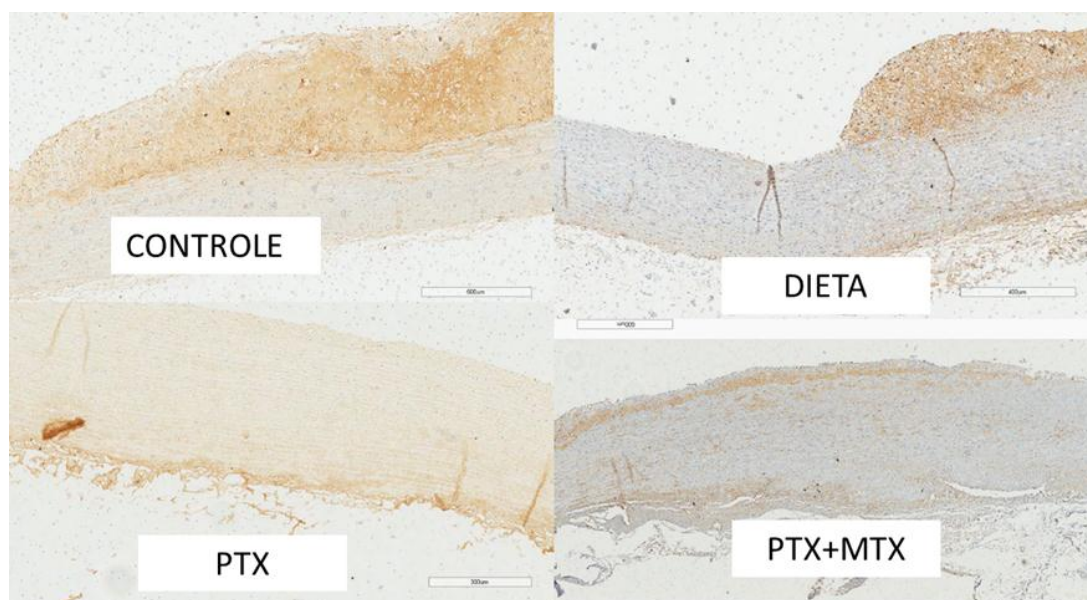
### 5.9.2 Quantificação da expressão proteica de MMP9

A Tabela 8 apresenta os valores da imunomarcação para MMP9. A porcentagem de área marcada foi 74% menor no grupo PTX comparado com o grupo DIETA, diferença de 10,6% IC 95% (2,4 a 18,7). Comparando os grupos PTX+MTX e DIETA, a redução foi ainda menor, de 78% a favor do grupo que fez tratamento quimioterápico combinado, diferença de 11,1% IC 95% (3,6 a 18,7).

**Tabela 7** - Morfometria da área imunomarcada e porcentagem de área imunomarcada pela metaloproteinase da matriz MMP-9 presente em arco aórtico de coelhos dos grupos DIETA, PTX e PTX+MTX. Dados expressos em Média±D.P.

<b>MMP-9</b>	<b>DIETA</b>	<b>PTX</b>	<b>PTX+MTX</b>
Área marcada (mm <sup>2</sup> )	10,2±3,6	8,3±1,1	8,2±1,9
% de área marcada	14,4±5,1	3,7±2,2*	3,2±1,5*

\*p<0,05 em comparação com o grupo DIETA.



**Figura 9** - Cortes histológicos de arco aórtico de animais dos grupos Controle, DIETA, PTX e PTX+MTX imunomarcados para MMP-9.

### 5.10 Análise da expressão gênica relativa dos marcadores inflamatórios nas aortas

Análise por Qrt-PCR da expressão gênica relativa dos marcadores inflamatórios mostrou que não houve diferença estatística na expressão dos genes para IL-10, MCP-1, MMP-9, MMP-12, CD36 e VCAM-1 nas aortas dos coelhos dos grupos PTX e PTX+MTX quando comparados ao grupo DIETA.

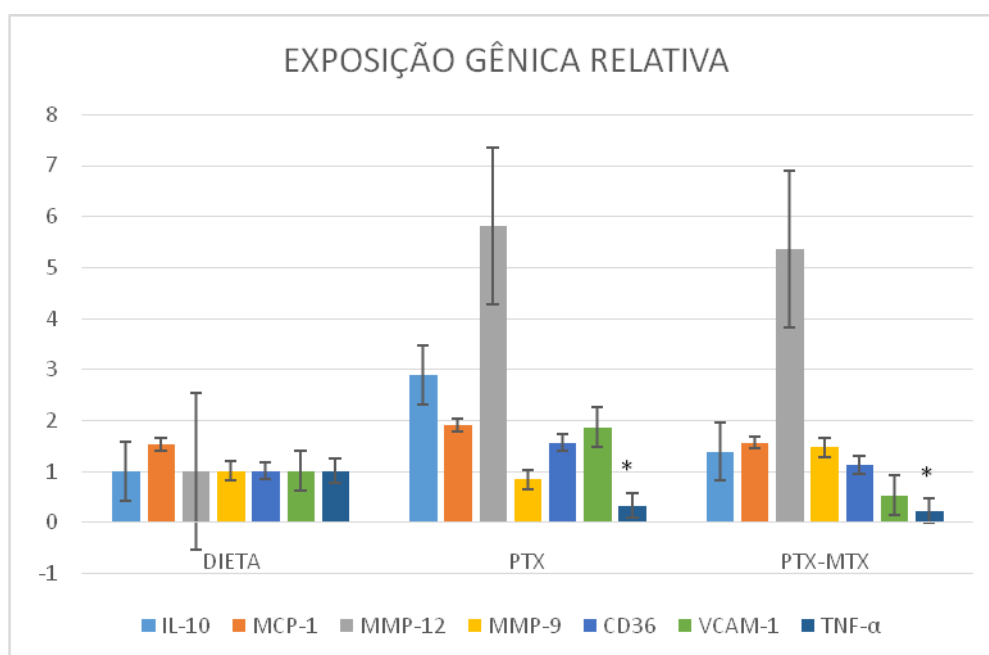
Com relação a esses marcadores, em alguns casos, houve até a tendência a um aumento na expressão gênica relativa ao grupo DIETA. Na análise de IL-10, houve um aumento de até 3 vezes dos valores do grupo PTX ( $2,9 \pm 2,3$  vs.  $1,0 \pm 0,15$ ,  $p=0,14$ ). Com relação à VCAM-1, o aumento foi ainda maior, mas ainda sem significância estatística (PTX  $7,5 \pm 8,3$  e PTX+MTX  $4,6 \pm 5,2$  vs.  $1,02 \pm 0,2$ ,  $p=0,32$ ). MMP-12 também mostrou tendência, sem significância estatística, a um aumento de, aproximadamente, 5 vezes dos valores dos grupos quimioterapia (PTX  $5,8 \pm 4,1$  e PTX+MTX  $5,4 \pm 8,4$ ,  $p=0,66$ ).

O único dos marcadores inflamatórios de aterosclerose que mostrou redução em sua expressão gênica associada ao tratamento quimioterápico foi o TNF- $\alpha$ .

O grupo PTX apresentou uma expressão de genes para TNF- $\alpha$  66% menor em relação ao grupo DIETA ( $0,34 \pm 0,27$  versus  $1,01 \pm 0,26$ ; IC 95% 0,2 a 11,  $p < 0,05$ ). No grupo PTX+MTX, essa diferença foi ainda maior ( $0,23 \pm 0,18$  versus  $1,01 \pm 0,26$ ; IC 95% 0,8 a 6,2,  $p < 0,05$ ), o que representa uma redução na expressão gênica desse imunomarcador de 77%.

Não houve diferença com significância estatística com relação às expressões de genes para TNF- $\alpha$  entre os grupos PTX e PTX+MTX.

A Figura 7 mostra a expressão gênica relativa dos marcadores de inflamação em comparação entre os grupos.



**Figura 10** - Expressão gênica relativa dos marcadores de inflamação: IL-10, MCP-1, MMP-12, MMP-9, CD36, VCAM-1 e TNF- $\alpha$ , dos grupos DIETA, PTX e PTX+MTX. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão. \* $p < 0,05$  vs. DIETA.

## **6 DISCUSSÃO**

---

## 6 DISCUSSÃO

Este estudo mostrou que o tratamento quimioterápico da aterosclerose à base da associação PTX+MTX, ligados à LDE, foi eficaz em regredir a área de placa aterosclerótica, sem causar efeitos colaterais.

Esses resultados são semelhantes aos encontrados na literatura, em um estudo envolvendo coelhos hipercolesterolêmicos, o uso de MTX sistêmico, em sua forma comercial, por 4 semanas demonstrou uma redução de 75% na área de placa aterosclerótica (Bulgarelli, 2012). Ao se associar o MTX à LDE, em sua forma de di-dodecil-MTX, a redução de área de placa foi um pouco mais modesta, 65%. Porém, houve uma melhor tolerabilidade e menos efeitos colaterais, como, por exemplo, uma queda 40% menor na contagem de hemácias (Bulgarelli, 2013).

Em outro estudo, a associação PTX-LDE reduziu em 60% a área lesionada dos coelhos tratados, além de inibir a migração de macrófagos para o local da lesão e a proliferação de células musculares lisas. O tratamento demonstrou não ter toxicidade para os animais (Maranhão, 2008).

No nosso estudo, nós procuramos comparar não apenas intervenções como dieta hipolipídica e quimioterapia com dois esquemas diferentes de medicamentos, como também com um grupo controle composto por coelhos que apenas sofreram a indução de aterosclerose. O objetivo dessa comparação é a de comprovar que os diferentes tipos de tratamento realmente tiveram a ação de regredir a placa aterosclerótica e não somente diminuir o volume dos ateromas.

Quando comparados ao grupo CONTROLE, os coelhos que fizeram uso do paclitaxel associado à LDE apresentaram uma regressão de 63,5% de placa aterosclerótica. No grupo que fez uso da associação de LDE-metotrexato e LDE-paclitaxel, essa regressão foi ainda maior de 71%. No grupo que apenas teve a dieta hipercolesterolêmica suspensa, embora tenha

haver uma redução na porcentagem de placa de 18%, não houve diferença estatística em relação ao grupo controle.

Comparando somente os grupos DIETA e os do braço quimioterapia, a redução de área de placa foi semelhante em relação aos estudos anteriores: de 59% no grupo PTX+MTX e de 49% no grupo PTX. Porém, o uso combinado de MTX e PTX não mostrou superioridade na redução da área de lesão quando comparado com PTX isoladamente.

Na planimetria microscópica, ocorreu o mesmo processo na camada íntima do arco aórtico dos coelhos, principalmente em comparação com o grupo CONTROLE. Os grupos DIETA, PTX e PTX+MTX mostraram uma redução expressiva da área da camada íntima. Redução esta que foi menos expressiva na comparação dos grupos intervenção, somente sendo encontrada diferença estatística na comparação entre os grupos PTX+MTX e DIETA.

A mesma tendência à redução foi encontrada na medida da espessura da íntima. Os grupos de intervenção apresentaram uma espessura muito menor do que o CONTROLE. Porém, quando comparados ao grupo DIETA, embora tenha havido tendência à redução da espessura, os grupos quimioterapia não mostraram diferença estatística em relação ao DIETA. Isso pode ser explicado por uma certa ação da dieta hipolipêmica na regressão do processo aterosclerótico. Isso foi demonstrado em humanos, como na revisão sistemática de Petersen e cols. de 2014, em que foi encontrada redução na relação da espessura íntima/média da carótida de pacientes de alto risco para doença cardiovascular submetidos à dieta mediterrânea, que é pobre em gordura saturada.

Assim como em outros estudos semelhantes, no nosso protocolo, a redução no volume de placas ateroscleróticas se deu sem a influência no perfil lipídico dos coelhos. Houve um aumento de mais de trinta vezes nos níveis plasmáticos de colesterol e frações, sem qualquer influência do tratamento quimioterápico.

Isso era de se esperar, uma vez que não foi usada nenhuma terapia hipolipemiante, apenas suspendemos a dieta enriquecida com colesterol a

1%, a fim de simular a prática clínica ideal, em que os pacientes portadores de aterosclerose devem fazer dieta pobre em colesterol.

Os quimioterápicos não possuem ação na diminuição de níveis de colesterol sérico. Em pacientes portadores de artrite reumatoide, Chen *et al.*, em 2011, não encontraram diferenças no perfil lipídico de pacientes em uso de MTX.

Nós utilizamos um protocolo de consumo de ração enriquecida com colesterol 1% por 8 semanas e de tratamento pelo mesmo tempo, mais prolongado e mais sujeito a efeitos colaterais aos coelhos do que protocolos de 4 semanas. Isso fez com que muitos coelhos não resistissem à indução de aterosclerose e morressem nas primeiras semanas de protocolo. Além disso, um tempo maior de indução de aterosclerose, e, principalmente, um tempo maior de tratamento consumindo dieta comercial usual pode ter alterado a composição das placas ateroscleróticas.

Muitas aortas apresentavam aspecto de calcificação no seu arco, mimetizando placas estáveis. É provável que essas características tenham influenciado nossos resultados, uma vez que placas estáveis podem ser mais difíceis de regredir e os fatores de inflamação são diferentes. Aikawa e cols., em 1998, demonstraram uma menor ação proteolítica de metaloproteinases e uma maior concentração de colágeno na capa fibrótica das ateroscleróticas em coelhos hipercolesterolêmicos que foram submetidos à dieta hipolipêmica.

Isso pode ter influído na ação dos quimioterápicos no perfil de marcadores inflamatórios analisado. Estudo do mesmo grupo mostrou redução da expressão gênica de fator tecidual na aorta de coelhos hipercolesterolêmicos submetidos, posteriormente, à dieta pobre em lipídeos (Aikawa, 1999).

No nosso estudo, não foi encontrada diferença com significância estatística entre as dosagens de níveis séricos por ELISA de TNF- $\alpha$ , IL-6, VCAM-1, MMP-9, leptina e PCR na comparação entre os grupos DIETA, PTX e PTX+MTX e na comparação entre as coletas de 0, 8 e 16 semanas.



O único marcador que apresentou tendência a sofrer elevação após a indução da aterosclerose com decréscimo após o tratamento foi o PCR e somente nos grupos DIETA e PTX, porém sem significância estatística. Nós não analisamos o perfil de marcadores inflamatórios séricos dos coelhos do grupo CONTROLE, pois nós já possuíamos medidas de todos os grupos após a indução da aterosclerose (8 semanas).

Também não foi realizada análise de quantificação de macrófagos, células musculares lisas e de expressão proteica de MMP-9 no grupo controle, o que pode ser considerado uma limitação desse estudo.

Porém, nossos achados, na comparação entre os grupos de intervenção, chamam a atenção para a importante diminuição da expressão proteica dessa metaloproteinase nos grupos PTX e PTX+MTX comparados ao grupo DIETA, da ordem de 74% e 78%, respectivamente.

A MMP-9 é uma das MMPs altamente expressa em lesões ateroscleróticas e, devido ao seu importante papel na degradação da membrana extracelular (MEC), compromete a estabilidade da placa e a integridade da membrana basal do endotélio. Isso predispõe à ruptura da placa aterosclerótica, o que pode levar a eventos cardiovasculares importantes, como infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (Blankenberg *et al.*, 2003; Newby, 2008; Schäfers *et al.*, 2010; Ketelhuth & Bäck, 2011; da Motta *et al.*, 2013). Portanto, menor expressão de MMP9 na cama íntima representa redução das placas ateroscleróticas, maior estabilidade dessas e diminuição da severidade de doenças cardiovasculares relacionadas à aterosclerose.

A análise por Qrt-PCR da expressão gênica relativa dos marcadores inflamatórios mostrou que não houve diferença estatística na expressão dos genes para IL-10, MCP-1, MMP-9, MMP-12, CD36 e VCAM-1 nas aortas dos coelhos dos grupos PTX e PTX+MTX quando comparados ao grupo DIETA.

O único marcador inflamatório que apresentou maior expressão gênica no grupo DIETA em comparação com os grupos quimioterapia foi o TNF- $\alpha$ .

TNF- $\alpha$  é uma citocina produzida em vários tipos de células, incluindo macrófagos, células endoteliais e células de músculo liso (Kleemann, 2008).

Exerce grande efeito inflamatório na aterosclerose. Estudos mostram a presença desta citocina em placas ateroscleróticas humanas (McKellar, 2009) e a concentração de TNF- $\alpha$  circulante está associada a um maior risco de infarto do miocárdio, espessamento de carótida, distúrbios na homeostasia dos triglicérides e da glicose (Rus, 1991). Este estudo mostrou que a terapia PTX+MTX reduziu de modo marcante a expressão do gene TNF- $\alpha$  comparado com PTX isolado e apenas correção da dieta.

Assim como nos estudos que também avaliaram a associação de quimioterápicos à LDE, no nosso protocolo, os coelhos toleraram bem as medicações, apresentando poucos efeitos colaterais, não houve diferença com relação ao peso e ao consumo de ração dos coelhos no início do protocolo de indução de aterosclerose até o final do tratamento.

Na análise de segurança, os coelhos não apresentaram alterações na função renal e hepática ou na glicemia com relação ao tratamento. Houve um aumento na média de creatinina dos coelhos do grupo DIETA após a indução de aterosclerose em relação aos valores basais, mas, como esse grupo não fez uso de quimioterapia, essa alteração não pode ser considerada efeito colateral.

É sabido que o metotrexato é altamente hepatotóxico e, como as transaminases hepáticas dos coelhos não sofreram alteração, esse efeito protetor deve ser creditado ao LDE.

Houve, também, uma alteração na glicemia nos coelhos do mesmo grupo, porém, no início do estudo, na coleta basal. Provavelmente, a causa dessa alteração foi jejum inadequado dos coelhos na ocasião da coleta.

Quanto ao perfil hematológico, a redução no número de hemácias na coleta de 8 semanas no grupo PTX+MTX, em relação ao basal, não foi relacionada ao tratamento quimioterápico, uma vez que não foi observada queda nas taxas de glóbulos vermelhos após 16 semanas de estudo. Entre os grupos, não houve diferença com significância estatística na série vermelha do hemograma.

Esse achado reforça a ação da LDE em diminuir a toxicidade dos quimioterápicos, uma vez que o metotrexato, por ser um agente antifolato, pode induzir anemia hemolítica e outras citopenias.

Também houve um efeito protetor do LDE na associação com paclitaxel. Neutropenia, o principal efeito adverso do quimioterápico, não foi observado nos coelhos incluídos no estudo. Apesar da tendência à redução na contagem de leucócitos na coleta de 16 semanas, nos três grupos intervenção (DIETA, PTX e PTX+MTX), além de não ter sido encontrada significância estatística, como o grupo DIETA apresentou a mesma alteração, essa não pode ser relacionada ao tratamento quimioterápico, uma vez que esse grupo não fez uso de medicação.

O efeito antiaterosclerótico dos quimioterápicos associados à LDE está sendo avaliado em estudos clínicos atualmente em curso.

Entre os diversos estudos clínicos com MTX, destaca-se o “Cardiovascular Inflammation Reduction Trial” (CIRT) (Everett, 2013). Trata-se de estudo duplo-cego, randomizado, que envolve 7.000 pacientes com doença arterial coronária estável e diabéticos ou síndrome metabólica. Serão avaliados os desfechos cardiovasculares primários: infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral e morte cardiovascular na vigência de baixas doses do quimioterápico (15 a 20 mg/semana). O estudo ainda está em curso.

Acreditamos que a associação com LDE, que também está sendo testada em protocolos clínicos ainda em fase de iniciação, tornará a opção de tratamento quimioterápico de aterosclerose mais factível e com melhor tolerabilidade.

## **7 CONCLUSÕES**

---

## 7 CONCLUSÕES

- O tratamento com a associação de paclitaxel e de paclitaxel em associação com metotrexato utilizando como veículo uma nanoemulsão lipídica de composição semelhante à LDL causou regressão das lesões ateroscleróticas em coelhos que sofreram indução de aterosclerose sendo submetidos a uma dieta hipercolesterolêmica, em comparação a coelhos que tiveram apenas a dieta enriquecida com colesterol suspensa;
- O tratamento quimioterápico foi bem tolerado, não sendo observadas manifestações de toxicidade hematológica, hepática ou renal nos coelhos tratados com a associação LDE-paclitaxel isoladamente ou em associação a LDE-metotrexato;
- Os quimioterápicos em associação com LDE foram eficazes em reduzir a expressão proteica de MMP-9 por imuno-histoquímica e a expressão gênica de TNF- $\alpha$  por qRT-PCR no tecido aórtico dos coelhos.

## **8 REFERÊNCIAS**

---

## 8 REFERÊNCIAS

Aikawa M, Rabkin E, Okada Y, Voglic SJ, Clinton SK, Brinckerhoff CE, Sukhova GK, Libby P. Lipid lowering by diet reduces matrix metalloproteinase activity and increases collagen content of rabbit atheroma: a potential mechanism of lesion stabilization. *Circulation*. 1998 Jun 23;97(24):2433-44.

Aikawa M, Voglic S, Sugiyama S, Rabkin E, Taubman M, Fallon J, Libby P. Dietary lipid lowering reduces tissue factor expression in rabbit atheroma. *Circulation*. 1999;100:1215-22.

Allison AC. Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward. *Immunopharmacology*. 2000;47(2-3):63-83.

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

Arsenault BJ, Kritikou EA, Tardif JC. Regression of atherosclerosis. *Curr Cardiol Rep*. 2012 Aug;14(4):443-9.

Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, Meyer J, Cambien F, Tiret L. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation*. 2003;107:1579-85.

Boyle JJ, Weissberg PL, Bennett MR. Human macrophage-induced vascular smooth muscle cell apoptosis requires NO enhancement of Fas/Fas-L interactions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2002;22:1624-30.

Bulgarelli A, Dias A, Caramelli B, Maranhão RC. Treatment with methotrexate inhibits atherogenesis in cholesterol-fed rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2012;59:308-14.

Bulgarelli A, Leite Jr. AC, Dias A, Maranhão RC. Anti-atherogenic effects of methotrexate carried by a lipid nanoemulsion that binds to LDL receptors in cholesterol-fed rabbits. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2013;27:531-9.

Chan ESL, Cronstein BN. Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases. *Arthritis Res*. 2002;4:266-73.

Charo I, Taub R. Anti-inflammatory therapeutics for the treatment of atherosclerosis. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(5):365-76.

Chen DY, Chih HM, Lan JL, Chang HY, Chen WW, Chiang EP. Blood lipid profiles and peripheral blood mononuclear cell cholesterol metabolism gene expression in patients with and without methotrexate treatment. *BMC Med.* 2011;9:4.

Chisolm GM, Chai YC. Regulation of cell growth by oxidized LDL. *Free Radic Biol Med.* 2000;28:1697-1707.

Choy PC, Siow YL, Mymin D, Karmin O. Lipids and atherosclerosis. *Biochem. Cell Biol.* 2004; 82:212-24.

Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Robbins: patologia estrutural e funcional.* 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 2000. p. 445-56.

da Motta NAV, Fumian MM, de Castro JP, de Brito FCF. Inflamação e aterosclerose: novos biomarcadores e perspectivas terapêuticas. *Rev Bras Cardiol.* 2013;26(5):390-99.

Dave T, Ezhilan J, Vasnawala H, Somani V. Plaque regression and plaque stabilisation in cardiovascular diseases. *Indian J Endocrinol Metab.* 2013;7(6):983-9.

David-Couto R, Dallan LAO, Lisboa LAF, *et al.* Deposition of a cholesterol from a lipid microemulsion in fragments of blood vessels excised from patients during coronary bypass surgery. *Atheroscler Suppl.* 2003;2:227-8.

Devaraj S, Xu DY, Jialal I. C-reactive protein increases plasminogen activator inhibitor-1 expression and activity in human aortic endothelial cells: implications for the metabolic syndrome and atherothrombosis. *Circulation.* 2003;107:398-404.

Dwivedi A, Slater S, George S. MMP-9 and -12 cause N-cadherin shedding and thereby  $\beta$ -catenin signalling and vascular smooth muscle cell proliferation. *Cardiovascular Research.* 2009;81(1):178-86.

Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med.* 2002;8(11):1249-56.

Eaton CB. Traditional and emerging risk factors for cardiovascular disease. *Prim. Care.* 2005;32:963-976i.



Everett BM, Pradhan AD, Solomon DH, Paynter N, Macfadyen J, Zaharris E, Gupta M, Clearfield M, Libby P, Hasan AA, Glynn RJ, Ridker PM. Rationale and design of the Cardiovascular Inflammation Reduction Trial: a test of the inflammatory hypothesis of atherothrombosis. *Am Heart J.* 2013 Aug;166(2):199-207.

Farzaneh-Far A, Rudd J. Inflammatory mechanisms. *Brit Med Bul.* 2001;59:55-68.

Feig JE, Feig JL. Macrophages, dendritic cells, and regression of atherosclerosis. *Front Physiol.* 2012 Jul 18;3:286.

Fitzpatrick FA, Wheeler RR. The immunopharmacology of paclitaxel (Taxol®), docetaxel (Taxotere®), and related agents. *International Immunopharmacology.* 2003;3:1699-1714.

Francis AA, Pierce GN. An integrated approach for the mechanisms responsible for atherosclerotic plaque regression. *Exp Clin Cardiol.* 2011;16(3):77-86.

Fuster JJ, Fernández P, González-Navarro H, Silvestre C, Nabah YN, Andrés V. Control of cell proliferation in atherosclerosis: insights from animal models and human studies. *Cardiovasc Res.* 2010;86(2):254-64.

Ginsburg GS, Small DM, Atkinson D. Microemulsions of phospholipids and cholesterol esters. Protein free models of low density lipoprotein. *J.Biol.Chem.* 1982;57:8216-27.

Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis: the road ahead. *Cell.* 2001;104:503-516.

Gordon D, Reidy MA, Benditt EP, Schwartz SM. Cell proliferation in human coronary arteries. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87:4600-04.

Heldman AW, Cheng L, Jenkins GM, Heller PF, Kim DW, Ware MJR, Nater C, Hruban RH, Rezai B, Abella BS, Bunge KE, Kinsella JL, Sollott SJ, Lakatta EG, Brinker JA, Hunter WL, Froehlich JP. Paclitaxel *stent* coating inhibits neointimal hyperplasia at 4 weeks in a porcine model of coronary restenosis. *Circulation.* 2001;103:2289-95.

Honma Y. Predictors of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 2004;11:265-70.

Hope SA, Meredith IT. Cellular adhesion molecules and cardiovascular disease. Part I. Their expression and role in atherogenesis. *Internal Medicine Journal*. 2003;33:380-6.

Hope SA, Meredith IT. Cellular adhesion molecules and cardiovascular disease. Part II. Their association with conventional and emerging risk factors, acute coronary events and cardiovascular risk prediction. *Internal Medicine Journal*. 2003;33:450-462.

Horwitz SB. Mechanism of action of taxol. *Science*. 1992;13:134-6.

Ibanez B, Vilahur G, Badimon JJ. Plaque progression and regression in atherothrombosis. *J Thromb Haemost*. 2007;5(Suppl 1):292-9.

IDB-2011. Indicadores e dados básicos do Brasil Disponível em: <http://www.datasus.gov.br/idb>.

Ikeda U, Oguchi A, Okada K, Ishikawa S, Saito T, Ikeda M, Kano S, Takahashi M, Shiomi M, Shimada K. Involvement of LDL receptor in proliferation of vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*;1994;110:87-94.

Kalanuria AA, Nyquist P, Ling G. The prevention and regression of atherosclerotic plaques: emerging treatments. *Vasc.Health. Risk Manag*. 2012;8:549-61.

Kataoka H, Kume N, Miyamoto S, Minami M, Moriwaki H, Murase T, Sawamura T, Masaki T, Hashimoto N, Kita T. Expression of lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in human atherosclerotic lesions. *Circulation*. 1999;99:3110-17.

Katsuda S, Coltrera MD, Ross R, Gown AM. Human atherosclerosis. IV. Immunocytochemical analysis of cell activation and proliferation in lesions of young adults. *Am J Pathol*. 1993;142:1787-93.

Kearney M, Pieczek A, Haley L, Losordo DW, Andre´s V, Schainfeld R *et al*. Histopathology of in-stent restenosis in patients with peripheral artery disease. *Circulation*. 1997;95:1998–2002.

Ketelhuth DFJ, Bäck M. The role of matrix metalloproteinases in atherothrombosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2011;13:162-9.

Kingston DGI. Taxol, a molecule for all seasons. *Chem, Commun*. 2001:867-80.

Kleemann R, Zadelaar S, Kooistra T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res*. 2008;79:360-76.

Lau D, Dhillon B, Yan H, Szmitko P, Verma S. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Heart Circ Physiol*. 2005;288:2031-41.

Libby P. Inflammation in Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32:2045-51.

Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation*. 2005;111:3481-8.

Liu YJ, Saini A, Cohen DJ, Ooi BS. Modulation of macrophage proliferation by hyperglycemia. *Mol Cell Endocrinol*. 1995;114:187-92.

Lundberg B. The solubilization of lipophilic derivatives of podophyllotoxins in submicron sized lipid emulsions and their cytotoxic activity against cancer cell in culture. *Int. J. Pharm*. 2004;5:189-218.

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

Maranhão RC, Cesar TB, Pedroso MTB, Hirata MH, Mesquita CH. Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling low density lipoprotein. *Lipids*. 1993;28:691-6.

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

Maranhão RC, Tercyak AM, Redgrave TG. Effects of cholesterol content on the metabolism of protein-free emulsion models of lipoproteins. *Biochem. Biophys. Acta*. 1986;875(2):247-55.

Martin S, Qasim A, Reilly M. Leptin Resistance. A possible interface of inflammation and metabolism in obesity-related cardiovascular disease. *JACC*. 2008;52:1201-10.

McKellar GE, McCarey DW, Sattar N, McInnes IB. Role for TNF in atherosclerosis? Lessons from autoimmune disease. *Nat Rev Cardiol*. 2009;6:410-7.

Moore KJ, Freeman MW. Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:1702-11.

Nair RR, Boyd DD. Expression cloning of novel regulators of 92 kDa type IV collagenase expression. *Biochem Soc Trans.* 2005; 33:1135-6.

Newby AC. Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:2108-14.

Nissen SE *et al.* Statin therapy, LDL cholesterol, C-reactive protein and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 2008;359:1897-1908.

Nissen SE, Nicholls SJ, Sipahi I *et al.* Effect of very high intensive statin therapy on regression of coronary atherosclerosis. The ASTEROID trial. *JAMA.* 2006;295:1556-65.

Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Brown BG, Ganz P, Vogel RA, Crowe T, Howard G, Cooper CJ, Brodie B, Grines CL, DeMaria AN; REVERSAL Investigators. Effect of intensive compared with moderate lipid lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2004;291:1071-80.

O'Brien ER, Alpers CE, Stewart DK, Ferguson M, Tran N, Gordon D, Benditt EP, Hinohara T, Simpson JB, Schwartz SM. Proliferation in primary and restenotic coronary atherectomy tissue. Implications for antiproliferative therapy. *Circ Res.* 1993;73:223-31.

Onetto N, Canetta R, Winograd B, Catane R, Dougan M, Grechko J, Burroughs J, Rozencweig M. Overview of Taxol safety. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 1993;15:131-9.

Park YM. CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis. *Exp Mol Med.* 2014 Jun 6;46:e99.

Parness J, Horwitz S B. Taxol binds to polymerized tubulin in vitro. *J. Cell Biol.* 1981;91:479-87.

Petersen KS, Clifton PM, Keogh JB. The association between carotid intima media thickness and individual dietary components and patterns. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2014;24(5):495-502.

Pickering JG, Weir L, Jekanowski J, Kearney MA, Isner JM. Proliferative activity in peripheral and coronary atherosclerotic plaque among patients undergoing percutaneous revascularization. *J Clin Invest.* 1993;91:1469-80.

Plutzky J. The vascular biology of atherosclerosis. *Am. J. Med.* 2003;115:55S-61S.

Reifenberg K, Lehr HA, Baskal D, Wiese E, Schaefer SC, Black S, Samols D, Torzewski M, Lackner KJ, Husmann M, Blettner M, Bhakdi S. Role of C-reactive protein in atherosclerosis: can the apolipoprotein E knockout mouse provide the answer? *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1641-6.

Rekhter MD, Gordon D. Active proliferation of different cell types, including lymphocytes, in human atherosclerotic plaques. *Am J Pathol.* 1995;147:668-77.

Ricciarelli R, Zingg JM, Azzi A. Vitamin E reduces the uptake of oxidized LDL by inhibiting CD 36 scavenger receptor expression in cultured aortic smooth muscle cells. *Circulation.* 2000;102:82-7.

Ridker K, Lloyd-Jones DM, Moss AJ. C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy. *N Eng J Med.* 2005;352:20-8.

Rodrigues DG, Covolan CC, Coradi ST, Barboza R, Maranhão RC. Use of cholesterol-rich emulsion that binds to low-density lipoprotein receptors as a vehicle for paclitaxel. *J. Pharm. and Pharmacol.* 2002;54(6):765-72.

Rodrigues DG, Maria DA, Fernandes DC, Valduga CJ, Couto RD, Ibanez OC, Maranhão RC. Improvement of paclitaxel therapeutic index by derivatization and association to a cholesterol-rich microemulsion: in vitro and in vivo studies. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2005;55(6):565-76.

Rodrigues DG. Associação do quimioterápico paclitaxel a uma microemulsão rica em colesterol (LDE): estudos de toxicidade, biodistribuição e atividade terapêutica em modelo animal [Tese] - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2004.

Rosowsky A, Forsch RA, Yu CS, Lazarus H, Bearsdley GP. Methotrexate analogues. Divergent influence of alkyl chain length on the dihydrofolate reductase affinity and cytotoxicity of methotrexate monoesters. *J Med Chem.* 1984;27(5):605-9.

Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115-26.

Rus HG, Niculescu F, Vlaicu R. Tumor necrosis factor-alpha in human arterial wall with atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1991;89:247-54.

Schäfers M, Schober O, Hermann S. Matrix-metalloproteinases as imaging targets for inflammatory activity in atherosclerotic plaques. *J Nucl Med.* 2010;51:663-6.

Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature.* 1979;7(277):665.

Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *J Biol Chem.* 2003;278:13740-6.

Serrano CV Jr, Souza JA, Paiva MSMO. Fatores desencadeantes da instabilização da placa aterosclerótica. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo.* 2001;4:724-32.

Singh M, Bedi US. Is atherosclerosis regression a realistic goal of statin therapy and what does that mean? *Curr Atheroscler Rep.* 2013;15(1):294.

Stocker R, Keaney Junior JF. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol. Rev.* 2004;84:1381-1478.

Stone GW, Ellis SG, Cannon L, Mann JT, Greenberg JD, Spriggs SD, O'Shaughnessy CD, Demaio S, Hall P, Popma JJ, Koglin J, Russel ME. Comparison of a polymer-based paclitaxel-eluting *stent* with a bare metal *stent* in patients with complex coronary artery disease: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2005;294(10):1215-23.

Tabas I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat.Rev. Immunol.* 2010;10: 36-46.

Tian H, Cronstein BN. Understanding the mechanism of action of methotrexate. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 2007;65(3):168-73.

Verma S, Wang CH, Li SH. A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation.* 2002;106:913-9.

Virmani R, Burke A, Kolodgie F, Farb A. Vulnerable plaque: the pathology of unstable coronary lesions. *J Interv.Cardiol.* 2002;15:439-46.

Von der Thüsen J, Kuiper J, Van Berkel T, Biessen E. Interleukins in Atherosclerosis: molecular pathways and therapeutical potential. *Pharmacol Rev.* 2003;55:133-66.

Wei GL, Krasinski K, Kearney M, Isner JM, Walsh K, Andre's V. Temporally and spatially coordinated expression of cell cycle regulatory factors after angioplasty. *Circ Res*. 1997;80:418-26.

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

World Health Organization. The top 10 causes of death. Fact sheet n°310, updated on July 2013. Available from: [www.who.int/factsheets/fs310/en](http://www.who.int/factsheets/fs310/en).

Wu H, Moulton KS, Glass CK. Macrophage scavenger receptors and atherosclerosis. *Trends Cardiovasc. Med*. 1992;2:220-5.

Ylä-Herttua S, Luoma J, Kallionpää H, Laukkonen M, Lehtolainen P, Viita H. Pathogenesis of atherosclerosis. *Maturitas*. 1996;23:47-9.

Zhu Y, Bujo H, Ymazaki H, Hirayama S, Kanaki T, Takahashi K, Shibasaki M, Schneider W J, Saito Y. Enhanced expression of the LDL receptor family member LR11 increases migration of smooth muscle cells in vitro. *Circulation*. 2002;105(15):1830-6.