UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

TATIANA SOLANO VITÓRIO

# Efeito da combinação de sinvastatina com paclitaxel veiculado por nanoemulsão lipídica na aterosclerose induzida em coelhos

São Paulo
2013

TATIANA SOLANO VITÓRIO

# Efeito da combinação de sinvastatina com paclitaxel veiculado por nanoemulsão lipídica na aterosclerose induzida em coelhos

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

Área de Concentração: Análises Clínicas

Orientador: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão

São Paulo
2013

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

Vitório, Tatiana Solano
V845e Efeito da combinação de sinvastatina com paclitaxel veiculado por nanoemulsão lipídica na aterosclerose induzida em coelhos / Tatiana Solano Vitório. -- São Paulo, 2013.
101p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Maranhão, Raul Cavalcante

1. Aterosclerose 2. Agente antineoplásico : quimioterapia I. T. III. Maranhão, Raul Cavalcante, orientador.

616.136 CDD

VITÓRIO, Tatiana Solano. **Efeito da combinação de sinvastatina com paclitaxel veiculado por nanoemulsão lipídica na aterosclerose induzida em coelhos**. Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Análises Clínicas.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento:_____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento:_____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento:_____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento:_____

**DEDICATÓRIA**

*Ao César,*

*meu melhor amigo, meu companheiro,*

*que testemunha a minha vida,*

*que segue ao meu lado na jornada.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Raul Cavalcante Maranhão, pela confiança em mim depositada e por todos os valiosos ensinamentos.

A todos os funcionários e companheiros de pós-graduação do Laboratório de Metabolismo de Lípides, pelo suporte na realização deste trabalho, pela amizade e pelos happy hours, que certamente facilitaram o trajeto.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Análises Clínicas e da secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pelo suporte e atenção, e em especial, à Ana Maria Dias Dantas, pelo enorme auxílio durante todo o trabalho e pelos bate-papos durante minhas passagens pela USP.

Aos funcionários da Divisão Experimental do Instituto do Coração, pelo auxílio no trabalho com os animais.

À Professora Ligia Ferreira Gomes, por me receber de braços abertos no estágio do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino e por tudo o que aprendi durante o período em que trabalhamos juntas.

À Professora Primavera Borelli, pela disponibilidade e suporte, ao ceder a infraestrutura de seu laboratório para a realização das análises hematológicas, e ao Edson Makiyama, pelo suporte técnico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

À grande amiga Amanda Felippe Padoveze, companheira em todas as horas.

Ao meu irmão, Marcelo, pelas conversas e risadas ao telefone.

E aos meus pais, Elza e João Roberto, pelo amor e apoio incondicional.

*...“E aqueles que foram vistos dançando foram julgados insanos por aqueles que não podiam escutar a música”...*

*Friedrich Nietzsche*

# RESUMO

VITÓRIO, T. S. **Efeito da combinação de sinvastatina com paclitaxel veiculado por nanoemulsão lipídica na aterosclerose induzida em coelhos.** 2013. 101 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Em estudos prévios, mostramos que uma nanoemulsão lipídica (LDE) é reconhecida e se liga aos receptores de LDL após sua injeção 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 utilizada como veículo para direcionar fármacos a essas células, diminuindo sua toxicidade e aumentando sua eficácia terapêutica. Anteriormente, reportamos que o tratamento com um derivado do paclitaxel, o oleato de paclitaxel, associado à LDE (PTX-LDE), reduziu em 60% a área lesionada de aortas de coelhos submetidos à dieta aterogênica, comparados a animais não tratados. No presente trabalho, avaliamos o efeito da associação de sinvastatina, medicamento hipolipemiante, e PTX-LDE, sobre a aterosclerose induzida por dieta em coelhos. Trinta e seis coelhos machos da raça Nova Zelândia foram submetidos à dieta enriquecida com 1% de colesterol durante oito semanas. A partir da quinta semana, os animais foram divididos em quatro grupos, de acordo com o tratamento: controle (solução salina EV), sinvastatina (2mg/kg/dia, VO), paclitaxel (PTX-LDE, 4mg/Kg/semana, EV), ou combinação de sinvastatina (2mg/Kg/dia, VO) com paclitaxel (PTX-LDE, 4mg/Kg/semana, EV). Após oito semanas, os animais foram sacrificados para análise das aortas. Em comparação aos controles, a área lesionada das aortas foi em torno de 60% menor, tanto no grupo paclitaxel, quanto no grupo da combinação, e em torno de 40% menor no grupo sinvastatina ($p<0,05$). A razão entre as camadas íntima/média foi menor nos grupos tratados, em relação ao grupo controle (controles, 0,35±0,22, sinvastatina, 0,10±0,07, paclitaxel, 0,06±0,16 e combinação, 0,09±0,05, $p<0,0001$). Os grupos combinação e sinvastatina apresentaram um aumento da porcentagem de colágeno nas lesões (combinação, 20% e sinvastatina, 22%), em comparação aos controles (11%) e ao grupo paclitaxel (12%), ($p<0,0001$). Houve uma diminuição da porcentagem de macrófagos na lesão em todos os grupos tratados (paclitaxel, 11%, sinvastatina, 8% e combinação, 5%), comparados ao grupo controle (30%), ($p<0,0001$). O grupo paclitaxel apresentou menor porcentagem de células musculares lisas na lesão (20%) em relação aos controles (33%), ($p<0,0001$), já na combinação, houve aumento dessa porcentagem (44%), ($p<0,0001$). A combinação com sinvastatina não aumentou a eficácia do tratamento com PTX-LDE na redução da área de lesões ateroscleróticas, porém, os efeitos adicionais sobre o perfil lipídico e na composição das lesões, observadas com o uso da combinação, são achados importantes, que sugerem benefícios no sentido de aumentar a estabilidade das placas ateroscleróticas, o que nos abre um caminho de pesquisa muito promissor.

Palavras-chave: Aterosclerose, paclitaxel, sinvastatina, veiculação farmacológica, nanoemulsão lipídica.

## ABSTRACT

VITÓRIO, T. S. **Effect of a combination of simvastatin and paclitaxel carried by a lipid nanoemulsion on induced atherosclerosis in rabbits.** 2013. 101 p. Thesis (Ph.D.) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2013.

In previous studies we have shown that a lipid nanoemulsion (LDE) is recognized and binds to LDL receptors after injection into the bloodstream. As those receptors are upregulated in cells with higher proliferation rates, as occurs in cancer and atherosclerosis, LDE can be used as a vehicle to direct drugs to those cells, diminishing toxicity and increasing therapeutic efficacy. Previously, we reported that treatment with antiproliferative agent paclitaxel derivative, paclitaxel oleate, associated with LDE (PTX-LDE), reduced by 60% the injured area of the aorta of rabbits subjected to atherogenic diet compared to untreated animals. In the current study we aim to test the effect of a combination of lipid-lowering drug simvastatin with PTX-LDE on diet-induced atherosclerosis in rabbits. Thirty-six male New Zealand rabbits were fed a 1% cholesterol diet for 8 weeks. Starting from week 5, animals were divided into four groups, according to the following treatments: controls (I.V. saline solution injections), simvastatin P.O. (2mg/kg/day), paclitaxel (PTX-LDE I.V. injections, 4mg/Kg/week), or paclitaxel-simvastatin combination (PTX-LDE I.V., 4mg/Kg/week + simvastatin P.O., 2mg/Kg/day). After 8 weeks, the animals were sacrificed for aorta evaluation. Compared to controls, the injured area was reduced by 60% in both paclitaxel and combination groups, and by 40% in simvastatin group ($p<0,05$). The intima/media ratio was reduced in treated groups, compared to control group (controls, 0,35±0,22, simvastatin, 0,10±0,07, paclitaxel, 0,06±0,16 and combination, 0,09±0,05, $p<0,0001$). Simvastatin and combination groups showed increased collagen content within the lesions (simvastatin, 22% and combination 20%), compared to controls (11%) and to paclitaxel group (12%), ($p <0.0001$). Macrophage content within the lesions was reduced in all treated groups (paclitaxel, 11%, simvastatin, 8% e combination, 5%), compared to controls (30%), ($p <0.0001$). The percentage of smooth muscle cells in the lesions was diminished in paclitaxel group (20%) compared to control group (33%), while the combination group showed increased percentage (44%) of smooth muscle cells in the lesions ($p<0,0001$). The combination of simvastatin did not improve the efficacy of the treatment with PTX-LDE in reducing the area of atherosclerotic lesions, but the additional effects on lipid profile and lesion composition observed with the use of the combination are important findings that suggest benefits in order to enhance the stability of atherosclerotic plaques, which may lead us to a very promising research path.

Keywords: Atherosclerosis, paclitaxel, simvastatin, drug-targeting, lipid nanoemulsion.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALT – alanina aminotransferase

Apo – apolipoproteína

AST – aspartato aminotransferase

CD36 – grupamento de diferenciação 36

CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média

CT – colesterol total

DL50 – dose letal

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

E-selectina – selectina de células endoteliais

FPP – farnesilpirofosfato

GC – grupo controle

GP – grupo paclitaxel

GPP – granilpirofosfato

GS – grupo sinvastatina

GSP – grupo sinvastatina + paclitaxel

HCM – hemoglobina corpuscular média

HCT – hematócrito

HDL – lipoproteína de ata densidade

HDL-C – colesterol de lipoproteína de alta densidade

HE – hematoxilina-eosina

HGB – hemoglobina

HIV – vírus da imunodeficiência humana

HMG-CoA – 3-hidroxi-3-metil-glutaril-Coenzima A

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência

ICAM-1 – molécula de adesão intracelular-1

IL-1 – Interleucina-1

IL-6 – Interleucina-6

LDE–nanoemulsão lipídica artificial

LDL – lipoproteína de baixa densidade

LDL-C – colesterol de lipoproteína de baixa densidade

LDL-r – receptor de lipoproteína de baixa densidade

LOX-1 – receptor de lipoproteína de baixa densidade oxidada-1

MCP-1 – proteína de quimiotaxia de macrófagos-1

NF-Kb – fator de transcrição nuclear *kappa* B

n-HDL-C – colesterol não-lipoproteína de alta densidade

oxLDL – lipoproteína de baixa densidade oxidada

P-selectina – selectina de plaquetas

PTX – paclitaxel

TG – triglicérides

TNF-α – fator de necrose tumoral-α

VCAM-1 – molécula de adesão de células vasculares-1

VCM – volume corpuscular médio

VLDL – lipoproteína de densidade muito baixa

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1 –** Macroscopia da aorta dos animais dos grupos controle, sinvastatina, paclitaxel e sinvastatina + paclitaxel, representando as lesões encontradas em cada grupo estudado..... 57

**Figura 2 –** Fotomicrografias de cortes do arco aórtico dos animais dos grupos controle, sinvastatina, paclitaxel e sinvastatina + paclitaxel, para a medição de área e espessura de placa. Coloração por H/E..... 58

**Figura 3 –** Fotomicrografias de cortes do arco aórtico dos animais dos grupos controle, sinvastatina, paclitaxel e sinvastatina + paclitaxel. Coloração por tricrômico de Masson..... 60

**Figura 4 –** Fotomicrografias de cortes do arco aórtico dos animais dos grupos controle, sinvastatina, paclitaxel e sinvastatina + paclitaxel. Coloração por imunohistoquímica (anticorpo anti-RAM-11), evidenciando macrófagos..... 62

**Figura 5 –** Fotomicrografias de cortes do arco aórtico dos animais dos grupos controle, sinvastatina, paclitaxel e sinvastatina + paclitaxel. Coloração por imunohistoquímica (anticorpo anti-α-actina), evidenciando células musculares lisas..... 63

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1 –** Hemograma dos animais, determinado antes do início e ao término do tratamento..... 51

**Tabela 2 –** Perfil lipídico dos animais, determinado antes do início da dieta (basal), antes do início do tratamento e ao término do tratamento..... 54

**Tabela 3 –** Parâmetros bioquímicos de função hepática e renal dos animais, determinado antes do início da dieta (basal), antes do início do tratamento e após o término do tratamento..... 56

**Tabela 4 –** Quantificação por morfometria macroscópica da área total e da área com lesões ateroscleróticas das aortas dos animais..... 57

**Tabela 5 –** Quantificação por morfometria microscópica da área das camadas íntima e média dos arcos aórticos dos animais..... 59

**Tabela 6 –** Porcentagem de células musculares lisas, macrófagos e colágeno na camada íntima do arco aórtico dos animais..... 61

## LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfico 1 –** Consumo de ração dos animais dos grupos controle, sinvastatina, paclitaxel, e sinvastatina + paclitaxel, durante as semanas de tratamento..... 50

**Gráfico 2 –** Peso corporal dos animais dos grupos controle, sinvastatina, paclitaxel, e sinvastatina + paclitaxel, durante as semanas de tratamento..... 50

**SUMÁRIO**


**1 INTRODUÇÃO..... 18**

1.1 Aterosclerose..... 19

1.2 Estatinas..... 22

1.3 Paclitaxel..... 26

1.4 Nanopartículas lipídicas artificiais como transportadoras de fármacos.. 28

1.5 Preparações LDE-quimioterápicos no tratamento da aterosclerose..... 32

**2 JUSTIFICATIVA..... 35**

**3 OBJETIVO..... 38**

**4 MATERIAL E MÉTODOS..... 40**

4.1 Preparo da LDE..... 41

4.2 Incorporação do PTX à LDE..... 41

4.3 Animais utilizados no estudo..... 42

4.4 Preparo da dieta rica em colesterol..... 42

4.5 Protocolo experimental..... 43

4.6 Avaliação do consumo de ração e do peso corporal..... 43

4.7 Avaliação do perfil hematológico..... 44

4.8 Avaliação do perfil lipídico..... 44

4.9 Avaliação bioquímica da função hepática e renal..... 45

4.10 Análise macroscópica das aortas..... 45

4.11 Análise microscópica dos arcos aórticos..... 46

4.12 Análise estatística..... 46

**5 RESULTADOS..... 48**

5.1 Avaliação do consumo de ração e do peso corporal..... 49

5.2 Avaliação do perfil hematológico..... 51

5.3 Avaliação do perfil lipídico..... 53

5.4 Avaliação bioquímica da função hepática e renal..... 55

5.5 Análise macroscópica das aortas..... 55

5.6 Análise microscópica dos arcos aórticos..... 58

**6 DISCUSSÃO..... 64**

**7 CONCLUSÃO..... 74**

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 76**

**ANEXOS..... 100**

# 1 INTRODUÇÃO

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Aterosclerose

A aterosclerose é uma doença progressiva caracterizada pelo espessamento e acúmulo de lipídeos, células inflamatórias e elementos fibrosos na camada íntima das artérias, principalmente as de calibre médio e grande, produzindo placas ateromatosas (YLÄ-HERTTUALA *et al.*, 1996; LUSIS; MAR; PAJUKANTA, 2004). Estas, também denominadas fibrogordurosas, são formadas de uma placa focal elevada no interior da íntima com centro lipídico, principalmente colesterol e ésteres de colesterol, que se projeta na luz das artérias (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000; ZIPES, 2005). Múltiplos processos estão envolvidos na fisiopatologia da aterosclerose, incluindo disfunção endotelial, inflamação, proliferação vascular e alterações da matriz (DZAU; BRAUN-DULLAEUS; SEDDING, 2002).

Diversos fatores, como hipertensão arterial, *diabetes melittus*, tabagismo e hipercolesterolemia podem alterar a homeostase do endotélio vascular, prejudicando suas funções na vasoconstrição, na coagulação e aumentando a permeabilidade vascular (EATON, 2005). Tal comprometimento funcional do endotélio facilita a penetração no espaço subendotelial de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) pequenas e densas e remanescentes de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) (HOMMA, 2004).

Quando elevadas na circulação, estas lipoproteínas se ligam a proteoglicanos, aumentam seu tempo de retenção na íntima arterial e podem sofrer oxidação por

radicais livres produzidos por células endoteliais adjacentes, células musculares lisas ou macrófagos isolados (ZIPES, 2005; CHOY, 2004). A retenção e modificação destas lipoproteínas são eventos iniciais do processo aterogênico que desencadeiam a resposta inflamatória na parede arterial (WILLIAMS; TABAS, 1995; STAELS, 2002). O processo inflamatório em si também prejudica a função de barreira do endotélio, aumentando a permeabilidade vascular (VAN NIEUW AMERONGEN; VAN HINSBERGH, 2003).

As partículas de LDL oxidadas (oxLDL), altamente aterogênicas, estimulam as células endoteliais a expressar moléculas de adesão, como *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1*), intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) e selectina de células endoteliais (E-selectina) e a secretar citocinas, como as interleucinas 1 e 6 e (IL-1 e IL-6, respectivamente), fator de necrose tumoral-$\alpha$ (TNF-$\alpha$) e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), desencadeando a migração de monócitos aos sítios de lesão e sua transformação em macrófagos (CHOY, 2004; BERLINER, 1990; LIBBY; THEROUX, 2005). Os macrófagos ativados fagocitam as oxLDL por meio dos receptores de varredura (*scavenger*) expressos em sua superfície, formando as células espumosas (YLÄ-HERTTUALA *et al*., 1989; WU; MOULTON; GLASS, 1992; GLASS; WITZTUM, 2001; STOCKER; KEANEY JUNIOR, 2004).

Como consequência da resposta inflamatória, as células musculares lisas migram da camada média e se acumulam na íntima, onde proliferam. Estas células também são capazes de acumular lipídeos, principalmente ésteres de colesterol, provavelmente pela presença de receptores de oxLDL (CD36 e *lectinlike Ox-LDL receptor 1*, LOX-1) (KATAOKA *et al*., 1999; RICCIARELLI; ZINGG; AZZI, 2000),

ocorrendo assim a formação de mais células espumosas (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

Em conjunto com células endoteliais e monócitos, as células musculares lisas, em resposta a diversos sinais oxidativos, hemodinâmicos, inflamatórios e autoimunes, secretam metaloproteinases, que degradam a matriz extracelular e modulam diversas funções das células vasculares como ativação, proliferação, migração e morte celular (LIBBY; THEROUX, 2005).

Enquanto os fatores que estimulem a disfunção endotelial persistirem, haverá adesão de monócitos, migração subendotelial de células musculares lisas e acúmulo de lipídeos no interior dos macrófagos e das células musculares lisas, produzindo finalmente agregados de células espumosas na íntima, que aparecem macroscopicamente como estrias gordurosas (GLASS; WITZTUM, 2001; STOCKEY; KEANEY JUNIOR, 2004).

A proliferação das células musculares lisas e a deposição de matriz extracelular são processos que quando crônicos, transformam a estria gordurosa em ateroma fibrogorduroso, pela deposição adicional de colágeno e proteoglicanos, além da formação da cápsula fibrosa pelo tecido conjuntivo proeminente na face da íntima.

A profileração celular contínua sobre os ateromas produz então as placas fibrosas (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000; PLUTZKY, 2003), que quando comprometidas por trombose, hemorragia e/ou calcificação, desencadeiam eventos clínicos agudos, como isquemia cardíaca e infarto do miocárdio, decorrentes da oclusão arterial.

A proliferação vascular contribui com a fisiopatologia da aterosclerose e está relacionada a outros processos celulares, como inflamação, apoptose e alterações da

matriz (DZAU; BRAUN-DULLAEUS; SEDDING, 2002). Alguns procedimentos utilizados para tratar a redução do lúmen vascular, como a angioplastia com balão e o implante de *stents*, podem desencadear a proliferação de células musculares lisas no local por lesão mecânica, o que inicia uma cascata de eventos, levando à reestenose (KADAR; GLASZ, 2001).

Desse modo, o melhor conhecimento do mecanismo das doenças vasculares tem possibilitado o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento que podem inibir ou bloquear os processos patológicos da proliferação vascular. O interesse na terapia antiproliferativa levou a uma busca pela inibição de fases específicas do ciclo celular, que pode ser alcançada por meio de agentes farmacológicos que bloqueiam a proliferação celular (DZAU; BRAUN-DULLAEUS; SEDDING, 2002).

## 1.2 Estatinas

As estatinas constituem uma notável classe de medicamentos redutores de colesterol e têm sido associadas com uma expressiva diminuição da morbidade e mortalidade cardiovascular para pacientes em prevenção primária ou secundária da doença coronariana (BALLANTYNE, 1998).

As estatinas são agentes hipolipemiantes que exercem os seus efeitos por meio da inibição da 3-hidroxi-3-metil-glutaril-Coenzima A redutase, (HMG-CoA redutase), enzima fundamental na síntese do colesterol, levando a uma redução do colesterol tecidual e um consequente aumento na expressão dos receptores de LDL (LDL-r) (VAUGHAN; GOTTO; BASSON, 2000). O mecanismo de ação das estatinas para obtenção da redução do colesterol se deve a inibição da HMG-CoA redutase por meio

da afinidade destes fármacos com o sítio ativo da enzima. Esta inibição é reversível e competitiva com o substrato HMG-CoA (McTAGGART, 2003).

Existem consideráveis diferenças entre as estatinas, no que tange às propriedades farmacocinéticas, bem como ao coeficiente de hidrofilicidade, via hepática de metabolização (especialmente, do citocromo P450 e isoenzimas), meia-vida plasmática e eficácia na redução lipídica (FONSECA, 2005). As estatinas também podem diferir na capacidade de interação com outras drogas que utilizam o mesmo sítio de metabolização microssomal hepático (STAFFA; CHANG; GREEN, 2002). Porém, apesar das potenciais interações entre as estatinas e alguns fármacos de uso rotineiro na prática clínica, efeitos adversos são relativamente raros tanto em nível hepático como muscular. (FONSECA, 2005).

Funcionalmente, as estatinas podem ser classificadas pela sua hidrofilicidade ou lipofilicidade, o que as distingue em grupos capazes de reduzir eventos cardíacos independentemente de suas atividades hipolipemiantes e antiateroscleróticas (ICHIHARA; SATOH, 2002).

Existem diferenças na habilidade de células extra-hepáticas de reconhecer e transportar seletivamente estatinas distintas. Estatinas hidrofílicas, como a pravastatina, não penetram nas bicamadas lipídicas, entrando nos hepatócitos via transportadores aniônicos (ISTVAN *et al.*, 2001; PARKER, 2003). Em contraste, estatinas lipofílicas como a lovastatina, sinvastatina e fluvastatina atravessam diretamente as membranas celulares e apresentam efeitos pleiotrópicos em tecidos extra-hepáticos, além de seus efeitos de redução de colesterol (ICHIHARA *et al.*, 2002), sendo portanto amplamente utilizadas por uma gama de tecidos e células por difusão passiva (SERAJUDDIN; RANADIVE; MAHONEY, 1991; HAMELIN; TURGEON, 1998).

Embora as estatinas sejam amplamente utilizadas na aterosclerose para a redução do colesterol, muitos desses efeitos pleiotrópicos têm sido relatados com o uso destas drogas. Do ponto de vista farmacodinâmico, as estatinas são bastante seletivas para sua atuação junto à enzima HMG-CoA redutase e vários dos efeitos pleiotrópicos destes fármacos parecem depender de uma menor ativação de algumas proteínas que interferem em várias e importantes vias de sinalização celular. Estas vias são relacionadas a genes que condicionam a síntese de citocinas inflamatórias, fatores de coagulação, ou a maior expressão de óxido nítrico (FONSECA, 2005).

Desta forma, as estatinas, ao inibirem à enzima HMG-CoA redutase, inibem também a síntese de mevalonato, um precursor importante de produtos como o geranilpirofosfato (GPP) e o farnesilpirofosfato (FPP), que atuam na regulação do ciclo celular e são responsáveis pela isoprenilação das proteínas intracelulares Ras e Rho. A redução de mevalonato, portanto, determina menor ativação destas proteínas, promovendo efeitos anti-inflamatórios, melhor balanço da hemostasia e recuperação da vasorreatividade dependente do endotélio (McFARLANE, 2002). As proteínas intracelulares Ras e Rho também regulam a tradução de diversos receptores de membrana responsáveis pela transcrição de genes envolvidos na proliferação celular, diferenciação e apoptose.

Estudos anteriores mostraram que várias das estatinas lipofílicas podem induzir a apoptose em células musculares lisas (GUIJARRO *et al.*, 1998) ou ativação de células T através do receptor de células T (GOLDMAN *et al.*, 1996). Em baixas concentrações, apenas as estatinas lipofílicas demostraram ter efeito sobre apoptose e viabilidade celular, sendo que o efeito obtido com o uso de sinvastatina foi o mais potente de todos.

Assim, em pontos de estenose com processo de inflamação local, a diminuição no número de células musculares lisas pode ter efeito benéfico (KNAPP *et al.*, 2000).

Em estudos anteriores de tratamento da aterosclerose induzida em coelhos, o uso de estatina resultou em lesões ateroscleróticas menos graves e inibiu a infiltração de macrófagos, reduzindo o componente inflamatório na neoíntima. O estudo também reportou que o uso de estatina diminuiu a expressão de MCP-1 e a atividade do fator nuclear de transcrição-*kappa* B (NF-kB), sugerindo o efeito direto da droga sobre a placa ateromatosa (BUSTOS, 1998).

As estatinas também demonstraram ter um efeito na diminuição de oxLDL circulante (INAMI *et al.*, 2004; INOUE *et al.*, 2002; VAN TITS *et al.*, 2004), possivelmente pelo aumento da atividade da paraoxonase (TOMÁS *et al.*, 2000). A oxLDL, fator iniciante da aterogênese, possui numerosos efeitos biológicos desfavoráveis, como a indução da disfunção endotelial, ativação da adesão endotelial, diferenciação e adesão de monócitos e a proliferação de células musculares lisas (KUGIYAMA *et al.*, 1990; FROSTEGARD *et al.*, 1991; FROSTEGARD *et al.*, 1990; KOBA *et al.*, 2000), e há diversas evidências de que o aumento de peroxidação de lípides e do stress oxidativo estão relacionados com a hipercolesterolemia (OHARA *et al.*, 1995; REILLY *et al.*, 1998).

As ações imunomodulatórias na inflamação, a mobilização de células tronco, a diminuição da resistência à insulina, entre outras ações, têm ampliado consideravelmente as prescrições para estes fármacos, como no caso da insuficiência cardíaca (LIAO, 2004), nos transplantes (MEHRA; RAVAL, 2004) ou na artrite reumatóide (LEUNG *et al.*, 2003).

Além disso, cresce o conceito de que praticamente todos os clássicos fatores de risco podem ter seu impacto na doença aterosclerótica atenuado pelo uso das estatinas, como tem sido mostrado em estudos de hipertensão arterial (SEVER *et al.*, 2003) ou diabetes (COLHOUN *et al.*, 2004), além do uso de estatinas em outras condições, como em indivíduos portadores do vírus HIV em uso de antirretrovirais (DEL REAL *et al.,* 2004) ou em indivíduos com osteoporose (McFARLANE *et al.*, 2003).

Entretanto, a questão que permaneceu após todos estes estudos é a de que apesar dos benefícios, um considerável resíduo de morbidade e mortalidade ainda foi observado. A necessidade de metas mais agressivas de redução do colesterol de LDL (LDL-C) determina a utilização de fármacos mais efetivos (FONSECA, 2005).

### 1.3 Paclitaxel

Paclitaxel (PTX) é o fármaco precursor de uma classe de agentes estabilizantes de microtúbulos, os taxanos. (ROWINSKY *et al.*, 1990). No começo dos anos 70, o PTX foi isolado por Wani e colaboradores a partir do extrato da casca do teixo do Pacífico, chamado *Taxus brevifolia* (WANI *et al*., 1971). O PTX age nos microtúbulos, e diferentemente de outros agentes que estabilizam microtúbulos, tais como os alcaloides da vinca, o PTX promove a polimerização da tubulina (SCHIFF; FANT; HORWITZ, 1979). Dessa forma, os microtúbulos formados pela indução do PTX são estáveis e disfuncionais, o que leva a um desequilíbrio entre a formação de microtúbulos e sua dissociação em tubulina (PARNESS; HORWITZ, 1981).

Os microtúbulos têm como principal função promover a divisão celular durante a mitose, e sua disfunção compromete as fases G2 (intervalo pré-mitótico) e M (mitose),

bloqueando a divisão e, consequentemente, a proliferação celular (HORWITZ, 1992; HORWITZ *et al.*, 1993). Além disso, os microtúbulos também estão envolvidos em outras funções essenciais à célula, como funções de interface, excreção, mobilidade e transmissão de sinais no transporte intracelular de organelas (PATTERSON, 2006).

Por sua atividade citotóxica, o PTX tem sido utilizado no tratamento de câncer de ovário e mama (PAZDUR *et al*., 1993; DZAU; BRAUN-DULLAEUS; SEDDING, 2002). O mecanismo preciso pelo qual o PTX é transportado para o interior das células é desconhecido. Supõe-se que devido à sua natureza hidrofóbica, o PTX possa entrar na célula por difusão passiva (MANFREDI *et al*., 1984; RODRIGUES, 2005).

Um dos problemas iniciais encontrados no uso do PTX estava relacionado com sua fraca solubilidade em água, o que dificultava o desenvolvimento de uma formulação para seu uso clínico (HORWITZ, 1992). O problema de solubilidade foi resolvido, com a formulação do PTX em cremophor EL. Porém, a utilização do cremophor EL como veículo trouxeram efeitos secundários indesejados, como reações de hipersensibilidade (KINGSTON, 2001).

Brahn foi o primeiro a reportar, em 1994, que o PTX não só preveniu a indução, mas causou a regressão de artrite pré-existente em um modelo de artrite induzida em ratos (BRAHN; TANG; BANQUERIGO, 1994). O PTX tem sido avaliado em outros diversos modelos animais de patologias. O agente inibiu a progressão de doença policística renal congênita em camundongos, teve efeito protetor em modelos de pancreatite em ratos e inibiu o acúmulo de células musculares lisas após angioplastia em ratos.

Esta última observação foi adaptada e hoje, o PTX tem sido utilizado para recobrir *stents* utilizados em angioplastia para evitar a reestenose (FITZPATRICK;

WHEELER, 2003). Essa técnica permite um contato imediato do fármaco com a parede do vaso, favorecendo sua rápida acumulação no tecido arterial (HELDMAN *et al*., 2001). Entretanto, os *stents* eluídos com fármacos, apesar de prevenir a reestenose, não reduzem as taxas de mortalidade dos pacientes (STONE *et al*., 2005).

A ação local do PTX poderia ser substituída por uma ação em toda a árvore coronária. Contudo, para se alcançar as concentrações necessárias para a eficácia terapêutica no tratamento sistêmico, a dose deve ser maior que a dose para ação local, o que leva ao aumento da toxicidade (ONETTO *et al*., 1993). A neutropenia é a principal manifestação da toxicidade do PTX, além das reações de hipersensibilidade associadas ao cremophor EL (WEISS *et al*., 1990; ROWINSKY *et al*.,1993), como por exemplo, toxicidade gastrointestinal, que leva à perda de peso (PAZDUR *et al*., 1993).

O veículo também tem influência na função do endotélio e músculos, causando vasodilatação, dificuldade respiratória, letargia e hipotensão (WEISS *et al*., 1990; ROWINSKY *et al*., 1990; PAZDUR *et al*., 1993).

### 1.4 Nanopartículas lipídicas artificiais como transportadoras de fármacos

A LDL é o principal carreador de colesterol no plasma. A apolipoproteína (apo) B-100 constitui a parte proteica da LDL e é o componente que liga as partículas da LDL a seus receptores específicos, os LDL-r, situados na superfície da membrana plasmática celular (BROWN; GOLDSTEIN, 1986). O LDL-r está sujeito à regulação retroativa (*feedback*) e sua regulação é o principal fator para o controle da concentração plasmática de LDL (BROWN; GOLDSTEIN, 1990).

A expressão dos LDL-r se apresenta muito aumentada em células com altas taxas de mitose, como ocorre em processos neoplásicos. Ho e colaboradores observaram um aumento na atividade dos LDL-r em células leucêmicas do sangue periférico de pacientes com leucemia mielocítica aguda, em relação às células mononucleares de indivíduos sadios (HO *et al*., 1978).

Em outro estudo, Gal e colaboradores demonstraram que células de linhagens neoplásicas (carcinoma epidermoidal vaginal, carcinoma epidermoidal cervical e adenocarcinoma endometrial) expressam cerca de 15 a 30 vezes mais LDL-r do que as células de linhagens normais (células fibroblásticas cervicais e células epiteliais de glândula endometrial proliferativa) (GAL *et al*., 1981).

A superexpressão de LDL-r é decorrente da aceleração da mitose nas células neoplásicas, o que demanda lípides para atender à síntese de novas membranas, exigida pela duplicação celular. Esse fenômeno propiciou a busca por uma estratégia de direcionamento específico de fármacos a tecidos acometidos, concentrando os fármacos no sítio de ação (*drug-targeting*) e diminuindo sua captação por órgãos e tecidos normais, por meio da interação da LDL com seus receptores (FIRESTONE, 1994).

Essa possibilidade está baseada no fato de que a LDL é capaz de transportar grandes quantidades de componentes lipofílicos que podem ter efeitos citotóxicos, sendo internalizada pelos LDL-r superexpressos. Consequentemente, há uma maior concentração do fármaco incorporado nas células alvo e uma diminuição da toxicidade celular não específica (MOSLEY *et al*., 1981).

Porém, a utilização da LDL natural fica restrita às experiências laboratoriais, pois sua obtenção a partir do plasma humano e os procedimentos de incorporação dos

fármacos e armazenamento dos complexos inviabilizam sua utilização na prática clínica (RENSEN *et.al.*, 1997). Além disso, por ser um hemoderivado, pode provocar respostas imunológicas e contaminação por vírus da hepatite ou do HIV. Portanto, apesar dos progressos, em 2013 ainda são escassos os produtos em uso comercial com propriedades de *drug-targeting*.

Outros transportadores têm sido desenvolvidos e testados, tais como transportadores poliméricos, anticorpos, emulsões, lipossomas e lipossomas carregados positivamente (MARANHÃO; TERCYAK; REDGRAVE, 1986; LUNDBERG, 1994; KAN *et al*., 1999; JURCIC; SCHEINBERG; HOUGHTON, 1996; TYAGI *et al*., 1999; SENGUPTA *et al*., 2000; BELLOT; POUNA; ROBERT, 2001).

Em artigos publicados por nosso grupo a partir de 1992, mostramos que, dependendo da estrutura e composição das partículas, nanoemulsões lipídicas produzidas artificialmente podem concentrar-se nas células neoplásicas e com isso carrear quimioterápicos dirigidos àquelas células. Tratou-se de descoberta pioneira na área de Nanotecnologia aplicada à Medicina, já que foi a primeira vez que se demonstrou o direcionamento de partículas sólidas artificiais, não liposomais, para o sítio de ação (MARANHÃO *et al*., 1992).

As nanoemulsões são produzidas sem proteína, porém a estrutura e a composição lipídica das nanopartículas, de uma maneira geral, são parecidas com as da LDL. Isto permite que, em contato com a corrente circulatória, adquiram a apo E presente nas lipoproteínas plasmáticas. A apo E é reconhecida pelos LDL-r, e isto permite que a nanoemulsão seja captada pelas células pelo mesmo processo de captação da LDL, a endocitose medida pelo LDL-r (MARANHÃO *et al.*, 1993; 1997). Desta maneira, referimo-nos às nanoemulsões como “LDE”.

Estudos realizados em pacientes com câncer de ovário e mama mostraram que a LDE se concentra nos tecidos neoplásicos. As células de câncer de ovário, por exemplo, tiveram uma captação em média 10 vezes maior da LDE em relação ao tecido normal enquanto que, em carcinoma de mama, a captação tumoral foi, em média, 4,5 vezes maior em relação ao tecido mamário normal (ADES *et al*., 2001; GRAZIANI *et al*., 2002). Estes experimentos comprovaram a capacidade do veículo de direcionamento para o tecido proliferativo.

De fato, ao se associarem fármacos de ação terapêutica à LDE, após injeção na corrente circulatória, os fármacos são captados junto com as nanopartículas e concentram-se assim no tecido-alvo, os tumores malignos. Em cultura celular (RODRIGUES *et al.*, 2002; VALDUGA *et al.*, 2003), e em estudos de farmacocinética em animais (RODRIGUES *et al.*, 2005) e em pacientes (MARANHÃO *et al.*, 2002), mostrou-se que as diversas preparações LDE-quimioterápicos eram estáveis, sendo que os fármacos transportados pela LDE não se dissociam dela na circulação, permanecendo nas nanopartículas até sua entrada nas células, o que é fundamental para obtenção do efeito *drug-targeting*.

Até o momento, desenvolvemos cinco formulações de quimioterápicos associados à LDE: carmustina (MARANHÃO *et al.*, 2002) e derivados de paclitaxel (RODRIGUES *et al.*, 2002; 2005), etoposídeo (VALDUGA *et al.*, 2003), metotrexato (MOURA *et al.*, 2011) e daunorrubicina (TEIXEIRA *et al.*, 2008). A necessidade de derivatizar os quatro últimos quimioterápicos para associá-los à LDE visou aumentar sua lipofilicidade e, assim, o rendimento da associação, e obter associações estáveis. No caso, trata-se de adicionar um ácido graxo à estrutura molecular do fármaco. Quando o quimioterápico modificado, transportado na LDE penetra na célula, esterases

citoplasmáticas quebram a ligação com o ácido graxo e a molécula readquire sua ação farmacológica.

A experimentação *in vitro* mostrou, com base nos parâmetros clássicos de Farmacologia, como o cálculo das doses letais (DL50), que este processo de veiculação reduz drasticamente a toxicidade dos quimioterápicos (DORLHIAC-LLACER *et al*., 2001; VALDUGA, 2003). Por exemplo, a DL50 do LDE-paclitaxel foi 10 vezes maior que a DL50 do paclitaxel comercial, o que confirma a enorme redução de toxicidade (RODRIGUES *et al.*, 2002). Na experimentação animal com modelos oncológicos mostrou-se também que a associação com a LDE aumenta a ação terapêutica dos fármacos, sendo capazes de inibir o crescimento tumoral em camundongo mais eficientemente que as preparações comerciais correspondentes (RODRIGUES *et al.*, 2005; LO PRETE *et al.*, 2006), além de aumentar o tempo de sobrevida dos animais com implantação de tumor (LO PRETE *et al.*, 2006) e reduzir acentuadamente as metástases (KRETZER *et al.*, 2012).

### 1.5 Preparações LDE-quimioterápicos no tratamento da aterosclerose

A LDE também tem sido utilizada como uma ferramenta no estudo na área de Cardiologia. Em um estudo em portadores de hipercolesterolemia, onde há diminuição da atividade dos receptores B/E, resultando na captação deficiente de LDL e seu acúmulo no plasma (RIDKER *et al*., 2001), a LDE foi removida da circulação mais lentamente do que em indivíduos normolipidêmicos, confirmando o comportamento esperado (MARANHÃO *et al*., 1997).

Quando injetada em pacientes com doença coronária submetidos à cirurgia de revascularização, foi verificado que quantidades consideráveis da LDE foram captadas pelo tecido arterial desprezado durante o procedimento (DAVID-COUTO *et al*., 2007).

O fenômeno de superexpressão de LDL-r também ocorre em células envolvidas em processos proliferativos não-neoplásicos como o processo de aterogênese. Zhu e colaboradores observaram uma superexpressão de LDL-r na superfície celular de células de músculo liso vascular localizadas na íntima hiperplásica de lesões ateroscleróticas (ZHU *et al*., 2002). De fato, em 2004, reportamos que a LDE também pode ser captada mais intensamente por tecidos não neoplásicos, mas em proliferação rápida, como acontece em pacientes com talassemia *minor* (NAOUM *et al.*, 2004).

A partir dos trabalhos de Ross (ROSS, 1999) que levaram à concepção fisiopatológica atual da doença (LIBBY *et al.*, 2010), a aterosclerose é basicamente um processo inflamatório-proliferativo crônico. Apesar do esforço no desenvolvimento de drogas anti-inflamatórias para uso em Cardiologia (CHARO; TAUB, 2011), o tratamento médico atual das doenças cardiovasculares é restrito ao controle dos fatores de risco, ou seja, a administração de estatinas, anticoagulantes, antiagregantes e anti-hipertensivos.

Como os medicamentos usados no tratamento contra o câncer são os mais potentes antiproliferativos e anti-inflamatórios no arsenal da Terapêutica, levantamos a hipótese do seu uso, veiculado na LDE, no tratamento da aterosclerose. Esta abertura tornou-se possível porque a associação com a LDE neutraliza a toxicidade dos quimioterápicos. Assim, a estratégia torna-se perfeitamente viável, com o novo grau de tolerabilidade dessas drogas proporcionado pelo sistema LDE.

Com base nestas informações, em 2008, injetamos a LDE radioativa em coelhos com aterosclerose induzida pela administração de dieta rica em colesterol e verificamos que as nanopartículas se concentravam nas lesões ateroscleróticas. Além disso, foi demonstrado que a LDE concentrou-se no arco aórtico dos coelhos que receberam a dieta enriquecida com colesterol (MARANHÃO *et al.*, 2008).

O tratamento com a preparação do derivado de paclitaxel, o oleato de paclitaxel, veiculado pela LDE (PTX-LDE), reduziu em cerca de 60% a área lesionada da aorta dos coelhos com aterosclerose induzida por dieta, em comparação aos coelhos controles não tratados (MARANHÃO *et al.*, 2008). Além do PTX-LDE, conseguimos bons resultados também com o uso de LDE-etoposídeo (TAVARES *et al.*, 2011) e LDE-metotrexato (BULGARELLI *et al.*, 2013). Além do efeito inibitório das drogas sobre fatores pró-inflamatórios, a invasão macrofágica da íntima e a proliferação das células musculares lisas também foram inibidas pelos tratamentos. Estes achados abriram uma nova frente de aplicações para a LDE (MARANHÃO *et al.*, 2008).

# 2 JUSTIFICATIVA

## 2 JUSTIFICATIVA

Até os dias atuais, afora as técnicas invasivas, o progresso na exploração de estratégias para o tratamento da aterosclerose que levaram à maior sobrevida e diminuição de eventos mórbidos foram todos resultantes de intervenções nos fatores de risco da doença. Neste sentido, destaca-se o amplo uso das estatinas na clínica (BALLANTYNE, 1998).

Além de seu efeito hipolipemiante, outros efeitos têm sido relatados com o uso das estatinas (FONSECA, 2005). Esses efeitos, chamados de pleiotrópicos, são considerados importantes na estabilização da placa aterosclerótica (JORGE, P.A. *et al.*, 2005). Entretanto, o tratamento com estatinas ainda parece ser insuficiente para prevenir a progressão da aterosclerose (RODRIGUEZA *et al*., 1998).

A rápida estabilização e regressão da aterosclerose encontram dificuldades muitas vezes nos efeitos colaterais observados ou mesmo em modos inconvenientes de administração. Portanto, os progressos ficaram restritos a um melhor controle dos fatores de risco e não existe até agora terapêutica medicamentosa eficaz voltada para o processo proliferativo-inflamatório da patologia de base.

Assim, a redução da toxicidade e a marcante atividade anti-inflamatória e antiproliferativa observada com a utilização da LDE como veículo no direcionamento de drogas, como o paclitaxel, para a lesão aterosclerótica fundamenta sua aplicação no tratamento de doenças cardiovasculares.

Diante disso, neste trabalho abrimos caminho para o uso da nanoemulsão associada ao agente quimioterápico paclitaxel na terapia combinada com

sinvastatina, buscando regredir o componente inflamatório e o processo de aterosclerose global.

# 3 OBJETIVO

## 3 OBJETIVO

Verificar se o uso de sinvastatina tem efeito sobre a regressão da aterosclerose alcançada com o uso de paclitaxel associado a uma nanoemulsão lipídica, em coelhos com aterosclerose induzida por dieta, avaliar o efeito dos tratamentos na composição das lesões, em relação ao conteúdo de colágeno, macrófagos e células musculares lisas, assim como avaliar a toxicidade dos tratamentos.

# 4 MATERIAL E MÉTODOS

# 4 MATERIAL E MÉTODOS

## 4.1 Preparo da LDE

A LDE foi preparada segundo a técnica descrita por Ginsburg (GINSBURG; SMALL; ATKINSON, 1982) e modificada por Maranhão (MARANHÃO *et al*., 1993). 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 dissecador a vácuo, por 16 horas a 4 ºC para remoção dos solventes residuais. Após a adição de 10 mL de solução tris HCl 0,01 M, pH 8,05, a mistura de lipídios foi sonicada por 3 h. A emulsão foi então 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 é a LDE. Finalmente, o excesso de brometo de potássio foi removido por meio de diálise e a LDE então foi esterilizada utilizando-se filtros de 0,22 µm de diâmetro e armazenada em frascos estéreis a 4 ºC por até 30 dias.

## 4.2 Incorporação do PTX à LDE

O PTX foi modificado, pela ligação de ácidos graxos à sua molécula, em um derivado mais lipofílico, o oleato de paclitaxel, como descrito anteriormente (RODRIGUES *et al.*, 2005). O oleato de paclitaxel obtido foi incorporado à LDE numa razão 5:1 em massa de lipídios:fármaco. O fármaco foi dissolvido em 300µL de etanol e misturado com 3,0 mL de LDE. A incorporação foi realizada utilizando-se

irradiação ultrassônica por 40 minutos a 55ºC em banho de água/gelo. A taxa de associação foi determinada pela diálise do fármaco incorporado à LDE, com quantificação do derivado que atravessou a membrana, por HPLC (High-Pressure Liquid Chromatography). As preparações foram realizadas no mesmo dia dos experimentos e esterilizadas em filtro Millipore 0,22µm.

### 4.3 Animais utilizados no estudo

Foram utilizados 36 coelhos machos da raça Nova Zelândia brancos com média de peso de 3,3±0,3kg. Os animais foram mantidos em temperatura controlada e em ciclos de claro/escuro de 12 horas no Biotério da Divisão Experimental do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. Água foi fornecida *ad libitum*. Para adaptação às condições ambientais do biotério, os coelhos consumiram ração comercial usual, constituída de 16% de proteínas, 7% de lipídeos, 14% de fibra bruta, 7% de cinzas e 50% de extrato não-nitrogenado, por uma semana.

### 4.4 Preparo da dieta rica em colesterol

A dieta enriquecida com 1% de colesterol foi preparada pela adição de uma solução de colesterol à ração comercial usual, na proporção de 1 g de colesterol para 100g de ração. O colesterol foi dissolvido adicionando-se éter etílico e etanol sob agitação. Após a adição da solução, a ração permaneceu em repouso por 24 horas em capela para a evaporação completa dos solventes. A ração rica em

colesterol foi então pesada, separada em porções individuais de 150g em sacos plásticos lacrados e armazenada a -20º.

### 4.5 Protocolo experimental

Após a primeira semana de adaptação, todos os coelhos foram submetidos à indução de aterosclerose pela dieta rica em colesterol durante oito semanas (150 gramas de ração/dia). Na quinta semana de consumo da dieta, os coelhos foram divididos em grupos de acordo com o tratamento administrado:

- Grupo Controle (GC, n=9): Recebeu injeções endovenosas de solução salina (mesmo volume/semana);
- Grupo Sinvastatina (GS, n=9): Recebeu sinvastatina (2mg/Kg/dia) por gavagem;
- Grupo Paclitaxel (GP, n=9): Recebeu injeções endovenosas PTX-LDE (4mg/Kg/semana);
- Grupo Combinação Sinvastatina + Paclitaxel (GSP, n=9): Recebeu injeções endovenosas de PTX-LDE (4mg/Kg/semana) e sinvastatina (2mg/Kg/dia) por gavagem.

Todas as injeções foram administradas uma vez por semana e a sinvastatina foi macerada em água filtrada e administrada diariamente, pelo período de quatro semanas (semanas 5, 6, 7 e 8). Ao fim das oito semanas, os animais foram sacrificados com injeção endovenosa de uma dose letal de pentobarbital sódico (5%).

Este protocolo foi apresentado à Comissão Científica do Instituto do Coração (projeto nº 382/10), e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

### 4.6 Avaliação do consumo de ração e do peso corporal

O consumo de ração dos coelhos foi avaliado diariamente, pela pesagem do resíduo de ração. Os animais foram pesados semanalmente para avaliação da variação do peso corporal.

### 4.7 Avaliação do perfil hematológico

Amostras de sangue foram coletadas da veia auricular marginal dos coelhos, em uma solução de EDTA a 10%, antes e após os tratamentos, para a realização do hemograma completo dos animais, com a utilização do equipamento veterinário Horiba ABX – Micros ABC Vet. A partir do sangue total, foram confeccionados esfregaços sanguíneos, corados com May-Grunwald-Giemsa modificado (Rosenfeld) para a contagem diferencial dos leucócitos, com a determinação da porcentagem de linfócitos, monócitos e neutrófilos.

### 4.8 Avaliação do perfil lipídico

Amostras de sangue dos coelhos foram coletadas da veia auricular marginal antes do início do consumo da dieta rica em colesterol, antes do início e ao longo

das quatro semanas de tratamento (5º, 6º, 7º e 8º semanas) após jejum de 12h e centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos a 4ºC para separação do soro.

As concentrações séricas de colesterol total e triglicérides foram determinadas por método enzimático colorimétrico direto. A concentração de colesterol de HDL (HDL-C) foi determinada por método enzimático colorimétrico, após a precipitação das lipoproteínas que contém ApoB. As determinações foram realizadas em aparelho Cobas c111 (Roche Diagnostics – Kit de Reagentes para Cobas c111). A concentração de colesterol de lipoproteínas que contém ApoB (n-HDL-C) foram calculadas pela diferença entre as concentrações de colesterol total e de colesterol de HDL (nHDL-C = CT – HDL-C).

### 4.9 Avaliação bioquímica da função hepática e renal

Amostras de sangue dos coelhos foram coletadas da veia auricular marginal antes do início do consumo da dieta rica em colesterol, antes do início e ao longo das quatro semanas de tratamento (5º, 6º, 7º e 8º semanas) após jejum de 12h e centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos a 4ºC para separação do soro.

As concentrações séricas das enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST) e alanino aminotransferase (ALT) e de ureia foram determinada por método cinético. A concentração sérica de creatinina foi determinada por método cinético de Jaffé. As determinações foram realizadas em aparelho Cobas c111 (Roche Diagnostics, Kit de Reagentes para Cobas c111).

### 4.10 Análise macroscópica das aortas

As aortas foram retiradas a partir do arco aórtico até a artéria abdominal e abertas longitudinalmente ao longo da parede anterior. Em seguida, foram lavadas com salina, fixadas em formalina tamponada a 10% e coradas com Escarlate R. Fotos foram tiradas para a análise morfométrica das aortas e da área das lesões ateroscleróticas, quantificadas por meio do software NIS – Elements AR 3.2, com a utilização do microscópio Eclipse 80i com câmera acoplada DS-Ri1 (Nikon, Tóquio, Japão).

### 4.11 Análise microscópica dos arcos aórticos

A região do arco aórtico das artérias foi seccionada em fragmentos de 5 mm e embebida em parafina para a confecção de lâminas coradas com hematoxilina/eosina (HE), para a realização das medições da área das camadas média e íntima de cada fragmento. Também foram confeccionadas lâminas coradas com Tricrômico de Masson, para a quantificação de colágeno das placas ateroscleróticas.

Foram realizados ensaios de imunohistoquímica, para a identificação e diferenciação dos elementos presentes na lesão. Foram utilizados anticorpos para a identificação de macrófagos (mouse MAB clone RAM-11, Dako) e células musculares lisas (α-actina, MAB clone 1A4, Dako), de acordo com as instruções do fabricante. As medições e as análises de quantificação foram realizadas com o software NIS – Elements AR 3.2, com a utilização do microscópio Eclipse 80i com câmera acoplada DS-Ri1 (Nikon, Japão).

### 4.12 Análise estatística

As diferenças dos resultados de consumo de ração, peso corporal, hemograma, perfil lipídico e bioquímico foram avaliadas pelo teste de Friedman, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn (comparação intragrupos) e pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltipla de Dunn (comparação intergrupos).

Para a comparação da porcentagem das lesões arteriais e da área das camadas média e íntima entre os grupos, assim como da porcentagem de colágeno, macrófagos e células musculares lisas, foi utilizado o teste de Kruskall-Wallis, seguido do teste de comparação múltipla de Dunn. A probabilidade de significância considerada foi de $p<0,05$ em todas as comparações realizadas. Os dados foram tabelados como média ± desvio padrão (M±DP).

# 5 RESULTADOS

# 5 RESULTADOS

## 5.1 Avaliação do consumo de ração e do peso corporal

No grupo controle, o consumo de ração foi de 122,1±7,8 g/dia na primeira semana de tratamento e 99,8±13,2 g/dia, na última semana de tratamento. No grupo paclitaxel, o consumo foi de 114,8±21,3 g/dia na primeira semana e 113,9±8,8 g/dia, na última semana. No grupo sinvastatina, o consumo variou de 126,1±5,6 g/dia, na primeira semana, a 106,7±5,5 g/dia, na última semana, e no grupo tratado com a combinação, o consumo foi de 126,9±9,9 g/dia e 118,7±17,2 g/dia, respectivamente. Não houve alteração no consumo de ração dos animais durante os tratamentos, assim como não houve diferença no consumo de ração entre os grupos, no período do estudo. O gráfico 1 mostra a média do consumo de ração dos animais, em gramas, durante as semanas de tratamento.

De maneira similar, não houve alteração no peso corporal dos animais durante os tratamentos, assim como não houve diferença entre os grupos. A média foi de 3,3±0,1 Kg na primeira semana de tratamento e 3,4±0,4 Kg na última semana de tratamento, para os animais controles. No grupo paclitaxel, a média foi de 3,1±0,3 Kg na primeira semana e 3,4±0,4 Kg, na última semana. No grupo sinvastatina, a média de peso foi de 3,3±0,4 Kg, na primeira semana, a 3,3±0,2 Kg, na última semana, e no grupo tratado com a combinação, o peso variou de 3,3±0,4 a 3,4±0,4 Kg durante as semanas de tratamento. A evolução do peso corporal dos animais de cada grupo durante as semanas de tratamento é mostrada no gráfico 2.

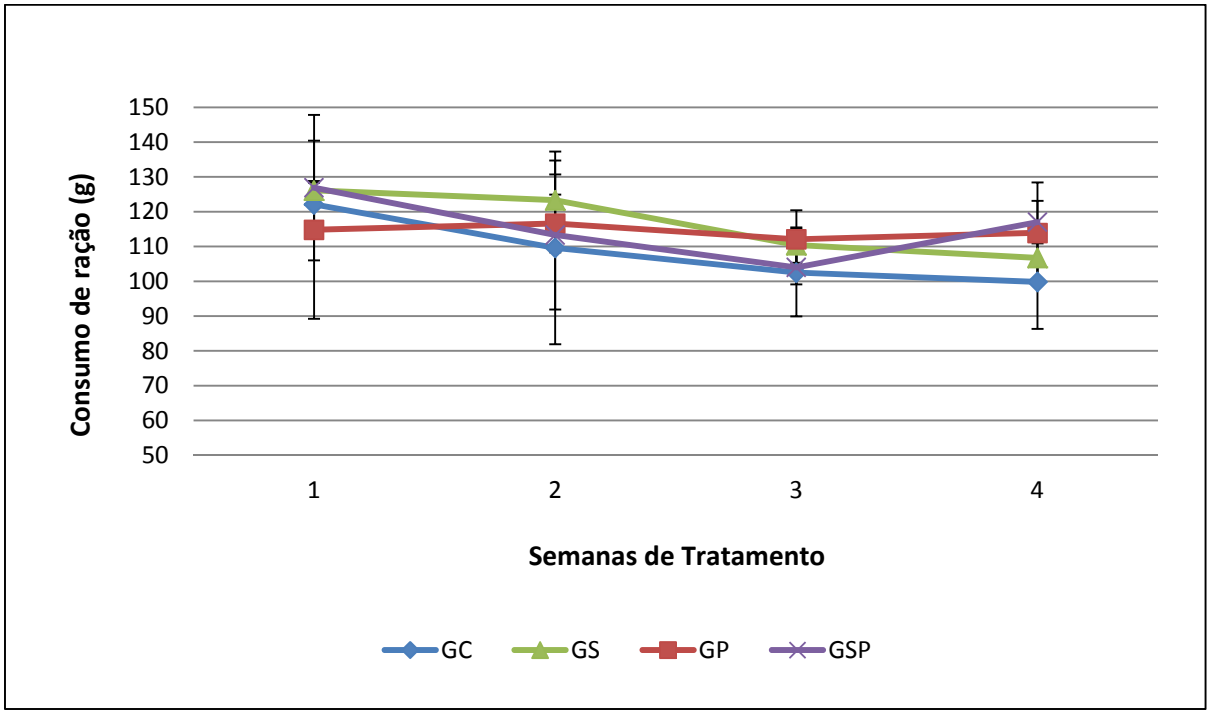


Gráfico 1– Consumo de ração dos animais dos grupos controle (GC, n=9), sinvastatina (GS, n=9), paclitaxel (GP, n=9), e sinvastatina + paclitaxel (GSP, n=9), durante as semanas de tratamento. Dados expressos em M±DP.

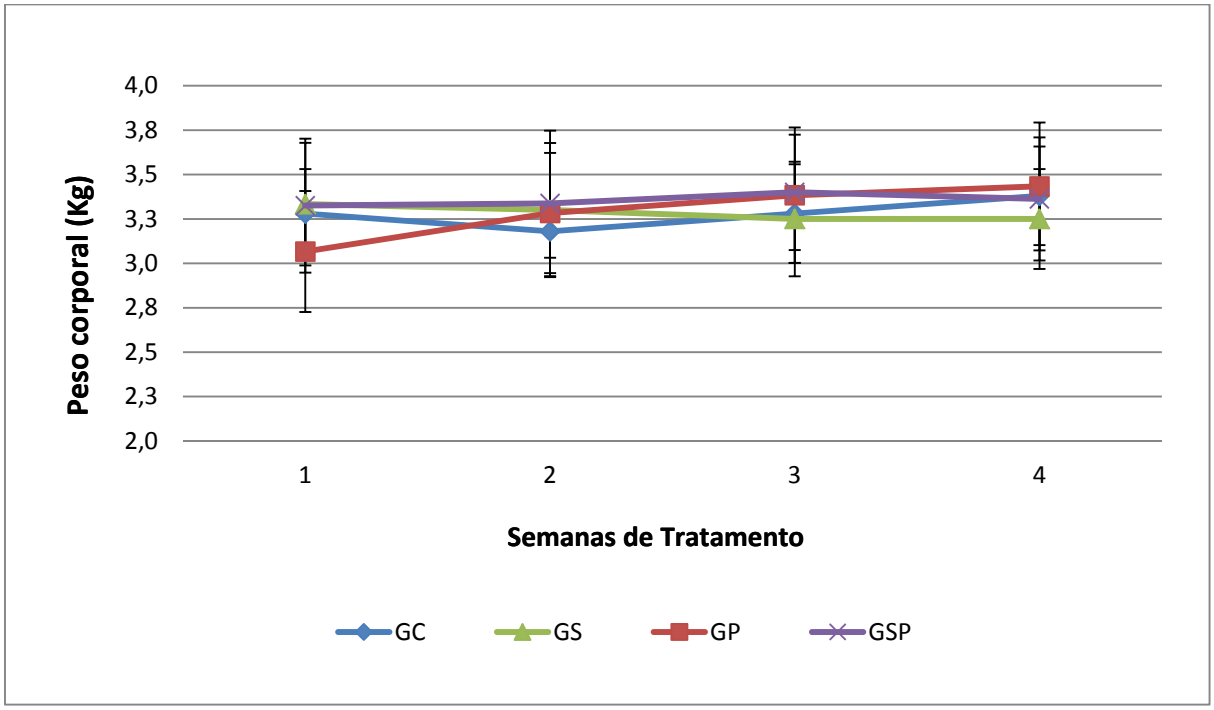


Gráfico 2– Peso corporal dos animais dos grupos controle (GC, n=9), sinvastatina (GS, n=9), paclitaxel (GP, n=9), e sinvastatina + paclitaxel (GSP, n=9), durante as semanas de tratamento. Dados expressos em M±DP.

## 5.2 Avaliação do perfil hematológico

Na avaliação da série eritrocitária e dos índices hematimétricos, foram encontradas diferenças entre os grupos nos valores de hemoglobina, hematócrito e concentração de hemoglobina corpuscular média, porém os grupos não apresentaram diferença nos valores obtidos antes do início e ao término dos tratamentos. Também não houve alteração nos valores de plaquetas dos animais.

Em relação à série leucocitária, não houve diferença nos valores de leucócitos totais, assim como na contagem diferencial, não houve alteração da porcentagem dos diferentes tipos leucocitários, em todos os grupos. Eusinófilos e basófilos foram raramente encontrados. O hemograma dos animais, determinado antes do início e ao término do tratamento, é mostrado na tabela 1.

Tabela 1 - Hemograma dos animais, determinado antes do início e ao término do tratamento. *Continua*

| | **Pré-tratamento** | **Pós-tratamento** |
|---|---|---|
| **Eritrócitos ($10^6$/mm$^3$)** | | |
| GC | 4,1±1,1 | 3,9±1,1 |
| GS | 4,5±0,3 | 4,4±0,9 |
| GP | 5,1±0,6 | 4,9±1,0 |
| GSP | 4,8±0,9 | 4,7±0,8 |
| **HGB (g/dL)** | | |
| GC | 10,0±2,5 | 8,4±0,7 |
| GS | 10,8±0,6 | 10,0±1,3 |
| GP | 11,6±0,7 | 10,8±1,8 |
| GSP | 12,2±0,9 | 11,2±1,1* |
| **HCT (%)** | | |
| GC | 29,5±6,2 | 25,4±2,1 |
| GS | 32,8±2,0 | 31,2±4,0 |
| GP | 37,6±1,8† | 33,5±4,0* |
| GSP | 36,7±3,0 | 32,9±4,1* |

*Continuação*

| | Pré-tratamento | Pós-tratamento |
|---|---|---|
| **VCM ($fm^3$)** | | |
| GC | 70,0±1,6 | 80,3±3,9 |
| GS | 73,0±2,2 | 76,4±7,6 |
| GP | 72,5±6,1 | 79,2±5,8 |
| GSP | 71,5±2,2 | 75,2±3,3 |
| **HCM (pg)** | | |
| GC | 22,7±1,2 | 26,7±1,7 |
| GS | 24,2±0,6* | 24,5±2,9 |
| GP | 22,8±1,7 | 26,3±1,8 |
| GSP | 24,0±1,2 | 26,1±1,8 |
| **CHCM (g/dL)** | | |
| GC | 32,3±0,4 | 33,1±0,3 |
| GS | 33,2±0,4 | 32,1±0,7 |
| GP | 31,6±1,1 | 33,0±1,5 |
| GSP | 34,0±1,2† | 34,4±1,3† |
| **Leucócitos ($10^3/mm^3$)** | | |
| GC | 5,6±2,8 | 7,2±2,6 |
| GS | 6,0±1,4 | 8,9±1,5 |
| GP | 6,4±2,4 | 6,9±2,9 |
| GSP | 7,6±3,9 | 7,2±2,4 |
| **Linfócitos (%)** | | |
| GC | 57,7±6,1 | 62,2±3,9 |
| GS | 67,2±2,9 | 56,0±5,3 |
| GP | 57,1±5,0 | 64,3±11,0 |
| GSP | 50,0±1,4 | 56,6±6,2 |
| **Neutrófilos (%)** | | |
| GC | 30,3±11,7 | 28,3±6,1 |
| GS | 28,3±4,4 | 36,6±5,6 |
| GP | 39,2±4,8 | 36,2±10,3 |
| GSP | 42,8±7,6 | 39,1±2,9 |
| **Monócitos (%)** | | |
| GC | 2,3±0,8 | 3,6±1,5 |
| GS | 2,0±0,7 | 3,0±1,4 |
| GP | 2,7±1,2 | 3,2±2,1 |
| GSP | 3,0±1,0 | 4,0±1,2 |

*Conclusão*

| | Pré-tratamento | Pós-tratamento |
|---|---|---|
| **Plaquetas ($10^3$/mm$^3$)** | | |
| GC | 206,0±71,1 | 281,3±127,0 |
| GS | 328,8±58,8 | 392,4±71,3 |
| GP | 226,8±31,3 | 255,3±84,6 |
| GSP | 293,4±105,0 | 202,8±118,4 |

GC, grupo controle (n=7); GS, grupo sinvastatina (n=7), GP; grupo paclitaxel (n=7); GSP, grupo sinvastatina + paclitaxel (n=7); HGB, hemoglobina; HCT, hematócrito; VCM, volume corpuscular médio; HCM, hemoglobina corpuscular média; CHCM, concentração de hemoglobina corpuscular média. Dados expressos em M±DP.
*p<0,05, comparado ao controle, teste de Kruskall-Wallis, seguido de teste de comparação múltipla de Dunn.
†p<0,05, comparado ao grupo sinvastatina, teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste de comparação múltipla de Dunn.

### 5.3 Avaliação do perfil lipídico

A tabela 2 mostra a concentração sérica de colesterol total, HDL-C, n-HDL e triglicérides dos coelhos dos grupos estudados. Na quarta semana de consumo da dieta, a concentração de colesterol total, n-HDL-C e triglicérides em todos os grupos aumentou, em média, 13, 30 e 2 vezes, respectivamente.

Ao final de oito semanas, nos grupos controle e paclitaxel, houve aumento de, em média, 25 vezes na concentração de colesterol total, de 58 vezes na concentração de n-HDL-C e de 3 vezes na concentração de triglicérides, comparado ao basal. Já nos animais que receberam sinvastatina, houve diminuição na concentração de colesterol total, n-HDL-C e triglicérides de 4, 5 e 2 vezes, respectivamente, no grupo sinvastatina, e de 1,5, 1,5 e 1,3 vezes, no grupo tratado com a combinação, comparado à quarta semana.

O grupo paclitaxel apresentou uma discreta diminuição da concentração de HDL-C na quarta semana, porém, ao final da oitava semana, apenas os grupos que receberam sinvastatina diferiram na concentração de HDL-C.

Tabela 2 – Perfil lipídico dos animais, determinado antes do início da dieta (basal), antes do início do tratamento e ao término do tratamento.

| | **Basal** | **Pré-tratamento** | **Pós-tratamento** |
|---|---|---|---|
| **CT (mg/dL)** | | | |
| GC | 45±1 | 807±116* | 1178±51* |
| GS | 52±1 | 616±36* | 160±4† |
| GP | 53±1 | 556±29 | 1276±49* |
| GSP | 47±3 | 631±194* | 423±26 |
| **HDL-C (mg/dL)** | | | |
| GC | 20±1 | 19±8 | 20±1 |
| GS | 23±1 | 19±1$f$ | 35±3†† |
| GP | 21±1 | 18±1* | 21±1 |
| GSP | 19±4 | 18±2 | 17±1 |
| **n-HDL-C (mg/dL)** | | | |
| GC | 24±2 | 787±107 | 1158±51* |
| GS | 29±2 | 596±37* | 124±6 |
| GP | 31±2 | 537±28 | 1255±48* |
| GSP | 29±6 | 565±199* | 400±29 |
| **TG (mg/dL)** | | | |
| GC | 66±5 | 124±8 | 200±52* |
| GS | 72±17 | 157±16* | 90±3† |
| GP | 87±21 | 128±2 | 203±1* |
| GSP | 83±10 | 160±9* | 123±15 |

GC, grupo controle (n=7); GS, grupo sinvastatina (n=7); GP, grupo paclitaxel (n=7); GSP, grupo sinvastatina + paclitaxel (n=7); CT, colesterol total; HDL-C, colesterol de HDL (determinado após a precipitação das lipoproteínas que contém ApoB); nHDL-C, colesterol não-HDL; TG, triglicérides. O nHDL-C foi calculado como a diferença entre as concentrações de CT e de HDL-C. Dados expressos em M±DP.
*p<0,001, comparado ao basal, teste de Friedman, seguido de teste de comparação múltipla de Dunn.
†p<0,0001, comparado ao grupo paclitaxel, teste de Kruskall-Wallis, seguido de teste de comparação múltipla de Dunn.
$f$p<0,001, comparado ao pós-tratamento, teste de Friedman, seguido de teste de comparação múltipla de Dunn.
††p<0,0001, comparado ao grupo sinvastatina + paclitaxel, teste de Kruskall-Wallis, seguido de teste de Dunn.

## 5.4 Avaliação bioquímica da função hepática e renal

Os demais parâmetros bioquímicos, refletindo a função hepática e renal dos animais, são mostrados na tabela 3. Ao final da oitava semana do estudo, houve um aumento da concentração de AST de 4 vezes, em média, comparado ao valor basal, em todos os grupos, sendo que o maior aumento observado foi a partir da quarta semana.

Também houve aumento da ALT no primeiro mês de dieta, porém, no grupo que recebeu a combinação, o aumento foi mais tardio. Não houve alterações nos parâmetros renais dos animais, durante o período do estudo.

## 5.5 Análise macroscópica das aortas

A macroscopia das aortas dos animais está representada na figura 1, que ilustra o padrão das lesões ateroscleróticas encontradas em cada grupo. Houve redução na formação de lesões ateroscleróticas em todos os grupos tratados, comparados aos controles, sendo que a redução observada nos grupos que receberam paclitaxel foi notavelmente maior.

A análise morfométrica das aortas mostrou uma área de lesões em torno de 63% menor nos grupos paclitaxel e combinação, e de 40% no grupo sinvastatina, em relação aos controles. Os valores da quantificação de lesões ateroscleróticas na artéria dos animais dos grupos estudados são mostrados na tabela 4.

Tabela 3 – Parâmetros bioquímicos de função hepática e renal dos animais, determinado antes do início da dieta (basal), antes do início do tratamento e após o término do tratamento.

| | Basal | Pré-tratamento | Pós-tratamento |
|---|---|---|---|
| **AST (mg/dL)** | | | |
| GC | 36,1±5,6 | 51,0±22,1 | 107,0±23,2* |
| GS | 36,7±8,5 | 49,3±9,8 | 143,0±17,0* |
| GP | 39,0±13,9 | 45,5±9,4 | 106,1±52,3* |
| GSP | 34,3±1,7 | 78,6±16,2 | 171,7±73,5* |
| **ALT (mg/dL)** | | | |
| GC | 22,0±6,2 | 80,6±36,2* | 51,0±3,5 |
| GS | 22,0±7,1 | 71,0±16,1* | 66,5±7,6 |
| GP | 32,3±7,7 | 51,0±11,6* | 40,5±3,1 |
| GSP | 26,0±8,0 | 65,0±9,8 | 89,5±15,6* |
| **Ureia (mg/dL)** | | | |
| GC | 29,5±9,3 | 39,5±3,1 | 35,5±3,1 |
| GS | 47,0±6,2 | 45,5±4,9 | 51,6±20,8 |
| GP | 35,2±9,5 | 38,3±5,3 | 42,6±4,0 |
| GSP | 35,3±6,7 | 44,2±11,0 | 45,1±10,8 |
| **Creatinina (mg/dL)** | | | |
| GC | 1,30±0,08 | 1,36±0,13 | 1,46±0,05 |
| GS | 1,30±0,08 | 1,35±0,04 | 1,43±0,18 |
| GP | 1,26±0,05 | 1,36±0,22 | 1,15±0,17 |
| GSP | 1,27±0,30 | 1,30±0,14 | 1,27±0,04 |

GC, grupo controle (n=7); GS, grupo sinvastatina (n=7); GP, grupo paclitaxel (n=7); GSP, grupo sinvastatina + paclitaxel (n=7); AST, aspartato aminotransferase; ALT, alanina aminotransferase. Dados expressos em M±DP.

*p<0,01, comparado ao basal, teste de Friedman, seguido de teste de comparação múltipla de Dunn.

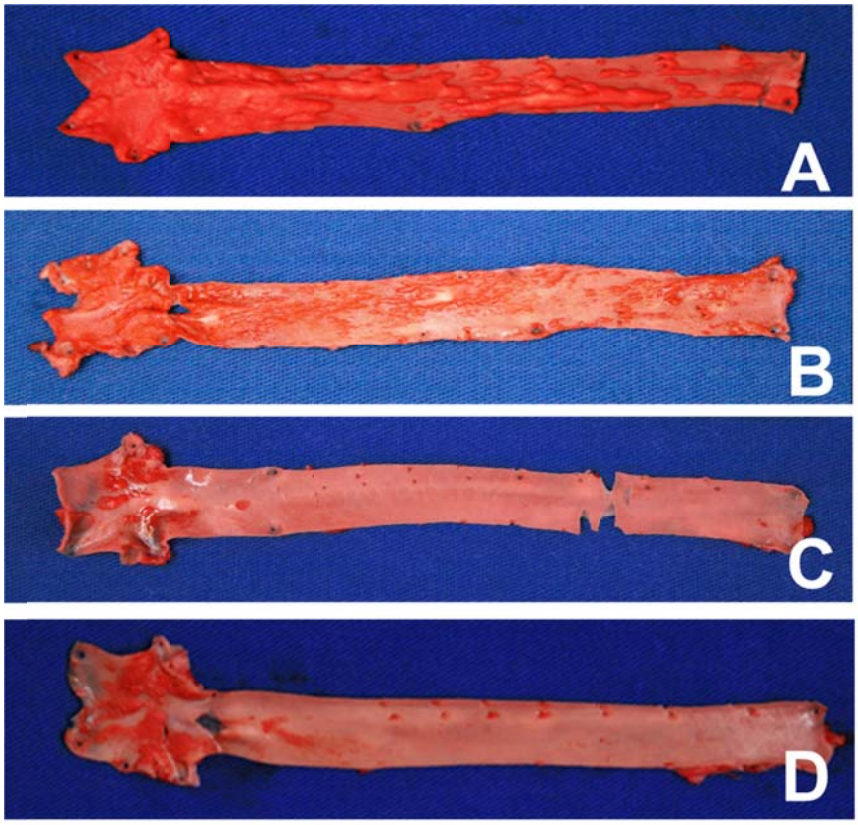


Figura 1 – Macroscopia da aorta dos animais dos grupos controle (A, n=9), sinvastatina (B, n=9), paclitaxel (C, n=9) e sinvastatina + paclitaxel (D, n=9), representando as lesões encontradas em cada grupo estudado (coradas em vermelho).

Tabela 4 – Quantificação por morfometria macroscópica da área total e da área com lesões ateroscleróticas das aortas dos animais.

| **Macroscopia** | **GC** | **GS** | **GP** | **GSP** |
|---|---|---|---|---|
| Área total da aorta ($cm^2$) | 10,60±1,44 | 10,18±0,48 | 11,09±1,07 | 10,71±0,96 |
| Área com lesão ($cm^2$) | 6,79±2,10 | 3,83±1,23 | 2,58±1,30* | 2,49±1,19* |
| Área lesão/área total ($cm^2$) | 0,63±0,14 | 0,37±0,10 | 0,23±0,12† | 0,23±0,11† |

GC, grupo controle (n=9); GS, grupo sinvastatina (n=9); GP, grupo paclitaxel (n=9); GSP, grupo sinvastatina + paclitaxel (n=9). Dados expressos em M±DP.
*p<0,01, comparado ao grupo controle, teste de Kruskall-Wallis, seguido de teste de comparação múltipla de Dunn.
†p<0,001, comparado ao grupo controle, teste de Kruskall-Wallis, seguido de teste de comparação múltipla de Dunn.

## 5.6 Análise microscópica dos arcos aórticos

Houve diminuição da área da camada íntima em todos os grupos que receberam tratamentos, porém a redução observada no grupo sinvastatina não foi significante, quando comparado ao grupo controle. A maior redução observada foi no grupo paclitaxel, com área da íntima em torno de 70% menor do que a dos controles. A razão entre as camadas íntima e média em todos os grupos tratados também foi menor do que no grupo controle. A microscopia dos arcos aórticos está representada na figura 2, que ilustra o padrão de lesão encontrada em cada grupo. A análise morfométrica das camadas íntima e média é mostrada na tabela 5.

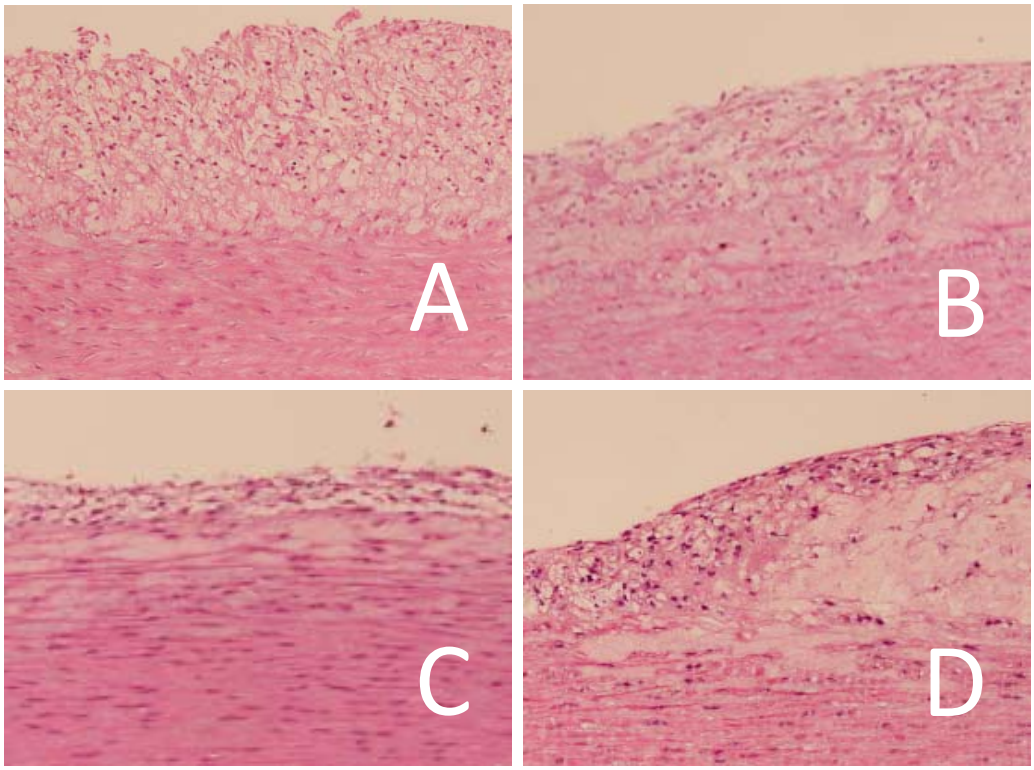


Figura 2 – Fotomicrografias de cortes do arco aórtico dos animais dos grupos controle (A, n=9), sinvastatina (B, n=9), paclitaxel (C, n=9) e sinvastatina + paclitaxel (D, n=9), para a medição da área das camadas íntima e média. Coloração por H/E. Aumento de 100x.

Tabela 5 – Quantificação por morfometria microscópica da área das camadas íntima e média dos arcos aórticos dos animais.

| **Microscopia** | **GC** | **GS** | **GP** | **GSP** |
|---|---|---|---|---|
| Área da íntima ($mm^2$) | 0,17±0,08 | 0,10±0,07 | 0,05±0,04* | 0,09±0,05* |
| Área da média ($mm^2$) | 0,49±0,10 | 0,47±0,12 | 0,46±0,15 | 0,51±0,15 |
| Área íntima/média ($mm^2$) | 0,35±0,22 | 0,10±0,17* | 0,06±0,16* | 0,10±0,13* |

GC, grupo controle (n=9); GS, grupo sinvastatina (n=9); GP, grupo paclitaxel (n=9); GSP, grupo sinvastatina + paclitaxel (n=9). Dados expressos em M±DP.
*p<0,0001, comparado ao grupo controle, teste de Kruskall-Wallis, seguido de teste de comparação múltipla de Dunn.

Na tabela 6, são apresentados os resultados da quantificação de colágeno, macrófagos e células musculares lisas presentes nas lesões ateroscleróticas do arco aórtico dos animais de cada grupo. Os grupos sinvastatina e combinação apresentaram um aumento de 2 vezes da quantidade de colágeno nas lesões, em comparação aos grupos controle e paclitaxel.

Além disso, notou-se que, nas lesões presentes nos animais do grupo que recebeu a combinação, houve uma reorganização dos tipos celulares que formam as lesões, com a formação de capa fibrosa, constituída de células musculares lisas. As fotomicrografias dos segmentos dos arcos aórticos, corados por tricrômico de Masson, estão representadas na figura 3.

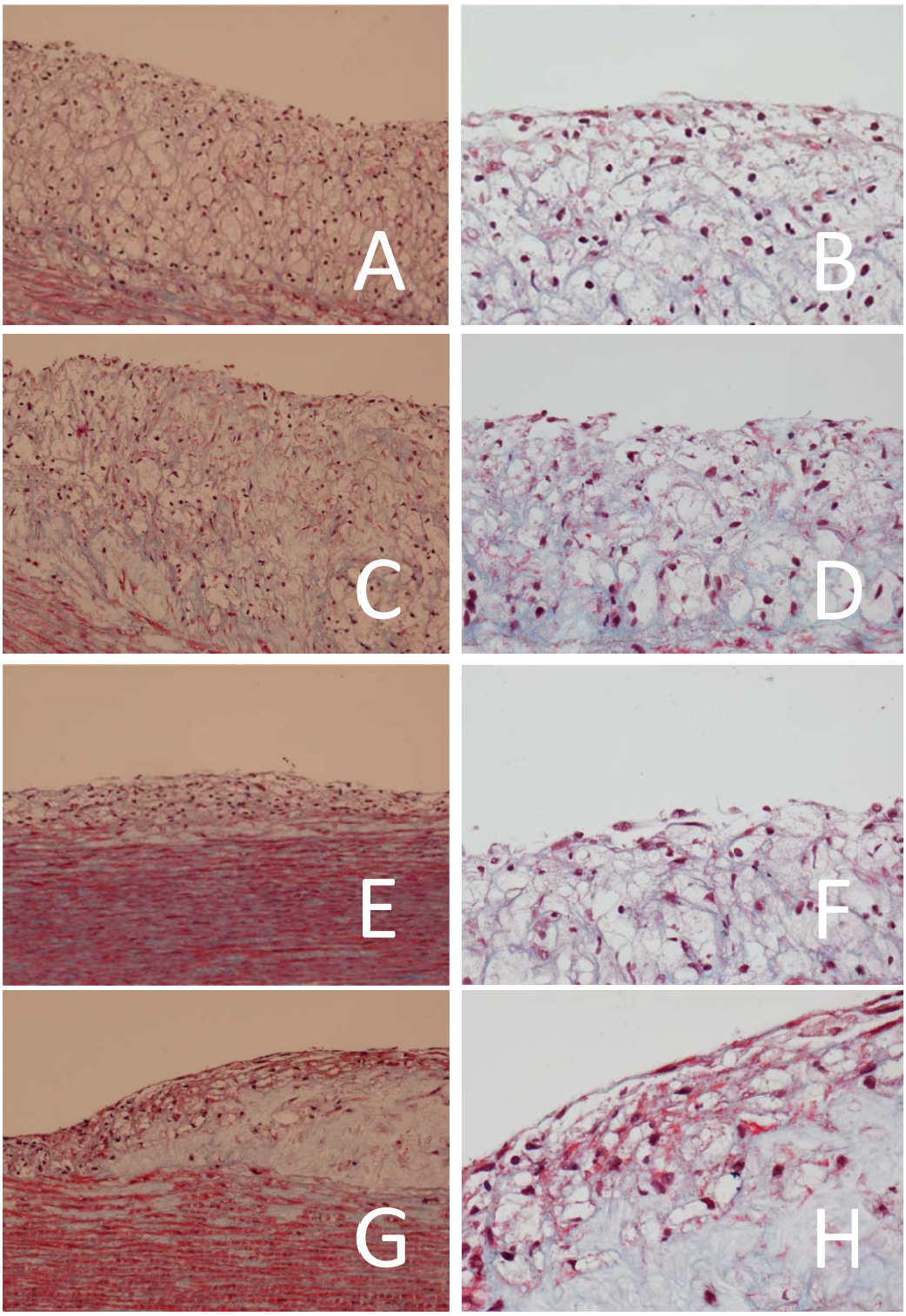


Figura 3 – Fotomicrografias de cortes do arco aórtico dos animais dos grupos controle (A e B, n=9), sinvastatina (C e D, n=9), pacliitaxel (E e F, n=9) e sinvastatina + paclitaxel (G e H, n=9). Coloração por tricrômico de Masson, evidenciando o conteúdo de colágeno das placas (azul) e fibras musculares lisas (vermelho). Aumento de 200x (A, C, E e G) e de 400x (B, D, F e H), mostrando detalhe da lesão.

Tabela 6 – Porcentagem de células musculares lisas, macrófagos e colágeno na camada íntima do arco aórtico dos animais.

| | GC | GS | GP | GSP |
|---|---|---|---|---|
| Célula muscular lisa (%) | 32,66±12,94 | 31,71±9,96† | 20,21±13,38*† | 44,19±12,24* |
| Macrófagos (%) | 30,33±9,57 | 7,96±6,04* | 11,07±7,92*† | 5,40±4,98* |
| Colágeno (%) | 11,25±5,06 | 22,24±9,52*†† | 12,26±8,77 | 19,69±9,83*†† |

GC, grupo controle (n=9); GS, grupo sinvastatina (n=9); GP, grupo paclitaxel (n=9); GSP, grupo sinvastatina + paclitaxel (n=9). Dados expressos em M±DP.
*p<0,0001, comparado ao grupo controle, teste de Kruskall-Wallis, seguido de teste de comparação múltipla de Dunn.
†p<0,0001, comparado ao grupo paclitaxel+sinvastatina, teste de Kruskall-Wallis, seguido de teste de comparação múltipla de Dunn.
††p<0,0001, comparado ao grupo paclitaxel, teste de Kruskall-Wallis, seguido de teste de comparação múltipla de Dunn.

A figura 4 mostra segmentos dos arcos aórticos dos grupos estudados, após coloração por imunohistoquímica eletiva para macrófagos (anticorpo anti-RAM-11). Todos os tratamentos resultaram na presença reduzida de macrófagos na camada íntima, quando comparados aos controles. Os valores encontrados pela quantificação de macrófagos nas lesões (tabela 6) representam redução de, em média, 60, 70 e 80%, respectivamente, nos grupos paclitaxel, sinvastatina e combinação.

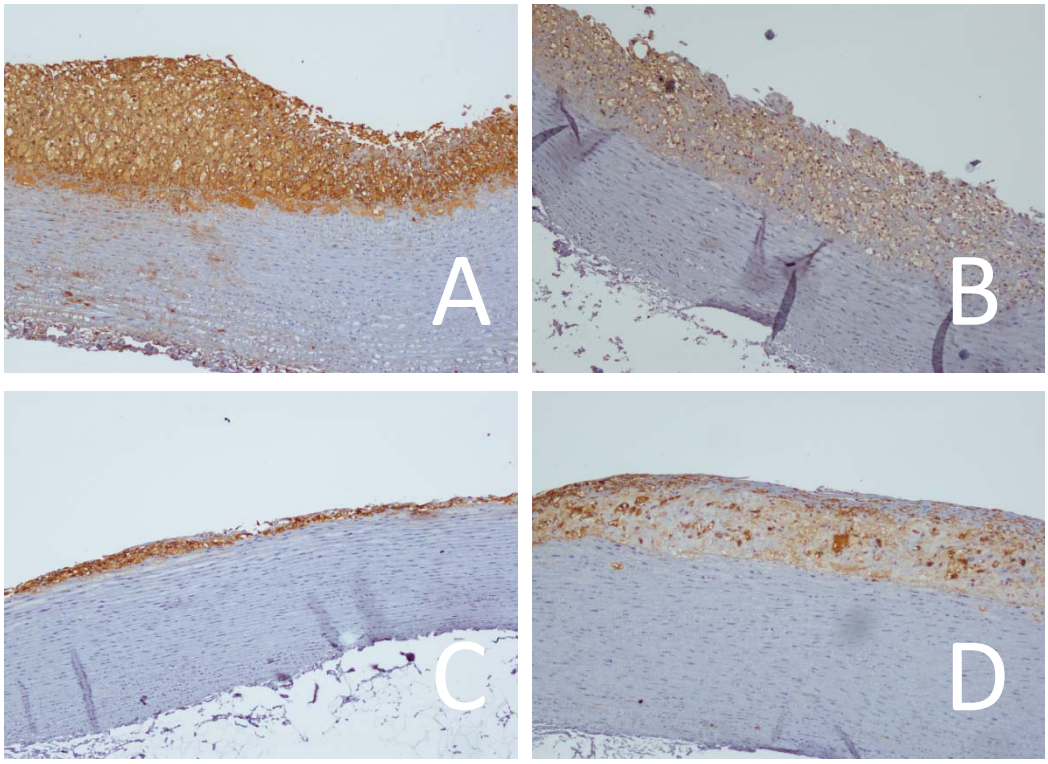


Figura 4 – Fotomicrografias de cortes do arco aórtico dos animais dos grupos controle (A, n=9), sinvastatina (B, n=9), paclitaxel (C, n=9) e sinvastatina + paclitaxel (D, n=9). Coloração por imunohistoquímica (anticorpo anti-RAM-11), evidenciando macrófagos (corado em marrom). Aumento de 100x.

A figura 5 mostra segmentos dos arcos aórticos após coloração por imunohistoquímica eletiva para células musculares lisas (anticorpo anti-α-actina). No grupo paclitaxel, observamos diminuição da porcentagem de células musculares lisas e, no grupo que recebeu a combinação, houve aumento da presença dessas células nas lesões, quando comparados aos controles. Não houve diferença entre a porcentagem de células musculares lisas nas lesões dos grupos controle e sinvastatina (tabela 6).

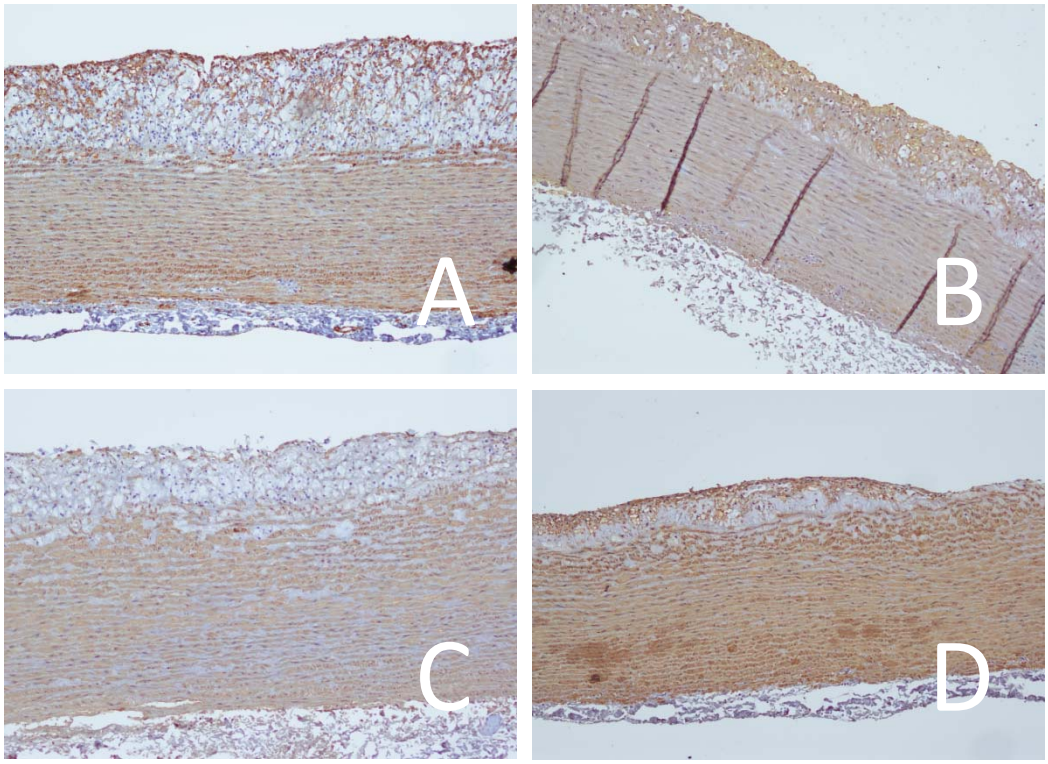


Figura 5 – Fotomicrografias de cortes do arco aórtico dos animais dos grupos controle (A, n=9), sinvastatina (B, n=9), paclitaxel (C, n=9) e sinvastatina + paclitaxel (D, n=9). Coloração por imunohistoquímica (anticorpo anti-α-actina), evidenciando células musculares lisas (corado em marrom). Aumento de 100x.

# 6 DISCUSSÃO

## 6 DISCUSSÃO

Anteriormente, reportamos que a área lesionada de aortas de coelhos submetidos à dieta rica em colesterol era 60% menor após o tratamento com PTX-LDE (MARANHÃO *et al*., 2008), quando comparados a animais controles que não receberam o tratamento. O tratamento se apresentou livre de toxicidade, porém não teve efeito sobre o perfil lipídico dos animais.

As estatinas são agentes hipolipemiantes empregados amplamente para a redução do colesterol sérico (BALLANTYNE, 1998). Além do efeito hipolipemiante, muitos efeitos, chamados pleiotrópicos, têm sido relatados com o uso das estatinas (FONSECA, 2005). Diante disso, neste trabalho abrimos caminho para o uso do agente quimioterápico paclitaxel associado à nanoemulsão em combinação com o uso de sinvastatina, uma estatina amplamente utilizada em trabalhos que usam coellhos como modelo animal de aterosclerose. Além disso, levando-se em conta o uso frequente das estatinas na prática clínica, a estratégia de combinação poderia proporcionar benefícios, com efeitos que se somam às terapias atualmente disponíveis.

Apesar dos estudos experimentais em coelhos descritos na literatura que usam sinvastatina na dose de 5mg/Kg/dia (QIAO; REN; CHEN, 2009; ZHANG *et al*., 2009; CHAROENWANTHANANG *et al*., 2011), e os relatos indicarem tolerância ao tratamento, não conseguimos reproduzir em nosso biotério tais relatos reportados nestes trabalhos. No estudo piloto, três animais que foram tratados apenas com sinvastatina na dose 5mg/Kg/dia morreram aproximadamente durante a terceira semana do período de tratamento (dados não mostrados).

Dessa forma, padronizamos o uso de sinvastatina ao nosso protocolo experimental e o estudo foi desenvolvido com a dose de 2mg/Kg/dia, tanto para os animais que receberam apenas a sinvastatina quanto aos que receberam o tratamento combinado.

Não houve alteração no consumo de ração ou no peso corporal dos animais durante os tratamentos. Estes dados são indicações de que a dose dos fármacos utilizados neste trabalho foi perfeitamente tolerável para os animais. A depressão da medula óssea é o efeito tóxico mais comum associado ao uso de paclitaxel, e se manifesta principalmente por neutropenia (WIERNIK *et al.*, 1987). Com os resultados observados em relação ao perfil hematológico dos animais, e em particular da leucometria, ficou evidente que a toxicidade da terapia com o quimioterápico, isoladamente ou em combinação com a sinvastatina, foi em parte evitada pela sua associação à LDE.

O coelho como modelo experimental é uma ferramenta importante no estudo da aterosclerose por sua sensibilidade ao colesterol da dieta, uma vez que esses animais não conseguem aumentar sua excreção de esteróis (XU *et al*., 1995) e, desta forma, quando submetidos a dietas ricas em colesterol, tendem a desenvolver hipercolesterolemia rapidamente e acumular grandes quantidades de colesterol na parede dos vasos. Por outro lado, o colesterol também se acumula em grandes quantidades no fígado desses animais. A esteatose hepática, muitas vezes severa, que é observada em coelhos sob o consumo de colesterol, por si só sugere que o próprio colesterol, de acordo com a sua porcentagem na dieta, pode ser tóxico para o fígado dos animais (STEIN, Y; STEIN, O, 2001).

Embora a sinvastatina seja bem tolerada, a toxicidade muscular e hepática são os efeitos adversos mais importantes. A atividade elevada das enzimas

hepáticas e insuficiência hepática foram reportadas em pacientes sob o uso de sinvastatina (CHALASANI, 2005; COHEN *et al.*, 2006; ARMITAGE, 2007). De fato, em um estudo com a utilização de coelhos como modelo animal de aterosclerose, CHAROENWANTHANANG e colaboradores administraram aos animais uma dieta enriquecida com 1% de colesterol por um mês. Durante o mês subsequente, reduziram o colesterol da dieta a 0,5% e trataram os animais com sinvastatina na dose de 5mg/Kg/dia. Ao final do estudo, reportaram o aumento da expressão das citocinas pró-inflamatórias MCP-1 e TNF-α no fígado (CHAROENWANTHANANG *et al.*, 2011), sugerindo alterações hepáticas nos animais.

Neste estudo, observamos alteração nos parâmetros de função hepática dos animais não apenas dos grupos tratados, mas também do grupo controle, de modo semelhante. Este dado sugere que o consumo de colesterol pelos animais por si só pode alterar os parâmetros de função hepática em coelhos, reforçando a ideia de que os tratamentos foram bem tolerados pelos animais. Além disso, está descrito na literatura que há um aumento progressivo dos parâmetros de função hepática em coelhos entre 3 e 6 meses de idade, período no qual geralmente são utilizados em pesquisas como modelos de aterosclerose, por simples influência da progressão da idade (DONTAS *et al.*, 2011).

Outros tipos de estratégias de tratamento em coelhos hipercolesterolêmicos foram descritos, e algumas delas consistem em retirar a dieta aterogênica antes do início do tratamento com sinvastatina (ZHANG *et al*., 2009). Em nosso protocolo experimental, acreditamos que a manutenção da dieta enriquecida com colesterol continuamente durante todo o período do tratamento é importante para demonstrarmos o efeito que desejamos, ou seja, a redução da área de placas formadas pelo efeito dos diferentes tipos de tratamentos administrados, seja ele

hipolipemiante, no caso da sinvastatina, seja ele de ação antiproliferativa, como no caso do paclitaxel associado à nanoemulsão, independentemente de algum efeito advindo da retirada da dieta rica em colesterol. Apesar de controverso, pela grande variabilidade dos protocolos de tratamento realizados em coelhos, está descrito na literatura que a simples retirada da dieta rica em colesterol leva à diminuição da concentração do colesterol sérico e melhoras no perfil inflamatório e no quadro aterogênico de coelhos (MARTINET *et al*., 2001; AIKAWA *et al*., 2002).

Mesmo com a dieta contínua, as diferenças entre o perfil lipídico dos animais que receberam sinvastatina foram notáveis. No grupo sinvastatina, houve redução da concentração de colesterol total, das lipoproteínas n-HDL e de triglicérides, além de aumentar a concentração de HDL-C. Nos animais que receberam a combinação de sinvastatina com PTX-LDE também houve efeito hipolipemiante, porém menor. A concentração de HDL, neste caso, não foi alterada.

Na análise macroscópica das aortas, mostramos que a dieta foi eficaz na indução de aterosclerose, pela dimensão de placas ateroscleróticas encontradas nos animais controles, sendo que mais de 60% da superfície da aorta desses animais apresentavam lesões. Os tratamentos com PTX-LDE isolado ou em combinação com sinvastatina mostraram grande eficácia na redução da área de placas ateroscleróticas, com apenas 20% da superfície da aorta apresentando lesões, o que representa uma área lesionada em torno de 60% menor, em relação aos controles.

O grupo sinvastatina não mostrou a mesma eficácia na redução da área de lesões, quando o comparamos aos demais grupos tratados. De maneira interessante, apesar de um efeito hipolipemiante menor, o grupo tratado com a combinação mostrou maior redução da área de lesões, quando comparado à

observada no grupo tratado apenas com sinvastatina. A análise microscópica confirmou o melhor resultado nos grupos tratados com PTX-LDE ou com a combinação, com a formação de placas menos espessas em relação aos controles.

Devemos destacar que o grande efeito do tratamento com PTX associado à LDE não tem relação com o veículo em si. Dados de nosso laboratório mostraram que animais submetidos à mesma dieta e que receberam exclusivamente a LDE tiveram um quadro de agravamento da doença, semelhante ao dos animais controles que receberam apenas solução salina, com formação de lesões ateroscleróticas nos três segmentos da aorta (BULGARELLI *et al*., 2013).

Em uma visão tradicional da aterosclerose, acredita-se que o grau de estenose das regiões de lesão define o risco de eventos. Por outro lado, com a gama de conhecimentos gerados pelos mais diversos estudos reportados na literatura sobre a fisiopatologia da aterosclerose, hoje sabemos que a biologia vascular tem grande importância no decorrer da doença, no que diz respeito à estabilidade da placa aterosclerótica (LIBBY; AIKAWA, 2003).

As estatinas, nesse ponto, alteram favoravelmente a biologia da placa, estabilizando-as, principalmente por meio de seu efeito hipolipemiante, reduzindo o conteúdo lipídico das placas, o que leva à diminuição do processo inflamatório, da atividade colagenolítica e do processo trombótico (LIBBY; AIKAWA, 2003).

Devido à importância da composição das placas na sua vulnerabilidade, investigamos também o impacto dos tratamentos na conformação e densidade celular das lesões, pela quantificação de colágeno, macrófagos e células musculares lisas presentes na camada íntima.

O colágeno é um componente importante da matriz extracelular. Evidências sugerem que a quantidade de colágeno da matriz está associada à estabilidade

mecânica das placas ateroscleróticas (NADKARNI *et al*., 2007). As células musculares lisas são as responsáveis pela síntese de colágeno. Na lesão aterosclerótica, essas células migram da camada média para a íntima, resultando num aumento da síntese de colágeno. Células inflamatórias, como os macrófagos, liberam metaloproteinases de matriz no foco da lesão, levando à proteólise do colágeno e apoptose das células musculares lisas presentes na camada íntima, impedindo a síntese de colágeno. Esse desequilíbrio na dinâmica entre a produção e a degradação de colágeno propicia a diminuição do conteúdo de colágeno na placa, podendo levar à sua ruptura (NEWBY; ZALTSMAN, 1999).

Neste estudo, a quantidade de colágeno encontrada nas lesões dos grupos que receberam sinvastatina foi em torno de duas vezes maior, em relação aos controles e ao grupo tratado apenas com PTX-LDE. De acordo com a literatura, terapias hipolipemiantes, como o uso de estatinas, promovem a estabilização da placa aterosclerótica, por meio da restauração da produção e revertendo a degradação de colágeno (LIBBY; AIKAWA, 2003), além de modificar as propriedades físico-químicas do núcleo lipídico da placa (KOH, 2000).

Pela análise das lesões por imunohistoquímica, mostramos que o tratamento com PTX-LDE reduz significativamente a porcentagem de macrófagos na placa, com um efeito semelhante ao observado com o uso de sinvastatina. Já na combinação do PTX-LDE com a sinvastatina, esse efeito foi ainda maior. Este é um achado importante, dado o papel do metabolismo de lípidos nos macrófagos na modulação e manutenção dos processos inflamatórios que promovem a aterosclerose.

Segundo a literatura, o tratamento de animais ou humanos com estatinas demonstrou de fato reduzir o número de macrófagos em lesões ateroscleróticas (CRISBY *et al.*, 2001). Porém, existem dados contraditórios a respeito do

mecanismo da redução do número de macrófagos na lesão, após tratamento com estatinas.

Estudos *in vitro* mostram que existe uma variação na indução de apoptose, de acordo com a linhagem de macrófago e do tipo de estatina utilizados, de modo que alguns autores defendem que a diminuição do número de macrófagos pelo uso de estatinas é devido à diminuição do influxo de macrófagos na íntima, ao invés de uma depleção de macrófagos por morte celular (CROONS *et al.*, 2010).

A redução do influxo de macrófagos induzido pelas estatinas foi atribuída, entre outros, à diminuição da expressão de MCP-1, que tem sido implicada no recrutamento de monócitos e na inflamação (BUSTOS, 1998). Portanto, sua diminuição pode ser um fator determinante na gênese e perpetuação do processo aterosclerótico. Em estudos com animais, as estatinas também diminuíram a expressão de VCAM-1; Scalia e colaboradores demonstraram a importância desta molécula de adesão, assim como de ICAM-1 e P-selectina, na interação entre leucócitos e o endotélio, durante a fase inicial da hipercolesterolemia em coelhos (SCALIA *et al.*, 1998).

Os efeitos da combinação de PTX-LDE com sinvastatina na alteração da conformação das lesões foram confirmados pelo aumento de células musculares lisas na placa, diferindo do grupo sinvastatina, que no nosso estudo, não apresentou efeito algum na porcentagem dessas células nas lesões, e do grupo tratado apenas com PTX-LDE, onde houve diminuição da porcentagem dessas células.

O aumento da porcentagem de células musculares lisas no grupo tratado com a combinação pode estar relacionado com a diminuição de macrófagos na camada íntima pela redução de seu recrutamento, uma vez que os macrófagos ativados induzem potencialmente a apoptose nas células musculares lisas, por meio da

interação direta célula-célula, intermediada por proteínas de superfície ativadoras de apoptose (BOYLE *et al.*, 2001).

Por outro lado, em relação ao efeito das estatinas sobre a viabilidade celular, diferenças foram descritas na indução de apoptose em macrófagos e em células musculares lisas. Essas diferenças podem estar relacionadas com o nível de atividade da HMG-CoA redutase em diferentes tipos celulares. Ao inibirem a HMG-CoA redutase, as estatinas também inibem a síntese de mevalonato, um precursor importante de produtos como o GPP e o FPP, que são responsáveis pela isoprenilação das proteínas intracelulares. Como macrófagos arteriais consomem três vezes mais oxigênio do que células musculares lisas, possivelmente são mais sensíveis à inibição da isoprenilação de proteínas, o que interfere na função de receptores de membrana ou mensageiros intermediários e, consecutivamente, na sua viabilidade (CROONS *et al.*, 2010).

Além disso, em contraste com outros tipos celulares, os receptores B/E em macrófagos ligam-se fortemente à lipoproteínas remanescentes ricas em ésteres de colesterol (β-VLDL), ligação essa mediada pela Apo E (JAAKKOLA; NIKKARI, 1990). Cabe lembrar que a LDE adquire apo E na circulação, que faz com que a partícula seja reconhecida por estes receptores e carreie, neste caso, o PTX ao interior das células.

Outro fato importante é que a presença de macrófagos aumenta a captação de lipoproteínas que contém apo E pelas células musculares lisas, independentemente do fenótipo expresso por elas (RENNIK et al., 1994), e quando incubadas isoladamente, as células musculares lisas possuem um controle mais refinado da regulação retroativa dos receptores (JAAKKOLA; NIKKARI, 1990). Em conjunto, esses dados podem sugerir um maior efeito da associação terapêutica

sobre macrófagos, porém, mais estudos são necessários a fim de elucidar os possíveis mecanismos de ação da associação de PTX-LDE e sinvastatina.

De acordo com os resultados demonstrados neste estudo, além de aumento de colágeno, houve o aumento da razão entre α-actina e RAM-11 na lesão aterosclerótica dos animais tratados com PTX-LDE e sinvastatina. Estes resultados sugerem que o PTX-LDE combinado à sinvastatina modifica significativamente a composição da placa para uma forma mais estável de lesão.

De particular importância é a constatação de que o PTX-LDE reduziu a área lesionada com uma potência maior à de uma estatina no modelo experimental. Outra observação importante diz respeito aos benefícios sinérgicos da combinação de PTX-LDE com sinvastatina, que não só resultou em redução das lesões ateroscleróticas, mas também em mudanças na sua conformação. Os benefícios do tratamento com PTX-LDE em combinação com sinvastatina podem estar associados com alterações sugestivas de um fenótipo de placa mais estável. Diante disso, as nossas observações sugerem que a combinação de PTX-LDE com sinvastatina pode resultar em benefícios antiateroscleróticos adicionais em comparação com o tratamento com o uso isolado de PTX-LDE ou de sinvastatina.

# 7 CONCLUSÃO

## 7 CONCLUSÃO

- Pelo exposto até o momento, o tratamento com sinvastatina combinada ao PTX-LDE mostrou eficácia semelhante à observada no tratamento apenas com PTX-LDE na redução da área das lesões ateroscleróticas, sendo seu efeito maior do que o observado no grupo tratado apenas com sinvastatina;

- O tratamento combinado, porém, mostrou maior efeito na composição das lesões, em relação à presença de colágeno, macrófagos e células musculares lisas, em comparação aos grupos tratados apenas com PTX-LDE ou sinvastatina, modificando a conformação da lesão, com alterações sugestivas de um fenótipo de placa mais estável;

- Nenhum dos tratamentos levou a alterações no consumo de ração, peso corporal ou nos perfis hematológico e renal dos animais. As alterações observadas nos parâmetros de função hepática em todos os grupos sugerem toxicidade hepática pelo consumo de colesterol, e não toxicidade dos tratamentos. Já em relação ao perfil lipídico, houve efeito hipolipemiante dos tratamentos apenas nos grupos nos quais a sinvastatina foi administrada.

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADES, A.; CARVALHO, J. P.; GRAZIANI, S. R.; AMÂNCIO, R. F.; SOUEN, J. S.; PINOTTI, J. A.; MARANHÃO, R. C. Uptake of a cholesterol-rich emulsion by neoplastic ovarian tissues. **Gynecol. Oncol**. v. 82(1), p. 84-87, 2001.

AIKAWA, M.; SUGIYAMA, S.; HILL, C.C.; VOGLIC, S.J.; RABKIN, E.; FUKUMOTO, Y.; SCHOEN, F.J.; WITZTUM, J.L.; LIBBY, P. Lipid Lowering Reduces Oxidative Stress and Endothelial Cell Activation in Rabbit Atheroma. **Circulation.** v.106, p.1390-1396, 2002.

ALLISON, A. C. Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward. **Immunopharmacology**. v. 47(2-3), p. 63-83, 2000.

ARMITAGE, J. The safety of statins in clinical practice. **Lancet**. v. 370(9601), p. 1781-90, 2007.

AZEVEDO, C. H.; CARVALHO, J. P.; VALDUGA, C. J.; MARANHÃO, R. C. Plasma Kinetics and Uptake by the Tumor of a Cholesterol-rich Microemulsion (LDE) Associated to Etoposide Oleate in Patients with Ovarian **Carcinoma Gynecol Oncol**. v. 97(1), p. 178-182, 2005.

BALLANTYNE, C.M. Current thinking in lipid lowering. **Am J Med**. v. 104(6A), p. 33S-44S, 1998.

BELLOT, R.; POUNA, P.; ROBERT, J. Separation and determination of lipossomal and non-lipossomal daunorubicin from the plasma of patients treated with daunoxone. **J. Chromatogr B**. v. 757, p. 257, 2001.

BERLINER, J. A.; TERRITO, M. C.; SEVANIAN, A.; RAMIN, S.; KIM, J. A.; BAMSHAD, B.; ESTERSON, M.; FOGELMAN, A. M. Minimally modified low densitylipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. **J. Clin. Invest**., v. 85, p.1260-1266, 1990.

BOYLE, J. J.; BOWYER, D. E.; WEISSBERG, P. L.; BENNETT, M. R. Human blood derived macrophages induce apoptosis in human plaque derived vascular smooth muscle cells by Fas ligand/Fas interactions. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v.21(9), p. 1402-7, 2001.

BRAHN, E.; TANG, C.; BANQUERIGO, M. L. Regression of collagen-induced arthritis with taxol, a microtubule stabilizer. **Arthritis Rheum**. v. 37, p. 839, 1994.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. A Receptor-Mediated Pathway for Cholesterol Homeostasis. **Science***, v.* 232, p. 34-47, 1986.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Atherosclerosis. Scavenging for receptors. **Nature**. v. 343(6258), p. 508-509, 1990.

BULGARELLI, A.; LEITE, A. C. Jr.; DIAS, A. A.; MARANHÃO, R. C. Anti-atherogenic effects of methotrexate carried by a lipid nanoemulsion that binds to LDL receptors in cholesterol-fed rabbits. **Cardiovasc Drugs Ther**. no prelo, 2013.

BUSTOS, C.; HERNANDEZ-PRESA, M. A.; ORTEGO, M.; TUNON, J.; ORTEGA, L.; PEREZ, F.; DIAZ, C.; HERNANDEZ, G.; EGIDO, J. HMG-CoA Reductase Inhibition by Atorvastatin Reduces Neointimal Inflammation in a Rabbit Model of Atherosclerosis. **J Am Coll Cardiol**. v. 32, p. 2057-64, 1998.

CHALASANI, N. Statina and hepatotoxicity: focus on patients with fatty liver. **Hepatology**. v. 41(4), p. 690-5, 2005.

CHAN, E. S. L.; CRONSTEIN, B. N. Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases. **Arthritis Res***.* v. 4, p. 266-273, 2002.

CHARO, I.F.; TAUB, R. Anti-inflammatory therapeutics for the treatment of atherosclerosis. **Nature Reviews**. v.10, p.365-76, 2011.

CHAROENWANTHANANG, P.; LAWANPRASERT, S.; PHIVTHONG-NGAM, L.; PIYACHATURAWAT, P.; SANVARINDA, Y.; PORNTADAVITY, S. Effects of Curcuma comosa on the expression of atherosclerosis-related cytokine genes in rabbits fed a high-cholesterol diet. **Journal of Ethnopharmacology.** v.134 (3), p. 608-13, 2011.

CHOY, P. C.; SIOW, Y. L.; MYMIN, D.; KARMIN, O. Lipids and atherosclerosis. **Biochem. Cell Biol**., v.82, p. 212-224, 2004.

COHEN, D. E.; ANANIA, F. A.; CHALASANI, N.; National Lipid Association Statin Safety Task Force Liver Expert Panel. An assessment of statin safety by hepatologists. **Am J Cardiol**. v. 97(8A), p. 77C-81C, 2006.

COLHOUN, H. M.; BETTERIDGE, D. J.; DURRINGTON, P. N.; HITMAN, G. A.; NEIL, H. A.; LIVINGSTONE, S. J.; THOMASON, M. J.; MACKNESS, M.I.; CHARLTON-MENYS, V.; FULLER, J. H.; CARDS investigators. Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Colllaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS): multicenter randomized placebo-controlled trial. **Lancet**. v. 364(9435), p. 685-96, 2004.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins***:* patologia estrutural e funcional. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan S. A., p. 445-456, 2000.

CRISBY, M.; NORDIN-FREDRIKSSON, G.; SHAH, P. K.; YANO, J.; ZHU, J.; NILSSON, J. Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization. **Circulation**. v. 103, p. 926–33, 2001.

CROONS, V.; DE MEYER, I.; HOUTEN, S. M.; MARTINET, W.; BULT, H.; HERMAN, A. G.; DE MEYER, G. R. Effect of statins on the viability of macrophages and smooth muscle cells. **J Cardiovasc Pharmacol.** v. 55(3), p. 269-75, 2010.

CUTOLO, M.; BISSO, A.; SULLI, A.; FELLI, L.; BRIATA, M.; PIZZORNI, C. Antiproliferative and antiinflammatory effects of methotrexate on cultured differentiating myeloid monocytic cells (THP-1) but not on synovial macrophages from rheumatoid arthritis patients. **J Rheumatol**. v. 27, p. 2551-2557, 2000.

CUTOLO, M.; SULLI, A.; PIZZORNI, C.; SERIOLO, B.; STRAUB, R. H. Anti-inflammatory machanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**. v. 60, p. 729-735, 2001.

DAVID-COUTO, R.; DALLAN, L. A. O.; LISBOA, L. A. F.; KAWABE, L. T.; DE OLIVEIRA, S. A.; MARANHÃO, R. C. Deposition of cholesterol from a lipid microemulsion in fragments of blood vessels excised from patients during coronary bypass surgery. **Lipids**. v. 42(5), p. 411-418, 2007.

DAY, A. J.; SHEERS, M. Synthesis and removal of different cholesterol esters by aortic smooth muscle cells in culture. **Atherosclerosis**. v. 26, p. 483-92, 1977.

DEGEORGE, J. J.; AHN, C. H.; ANDREWS, P. A.; BROWER, M. E.; GIORGIO, D. W.; GOHEER, M. A.; HAM, D. Y. L.; MCGUINN, W. D.; SUN, C. J.; TRIPATHI, S. C. Regulatory considerations for preclinical development of anticancer drugs. **Journal of Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v.41(3), p.173-185, 1997.

DEL REAL, G.; JIMÉNEZ-BARANDA, S.; MIRA, E.; LACALLE, R. A.; LUCAS, P.; GÓMEZ-MOUTÓN, C.; ALEGRET, M.; PEÑA, J. M.; RODRÍGUEZ-ZAPATA, M.; ALVAREZ-MON, M.; MARTÍNEZ-A, C.; MAÑES, S. Statins inhibit HIV-1 infection by down-regulating Rho activity. **J Exp Med**. v. 200(4), p. 541-7, 2004.

DEVITA, V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. **Cancer:** Principles & Practice of Oncology. 7th Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. CD-ROM.

DONTAS, I. A.; MARINOU, K. A.; ILIOPOULOS, D.; TSANTILA, N.; AGROGIANNIS, G.; PAPALOIS, A.; KARATZAS, T. Changes of blood biochemistry in the rabbit animal model in atherosclerosis research; a time- or stress-effect. **Lipids Health Dis**. v. 10, p. 139-45, 2011.

DORLHIAC-LLACER, P. E.; MARQUEZINI, M. V.; TOFFOLETTO, O.; CARNEIRO, R. C. G.; MARANHÃO, R. C.; CHAMONE, D. A. F. In vitro cytotoxicity of the LDE:

daunorubicin complex in acute myelgenous leukemia blast cells. **Braz. J. Med. Biol. Res**. v. 34(10), p. 1257-1263, 2001.

DZAU, V. J.; BRAUN-DULLAEUS, R. C., SEDDING, D. G. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. **Nat Med**, v. 8(11), p.1249-1256, 2002.

EATON, C. B. Traditional and emerging risk factors for cardiovascular disease. **Prim. Care**, v. 32, p. 963-976i, 2005.

ELKIND, M. S. V.; SCIACCA, R.; BODEN-ABDALA, B. Leukocyte count is associated with aortic arch plaque thickness. **Stroke**. v. 33, p. 2587-2592, 2002.

FIRESTONE, R. A. Low-density lipoprotein as a vehicle for targeting antitumor compounds to cancer cells. **Bioconjugate Chem**. v. 5, p. 105–113, 1994.

FITZPATRICK, F.A.; WHEELER, R. The immunopharmacology of paclitaxel (Taxol®), docetaxel (Taxotere®), and related agents. **International Immunopharmacology**. v. 3, p. 1699-1714, 2003.

FONSECA, F. A. Pharmacokinetics of statins. **Arq Bras Cardiol.** v. 85(5), p. 9-14, 2005.

FROSTEGÅRD, J.; HAEGERSTRAND, A.; GIDLUND, M.; NILSSON, J. Biologically modified LDL increases the adhesive properties of endothelial cells. **Atherosclerosis.** v. 90(2-3), p. 119-26, 1991.

FROSTEGÅRD, J.; NILSSON, J.; HAEGERSTRAND, A.; HAMSTEN, A.; WIGZELL, H.; GIDLUND, M**.** Oxidized low density lipoprotein induces differentiation and adhesion of human monocytes and the monocytic cell line U937. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 87(3), p. 904-8, 1990.

GAL, D.; MACDONALD, P. C.; PORTER, J. C.; SMITH, J. W.; SIMPSON, E. R. Effect of cell density and confluency on cholesterol metabolism in cancer cells in monolayer culture. **Cancer Res***.* v. 41(2), p. 473-477, 1981.

GENG, y.j.; LIBBY, P. Progression of atheroma: a struggle between death and procreation. **Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.** v. 22, p. 1370-1380, 2002.

GINSBURG, G. S.; SMALL, D. M.; ATKINSON, D. Microemulsions of phospholipids and cholesterol esters. Protein-free models of low density lipoprotein. **J. Biol. Chem***.,* v.57, p.8216-8227, 1982.

GLASS. C. K; WITZTUM, J. L. Atherosclerosis: The road ahead. **Cell**., v.104, p.503-516, 2001.

GONZALEZ-GAY, M. A.; GONZALEZ-JUANATEY, C.; MARTIN, J. Rheumatoid arthritis: a disease associated with accelerated atherogenesis. **Semin Arthritis Rheum***.* v. 35(1), p. 8-17, 2005.

GOLDMAN, F.; HOHL, R. J.; CRABTREE, J.; LEWIS-TIBESAR, K.; KORETZKY, G. Lovastatin inhibits T cell antigen receptor signaling independent of its effects on ras. **Blood**. v. 88, p. 4611-19, 1996.

GRAZIANI, S. R.; IGREJA, F. A. F.; HEGG, R.; MENEGHETTI, C.; BRANDIZZI, L. I.; BARBOZA, R.; AMÂNCIO, R. F.; PINOTTI, J. A.; MARANHAO, R. C. Uptake of a cholesterol rich-emulsion by breast cancer. **Gynecol Oncol**. v. 85, p. 493-497, 2002.

GUIJARRO, C; BLANCO-COLIO, L. M.; ORTEGO, M.; ALONSO, C.; ORTIZ, A.; PLAZA, J. J. 3 Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase and isoprenylation inhibitors induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture. Circulation Research. v. 83, p. 490–500, 1998.

HAMELIN, B.A.; TURGEON, J. Hydrophilicity:lipophilicity: relevance for the pharmacology and clinical effects of HMG-CoA reductase inhibitors. **Trends Pharmacol Sci**. v.19, p. 26–37, 1998.

HELDMAN, A. W.; CHENG, L.; JENKINS, G. M.; HELLER, P.F.; KIM, D. W.; WARE, M. J. R.; NATER, C.; HRUBAN, R. H.; REZAI, B.; ABELLA, B.S.; BUNGE, K. E.; KINSELLA, J. L.; SOLLOTT, S. J.; LAKATTA, E. G.; BRINKER, J. A.; HUNTER, W. L.; FROEHLICH, J. P. Paclitaxel stent coating inhibits neointimal hyperplasia at 4 weeks in a porcine model of coronary restenosis. **Circulation**. v. 103, p. 2289-2295, 2001.

HO, Y. K.; SMITH, R. G.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Low-Density Lipoprotein (LDL) Receptor Activity in Human Acute Myelogenous Leukemia Cells. **Blood**. v. 52, p. 1099, 1978.

HOMMA, Y. Predictors of atherosclerosis. **J. Atheroscler Thromb**., v.11, p.265-270, 2004.

HORWITZ, S. B. Mechanism of action of taxol. **Science**. v. 13, p. 134-136, 1992.

HORWITZ S. B.; COHEN D.; RAO S.; RINGEL I.; SHEN H. J.; YANG C. P. Taxol: mechanisms of action and resistant. **J. Natl. Cancer Inst. Monogr**.,v.15, p.55-61, 1993.

ICHIHARA, K.; SATOH, K. Disparity between angiographic regression and clinical events rates with hydrophobic statins. **Lancet**. v. 359(9324), p. 2195-8, 2002.

INAMI, S.; OKAMATSU, K.; TAKANO, M.; TAKAGI, G.; SAKAI, S.; SANO, J. Effects of statins on circulating oxidized low-density lipoprotein in patients with hypercholesterolemia. **Jpn Heart J**. v. 45, p. 969–75, 2004.

INOUE, T.; HAYASHI, M.; TAKAYANAGI, K.; MOROOKA, S. Lipid-lowering therapy with fluvastatin inhibits oxidative modification of low density lipoprotein and improves vascular endothelial function in hypercholesterolemic patients. **Atherosclerosis**. v. 160, p. 369–76, 2002.

ISTVAN, E. S.; DEISENHOFER, J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. **Science***;* v. 292, p. 1160–4, 2001.

JAAKKOLA, O.; NIKKARI T. Lipoprotein degradation and cholesterol esterification in primary cell cultures of rabbit atherosclerotic lesions**. Am J Pathol.** v. 137(2), p. 457-65, 1990.

JORGE, P. A.; ALMEIDA, E. A.; OZAKI, M. R.; JORGE, M.; CARNEIRO, A. Effects of atorvastatin, fluvastatin, pravastatin, and simvastatin on endotelial function, lipid peroxidation, and aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. **Arq. Bras. Cardiol.** v. 84 (4), p. 314-9, 2005.

JURCIC, J. G.; SCHEINBERG, D. A.; HOUGHTON, A. N. Monoclonal antibody therapy of cancer. **Cancer Chemother Biol Response Modif**. v. 16, p. 168-188, 1996.

KADAR A, GLASZ T. Development of atherosclerosis and plaque biology. **Cardiovasc Surg**. v. 9(2), p. 109-121, 2001.

KAN, P.; CHEN, Z. B.; LEE, C. J.; CHU, I. M. Development of nonionic surfactant/phospholipid o/w emulsion as a paclitaxel delivery system. **J Control Release**. v. 58(3), p. 271-278, 1999.

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**, v.99, p.3110-3117, 1999.

KINGSTON, D. G. I.*;* Taxol, a molecule for all seasons. **Chem. Commun**. p. 867-880, 2001.

KNAPP, A.C.; HUANG, J.; STARLING, G.; KIENER, P.A. Inhibitors of HMG CoA reductase sensitize human smooth muscle cells to Fas-ligand and cytokine-induced cell death. **Atherosclerosis**. v. 152, p. 217-27, 2000.

KOBA, S.; PAKALA, R.; WATANABE, T.; KATAGIRI, T.; BENEDICT, C. R. Synergistic interaction between thromboxane A2 and mildly oxidized low density lipoproteins on vascular smooth muscle cell proliferation. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**. v. 63(6), p. 329-35, 2000.

KOH, K. K. Effects of statins on vascular wall: vasomotor function, inflammation, and plaque stability. **Cardiovasc Res**. v. 47(4), p. 648-57, 2000.

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

KUGIYAMA, K.; KERNS, S. A.; MORRISETT, J. D.; ROBERTS, R.; HENRY, P. D. Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by lysolecithin in modified low-density lipoproteins. **Nature**. v. 344(6262), p. 160-2, 1990.

LEE, R.M.; MASAKI, T.; YANG, H.S.; LIU, J.; CHEN, J.; LI, L.; BLUMENTHAL, D.K.; CHEUNG, A.K. Different Signaling Responses to Anti-Proliferative Agents in Human Aortic and Venous Smooth Muscle Cells. **Journal of Cellular Biochemistry.** v. 99, p. 835-844, 2006.

LEUNG, B. P.; SATTAR, N.; CRILLY, A.; PRACH, M.; MCCAREY, D. W.; PAYNE, H.; MADHOK, R.; CAMPBELL, C.; GRACIE, J. A.; LIEW, F. Y.; MCINNES, I. B. **A novel anti-inflammatory role for simvastatin in inflammatory arthritis. J Immunol**. v. 170(3), p. 1524-30, 2003.

LIAO, J. K. Statin therapy for cardiac hypertrophy and heart failure. **J Investig Med**. v. 52(4), p. 248-53, 2004.

LIBBY, P; AIKAWA, M. Mechanism of plaque stabilization with statins. **The American Journal of Cardiology**. v. 91 (4), p. 4-8, 2003.

LIBBY, P.; OKAMOTO, Y.; FOLCO, E. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. Circ. J. v.74, p.213-20, 2010.

LIBBY, P.; THEROUX, P. Phatophysiology of coronary artery disease. **Circulation**, v.111, p.3481-3488, 2005.

LO PRETE, A. C.; MARIA, D. A.; RODRIGUES, D. G.; VALDUGA, C. J.; IBAÑEZ, O. C. M.; MARANHÃO, R. C. Evaluation in melanoma-bearing mice of an etoposide derivative associated to a cholesterol rich-microemulsion. **J Pharm Pharmacol**. v. 58(6), p. 801-8, 2006.

LUNDBERG, B. The solubilization of lipophilic derivates of podophyllotoxins in sub-micron sized lipid emulsions and their cytotoxic activity against cancer cells in culture. **Int. J. Pharm**. v.109, p. 73, 1994.

LUSIS, A. J.; MAR, R.; PAJUKANTA, P. Genetics of atherosclerosis. **Annu. Ver. Hum. Genet**, v. 5, p.189-218, 2004

MANFREDI, J. J.; HORWITZ, S. B. Taxol: an antimitotic agent with a unique mechanism of action. **Pharmacol. Ther**. v. 25, p. 83-125, 1984.

MARANHÃO, R. C.; CESAR, T. B.; PEDROSO, M. T. B.; HIRATA, M. H.; MESQUITA, C. H. Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling low density lipoprotein. **Lipids**. v. 28, p. 691-696, 1993.

MARANHÃO, R. C.; FERES, M. C.; MARTINS, M. T.; MESQUITA, C. H.; TOFFOLETTO, O.; VINAGRE, C. G. C.; GIANINNI, S. D.; PILEGGI, F.; Plasma

kinetic behavior in hyperlipidemic subjects of a lipidic microemulsion that binds to LDL receptors. **Lipids**. v. 32, p. 627-633, 1997.

MARANHÃO, R.C.; GARICOCHEA, B., SILVA, E.L.; LLACER, P.D.; PILEGGI, F.J.C.; CHAMONE, D.A.F. Increased plasma removal of microemulsions resembling the lipid phase of low-density lipoproteins (LDL) in patients with acute myeloid leukemia: a possible new strategy for the treatment of the disease. **Brasilian J. Med. Biol. Res**. v.25(9), p.1-5, 1992.

MARANHÃO, R.C.; GRAZIANI, S.R.; YAMAGUCHI, N.; MELO, R.F.; LATRILHA, M.C.; RODRIGUES, D.G; COUTO, R.D.; SCHREIER, S.; BUZAID, A. C. Association of carmustine with a lipid emulsion: in vitro, in vivo and preliminary studies in cancer patients. **Cancer Chemother. Pharmacol**. v. 49(6), p. 487-498, 2002.

MARANHÃO, R. C.; TAVARES, E. R.; PADOVEZE, A. F.; VALDUGA, C. J.; RODRIGUES, D. G.; PEREIRA, M. D. Paclitaxel associated with cholesterol-rich nanoemulsions promotes atherosclerosis regression in the rabbit. **Atherosclerosis**. v. 197, p. 959-966, 2008.

MARANHÃO, R. C.; TERCYAK, A. M.; REDGRAVE, T. G. Effects of cholesterol content on the metabolism of protein-free emulsion models of lipoproteins. **Biochem. Biophys. Acta**. v. 875(2), p. 247-255, 1986.

MARTINET, W.; KNAAPEN, M.W.M.; DE MEYER, G.R.Y.; HERMAN, A.G.; KOCKX, M.M. Oxidative DNA Damageand Repair in Experimental Atherosclerosis Are Reversed by Dietary Lipid Lowering **Circ. Res**. v.88, p. 733-739, 2001.

MCFARLANE, S. I.; MUNIYAPPA, R.; FRANCISCO, R. Pleiotropic effects of statins: lipid reduction and beyond. **Clin Endocrinol Metab**. v. 87, p. 1451-8, 2002.

MCFARLANE, S. I.; MUNIYAPPA, R.; SHIN, J. J.; BAHTIYAR, G.; SOWERS, J. R. Osteoporosis and cardiovascular disease: brittle bones and boned arteries, is there a link? **Endocrine**. v. 23(1), p. 1-10, 2004.

MOURA JA, VALDUGA CJ, TAVARES ER, KRETZER IF, MARIA DA, MARANHÃO RC. Novel formulation of a methotrexate derivative with a lipid nanoemulsion. **Int J Nanomedicine**. v. 6, p. 2285-95, 2011.

McTAGGART, F. Comparative pharmacology of rosuvastatin. **Atheroscler Suppl**. V. 4(1), p. 9-14, 2003.

MEHRA, M. R.; RAVAL, N. Y. Metaanalysis of statins and survival in de novo cardiac transplantation. **Transplant Proc**. v. 36(5), p. 1539-41, 2004.

MOSLEY, S. T.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S.; FALCK, J. R.; ANDERSON, R. G. Targeted killing of cultured cells by receptor-dependent photosensitization. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 78(9), p. 5717-21, 1981.

NADKARNI**,** S**.** K**.;** BOUMA**,** B**.** E**.;** DE BOER**,** J**.;** TEARNEY**,** G**.** J. Evaluation of collagen in atherosclerotic plaques: the use of two coherent laser based imaging methods. **Lasers Med Sci**. v. 24(3), p. 439-45, 2009.

NAOUM, F.A.; GUALANDRO, S.E.; LATRILHA, M.C.; MARANHÃO, R.C. Plasma kinetics of a cholesterol-rich microemulsion in subjects with heterozygous beta-thalassemia. **Am. J. Hematol**. v.77(4), p.340-5, 2004.

NEWBY AC, ZALTSMAN AB. Fibrous cap formation or destruction—the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation. **Cardiovasc Res.** v. 41, p. 345–360, 1999.

OGA, S. Associação Medicamentosa. In: OGA, S.; BASILE, A.C.; CARVALHO, M.F. **Guia Zanini-Oga de interações medicamentosas**. Säo Paulo. Atheneu, p. 3-22, 2002.

OHARA, Y.; PETERSON, T. E.; SAYEGH, H.S.; SUBRAMANIAN, R. R.; WILCOX, J. N.; HARRISON, D. G. Dietary correction of hypercholesterolemia in the rabbit normalizes endothelial superoxide anion production. **Circulation**. v. 92(4), p. 898-903, 1995.

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**. v. 15, p. 131-139, 1993.

PARKER, R. A.; HUANG, Q.; TESFAMARIAM, B. Influence of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase inhibitors on endothelial nitric oxide synthase and the formation of oxidants in the vasculature. **Atherosclerosis**. v. 169(1), p. 19-29, 2003.

PARNESS, J.; HORWITZ, S. B. Taxol binds to polymerized tubulin in vitro. **J Cell Biol**. v. 91, p. 479-487, 1981.

PATTERSON, C.; MAPERA, S.; LI, H.; MADAMANCHI, N.; HILLIARD, E.; LINEBERGER, R.; HERRMANN, R.; CHARLES, P. Comparative Effects of Paclitaxel and Rapamycin on Smooth Muscle Migration and Survival Role of Akt-Dependent Signaling. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v.26, p.1473-1480, 2006.

PAZDUR, R.; KUDELKA, A. P.; KAVANAGH, J. J.; COHEN, P. R.; RABER, M. N. The taxoids: paclitaxel (Taxol®) and docetaxel (Taxotere®). **Cancer treatment reviews**. v. 19, 351-386, 1993.

PLUTZKY, J. The vascular biology of atherosclerosis. **Am. J. Med**., v.115, p.55S-61S, 2003.

PRODANOWICH, S.; MA, F.; TAYLOR, J. R.; PEZON, C.; FASIHI, T.; KIRSNER, R. S. Methotrexate reduces incidence of vascular diseases in veterans with psoriasis and rheumatoid arthritis. **J Am Acad Dermatol**. v. 2(2), p. 262-267, 2005.

QIAO, Z.; REN, J.; CHEN, H. Simvastatin Reduces Expression and Activity of Lipoprotein-associated Phospholipase A2 in the Aorta of Hypercholesterolaemic Atherosclerotic Rabbits. **The Journal of International Medical Research.** v. 37, p. 1029-1037, 2009.

REILLY, M. P.; PRATICÒ, D.; DELANTY, N.; DIMINNO, G.; TREMOLI, E.; RADER, D.; KAPOOR, S.; ROKACH, J.; LAWSON, J.; FITZGERALD, G. A. Increased formation of distinct F2 isoprostanes in hypercholesterolemia. **Circulation**. v. 98(25), p. 2822-8, 1998.

RENNIK, R. E.; CAMPBELL, J. H.; CAMPBELL, G. R. Macrophages enhance binding of beta-VLDL and cholesterol ester accumulation in cultured aortic smooth muscle cells. **Heart Vessels**. v. 9(1), p. 19-29, 1994.

RENSEN, P. C.; SCHIFFELERS, R. M.; VERSLUIS, A. J.; BIJSTRBOSCH, M. K.; VAN KUIJK-MEUWISSEN, M. E.; VAN BERKEL, T. J. Human recombinant apolipoprotein E-enriched lipossomes can mimic low-density lipoproteins as carriers for the site-specific delivery of antitumor agents. **Mol Pharmacol**. v. 52, p. 445-55, 1997.

RICCIARELLI, R.; ZINGG, J-M.; AZZI, A. Vitamin E reduces the uptake of oxidized LDL by inhibiting CD 36 scavenger receptor expression in cultured aortic smooth muscle cells. **Circulation**, v.102, p.82-87, 2000.

RIDKER, P. M.; GENEST, J.; LIBBY, P. Risk factors of atherosclerotic disease. *In* **Heart disease**: a textbook of cardiovascular medicine. E. Braunwald, D. P. Zipes, P. Libby, editors. Philadelphia: WB Saunders Company, 2001. p. 1010-1039.

RODRIGUES, D. G.; COVOLAN, C. C.; CORADI, S. T.; BARBOZA, R.; MARANHÃO, R. C. Use of a cholesterol- rich emulsion that binds to low-density lipoprotein receptors as a vehicle for paclitaxel. **J. Pharm. and Pharmacol**. v. 54(6), p. 765-772, 2002.

RODRIGUES, D. G.; MARIA, D. A.; FERNANDES, D. C.; VALDUGA, C. J.; COUTO, R. D.; IBANEZ, O. C.; MARANHÃO, R. C. Improvement of paclitaxel therapeutic index by derivatization and association to a cholesterol-rich microemulsion: *in vitro* and *in vivo* studies. **Cancer Chemother Pharmacol**. v. 55(6), p. 565-576, 2005.

RODRIGUEZA, W. V.; KLIMUK, S. K.; PRITCHARD, P. H.; HOPE, M. J. Cholesterol mobilization and regression of atheroma in cholesterol-fed
rabbits induced by large unilamellar vesicles. **Biochem Biophys Acta**. v. 1368, p. 306-320, 1998.

ROSOWSKY, A.; FORSCH, R. A.; YU, C. S.; LAZARUS, H.; BEARDSLEY, G. P. Methotrexate analogues. 21. Divergent influence of alkyl chain length on the dihydrofolate reductase affinity and cytotoxicity of methotrexate monoesters. **J Med Chem**. v. 27(5), p. 605-609, 1984.

ROSS, R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. **N. Eng. J. Med**. v.14, p.340-2, 1999.

ROWINSKY, E. K.; CAZENAVE, L. A. DONEHOWER, R. C. Taxol - a novel investigational antimicrotubule agent. **J. Natl. Cancer Inst***.* v.82, p. 1247-1259, 1990.

ROWINSKY, E. K.; EISENHAUER, E. A.; CHAUDHRY, V.; ARBUCK, S. G.; DONEHOWER, R. C. Clinical toxicities encountered with paclitaxel (Taxol). **Semin Oncol**. v. 4(3), p. 1-15, 1993.

SCALIA, R.; APPEL, J. Z. 3RD.; LEFER, A. M. Leukocyte-endothelium interaction during the early stages of hypercholesterolemia in the rabbit: role of P-selectin, ICAM-1, and VCAM-1. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v. 18(7), p. 1093-100, 1998.

SCHIFF, P. B.; FANT, J.; HORWITZ, S. B. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. **Nature**. v. 7, p. 277:665, 1979.

SENGUPTA, S.; TYAGI, P.; VELPADIAN, T.; GUPTA, Y. K.; GUPTA, S. K. Etoposide encapsulated in positively charged lipossomes: pharmacokinetic studies in mice and formulation stability studies. **Pharnacol. Res**. v. 42(5), p. 459-464, 2000.

SERAJUDDIN, A. T. M.; RANADIVE, S. A.; MAHONEY, E. M. Relative lipophilicities, solubilities, and structure-pharmacological considerations of 3-hydroxy-3 methylglutaryl-coenzyme A (HMGCoA) reductase inhibitors pravastatin, lovastatin, mevastatin, and simvastatin. **J Pharm Sci.** v. 80, p. 830–4, 1991.

SEVER, P. S.; DAHLÖF, B.; POULTER, N. R.; WEDEL, H.; BEEVERS, G.; CAULFIELD, M.; COLLINS, R.; KJELDSEN, S. E.; KRISTINSSON, A.; MCINNES, G. T.; MEHLSEN, J.; NIEMINEN, M.; O'BRIEN, E.; OSTERGREN, J.; ASCOT investigators. Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial--Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomised controlled trial. **Lancet**. v. 361(9364), p. 1149-58, 2003.

SHIOMI M, ITO T. Effect of cerivastatin sodium, a new inhibitor of HMG-CoA reductase, on plasma lipid levels, progression of atherosclerosis, and the lesional composition in the plaques of WHHL rabbits. **Br J Pharmacol**. v. 126, p. 961–968, 1999.

SOLLOT, S. J.; CHENG, L.; PAULY, R. R.; JENKINS, G. M.; MONTICONE, R. E.; KUZUYA, M.; FROEHLICH, J. P.; CROW, M. T.; LAKATTA, E. K.; KINSELLA, J. L. Taxol Inhibits Neointimal Smooth Muscle Cell Accumulation after Angioplasty in the Rat. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 95, p. 1869-1735, 1995.

STAELS, B. A cholesterol tether. **Nature**. v. 417, p. 699-701, 2002.

STAFFA, J. A., CHANG, J., GREEN, L. Cerivsatatin and reports of fatal rhabdomyolisis. **N Engl J Med**. v. 346(7), p. 539-40, 2002.

STEIN, Y.; STEIN, O. Does therapeutic intervention achieve slowing of progression or bona fide regression of atherosclerotic lesions? **Arterioscler Thromb. Vasc. Biol**. v. 21, p. 183-188, 2001.

STOCKER, R.; KEANEY JUNIOR, J. F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis**. Physiol. Rev.**, v.84, p.1381-1478, 2004.

STONE, G.W.; ELLIS, S. G.; CANNON, L.; MANN, J. T.; GREENBERG, J. D.; SPRIGGS, D.; O'SHAUGHNESSY, C. D.; DEMAIO, S.; HALL, P.; POPMA, J. J.; KOGLIN, J.; RUSSELL, M. E. 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**. v. 294(10), p. 1215-1223, 2005.

TAVARES, E. R.; FREITAS, F. R.; DIAMENT, J.; MARANHÃO, R. C. Reduction of atherosclerotic lesions in rabbits treated with etoposide associated with cholesterol-rich nanoemulsions. **Int J Nanomedicine**. v. 6, p. 2297-304, 2006.

TEIXEIRA, R. S.; VALDUGA, C. J.; BENVENUTTI, L. A.; SCHREIER, S.; MARANHÃO, R. C. Delivery of daunorubicin to cancer cells with decreased toxicity by association with a lipidic nanoemulsion that binds to LDL receptors. **J Pharm Pharmacol**. v. 60(10), p. 1287-95, 2008.

TIAN, H.; CRONSTEIN, B. N.Understanding the mechanisms of action of methotrexate. **Bull NYU Hosp Jt Dis**. v. 65(3), p. 168-173, 2007.

TOMÁS, M.; GARCÍA-FARIA, F.; VILLA, J.; TORRENTS, A.; COVAS, M.; MARRUGAT, J. Effect of simvastatin therapy on paraoxonase activity and related lipoproteins in familial hypercholesterolemic patients. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v. 20(9), p. 2113-9, 2000.

TYAGI, P.; SENGUPTA, S.; VELPADIAN, T.; GUPTA, Y. K.; KOCHUPILLAI, V.; GUPTA, S. K. Evaluation of the antitumour acticity of lipossomal formulations of etoposide against choriocarcinoma xenografts in Balb/c nu/nu mice. **Pharm. Commun**. v. 5, v. 595, 1999.

VALDUGA, C. J.; FERNANDES, D. C.; LO PRETE, A. C.; AZEVEDO, C. H.; RODRIGUES, D. G.; MARANHÃO, R. C. Use of a cholesterol-rich microemulsion that binds to low-density lipoprotein receptors as vehicle for etoposide. **J Pharm Pharmacol**. v. 55(12), p. 1615-22, 2003.

VAN NIEUW AMERONGEN, G. P.; VAN HINSBERGH, V. W. M. Targets for pharmacological intervention of endothelial hyperpermeability and barrier function. **Vascular Pharmacology**. v. 39, p. 257– 272, 2003.

VAN TITS, L. J.; SMILDE, T. J.; VAN WISSEN, S.; DE GRAAF, J.; KASTELEIN, J. J.; STALENHOEF, A. F. Effects of atorvastatin and simvastatin on low-density lipoprotein subfraction profile, low-density lipoprotein oxidizability, and antibodies to oxidized low-density lipoprotein in relation to carotid intima media thickness in familial hypercholesterolemia. **J Investig Med**. v. 52, p. 177–84, 2004.

VAUGHAN, C. J., GOTTO, A. M. Jr., BASSON, C. T. The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. **J Am Coll Cardiol.** v. 35(1), p. 1-10, 2000.

WANI MC, TAYLOR HL, WALL, ME, COGGON P, MCPHAIL AT. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic agent from *Taxus brevifolia.* **J. Am. Chem. Soc**. v. 93, p. 2325-2327, 1971.

WEISS, R.B.; DONEHOWER, R. C.; WIERNIK, P. H.; OHNUMA, T.;, GRALLA, R. J.; TRUMP, D. L.; BAKER, J. R.; VAN ECHO, D. A.; VON HOFF, D. D.; LEYLAND-JONES, B. Hypersensitivity reactions from taxol. **J Clin Oncol**. v. 8(7), p. 1263-1268, 1990.

WIERNIK, P.; SCHWARTZ, E. L.; STRAUMAN, J. J.; DUTCHER, J. P.; LIPTON, R. B.; PAIETTA, E. Phase I clinical and pharmacokinetic study of taxol. **Cancer Res**. v. 47, p. 2485-2493, 1987.

WILLIAMS, K. J.; TABAS, I. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol**. v. 15, p. 551–561, 1995.

WITTES, R. E.; GOLDIN, A. Unresolved issues in combination chemotherapy. **Cancer Treat. Rep**. v.70(1), p.105-125, 1986.

WU, H.; MOULTON, K. S.; GLASS, C. K. Macrophage scavenger receptors and atherosclerosis. **Trends Cardiovasc. Med**., v.2, p. 220-225, 1992.

XU, G.; SALEN, G.; SHEFER, S.; NESS, G.C.; NGUYEN, L.B.; PARKER, T.S. ET AL., Unexpected inhibition of cholesterol 7 alpha-hydroxylase by cholesterol in New Zealand White and Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. **J Clin Invest**., v. 95, p.149-504, 1995.

YLÄ-HERTTUALA, S.; LUOMA, J.; KALLIONPPAA, H.; LAUKKANEN, M.; LEHTOLAINEN, P.; VIITA, H. Pathogenesis of atherosclerosis. **Maturitas**, v.23, p.47-49, 1996.

YLÄ-HERTTUALA, S.; PALINSKI, W.; ROSENFELD, M. E.; PARTHASARATHY, S.; CAREW, T.E.; BUTLER, S.; WITZTUM, J. L.; STEINBERG, D. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. **J. Clin. Invest**., v.84, p.1086-1095, 1989.

ZHANG, L.; LIU, Y.; LU, X.T.; WU, Y.L.; ZHANG, C. JI, X.P.; WANG, R.; LIU, C.X.; FENG, J.B.; JIANG, H.; XU, X.S.; ZHAO, Y.X.; ZHANG, Y. Traditional Chinese medication Tongxinluo dose-dependently enhances stability of vulnerable plaques: a comparison with a high-dose simvastatin therapy. **Am J Physiol Heart CircPhysiol**. v. 297, p. H2004–H2014, 2009.

ZHU, Y.; BUJO, H.; YAMAZAKI, 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**. v. 105(15), p. 1830-1836, 2002.

ZIPES, D. P.; LIBBY, P.; BONOW, R. O.; BRAUNWD, E. **Braunwald's heart disease**: a textbook of cardiovascular disease. 7 ed. Philadelphia: Saunders, 2005.

# ANEXOS

MEDICINA

USP

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

**A CEUA** do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **15.12.2010, APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **382/10** intitulado: **""Paclitaxel e metotrexato associados a uma nanoemulsão lipídica combinados à estatina na regressão da aterosclerose em coelhos"**, apresentado pela **Comissão Científica do Incor.**

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

**Pesquisador (a) Responsável: Raul Cavalcante Maranhão**

**Pesquisador (a) Executante: Tatiana Solano Vitório**

**CEP-FMUSP, 15 de dezembro de 2010.**

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

**Prof. Dr. Eduardo Massad**
**Coordenador**
**Comitê de Ética em Pesquisa**

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Av. Dr. Arnaldo , 455 – Instituto Oscar Freire 1º andar CEP 01246903 – Fone : 3061-8004
mail: cep.fmusp@hcnet.usp.br

COMISSÃO CIENTIFICA
RECEBIDO
20/12/10
Debora