

Bianca Meneghini Gomes

Uso de nanopartícula lipídica como veículo do quimioterápico docetaxel no
tratamento da aterosclerose induzida em coelhos

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

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

São Paulo

2018

DEDICATÓRIA

Ao meu grande companheiro Thiago pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, frequentes nessa fase. Sem você nenhuma conquista valeria à pena.

Aos meus pais Valter e Tais, que dignamente me apresentaram à importância da persistência e da ética. Sempre me apoiando e sempre presentes.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão, pela oportunidade de realizar este trabalho, pela confiança, orientação e pelos ensinamentos que contribuíram diretamente para a formação da profissional que sou hoje e me inspiram a continuar nessa trajetória.

Ao Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Incor-HCFMUSP, pela possibilidade de realizar este trabalho.

À Neusa, Tatiane e Juliana, funcionárias da Pós-Graduação do programa de Cardiologia do Incor, pela disponibilidade e orientação.

À equipe da Divisão Experimental do Instituto do Coração, especialmente Dra. Edna, Dario, Vicente, Pedro e Anne, pelo auxílio e manejo dos animais.

A todos os colegas do laboratório de Metabolismo e Lípidos do Incor, que participaram de forma direta ou indireta desse trabalho.

À Elaine Rufo Tavares, pela orientação essencial para que este trabalho fosse concluído. Agradeço não só à dedicação ao trabalho, mas também o incentivo e a ajuda fundamentais para meu crescimento profissional, além da amizade.

À Maria Carolina Guido pela participação ativa neste trabalho, tecnicamente e no seu desenvolvimento. Obrigada pelo apoio, por sempre estar presente e disponível e por se minha companheira de congresso e amiga.

Às minhas grandes amigas, Anne, Natalia e Suellen que de alguma forma fizeram com que tudo se tornasse mais fácil, participando de todos os momentos e vibrando com cada uma das minhas conquistas. Obrigada por embarcarem nessa comigo, por estarem presentes nos momentos importantes, nos congressos, prêmios e por me apoiarem para que eu conseguisse concluir essa jornada.

À minha família, que pacientemente me acompanhou e apoiou nessa jornada. Obrigada por entenderem minha ausência e por me darem todo o alicerce para conseguir chegar até aqui. Agradeço especialmente a minha irmã, Bruna, por sempre estar presente e na torcida e ao meu cunhado/irmão Daniel, pelas intermináveis conversas e pelo carinho.

NORMALIZAÇÃO

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

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Nanopartícula lipídica (LDE) e taxanos	5
2. OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo geral	11
2.2 Objetivos específicos	11
3. MÉTODOS	12
3.1 Animais e dieta	12
3.2 Síntese do docetaxel	14
3.3 Preparo da nanopartícula lipídica artificial e incorporação do docetaxel	16
3.4 Perfil lipídico e hematológico dos animais	17
3.5 Planimetria das lesões ateroscleróticas	17

3.6 Morfometria das lesões ateroscleróticas	18
3.7 Imunohistoquímica	19
3.8 Expressão proteica por Western blot	20
3.9 Análise estatística	22
4. RESULTADOS	23
4.1 Perfil poderal	23
4.2 Consumo de ração	24
4.3 Perfil lipídico	25
4.4 Perfil hematológico	26
4.5 Indicadores de função renal e enzimas hepáticas	28
4.6 Planimetria da lesão aterosclerótica	29
4.7 Morfometria do arco aórtico	30
4.8 Análise imunohistoquímica de células do músculo liso	32
4.9 Expressão proteica	33
4.9.1 Processo inflamatório	33
4.9.2 Proliferação celular	36
4.9.3 Morte celular	37
4.9.4 Reparo vascular	39

5	DISCUSSÃO	42
6	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS	50

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Perfil lipídico dos coelhos dos grupos Controle e LDE-DTX.
- Tabela 2** Perfil hematológico dos animais dos grupos Controle e LDE-DTX.
- Tabela 3** Marcadores de função renal e enzimas hepáticas dos grupos Controle e LDE-DTX.
- Tabela 4** Medidas da área total e da área das lesões macroscópicas das artérias dos coelhos nos grupos Controle e LDE-DTX.
- Tabela 5** Morfometria do arco aórtico de coelhos dos grupos Controle e LDE-DTX.
- Tabela 6** Área total da íntima, área marcada com alfa actina e porcentagem marcada na íntima com alfa actina dos grupos Controle e LDE-DTX.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Representação das fórmulas estruturais do docetaxel e do oleato de docetaxel.
- Figura 2** Evolução do peso dos animais dos grupos Controle e LDE-DTX.
- Figura 3** Variação do consumo de ração dos animais dos grupos Controle e LDE-DTX.
- Figura 4** Imagem representativa das aortas dos animais dos grupos Controle e LDE-DTX.
- Figura 5** Imagem representativa de cortes histológicos do arco aórtico dos coelhos dos grupos Controle e LDE-DTX.
- Figura 6** Imagem representativa de imunohistoquímica para as células de músculo liso no arco aórtico dos animais dos grupos Controle e LDE-DTX.
- Figura 7** Imagem representativa de imunohistoquímica para macrófagos, imagem representativa das bandas de Western blot e expressão proteica de CD68, MCP-1, NFκB, TNF-α, IL-1β, IL-6 e Von Willebrand dos animais dos grupos Controle e LDE-DTX.
- Figura 8** Imagem ilustrativa das bandas de Western blot de PCNA, expressão proteica e imagem representativa de imunohistoquímica de PCNA dos grupos Controle e LDE-DTX.
- Figura 9** Imagem ilustrativa das bandas de Western blot e expressão proteica de caspase 3, caspase 9, BAX e Bcl-2 dos grupos Controle e LDE-DTX.
- Figura 10** Imagem ilustrativa das bandas de Western blot e expressão proteica de MMP-2 e MMP-9 dos grupos Controle e LDE-DTX.
- Figura 11** Imagem ilustrativa das bandas de Western blot e expressão proteica de colágeno I e colágeno III dos grupos Controle e LDE-DTX e imagem representativa de imunohistoquímica para colágeno.

RESUMO

Meneghini C. B. *Uso de nanopartícula lipídica como veículo do quimioterápico docetaxel no tratamento da aterosclerose induzida em coelhos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Considerada como uma nova estratégia no direcionamento de fármacos para tecidos lesionados, a LDE é uma nanopartícula lipídica que se concentra em locais inflamatórios com altas taxas de proliferação celular, como lesões ateroscleróticas, e é usada em modelos experimentais e no homem. Docetaxel (DTX), agente quimioterápico antiproliferativo, ainda não foi explorado no tratamento da aterosclerose. Coelhos New Zealand brancos machos foram alimentados com ração enriquecida com 1% de colesterol para induzir aterosclerose ao longo do período experimental de 8 semanas. Após 4 semanas, os animais foram tratados semanalmente com LDE-DTX (n =9) com dose de 1 mg/kg e.v. ou apenas com LDE (grupo Controle, n =9). O consumo de ração e os perfis lipídico, hematológico e ponderal foram avaliados durante o protocolo nos tempos basal, 4 semanas e final. Após a eutanásia, foram realizadas análises morfológicas e Western blot das aortas. Como esperado, o colesterol total aumentou aproximadamente 42 vezes em ambos os grupos quando comparados os períodos basal e final. Houve diminuição no número de hemácias entre os períodos basal e final em ambos os grupos, aparentemente não relacionada ao tratamento. Os animais não apresentaram toxicidade renal e hepática. A área de lesão macroscópica nas aortas do grupo LDE-DTX foi aproximadamente 80% menor em relação ao Controle e a área de placa na região do arco aórtico foi 86% menor no grupo tratado com LDE-DTX quando comparado ao Controle. Em relação aos fatores inflamatórios, a expressão proteica de CD68 foi 64% menor no grupo tratado com LDE-DTX quando comparado ao grupo Controle. MCP-1 foi 84% menor no grupo tratado com LDE-DTX e o TNF- α foi 44% menor no grupo tratado, quando comparados ao grupo Controle. A expressão proteica de interleucina IL-1 β e do NF κ B foram cerca de 60% menores no grupo tratado assim como a IL-6, que foi 79% menor, ambos comparados ao grupo Controle. O fator de von Willebrand foi cerca de 30% menor no grupo tratado com LDE-DTX comparado ao Controle. Os fatores pró-apoptóticos apresentaram menor expressão no grupo LDE-DTX: a caspase 3 foi 82% menor em comparação ao Controle, caspase 9 e Bax, cerca de 50% menor que o controle bem como o fator anti-apoptótico Bcl-2. A expressão proteica dos colágeno I e III também foi menor no grupo LDE-DTX. Comparados ao controle, a expressão proteica de MMP-2 e MMP-9 foram cerca de 70% menores no grupo LDE-DTX. O marcador de proliferação celular PCNA foi 41% menor no grupo LDE-DTX em comparação com o grupo Controle. O tratamento com a associação LDE-DTX mostrou-se eficaz, uma vez que os coelhos tratados apresentaram uma área menor da lesão aterosclerótica, menor inflamação, morte celular e proliferação na aorta quando comparado ao grupo Controle.

Descritores: Aterosclerose, proliferação celular, inflamação, antineoplásicos, nanopartículas, lípidos, coelhos.

ABSTRACT

Meneghini C.B. *Use of lipid core nanoparticle as a vehicle of the chemotherapeutic docetaxel in the treatment of atherosclerosis induced in rabbits* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

Considered as a new strategy of targeting drugs to injured tissues, LDE, a lipid core nanoparticle concentrates on inflammatory sites with high cell proliferation rates, as atherosclerotic lesions, and it is used as a vehicle for drugs in experimental models and in humans. Docetaxel (DTX), an antiproliferative chemotherapeutic agent has not been explored yet in the treatment of atherosclerosis. New Zealand white male rabbits were fed with 1% cholesterol diet throughout the 8-week experimental period to induce atherosclerosis. After 4 weeks, the animals were treated weekly with LDE-DTX (n=9) at a dose of 1mg/kg i.p. or only with LDE (Control group, n=9). We evaluated feed intake, lipid, hematological, and weight profiles during the protocol at baseline, 4 weeks and post-treatment. After euthanasia was performed morphological analysis and Western blot of the aorta. As expected, total cholesterol increased 42-fold in both groups comparing baseline to post-treatment. There was a decrease in red blood cells number in both groups but it is probably not treatment-related. There was no hepatic and renal treatment-related toxicity. The macroscopic lesion area in the aortas of LDE-DTX was approximately 80% smaller compared to Control and the morphometry of the aortic arch was 86% smaller in LDE-DTX group compared to Control group. Regarding inflammatory factors, CD68 was 64% lower in LDE-DTX group comparing to Control group. MCP-1 was 84% in LDE-DTX group and TNF- α was 44% lower in the treated group comparing to Control group. The protein expression of IL-1 β and NF κ B were about 60% lower in the LDE-DTX group as well as IL-6 that was 79% lower, both compared to Control group. The von Willebrand factor was about 30% lower in LDE-DTX group compared to Control group. The pro-apoptotic factors showed lower expression in LDE-DTX group: caspases 3 was 82% lower compared to control and caspases 9 and Bax were about 50% than Control group as well as the anti-apoptotic factor Bcl-2. The protein expression of collagen I and III were lower in LDE-DTX group. Compared to control, the protein expression of MMP-2 and MMP-9 were about 70% lower in the LDE-DTX group compared to Control group. The cell proliferation marker PCNA was 41% lower in LDE-DTX group compared to Control group. Treatment with LDE-DTX association proved to be effective since the treated rabbits had a smaller area of the atherosclerotic lesion, lower inflammation, cell death and proliferation in the aorta when compared to Control group.

Descriptors: atherosclerosis, cell proliferation, inflammation, antineoplastic agents, nanoparticles, lipids, rabbits.

1. INTRODUÇÃO

Avanços significativos no entendimento e tratamento da aterosclerose ocorreram nos últimos anos, porém manifestações clínicas decorrentes da doença ainda são as maiores causas de mortalidade mundial. No Brasil, em virtude do impacto social, a comunidade científica tem se empenhado no seu estudo etiológico e no desenvolvimento de métodos preventivos para seu controle (Santos et al., 2011; Martínez et al., 2018).

Considerada uma doença inflamatória e proliferativa crônica, a aterosclerose tem como fatores de risco mais comuns a hipercolesterolemia, tabagismo, hipertensão, diabetes e idade (Solanki et al., 2018; Goikuria et al., 2018).

O início do processo aterogênico é marcado pela disfunção endotelial causada pelos fatores de risco, que leva a respostas compensatórias que alteram as propriedades homeostáticas normais do endotélio. Quando há aumento dos níveis plasmáticos de lipoproteínas e aumento da permeabilidade do endotélio, as lipoproteínas infiltram na camada íntima das artérias, onde se tornam alvos para ataques oxidativos e enzimáticos (Libby et al., 2003; Choy et al., 2004).

O aumento da concentração de LDL no interior da célula endotelial induz o maior consumo de NO (óxido nítrico) e conseqüentemente maior produção de radicais livres. Ocorre a peroxidação dos ácidos graxos das partículas de LDL e conseqüente oxidação, dando origem as LDL oxidadas (LDL-ox) (Domioniczak et al., 2011; Soto et al., 2014; Fanher et al., 2018).

Os fosfolípidos liberados pelas LDL ativam células endoteliais para expressar moléculas de adesão como moléculas de adesão celular vascular (VCAM-1) e moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) e recrutam monócitos e linfócitos. Uma vez aderidos ao endotélio, os leucócitos migram para a íntima em resposta a quimiocinas como a proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1) (Ross, 1999).

Na camada íntima, monócitos são diferenciados em macrófagos e, quando ativados, em ação conjunta com linfócitos T produzem citocinas, proteases, moléculas pró-trombóticas e substâncias vasoativas, que alteram a função vascular e levam à progressão da lesão. Dentre as citocinas ativadas mais importantes estão a interleucina-1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral (TNF- α), além da interleucina 6 (IL-6) e intérferon gama (INF- γ) (Hansson et al., 2006; Liu et al., 2013).

A IL-1 β é um sinal precoce da disfunção da parede arterial e induz à ativação do gene fator nuclear kappa B (NF- κ B) para a expressão de moléculas de adesão e citocinas, facilitando a agregação de outras células inflamatórias no endotélio ativado. Quando associada às citocinas expressas pelos linfócitos T, como INF- γ , TNF- α e TNF- β , induz a produção de IL-6 por células musculares lisas e aumenta a expressão de macrófagos, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF), associados com a progressão do processo inflamatório na aterosclerose (Liu et al., 2013; Hoseine et al., 2017; Goikuria et al., 2018).

Concomitantemente ocorre produção de TNF- α pelos macrófagos, uma das principais citocinas mediadoras na resposta inflamatória, que age no endotélio e

contribui para o remodelamento vascular e aumento da inflamação (Sbarsi et al., 2006).

Através de receptores “scavengers” como SR-A e CD36, macrófagos fagocitam as LDL-ox e lípidos se acumulam em seu citoplasma, formando então as chamadas células espumosas (Martínez et al., 2018).

Sob o estímulo desse meio pró-inflamatório, células musculares lisas migram da camada média para a camada íntima arterial, induzidas pelo PDGF ou pelo TNF- α e passam a proliferar. Estas células também podem acumular lípidos e conseqüentemente também formam as células espumosas (Libby et al., 2003; Li et al., 2017).

Com a progressão da lesão e a proliferação de macrófagos na camada íntima, ocorre aumento do processo inflamatório e a liberação de metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs), que degradam a matriz extracelular para facilitar a migração e o recrutamento de células através da proteólise do colágeno com objetivo de repar o vaso (Hansson et al., 2006; Chen et al., 2013).

Assim, a junção de fatores como o acúmulo de lípidos, células inflamatórias, células imunes e de elementos fibrosos que se depositam na camada íntima da artéria, somados a proliferação celular, levam ao espessamento da parede do vaso e a formação da placa aterosclerótica (Dzau et al., 2002).

O centro da placa é composto de lípidos e debris celulares, envoltos por capa fibrosa composta por células musculares lisas e matriz rica em fibras de colágeno. O predomínio do colágeno organizado em capa fibrosa espessa

caracteriza a placa aterosclerótica como estável, porém as MMPs podem provocar disfunção no reparo vascular, degradando o colágeno e reduzindo esta estabilidade (Gottlieb et al., 2005; Hansson et al., 2006; Libby et al., 2011).

Durante a progressão da lesão ocorre também a ativação do mecanismo para suprimir a inflamação, através da fagocitose dos debris celulares seguida pela produção e secreção de fatores anti-inflamatórios. Porém, enquanto houver estímulo pelos fatores de risco e formação de placa, a presença de células apoptóticas na parede arterial pode apresentar efeito pró-inflamatório por estimular citocinas e fatores quimiotáticos. A sobrecarga citoplasmática dos macrófagos e presença da LDL-ox diminui a eficiência da fagocitose, o que contribui para a formação do núcleo necrótico, associado à menor estabilidade da placa. A ruptura da capa fibrosa pode levar à trombose e muitos dos desfechos clínicos adversos associados à aterosclerose, como isquemia cardíaca e infarto agudo do miocárdio (Libby et al., 2008; Haider et al., 2009; Tajbakhsh et al., 2018).

Atualmente, os avanços no entendimento das doenças vasculares proliferativas propiciam alternativas para o tratamento, com foco em inibir ou bloquear os processos patológicos da proliferação vascular. A redução do lúmen dos vasos por lesão aterosclerótica corrigida por procedimentos invasivos como angioplastia ou *stents* pode notavelmente estimular o processo de proliferação das células musculares lisas devido a estímulo mecânico, aumentando a resposta inflamatória e reestenose resultante do remodelamento (Dzau, 2002; Bukka et al., 2018).

Fármacos com ação antiproliferativa têm sido utilizados em *stents* farmacológico, com o objetivo de evitar a reoclusão do vaso, porém o alto custo

e a falta de impacto sobre as taxas de mortalidade levam a busca de novas propostas de tratamento, possivelmente de forma sistêmica, com ação direta na lesão aterosclerótica (Bukka et al., 2018).

Recentemente, o bloqueio de citocinas pró-inflamatórias foi testado em pacientes com doença cardiovascular prévia com objetivo de prevenir eventos recorrentes e proporcionaram diminuição desses eventos, porém a ação deste tratamento é específica e, pode necessitar de terapias combinadas para reduzir o risco cardiovascular (Ridker et. al., 2017).

Uma abordagem mais ampla foi demonstrada por Maranhão et. al. (2008), em que a incorporação de quimioterápicos à nanopartícula LDE promove uma drástica redução da toxicidade do fármaco viabilizando seu uso para o tratamento de outras doenças proliferativas como a aterosclerose.

1.1 Nanopartícula lipídica (LDE) e os taxanos

Em 1992, Maranhão e colaboradores desenvolveram a LDE, nanopartícula lipídica artificial de diâmetro médio de 60nm, que possui núcleo formado por ésteres de colesterol com pequena porção de triglicérides envolta por uma monocamada de fosfolípidos e colesterol livre, composição semelhante à porção lipídica das LDL. Quando injetada em modelos experimentais e em humanos, comporta-se de forma semelhante a LDL e, embora não tenha proteínas em sua constituição, adquire apolipoproteínas, principalmente a apo E, a partir das lipoproteínas nativas. A apolipoproteína presente na nanopartícula é então

reconhecida pelos receptores de LDL (LDL-R), permitindo a internalização da partícula para o citoplasma.

Em relação a LDL nativa, a LDE é mais rapidamente removida do plasma, pois se liga ao receptor através da apolipoproteína E (apoE), que possui de 20 a 30 vezes mais afinidade pelo LDL-R que a apolipoproteína B100 (apoB100) das LDL (Hirata et al., 1999).

Em doenças inflamatórias e proliferativas, como o câncer, ocorre um aumento do número de LDL-R, devido à maior demanda de colesterol para síntese de novas membranas celulares (Brown & Goldstein, 1986).

Testes de remoção cinética da LDE foram realizados em pacientes com leucemia mielóide aguda (LMA) e leucemia linfocítica aguda (LLA). Na LMA, o número de LDL-R é aumentado devido à alta proliferação celular, enquanto que na LLA, o número de receptores se mantém normal. O estudo mostrou maior remoção cinética de LDE na LLA quando comparada a LMA, sugerindo então que a LDE é captada por neoplasias com LDL-R aumentado (Maranhão, 1994).

Em estudos posteriores, confirmou-se a captação e concentração da LDE em tumores sólidos como carcinoma de ovário e de mama. Estes estudos também levantaram a possibilidade de utilizar a LDE como carregador de fármacos dirigido a células específicas, uma nova estratégia para o tratamento do câncer (Ades et al., 2001; Graziani et al., 2002).

A LDE então foi associada à carmustina, quimioterápico com alta toxicidade hepática e hematológica. Testes de biodistribuição foram realizados em camundongos e sugeriram que a captação foi mediada pelo LDL-R, além de a cinética plasmática não se alterar. Finalmente, foi realizado um estudo clínico

para determinar a toxicidade da associação em níveis de dose escalonados em pacientes com câncer refratários à quimioterapia convencional. Os pacientes tratados com LDE-carmustina apresentaram menores efeitos colaterais, mesmo em doses mais altas (Grazziani et al., 2002; Maranhão et al., 2002).

Outro quimioterápico, paclitaxel, foi associado à LDE e testado em ratos e, diminuiu os efeitos colaterais do fármaco e teve ação focal em células neoplásicas. O etoposide quando associado à LDE, mostrou maior concentração em tumor de ovário quando comparado a ovários normais (Rodrigues et al., 2002; Azevedo et al., 2005)

A LDE também foi testada em outras doenças proliferativas que não o câncer. Injetada em pacientes com doença coronariana submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio, foi captada consideravelmente pelo tecido arterial retirado durante o procedimento (Couto et al., 2007).

Em coelhos com aterosclerose induzida por dieta rica em colesterol, a captação de LDE no arco aórtico mais do que duplicou quando comparado a coelhos saudáveis e quando tratados com a associação LDE-paclitaxel, a área de lesão aterosclerótica dos animais foi 60% menor quando comparado aos controles não tratados submetidos à mesma dieta. Em estudos posteriores com o mesmo modelo animal foram testados etoposide, metotrexato e carmustina associados à LDE e demonstraram que além de reduzir a lesão aterosclerótica, o tratamento com a associação reduz a expressão de IL-1 β , TNF- α e IL-18, fatores pró-inflamatórios (Maranhão et al., 2008, Tavares et al., 2011; Bulgarelli et al., 2012; Daminelli et al., 2016).

A associação da LDE ao paclitaxel no tratamento da aterosclerose em coelhos também diminuiu a expressão de macrófagos e proliferação de células

musculares lisas na camada íntima dos animais tratados (Maranhão et al., 2008).

O paclitaxel, quimioterápico já explorado em nossos estudos prévios, é um fármaco da classe dos taxanos, cujo principal análogo, docetaxel, difere estruturalmente apenas na posição 10 no anel de bacatina e na posição 3' da cadeia lateral. Os taxanos são quimioterápicos semi-sintéticos e possuem mecanismo de ação diferente da maioria dos agentes antineoplásicos, pois agem com foco específico nos heterodímero de tubulina, componente chave dos microtúbulos celulares, com objetivo de inativar a proliferação celular (Pienta et al., 2001; Montero et al., 2005).

Os microtúbulos são rearranjos das cadeias α e β da tubulina, presente em todas as células eucariotes e absolutamente necessários no processo de divisão celular. Em condições normais, os microtúbulos são montados de modo a formar um cilindro e, para isso, dependem de fatores como guanosina trifosfato (GTP) e proteínas que interagem com a β -tubulina. Esse processo é chamado de polimerização e é essencial para o movimento dos cromossomos e adequada segregação de células filhas durante a mitose, sendo reversível em presença de Ca^{+2} e baixas temperaturas. Os taxanos, entretanto, se ligam a β -tubulina das células e promovem a polimerização dos microtúbulos, mesmo na ausência da GTP e das proteínas associadas. Uma vez ligados, os microtúbulos não podem mais ser despolimerizados e se tornam mais estáveis, interrompendo a mitose na fase G2M do ciclo celular. Como consequência do bloqueio do ciclo de divisão natural da célula, ocorre a inibição da proliferação celular (Long et al., 1994; Nehmé et al., 2001; Jordan et al., 2004; Vial et al., 2008).

O docetaxel é usado no tratamento de primeira linha de câncer de mama além de tratar tumores de ovário, próstata, gástricos e carcinoma de pulmão de células não pequenas (Cortes et al., 1995; Morse et al., 2005; Park et al., 2011; Gao et al., 2015).

O tratamento com taxanos sabidamente causa uma série de efeitos adversos relacionados com a dose utilizada, que vão desde reações alérgicas e toxicidade dermatológica até alterações hematológicas (Krasnopolsky et al., 2017).

Em estudo realizado em coelhos submetidos a baixas doses locais de docetaxel via cateter de balão intra-aórtico com objetivo de prevenir a reestenose após angioplastia, houve redução da proliferação das células musculares lisas, porém houve também redução da área da camada média, acompanhada pela redução da densidade celular, que indica toxicidade local. Este estudo sugeriu que, para reduzir os efeitos adversos do tratamento, o uso de sistemas de direcionamento de fármacos para o local de lesão aterosclerótica poderia ser uma abordagem potencial no tratamento de doenças vasculares (Yasuda et al., 2002).

A associação do paclitaxel a LDE reduziu a toxicidade clínica e laboratorial do fármaco, como demonstrado em estudo experimental em animais e em pacientes com câncer avançado (Maranhão et al., 2008; Graziani et al., 2017).

Em estudo piloto em pacientes com lesão aterosclerótica aórtica em que foi administrado paclitaxel associado à LDE, não houve toxicidade clínica e laboratorial importantes relacionadas ao tratamento, o que torna o uso da associação tolerável também em pacientes com doenças cardiovasculares (Shiozaki et al., 2016).

Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo testar a hipótese de que o docetaxel também poderia possuir a forte atividade antiaterosclerótica do paclitaxel e explorar novos mecanismos moleculares através dos quais os taxanos podem interferir favoravelmente na aterogênese.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar a eficácia do tratamento com a associação do docetaxel à LDE (LDE-DTX) em coelhos com aterosclerose induzida por dieta rica em colesterol.

2.2 Objetivos específicos

Quantificar a expressão proteica de marcadores envolvidos nos processos de inflamação, morte celular, proliferação celular e reparo vascular.

3. MÉTODOS

3.1 Animais e dieta

Foram utilizados 33 coelhos New Zealand brancos machos, provenientes do biotério e criação comercial FMUSP (São Paulo, SP), entre 3 e 4,5 kg, mantidos em gaiolas climatizadas, com ciclo claro:escuro de 12h. Todos os coelhos consumiram ração comercial usual (Purina Inc.) por uma semana para adaptação às condições ambientais do Biotério da Divisão Experimental do INCOR-HCFMUSP, sob responsabilidade da veterinária Dra. Edna Aparecida Diniz Paulo.

Por se tratar de um estudo pioneiro, em que foi testado um fármaco ainda não utilizado em nosso laboratório, realizamos estudo piloto para padronização da dose de tratamento.

Para a indução da aterosclerose, os animais consumiram 150g/dia de ração comercial usual com suplementação de 1% de colesterol (peso/peso), durante quatro semanas. A água foi mantida *ad libitum*. Utilizamos 5 animais dos quais 3 foram tratados com a associação LDE-DTX na dose de 4 mg/kg e 2 animais foram alocados no grupo Controle e receberam administração endovenosa (e.v) apenas da LDE, uma vez por semana, durante quatro semanas concomitantes com a dieta rica em colesterol que foi administrada até o final do protocolo. Os três animais tratados com a associação LDE-DTX na

dose de 4 mg/kg foram a óbito logo após o primeiro tratamento, o que nos levou a realizar novos testes com doses menores.

Foram testados mais 12 animais seguindo o mesmo protocolo: quatro animais foram alocados no grupo Controle, quatro animais foram tratados com LDE-DTX na dose de 2 mg/kg e quatro animais tratados com LDE-DTX na dose de 1mg/kg. Houve óbito dos quatro animais do grupo LDE-DTX tratados com 2mg/kg logo nos primeiros tratamentos. Os animais que receberam 1mg/kg de LDE-DTX seguiram até o término do protocolo.

A partir desse estudo, estabeleceu-se então a dose de 1 mg/kg para o tratamento dos animais do grupo LDE-DTX.

Utilizamos então 10 animais que, após 4 semanas de indução da aterosclerose, foram divididos em grupo Controle e grupo LDE-DTX aleatoriamente e submetidos ao tratamento por 4 semanas, sendo que:

Grupo LDE-DTX: recebeu 1 mg/kg da associação LDE-DTX, e.v, uma vez por semana durante quatro semanas, concomitante a indução da aterosclerose por dieta rica em colesterol 1% durante todo o período do protocolo;

Grupo Controle: recebeu somente o veículo LDE, e.v, uma vez por semana durante quatro semanas, concomitante a indução da aterosclerose por dieta rica em colesterol 1% durante todo o período do protocolo.

A eutanásia foi realizada após quatro semanas de tratamento, utilizando barbitúrico (Tiopental).

Para o preparo da dieta, a ração usual comercial (Nuvilab Coelhos – Ind. Brasileira) foi enriquecida com colesterol na proporção de 1g de colesterol para cada 100g de ração. O colesterol foi dissolvido em solução de éter etílico e etanol absoluto (Fabrichem, Trumbull, Connecticut, EUA), por agitação constante, e posteriormente misturado à ração comercial de forma homogênea. Após 24 horas em câmara de fluxo laminar unidirecional vertical para total evaporação dos solventes, a ração enriquecida com 1% de colesterol foi armazenada em sacos plásticos lacrados a -20°C até o uso.

3.2 Síntese do docetaxel

Para garantir a melhor incorporação do fármaco à LDE, o docetaxel foi modificado, acrescentando-se uma cadeia de ácido oleico que permitiu que a molécula se tornasse mais apolar. O docetaxel modificado foi denominado oleato de docetaxel (DTX).

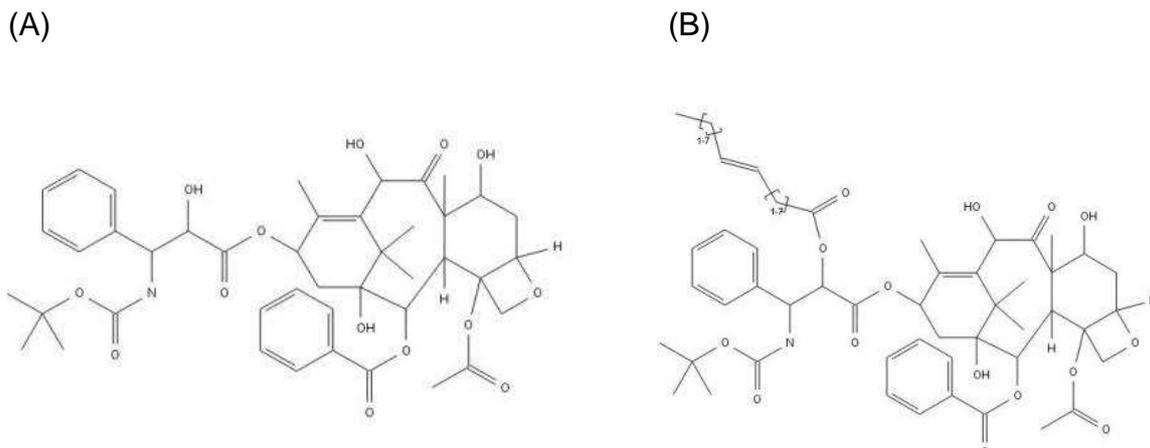


Figura 1: Representação das fórmulas estruturais do docetaxel (A) e do oleato de docetaxel – DTX (B).

Para a reação de derivatização do docetaxel, utilizaram-se os seguintes reagentes, dissolvidos em diclorometano anidro: 0,203g (0,72mmol) de ácido oléico, 0,250g (1,2mmol) DCC, 0,073g (0,6mmol) DMAP e 0,500g (0,6 mmol) de docetaxel. O meio reacional permaneceu em agitação em atmosfera inerte (N_2) por duas horas à temperatura ambiente. A reação foi monitorada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em coluna de sílica C18 150x4,6mmx3,5 μ m (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), fase móvel metanol:acetonitrila (90:10 v/v), detector UV/visível 230nm. Após a identificação da formação do produto final, foram realizadas sucessivas extrações líquido-líquido com ácido clorídrico, água e solução saturada de cloreto de sódio. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio, filtrada e evaporada em rotaevaporador. O produto foi purificado em coluna preparativa cromatográfica C18 250x9,4nmx5 μ m (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), fase móvel metanol:acetonitrila (90:10 v/v), detector UV/visível 230nm. Em seguida, adicionou-se hexano, obtendo-se um precipitado branco, o qual foi filtrado e secado a vácuo.

3.3 Preparo da nanopartícula lipídica artificial e da associação LDE-DTX

LDE foi preparada a partir de uma mistura de lípides constituída por 64% de fosfatidilcolina, 33% colesterol esterificado, 1% de colesterol não esterificado e 2% de triglicérides (MARANHÃO, 1992).

A emulsificação dos lípides foi iniciada adicionando-se tampão TRIS-HCl (0,001 M pH 8,05), e o agente tensoativo, Tween 80 (Merck, Hohenbrum, Alemanha) em um homogenizador de alta pressão, Microfluidizer-M110S (Microfluidizer® Processor, Microfluidics™, Westwood, MA, EUA). O processo de homogeneização ocorreu durante 30-40 minutos a uma temperatura constante de 55-60°C, e o diâmetro das partículas lipídicas foi monitorado por espalhamento de luz dinâmico a 90° (Zetasizer Nano ZS90, Malvern, Reino Unido) durante todo período de produção. A nanopartícula foi esterilizada em filtro de policarbonato 0,22µm (Merck Millipore, Billerica, MA, EUA) e armazenada a 4°C.

Para o preparo da associação LDE-DTX, na mistura de lípides, adicionou-se o DTX na proporção fármaco:lipídes 1:10. A taxa de incorporação do docetaxel a nanopartícula lipídica artificial foi avaliada por HPLC.

3.4 Perfil lipídico e hematológico dos animais

As amostras de sangue foram coletadas da veia auricular marginal dos animais no período que antecedeu a indução da aterosclerose (basal), antecedendo o início do tratamento (4 semanas) e na data da eutanásia (final).

O soro foi centrifugado a 2500 rpm por 10 min a 4°C e alíquotas foram encaminhadas para o Laboratório de Análises Especiais (LAR), Laboratório de Investigação Médica LIM 03, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo. O hemograma completo foi realizado em analisador hematológico automatizado veterinário Sysmex PochH 100iv (Roche, Basel, Suíça). Foi utilizado o método enzimático colorimétrico para as determinações de colesterol total, HDL (lipoproteína de alta densidade), n-HDL-c (colesterol não HDL) e triglicérides. As transaminases alanina (ALT) e aspartato (AST), ureia e creatinina foram analisadas por método cinético UV-IFCC (Ultravioleta - International Federation of Clinical Chemistry), todos em equipamento COBAS 111 (Roche, Basel, Suíça).

3.5 Planimetria das lesões ateroscleróticas

Após a eutanásia, as aortas dos coelhos foram retiradas a partir do arco aórtico até a aorta abdominal, abertas longitudinalmente ao longo da parede posterior e fixadas em formalina 10%. Os lípidos presentes nas aortas foram

evidenciados por Scarlat R (Sudan IV; Sigma, Saint Louis, EUA). As aortas foram fotografadas e o tamanho das lesões foi medido por planimetria através de programa computacional Image J (National Institutes of Health, Bethesda, EUA). A porcentagem de lesão aterosclerótica macroscópica foi calculada através da razão entre área da lesão/área total da aorta x100.

3.6 Morfometria das lesões ateroscleróticas

Após a realização da análise macroscópica, o arco aórtico das artérias foi cortado transversalmente em segmentos de 5 mm, embebido em parafina e posteriormente cortados em segmentos de 5 μ m.

A desparafinização das lâminas foi feita com 3 banhos de xilol de 10 minutos cada, seguido de 3 banhos de etanol absoluto, 2 banhos de etanol 95% e um banho de etanol 70%. As lâminas com os cortes histológico foram lavadas em água corrente e coradas em hematoxilina/eosina. Foram fotografados três campos de cada corte histológico no aumento de 100x através de microscópio ótico equipado com software de análise de imagens (Leica Q500 iW e Leica DMLS, Leica Imaging Systems LTD, Cambridge, Reino Unido). A porcentagem de lesão aterosclerótica da íntima foi calculada através da razão da área da íntima/área total x 100.

3.7 Imunohistoquímica

Imunohistoquímica foi realizada para identificação de células de músculo liso (anti- α actina) (Dako, Carpinteria, CA, EUA) e macrófagos (clone RAM-11) (Dako, Carpinteria, CA, EUA) na aorta dos coelhos dos dois grupos. As lâminas passaram pelo procedimento de desparafinização descrito acima. A recuperação antigênica foi realizada por calor úmido e pressão em Câmara de Pascal (Dako, Carpinteria, CA, EUA) para recuperação antigênica com tampão Tris 10mM/EDTA 1mM para anti- α actina e tampão citrato 10mM pH=6,0 para os antígenos macrófagos. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com 4 banhos de 5 minutos de peróxido de hidrogênio a 3%. O bloqueio de reações inespecíficas foi feito com soro fetal bovino diluído em solução salina tamponada com sais de fosfato (PBS) durante 1 hora em estufa umidificada a 37°C. Os cortes foram incubados com anticorpo primário anti- α actina e clone RAM-11 (Dako, Carpinteria, CA, EUA) por 18 horas a 4°C. O sistema de detecção utilizado foi o polímero Envision (Dako, Carpinteria, CA, EUA) e a reação foi revelada com diaminibenzidina (DAB) (Dako, Carpinteria, CA, EUA), contracorada com hematoxilina de Harris. Para análise quantitativa da expressão proteica do antígeno da α -actina, foi utilizado microscópio ótico equipado com software de análise de imagens (Leica Q500 iW e Leica DMLS; Leica Imaging Systems LTD, Cambridge, Reino Unido). O limiar de detecção de cor foi determinado pelo cromógeno DAB, baseado em uma região marcada do tecido. Imagens de três campos de cada corte histológico foram capturadas em aumento de 100x e usadas para medir a área total da íntima e a área de

marcação marrom do cromógeno DAB na íntima. A área marcada pelo cromógeno DAB foi calculada como porcentagem da área da íntima de cada campo. A expressão do antígeno em cada animal foi calculada como média de todos os campos medidos para cada corte histológico.

3.8 Expressão proteica por Western blot

Foram realizadas quantificações proteicas de marcadores de processo inflamatório CD68, IL1- β , IL-6, MCP-1, TNF- α , NF-kB e fator de von Willebrand (Abcam, Cambridge, Reino Unido); morte celular Bax, Bcl-2, caspase 3 e caspase 9; metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 (Abcam, Cambridge, Reino Unido); marcador de proliferação celular PCNA (Abcam, Cambridge, Reino Unido), além de colágenos I, III e TGF- β (Abcam, Cambridge, Reino Unido). Como o n amostral foi muito grande para a realização da técnica, foram selecionadas aortas dos animais cujas médias de lesão aterosclerótica macroscópica eram similares.

Fragments de 1mg de tecido do arco aórtico foram colocados em 1mL de tampão RIPA (tris base pH 8,0, NaCl, NP-40 e glicerol) com os inibidores de proteínas: aprotinina, leupeptina e fluoreto-fenil-metil-sulfonil e em seguida homogeneizados em Polytron. As amostras foram agitadas por 2 horas, centrifugadas a 12.000 rpm, por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado. A determinação da concentração de proteínas foi realizada pelo método de Pierce 660nm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Após a obtenção

das concentrações das amostras, foi calculado o volume necessário das amostras para obter uma concentração proteica de 50µg. Após esse cálculo, foi acrescentado tampão de amostra (sample buffer, Tris HCl pH 6, 8,2-mercaptoetanol, dodecil sulfato de sódio (SDS), bromofenol e glicerol).

Para separação proteica (eletroforese), utilizamos gel de acrilamida. Após polimerização do gel, as amostras foram aquecidas a 95°C por 5 minutos e aplicadas no gel. Após a corrida, realizamos a transferência das proteínas do gel para membrana de nitrocelulose. Com o término da transferência a membrana foi corada com Ponceau S (ácido acético 5% e Ponceau S 0,1%) para verificar a transferência das proteínas para a membrana. O bloqueio das proteínas transferidas para a membrana foi realizado em 5% de leite desnatado diluído em tampão de solução salina tamponada Tris e Tween (TBS-T) (pH 7,6, tris base, NaCl e Tween) por 60 minutos em temperatura ambiente.

Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo primário, diluído em tampão TBS-T, sob agitação, overnight a 4°C. A concentração do anticorpo foi determinada de acordo com a bula do fabricante do anticorpo utilizado. Após incubação do anticorpo primário, a membrana foi incubada com anticorpo secundário, também diluído em tampão sTBS-T por 120 minutos em temperatura ambiente. Para a revelação por quimioluminescência, utilizamos revelador quimioluminescente (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) por 5 minutos. As bandas foram identificadas em fotodocumentador Amersham Imager 600 (GE Health Care Bio-Sciences, Björkgatan, Suécia). Utilizamos como normalizador o GAPDH (Calbiochem, San Diego, CA, EUA) e para a análise dos resultados obtidos utilizamos o programa Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MA, EUA).

3.9 Análise estatística

Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão. O tipo de distribuição das variáveis e a hipótese de igualdade das variâncias foram testados em todos os casos. Na análise dos dados de consumo de ração, variação de peso dos animais e análises laboratoriais, para variáveis de distribuição normal utilizamos o teste ANOVA com pós-teste de Tukey, para a realização de comparações múltiplas. Para variáveis de distribuição não normal, utilizamos o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. O teste *t-student* foi utilizado para as análises da planimetria, morfometria, imunohistoquímica e ensaios de Wester blot. O nível de significância estatística foi estabelecido pelo valor de $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas pelo programa GraphPadPrism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) versão 5.0.

4. RESULTADOS

4.1 Perfil ponderal

A evolução de peso corporal dos animais (Figura 2) se manteve similar nos grupos Controle e LDE-DTX em todo o protocolo.

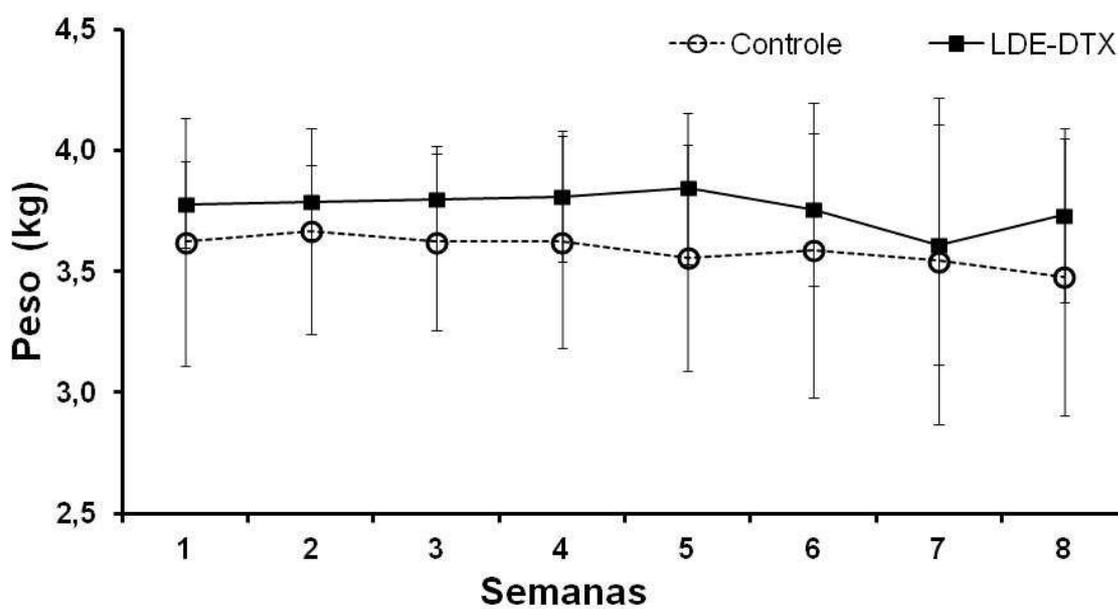


Figura 2: Evolução do peso (kg) durante as 8 semanas de protocolo dos animais dos grupos Controle e LDE-DTX. Dados expressos em Média \pm Desvio Padrão.

4.2 Consumo de ração

A Figura 3 mostra o consumo de ração suplementada com 1% de colesterol pelos coelhos dos grupos Controle e LDE-DTX durante todo o protocolo. Não houve diferença entre os grupos quando comparado o consumo de ração semana a semana.

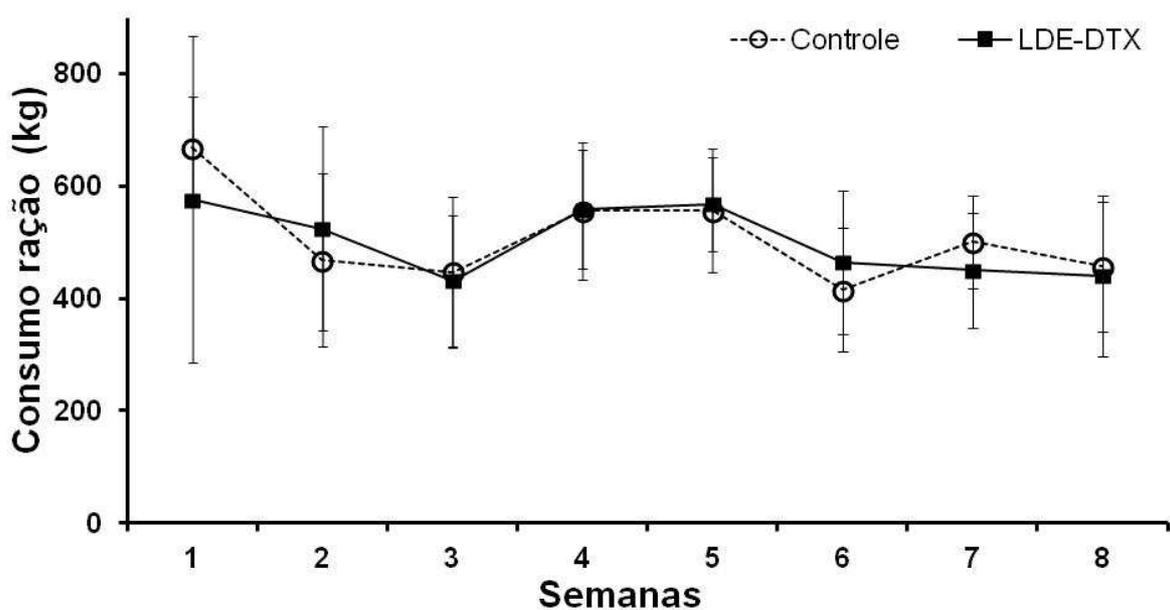


Figura 3: Variação de consumo de ração (g) dos grupos Controle e LDE-DTX durante as 8 semanas de protocolo. Dados expressos em Média \pm Desvio Padrão.

4.3 Perfil lipídico

A Tabela 1 mostra o perfil lipídico dos animais nos períodos basal, 4 semanas e final do protocolo.

Conforme esperado, o colesterol total aumentou cerca de 40 vezes em ambos os grupos quando comparados os períodos basal e final, demonstrando que a indução da aterosclerose se deu de forma eficaz e semelhante nos dois grupos. Não houve diferença entre os grupos em nenhum dos períodos do protocolo para o colesterol total.

O HDL colesterol aumentou cerca de 10 vezes nos dois grupos quando comparados os períodos basal e final assim como o colesterol não HDL (n-HDL-c), que também aumentou consideravelmente. Não houve diferença entre os grupos em nenhum dos períodos do protocolo.

Os triglicérides aumentaram em ambos os grupos quando comparadas as concentrações nos períodos basal e final e não houve diferença entre os grupos em nenhum dos períodos do protocolo.

Tabela 1: Perfil lipídico dos coelhos dos grupos Controle e LDE-DTX nos períodos basal, 4 semanas e final.

(mg/dl)	Controle (n=9)			LDE-DTX (n=9)		
	Basal	4 semanas	Final	Basal	4 semanas	Final
Colesterol total	43±3	1116±53*	1850±208 ^{‡§}	37±3 [#]	1036±53 [†]	1826±408 ^{†**}
HDL-c	23±2	281±23*	390±87 [‡]	20±3 ^{§#}	239±24 [†]	284±48* [§]
n-HDL-c	20±2	849±70 [†]	1533±166 [‡]	17±2 ^{°#}	797±46 [†]	1542±373 ^{†**}
Triglicérides	65±8	150±99	207±35*	69±9 ^{&}	129±21	209±32* [§]

Dados expressos em Média ± Desvio Padrão. *p<0.01 vs Controle basal; [‡]p<0.001 vs Controle basal; [§]p<0.01 vs Controle 4 semanas; [#]p<0.001 vs Controle final; [†]p<0.05 vs Controle basal; ^{||}p<0.05 vs LDE-DTX basal; **p<0.001 vs LDE-DTX basal; [§]p<0.01 vs LDE-DTX basal; [°]p<0.05 vs Controle 4 semanas; [&]p<0.01 vs Controle final.

4.4 Perfil hematológico

Na Tabela 2 estão expressos os dados de hemograma dos grupos Controle e LDE-DTX nos períodos basal, 4 semanas e final.

Houve queda de aproximadamente 60% no número de hemácias dos grupos Controle e LDE-DTX quando comparados os valores basal e final do protocolo e provavelmente não relacionada ao tratamento, uma vez que em ambos os grupos os dados foram semelhantes.

O número de leucócitos e a porcentagem de monócitos aumentaram no grupo Controle entre os períodos basal e final.

Os animais não apresentaram diferença na porcentagem de linfócitos, neutrófilos e contagem de plaquetas.

Tabela 2: Perfil hematológico dos grupos Controle e LDE-DTX nos períodos basal, 4 semanas e final.

	Controle (n=9)			LDE-DTX (n=9)		
	Basal	4 semanas	Final	Basal	4 semanas	Final
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	5,9±0,4	4,3±0,2*	3,8±0,2 [†]	6,7±0,3 ^{‡§}	4,7±0,2	3,9±0,2 [†]
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	11,5±1,1	16,9±1,3	22,5±1,9 [†]	12,1±1,2 [§]	17,5±1,7	18,3±1,4 [#]
Linfócitos (%)	53±2,5	56±0,1	61±4,0	54±2,9	55±3,4	58±2,6
Monócitos (%)	1,9±0,5	2,6±0,6	6,8±1,1* **	4,6±0,6	6,9±1,3* **	6,2±0,7 [‡]
Neutrófilos (%)	41,4±3,4	38,2±1,2	31,4±3,4	41±4,8	32,7±2,4	34,9±2,5
Plaquetas ($10^3/\text{ml}$)	231±24	252±41	318±72	253±29	262±28	224±18

Dados expressos em Média ± Desvio Padrão. *p<0.01 vs Controle basal; [†]p<0.001 vs Controle basal; [‡]p<0.001 vs Controle 4 semanas; [§]p<0.001 vs Controle final; ^{||}p<0.001 vs LDE-DTX basal; [#]p<0.05 vs Controle basal; **p<0,05 vs Controle 4 semanas.

4.5 Indicadores de função renal e enzimas hepáticas

Não houve diferença entre os grupos para os indicadores de função renal ureia e creatinina em nenhum dos tempos do protocolo.

As enzimas hepáticas ALT e AST não apresentaram diferença em ambos os grupos em nenhum dos períodos do protocolo.

Tabela 3: Marcadores de função renal e enzimas hepáticas dos grupos Controle e LDE-DTX nos tempos basal, 4 semanas e final.

	Controle (n=9)			LDE-DTX (n=9)		
	Basal	4 semanas	Final	Basal	4 semanas	Final
Uréia (mg/dL)	30±4	45±4	49±4	34±3	53±3	53±4
Creatinina (mg/dL)	0,97±0,03	1,46±0,12	1,49±0,21	0,96±0,30	1,62±0,10	1,71±0,20
ALT (UI/L)	63±10	71±14	64±9	74±16	100±31	63±11
AST (UI/L)	32±4	51±13	61±10	43±8	57±12	48±6

Dados expressos em Média ± Desvio Padrão.

4.6 Planimetria das lesões ateroscleróticas

A Tabela 4 mostra a área e a porcentagem de lesão nas aortas dos grupos Controle e LDE-DTX. A Figura 4 ilustra os depósitos lipídicos nas lesões ateroscleróticas das artérias aorta dos animais dos grupos Controle e LDE-DTX.

A área de lesão do grupo tratado com LDE-DTX foi aproximadamente 80% menor que a área de lesão do grupo Controle, demonstrando expressiva menor presença de lesões ateroscleróticas nos animais tratados com LDE-DTX.

Tabela 4: Medidas da área total e da área de lesão macroscópica das artérias dos coelhos dos grupos Controle e LDE-DTX.

	Controle (n=9)	LDE-DTX (n=9)
Área Total da Aorta (pixel ² x10 ⁶)	1,84±0,32	1,49±0,25
Área de Lesão (pixel ² x10 ⁶)	0,64±0,46	0,11±0,58*
Porcentagem de Lesão	42±22	8±5*

Dados expresso em Média±D.P. *p<0,01.



Figura 4: Imagem representativa das aortas dos animais dos grupos Controle (A) e LDE-DTX (B) com os depósitos lipídicos das lesões ateroscleróticas evidenciados por ScarlatR.

4.7 Morfometria do arco aórtico

A Tabela 5 mostra os dados da morfometria do arco aórtico dos coelhos tratados com LDE-DTX comparados ao grupo Controle e a Figura 5 mostra imagens representativas dos cortes histológicos do arco aórtico.

A área da íntima medida no grupo LDE-DTX foi aproximadamente 7 vezes menor que a do grupo Controle e a porcentagem de lesão do grupo tratado com a associação LDE-DTX foi 88% menor que a do grupo Controle, como mostrado na Figura 5.

A espessura da lesão na camada íntima cerca de 80% menor no grupo tratado com LDE-DTX quando comparado ao grupo Controle.

Tabela 5: Morfometria do arco aórtico dos coelhos dos grupos Controle e LDE-DTX.

	Controle (n=9)	LDE-DTX (n=9)
Área Total da Aorta (mm ²)	1,23±0,16	1,12±0,11
Área de Lesão (mm ²)	0,23±0,20	0,03±0,04*
Porcentagem Lesão	18±14	2±4*
Espessura Total (µm ²)	558,8±91,7	466,1±55,5 [†]
Espessura de Lesão (µm ²)	78,45±81,69	5,71±6,47*

Dados expresso em Média±D.P. *p<0,01; [†]p<0,05.

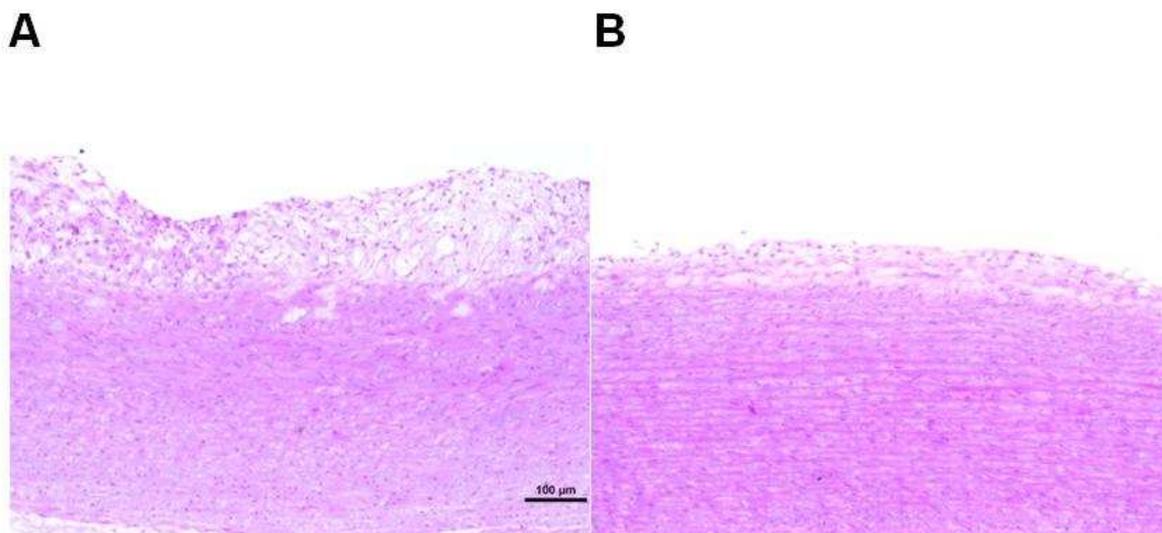


Figura 5: Imagem representativa de corte histológico do arco aórtico dos coelhos dos grupos (A) Controle e (B) LDE-DTX. Coloração de hematoxilina-eosina. Aumento de 100X.

4.8 Análise imunohistoquímica de células do músculo liso

A Tabela 6 mostra os resultados para marcação de células de músculo liso na camada íntima do arco aórtico dos coelhos dos grupos Controle e LDE-DTX. A porcentagem de área marcada foi cerca de 7 vezes menor no grupo tratado com LDE-DTX quando comparado ao Controle.

Tabela 6: Área total da íntima, área marcada com α -actina e porcentagem marcada na íntima com α -actina dos grupos Controle e LDE-DTX.

	Controle (n=9)	LDE-DTX (n=9)
Área total da íntima ($\mu\text{m}^2 \times 10^3$)	113,9 \pm 98,3	13,1 \pm 30,2*
Área marcada ($\mu\text{m}^2 \times 10^3$)	53,0 \pm 39,4	6,4 \pm 14,4*
% área marcada na íntima	36 \pm 21	5 \pm 11*

Dados expresso em Média \pm D.P. *p<0,05.

A Figura 6 mostra a imagem representativa da imunohistoquímica para α -actina dos grupos Controle e LDE-DTX.

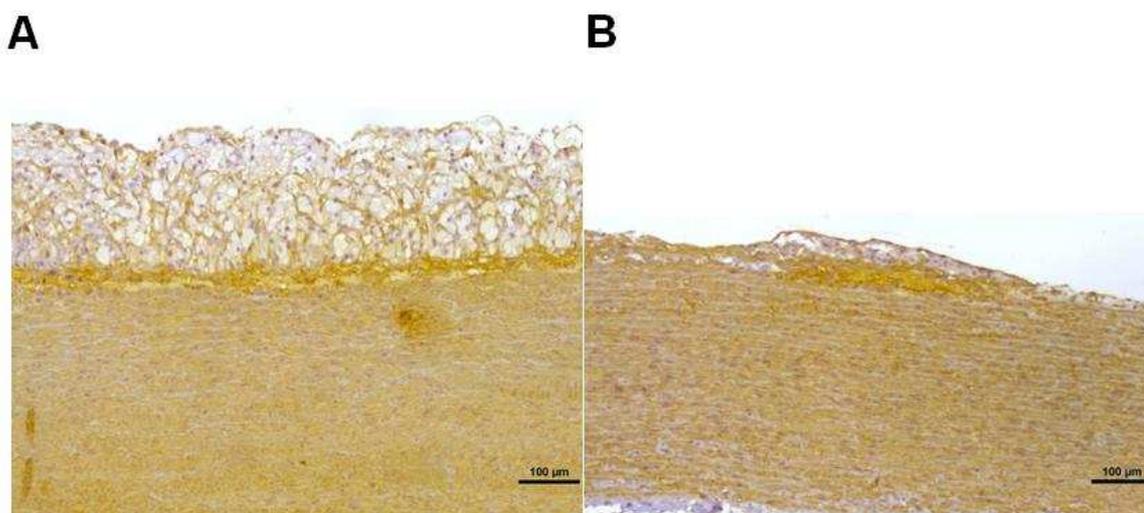


Figura 6: Imagem representativa de imunohistoquímica para células de músculo liso no arco aórtico dos grupos (A) Controle e (B) LDE-DTX marcadas pelo cromógeno DAB. Aumento de 100X.

4.9 Expressão proteica

4.9.1 Processo inflamatório

A Figura 7B mostra as bandas de Western blot representativas de marcadores inflamatórios no arco aórtico dos grupos LDE-DTX e Controle. A expressão proteica de CD68 foi aproximadamente 60% menor no grupo tratado comparado ao grupo Controle, como mostrado na Figura 7C. A menor presença de macrófagos nas lesões ateroscleróticas do grupo LDE-DTX foi mostrada na Figura 7A. Da mesma forma, a quimiocina MCP-1 também foi 80% menor no grupo LDE-DTX em comparação ao grupo controle no arco aórtico (Figura 7D).

Os animais tratados com LDE-DTX apresentaram menor expressão proteica de todos os marcadores inflamatórios analisados. A expressão proteica de TNF- α foi 45% menor e a expressão de NF- κ B, IL-1 β e IL-6 foi cerca de 60% menor no grupo LDE-DTX que no grupo Controle (Figuras 7E-H).

O grupo tratado com LDE-DTX apresentou cerca de 50% menos expressão proteica do fator von Willebrand do que os animais do Controle (Figura 7I).

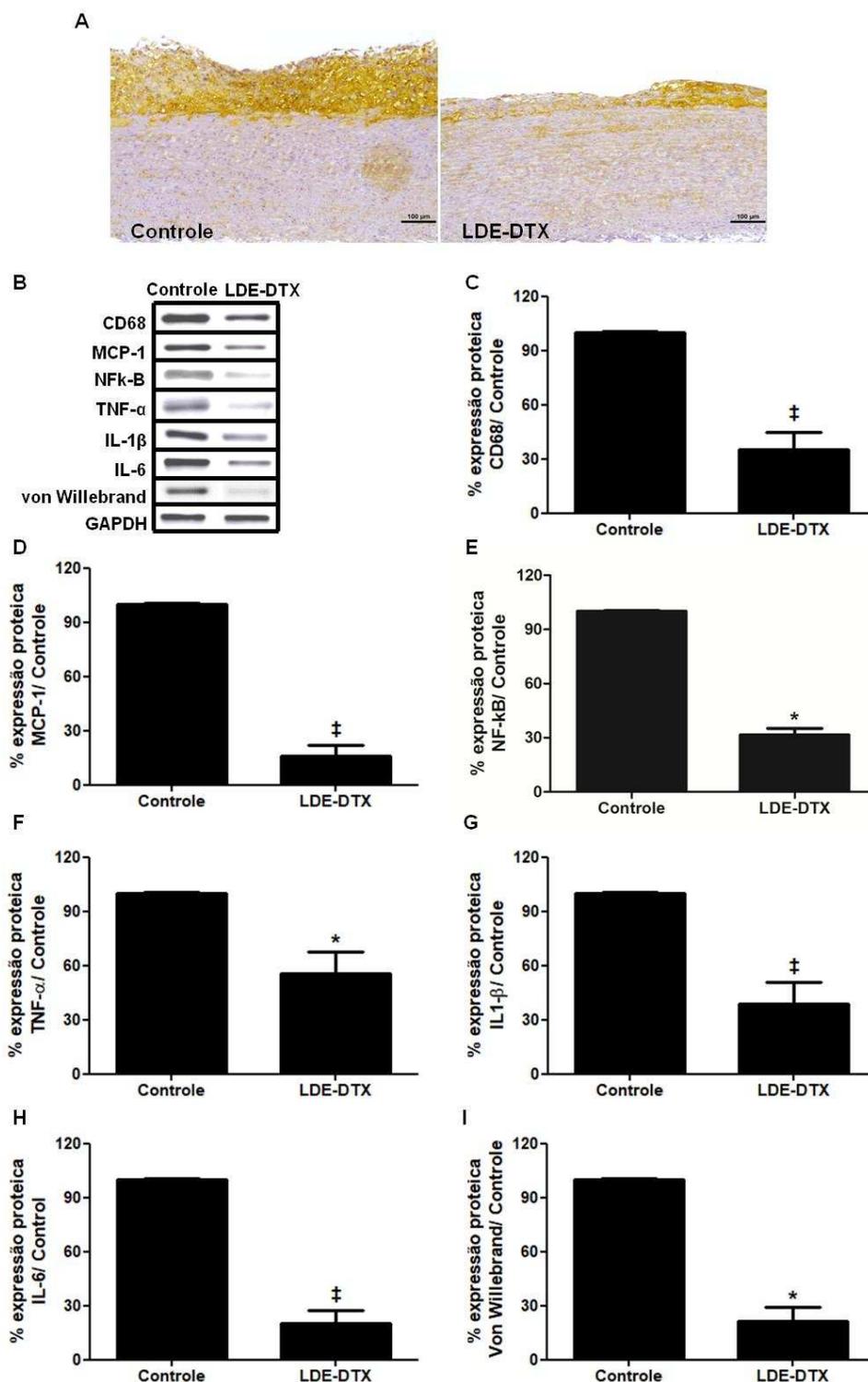


Figura 7: (A) Imagem representativa de imunohistoquímica para macrófagos no arco aórtico marcado com cromógeno DAB nos grupos Controle e LDE-DTX. Aumento de 100x. (B) Imagem ilustrativa das bandas de Western blot para as proteínas CD68, MCP-1, NF-κB, TNF-α, IL-1 β, IL-6 e von Willebrand dos grupos Controle e LDE-DTX. Expressão proteica de (C-I) CD68, MCP-1, NF-κB, TNF-α, IL-1β, IL-6 e von Willebrand em arco aórtico dos coelhos dos grupos Controle (n=4) e LDE-DTX (n=5). Dados expressos em Média ± Desvio Padrão. *p<0,01; †p<0,05.

4.9.2 Proliferação celular

A expressão proteica do marcador de proliferação PCNA foi 40% menor no grupo tratado com LDE-DTX em comparação com o grupo Controle (Figura 8A-B). A presença de PCNA no arco aórtico dos grupos Controle e LDE-DTX foi demonstrada na Figura 8C.

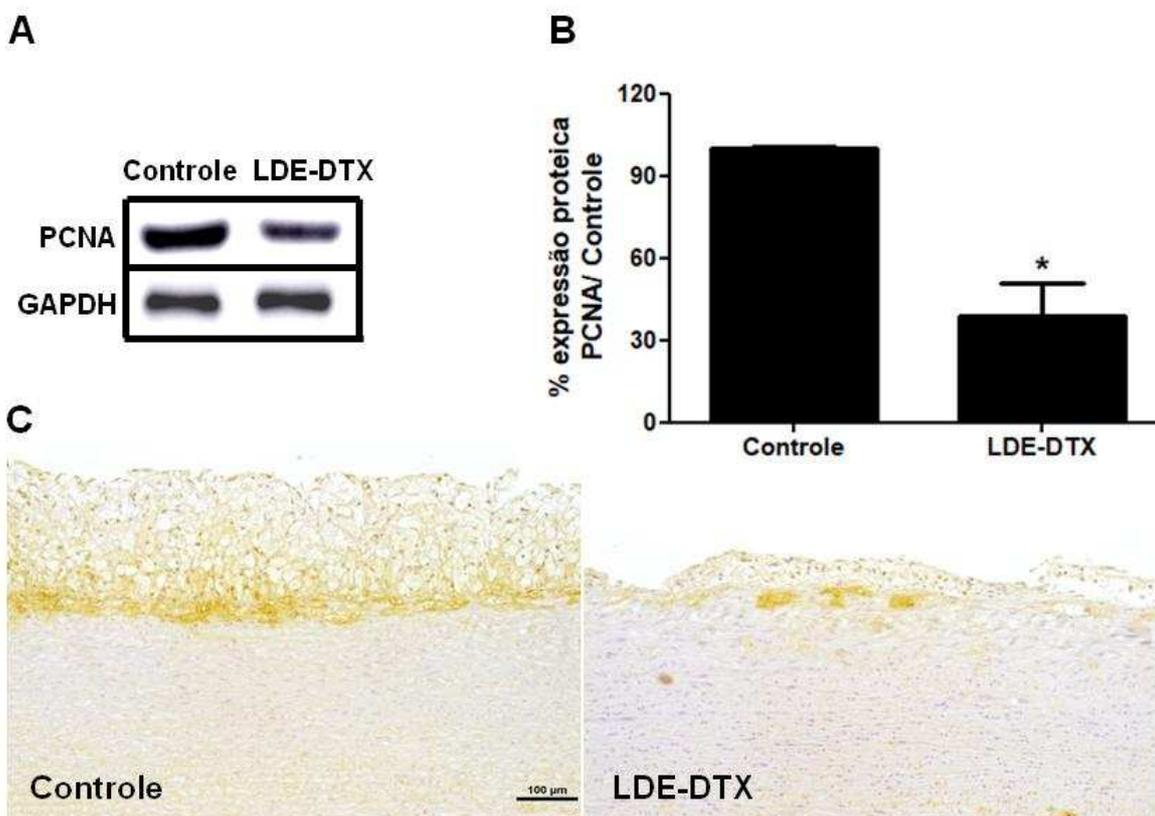


Figura 8: (A) Imagem ilustrativa das bandas de Western blot para a proteína PCNA. (B) Expressão proteica de PCNA em arco aórtico dos coelhos dos grupos Controle (n=4) e LDE-DTX (n=4). (C) Imagem representativa de PCNA no arco aórtico de ambos os grupos marcados pelo cromógeno DAB. Aumento de 100X. Dados expressos em Média \pm Desvio Padrão. * $p < 0,01$.

4.9.3 Morte celular

As bandas representativas de Western blot dos marcadores de morte celular no arco aórtico dos grupos Controle e LDE-DTX foram demonstradas na Figura 9A. A expressão proteica dos fatores pró-apoptóticos caspase 3 (Figura 9B) foi cerca de 80% menor e caspase 9 (Figura 9C) e Bax (Figura 9D) foram aproximadamente 50% menores no grupo LDE-DTX em comparação ao grupo Controle. Os animais tratados com LDE-DTX também mostraram expressão proteica do fator anti-apoptótico Bcl-2 50% menor quando comparados com os animais do grupo Controle (Figura 9E).

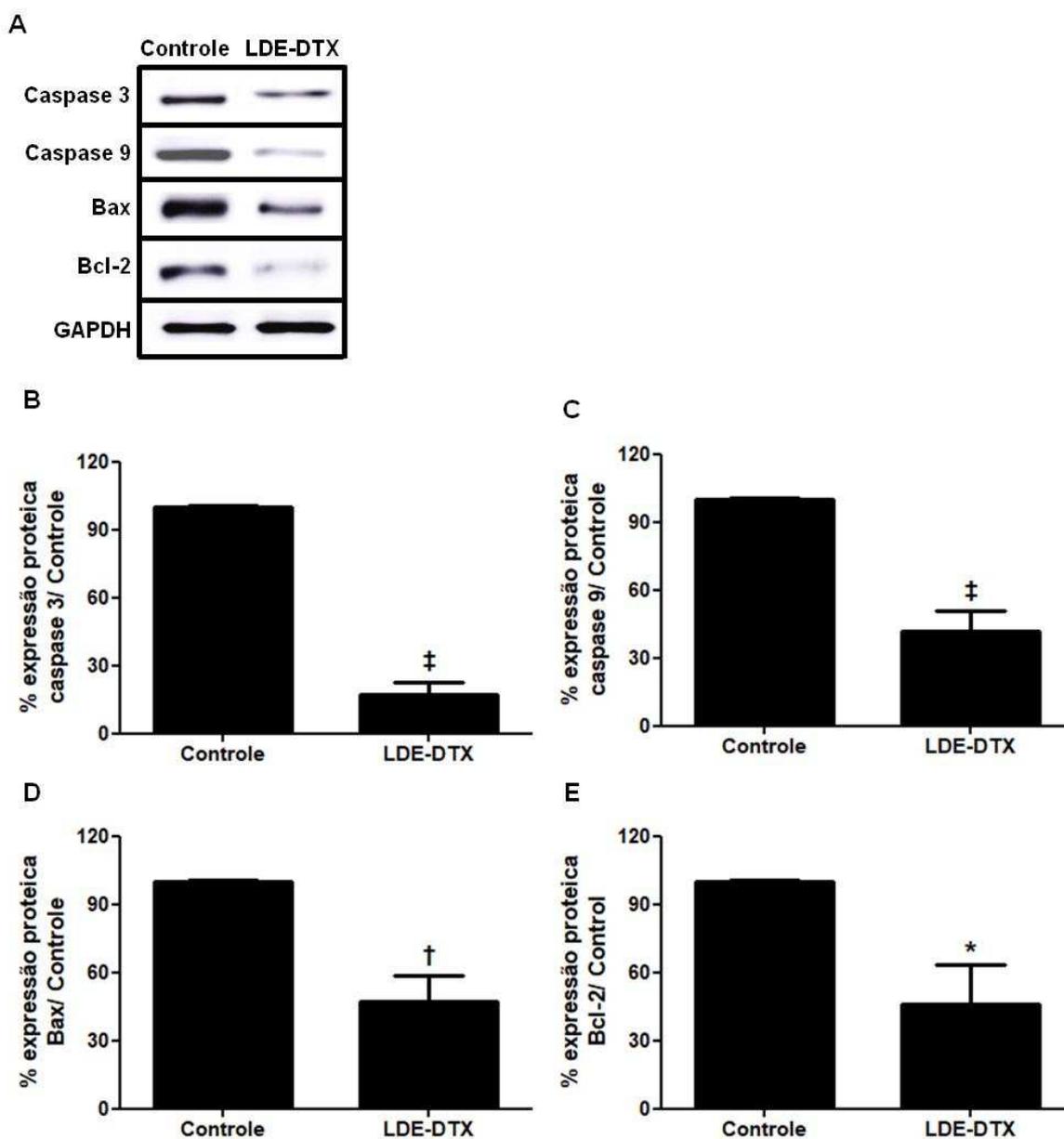


Figura 9: (A) Imagem ilustrativa das bandas de Western blot para as proteínas caspase 3, caspase 9, Bax e Bcl-2. Expressão proteica de (B-D) caspase 3, caspase 9, Bax e Bcl-2 em arco aórtico dos coelhos dos grupos Controle (n=5) e LDE-DTX (n=4). Dados expressos em Média \pm Desvio Padrão. * $p < 0,01$; [†] $p < 0,001$; [‡] $p < 0,05$.

4.9.4 Reparo vascular

A Figura 10A mostra bandas representativas de Western blot de MMP-2 e 9 dos grupos LDE-DTX e Controle. A expressão de MMP-2 e MMP-9 foi cerca de 70% menor no grupo tratado com LDE-DTX em comparação com o grupo de Controle (Figura 10B-C).

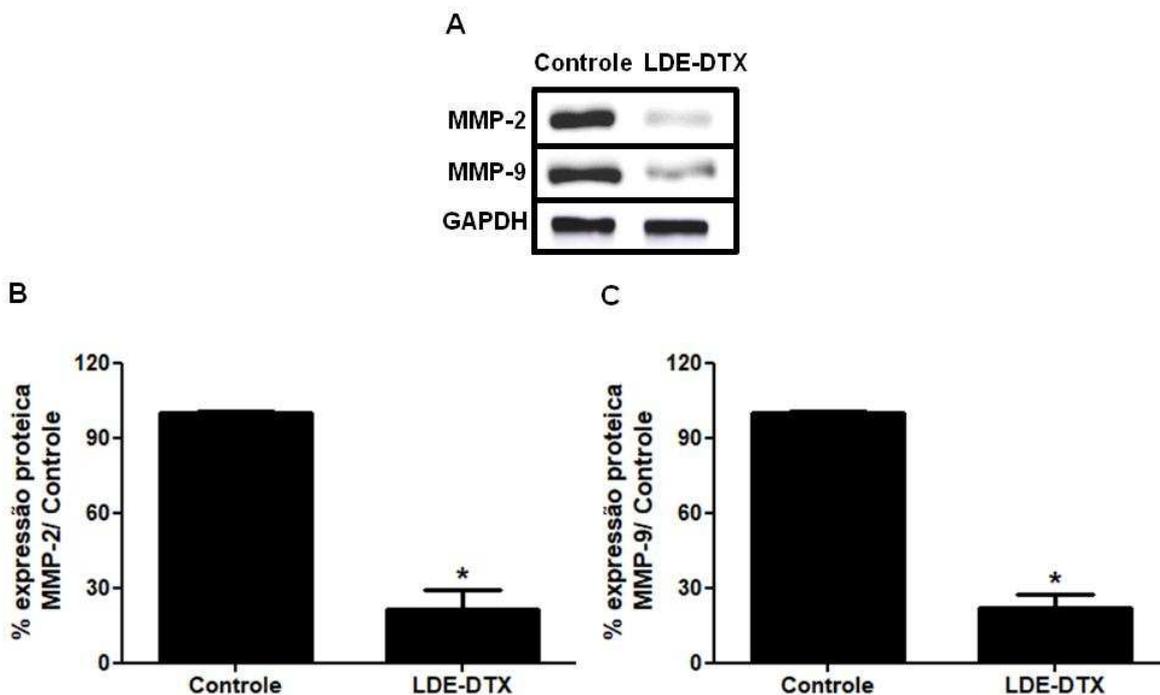


Figura 10: (A) Imagem ilustrativa das bandas de Western blot para as proteínas MMP-2 e MMP-9. Expressão proteica de (B-C) MMP-2 e MMP-9 em arco aórtico dos coelhos dos grupos Controle (n=4) e LDE-DTX (n=4). Dados expressos em Média \pm Desvio Padrão. * $p < 0,01$.

A Figura 11A mostra bandas representativas de Western blot de TGF- β e colágenos I e III. A expressão proteica do TGF- β foi 50% menor nos animais

tratados com LDE-DTX do que no grupo Controle (Figura 11B). O colágeno I (Figura 11C) foi 30% menor no grupo tratado com LDE-DTX, enquanto o colágeno III (Figura 11D) foi cerca de 70% menor no grupo LDE-DTX quando comparado ao grupo Controle. A Figura 11E mostra imagem representativa de secções do arco aórtico coradas com tricrômio de Masson representando a matriz extracelular nos grupos Controle e LDE-DTX.

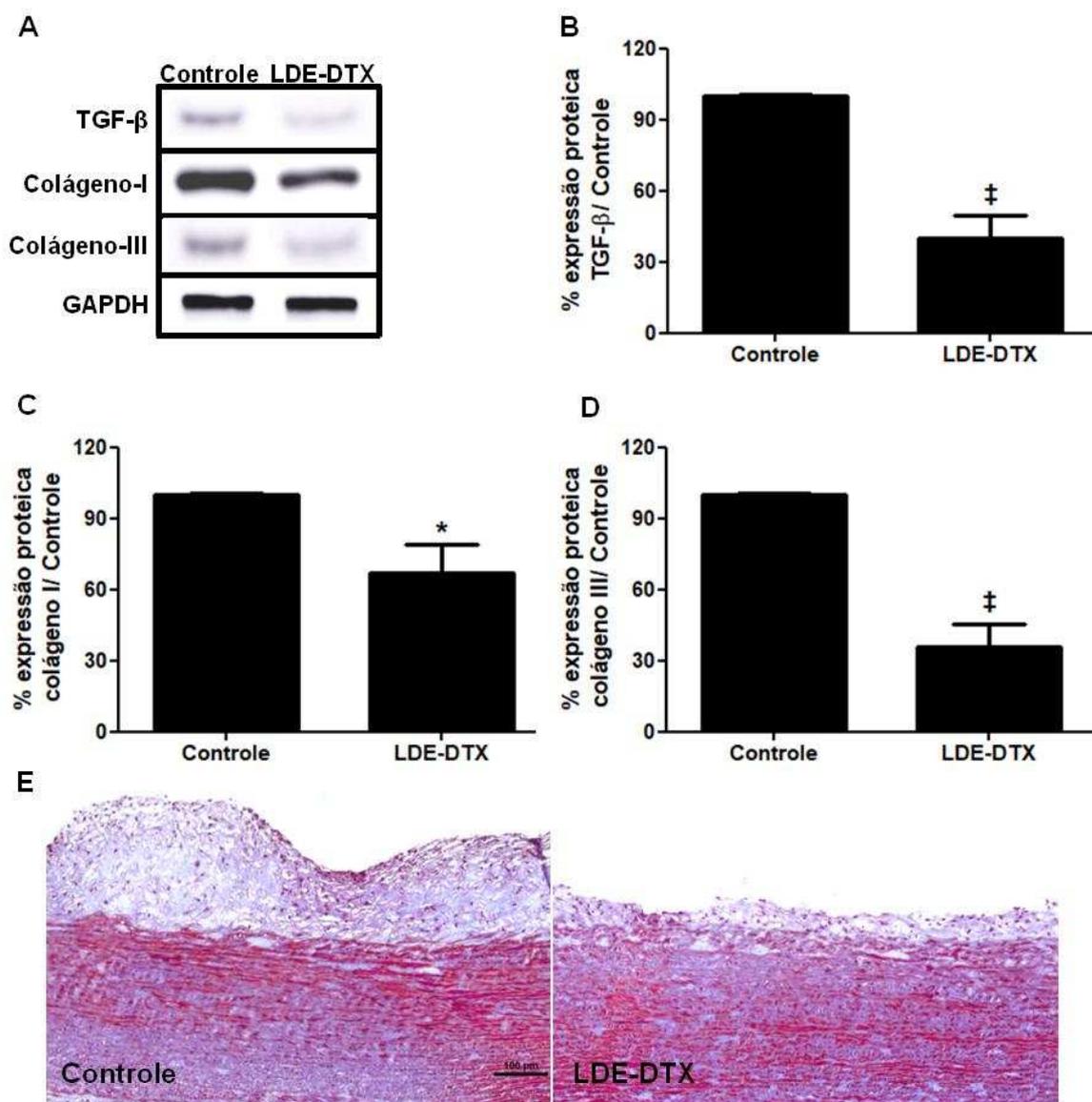


Figura 11: (A) Imagem ilustrativa das bandas de Western blot para as proteínas TGF-β, colágeno I e colágeno III. Expressão proteica de (B-D) TGF-β, colágeno I e colágeno III e em arco aórtico dos coelhos dos grupos Controle (n=4) e LDE-DTX (n=4). (E) Imagem representativa de imunohistoquímica para células de colágeno no arco aórtico dos grupos Controle e LDE-DTX marcadas pelo cromógeno DAB. Aumento de 100X. Dados expressos em Média ± Desvio Padrão. *p<0,01; ‡p<0,05.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliamos o tratamento de coelhos com aterosclerose induzida por dieta rica em colesterol com a associação do docetaxel, à LDE, nanopartícula desenvolvida pelo Prof. Maranhão e colaboradores.

Nosso laboratório foi pioneiro no tratamento da aterosclerose utilizando quimioterápicos, uma vez que a associação destes fármacos à LDE neutraliza esses agentes, minimizando os efeitos adversos do tratamento (Maranhão et. al, 2008; Tavares et al.; 2008; Bulgareli et al.; 2012).

Os taxanos, agentes quimioterápicos antiproliferativos foram testados previamente por nosso laboratório no tratamento da aterosclerose em coelhos (Maranhão et. al., 2008), porém o presente estudo permitiu uma avaliação mais detalhada quanto o mecanismo de ação dessa classe de fármacos além de explorar um fármaco ainda não testado, o docetaxel.

O modelo experimental escolhido para o estudo é bastante sedimentado e a indução da aterosclerose nos coelhos foi eficaz, uma vez que o colesterol total dos animais aumentou consideravelmente quando comparados o início e o término do protocolo. O consumo de ração e o peso dos animais se mantiveram durante o protocolo, em ambos os grupos.

O tratamento dos coelhos associando o docetaxel à LDE não apresentou efeitos colaterais. A queda no número de hemácias entre os períodos basal e final do protocolo ocorreu em ambos os grupos, ou seja, não está relacionada ao tratamento e é provavelmente decorrente da indução da aterosclerose. As

enzimas hepáticas e marcadores de função renal também não apresentaram diferença durante todo o protocolo, indicando que a LDE neutralizou os efeitos tóxicos do fármaco.

Estudos clínicos em pacientes com câncer de mama tratados com docetaxel comercial mostraram que anemia e neutropenia são os eventos adversos hematológicos mais frequentes. Alterações em enzimas hepáticas e de creatinina nesses pacientes também foram relatadas (Ho et al., 2014; Schwartz et al., 2005; Kim et al., 2018).

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório associando a LDE a quimioterápicos como etoposide, metotrexato e carmustina não apresentaram toxicidade relacionada ao tratamento (Tavares et al., 2011; Bulgarelli et al., 2012; Daminelli et al., 2016).

A associação do paclitaxel à LDE praticamente elimina a toxicidade clínica e laboratorial desta droga, como demonstrado em animais experimentais e em estudos com pacientes com cânceres avançados. A viabilidade e segurança do tratamento com esta formulação também foi comprovada em um estudo piloto envolvendo pacientes com ateromas aórticos (Maranhão et al., 2008; Shiozaki et al., 2016; Graziani et al., 2017).

No presente estudo, o tratamento com LDE-DTX resultou em área de lesão aterosclerótica 80% menor que nos coelhos controles. Em estudo anterior, o tratamento com LDE-paclitaxel reduziu em 60% a área de lesão aterosclerótica (Maranhão, 2008). A expressão proteica de macrófagos foi cerca de 60% menor no grupo tratado com LDE-DTX quando comparado ao grupo Controle enquanto

que no tratamento com LDE-paclitaxel foi 85% menor quando comparado ao seu controle. A presença de células musculares lisas na íntima foi 85% menor no grupo tratado com LDE-DTX quando comparado ao grupo Controle enquanto que no tratamento com LDE-paclitaxel foi 87% menor no grupo tratado comparado ao seu controle (Maranhão et al., 2008).

Essas diferenças podem ser atribuídas às diferentes doses utilizadas em cada estudo bem como as técnicas utilizadas para análise desses marcadores e não indicam superioridade de uma preparação sobre a outra.

A expressão proteica do PCNA, proteína *scaffold* envolvida na replicação do DNA que constitui um marcador de proliferação padrão (Pickering et al,1993) foi menor no grupo tratado com LDE-DTX quando comparado ao grupo Controle.

Axel e colaboradores (1997) demonstraram em estudo com cultura de células musculares lisas que os taxanos inibiam a proliferação destas células em um período de até 14 dias após a aplicação.

Em estudo *in vitro* de cultura celular realizado para investigar os efeitos inibitórios do docetaxel na proliferação de células musculares lisas e mecanismo molecular desta inibição, docetaxel agiu significativamente tanto na proliferação como na síntese de DNA destas células, estimulado pelo PDGF. Docetaxel também diminuiu as expressões de proteínas relacionadas ao ciclo celular, e bloqueou a progressão da proliferação na fase G0 e G1 da mitose (Yasuda et al., 2002; Park et al., 2011).

O mecanismo de ação do docetaxel somado à captação da LDE aumentada em tecidos com alta taxa de proliferação celular, como na

aterosclerose (Ho et. al, 1987, Maranhão et. al, 2008) promove ação direta da associação LDE-DTX nas lesões ateroscleróticas, conseqüentemente diminuindo a proliferação das células endoteliais e musculares lisas.

A inibição da proliferação celular leva a um menor recrutamento de monócitos, o que explica a menor expressão proteica de MCP-1 encontrado em nosso estudo. Diversos estudos experimentais demonstraram que o MCP-1 está altamente expresso em placas ateroscleróticas e é responsável pela mediação no recrutamento de macrófagos para a camada íntima acometida pela aterosclerose (Lin et al., 2014).

O menor recrutamento de macrófagos para a camada íntima reflete na avaliação das citocinas anti-inflamatórias IL-1 β , TNF- α e IL-6 que, em nosso estudo, apresentaram menor expressão proteica no grupo tratado com LDE-DTX em comparação ao controle, assim como NF-kB, que medeia à indução de citocinas pró-inflamatórias, fatores quimiotáticos e moléculas de adesão (Liu et al., 2017). O processo inflamatório na lesão aterosclerótica é retroalimentado, ou seja, quanto maior a ativação de macrófagos, maior a inflamação (Libby et al., 2010). Acreditamos então que o menor recrutamento de macrófagos leva a menor formação de células espumosas e conseqüentemente menor inflamação.

A ação anti-inflamatória do LDE-DTX também foi estendida ao fator de von Willebrand (FVW) produzido pelo endotélio e cuja expressão protéica no arco aórtico foi diminuída pelo tratamento. O VWF tem um papel presuntivo no recrutamento de leucócitos e plaquetas em tecido inflamado e recentemente foi implicado como mediador da inflamação vascular. Evidências sugerem o seu papel no recrutamento de leucócitos e plaquetas no tecido inflamado (Gragnano

et al., 2017). O VWF pode estimular diretamente a proliferação de células musculares lisas, o principal componente celular dos ateromas, que foi diminuído pelo tratamento LDE-DTX (Methia et al., 2001).

Os efeitos do LDE-DTX no reparo da artéria lesionada foram abordados neste estudo com a avaliação da expressão proteica de colágeno, metaloproteinases (MMPs) e TGF- β . As MMPs secretadas pelos macrófagos degradam a matriz extracelular, facilitando assim a progressão da migração celular e a invasão da camada íntima pelas células musculares lisas (Nadkarni, et al, 2009). A quantidade e organização do colágeno da matriz é um dos principais determinantes da estabilidade mecânica da capa fibrosa e o aumento na proteólise do colágeno pelas MMPs está associado à ruptura da placa (Hansson et al., 2006). As MMPs aumentadas estão associadas a capas fibrosas mais finas e estrutura tecidual menos organizada (Chen et al., 2013). O TGF- β inibe o acúmulo de células musculares lisas na camada íntima e estimula a síntese da matriz extracelular e o reparo do tecido da parede arterial (Toma et al., 2012). No arco aórtico dos coelhos ateroscleróticos, o tratamento com LDE-DTX resultou na menor expressão proteica de MMP-2, MMP-9, colágeno I e colágeno III, bem como de TGF- β . Como o efeito antiproliferativo de DTX inibiu fortemente a invasão de macrófagos e células musculares lisas na camada íntima, é concebível que a menor expressão desses dois tipos de células resultou na síntese diminuída de MMPs e TGF- β por macrófagos e de colágeno por células musculares lisas. O efeito anti-aterosclerótico da associação LDE-DTX promoveria também efeito estabilizador na estrutura do vaso.

Quanto ao mecanismo de morte celular, a expressão proteica de todos os fatores pró apoptóticos analisados foi menor no grupo tratado com LDE-DTX quando comparado ao Controle bem como a expressão proteica de bcl-2, fator anti-apoptótico.

As caspases são normalmente inativas ou minimamente ativas quando não estimuladas e são acionados através de um conjunto de eventos de sinalização, como a ativação de um receptor específico. A ativação da caspase 9 e caspase 3 foi demonstrada estar envolvida na apoptose induzida por LDL-ox em células musculares lisas e células endoteliais (Kutuk et al., 2006). Nishio e Watanabe (1996) revelaram que a apoptose induzida por LDL-ox das células musculares lisas envolvia a regulação negativa da proteína Bcl-2 e a ativação da caspase 3. Outro estudo demonstrou que a LDL-ox aumenta a expressão da Bax nas células musculares lisas e que tanto o aumento da Bax quanto a diminuição da Bcl-2 eram dependentes da captação ou ligação da LDL-ox, mediada pelo LOX-1, receptor específico para LDL-ox (Kataoka et al., 2001).

Portanto, acreditamos que uma vez que há menor formação de placa aterosclerótica e menor inflamação, a necessidade de ativação do mecanismo de morte celular passa a ser menor e tanto proteínas pró-apoptóticas quanto anti-apoptóticas estão menos expressas no grupo tratado com LDE-DTX quando comparadas ao grupo Controle em nosso estudo.

O presente estudo possibilitou explorar os mecanismos moleculares envolvidos no tratamento com a associação LDE-DTX e mostrou que o docetaxel, assim como o paclitaxel, possui significativa ação antiaterosclerótica.

Quando associado à LDE, que reduz a toxicidade do fármaco, seu uso passa a ser viável no tratamento da aterosclerose.

6. CONCLUSÃO

O tratamento com a associação LDE-DTX se mostrou eficaz, uma vez os coelhos tratados apresentaram menor porcentagem de lesão aterosclerótica quando comparados aos controles.

A LDE neutralizou os efeitos tóxicos do fármaco, uma vez que não houve nenhum tipo de toxicidade relacionada ao tratamento.

O tratamento com LDE-DTX proporcionou menor inflamação, menor morte celular e menor proliferação nos coelhos tratados com a associação quando comparados aos controles.

REFERÊNCIAS

Ades A, Carvalho JP, Graziani SR, et al. Uptake of cholesterol-rich emulsion by neoplastic ovarian tissues. *Gynecol. Oncol.* 2001; 47:63-83.

Axel DI, Kunert W, Göggelmann C, Oberhoff M, et al. Paclitaxel Inhibits Arterial Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration In Vitro and In Vivo Using Local Drug Delivery. *Circulation.* 1997; 96: 636-645.

Azevedo CH, Carvalho JP, Valduga CJ, Maranhão RC. Plasma kinetics and uptake by the tumor of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) associated to etoposide oleate in patients with ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2005; 97: 178-82.

Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science.* 1986; 232: 34–47.

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

Bukka M, Rednam PJ, Sinha M. Drug-eluting balloon: design, technology and clinical aspects. *Biomedical Materials.* 2018; 13: 3.

Chen Q, Jin M, Yang F, Zhu J, Xiao Q, Zhang L. Matrix Metalloproteinases: Inflammatory Regulators of Cell Behaviors in Vascular Formation and Remodeling. *Mediators of Inflammation.* 2013;2013:14.

Choy PC, Yaw LS, David M, et al. Lipids and atherosclerosis. *Biochemistry Cellular Biology.* 2004; 82: 212-224.

Couto RD, Dallan LA, Lisboa LA, et al. Deposition of Free Cholesterol in the Blood Vessels of Patients with Coronary Artery Disease: a Possible Novel Mechanism for Atherogenesis. *Lipids.* 2007; 42:411–418.

Cortes JE, Padzur R. Docetaxel. *Journal of Clinical Oncology*. 1995;13:2643-2655.

Daminelli EN, Martinelli AEM, Bulgarelli A, Freitas FR, Maranhão RC. Reduction of Atherosclerotic Lesions by the Chemotherapeutic Agent Carmustine Associated to Lipid Nanoparticles. *Cardiovascular Drugs & Therapy*. 2016; 30: 433-443.

Dominiczak MH and Caslake MJ. Apolipoproteins: metabolic role and clinical biochemistry applications. *Ann Clin Biochem*. 2011; 48: 498–515.

Dzau VJ, Braun-Dullaes RC, Sedding, DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat. Med*. 2002; 8:1249-1256.

Fancher IS, Ahn SJ, Adamos C, et al. Hypercholesterolemia-Induced Loss of Flow-Induced Vasodilation and Lesion Formation in Apolipoprotein E–Deficient Mice Critically Depend on Inwardly Rectifying K⁺ Channels. *Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease*. 2018;7.

Gao H, Cao S, Yang Z, et al. Preparation, characterization and anti-glioma effects of Docetaxel incorporated albumin-lipid nanoparticles. *Journal Biomedical Nanotechnology*. 2015; 11: 2137-2147.

Graziani SR, Igreja FAF, Hegg R, et al. Uptake of a cholesterol rich-emulsion by breast cancer. *Gynecology Oncology*. 2002; 85: 493-497.

Graziani SR, Vital CG, Morikawa AT, et al. Phase II study of paclitaxel associated with lipid core nanoparticles (LDE) as third-line treatment of patients with epithelial ovarian carcinoma. *Med. Oncol*. 2017; 34(9): 151.

Gragnano F, Sperlongano S, Golia E. The Role of von Willebrand factor in vascular inflammation: from pathogenesis to targeted therapy. *Mediators of Inflammation*. 2017; 2017:13.

Goikuria H, Vandenbroeck K, Alloza I. Inflammation in human carotid atheroma plaques. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2018; 39: 62-70.

Gottlieb MG, Bonardi G, Moriguchi EH. Fisiopatologia e aspectos inflamatórios da aterosclerose. *Scientia Medica*; 2005;15; 3.

Haider N, Hartung D, Fujimoto S, et al. Dual molecular imaging for targeting metalloproteinase activity and apoptosis in atherosclerosis: molecular imaging facilitates understanding of pathogenesis. *J Nucl Cardiol*. 2009;16:753-62.

Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nature Immunology*. 2006; 6: 508-519.

Hirata RD, Hirata MH, Mesquita CH, et al. Effects of apolipoprotein B-100 on the metabolism of a lipid microemulsion model in rats. *Biochem Biophys Acta*. 1999; 1437-1453.

Ho YK, Smith RG, Brown MS, et al. Low density lipoprotein (LDL) receptor activity in human acute myelogenous leukemia cells. *Blood*. 1987; 52: 1099-1114.

Ho MY, Mackey JR. Presentation and management of docetaxel-related adverse effects in patients with breast cancer. *Cancer Manag Res*. 2014; 6: 253-9.

Hoseini Z, Sepahvand F, Rashidi B, Sahebkar A, Masoudifar A, Mirzaei H. NLRP3 inflammasome: Its regulation and involvement in atherosclerosis. *J Cell Physiol*. 2018; 233:2116-2132.

Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer*. 2004; 4: 253-65.

Kataoka H, Kume N, Miyamoto S. Oxidized LDL Modulates Bax/Bcl-2 Through the Lectinlike Ox-LDL Receptor-1 in Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21: 955-960.

Krasnopolsky AS, Dudnichenko YM. Experimental study of liposomal docetaxel analysis of docetaxel incorporation and stability. *Exp Oncol*. 2017; 39.

Kutuk O, Basaga H. Bcl-2 protein family: implications in vascular apoptosis and atherosclerosis. *Apoptosis*. 2006; 11: 1661-75.

Li J, Yao Q, Feng F, He S, et al. Systematic identification of rabbit LncRNAs reveals functional roles in atherosclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2018

Liu W, Yin Y, Zhou Z, et al. OxLDL-induced IL-1beta secretion promoting foam cells formation was mainly via CD36 mediated ROS production leading to NLRP3 inflammasome activation. *Inflamm. Res*. 2014; 43: 63-33.

Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002; 420.

Libby P, Aikawa M. Mechanisms of plaque stabilization with statins. *Am J Cardiol* 2003;91:4B–8B.

Libby P. Role of inflammation in atherosclerosis associated with rheumatoid arthritis. *Am J Med*. 2008;121:S21-31.

Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011;473:317-25.

Long BH, Fairchild CR. Paclitaxel Inhibits Progression of Mitotic Cells to G1 Phase by Interference with Spindle Formation without Affecting Other Microtubule Functions during Anaphase and Telephase. *Cancer Research*. 1994; 54: 4355-4361.

Maranhão RC, Garicochea B, Dorlhiac-Llacer P, et al. Plasma kinetics and biodistribution of a lipid emulsion resembling low-density lipoprotein in patients with acute leukemia. *Cancer Research*. 1994; 54: 4660-4666.

Maranhão RC, Graziani SR, Yamaguchi N, et al. Association of carmustine with a lipid emulsion: in vitro, in vivo and preliminary studies in cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2002; 49: 487-98.

Maranhão RC, Tavares ER, Padoveze, AF, et al. Paclitaxel associated with cholesterol-rich nanoemulsions promotes atherosclerosis regression in the rabbit. *Atherosclerosis*. 2008; 959–966.

Martínez GJ, Celermajer DS, Patel S. The NLRP3 inflammasome and the emerging role of colchicine to inhibit atherosclerosis-associated inflammation. *Atherosclerosis*. 2018; 269: 262-271.

Methia N, André P, Denis CV, Economopoulos M, Wagner DD. Localized reduction of atherosclerosis in von Willebrand factor-deficient mice. *Blood*. 2001; 98:1424–1428.

Montero A, Fossella F, Hortobagyi G, Valero V. Docetaxel for treatment of solid tumours: a systematic review of clinical data. *Lancet Oncol*. 2005; 6: 229–39.

Morse DL, Gray H, Payne CM, Gillies RJ. Docetaxel induces cell death through mitotic catastrophe in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2005; 4: 1495-1504.

Nadkarni SK, Bouma BE, de Boer J, Tearney GJ. Evaluation of collagen in atherosclerotic plaques: the use of two coherent laser-based imaging methods. *Lasers Med Sci*. 2009; 24: 439-45.

Nehmé A, Varadarajan P, Sellakumar G, et al. Modulation of docetaxel-induced apoptosis and cell cycle arrest by all- trans retinoic acid in prostate cancer cells. *British Journal of Cancer*. 2001; 05: 29.

Nishio E, Watanabe Y. Oxysterols induced apoptosis in cultured smooth muscle cells through CPP32 protease activation and bcl-2 protein downregulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; 226: 928-34.

Park ES, Yoo JM, Lim Y, Tudev et al. Inhibitory effects of docetaxel on platelet-derived growth factor (PDGF)-BB-induced proliferation of vascular smooth muscle cells through blocking PDGF-receptor β phosphorylation. *J Pharmacol Sci*. 2011; 116: 204-13.

Pienta, K. Preclinical mechanisms of action of docetaxel and docetaxel combinations in prostate cancer. *Seminars in oncology*. 2001; 28: 3-7.

Pickering JG, Weir L, Jekanowski J, Kearney MA, Isner JM. Proliferative activity in peripheral and coronary atherosclerotic plaque among patients undergoing percutaneous revascularization. *Journal of Clinical Investigation*. 1993; 9: 1469-1480.

Ridker PM, Everett BM, Thuren T, et al. CANTOS Trial Group. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med.* 2017; 377: 1119-1131.

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

Rodrigues DG, Covolan CC, Coradi ST, et al. Use of a cholesterol-rich emulsion that binds to low density lipoprotein receptors as a vehicle for paclitaxel. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2002; 54: 765–772.

Santos MCB, Vieira JAM, César BM, et al. Hábitos e perfil socioeconômico do paciente aterosclerótico no Brasil. *Com. Ciências Saúde.* 2011; 3: 247-256.

Sbarsi I, Falcone C, Boiocchi C, Campo I, et, al. Inflammation and atherosclerosis: the role of TNF and TNF receptors polymorphisms in coronary artery disease. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2007; 20: 145-54.

Schwartz GK, Shah MA. Targeting the Cell Cycle: A New Approach to Cancer Therapy. *Journal of Clinical Oncology.* 2005; 36: 9408-9421.

Shiozaki AA, Senra T, Morikawa AT, et al. Treatment of patients with aortic atherosclerotic disease with paclitaxel-associated lipid nanoparticles. *Clinics.* 2016; 71: 435-439

Solanki A, Bhatt LK, Johnston TP, et al. Evolving targets for the treatment of atherosclerosis, *Pharmacology & Therapeutics.* 2018.

Soto Y, Mesa N, Alfonso Y, et al. Targeting arterial wall sulfated glycosaminoglycans in rabbit atherosclerosis with a mouse/human chimeric antibody. *mAbs.* 2014; 5: 1340-1346.

Tavares ER, Freitas FR, Diament JD, et al. Reduction of atherosclerotic lesions in rabbits treated with etoposide associated with cholesterol-rich nanoemulsions. *International Journal of Nanomedicine*. 2011; 6: 2297–2304.

Tajbakhsh A, Rezaee M, Kovanen PT, Sahebkar A. Efferocytosis in atherosclerotic lesions: Malfunctioning regulatory pathways and control mechanisms. *Pharmacol Ther*. 2018.

Toma I, McCaffrey TA. Transforming growth factor- β and atherosclerosis: interwoven atherogenic and atheroprotective aspects. *Cell Tissue Res*. 2012; 347:155-75.

Vial J, Cohen M, Sassi P, Thiebaut, D. Pharmaceutical quality of Docetaxel generics versus originator drug product: a comparative analysis. *Curr. Med. Res. Opin.* 2008; 24: 07.

Yasuda S, Noguchi T, Gohda M, et al. Local delivery of low-dose Docetaxel, a novel microtubule polymerizing agent, reduces neointimal hyperplasia in a balloon-injured rabbit iliac artery model. *Cardiovascular Research*. 2002; 5: 481–486.