

**Elaine Nunes Daminelli**

**Uso de carmustina associada a nanoemulsões ricas em colesterol  
(LDE) para 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  
2014**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Daminelli, Elaine Nunes

Uso de carmustina associada a nanoemulsões ricas em colesterol (LDE) para tratamento de aterosclerose induzida em coelhos / Elaine Nunes Daminelli. -- São Paulo, 2014.

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

Programa de Cardiologia.

Orientador: Raul Cavalcante Maranhão.

Descritores: 1.Nanopartículas 2.Aterosclerose 3.Inflamação  
4.Carmustina 5.Hipercolesterolemia 6.Coelhos

USP/FM/DBD-368/14

## DEDICATÓRIA

À DEUS,

pela vida, fé, capacidade e coragem de seguir em frente.

Aos meus Pais, Antônio e Cida,

por toda dedicação, oportunidade, amor, incentivo e tudo o que eles  
representam.

À meu grande companheiro, Lucas,

pela ajuda, compreensão, paciência, carinho, amor e incentivo, que são  
fundamentais para continuar  
seguindo.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Raul C. Maranhão, pela orientação, confiança, oportunidade de realizar este trabalho e a excepcional possibilidade de estudar fora do País, um período que contribuiu muito para o meu crescimento pessoal e, principalmente, profissional. Obrigada pelo valioso ensinamento durante esta importante trajetória.

Ao Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – InCor/HCFMUSP, pela possibilidade de realizar esse trabalho.

À Neusa, Tatiane e Juliana, funcionárias da Pós-Graduação do programa de Cardiologia do InCor, pela ajuda, empenho e disponibilidade sempre.

À equipe da Divisão Experimental do Instituto do Coração, especialmente Dra. Edna, Nelson, Vicente, Dario, Pedro e Hugo pelo auxílio e apoio na experimentação animal.

Ao professor Hermes V. Barbeiro pelas valiosas contribuições e ajuda na análise estatística deste trabalho.

À Adriana, Keila, Fernanda e Orlando, equipe do Laboratório de Miocardiopatias do InCor, pelo apoio e amizade.

À equipe do Laboratório de Anatomia Patológica do InCor, especialmente à Joyce, pela ajuda e sempre disponibilidade em ensinar, e à Jaqueline pelas longas conversas e amizade.

À minha amiga Maria Conceição M. Latrilha pela enorme ajuda, ensinamentos, disponibilidade, apoio, incentivo e, principalmente, amizade.

A todos os funcionários, colegas e amigos do Laboratório de Metabolismo de Lípidos do InCor, pelo apoio nesta trajetória.

A CAPES, CNPq e FAPESP, pelo apoio financeiro.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste estudo.

## Normalização Adotada

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

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. 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.....	01
2 OBJETIVOS.....	03
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	04
3.1 Aterosclerose.....	04
3.2 Carmustina.....	08
3.3 Nanoemulsão lipídica artificial rica em colesterol (LDE) como transportadora de fármaco.....	09
4 MÉTODOS.....	13
4.1 Preparo da LDE.....	13
4.2 Incorporação da carmustina à LDE.....	14
4.3 Protocolo experimental <i>in vivo</i> .....	14
4.4 Perfil hematológico.....	15
4.5 Perfil lipídico e bioquímico.....	15
4.6 Análise macroscópica dos cortes histológicos do arco aórtico.....	16
4.7 Análise morfométrica dos cortes histológicos do arco aórtico.....	17
4.8 Imunohistoquímica.....	18
4.9 Análise estatística.....	20
5 RESULTADOS.....	21

5.1 Avaliação do consumo de ração e do peso corporal dos animais.....	21
5.2 Avaliação do perfil hematológico dos animais.....	23
5.3 Avaliação do perfil lipídico dos animais.....	26
5.4 Avaliação dos parâmetros bioquímicos dos animais.....	29
5.5 Análise morfométrica das aortas.....	33
5.5.1 Planimetria macroscópica.....	33
5.5.2 Planimetria microscópica.....	36
5.5.3 Análise imunohistoquímica.....	38
5.5.3.1 Quantificação de macrófagos.....	38
5.5.3.2 Quantificação da população e subpopulação de linfócitos.....	40
5.5.3.2.1 Linfócitos T CD3.....	40
5.5.3.2.2 “Forkhead box protein P3” (FoxP3).....	42
5.5.3.3 Quantificação de células de músculo liso.....	44
5.5.3.4 Quantificação da expressão protéica de metaloproteinase 9 (MMP9).....	46
5.5.3.5 Quantificação da expressão protéica de citocinas inflamatórias.....	48
5.5.3.5.1 Interleucina 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ).....	48
5.5.3.5.2 “Tumor necrosis factor- $\alpha$ ” (TNF- $\alpha$ ).....	50
5.5.3.6 Quantificação da expressão protéica de receptores de lipoproteínas.....	52
5.5.3.6.1 Receptor de lipoproteína de alta densidade (LDL-r).....	52
5.5.3.6.2 “LDL receptor-related protein-1” (LRP-1).....	54
5.5.3.6.3 “Scavenger receptor class B1” (SR-B1).....	56
6 DISCUSSÃO.....	58
7 CONCLUSÕES.....	70
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Consumo de ração dos animais dos grupos controle e LDE-carmustina durante as semanas de tratamento.....21
- Figura 2** - Peso corporal dos animais dos grupos controle e LDE-carmustina durante as semanas de tratamento.....22
- Figura 3** - Valores totais de eritrócitos dos grupos controle e tratado com LDE-carmustina antes do início da dieta rica em colesterol (Basal), antes do início do tratamento (Pré-Tratamento) e ao final do tratamento (Pós-Tratamento).....23
- Figura 4** - Valores totais de leucócitos dos grupos controle e tratado com LDE-carmustina antes do início da dieta rica em colesterol (Basal), antes do início do tratamento (Pré-Tratamento) e ao final do tratamento (Pós-Tratamento).....24
- Figura 5** - Porcentagem de linfócitos dos grupos controle e tratado com LDE-carmustina antes do início da dieta rica em colesterol (Basal), antes do início do tratamento (Pré-Tratamento) e ao final do tratamento (Pós-Tratamento).....24
- Figura 6** - Porcentagem de monócitos dos grupos controle e tratado com LDE-carmustina antes do início da dieta rica em colesterol (Basal), antes do início do tratamento (Pré-Tratamento) e ao final do tratamento (Pós-Tratamento).....25

**Figura 7** - Porcentagem de neutrófilos dos grupos controle e tratado com LDE-carmustina antes do início da dieta rica em colesterol (Basal), antes do início do tratamento (Pré-Tratamento) e ao final do tratamento (Pós-Tratamento).....25

**Figura 8** - Concentração plasmática de colesterol total dos grupos controle e tratado com LDE-carmustina antes do início da dieta rica em colesterol (Basal), antes do início do tratamento (Pré-Tratamento) e ao final do tratamento (Pós-Tratamento).....27

**Figura 9** - Concentração plasmática de HDL-colesterol dos grupos controle e tratado com LDE-carmustina antes do início da dieta rica em colesterol (Basal), antes do início do tratamento (Pré-Tratamento) e ao final do tratamento (Pós-Tratamento).....27

**Figura 10** - Concentração plasmática de não HDL-colesterol dos grupos controle e tratado com LDE-carmustina antes do início da dieta rica em colesterol (Basal), antes do início do tratamento (Pré-Tratamento) e ao final do tratamento (Pós-Tratamento).....28

**Figura 11** - Concentração plasmática de triglicerídeos dos grupos controle e tratado com LDE-carmustina antes do início da dieta rica em colesterol (Basal), antes do início do tratamento (Pré-Tratamento) e ao final do tratamento (Pós-Tratamento).....28

**Figura 12** - Concentração plasmática de ALT dos grupos controle e tratado com LDE-carmustina antes do início da dieta rica em colesterol (Basal), antes do início do tratamento (Pré-Tratamento) e ao final do tratamento (Pós-Tratamento).....30

**Figura 13** - Concentração plasmática de AST dos grupos controle e tratado com LDE-carmustina antes do início da dieta rica em colesterol (Basal), antes do início do tratamento (Pré-Tratamento) e ao final do tratamento (Pós-Tratamento).....30

**Figura 14** - Concentração plasmática de bilirrubina total dos grupos controle e tratado com LDE-carmustina antes do início da dieta rica em colesterol (Basal), antes do início do tratamento (Pré-Tratamento) e ao final do tratamento (Pós-Tratamento).....31

**Figura 15** - Concentração plasmática de fosfatase alcalina dos grupos controle e tratado com LDE-carmustina antes do início da dieta rica em colesterol (Basal), antes do início do tratamento (Pré-Tratamento) e ao final do tratamento (Pós-Tratamento).....31

**Figura 16** – Concentração plasmática de GGT dos grupos controle e tratado com LDE-carmustina antes do início da dieta rica em colesterol (Basal), antes do início do tratamento (Pré-Tratamento) e ao final do tratamento (Pós-Tratamento).....32

**Figura 17** – Concentração plasmática de creatinina dos grupos controle e tratado com LDE-carmustina antes do início da dieta rica em colesterol (Basal), antes do início do tratamento (Pré-Tratamento) e ao final do tratamento (Pós-Tratamento).....32

**Figura 18** – Concentração plasmática de ureia dos grupos controle e tratado com LDE-carmustina antes do início da dieta rica em colesterol (Basal), antes do início do tratamento (Pré-Tratamento) e ao final do tratamento (Pós-Tratamento).....33

<b>Figura 19</b> – Planimetria macroscópica da aorta dos grupos controle e tratado com LDE-carmustina.....	34
<b>Figura 20</b> – Fotos de aorta de coelhos coradas com Escarlata de Biebrich R representando os grupos controle e tratado com LDE-carmustina.....	35
<b>Figura 21</b> – Fotos de microscopia óptica do arco aórtico coradas com hematoxilina/eosina representando os grupos controle e LDE-carmustina.....	37
<b>Figura 22</b> – Porcentagem de macrófagos e fotos de imunohistoquímica de macrófagos no arco aórtico representando os grupos controle e LDE-carmustina.....	39
<b>Figura 23</b> – Porcentagem de linfócitos T CD3 e fotos de imunohistoquímica de linfócitos T CD3 no arco aórtico representando os grupos controle e LDE-carmustina.....	41
<b>Figura 24</b> – Porcentagem de FoxP3 e fotos de imunohistoquímica de FoxP3 no arco aórtico representando os grupos controle e LDE-carmustina.....	43
<b>Figura 25</b> – Porcentagem de células de músculo liso e fotos de imunohistoquímica de células de músculo liso no arco aórtico representando os grupos controle e LDE-carmustina.....	45

<b>Figura 26</b> – Porcentagem de expressão protéica de MMP9 e fotos de imunohistoquímica de expressão protéica de MMP9 no arco aótico representando os grupos controle e LDE-carmustina.....	47
<b>Figura 27</b> – Porcentagem de expressão protéica de citocinas inflamatórias – IL-1 $\beta$ e fotos de imunohistoquímica de expressão protéica de IL-1 $\beta$ no arco aótico representando os grupos controle e LDE-carmustina.....	49
<b>Figura 28</b> – Porcentagem de expressão protéica de citocinas inflamatórias – TNF- $\alpha$ e fotos de imunohistoquímica de expressão protéica de TNF- $\alpha$ no arco aótico representando os grupos controle e LDE-carmustina.....	51
<b>Figura 29</b> – Porcentagem de expressão protéica para receptor de lipoproteína – LDL-r e fotos de imunohistoquímica de expressão protéica de LDL-r no arco aótico representando os grupos controle e LDE-carmustina.....	53
<b>Figura 30</b> – Porcentagem de expressão protéica para receptor de lipoproteína – LRP-1 e fotos de imunohistoquímica de expressão protéica de LRP-1 no arco aótico representando os grupos controle e LDE-carmustina.....	55
<b>Figura 31</b> – Porcentagem de expressão protéica para receptor de lipoproteína – SR-B1 e fotos de imunohistoquímica de expressão protéica de SR-B1 no arco aótico representando os grupos controle e LDE-carmustina.....	57

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Planimetria microscópica das áreas e das espessuras totais e da camada íntima do arco aórtico das artérias dos animais dos grupos controle e tratado com LDE-carmustina.....	37
--	----

## Resumo

DAMINELLI, E. N. **Uso de carmustina associada a nanoemulsões ricas em colesterol (LDE) para tratamento da aterosclerose induzida em coelhos.** [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica e proliferativa que tem início quando fatores de risco alteram o endotélio vascular. As partículas da nanoemulsão lipídica LDE concentram-se em sítios inflamatórios e de intensa proliferação celular, como acontece nas lesões ateroscleróticas. A carmustina, um fármaco antiproliferativo usado na quimioterapia do câncer, não foi ainda explorada no tratamento da aterosclerose. Em trabalhos anteriores, mostrou-se que a associação com a LDE reduz drasticamente a toxicidade da carmustina, o que já foi demonstrado em pacientes com câncer avançado. O propósito do estudo é avaliar se a carmustina associada à LDE pode promover o efeito antiproliferativo nas lesões ateroscleróticas induzidas em coelhos. No presente trabalho, dezoito coelhos machos da raça New Zealand, receberam dieta rica em colesterol a 1% durante 8 semanas. Depois de 4 semanas foram divididos em dois grupos: grupo controle, que recebeu injeção endovenosa contendo apenas solução salina e grupo tratado, que recebeu LDE-carmustina na dose de 4mg/Kg semanalmente durante 4 semanas. Foram avaliados perfil hematológico, lipídico, bioquímico, ponderal e o consumo de ração. Após a eutanásia, foram medidas as lesões ateroscleróticas macroscópicas. Em seguida, o arco aórtico foi analisado por morfometria e por imunohistoquímica. Observou-se que não houve diferença no perfil ponderal e no consumo de ração entre os grupos de estudo. Não houve toxicidade hematológica, hepática e renal no grupo tratado. No perfil lipídico, ao final do estudo, as concentrações de colesterol total, não HDL-C e triglicerídeos aumentaram em todos os grupos. Portanto, o tratamento com LDE-carmustina inibiu as lesões ateroscleróticas em aproximadamente 90%, comparado ao grupo controle. LDE-carmustina também reduziu a presença de macrófagos, de células de músculo liso e das células reguladoras de linfócitos T na íntima arterial, bem como a expressão protéica de MMP9, das citocinas inflamatórias e dos receptores de lipoproteínas. O tratamento da aterosclerose induzida em coelho com LDE-carmustina resultou em marcante redução das lesões na aorta, da proliferação e invasão da íntima por macrófagos e células musculares lisas, características da doença, além dos fatores inflamatórios. Tendo em vista que, associada à LDE, a carmustina tem baixa toxicidade, a nova preparação LDE-carmustina tem grande potencial para a terapêutica das doenças cardiovasculares de natureza aterosclerótica.

*Descritores:* Nanopartículas, Aterosclerose, Inflamação, Carmustina, Hipercolesterolemia, Coelhos

## Abstract

DAMINELLI, E. N. **Use of carmustine associated with cholesterol-rich nanoemulsions (LDE) to treatment of atherosclerosis induced in rabbits.** [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”, Brazil; 2014.

Atherosclerosis is a chronic inflammatory and proliferative disease that starts when risk factors alter vascular endothelium. The particles of the lipid nanoemulsion LDE concentrate on inflammatory sites and with intense cell proliferation, as occurs in atherosclerotic lesions. The carmustine, an antiproliferative drug used in cancer chemotherapy has not yet been explored for the treatment of atherosclerosis. In previous work, we showed that the association with LDE drastically reduces toxicity of carmustine, which has been demonstrated in patients with advanced cancer. The purpose of this study is to evaluate whether carmustine associated with LDE can promote antiproliferative effect on atherosclerotic lesions induced in rabbits. In this study, eighteen male New Zealand rabbits were given a diet rich in cholesterol 1% for 8 weeks. After 4 weeks they were divided into two groups: control group, which received an intravenous injection containing only saline and treated group receiving LDE-carmustine dose of 4 mg/kg weekly for 4 weeks. Hematology, lipid, biochemical, weight profile and feed intake were evaluated. After euthanasia, macroscopic atherosclerotic lesions were measured. Then, the aortic arch was analyzed by morphology and by immunohistochemistry. It was observed that there was no difference in weight and profile in feed intake between the study groups. There were not hematological, hepatic and renal toxicity in the treated group. Lipid profile at the end of the study, the concentrations of total cholesterol, non-HDL-C and triglycerides increased in all groups. Therefore, treatment with LDE-carmustine inhibit atherosclerotic lesions in approximately 90%, compared to the control group. LDE-carmustine also reduced the presence of macrophages, smooth muscle cells and regulatory T cells in the arterial intima as well as the protein expression of MMP9, inflammatory cytokines and lipoprotein receptors. Treatment of rabbits with induced atherosclerosis LDE-carmustine resulted in marked reduction of lesions in the aorta, proliferation and invasion by macrophages and intimal smooth muscle cells, disease characteristics, in addition to inflammatory factors. Given that, associated with LDE, carmustine has low toxicity, the new formulation LDE-carmustine has great potential for the therapy of atherosclerotic cardiovascular disease nature.

*Descriptors: Nanoparticles, Atherosclerosis, Inflammation, Carmustine, Hypercholesterolemia, Rabbits*

## 1. INTRODUÇÃO

A doença cardiovascular é a principal causa de morte nos países desenvolvidos (Estol, 2011). A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica e proliferativa na parede arterial. As placas ateroscleróticas são caracterizadas por infiltrados inflamatórios, acúmulo de lípidos, células apoptóticas e capa fibrosa na parede das artérias (Andersson et al., 2010; Hansson & Hermansson, 2011). A proliferação vascular contribui para a patologia da aterosclerose e está ligada a outros processos celulares como inflamação, apoptose e alterações da matriz. O acúmulo focal de células musculares lisas é um precursor do desenvolvimento das lesões ateroscleróticas humanas. O interesse na terapia antiproliferativa levou a uma busca pela inibição de fases específicas do ciclo celular, que pode ser alcançada através de agentes farmacológicos que bloqueiam a proliferação celular (Dzau et al., 2002), como a carmustina. Não há relatos na literatura da utilização da carmustina para o tratamento da aterosclerose.

A carmustina é um agente antineoplásico e lipossolúvel usado isolado ou junto com outros fármacos para o tratamento de diferentes tipos de tumores, incluindo linfomas e tumores cerebrais (Brunton et al., 2006; Leikin & Paloucek, 2008).

Em estudos anteriores, foi desenvolvido em nosso laboratório uma nanopartícula rica em colesterol, denominada LDE, a qual é reconhecida pelos receptores da lipoproteína de baixa densidade (LDL) após injeção na corrente sanguínea (Maranhão et al., 1997). A LDE é produzida sem proteína, quando entra em contato com o plasma ela adquire apo E e outras apolipoproteínas das lipoproteínas naturais. A apo E é

reconhecida pelos receptores de LDL, como LDL-r e “LDL-related protein” (LRP), assim a LDE liga-se a esses receptores e são internalizadas pelas células (Ruiz et al., 2005).

Em estudos prévios associando a carmustina à LDE observou-se que o complexo era estável e a ação farmacológica do quimioterápico não foi afetada. Em pacientes com câncer avançado tratados com LDE-carmustina mostrou marcada redução da toxicidade deste agente farmacológico (Maranhão et al., 2002) e em ratos com tumor Walker 256 implantado, o tratamento com a associação foi capaz de diminuir a massa tumoral (Teixeira et al., 2004).

Em outros estudos, foi observado que a LDE injetada por via endovenosa apresenta concentração apreciável na artéria e na lesão aterosclerótica. O tratamento da aterosclerose induzida em coelhos com a associação de paclitaxel (Maranhão et al., 2008), etoposide (Valduga et al., 2003) e metotrexato (Moura et al., 2011) com a LDE resultou em acentuada redução das lesões ateroscleróticas. Isso ocorre porque a LDE concentra-se em sítios inflamatórios e com intensa inflamação, processo que ocorre na doença aterosclerótica (Zhu et al., 2002).

A proposta desse estudo é utilizar carmustina associada à LDE para o tratamento da aterosclerose induzida em coelhos sob dieta rica em colesterol.

## 2. OBJETIVOS

- Avaliar a eficácia da associação da carmustina à uma nanoemulsão lipídica (LDE-carmustina) na inibição de lesões ateroscleróticas induzidas em coelhos;
- Analisar se há toxicidade da associação LDE-carmustina no modelo experimental em estudo;
- Investigar o efeito da LDE-carmustina através da quantificação de macrófagos, linfócitos T CD3, linfócitos T reguladores (FoxP3), células de músculo liso, expressão protéica dos receptores de lipoproteínas (LDLr, LRP e SR-B1), as citocinas inflamatórias (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ), a MMP9 nas lesões ateroscleróticas dos coelhos.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Aterosclerose

Apesar dos avanços relacionados à prevenção e ao tratamento da doença cardiovascular aterosclerótica, esta ainda continua sendo a principal causa de morte por doença no ocidente (Willerson & Ridker, 2004; Estol, 2011; Pagidipati & Gaziano, 2013).

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica, progressiva e multifatorial, caracterizada pelo acúmulo de lípidos, células inflamatórias, células do sistema imune e elementos fibrosos que se depositam na camada íntima das artérias, principalmente as de médio e grande calibre, formando placas ou estrias gordurosas (Ylä-Herttuala et al., 1996; Ross, 1999; Woollard & Geissmann, 2010). Estas, também denominadas fibrogordurosas, são formadas por uma placa focal elevada no interior da íntima, com centro lipídico, principalmente colesterol e ésteres de colesterol, que se projeta na luz das artérias e que geralmente ocasionam a obstrução das mesmas (Cotran et al., 2000; Zipes et al., 2005; Gottlieb et al., 2005).

Na patogenia da doença aterosclerótica, um conjunto de fatores de risco, como hipertensão arterial, diabetes mellitus, tabagismo, hipercolesterolemia e predisposição genética podem desencadear lesões no endotélio vascular iniciando o processo aterogênico (Eaton, 2005; Gottlieb et al., 2005; Bentson et al., 2014). A hiperlipidemia é um fator de risco importante no desenvolvimento da aterosclerose e é caracterizada pelo aumento dos níveis plasmáticos de colesterol e triglicérides. Esses lipídeos são

transportados na corrente sanguínea principalmente pelas lipoproteínas pequenas e densas, como quilomícrons, VLDL e LDL (van Diepen et al., 2013).

Contudo, as lipoproteínas, principalmente as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) têm ocupado um papel importante na etiologia da doença aterosclerótica, sendo que a disfunção endotelial provoca aumento da permeabilidade vascular e facilita a penetração no espaço subendotelial dessas lipoproteínas (Homma, 2004; Gottlieb et al., 2005). As LDL são removidas da circulação ao serem internalizadas pelas células endoteliais através dos seus receptores, receptor de LDL (LDL-r) e “receptor-related protein” (LRP) (Dominiczak & Caslake, 2011). O aumento destas lipoproteínas na circulação favorece a entrada e o acúmulo das mesmas da parede arterial. Essas partículas possuem alta afinidade pela matriz extracelular, principal componente da camada íntima arterial. No espaço subendotelial as partículas de LDL se ligam a proteoglicanos, aumentam seu tempo de retenção na íntima arterial e são capazes de sofrer oxidação por radicais livres produzidos por células endoteliais adjacentes e células musculares lisas (Choy et al., 2004; Zipes et al., 2005; Badimon et al., 2011).

Em resposta ao acúmulo de LDL oxidada as células endoteliais são ativadas e expressam moléculas de adesão, as quais promovem o recrutamento e a adesão de monócitos e linfócitos à parede arterial. Essas células rolam ao longo da superfície endotelial através da ligação com as selectinas P e E, moléculas de adesão. A fixação firme de monócitos e linfócitos T ao endotélio é mediada pela interação da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) (Chi & Melendez, 2007), molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), e proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1) (Chi & Melendez, 2007; Libby et al., 2010; van Diepen et al., 2013; Legein et al., 2013).

Após a migração e internalização dos monócitos no espaço subendotelial, estes se diferenciam em macrófagos através do fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), o qual também aumenta a expressão de receptores “scavengers” (SR) na superfície dos macrófagos. Através desses receptores os macrófagos fagocitam as partículas de LDL oxidadas, as quais se acumulam no seu citoplasma e formam as células espumosas (Chi & Melendez, 2007; Badimon et al., 2011; Hansson & Hermansson, 2011; Legein et al., 2013). Nessas lesões, os macrófagos podem secretar citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), assim como os linfócitos T que, secretam interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral  $\alpha$  e  $\beta$  e interleucina-1 (Ross, 199; Hansson, 2005), as quais amplificam a resposta inflamatória local, promovendo o recrutamento de mais células e LDL oxidadas, contribuindo para a aterogênese (Libby et al., 2011; Bentzon et al., 2014). No entanto, as funções efetoras dos linfócitos T estão sob a regulação de uma subclasse de linfócitos T, denominadas células T regulatórias. Essas células são encontradas em número muito baixo em placas ateroscleróticas em comparação a outros tecidos inflamados e nesses tecidos, elas são identificadas pela presença do fator de transcrição “Forkhead box protein P3” (FoxP3) (de Boer et al., 2007; Ponnuswamy et al., 2012; Klingenberg et al., 2013). As células T regulatórias desempenham papel importante nas respostas imunes por manter a tolerância imunológica (Faria et al., 2008; Pastrana et al., 2012).

As células musculares lisas migram da túnica média para a íntima via degradação da matriz extracelular mediada pela metaloproteinase 9 (MMP9) e outras proteinases. Na íntima as células musculares lisas proliferam em resposta a fatores de crescimento como o fator de crescimento transformante (TGF- $\beta$ ) e fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), os quais também secretam proteínas de matriz extracelular, incluindo colágeno

intersticial e elastina, formando uma capa fibrosa (Packard & Libby, 2008; Libby et al., 2011).

Enquanto persistir a hipercolesterolemia, haverá adesão de monócitos, migração subendotelial de células musculares lisas e acúmulo de lípidos 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; Stocker & Keaney Jr., 2004; Packard & Libby, 2008).

A proliferação de células musculares lisas e a deposição de matriz extracelular são processos que se crônicos, transformarão 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 proliferação celular adicional sobre os ateromas produzirá assim as placas fibrosas (Cotran et al., 2000; Plutzky, 2003; Chi & Melendez, 2007). Essa proliferação celular contínua pode levar a deposição celular e desencadear eventos clínicos como isquemia cardíaca e infarto do miocárdio, decorrentes da oclusão arterial (Libby et al., 2011).

A aterosclerose deixou de ser considerada apenas uma doença de acúmulo de lípidos que obstrui as artérias. Atualmente, o objetivo terapêutico está além de tratar estenoses através de procedimentos invasivos para a revascularização. O conhecimento sobre o mecanismo das doenças vasculares tem possibilitado o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para 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 através de agentes farmacológicos que bloqueiam a proliferação celular (Dzau et al., 2002; Libby et al., 2009).

### 3.2 Carmustina

A carmustina (1,3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea) (BCNU) é um agente antineoplásico usado no tratamento de linfoma de Hodgkin, não-Hodgkin, melanoma, mieloma, câncer de pulmão, câncer de cólon e tumores cerebrais, principalmente este último por sua capacidade altamente lipossolúvel e a habilidade de atravessar a barreira hematoencefálica (de Almeida et al., 2005; Brunton et a., 2006; Leikin & Paloucek, 2008).

A carmustina é um agente antineoplásico alquilante pertencente à classe das nitrossuréias, usada desde 1970. Sua ação antiproliferativa ocorre pela sua ligação interfilamentosa com o DNA. O principal sítio de alquilação no DNA é a posição N7 da guanina (átomo de nitrogênio da guanina), o qual representa o alvo que determina os efeitos biológicos desses agentes. Outras bases podem também ser alquiladas, como a adenina nas posições N1 e N3, a citosina no N3 e a guanina no O6, assim como grupos fosfatos e proteínas associadas ao DNA. Alquilam também o RNA e inibem a auto-reparação do DNA (Drablos et al., 2004; de Almeida, 2005; Kang et al., 2014).

A carmustina é administrada em altas doses por via sistêmica para alcançar níveis terapêuticos no cérebro e seu tempo de meia-vida no plasma é cerca de 20 minutos (Seong et al., 2003). A administração sistêmica prolongada está associada a severos efeitos colaterais como mielossupressão, toxicidade hepática e hematológica (Seong et al., 2003; Stankiewicz-Kranc et al., 2009; Kuo & Liang, 2011). Essas reações adversas ocorrem pela inespecificidade do fármaco pelas células alvo, a qual pode ser revertida a partir da ligação de agentes farmacológicos a transportadores, aumentando sua

especificidade. Dentre os transportadores já testados existe a LDE, uma nanopartícula que tem afinidade por receptores de LDL (Maranhão et al., 1993).

### **3.3 Nanoemulsão lipídica artificial rica em colesterol (LDE) como transportadora de fármaco**

A maior parte do colesterol no organismo é transportada pela LDL, a qual possui a apoproteína B-100 que permite sua ligação com os receptores LDL (ou receptores B/E), situados na superfície da membrana plasmática celular (Brown & Goldstein, 1986). O receptor de LDL está sujeito à regulação retroativa (feedback) e sua regulação é o principal fator para o controle da concentração plasmática de LDL (Brown & Goldstein, 1990).

Maranhão et al. (1993) desenvolveram uma nanopartícula lipídica artificial semelhante à estrutura lipídica da lipoproteína de densidade baixa (LDL). A nanopartícula foi denominada LDE e é esférica, com diâmetro de 25 – 50 nm. Como a LDL, a LDE tem um núcleo constituído de ésteres de colesterol, com quantidades residuais de triglicérides, envolvido por uma monocamada de fosfolípidos; na monocamada superficial há uma proporção pequena de colesterol na forma livre. A LDE é feita sem proteínas, mas em contato com o plasma, em colisões com as diversas lipoproteínas, as apolipoproteínas (apo) como a apo CII, apo A1, apo E e outras, aderem-se à superfície das partículas. A apo E serve de ligante da nanopartícula aos receptores da LDL. Por isso, a LDE é removida mais rapidamente da circulação do que a própria LDL natural

(Hirata et al., 1999), a apo E tem 20 a 30 vezes mais afinidade pelo receptor do que a apo B100, única apo da LDL natural e que é o ligante da LDL ao receptor (Mahley, 1999). As possibilidades do novo modelo para realizar estudos metabólicos, de fisiologia ou fisiopatologia são fascinantes. Ao contrário da lipoproteína natural, que deve ser isolada e reinjetada no mesmo indivíduo, uma única preparação de LDE pode ser injetada em inúmeros indivíduos. Além disso, as facilidades de marcação com radioisótopos e outros meios, de manipular a composição de acordo com as necessidades da pesquisa, introduzindo ou retirando novos componentes, tornam o sistema um instrumento de trabalho versátil, de grande praticidade e eficiência.

Um novo terreno de aplicações de impacto foi aberto com a descoberta de que a LDE, mediante injeção na corrente circulatória, concentra-se nos tecidos tumorais e pode ser usada no tratamento do câncer como veículo para direcionar quimioterápicos para as células neoplásicas (Maranhão et al., 1992; Maranhão et al., 1994). A célula neoplásica, provavelmente pela necessidade de aporte lipídico maior exigido pela proliferação acelerada, apresenta acentuado aumento na expressão dos receptores da LDL (Ho et al., 1987). Isto possibilita o uso da LDE como veículo para concentrar quimioterápicos, incluídos na sua estrutura, no tecido neoplásico, desviando-os dos tecidos normais do organismo. Com isso, pode-se aumentar a eficiência terapêutica desses agentes e diminuir os efeitos colaterais que constituem limitação importante à quimioterapia (Maranhão et al., 1992; Maranhão et al., 1994).

Em experimentos visando o tratamento do câncer com a LDE como veículo, progressos significativos foram feitos. Mostramos em animais de experimentação e também em pacientes, que tanto a LDE quanto os fármacos a ela incorporados concentram-se nos tumores (Ades et al., 2001; Azevedo et al., 2005). Inicialmente, o

fármaco utilizado nesses experimentos foi a carmustina, que mostrou boa incorporação e estabilidade nas partículas da LDE (Teixeira et al., 2004). Em ensaios clínicos com a carmustina, etoposídeo e paclitaxel (Maranhão et al., 2002; Hungria et al., 2004) verificou-se que o uso desses fármacos associados a LDE, mesmo em doses mais elevadas do que as usualmente empregadas na clínica, apresentaram toxicidade praticamente ausente.

Um achado mais recente, é o de que a LDE, injetada em coelhos com aterosclerose por tratamento com dieta rica em colesterol, concentra-se na crossa da aorta, justamente a região onde as lesões ocorrem em profusão naquele modelo experimental. Tratados com a preparação LDE associada a paclitaxel, fármaco usado na cobertura de “stents” para evitar reestenose da coronária na angioplastia, houve diminuição dos ateromas, da ordem de 60% após o tratamento de 4 semanas, em comparação com os animais-controle, com aterosclerose mas tratados apenas com solução salina (Maranhão et al., 2008). Conforme esperado, pela documentação acumulada nos modelos animais e pacientes oncológicos, a toxicidade foi nignlível. Embora existam alguns estudos avaliando a eficácia da carmustina em reduzir a proliferação celular que ocorre nas neoplasias, este fármaco não foi explorado no tratamento da doença arterial coronária.

O tratamento clínico atual das doenças cardiovasculares está dirigido aos fatores de risco como as dislipidemias, sobretudo com as estatinas e medicação anticoagulante. Apesar dessa conduta ter levado à significativa redução dos desfechos da doença, ainda há um contingente de doentes, entre 50-60%, que se beneficiariam com novas abordagens terapêuticas.

O tratamento do mecanismo fisiopatogênico de base, constituído da inflamação e proliferação celular pode constituir-se em nova e promissora fronteira terapêutica das

doenças cardiovasculares. Agentes quimioterápicos de alta atividade antiproliferativa e antiinflamatória podem ser usados com esta finalidade. O uso da LDE como veículo desses agentes, direcionando-os para os sítios de lesão e neutralizando seus efeitos colaterais, pode possibilitar a abertura desta nova fronteira. Com isto, transformam-se em fármacos cujo uso é perfeitamente tolerável em cardiologia.

## 4. MÉTODOS

### 4.1 Preparo da LDE

A LDE foi preparada segundo a técnica descrita por Maranhão et al. (1993). Em um frasco foram adicionados 40 mg de fosfatidilcolina, 20 mg de oleato de colesterol, 1,0 mg de trioleína e 0,5 mg de colesterol. A seguir, a mistura foi evaporada sob fluxo de nitrogênio e mantida em dessecador a vácuo por 16 horas a 4 °C para remoção dos solventes residuais. Após a adição de 10 mL de solução Tris HCl 0,01 M, pH 8,05, a mistura de lipídios foi emulsificada por irradiação ultrassônica por 3 h em equipamento Branson, modelo 450A (Arruda Ultra-Som, São Paulo, Brasil). Para seleção do tamanho desejado de partículas, a nanoemulsão foi ultracentrifugada e a fração superior do tubo foi retirada. A densidade da emulsão foi ajustada para 1,21 g/mL, adicionando-se brometo de potássio e foi novamente ultracentrifugada. A fração da parte superior do tubo corresponde à LDE, que foi retirada por aspiração. O brometo de potássio foi removido através de diálise em tampão Tris HCl 0,01 M, pH 8,0. Finalmente, a emulsão foi esterilizada utilizando-se filtros de 0,22 µm de diâmetro sob fluxo laminar e armazenada em frascos estéreis a 4 °C por até 30 dias.

## **4.2 Incorporação da carmustina à LDE**

A carmustina foi associada à nanoemulsão na razão 5:1 em massa de lípides:fármaco. A associação foi realizada utilizando-se agitação em vórtex. As preparações foram realizadas no mesmo dia do experimento e esterilizadas em filtro Millipore 0,22µm. A taxa de associação à nanoemulsão foi determinada através de quantificação por HPLC.

## **4.3 Protocolo experimental *in vivo***

Os grupos de coelhos utilizados para o tratamento com o quimioterápico são: grupo 1 (Controle) e grupo 2 (LDE-carmustina). Cada grupo foi constituído de 9 coelhos (raça New Zealand White), os quais foram provenientes do criadouro Criex – São Paulo (com peso de 2,5 a 3 kg) e todos com indução de aterosclerose através da administração de dieta rica em colesterol durante oito semanas (150 gramas de ração/dia suplementado com 1% de colesterol). O tratamento de cada grupo teve início após quatro semanas de dieta rica em colesterol, administrado endovenosamente uma vez por semana. O grupo 1 recebeu injeções endovenosas de solução salina (mesmo volume/semana), o grupo 2 recebeu injeções endovenosas de carmustina associada à LDE (4mg/Kg/semana). Ao fim das oito semanas, os animais foram sacrificados com injeção endovenosa de uma dose letal de pentobarbital sódico 5%.

#### **4.4 Perfil hematológico**

Para avaliação do perfil hematológico foram coletadas amostras de sangue dos animais pela veia auricular marginal antes do consumo da dieta hipercolesterolêmica (Basal), antes de iniciar o tratamento com LDE-Carmustina (Pré-Tratamento) e no final do tratamento com LDE-Carmustina (Pós-Tratamento). O sangue total foi diluído em solução de Turk (1:20) para a contagem de leucócitos ( $10^6$  células/mL) e em solução de NaCl 0,9% (1:1000) para a contagem de eritrócitos ( $10^9$  células/mL). A contagem das células sanguíneas foi realizada em câmara de Neubauer.

A partir do sangue total, foram confeccionados esfregaços de sangue corados com corante panótico para a futura determinação da porcentagem de linfócitos, monócitos e neutrófilos.

#### **4.5 Perfil lipídico e bioquímico**

Para avaliação do perfil lipídico e bioquímico foram coletadas amostras de sangue (3 mL) da veia marginal auricular antes do início da dieta (Basal), antes de iniciar o tratamento com LDE-Carmustina (Pré-Tratamento) e no final do tratamento com LDE-carmustina (Pós-Tratamento). O sangue foi centrifugado a 2500 rpm por 10 min a 4°C e os níveis séricos de colesterol total (CT), “high density lipoprotein” (HDL colesterol) e triglicérides (TG) foram quantificados utilizando kits enzimáticos comerciais da Labtest Diagnóstica S. A. (Minas Gerais, Brasil).

As concentrações séricas de aspartato aminotransferase (AST) e alanino aminotransferase (ALT), gama glutamil transferase (GGT), fosfatase alcalina e ureia foram determinadas por método cinético. A concentração sérica de bilirrubina total foi determinada por método colorimétrico. 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). A concentração de colesterol de lipoproteínas que contêm ApoB (n-HDL-C) foram calculadas pela diferença entre as concentrações de colesterol total e de colesterol de HDL ( $n\text{-HDL-C} = \text{CT} - \text{HDL-C}$ ).

#### **4.6 Análise macroscópica dos cortes histológicos do arco aórtico**

Após a eutanásia, as aortas dos animais de ambos os grupos foram cortadas do arco aórtico até a artéria abdominal e aberta longitudinalmente ao longo da parede anterior. Em seguida, foram lavadas com salina, fixadas em formalina tamponada a 10% e coradas com Escarlata R. Foram tiradas fotos 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).

#### **4.7 Análise morfométrica dos cortes histológicos do arco aórtico**

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

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

A análise morfométrica foi realizada em imagens de 4 campos de cada corte histológico do arco aórtico dos animais dos grupos Controle, LDE-carmustina corados com hematoxilina/eosina que foram capturadas no aumento de 100 vezes em microscópio ótico equipado com o software de análise de imagens NIS – Elements AR 3.2, com a utilização do microscópio Eclipse 80i com câmera acoplada DS-Ri1 (Nikon, Tóquio, Japão). Em cada imagem dos campos fotografados a área total da aorta e área da íntima foram medidas para cálculo da razão entre a área de lesão e a área total. Foram medidas também a espessura total e a espessura da íntima da aorta para cálculo da razão entre a espessura da lesão e a espessura total da aorta.

#### 4.8 Imunohistoquímica

No grupo com o tratamento mais eficaz e no grupo Controle foram realizadas as reações de imunohistoquímica. As lâminas passaram pelo procedimento de desparafinização como descrito no item acima.

Para realização da imunohistoquímica, a recuperação de antígenos foi realizada por calor úmido e pressão em câmara de pressão para recuperação antigênica Pascal (Dako, Carpinteria, EUA) com tampão citrato 10mM pH 6,0 para os antígenos macrófagos de coelho (clone RAM-11), “cluster of differentiation 3” - linfócitos T totais (CD3), “forkhead box P3” – linfócitos T regulatórios (FoxP3), matriz metaloproteinase 9 (MMP9), “tumor necrosis factor” (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), “low density lipoprotein receptor-related protein 1” (LRP-1) e “scavenger receptor class B member 1” (SR-B1). A recuperação de antígenos por calor úmido e pressão com tampão Tris 10mM/EDTA 1mM foi realizada para o antígeno  $\alpha$  actina para identificação de células de músculo liso. Para o antígeno anti-LDL-R não foi necessário proceder a recuperação antigênica.

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 fosfato (PBS) durante 1 hora em estufa umidificada a 37°C. Os anticorpos primários anti-macrófagos de coelho (clone RAM-11) (Dako, Carpinteria, EUA), anti-CD3 (AbCam, Cambridge, EUA), anti-FoxP3 (AbCam, Cambridge, EUA), anti- $\alpha$  actina (Dako, Carpinteria, EUA), anti-MMP-9 (AbCam, Cambridge, EUA), anti-IL-1 $\beta$  (R&D Systems, Minneapolis, EUA), anti-TNF- $\alpha$  (R&D Systems, Minneapolis, EUA), anti-LDL-R (Lifespan, Seattle, EUA), anti-LRP-1

(Calbiochem, Darmstadt, Alemanha) e anti-SR-B1 (Millipore, Billerica, EUA) foram previamente padronizados, diluídos em PBS contendo 1% de albumina bovina. As lâminas foram incubadas por 18 horas a 4° C.

O sistema de detecção foi o polímero Envision (Dako, Carpinteria, EUA) para os anticorpos anti-macrófagos de coelho, anti-CD3, anti-FoxP3, anti- $\alpha$  actina, anti-MMP9 e anti-LRP-1. Para os anticorpos anti-LDL-R e anti-SR-B1, o sistema de detecção foi o polímero SuperPicture (Dako, Carpinteria, EUA) e para os anticorpos anti-TNF- $\alpha$  e anti-IL-1 $\beta$  foi utilizado o sistema Streptavidina-Biotina-Peroxidase (LSAB+) (Dako, Carpinteria, EUA). A reação foi revelada com diaminobenzidina (DAB) (Dako, Carpinteria, EUA) e contracorado com hematoxilina de Harris.

Para a análise quantitativa da expressão protéica dos antígenos RAM-11, CD3, FoxP3,  $\alpha$  actina, MMP-9, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , LDL-R, LRP-1 e SR-B1, também foi utilizado microscópio ótico equipado com o software de análise de imagens Image Analysis System Quantimet 500+. O limiar de detecção de cor foi determinado para cromógeno DAB tendo como base uma região do tecido marcada. Imagens de 4 campos de cada corte capturadas em aumento de 100 vezes foram usadas para medir área total da aorta, área da íntima, área de marcação marrom do cromógeno DAB na íntima, espessura total da aorta e espessura da íntima. A área marcada pelo cromógeno DAB foi calculada como porcentagem da área da íntima de cada campo. A expressão de cada antígeno em cada animal foi calculada como média de todos os campos medidos para cada corte histológico.

#### 4.9 Análise estatística

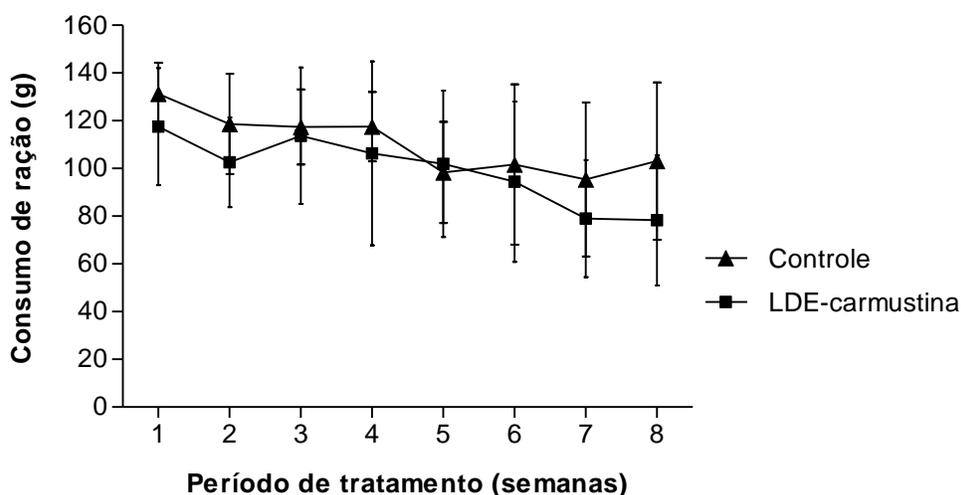
Os grupos foram avaliados utilizando o programa GraphPad Prism® 5.0. Os valores estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão, considerando-se uma significância ao nível de  $p < 0,05$ . A Análise de Variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey foi utilizado para a análise do consumo de ração, variação de peso dos animais, perfil hematológico, perfil lipídico e parâmetros bioquímicos antes e depois do tratamento. O teste *t-student* foi utilizado para a análise morfométrica (planimetria macroscópica e planimetria microscópica) e imunohistoquímica (macrófagos, linfócitos T CD3, FoxP3, células de músculo liso, MMP9, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , LDLr, LRP-1 e SR-B1) dos cortes histológicos do arco aórtico dos animais.

## 5. RESULTADOS

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

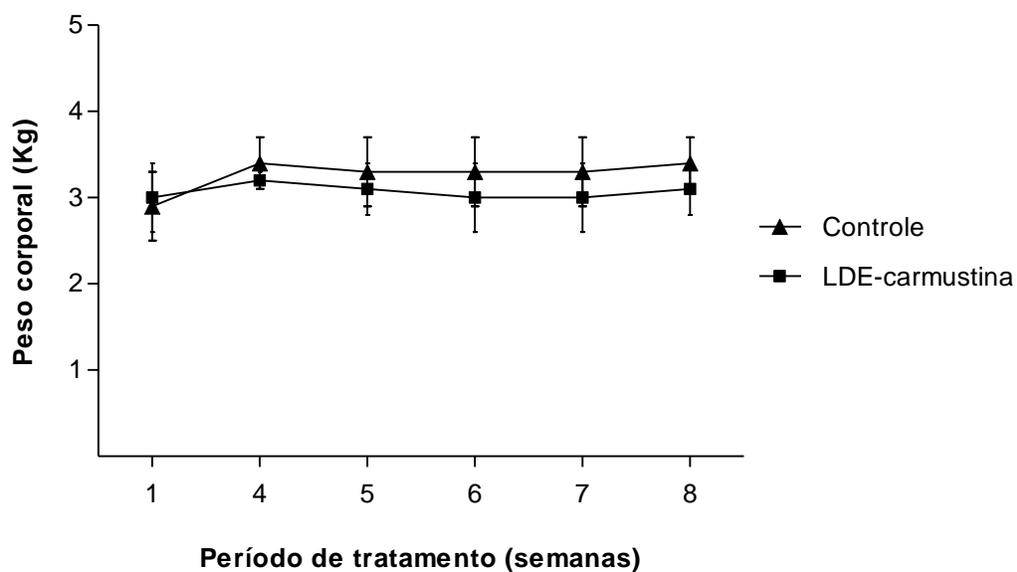
A figura 1 mostra a variação da quantidade de ração consumida pelos animais, em gramas, durante as semanas de tratamento. No grupo controle, o consumo de ração foi de  $131,26 \pm 13,09$  g/dia na primeira semana e na última semana foi de  $103,07 \pm 32,94$  g/dia de consumo. No grupo LDE-carmustina, o consumo foi de  $117,55 \pm 24,49$  g/dia na primeira semana e no final do tratamento o consumo foi de  $78,27 \pm 27,22$  g/dia.

A variação do consumo de ração entre ambos os grupos foi semelhante e não houve diferença entre eles do início ao final do tratamento.



**Figura 1:** Consumo de ração dos animais dos grupos controle (n=9) e LDE-carmustina (n=9), durante as semanas de tratamento. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

Quanto ao peso corporal dos animais estudados, a média foi de  $2,9 \pm 0,4$  Kg na primeira semana de tratamento e  $3,4 \pm 0,3$  Kg na última semana de tratamento, para os animais controles. No grupo LDE-Carmustina, a média foi de  $3,0 \pm 0,4$  Kg na primeira semana e  $3,1 \pm 0,5$  Kg na última semana. Não houve diferença de peso entre os grupos do início ao final do protocolo. A variação do peso corporal dos animais de cada grupo durante as semanas de tratamento é mostrada na figura 2.

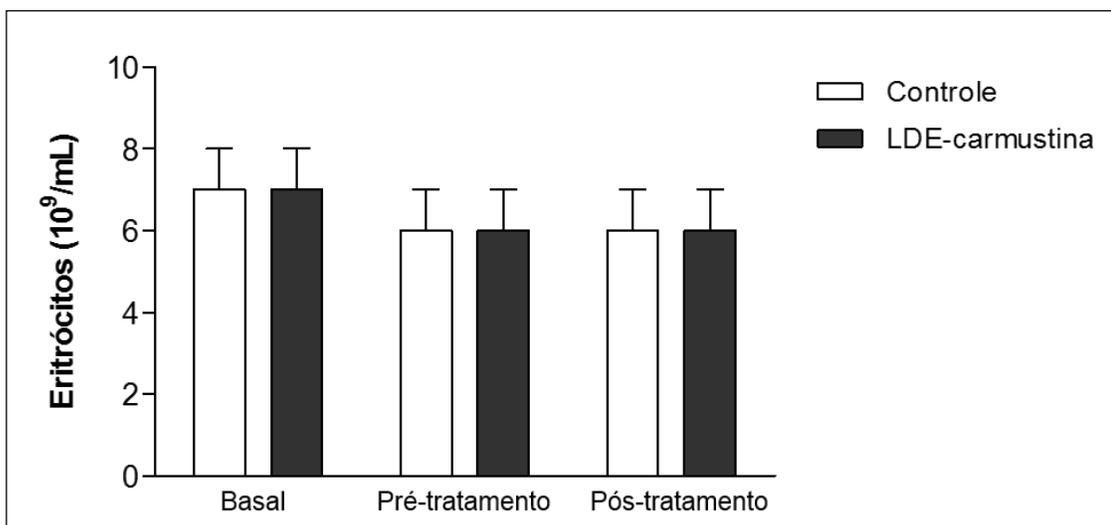


**Figura 2:** Peso corporal dos animais dos grupos controle (n=9) e LDE-carmustina (n=9), durante as semanas de tratamento. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

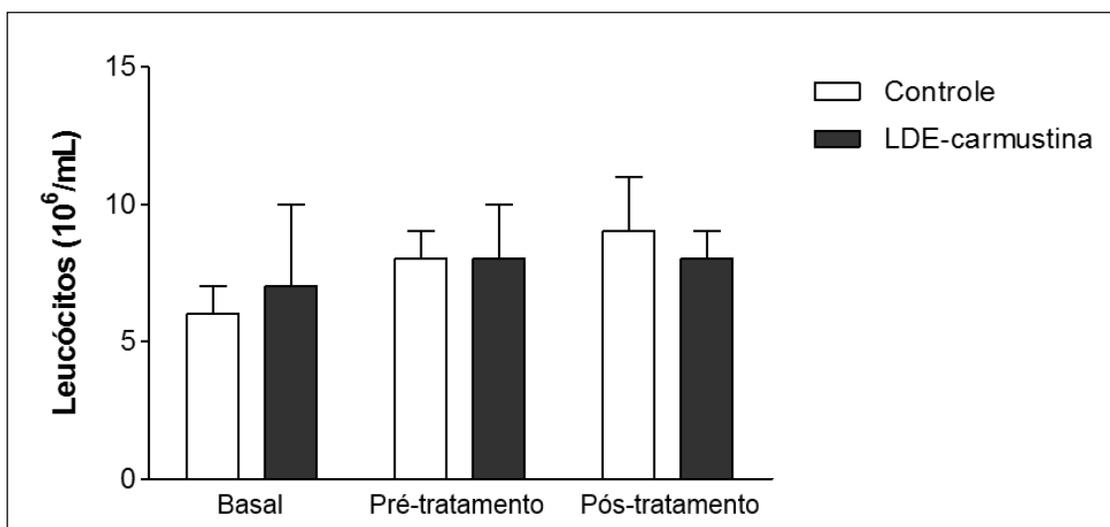
## 5.2 Avaliação do perfil hematológico dos animais

Nas figuras 3 e 4 podem ser observados os valores totais de eritrócitos e leucócitos dos grupos controle e tratados com a associação LDE-carmustina antes do início da dieta rica em colesterol (Basal), antes do início do tratamento (Pré-Tratamento) e ao final do tratamento (Pós-Tratamento), respectivamente. A porcentagem do número de linfócitos, monócitos e neutrófilos de cada grupo pode ser observada nas figuras 5, 6 e 7, respectivamente.

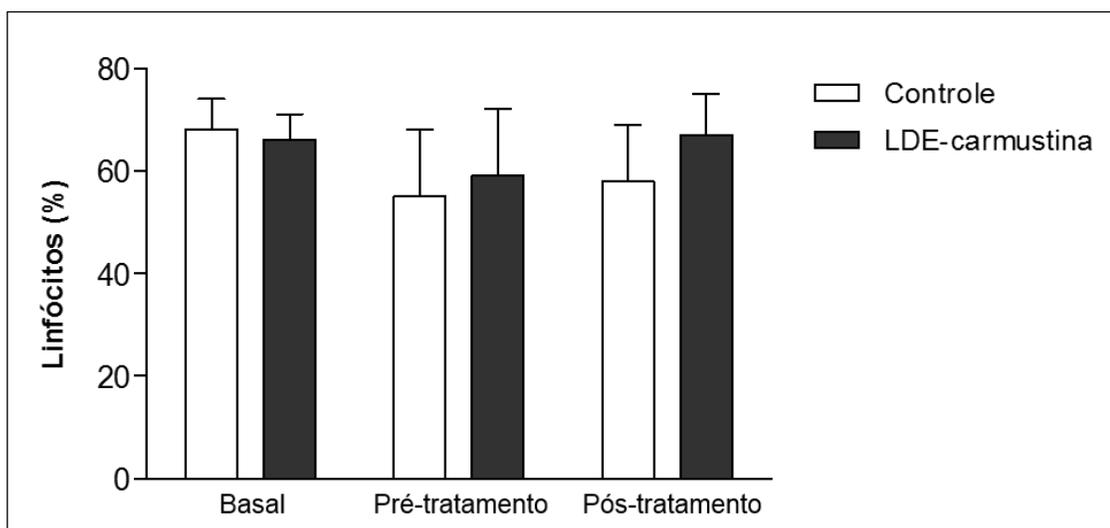
De acordo com o número total de eritrócitos e leucócitos, porcentagem de linfócitos, monócitos e neutrófilos dos grupos, a associação da camustina à LDE não apresentou toxicidade hematológica ao longo do tratamento quando comparado ao grupo controle, pois não apresentou alterações significativas dessas células.



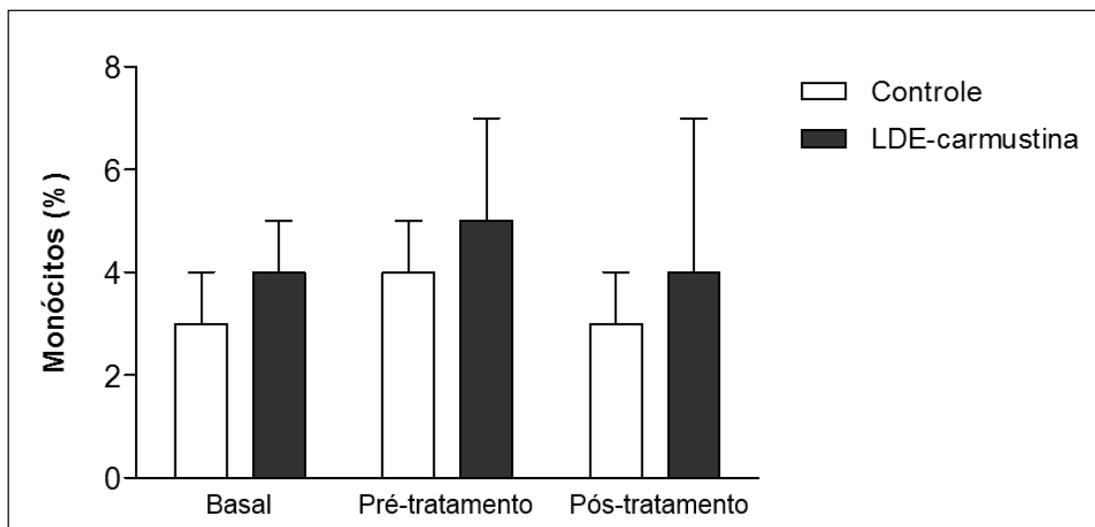
**Figura 3:** Valores totais de eritrócitos dos grupos controle (n=9) e tratado com LDE-carmustina (n=9) antes do início da dieta rica em colesterol (Basal), antes do início do tratamento (Pré-Tratamento) e ao final do tratamento (Pós-Tratamento). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.



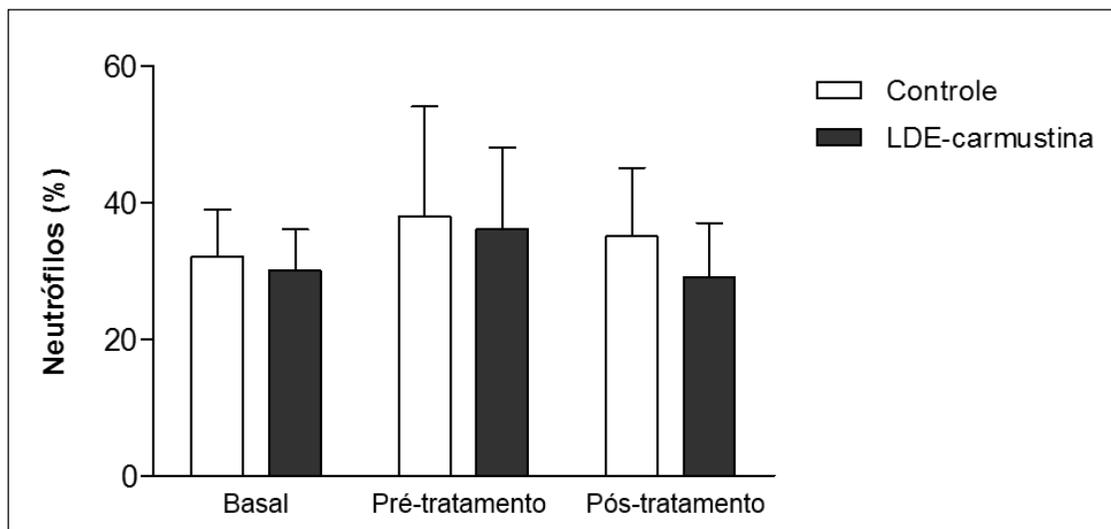
**Figura 4:** Valores totais de leucócitos dos grupos controle (n=9) e tratado com LDE-carmustina (n=9) antes do início da dieta rica em colesterol (Basal), antes do início do tratamento (Pré-Tratamento) e ao final do tratamento (Pós-Tratamento). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.



**Figura 5:** Porcentagem de linfócitos dos grupos controle (n=9) e tratado com LDE-carmustina (n=9) antes do início da dieta rica em colesterol (Basal), antes do início do tratamento (Pré-Tratamento) e ao final do tratamento (Pós-Tratamento). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.



**Figura 6:** Porcentagem de monócitos dos grupos controle (n=9) e tratado com LDE-carmustina (n=9) antes do início da dieta rica em colesterol (Basal), antes do início do tratamento (Pré-Tratamento) e ao final do tratamento (Pós-Tratamento). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

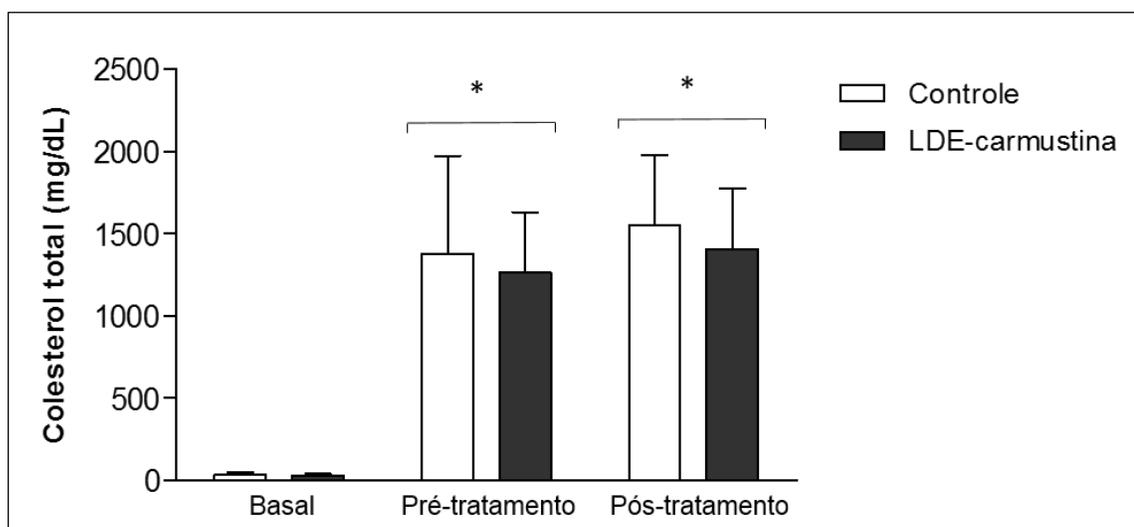


**Figura 7:** Porcentagem de neutrófilos dos grupos controle (n=9) e tratado com LDE-carmustina (n=9) antes do início da dieta rica em colesterol (Basal), antes do início do tratamento (Pré-Tratamento) e ao final do tratamento (Pós-Tratamento). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

### **5.3 Avaliação do perfil lipídico dos animais**

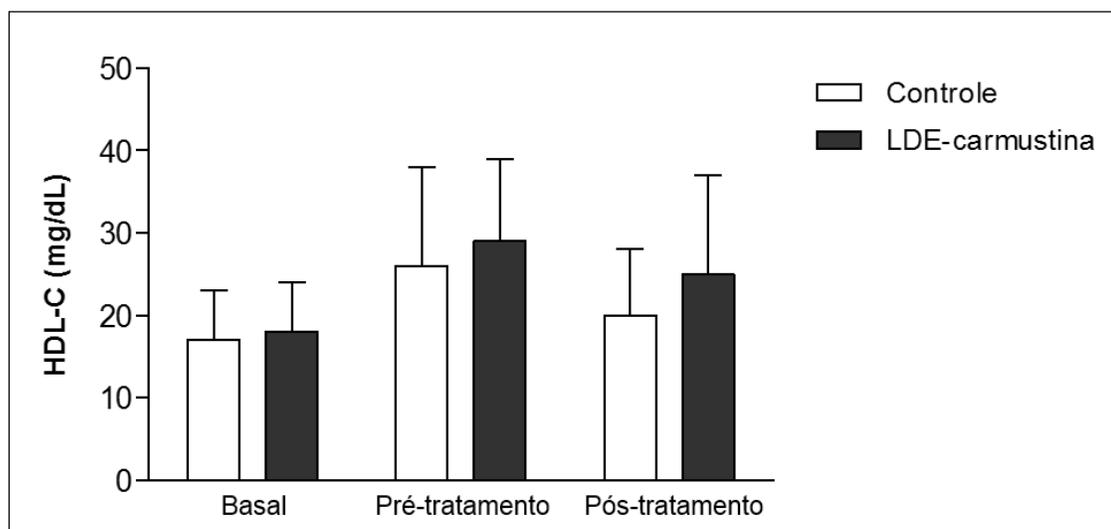
As figuras 8, 9, 10 e 11 mostram as concentrações plasmáticas de CT, HDL-C, nHDL-C e TG dos animais antes do início da dieta rica em colesterol (Basal), antes do início do tratamento (Pré-Tratamento) e ao final do tratamento (Pós-Tratamento), nos grupos controle e LDE-carmustina.

As figuras 8, 10 e 11 mostram que as concentrações plasmáticas de CT, n-HDL-C e TG aumentaram significativamente em ambos os grupos em relação à concentração inicial após 4 semanas (Pré-Tratamento) de suplementação hipercolesterolêmica e se mantiveram até o final do tratamento (Pós-Tratamento). Nota-se que na figura 9 os níveis séricos de HDL-C se mantiveram constantes nos dois grupos do início ao fim do tratamento.



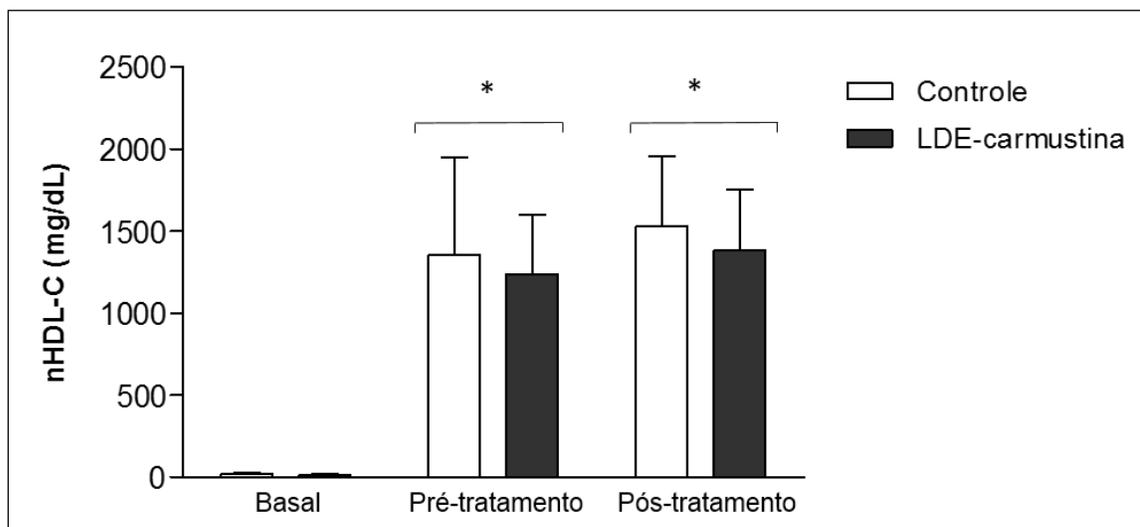
**Figura 8:** Concentração plasmática de colesterol total dos grupos controle (n=9) e tratado com LDE-carmustina (n=9) antes do início da dieta rica em colesterol (Basal), antes do início do tratamento (Pré-Tratamento) e ao final do tratamento (Pós-Tratamento). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

\* $p < 0,05$  versus basal.



**Figura 9:** Concentração plasmática de HDL-colesterol dos grupos controle (n=9) e tratado com LDE-carmustina (n=9) antes do início da dieta rica em colesterol (Basal), antes do início do tratamento (Pré-Tratamento) e ao final do tratamento (Pós-Tratamento). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

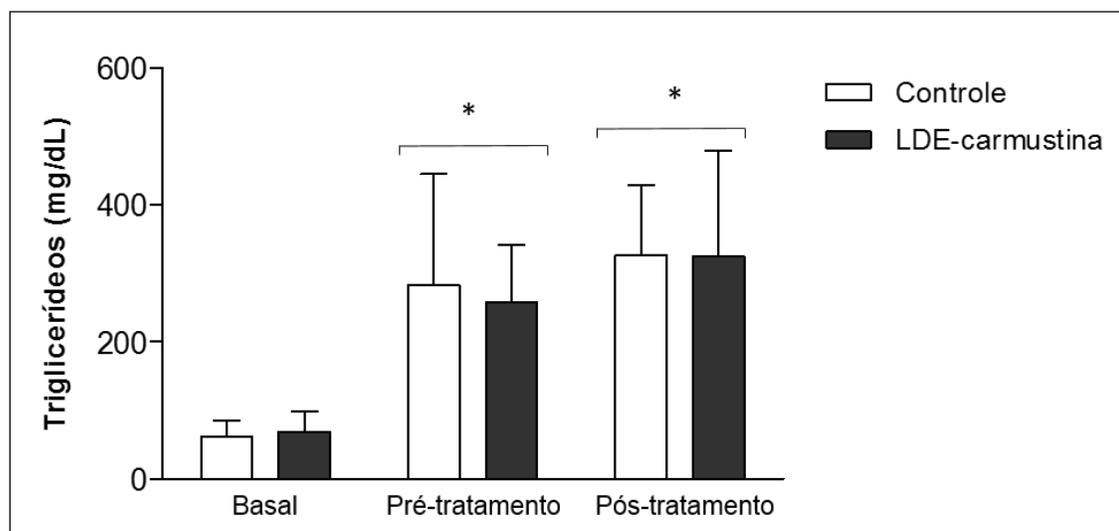
HDL-C: "high-density lipoprotein", HDL-colesterol.



**Figura 10:** Concentração plasmática de não HDL-colesterol dos grupos controle (n=9) e tratado com LDE-carmustina (n=9) antes do início da dieta rica em colesterol (Basal), antes do início do tratamento (Pré-Tratamento) e ao final do tratamento (Pós-Tratamento). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

\*p<0,05 versus basal.

nHDL-C: não HDL-colesterol



**Figura 11:** Concentração plasmática de triglicerídeos dos grupos controle (n=9) e tratado com LDE-carmustina (n=9) antes do início da dieta rica em colesterol (Basal), antes do início do tratamento (Pré-Tratamento) e ao final do tratamento (Pós-Tratamento). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

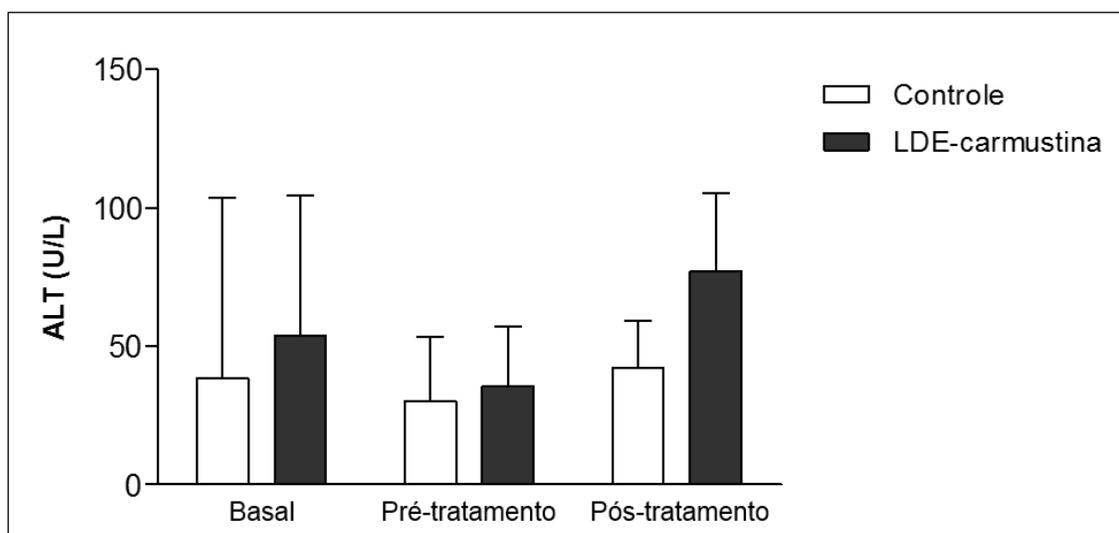
\*p<0,05 versus basal.

#### **5.4 Avaliação dos parâmetros bioquímicos dos animais**

As figuras 12, 13, 14, 15, 16, 17 e 18 mostram o perfil bioquímico dos animais antes do início da dieta rica em colesterol (Basal), antes do início do tratamento (Pré-Tratamento) e ao final do tratamento (Pós-Tratamento), nos grupos controle e LDE-carmustina.

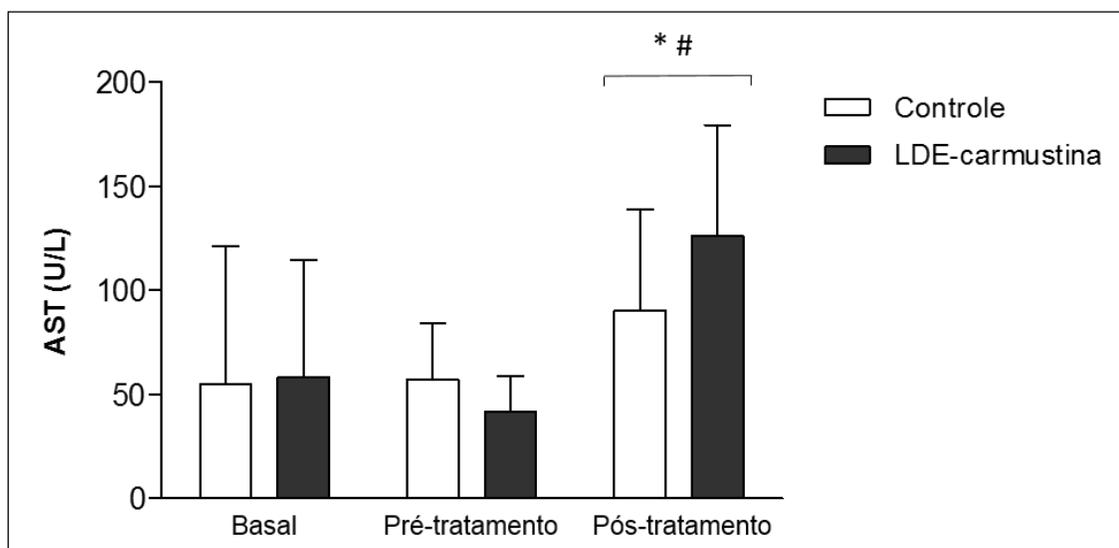
Os níveis plasmáticos de ALT, fosfatase alcalina, GGT, creatinina e ureia apresentaram valores semelhantes entre os dois grupos ao longo do tratamento, cujos valores não apresentaram diferenças significativas quando comparados entre si, figuras 12, 15, 16, 17 e 18, respectivamente. Porém, a concentração plasmática de AST aumentou ao final de 8 semanas de tratamento em ambos os grupos quando comparado ao basal e pré-tratamento ( $p < 0,05$ ), figura 13.

Outro parâmetro que apresentou alteração significativa foi a bilirrubina total, suas concentrações mostraram valores semelhantes em ambos os grupos do início ao final do estudo, com diminuição após 8 semanas de tratamento quando comparado o basal e ao pré-tratamento ( $p < 0,05$ ), figura 14.



**Figura 12:** Concentração plasmática de ALT dos grupos controle (n=9) e tratado com LDE-carmustina (n=9) antes do início da dieta rica em colesterol (Basal), antes do início do tratamento (Pré-Tratamento) e ao final do tratamento (Pós-Tratamento). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

ALT: alanino amino transferase

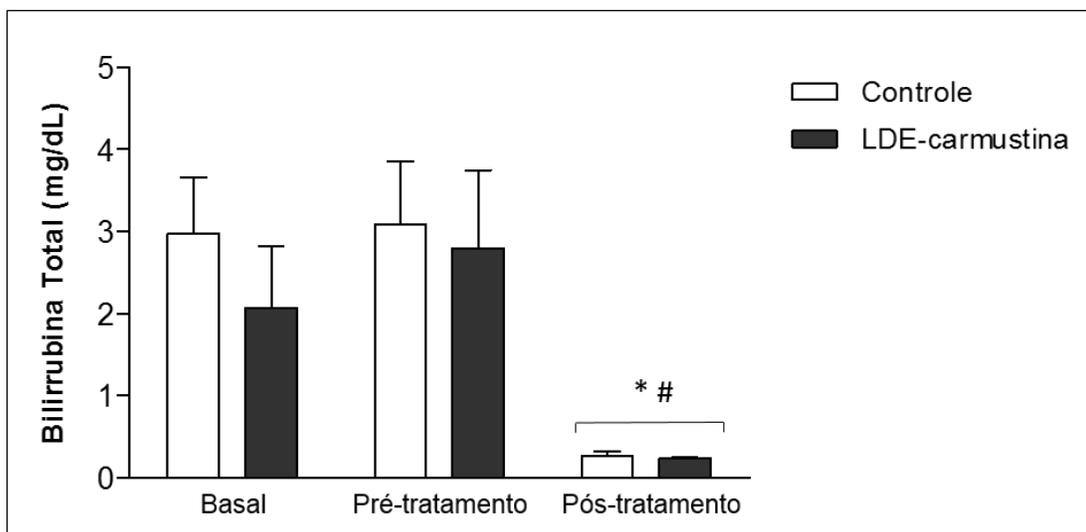


**Figura 13:** Concentração plasmática de AST dos grupos controle (n=9) e tratado com LDE-carmustina (n=9) antes do início da dieta rica em colesterol (Basal), antes do início do tratamento (Pré-Tratamento) e ao final do tratamento (Pós-Tratamento). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

\* $p < 0,05$  versus basal

# $p < 0,05$  versus versus pré-tratamento

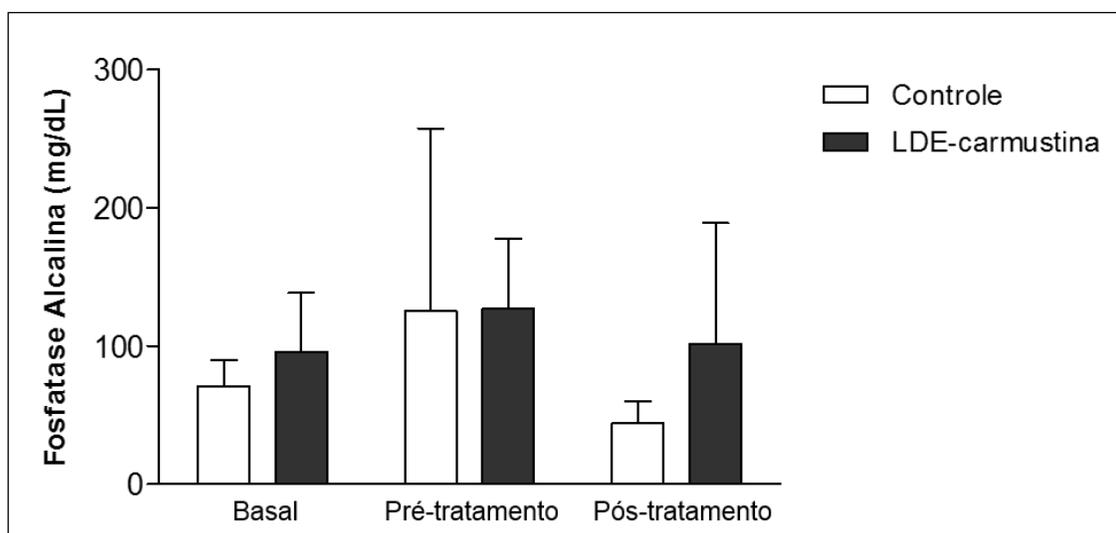
AST: aspartato aminotransferase



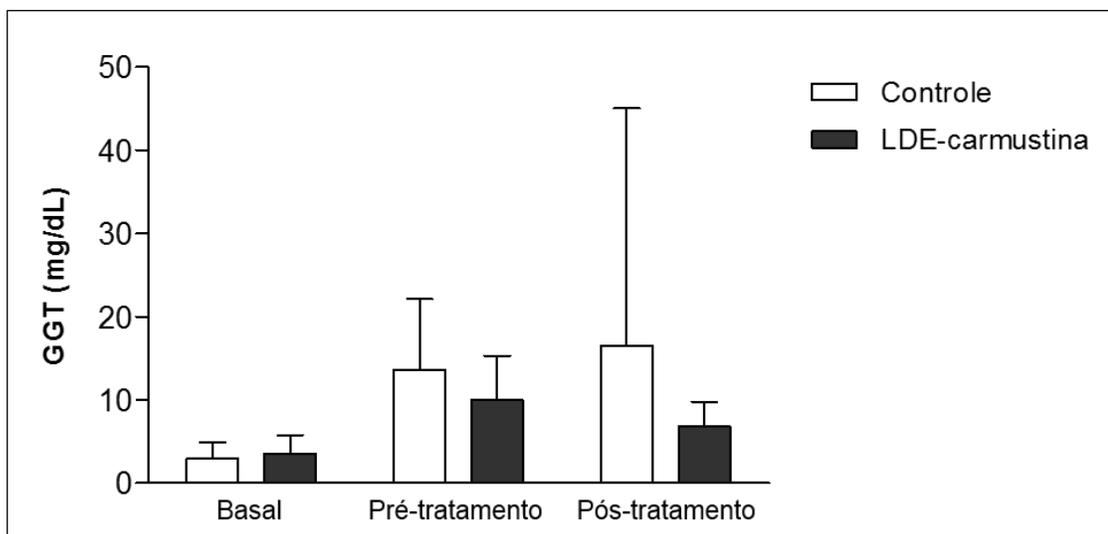
**Figura 14:** Concentração plasmática de bilirrubina total dos grupos controle (n=9) e tratado com LDE-carmustina (n=9) antes do início da dieta rica em colesterol (Basal), antes do início do tratamento (Pré-Tratamento) e ao final do tratamento (Pós-Tratamento). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

\*p<0,05 versus basal

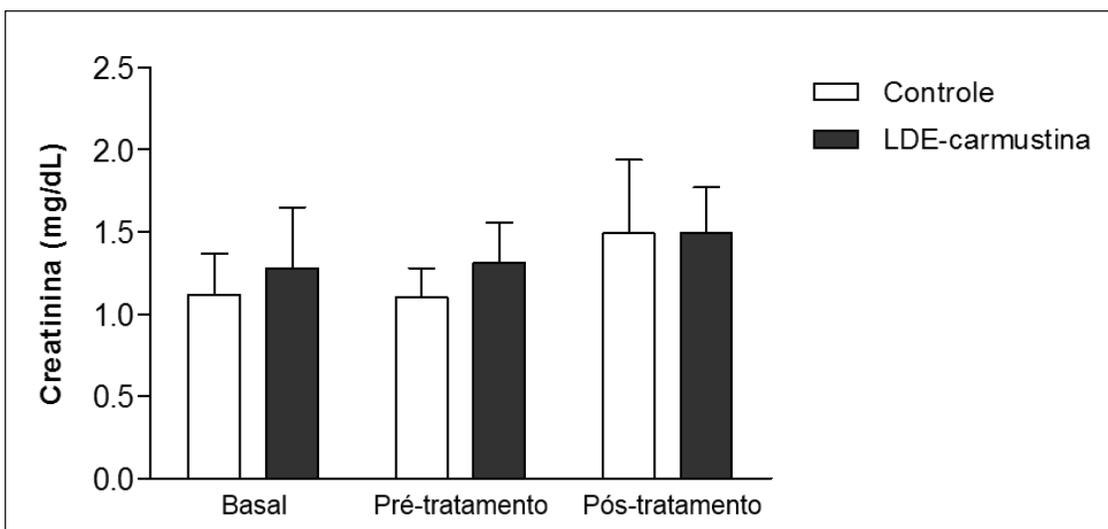
#p<0,05 versus versus pré-tratamento



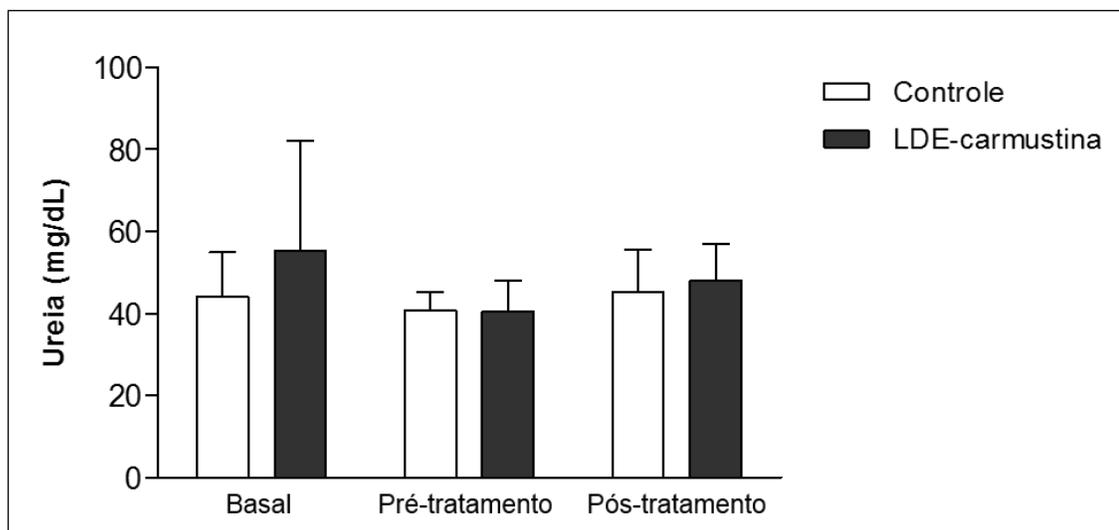
**Figura 15:** Concentração plasmática de fosfatase alcalina dos grupos controle (n=9) e tratado com LDE-carmustina (n=9) antes do início da dieta rica em colesterol (Basal), antes do início do tratamento (Pré-Tratamento) e ao final do tratamento (Pós-Tratamento). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.



**Figura 16:** Concentração plasmática de GGT dos grupos controle (n=9) e tratado com LDE-carmustina (n=9) antes do início da dieta rica em colesterol (Basal), antes do início do tratamento (Pré-Tratamento) e ao final do tratamento (Pós-Tratamento). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.  
GGT: gama glutamil transferase



**Figura 17:** Concentração plasmática de creatinina dos grupos controle (n=9) e tratado com LDE-carmustina (n=9) antes do início da dieta rica em colesterol (Basal), antes do início do tratamento (Pré-Tratamento) e ao final do tratamento (Pós-Tratamento). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.



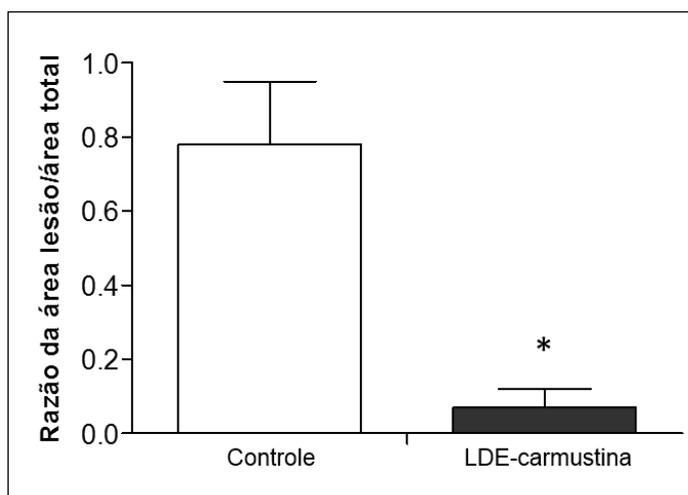
**Figura 18:** Concentração plasmática de ureia dos grupos controle (n=9) e tratado com LDE-carmustina (n=9) antes do início da dieta rica em colesterol (Basal), antes do início do tratamento (Pré-Tratamento) e ao final do tratamento (Pós-Tratamento). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

## 5.5 Análise morfométrica das aortas

### 5.5.1 Planimetria macroscópica

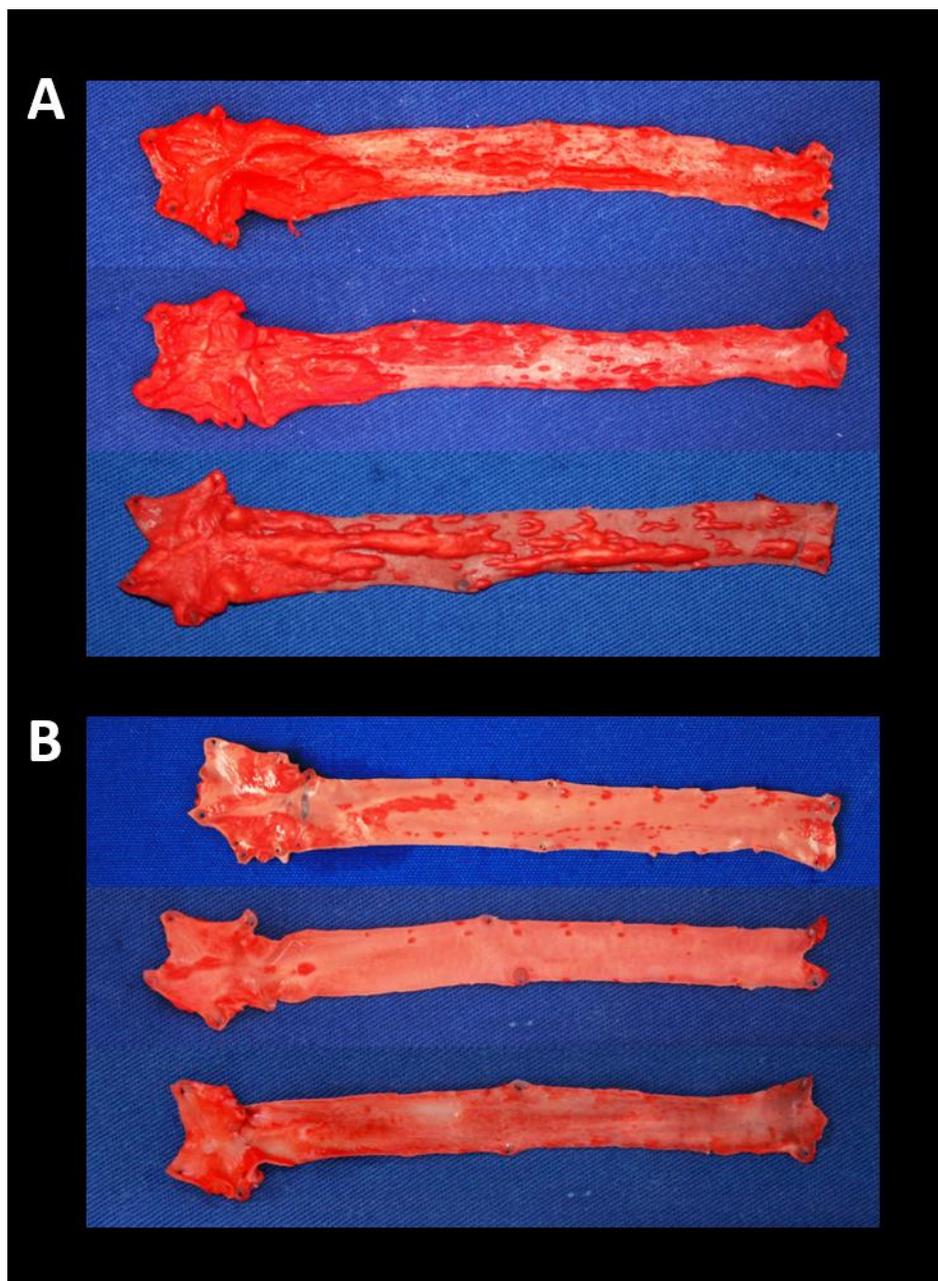
A planimetria macroscópica da aorta dos grupos está representada na figura 19. É possível observar nessa figura que o grupo tratado a associação teve marcada redução da lesão aterosclerótica macroscópica. O grupo tratado com LDE-carmustina apresentou redução em cerca de 90% quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

Na figura 20 é possível visualizar fotos de aortas representando os grupos estudados. As aortas foram coradas com escarlata de Biebrich R (corante específico para lipídeos). Nessa figura evidenciam-se em vermelho as lesões ateroscleróticas formadas nas aortas dos animais.



**Figura 19:** Planimetria macroscópica da aorta dos grupos controle (n=9) e tratado com LDE-carmustina (n=9). Dados expressos em média ± desvio padrão.

\*p<0,05 versus controle.



**Figura 20:** Fotos de aorta de coelhos coradas com Escarlata de Biebrich R representando os grupos controle (n = 9) (A) e tratado com LDE-carmustina (n=9) (B).

### 5.5.2 Planimetria microscópica

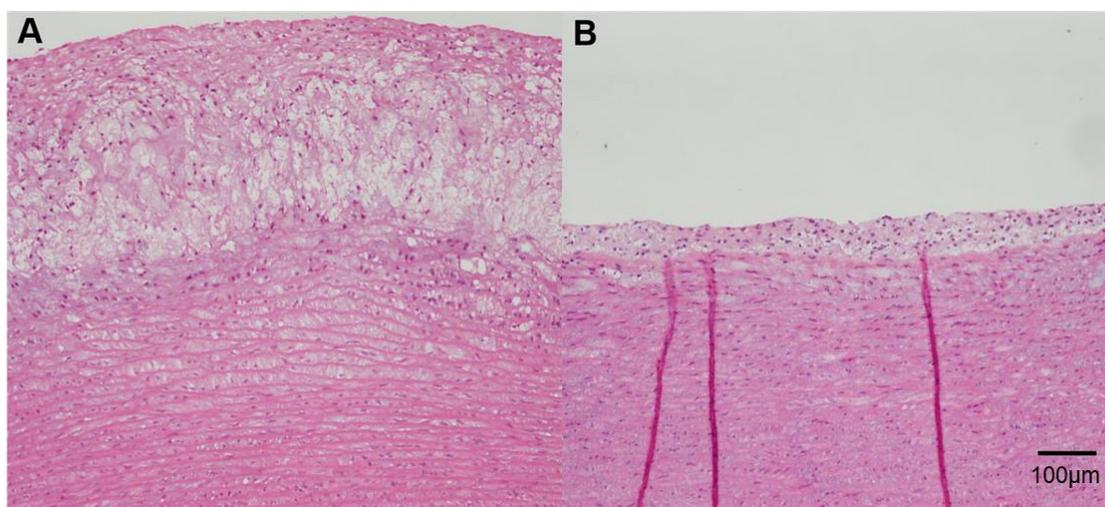
A planimetria microscópica dos cortes histológicos das aortas dos celhos dos grupos controle e LDE-carmustina é mostrada na tabela 1. O grupo LDE-carmustina apresentou uma redução de 40% da área total da aorta ( $p < 0,05$ ) e 94% da área da camada íntima ( $p < 0,05$ ) em comparação ao grupo controle. A razão entre a área da camada íntima e a área total da aorta do grupo LDE-carmustina também foi menor que no grupo controle ( $p < 0,05$ ), figura 21.

O grupo LDE-carmustina mostrou uma redução de 43% da espessura total da aorta ( $p < 0,05$ ) e 95% da espessura da camada íntima ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo controle. A razão entre a espessura da camada íntima e a espessura total da aorta do grupo LDE-carmustina também foi menor que no grupo controle ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 1:** Planimetria microscópica das áreas e das espessuras totais e da camada íntima do arco aórtico das artérias dos animais dos grupos controle e tratado com LDE-carmustina. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

<i>Microscopia</i>	<b>Controle</b>	<b>LDE-carmustina</b>
Área total da aorta ( $\mu\text{m}^2$ ) ( $10^{-3}$ )	662,58 $\pm$ 37,79	391,08 $\pm$ 18,39*
Área da íntima ( $\mu\text{m}^2$ ) ( $10^{-3}$ )	282,41 $\pm$ 23,72	15,65 $\pm$ 5,23*
Área da íntima/área total	0,43 $\pm$ 0,04	0,04 $\pm$ 0,01*
Espessura total da aorta ( $\mu\text{m}^2$ )	735,72 $\pm$ 32,40	415,67 $\pm$ 20,59*
Espessura da íntima ( $\mu\text{m}^2$ )	340,48 $\pm$ 38,43	16,27 $\pm$ 4,29*
Espessura da íntima/espessura total	0,46 $\pm$ 0,04	0,04 $\pm$ 0,01*

\*p<0,05 versus controle.

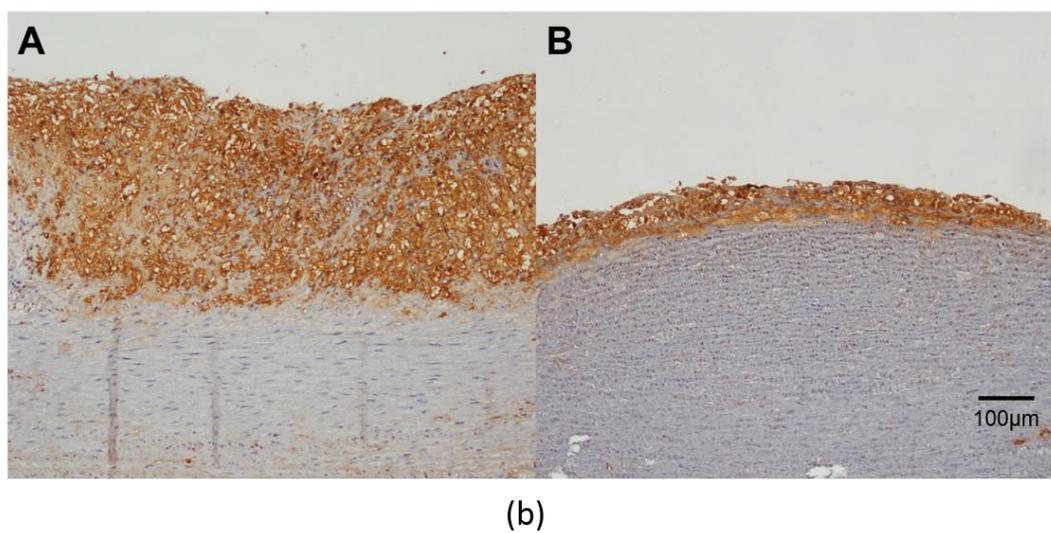
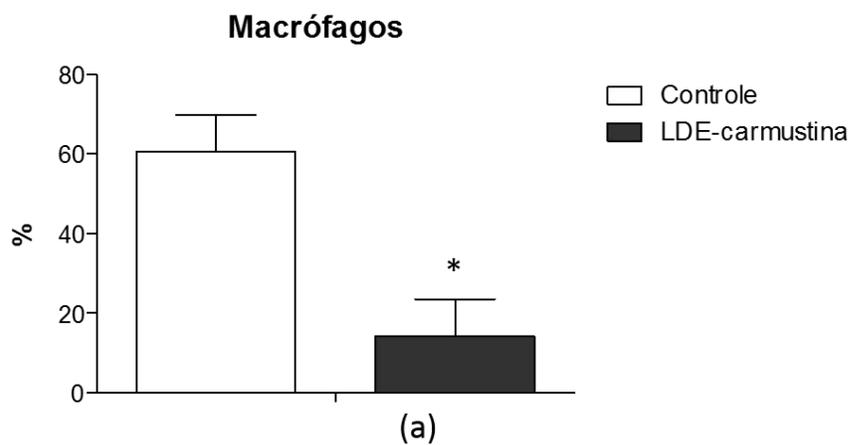


**Figura 21:** Fotos de microscopia óptica do arco aórtico coradas com hematoxilina/eosina representando os grupos (A) controle (n=9) e (B) LDE-carmustina (n=9). Aumento de 100X.

### **5.5.3 Análise imunohistoquímica**

#### **5.5.3.1 Quantificação de macrófagos**

A figura 22 (a) mostra a porcentagem de macrófagos na camada íntima do arco aórtico dos grupos estudados. A porcentagem de imunomarcação para macrófagos no grupo LDE-carmustina foi 77% menor em comparação ao grupo controle ( $14,16 \pm 9,32\%$  versus  $60,52 \pm 9,25\%$ , respectivamente,  $p < 0,05$ ). A figura 22 (b) apresenta a imagem microscópica de cortes histológicos do arco aórtico, corados por imunohistoquímica para RAM-11, mostrando a marcada redução de macrófagos na camada íntima do grupo tratado com LDE-carmustina.

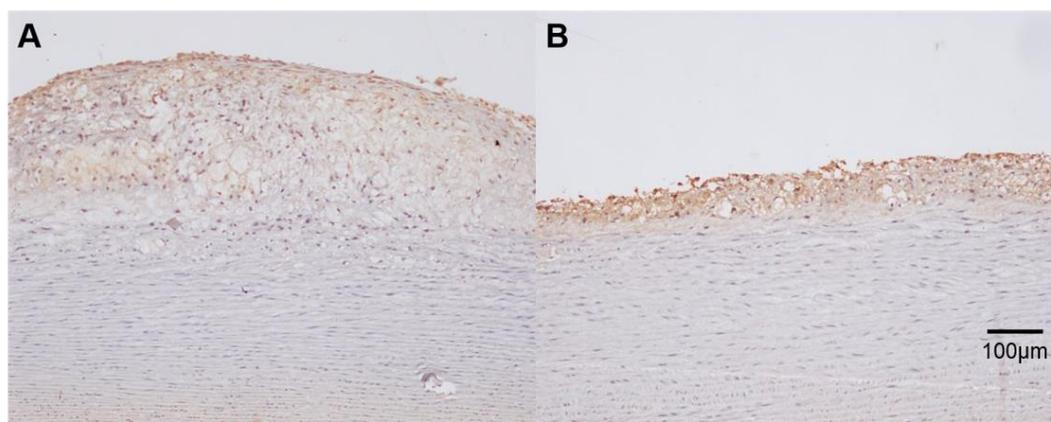
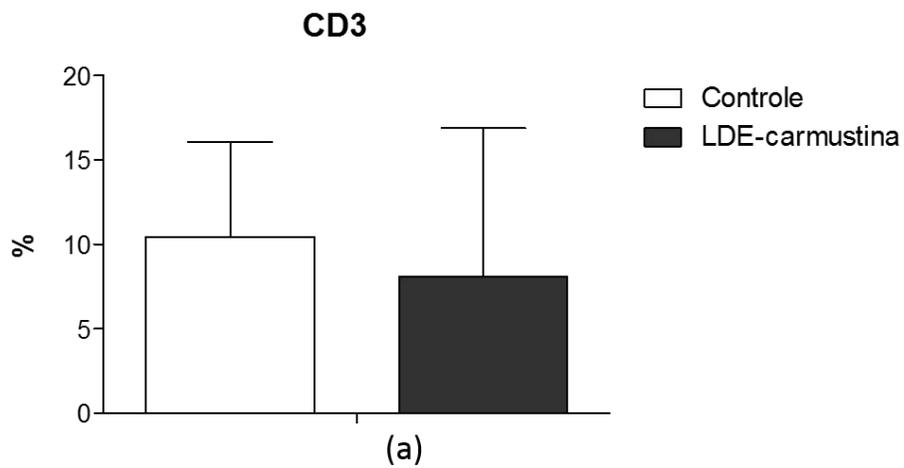


**Figura 22:** (a) Porcentagem de macrófagos (média  $\pm$  desvio padrão) na camada íntima de cortes do arco aórtico dos grupos controle (n=9) e LDE-carmustina (n=9),  $p < 0,05$ . (b) Fotos de imunohistoquímica de macrófagos no arco aórtico representando os grupos controle (A) e LDE-carmustina (B). Aumento de 100X.

### **5.5.3.2 Quantificação da população e subpopulação de linfócitos**

#### **5.5.3.2.1 Linfócitos T CD3**

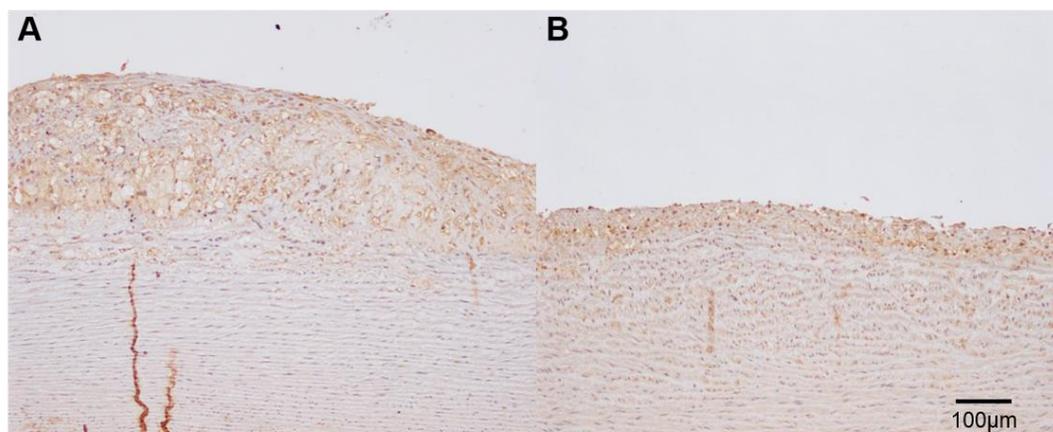
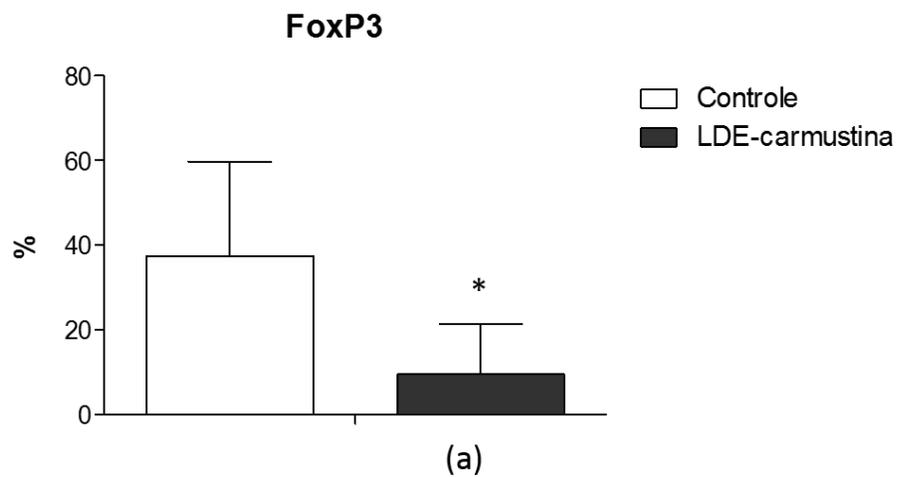
A figura 23 (a) mostra a porcentagem de linfócitos T CD3 na camada íntima do arco aórtico dos grupos estudados. A porcentagem de imunomarcção para linfócitos T CD3 não mostrou diferença significativa no grupo tratado com LDE-carmustina quando comparado ao grupo controle ( $8,10 \pm 8,78\%$  versus  $10,46 \pm 5,61\%$ , respectivamente,  $p=0,5065$ ). A figura 23 (b) apresenta a imagem microscópica de cortes histológicos do arco aórtico, corados por imunohistoquímica para linfócitos T CD3.



**Figura 23:** (a) Porcentagem de linfócitos T CD3 (média  $\pm$  desvio padrão) na camada íntima de cortes do arco aórtico dos grupos controle (n=9) e LDE-carmustina (n=9),  $p=0,5065$ . (b) Fotos de imunohistoquímica de linfócitos T CD3 no arco aórtico representando os grupos controle (A) e LDE-carmustina (B). Aumento de 100X. CD3: “cluster of differentiation 3”, marcador para linfócitos T totais.

### 5.5.3.2.2 “Forkhead box protein P3” (FoxP3)

A figura 24 (a) mostra a porcentagem de células T regulatórias FoxP3 na camada íntima do arco aórtico dos grupos estudados. A porcentagem de imunomarcção para FoxP3 foi 75% menor no grupo tratado com LDE-carmustina quando comparado ao grupo controle ( $9,53 \pm 11,82\%$  versus  $37,52 \pm 22,18\%$ , respectivamente,  $p < 0,005$ ). A figura 24 (b) apresenta a imagem microscópica de cortes histológicos do arco aórtico, corados por imunohistoquímica para FoxP3.

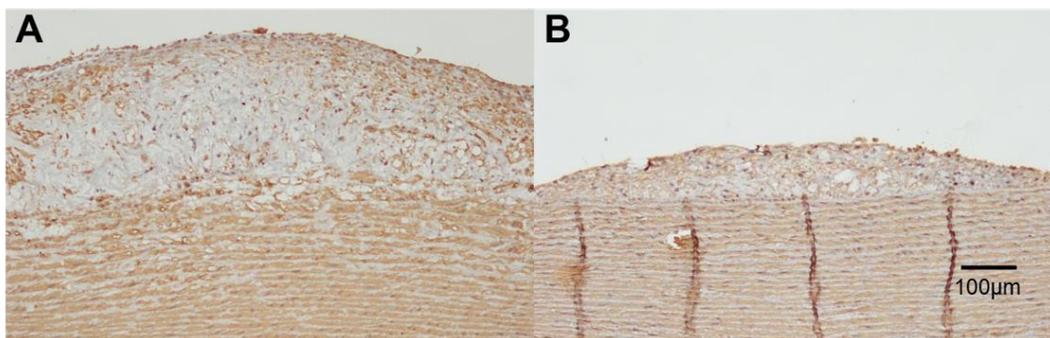
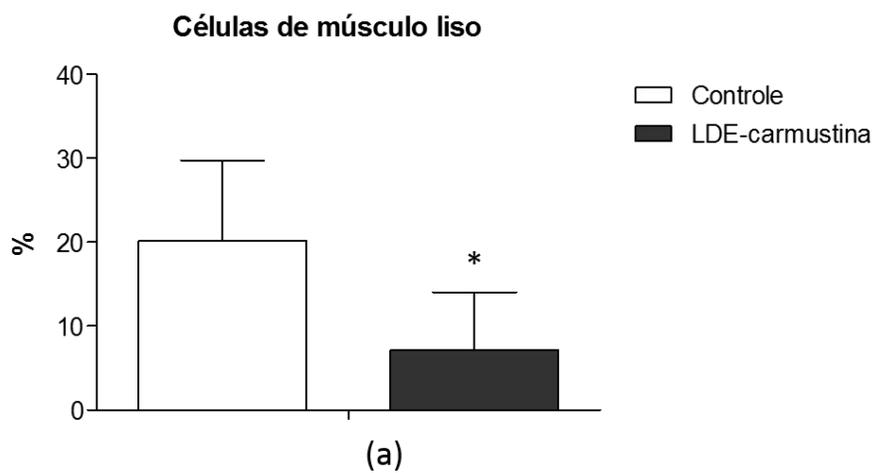


**Figura 24:** (a) Porcentagem de FoxP3 (média  $\pm$  desvio padrão) na camada íntima de cortes do arco aórtico dos grupos controle (n=9) e LDE-carmustina (n=9),  $p < 0,05$ . (b) Fotos de imunohistoquímica de linfócitos FoxP3 no arco aórtico representando os grupos controle (A) e LDE-carmustina (B). Aumento de 100X.

FoxP3: "forkhead box P3", células reguladoras de linfócitos T.

### 5.5.3.3 Quantificação de células de músculo liso

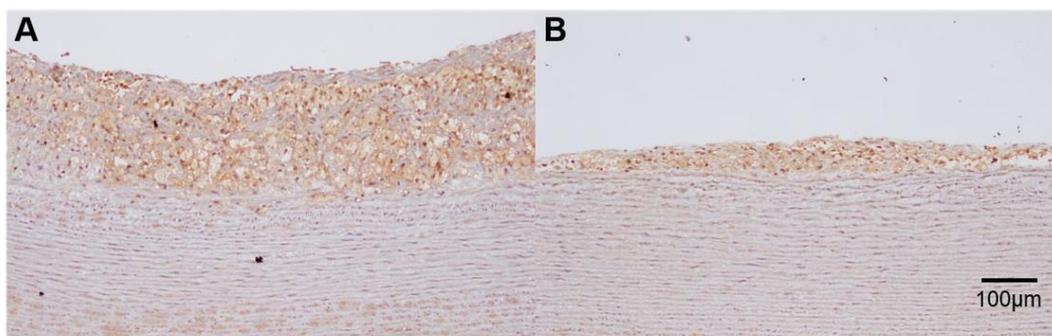
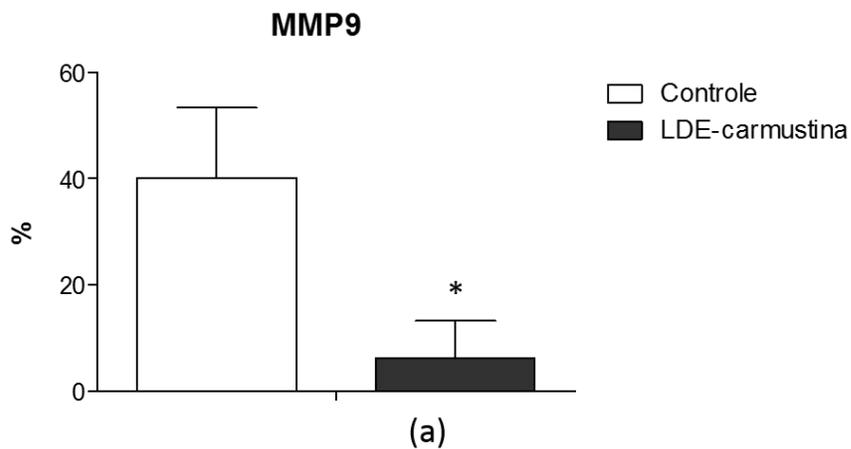
A figura 25 (a) mostra a porcentagem de células de músculo liso na camada íntima do arco aórtico dos grupos estudados. A porcentagem de imunomarcação para estas células no grupo LDE-carmustina foi 64% menor em comparação ao grupo controle ( $7,18 \pm 6,87\%$  versus  $20,19 \pm 9,57\%$ , respectivamente,  $p < 0,05$ ). A figura 25 (b) apresenta a imagem microscópica de cortes histológicos do arco aórtico, corados por imunohistoquímica para  $\alpha$ -actina, mostrando a marcada redução de células de músculo liso na camada íntima do grupo tratado com LDE-carmustina.



**Figura 25:** (a) Porcentagem de células de músculo liso (média  $\pm$  desvio padrão) na camada íntima de cortes do arco aórtico dos grupos controle (n=9) e LDE-carmustina (n=9),  $p < 0,05$ . (b) Fotos de imunohistoquímica de células de músculo liso no arco aórtico representando os grupos controle (A) e LDE-carmustina (B). Aumento de 100X.

#### **5.5.3.4 Quantificação da expressão protéica de metaloproteinase 9 (MMP9)**

A área da expressão protéica de MMP9 foi 85% menor no grupo tratado com LDE-carmustina quando comparado ao grupo controle ( $6,19 \pm 7,02\%$  versus  $40,18 \pm 13,18\%$ , respectivamente,  $p < 0,05$ ), figura 26 (a). A figura 26 (b) apresenta a imagem microscópica de cortes histológicos do arco aórtico, corados por imunohistoquímica para MMP9, mostrando a marcada redução da expressão de MMP9 na camada íntima do grupo tratado com LDE-carmustina.

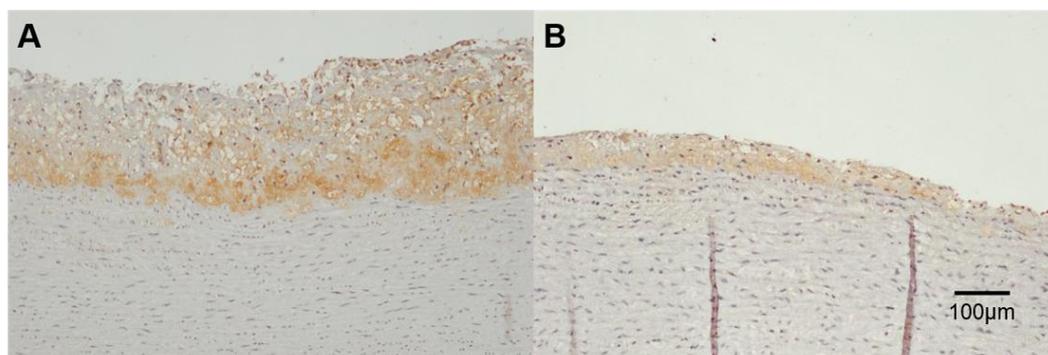
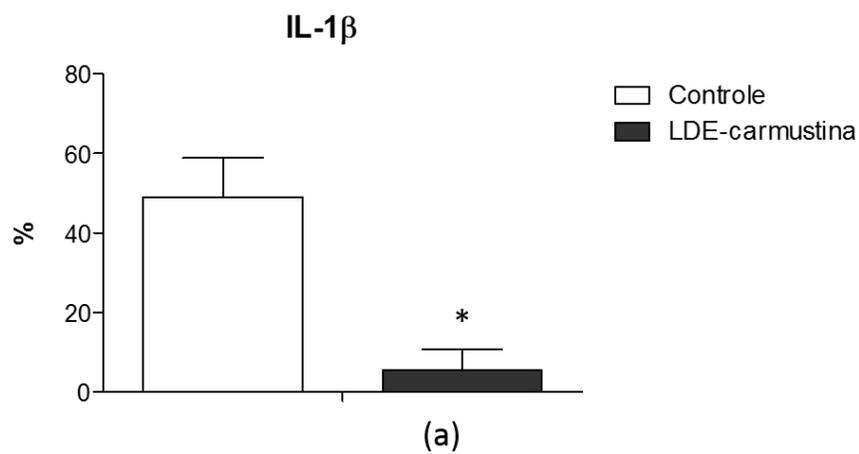


**Figura 26:** (a) Porcentagem de expressão protéica de MMP9 (média  $\pm$  desvio padrão) na camada íntima de cortes do arco aórtico dos grupos controle (n=9) e LDE-carmustina (n=9),  $p < 0,05$ . (b) Fotos de imunohistoquímica da expressão protéica para MMP9 no arco aórtico representando os grupos controle (A) e LDE-carmustina (B). Aumento de 100X. MMP9: matriz metaloproteinase 9.

### **5.5.3.5 Quantificação da expressão protéica de citocinas inflamatórias**

#### **5.5.3.5.1 Interleucina 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )**

A expressão protéica medida na área imunomarcada pela IL-1 $\beta$  foi 89% menor no grupo tratado com LDE-carmustina quando comparado ao grupo controle ( $5,47 \pm 5,25\%$  versus  $48,95 \pm 9,93\%$ , respectivamente,  $p < 0,05$ ), figura 27 (a). A figura 27 (b) apresenta a imagem microscópica de cortes histológicos do arco aórtico, corados por imunohistoquímica para IL-1 $\beta$ , mostrando a marcada redução desta citocina na camada íntima do grupo tratado com LDE-carmustina.

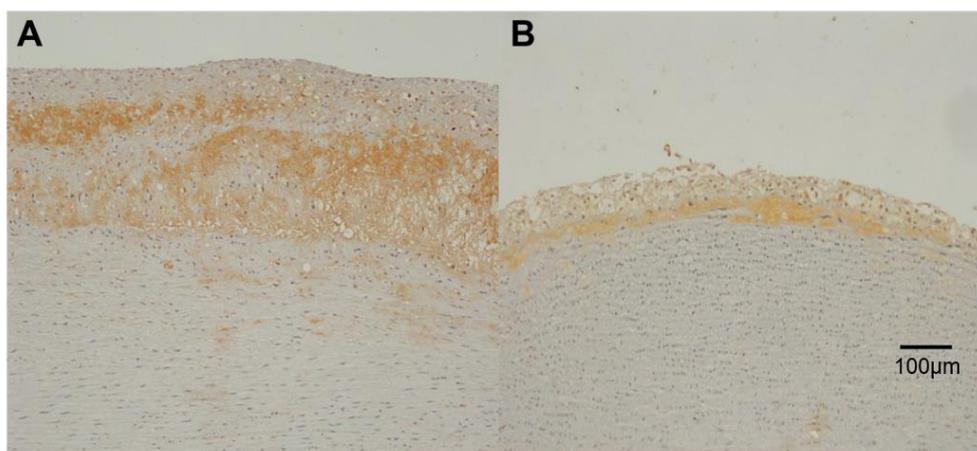
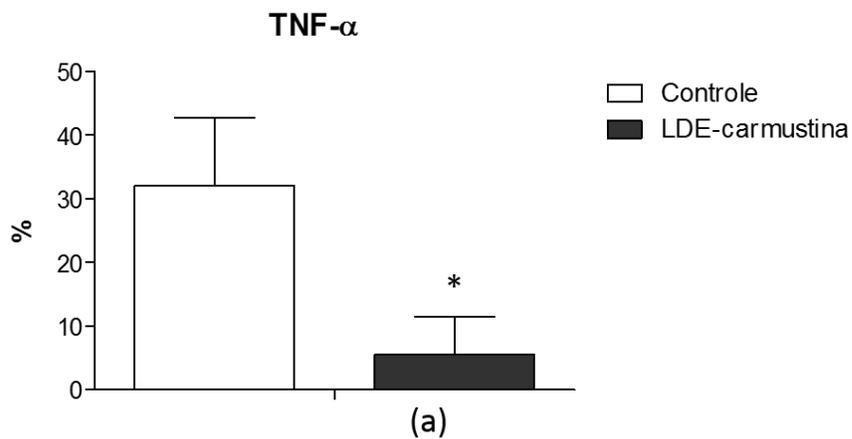


**Figura 27:** (a) Porcentagem de expressão protéica de citocinas inflamatórias – IL-1 $\beta$  (média  $\pm$  desvio padrão) na camada íntima de cortes do arco aórtico dos grupos controle (n=9) e LDE-carmustina (n=9),  $p < 0,05$ . (b) Fotos de imunohistoquímica da expressão protéica para IL-1 $\beta$  no arco aórtico representando os grupos controle (A) e LDE-carmustina (B). Aumento de 100X.

IL-1 $\beta$ : inlerleucina 1 beta.

#### **5.5.3.5.2 “Tumor necrosis factor- $\alpha$ ” (TNF- $\alpha$ )**

A área imunomarcada por TNF- $\alpha$  foi 83% menor no grupo tratado com LDE-carmustina quando comparado ao grupo controle ( $5,54 \pm 5,95\%$  versus  $32,07 \pm 10,69\%$ , respectivamente,  $p < 0,05$ ), figura 28 (a). A figura 28 (b) apresenta a imagem microscópica de cortes histológicos do arco aórtico, corados por imunohistoquímica para TNF- $\alpha$ , mostrando a marcada redução desta citocina na camada íntima do grupo tratado com LDE-carmustina.

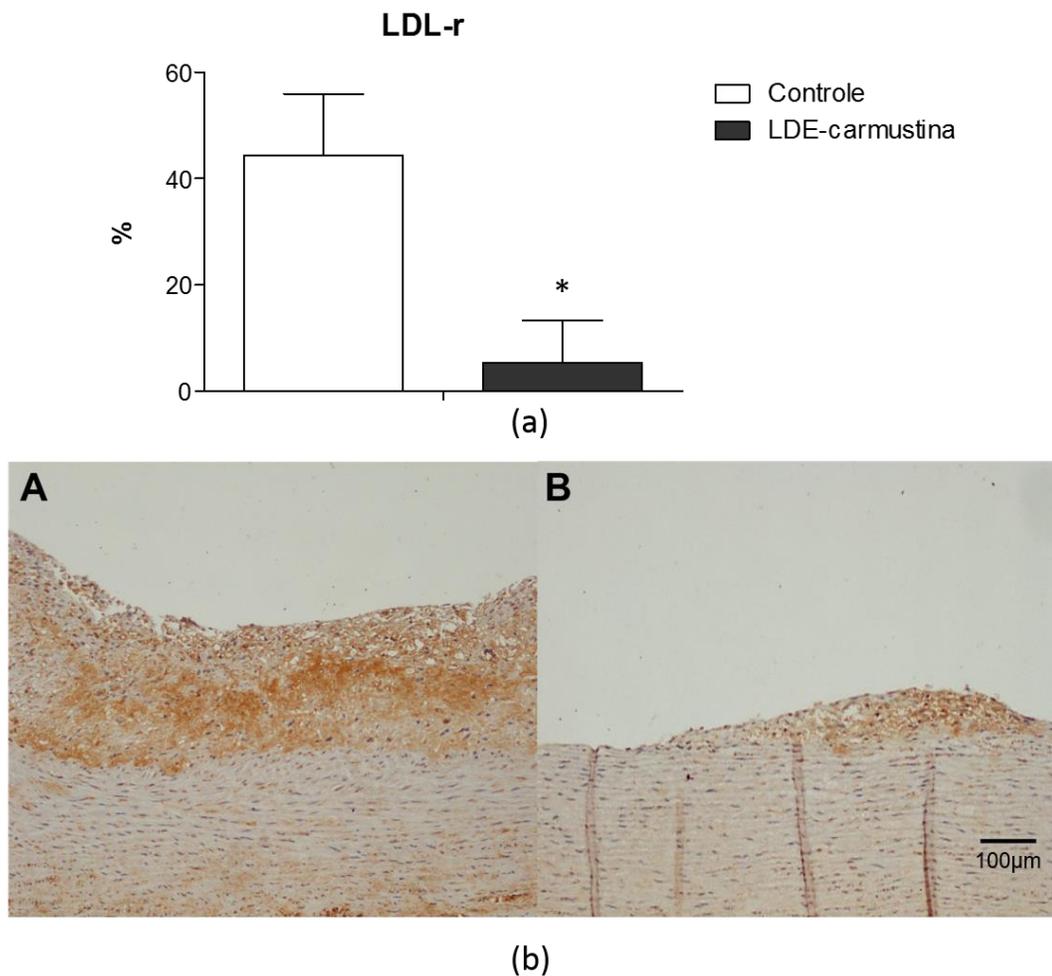


**Figura 28:** (a) Porcentagem de expressão protéica de citocinas inflamatórias – TNF- $\alpha$  (média  $\pm$  desvio padrão) na camada íntima de cortes do arco aórtico dos grupos controle (n=9) e LDE-carmustina (n=9),  $p < 0,05$ . Fotos de imunohistoquímica da expressão protéica para TNF- $\alpha$  no arco aórtico representando os grupos controle (A) e LDE-carmustina (B). Aumento de 100X. TNF- $\alpha$ : “tumor necrosis factor- $\alpha$ ”.

### **5.5.3.6 Quantificação da expressão protéica de receptores de lipoproteínas**

#### **5.5.3.6.1 Receptor de lipoproteína de alta densidade (LDL-r)**

A expressão protéica observada para LDL-r foi 88% menor no grupo tratado com LDE-carmustina quando comparado ao grupo controle ( $5,30 \pm 8,01\%$  versus  $44,28 \pm 11,66\%$ , respectivamente,  $p < 0,05$ ), figura 29 (a). A figura 29 (b) apresenta a imagem microscópica de cortes histológicos do arco aórtico, corados por imunohistoquímica para LDL-r, mostrando a marcada redução destas células na camada íntima do grupo tratado com LDE-carmustina.

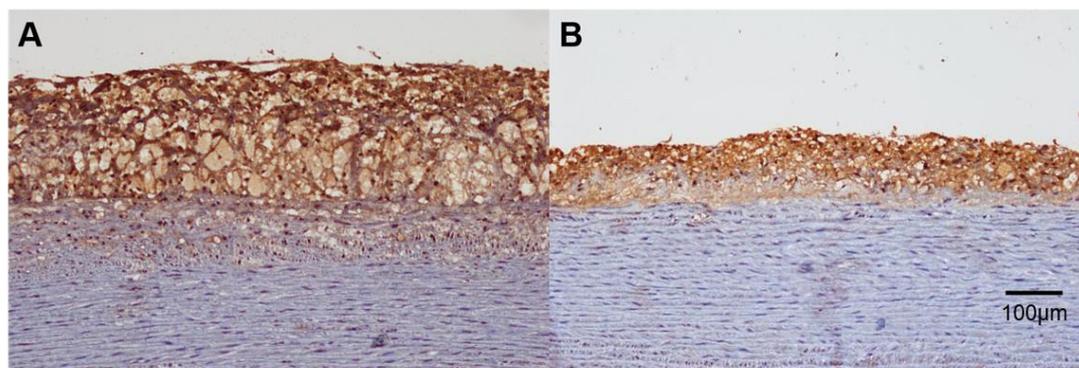
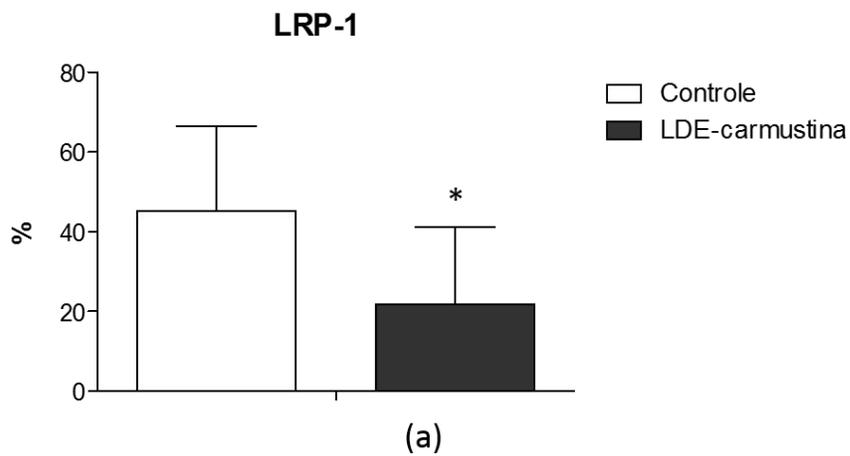


**Figura 29:** (a) Porcentagem de expressão protéica para receptor de lipoproteína – LDL-r (média  $\pm$  desvio padrão) na camada íntima de cortes do arco aórtico dos grupos controle (n=9) e LDE-carmustina (n=9),  $p < 0,05$ . (b) Fotos de imunohistoquímica da expressão protéica para LDL-r no arco aórtico representando os grupos controle (A) e LDE-carmustina (B). Aumento de 100X.

LDL-r: “low-density lipoprotein receptor”.

#### **5.5.3.6.2 “LDL receptor-related protein-1” (LRP-1)**

A expressão protéica observada para LRP-1 foi 52% menor no grupo tratado com LDE-carmustina quando comparado ao grupo controle ( $21,86 \pm 19,32\%$  versus  $45,25 \pm 21,21\%$ , respectivamente,  $p < 0,05$ ), figura 30 (a). A figura 30 (b) apresenta a imagem microscópica de cortes histológicos do arco aórtico, corados por imunohistoquímica para LRP-1, mostrando a redução destas células na camada íntima do grupo tratado com LDE-carmustina.

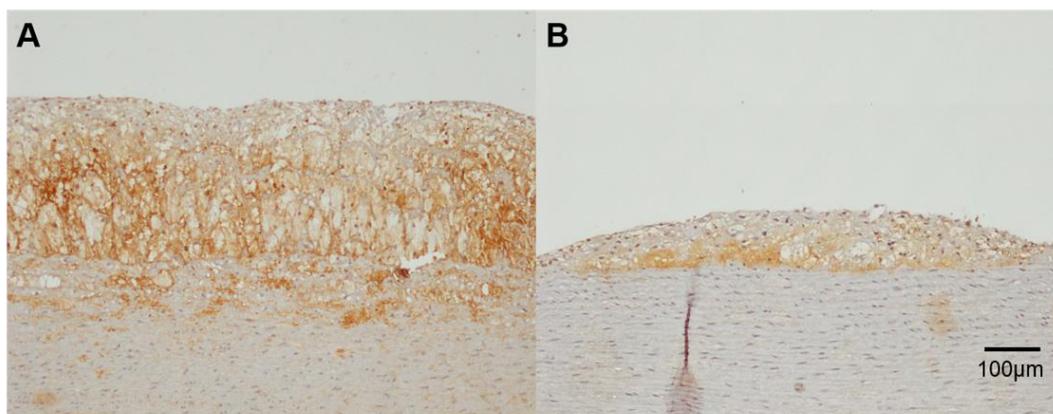
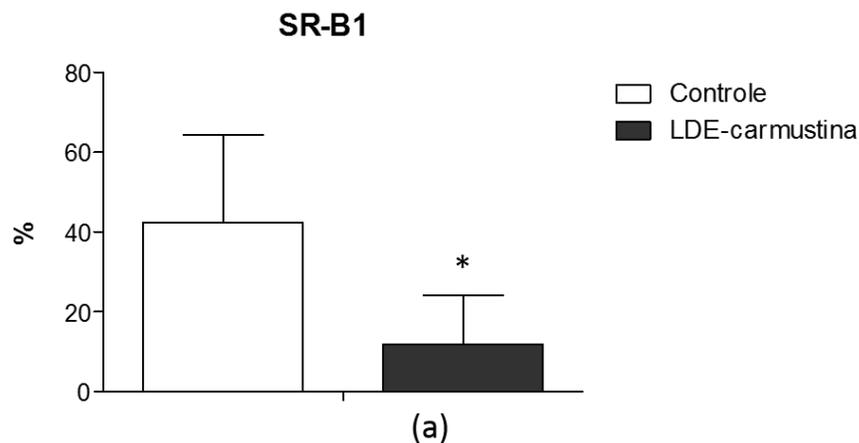


**Figura 30:** (a) Porcentagem de expressão protéica para receptor de lipoproteína – LRP-1 (média  $\pm$  desvio padrão) na camada íntima de cortes do arco aórtico dos grupos controle (n=9) e LDE-carmustina (n=9),  $p < 0,05$ . (b) Fotos de imunohistoquímica da expressão protéica para LRP-1 no arco aórtico representando os grupos controle (A) e LDE-carmustina (B). Aumento de 100X.

LRP-1: "low density lipoprotein receptor-related protein 1".

### 5.5.3.6.3 “Scavenger receptor class B1” (SR-B1)

A expressão protéica observada para SR-B1 foi 72% menor no grupo tratado com LDE-carmustina quando comparado ao grupo controle ( $11,91 \pm 12,26\%$  versus  $42,45 \pm 21,82\%$ , respectivamente,  $p < 0,05$ ), figura 31 (a). A figura 31 (b) apresenta a imagem microscópica de cortes histológicos do arco aórtico, corados por imunohistoquímica para SR-B1, mostrando a marcada redução destas células na camada íntima do grupo tratado com LDE-carmustina.



**Figura 31:** (a) Porcentagem de expressão protéica para receptor de lipoproteína – SR-B1 (média  $\pm$  desvio padrão) na camada íntima de cortes do arco aórtico dos grupos controle (n=9) e LDE-carmustina (n=9),  $p < 0,05$ . (b) Fotos de imunohistoquímica da expressão protéica para SR-B1 no arco aórtico representando os grupos controle (A) e LDE-carmustina (B). Aumento de 100X.  
SR-B1: “scavenger receptor class B member 1”.

## 6. DISCUSSÃO

Nesse estudo foi avaliada a eficácia terapêutica da associação do fármaco carmustina à nanoemulsão lipídica (LDE) no tratamento da aterosclerose. Essa associação mostrou marcada redução das lesões ateroscleróticas no arco aórtico de coelhos submetidos a uma dieta hipercolesterolêmica.

Estudos anteriores do grupo mostraram em animais de experimentação e, posteriormente, em pacientes oncológicos que tanto a LDE quanto os fármacos a ela incorporados concentram-se nos tumores (Ades et al., 2001; Azevedo et al., 2005). Inicialmente, o fármaco utilizado nesses experimentos foi a carmustina, que mostrou boa incorporação e estabilidade nas partículas de LDE (Teixeira et al., 2004). Considerou-se então a possibilidade do uso deste quimioterápico no tratamento da aterosclerose e que ainda não foi explorada nesse modelo experimental.

No presente trabalho o tratamento com LDE-carmustina mostrou ser capaz de reduzir as lesões ateroscleróticas em cerca de 90% em comparação aos animais do grupo controle. Maranhão et al. (2008) mostraram que a LDE injetada em coelhos com aterosclerose induzida através de dieta rica em colesterol, concentra-se na crossa da aorta, justamente a região onde as lesões ocorrem em profusão naquele modelo experimental. Em estudos anteriores, a redução em lesões ateroscleróticas em coelhos com dieta hipercolesterolêmica foi alcançada em trabalhos que associaram outros agentes quimioterápicos à LDE, como o paclitaxel (Maranhão et al., 2008), o etoposídeo (Valduga et al., 2003) e o metotrexato (Moura et al., 2011). O paclitaxel, o etoposídeo e o metotrexato associados à LDE foram administrados semanalmente nas doses de 4, 6 e 4 mg/Kg, respectivamente. O tratamento com LDE-paclitaxel reduziu as lesões em 60%,

LDE-etoposídeo em 85% e LDE-metotrexato em 65% (Maranhão et al., 2008; Tavares et al., 2011; Bulgarelli et al., 2013) em comparação com os animais-controle, com aterosclerose mas tratados apenas com solução salina.

A carmustina é um antiproliferativo lipossolúvel usado no tratamento de diversos tipos de tumores, particularmente efetivo no tratamento de linfoma e tumores cerebrais (Almeida et al., 2005; Laporte et al., 2006). A carmustina é um agente antineoplásico alquilante pertencente à classe das nitrossuréias e sua ação antiproliferativa ocorre pela sua ligação interfilamentosa com o DNA e inibe a auto-reparação do mesmo (Almeida, 2005). Porém, seu uso clínico é limitado por causar severa mielosupressão (Maze et al., 1996), o que não foi observado neste estudo. O perfil hematológico não sofreu alteração nos grupos estudados, indicando que o tratamento com LDE-carmustina não mostrou toxicidade hematológica. Estes resultados são confirmados por Maranhão et al. (2002), onde demonstraram que estudos com pacientes oncológicos tratados com a associação da carmustina à LDE não apresentaram toxicidade hematológica. Em ensaios clínicos com a carmustina, o etoposídeo e o paclitaxel (Maranhão et al., 2002; Hungria et al., 2004) verificou-se que o uso desses fármacos associados à LDE, mesmo em doses mais altas do que as usualmente empregadas na clínica, apresentaram toxicidade praticamente ausente.

No perfil lipídico, as concentrações plasmáticas de CT, HDL-C, n-HDL-C e TG mantiveram valores semelhantes ao longo do tratamento nos dois grupos. Esses resultados sugerem que o tratamento com LDE-carmustina não alterou os níveis plasmáticos desses lípidos. A variação do peso corporal e o consumo de ração do grupo tratado também não apresentaram diferenças significativas quando comparado ao grupo

controle, portanto, esses resultados parecem mostrar que a formulação não provoca perda de peso ou apetite.

No perfil bioquímico, as quantificações de ALT, AST, fosfatase alcalina, GGT e bilirrubina total foram realizadas para avaliação das funções hepáticas e creatinina e ureia para avaliação da função renal. As concentrações plasmáticas de ALT, fosfatase alcalina, GGT, creatinina e ureia se mantiveram constantes do início ao fim do tratamento nos grupos estudados. As concentrações plasmáticas de AST aumentaram e de bilirrubina total diminuíram em ambos os grupos no final do tratamento. Esses resultados indicam que o tratamento com LDE-carmustina não provocou toxicidade hepática e renal, mesmo com as concentrações de AST e bilirrubina total alterados, visto que as mesmas alterações foram encontradas no grupo controle.

Em trabalhos anteriores realizados em pacientes oncológicos a associação da carmustina com LDE não demonstrou alterações nas concentrações plasmáticas de ALT, AST, fosfatase alcalina, bilirrubina total, ureia e creatinina mesmo em doses mais altas do que as usualmente utilizadas na clínica (Maranhão et al., 2002). Estes resultados são bastante semelhantes ao do presente trabalho, exceto para as concentrações de AST que estavam aumentadas no final do tratamento nos dois grupos. Ambos os trabalhos excluíram toxicidade renal.

O primeiro modelo animal de aterosclerose foi proposto por Ignatowski em 1908 quando constatou que coelhos alimentados com proteína animal apresentavam depósitos lipídicos nas artérias (Ignatowski, 1908; Kritchevsky, 1995; Yanni, 2004; Konstantinov & Jankovic, 2013). Desde então, esse modelo experimental tem sido extensivamente usado em muitos aspectos da pesquisa em aterosclerose, tais como: estudos das lesões

vasculares, alterações dietéticas e hormonais, adesão e agregação plaquetárias, dentre outras (Jokinen et al., 1985).

Os coelhos são altamente suscetíveis à hipercolesterolemia induzida pela dieta enriquecida com colesterol, possivelmente devido à injesta aumentada de lípidos e concomitante baixa excreção biliar de esteróis (Xu et al., 1995; Kolodgie et al., 1996; Yanni, 2004). Os níveis plasmáticos de colesterol podem aumentar de 2 a 8 vezes o seu valor normal dentro de 20 dias de dieta enriquecida com 0,1 a 2% de colesterol (Bocan et al., 1993; Finking & Hanke, 1997; Yanni, 2004). Essa hipercolesterolemia provoca o acúmulo de colesterol nas paredes dos vasos e o desenvolvimento das lesões arteriais (Finking & Hanke, 1997; Yanni, 2004). Além disso, ocorre também depósito de colesterol no baço, glândulas supra-renais, medula óssea e, principalmente, no fígado. A esteatose hepática, muitas vezes severa, sugere que o colesterol por si só pode causar toxicidade para o fígado dos animais submetidos à dieta hipercolesterolêmica (Jokinen et al., 1985; Yanni, 2004).

De acordo com a planimetria macroscópica, o grupo tratado com LDE-carmustina apresentou marcante redução da placa aterosclerótica quando comparado ao grupo controle. Na planimetria microscópica, ocorreu o mesmo na camada íntima do arco aórtico. Esses resultados sugerem que mesmo com dieta hipercolesterolêmica constante e concentração plasmática elevada de colesterol, o tratamento com a formulação mostrou ser eficaz na redução das lesões ateroscleróticas na aorta de coelhos. Outros estudos similares utilizaram o mesmo modelo experimental, com suplementação hipercolesterolêmica a 1%, durante o mesmo período, porém, tratados com outros antiproliferativos associados à nanoemulsão lipídica. O tratamento com LDE-paclitaxel reduziu os ateromas em 60% (Maranhão et al., 2008), a preparação LDE-etoposide

reduziu as lesões ateroscleróticas em 85% (Tavares et al., 2011) e a associação LDE-metotrexato reduziu as placas ateromatosas em 75% (Bulgarelli et al., 2012) após o tratamento de 4 semanas, em comparação com os animais-controle, com aterosclerose mas tratados apenas com solução salina. Conforme esperado, pela documentação acumulada nos modelos animais e pacientes oncológicos, a toxicidade foi negligível.

Na análise da quantidade de macrófagos presentes na camada íntima, foi observado que houve uma redução de 77% no número dessas células no arco aórtico dos animais tratados com a associação LDE-carmustina. Esses resultados são bastante favoráveis, pois estudos comprovam que o processo de aterogênese inicia-se com o recrutamento de leucócitos, onde estes interagem com as células endoteliais através das moléculas de adesão pelo acúmulo lipídico na camada íntima. Essa interação atrai monócitos da corrente sanguínea para o local onde se transformam em macrófagos, estes por sua vez se transformam em “foam cells”, células espumosas, pelo acúmulo de lípidos no seu citoplasma (Braum et al., 1999; Takahashi et al., 2002). A menor presença de macrófagos nas áreas de lesão aterosclerótica nos animais tratados com LDE-carmustina, pode sugerir uma resposta ao efeito antiproliferativo do fármaco, pois os macrófagos também proliferam no interior da placa (Takahashi et al., 2002; Geng & Libby, 2002).

Com o persistente acúmulo das células espumosas, decorrente da hipercolesterolemia, ocorre a formação das lesões ateroscleróticas iniciais, chamadas de estrias gordurosas. Essas lesões são constituídas principalmente de células inflamatórias como macrófagos e linfócitos T (Ross, 1999; Li & Glass, 2002; Hansson, 2005; Döring & Zerneck, 2012). Os linfócitos T uma vez ativados, liberam mediadores inflamatórios e substâncias trombogênicas. Essas substâncias contribuem para o

desenvolvimento das placas e podem promover a desestabilização das mesmas, causando doença arterial coronária e até infarto do miocárdio (de Boer et al., 2003; Hansson, 2005). Os linfócitos T expressam receptores de superfície associado à uma proteína chamada CD3. Anticorpos anti-CD3 marcam a presença total dessas células no local da inflamação (Abbas et al., 1995). Os linfócitos T podem ser suprimidos por uma subpopulação de linfócitos T regulatórios (Treg) (Lü et al., 2013). Esses linfócitos suprimem a proliferação das células T ativadas e mantêm a homeostase imunológica por modular a duração e a magnitude da resposta inflamatória (Viridis et al., 2014). O gene responsável pelo desenvolvimento dos linfócitos T regulatórios é denominado “Forkhead box protein P3” (FoxP3) e também um marcador dessas células (Kasahara e al., 2014). Por ter a função de regular a inflamação local, os linfócitos T regulatórios parecem atenuar o processo da aterosclerose. Pois a deleção dessas células acelera o desenvolvimento da mesma (Dinh et al., 2012). Porém, estudos relatam que sua quantidade varia entre 1% a 5% de todos os linfócitos T nas placas de ateroma em comparação a outros tecidos cronicamente inflamados, sugerindo que a proteção local contra a progressão das lesões está prejudicada por aumentar a inflamação arterial (Nilsson et al., 2009; Wigren et al., 2012; Tse et al., 2013).

No presente estudo, a porcentagem total de linfócitos T CD3 foi 23% menor no grupo tratado, porém não significativo, e houve diminuição de 75% na subpopulação de linfócitos T regulatórios (FoxP3) no mesmo grupo quando comparado ao grupo controle. A menor presença dessas células nas lesões ateroscleróticas nos animais tratados com LDE-carmustina, pode ser atribuído ao efeito antiproliferativo do fármaco.

O tratamento com LDE-carmustina também mostrou efeito sobre a quantidade de células de músculo liso e MMP9 na camada íntima, com redução de 64% e 85%,

respectivamente. Durante a aterogênese, as células de músculo liso migram da túnica média para a camada íntima em resposta à lesão vascular (Gerthoffer, 2007). O avanço das estrias gordurosas para lesões mais complexas requer, além da infiltração das células inflamatórias, a participação das células musculares lisas (Geng & Libby, 2002), as quais têm como principal função a produção da matriz extracelular (MEC) que se acumula com a progressão das lesões (Doran et al., 2008). A MEC é um espaço preenchido por um complexo de componentes fibrosos e protéicos que circundam as células, fornecendo substrato para aderência, migração e proliferação celular. Atua como um reservatório de fatores de crescimento, proteínas de ligação celular e enzimas proteolíticas como as metaloproteinases (MMPs) (Kumar et al., 2005; Pereira et al., 2005). A degradação e o remodelamento da MEC são eventos essenciais que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário, proliferação, migração, reparo dos tecidos e em processos patológicos. Diversas proteinases podem participar do “turnover” da MEC, mas as MMPs são as principais enzimas proteolíticas que atuam sobre esse substrato (George & Dwivedi, 2004; Pereira et al., 2005; Busti et al., 2010). A MMP9 é uma das MMPs altamente expressa em lesões ateroscleróticas e devido ao seu importante papel na degradação da MEC, compromete a estabilidade da placa e a integridade da membrana basal do endotélio. Isso predispõe à ruptura da placa aterosclerótica, o que pode levar a eventos cardiovasculares importantes como infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (Blankenberg et al., 2003; Newby, 2008; Schäfers et al., 2010; Ketelhuth & Bäck, 2011; da Motta et al., 2013). Portanto, menor quantidade de células de músculo liso e da expressão de MMP9 na cama íntima, representa redução das placas ateroscleróticas, maior estabilidade das mesmas e diminuição da severidade de doenças cardiovasculares relacionadas à aterosclerose.

Houve também menor expressão protéica de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , no grupo de animais tratados com LDE-carmustina, com decréscimo de 89% e 83%, respectivamente.

Atualmente, diversas citocinas envolvidas no processo aterosclerótico têm sido estudadas, especialmente aquelas associadas à infiltração de monócitos e macrófagos (Ohta et al., 2005) e possuem como principal função mediar a interação entre os sistemas imunológico e inflamatório, dentre elas estão a IL-1 $\beta$  e a TNF- $\alpha$  (Burger & Dayer, 2002).

A IL-1 $\beta$  é uma potente interleucina pró-inflamatória da família da IL-1. É produzida, principalmente por monócitos, macrófagos e células dendríticas e está entre os mais importantes mediadores de indução da resposta inflamatória (Ferrero-Miliani et al., 2007). Ela pode ser secretada pelas células endoteliais que revestem a parede arterial e podem induzir a produção de outras citocinas, aumentar a expressão de moléculas de adesão, estimular a proliferação de células musculares lisas, aumentar a permeabilidade vascular (Clarke et al., 2010; van Diepen et al., 2013) e ativar proteases como as MMPs, as responsáveis pelo enfraquecimento da placa fibrosa de ateroma. Sendo assim, a IL-1 $\beta$  desempenha um papel importante na iniciação, progressão e ruptura das placas ateroscleróticas (Bhaskar et al., 2011).

A TNF- $\alpha$  também é uma citocina pró-inflamatória pertencente à família do fator de necrose tumoral (McKeller et al., 2009) e é secretada por macrófagos, linfócitos e monócitos (da Motta et al., 2013). É a principal citocina moduladora da cascata inflamatória, além de regular a ativação de leucócitos e a liberação de outras citocinas e quimiocinas (McKeller et al., 2009). A TNF- $\alpha$  está associada à progressão da aterosclerose por promover o aumento da expressão de moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1) e quimiocinas (MCP-1), as quais medeiam o recrutamento das células

inflamatórias para o endotélio vascular, facilitando o desenvolvimento das placas de ateroma (Ohta et al., 2005).

Assim, a menor expressão das citocinas pró-inflamatórias encontrada nesse trabalho sugere menor inflamação local, o que pode ser decorrente da menor quantidade de células secretoras das mesmas, dificultando o avanço das lesões ateroscleróticas.

No presente estudo, o tratamento com a associação LDE-carmustina mostrou ser eficaz também na diminuição da expressão protéica dos receptores de lipoproteínas, como LDL-r, LRP-1 e SR-B1, em cerca de 88%, 52% e 72%, respectivamente.

As partículas de LDL são removidas da circulação pela captação de receptores de membrana especializados que internalizam essas partículas para o interior das células, como LDL-r (Pires et al., 2012) e LRP-1 (Boucher & Philippe, 2011).

O receptor de LDL é uma glicoproteína expressa na maioria das células, especialmente no fígado (Wilson et al., 1998). Esses receptores reconhecem a apoproteína B (apoB-100), presente na LDL, e a apoproteína E (apoE), presente nos quilomícrons remanescentes, VLDL, IDL e HDL (Wilson et al., 1998; Jeon & Blacklow, 2005; Pires et al., 2012). Os receptores de LDL são agrupados em depressões na membrana celular e revestidas por clatrina. Após a ligação aos receptores, as partículas de LDL são internalizadas e degradadas em lisossomos. Os componentes protéicos da LDL são hidrolizados a aminoácidos e os ésteres de colesterol a colesterol livre que, é usado para síntese de membrana ou como precursor na síntese de hormônios esteróides. Em seguidas, esses receptores são reciclados e podem retornar à superfície da célula para iniciar outro ciclo de endocitose. (Brown & Goldstein, 1986; Vitols et al., 1990; Jeon & Blacklow, 2005; Beglova & Blacklow, 2005; Pires et al., 2012; Schekman, 2013). As células neoplásicas, as quais proliferam-se rapidamente, precisam de grande quantidade

de colesterol para a síntese de novas membranas. Com isso, essas células requerem maior captação de LDL, motivo pelo qual ocorre maior expressão de receptores dessas partículas do que em células normais (Lundberg, 1987). Portanto, a menor taxa de proliferação celular no grupo tratado com LDE-carmustina leva a uma menor necessidade de colesterol para a síntese de novas membranas, o que explica a diminuição da expressão dos receptores de LDL.

O LRP-1 é um receptor endocítico pertencente à família do receptor de LDL (Emonard et al., 2014) e é abundantemente expresso em tecidos do fígado, cérebro, placenta (Pires et al., 2012; Emonard et al., 2014) e parede vascular associado principalmente a macrófagos e células de músculo liso (Llorent-Cortés & Badimon, 2005). O LRP-1 reconhece a apoproteína E (apoE) e interage com no mínimo 40 diferentes ligantes desde lipoproteínas, glicoproteínas da matriz extracelular, proteases, vírus, citocinas e fatores de crescimento, sendo um receptor importante envolvido em processos fisiológicos e patológicos (Boucher & Herz, 2011; Emonard et al., 2014). Estudos mostram que a deleção do gene para o receptor LRP-1 em camundongos alimentados com dieta rica em colesterol, pode levar a formação de aneurismas e aterosclerose (Lillis et al., 2008; Boucher & Herz, 2011; Strickland et al., 2014). Além disso, o LRP-1 está envolvido na captação de agregados de LDL (agLDL), que são partículas de LDL modificadas associadas a complexos imunológicos e a proteoglicanos da matriz extracelular. O LRP-1 medeia a ligação e a internalização das agLDL nas células musculares lisas, levando ao acúmulo de lípidos e formação de células espumosas (Hiltunen et al., 1998; Llorente-Cortés et al., 2000). Estudos com coelhos submetidos à dieta hipercolesterolêmica demonstraram aumento da expressão de LRP na aorta dos animais (Watanabe et al., 1994; Llorente-Cortés et al., 2011) e a intervenção

de hipolipemiante demonstrou diminuição da expressão dos mesmos em coelhos hipercolesterolêmicos (Llorente-Cortés et al., 2011). Isso sugere que a diminuição da expressão dos receptores LRP no presente trabalho pode ser decorrente do efeito antiproliferativo da carmustina.

O SR-B1 é outro receptor envolvido na captação das lipoproteínas. É uma glicoproteína expressa em macrófagos, células de músculo liso, astrócitos (Silver & Tall, 2001) e, principalmente, em tecidos esteroideogênicos e fígado (Trigatti et al., 2000; Silver & Tall, 2001). O SR-B1 é um receptor endocítico que reconhece apolipoproteínas que possuem apo B e apoproteína A-I (apo A-I) presente nas partículas de HDL. Ele é responsável por mediar a captação da HDL, a qual está envolvida no transporte reverso do colesterol e onde ocorre a entrega de colesterol dos tecidos extrahepáticos para o fígado (de Beer et al., 2001; Connelly et al., 2003; Hoekstra et al., 2010; Saddar et al., 2013). Além disso, o SR-B1 também é capaz de ligar-se a lipoproteínas modificadas, como a LDL oxidada. Essa captação é mediada pelos macrófagos, que expressam tais receptores e se ligam preferencialmente a essas partículas através da apo B (Gui et al., 2012). Quando essa captação excede o efluxo ou o efluxo é interrompido, ocorre o acúmulo lipídico no interior dos macrófagos, levando à formação das células espumosas, principal motivo que leva ao desencadeamento da aterosclerose (Trigatti et al., 2003; Legein et al., 2013; Yu et al., 2013). Sendo assim, é lícito sugerir que a menor expressão desses receptores nas lesões ateroscleróticas pode ser decorrente da menor quantidade de macrófagos encontrados nas mesmas lesões, o que também leva à diminuição do processo inflamatório local.

De acordo com os resultados encontrados nos estudos *in vivo*, o tratamento com LDE-carmustina parece minimizar a resposta inflamatória na doença aterosclerótica,

suprimindo a expressão de macrófagos, linfócitos, células de músculo liso, receptores envolvidos na captação de lipoproteínas e citocinas pró-inflamatórias. Com essa análise, o tratamento com LDE-carmustina parece ser viável no tratamento da aterosclerose, porém são necessários maiores estudos para melhor compreender os mecanismos de ação no modelo experimental da aterosclerose.

## 7. CONCLUSÕES

. O tratamento com a associação da carmustina veiculada à uma nanoemulsão rica em colesterol, reduziu marcadamente as lesões ateroscleróticas em coelhos submetidos a uma dieta hipercolesterolêmica, em comparação a coelhos que não receberam o tratamento;

. Não foram observadas manifestações de toxicidade hematológica, hepática ou renal nos coelhos tratados com a associação LDE-carmustina;

. O tratamento com LDE-carmustina foi eficaz em reduzir o número de macrófagos, linfócitos, células de músculo liso, expressão protéica de receptores de lipoproteínas, citocinas pró-inflamatórias e MMP9 nas lesões ateroscleróticas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Revinter, 1995.

Ades A, Carvalho JP, Graziani SR, Amâncio RF, Souen JS, Pinotti JA, Maranhão RC. Uptake of a cholesterol-rich emulsion by neoplastic ovarian tissues. *Gynecol Oncol*. 2001;82(1):84-7.

Andersson J, Libby P, Hansson GK. Adaptive immunity and atherosclerosis. *Clin Immunol*. 2010;134:33-46.

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(1):178-82.

Badimon, Lina; Storey, Robert F.; Vilahur, Gemma. Update on lipids, inflammation and atherosclerosis. *Thromb Haemost.*, 105 (Suppl 1): S34-S42, 2011.

Beglova N, Blacklow S. The LDL receptor: how acid pulls the trigger. *Trends Biochem Sci*. 2005;30(6):309-17.

Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res.* 2014;114:1852-1866.

Bhaskar V, Yin J, Mirza AM, Phan D, Vanegas S, Issafras H, Michelson K, Hunter JJ, Kantak SS. Monoclonal antibodies targeting IL-1 beta reduce biomarkers of atherosclerosis *in vitro* and inhibit atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis.* 2011;216:313-20.

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

Bocan TMA, Mueller SB, Mazur MJ, Uhlendorf PD, Brown EQ, Kieft KA. The relationship between the degree of dietary-induced hypercholesterolemia in the rabbit and atherosclerotic lesion formation. *Atherosclerosis.* 1993;102:9-22.

Boucher P, Herz J. Signaling through LRP1: protection from atherosclerosis and beyond. *Biochem Pharmacol.* 2011;81(1):1-5.

Braum M, Pietsch P, Schrör K, Baumann G, Felix SB. Cellular adhesion molecules on vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc. Res.* 1999;41:395-401.

Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science.* 1986;232(4746):34-47.

Brown MS, Goldstein JL. Atherosclerosis. Scavenging for receptors. *Nature*. 1990;343(6258):508-509.

Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. *Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica*. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil; 2006.

Bulgarelli A, Leite Jr AC, Dias AAM, Maranhão RC. Anti-Atherogenic effects of methotrexate carried by a lipid nanoemulsion that binds to ldl receptors in cholesterol-fed rabbits. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2013;27:531–539.

Bulgarelli, Adriana; Martins Dias, Adriana A.; Caramelli, Bruno; Maranhão, Raul C. Treatment with methotrexate inhibits atherogenesis in cholesterol-fed rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2012;59(4):308–14.

Burger D, Dayer JM. IL-1 and TNF- $\alpha$  production in contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes. *Ann N.Y. Acad Sci*. 2002;966:464-73.

Busti C, Falcinelli E, Momi S, Gresele P. Matrix metalloproteinases and peripheral arterial disease. *Intern Emerg Med*. 2010;5:13-25.

Chi Z, Melendez AJ. Role of cell adhesion molecules and immune-cell migration in the initiation, onset and development of atherosclerosis. *Cell Adh Migr*. 2007;1(4):171-5.

Choy PC, Siow YL, Mymin D, Karmin O. Lipids and atherosclerosis. *Biochem Cell Biol.* 2004;82:212-224.

Clarke MCH, Talib S, Figg NL, Bennett MR. Vascular smooth muscle cell apoptosis induces interleukin-1 directed inflammation: effects of hyperlipidemia-mediated inhibition of phagocytosis. *Circ Res.* 2010;106:363-72.

Connelly MA, Kellner-Weibel G, Rothblat GH, Williams DL. SR-BI-directed HDL-cholesteryl ester hydrolysis. *J Lipid Re.* 2003;44:331-41.

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

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

de Almeida VL, Leitão A, Reina L. del C.B.; Montanari CA, Donnici CL. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos qua interagem com o DNA: uma introdução. *Quim Nova.* 2005;28:118-129.

de Beer MC, Durbin DM, Cai L, Jonas A, de Beer FC, van der Westhuyzen DR. Apolipoprotein A-I conformation markedly influences HDL interaction with scavenger receptor BI. *J Lipid Re.* 2001;42:309-313.

de Boer OJ, Becker AE, van der Wal AC. T lymphocytes in atherosclerosis: functional aspects and antigenic repertoire. *Cardiovasc Res*. 2003;60(1):78-86.

de Boer OJ, van der Meer JJ, Teeling P, van der Loos CM, van der Wal AC. Low numbers of FOXP3 positive regulatory T cells are present in all developmental stages of human atherosclerotic lesions. *PlosOne*. 2007;2(8):e779.

Dinh TN, Kyaw TS, Kanellakis P, To K, Tipping P, Toh BH, Bodik A, Agrotis A. Cytokine therapy with interleukin-2/anti-interleukin-2 monoclonal antibody complexes expands CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells and attenuates development and progression of atherosclerosis. *Circulation*. 2012;126:1256-66.

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

Doran AC, Meller N, McNamara CA. The role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(5):812-19.

Döring Y, Zerneck A. Plasmacytoid dendritic cells in atherosclerosis. *Front Physiol*. 2012;3:1-10.

Drablos F, Feyzi E, Aas PA, Vaagbo CB, Kavli B, Bratlie MS, Peña-Díaz J, Otterlei M, Slupphaug G, Krokan HE. Alkylation damage in DNA and RNA—repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair*. 2004;3:1389–140.

Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med*. 2002;8(11):1249-1256.

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

Emonard H, Théret L, Bennisroune AH, Dedieu S. Regulation of LRP-1 expression: make the point. *Pathol Biol*. 2014;62(2):84-90.

Estol CJ. Atherosclerosis: the XXIst century epidemic: a meeting at the Vatican. *Stroke*. 2011;42:3338-39.

Faria BA, Silva SM, Abreu MTCL, Napimoga MH. Ação dos linfócitos T regulatórios em transplantes. *Rev bras hematol hemoter*. 2008;30(4):309-315.

Ferdinandi DM, Ferreira AA. Agentes alquilantes: reações adversas e complicações hematológicas. *AC & T Científica*. 2009;1(1):1-12.

Finking G, Hanke H. Nikolaj Nikolajewitsch Anitschkow (1885-1964) established the cholesterol-fed rabbit as a model for atherosclerosis research. *Atherosclerosis*. 1997;135:1-7.

Geng YJ, Libby P. Progression of atheroma: a struggle between death and procreation. *Arterioscler Thromb. Vasc Biol*. 2002;22:1370-1380.

George SJ, Dwivedi A. MMPs, cadherins, and cell proliferation. *Trends Cardiovasc Med.* 2004;14:100-5.

Gerthoffer WT. Mechanisms of vascular smooth muscle cell migration. *Circ Res.* 2007;100:607-21.

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

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

Gui T, Shimokado A, Sun Y, Akasaka T, Muragaki Y. Diverse roles of macrophages in atherosclerosis: from inflammatory biology to biomarker discovery. *Mediators of Inflamm.* 2012:1-14.

Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol.* 2011;12(3):204-12.

Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005;352(16):1685-95.

Hiltunen TP, Luoma JS, Nikkari T, Ylä-Herttuala S. Expression of LDL receptor, VLDL receptor, LDL receptor-related protein, and scavenger receptor in rabbit atherosclerotic lesions: marked induction of scavenger receptor and VLDL receptor expression during lesion development. *Circulation.* 1998;97:1079-86.

Hirata RDC, Hirata MH, Mesquita CH, Cesar TB, Maranhão RC. Effects of apolipoprotein B-100 on the metabolism of a lipid microemulsion model in rats. *Biochim. Biophys Acta*. 1999;1437:53-62.

Ho YK, Smith RG, Brown MS, Goldstein JL. Low-Density Lipoprotein (LDL) Receptor Activity in Human Acute Myelogenous Leukemia Cells. *Blood*. 1987;52(6):1099-114.

Hoekstra M, Van Berkel TJ, Van Eck M. Scavenger receptor BI: a multi-purpose player in cholesterol and steroid metabolism. *World J Gastroenterol*. 2010;16(47):5916-24.

Homma Y. Predictors of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*. 2004;11:265-270.

Hungria VT, Latrilha MC, Rodrigues DG, Bydlowski SP, Chiattoni CS, Maranhão RC. Metabolism of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) in patients with multiple myeloma and a preliminary clinical study of LDE as a drug vehicle for the treatment of the disease. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2004;53:51-60.

Ignatowski AI. Influence de la nourriture animale sur l'organisma des lapins. *Arch. Med. Exp. Anat. Pathol*. 1908;20:1-10.

Jeon H, Blacklow SC. Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. *Annu Rev Biochem*. 2005;74:535-62.

Jokinen MP, Clarkson TB, Prichard RW. Animal models in atherosclerosis research. *Exp. Mol. Pathol.* 1985;42(1):1-28.

Kang PT, Chen CL, Ren P, Guarini G, Chen YR. BCNU-induced gR2 DEFECT mediates S-glutathionylation of Complex I and respiratory uncoupling in myocardium. *Biochemical Pharmacology.* 2014;89:490–502.

Kasahara K, Sasaki N, Yamashita T, Kita T, Yodoi K, Sasaki Y, Takeda M, Hirata K. CD3 antibody and IL-2 complex combination therapy inhibits atherosclerosis by augmenting a regulatory immune response. *J Am Heart Assoc.* 2014;3:1-13.

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

Klingenberg R, Gerdes N, Badeau RM, Gistera A, Strodthoff D, Ketelhuth DFJ, Lundberg AM, Rudling M, Nilsson SK, Olivecrona G, Zoller S, Lohmann C, Lüscher TF, Jauhiainen M, Sparwasser T, Hansson GK. Depletion of FOXP3+ regulatory T cells promotes hypercholesterolemia and atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2013;123(3):1323-34.

Kolodgie FD, Katocs AS, Largis EE, Wrenn SM, Cornhill JF, Herderick EE, Lee SJ, Virmani R. Hypercholesterolemia in the rabbit induced by feeding graded amounts of low level cholesterol. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 1996;16:1454-64.

Konstantinov IE, Jankovic GM. Alexander I. Ignatowski: a pioneer in the study of atherosclerosis. *Tex Heart Inst J*. 2013;40(3):246-9.

Kritchevsky D. Dietary protein, cholesterol and atherosclerosis: a review of the early history. *J Nutr*. 1995;125(3 suppl):589S-593S.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N. *Robbins e Cotran Patologia – Bases patológicas das doenças*. 7a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

Laporte EMD, Sesso A, Maranhão RC, Pozzi D. Influence of a cholesterol-rich emulsion and BCNU on the apoptotic indices of myeloma cells induced in Balb/C mice. *Braz J Morphol Sci*. 2006;23(1):121-129.

Legein B, Temmerman L, Biessen EAL, Lutgens E. Inflammation and immune system interactions in atherosclerosis. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70:3847–3869.

Leikin JB, Paloucek JP. *Poisoning and toxicology handbook*. 4td. New York: Informa Healthcare; 2008.

Li AC, Glass CK. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nature*. 2002;8(11):1235-42.

Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Inflammation in Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2002;54:2129–38.

Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Inflammation in Atherosclerosis: From pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(23):2129–2138.

Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011;473:317-325,2011.

Lillis AP, Duyin LBV, Murphy-Ullrich JE, Strickland DK. The low density lipoprotein receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiol Rev*. 2008;88(3):887-918.

Llorente-Cortés V, Badimon L. LDL receptor-related protein and the vascular wall: implications for atherothrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:497-504.

Llorente-Cortés V, Casani L, Cal R, Llenas A, Juan-Babot O, Camino-López S, Sendra J, Badimon L. Cholesterol-lowering strategies reduce vascular LRP1 overexpression induced by hypercholesterolemia. *Eur J Clin Invest*. 2011;41(10): 1087–1097.

Llorente-Cortés V, Martínez-González J, Badimon L. LDL receptor-related protein mediates uptake of aggregated LDL in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:1572-1579.

Lü CX, Xu RD, Cao M, Wang G, Yan FQ, Shang SS, Wu XF, Ruan L, Quan XQ, Zhang CT. FOXP3 demethylation as a means of identifying quantitative defects in regulatory T cells in acute coronary syndrome. *Atherosclerosis*. 2013;229:263-70.

Lundberg B. Preparation of drug-low density lipoprotein complexes for delivery of antitumoral drugs via the low density lipoprotein pathway. *Cancer Res.* 1987;47:4105-08.

Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science.* 1999;240: 622-630.

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

Maranhão RC, Garicochea B, Silva EL, Dorlhiac-Llacer P, Cadena SMS, Coelho IJC, Meneghetti JC, Pileggi FJC, Chamone AF. Plasma kinetics and biodistribution of a lipid emulsion resembling low-density lipoprotein in patients with acute leukemia. *Cancer Res.* 1994;54:4660-4666.

Maranhão RC, Garicochea B, Silva EL, Llacer P, Pileggi F, Chamone DAF. Increased plasma removal of microemulsions resembling the lipid phase of low-density lipoproteins in patients with acute myeloid leukemia: a possible new strategy for the treatment of disease. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 1992;25:1003-1007.

Maranhão RC, Graziani SR, Yamaguchi N, Melo RF, Latrilha MC, Rodrigues DG, Couto RD, Schreier S, Buzaid AC. Association of carmustine with a lipid emulsion: in vitro, in vivo and preliminary studies in cancer patients. *Cancer Chem. Pharmacol.* 2002;49(6):487-98.

Maranhão RC, Roland IA, Toffoletto O, Ramires JA, Gonçalves RP, Mesquita CH, Pileggi F. Plasma kinetic behavior in hyperlipidemic subjects of a lipidic microemulsion that binds to low density lipoprotein receptors. *Lipids*. 1997;32(6):627–33.

Maranhão RC, Tavares ER, Padoveze AF, Valduga CJ, Oliveira TV, Rodrigues DG. Paclitaxel associated with a lipid nanoemulsion (LDE) promotes atherosclerosis regression in the rabbit. *Cardiovasc Res*. 2008;27:974.

Maze R, Carney JP, Kelley MR, Glassner BJ, Williams DA, Samson L. Increasing DNA repair methyltransferase levels via bone marrow stem cell transduction rescues mice from the toxic effects of 1,3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea, a chemotherapeutic alkylating agent. *Proc Natl Acad Sci*. 1996;93:206-210.

McKeller GE, McCarey DW, Sattar N, McInnes L. Role for TNF in atherosclerosis? Lessons from autoimmune disease. *Nat Rev Cardiol*. 2009;6:410-17.

Moura JA, Valduga CJ, Tavares ER, Kretzer IF, Maria DA, Maranhão RC. Novel formulation of a methotrexate derivative with a lipid nanoemulsion. *Int J Nanomed*. 2011;6:2285–95.

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

Nilsson J, Wigren M, Shah PK. Regulatory T cells and the control of modified lipoprotein autoimmunity-driven atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med.* 2009;19(8):272-6.

Ohta H, Wada H, Niwa T, Kirii H, Iwamoto N, Fujii H, Saito K, Sekikawa K, Seishima M. Disruption of tumor necrosis factor- $\alpha$  gene diminishes the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Atherosclerosis.* 2005;180:11-17.

Packard RRS, Libby P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem.* 2008;54(1):24-38.

Pagidipati NJ, Gaziano TA. Estimating deaths from cardiovascular disease: a review of global methodologies of mortality measurement. *Circulation.* 2013;127:749-756.

Pastrana JL, Sha X, Virtue A, Mai J, Cueto R, Lee IA, Wang H, Yang X. Regulatory T Cells and Atherosclerosis. *J Clin Exp Cardiol.* 2012;2:2-11, 2012.

Pereira ALA, Veras SSL, Silveira ÉJD, Seabra FRG, Pinto LP, Souza LB, Freitas RA. O papel das proteínas da matriz extracelular e das metaloproteinases em carcinomas de cabeça e pescoço: uma atualização bibliográfica. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2005;71(1):81-6.

Pires LA, Hegg R, Freitas FR, Tavares ER, Almeida CP, Baracat EC, Maranhão RC. Effect of neoadjuvant chemotherapy on low-density lipoprotein (LDL) receptors and LDL

receptor-related protein 1 (LRP-1) receptor in locally advanced breast cancer. *Braz J Med Biol Res.* 2012;45(6):557-64.

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

Ponnuswamy P, Van V, Emily A, Mallat Z, Tedgui A. Humoral and cellular immune responses in atherosclerosis: Spotlight on B- and T-cells. *Vascul Pharmacol.* 2012;56(5-6):193-203.

Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340(2):115-126.

Ruiz J, Kouivaskaia D, Migliorini M, Robinson S, Saenko EL, Gorlatova N, Li D, Lawrence D, Hyman BT, Weisgraber KH, Strickland DK. The apoE isoform binding properties of the VLDL receptor reveal marked differences from LRP and the LDL receptor. *J Lipid Res.* 2005;46(8):1721–31.

Saddar S, Carriere V, Lee WR, Tanigaki K, Yuhanna IS, Parathath S, Morel E, Warriar M, Sawyer JW, Gerard RD, Temel RE, Brown JM, Connelly M, Mineo C, Shaul PW. Scavenger receptor class B type I is a plasma membrane cholesterol sensor. *Circ Re.* 2013;112:140-51.

Schäfers M, Schober O, Hermann S. Matrix-metalloproteinases as imaging targets for inflammatory activity in atherosclerotic plaques. *J Nucl Med.* 2010;51:663-66.

Schekman R. Discovery of the cellular and molecular basis of cholesterol control. *PNAS.* 2013;110(37):14833-36.

Seong H, An KT, Khang G, Choi SU, Lee CO, Lee HB. BCNU-loaded poly (D, L-lactide-co-glycolide) wafer and antitumor activity against KF-498 human CNS tumor cells in vitro. *International Journal of Pharmaceutics*. 2003;251:1-12.

Silver DL, Tall AR. The cellular biology of scavenger receptor class B type I. *Curr Opin Lipidol*. 2001;12(5):497-504.

Stankiewicz-Kranc A, Bielawska A, Bielawski K, Skrzydlewska E. Proline analogue of nitrosourea as a new cytotoxic prodrug. *Arch Pharm Chem Life Sci*. 2009;342:632-639.

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

Takahashi K, Takeya M, Sakashita N. Multifunctional roles of macrophages in the development and progression of atherosclerosis in humans and experimental animals. *Med Electron Microsc*. 2002;35:179-203.

Tavares ER, Freitas FR, Diament J, Maranhão RC. Reduction of atherosclerotic lesions in rabbits treated with etoposide associated with cholesterol-rich nanoemulsions. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:2297-304.

Teixeira RS, Curi R, Maranhão RC. Effects on Walker 256 tumour of carmustine associated with a cholesterol-rich microemulsion (LDE). *Pharmacy and Pharmacology*. 2004;56:909-914.

Trigatti B, Krieger M, Rigotti A. Influence of the HDL receptor SR-BI on lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(10):1732-8.

Trigatti B, Rigotti A, Krieger M. The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in cholesterol metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 2000;11:123-131.

Tse K, Tse H, Sidney J, Sette A, Ley K. T cells in atherosclerosis. *Int Immunol.* 2013;25(11):615-22.

Valduga CJ, Fernandes DC, Lo Prete AC, Azevedo CHM, Rodrigues DG, Maranhão RC. Use of a cholesterol-rich microemulsion that binds to low-density lipoprotein receptors as vehicle for etoposide. *J Pharm Pharmacol.* 2003;55:1615–22.

van Diepen JA, Berbée JFP, Havekes LM, Rensen PCN. Interactions between inflammation and lipid metabolism: relevance for efficacy of anti-inflammatory drugs in the treatment of atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2013;228(2):306-15.

Virdis A, Dell'Agnello U, Taddei S. Impact of inflammation on vascular disease in hypertension. *Maturitas.* 2014;78(3):179-83.

Vitols S, Soderberg-Reid K, Masquelier M, Sjöström B, Peterson C. Low density lipoprotein for delivery of a water-insoluble alkylating agent to malignant cells. In vitro and in vivo studies of a drug-lipoprotein complex. *Br J Cancer.* 1990;62:724-729.

Watanabe Y, Inaba T, Shimano H, Gotoda T, Yamamoto K, Mokuno H, Sato H, Yazaki Y, Yamada N. Induction of LDL receptor-related protein during the differentiation of monocyte-macrophages. Possible involvement in the atherosclerotic process. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1994;14:1000-6.

Wigren M, Nilsson J, Kolbus D. Lymphocytes in atherosclerosis. *Clin Chim Acta.* 2012;413:1562-68.

Willerson JT, Ridker PM. Inflammation as a cardiovascular risk factor. *Circulation.* 2004;109(21 Suppl 1):II2-10.

Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR. *Williams textbook of endocrinology.* 9<sup>th</sup> Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1998.

Woollard KJ, Geissmann F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat Rev Cardiol.* 2010;7(2):77-86.

Xu G, Salen G, Shefer S, Ness GC, Nguyen LB, Parker TS, Ghen TS, Zhao Z, Donnelly TM, Tint SG. Unexpected inhibition of cholesterol 7  $\alpha$ -hydroxylase by cholesterol in New Zealand white and Watanabe Heritable hyperlipidemic rabbits. *J Clin Invest.* 1995;95:149-504.

Yani AE. The laboratory rabbit: an animal model of atherosclerosis research. *Laboratory Animals.* 2004;38:246-56.

Ylä-Herttua S, Luoma J, Kallionppaa H, Laukkanen M, Lehtolainen P, Viita H. Pathogenesis of atherosclerosis. *Maturitas*. 1996;23:47-49.

Yu XH, Fu YC, Zhang DW, Yin K, Tang CK. Foam cells in atherosclerosis. *Clin Chim Acta*. 2013;424:245-52.

Zhu Y, Bujo H, Yamazaki H, Hirayama S, Kanaki T, Takahashi K, Shibasaki M, Schneider WJ, Saito Y. Enhanced expression of the LDL receptor family member LR11 increases migration of smooth muscle cells in vitro. *Circulation*. 2002;105 (15):1830-1836.

Zipes DP, Libby P, Bonow RO, Braunwald E. *Braunwald's heart disease: a textbook of cardiovascular disease*. 7ed. Philadelphia: Saunders, 2005.