

BRUNA MIRANDA DE OLIVEIRA SILVA

**Tratamento da aterosclerose induzida em coelhos com quimioterápico veiculado
em nanopartículas lipídicas**

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

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

**São Paulo
2022**

BRUNA MIRANDA DE OLIVEIRA SILVA

**Tratamento da aterosclerose induzida em coelhos com quimioterápico veiculado
em nanopartículas lipídicas**

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

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

**São Paulo
2022**

Ficha Catalográfica

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Bruna Miranda de Oliveira
Tratamento da aterosclerose induzida em coelhos
com quimioterápico veiculado em nanopartículas
lipídicas / Bruna Miranda de Oliveira Silva. -- São
Paulo, 2022.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Cardiologia.
Orientador: Raul Cavalcante Maranhão.

Descritores: 1. Aterosclerose 2. Inflamação
3. Nanopartículas lipídicas 4. Antineoplásicos
5. Toxicidade 6. Paclitaxel

USP/FM/DBD-264/22

Dedicatória

A minha família, que me incentivou e apoiou nesta longa e intensa jornada.

Agradecimentos

Agradeço ao Professor Raul Cavalcante Maranhão, que me abriu as portas de seu laboratório, me orientou e guiou desde minha entrada na Iniciação Científica até o encerramento deste trabalho. São quase 10 anos de ensinamentos, broncas e também muita admiração.

À Elaine Rufo Tavares pela ajuda, paciência, por estar sempre disposta a ensinar e a postos para qualquer situação, pela amizade, pelas risadas, por compreender as adversidades e tornar o trabalho mais leve e produtivo.

À Priscila Oliveira Carvalho pela paciência, pelas longas horas dedicadas à estatística e trabalho de bancada, por ajudar no desenvolvimento deste trabalho, com longas e pertinentes discussões de metodologia e resultados, pela amizade, pelos barzinhos após o expediente e por estar sempre ali presente.

Agradeço à Fatima Rodrigues Freitas, pelo apoio, incentivo e amizade, sempre perspicaz em apontar o caminho e trilhá-lo comigo, sem sua vigilância constante o Laboratório de Metabolismo de Lípidos simplesmente não funciona.

Aos amigos extraordinários que ganhei quando entrei no InCor: Aleksandra Tieme, Camila Hahn, Débora Deus, Andréia Prado, Josefa da Hora, Wanderlei, que tornaram o Laboratório minha segunda casa e se comportam como uma grande família, onde sei que posso ter refúgio e abrigo, além da contribuição para este trabalho, direta ou indiretamente.

Às amigas Sheila Cristina e Ana Elisa Martineli, que vieram antes de mim, me acolheram e se fizeram indispensáveis, ajudaram, aguentaram o meu choro e meu

riso, me permitiram nunca desistir. Minhas grandes confidentes e fontes de inspiração,
mulheres nas quais me espelho.

À Juliana, Neusa e Sidnei da pós-graduação, que estão sempre a postos para ajudar,
tirar dúvidas e orientar nos processos burocráticos.

Aos meus avós, Vitalina e Manoel, que me criaram e me deram todo amor, carinho e
cuidado e fizeram da nossa família o alicerce que me permitiu chegar até aqui. A
vocês não apenas agradeço, mas dedico todas as minhas conquistas.

Aos meus pais, Ramone, Nilton, Wagner e Daniela, que mesmo nas distâncias me
apoiaram, incentivaram, aconselharam e acompanharam cada passo dessa conquista.

Aos meus irmãos, João Pedro, Lucas, Felipe e Laís, e aos meus tios, Weber e Rose,
que fizeram dos momentos de descontração belas lembranças.

Ao CNPq e à FAPESP, cujo aporte financeiro tornou este projeto possível.

“Os dias de hoje são a época da mediocridade e da insensibilidade, da paixão pela ignorância, pela preguiça, pela incapacidade de agir e pela necessidade do tudo pronto. Ninguém faz uma reflexão; seria raro alguém capaz de suportar uma ideia.”

(Fiódor Dostoiévski)

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. Feddy, 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 *Listo f Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMARIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas

Lista de siglas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	7
3. MÉTODOS	8
3.1. Protocolo experimental em coelhos	8
3.1.1. Animais utilizados no estudo	8
3.1.2. Preparo da dieta rica em colesterol	9
3.1.3. Animais e protocolo das lesões ateroscleróticas	9
3.2. Síntese de PTX e preparo da LDE-PTX	10
3.3. Determinação do perfil lipídico dos coelhos	12
3.4. Avaliação da toxicidade do tratamento	12
3.5. Análise morfométrica das aortas	13
3.6. Histologia e imunohistoquímica	13
3.7. Análise da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)	15
3.8. Análise estatística	19
4. RESULTADOS	20

4.1. Perfil ponderal	20
4.2. Consumo de ração	21
4.3. Perfil hematológico e toxicológico	22
4.4. Perfil lipídico	24
4.5. Macroscopia das lesões ateroscleróticas	26
4.6. Imunohistoquímica	29
4.7. Expressão gênica	37
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÃO	47
7. REFERÊNCIAS	48

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 –** Peso corporal dos animais
- Figura 2 –** Consumo de ração
- Figura 3 –** Imagens representativas das áreas de placas marcadas com corante Sudan e cortes histológicos corados com Hematoxilina-eosina (aumento 8x) dos grupos estudados.
- Figura 4 –** Porcentagem de área de placa e área da íntima (%) nos grupos LDE e LDE-PTX.
- Figura 5 –** Cortes histológicos do arco aórtico (A e B), coração (C e D) e fígado (E e F), respectivamente, dos animais, imunomarcados para macrófagos nos grupos LDE e LDE-PTX.
- Figura 6 –** Porcentagem de imunomarcação RAM nas aortas, corações e fígados
- Figura 7 –** Cortes histológicos do arco aórtico (A e B), coração (C e D) e fígado (E e F), respectivamente, dos animais, imunomarcados para LDLR nos grupos LDE e LDE-PTX.
- Figura 8 –** Porcentagem de imunomarcação LDLR nas aortas, corações e fígados
- Figura 9 –** Cortes histológicos do arco aórtico (A e B), coração (C e D) e fígado (E e F), respectivamente, dos animais, corados Tricômio de Masson nos grupos LDE e LDE-PTX.

- Figura 10 –** Porcentagem de coloração para colágeno nas aortas, corações e fígados
- Figura 11 –** Cortes histológicos do arco aórtico (A e B), coração (C e D) e fígado (E e F), respectivamente, dos animais, imunomarcados para TNF- α nos grupos LDE e LDE-PTX.
- Figura 12 –** Porcentagem de imunomarcação TNF-A nas aortas, corações e fígados
- Figura 13 –** Expressão gênica bruta de LDLR, LRP-1 e CD36 nos corações
- Figura 14 –** Expressão gênica bruta de TNF, IL-1BETA, IL-10 E IL-18 nos corações
- Figura 15 –** Expressão gênica bruta de MCP1, VCAM, MMP9 e MMP12 nos corações
- Figura 16 –** Expressão gênica bruta de LDLR, LRP-1 e CD36 nas aortas
- Figura 17 –** Expressão gênica bruta de TNF, IL-1BETA, IL-10 E IL-18 nas aortas
- Figura 18 –** Expressão gênica bruta de MCP1, VCAM, MMP9 e MMP12 nas aortas

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Descrição dos ensaios TaqMan® utilizados para análise da expressão do RNAm por qRT-PCR.
- Tabela 2** - Perfis hematológico e toxicológico nos tempos basal, pré-tratamento e pós-tratamento dos grupos LDE e LDE-PTX.
- Tabela 3** - Perfil lipídico nos tempos basal, pré-tratamento e pós-tratamento dos grupos LDE e LDE-PTX.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina transaminase
Apo E	Apolipoproteína E
AST	Aspartato transaminase
CD-36	Cluster de diferenciação 36
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
DAB	3,3' - Diaminobenzidina
DAC	Doença arterial coronária
DCC	N,N'-diclorohexilcarbodiimida
DCU	1,3-Diciclohexilureia
DMAP	Dimetilaminopiridina
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IL	Interleucina
IL-10	Interleucina 10
IL-18	Interleucina 18
IL-1BETA	Interleucina 1 BETA
LDE	Nanopartícula lipídica
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLR	Receptor de lipoproteína de baixa densidade
LRP-1	Proteína 1 relacionada ao receptor de LDL

MMP	Metaloproteinase da matriz extracelular
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PTX	Paclitaxel
RNA	Ácido ribonucleico
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UHPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
VCAM	Proteína de adesão vascular

LISTA DE SIGLAS

CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
InCor	Instituto do Coração
LAR	Laboratório de Análises Especiais
LOGA	Logística ambiental de São Paulo

RESUMO

Silva BMO. *Tratamento da aterosclerose induzida em coelhos com quimioterápico veiculado através de nanopartículas lipídicas* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Em estudo prévio, mostrou-se que o quimioterápico paclitaxel (PTX) veiculado em nanopartículas lipídicas (LDE), que se concentram nas lesões ateroscleróticas, reduziu drasticamente a extensão e espessura das lesões aórticas induzidas em coelho por dieta rica em colesterol. A invasão da camada íntima arterial por macrófagos e células musculares lisas foi inibida pelo tratamento. O presente estudo teve como objetivo investigar no coelho aterosclerótico o efeito da LDE-PTX sobre as lesões das artérias coronárias e sobre a expressão gênica de fatores pró e anti-inflamatórios no coração, aorta e fígado, além de avaliar a toxicidade da preparação. Vinte e sete coelhos New Zealand machos foram submetidos a uma dieta suplementada com colesterol 1% durante 8 semanas. Após 4 semanas do início da dieta, os animais foram divididos em dois grupos: LDE-PTX (n=15), tratados por 4 semanas com LDE-PTX, na dose semanal de 4 mg/kg de PTX, EV; LDE (n=12), tratados com LDE apenas, injetada EV semanalmente. Foram avaliados antes, durante e após o período de estudo o consumo de ração e massa corporal dos animais, e exames de bioquímica plasmática para avaliação dos lípidos e da toxicidade hematológica, hepática e renal. Foi realizada a morfometria de segmentos das aortas; qRT-PCR foi realizado em fragmentos de tecido aórtico e cardíaco. Foi realizada a imunohistoquímica para avaliação de macrófagos, receptores de LDL, TNF- e da deposição de colágeno no arco aórtico, tecido cardíaco e hepático. Como esperado, a concentração plasmática de colesterol foi extremamente elevada após o período em dieta rica em colesterol, não havendo diferença entre os 2 grupos (LDE:

49±14 e 1505±274 mg/dL; LDE-PTX: 46±13 e 1261±368, pré e pós dieta respectivamente). No grupo LDE, a área total de lesões na aorta foi de 10,4±15,2%, igual à do grupo LDE-PTX (11,6±8,9%). A espessura da camada íntima arterial nas lesões foi igual no grupo LDE e nos animais tratados com LDE-PTX. A invasão da íntima por macrófagos e células musculares lisas foi pequena e não diferiu nos dois grupos. A dieta rica em colesterol não produziu lesões ateromatosas nas artérias coronárias dos coelhos, seja do grupo LDE ou do LDE-PTX. A dieta rica em colesterol resultou em esteatose hepática que, no entanto, não diferiu em intensidade entre os grupos LDE e LDE-PTX. A expressão gênica no tecido cardíaco da IL-18 foi maior e a de MMP9 foi menor no grupo LDE-PTX comparando-se ao grupo LDE. Nas aortas, a expressão gênica de TNF e IL-1 β foi maior no grupo LDE-PTX. Demais fatores inflamatórios e receptores de lipoproteínas não apresentaram diferença de expressão gênica nos tecidos analisados. Em conclusão, comparativamente ao nosso estudo prévio, a dieta rica em colesterol produziu lesões aórtica muito atenuadas, tanto em área quanto em espessura. Surpreendentemente, o tratamento com LDE-PTX que, em nosso estudo prévio, havia resultado em drástica redução da área, espessura da lesão e da invasão por macrófagos e células musculares lisas, não teve efeito nos coelhos ateroscleróticos do presente estudo. Tampouco houve impacto do tratamento com LDE-PTX sobre os vários fatores envolvidos na inflamação arterial, como interleucinas e metaloproteinases. Esses fatores são fundamentais na aterogênese e o fato de não terem sido reduzidos pelo LDE-PTX pode explicar a ausência de resposta terapêutica. Esses resultados sugerem que haja subgrupos de coelhos com maior resistência ao desenvolvimento da aterosclerose por ingestão de colesterol, apesar da intensa resposta hipercolesterolêmica à dieta. Nesses subgrupos de

coelhos, as lesões ateroscleróticas, que são de pequena intensidade, são também pouco responsivas ao tratamento com LDE-PTX. Em futuros estudos clínicos em pacientes com doenças cardiovasculares ateroscleróticas, eventuais falhas do tratamento podem ser parcialmente interpretadas à luz dos nossos achados.

Descritores: Aterosclerose; Inflamação; Nanopartículas lipídicas; Antineoplásicos; Toxicidade; Paclitaxel.

ABSTRACT

Silva BMO. *Treatment of atherosclerosis induced in rabbits with chemotherapeutic agent carried in lipid nanoparticles* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2022.

In a previous study, it was shown that chemotherapeutic agent paclitaxel (PTX) carried in lipid nanoparticles (LDE) that focus on atherosclerotic lesions drastically reduced the extent and thickness of rabbit-induced aortic lesions by a high-cholesterol diet. Invasion of the arterial intima layer by macrophages and smooth muscle cells was inhibited by treatment. The present study aimed to investigate in atherosclerotic rabbits the effect of LDE-PTX on aortic lesions and on the gene expression of pro- and anti-inflammatory factors in the heart, aorta and liver, in addition to evaluating the toxicity of the preparation. Twenty-seven male New Zealand rabbits were fed a diet supplemented with 1% cholesterol for 8 weeks. Four weeks after the start of the diet, the animals were divided into two groups: LDE-PTX (n=15), treated for 4 weeks with LDE-PTX, at a weekly dose of 4 mg/kg of PTX, IV; LDE (n=12), treated with LDE alone, injected IV weekly. We evaluated before, during and after the study period the food intake and body mass of the animals, and plasma biochemistry tests to evaluate lipids and hematological profile, hepatic and renal toxicity. Aortic lesions morphometry was performed; qRT-PCR was performed on aortic and cardiac tissue fragments. Immunohistochemistry was performed to evaluate macrophages, LDL receptors, TNF- α and collagen deposition in the aortic arch, cardiac and hepatic tissue. As expected, plasma cholesterol concentration was extremely high after the period on a high-cholesterol diet, with no difference between the 2 groups (LDE: 49 ± 14 and 1505 ± 274

mg/dL; LDE-PTX: 46 ± 13 and 1261 ± 368 , pre-diet and post-diet respectively). In the LDE group, the total area of lesions in the aorta was $10.4 \pm 15.2\%$, the same as in the LDE-PTX group ($11.6 \pm 8.9\%$). The thickness of the arterial intima in the lesions was similar in the LDE group and in the animals treated with LDE-PTX. Intima invasion by macrophages and smooth muscle cells was small and did not differ in the two groups. The cholesterol-rich diet did not produce atheromatous lesions in the aorta of rabbits, either in the LDE or LDE-PTX groups. The high-cholesterol diet resulted in hepatic steatosis, which, however, did not differ in intensity between the control group and LDE-PTX group. The IL-18 gene expression in cardiac tissue was higher and MMP9 was lower in the LDE-PTX group compared to LDE group. In the aorta, the gene expression of TNF and IL-1 β was higher in the LDE-PTX group. Other inflammatory factors and lipoprotein receptors showed no difference in gene expression in the analyzed tissues. In conclusion, compared to our previous study, the high-cholesterol diet produced very attenuated aortic lesions, both in area and in thickness. Surprisingly, LDE-PTX treatment, which, in our previous study, had resulted in a drastic reduction in lesion area, lesion thickness and invasion by macrophages and smooth muscle cells, had no effect on the atherosclerotic rabbits in the present study. There was also no impact of LDE-PTX treatment on the various factors involved in arterial inflammation, such as interleukins and metalloproteinases. These factors are fundamental in atherogenesis and the fact that they were not reduced by LDE-PTX may explain the lack of therapeutic response. These results suggest that there are subgroups of rabbits with greater resistance to the development of atherosclerosis due to cholesterol ingestion, despite the intense hypercholesterolemic response to the diet. In these subgroups of rabbits, atherosclerotic lesions, which are of low intensity, are

also poorly responsive to LDE-PTX treatment. In future clinical studies in patients with atherosclerotic cardiovascular diseases, eventual treatment failures can be partially interpreted in light of our findings.

Descriptors: Atherosclerosis; Inflammation; Lipid nanoparticles; Antineoplastic agents; Toxicity; Paclitaxel.

1. INTRODUÇÃO

No modelo animal mais clássico para aterogênese, alimentar coelhos com colesterol resulta no desenvolvimento, a curto prazo, de lesões ateroscleróticas, enquanto a concentração do colesterol plasmático atinge altos níveis. Essas descobertas de Anitschkow estabeleceram o papel da hipercolesterolemia na aterogênese (1,2). Oito décadas depois, uma segunda cadeia de mecanismos causadores de aterosclerose, originalmente intuídos por Ehrlich (3), ganhou impulso nos estudos de Ross e se consolidou nos anos seguintes (4).

Atualmente, está claro que tanto a inflamação quanto as alterações no metabolismo do colesterol intravascular são críticos na aterogênese e podem oferecer alvos terapêuticos. Depois de décadas em que o tratamento hipolipemiante com estatinas prevaleceu como “mainstream” na prevenção primária e secundária da doença cardiovascular aterosclerótica, a comprovação de conceito a partir de estudos clínicos com anti-inflamatórios começa a fundamentar seu uso na prática clínica.

Em 2008, relatamos que coelhos com aterosclerose desenvolvida através da alimentação rica em colesterol, atingindo 70% da área lesada do arco aórtico, mostrou acentuada regressão das lesões por tratamento com o agente anticancerígeno paclitaxel transportado no núcleo lipídico de nanopartículas (LDE) que se assemelham à composição do LDL (5). A LDE tem a peculiar propriedade de reduzir drasticamente a alta toxicidade dos agentes quimioterápicos. As áreas lesionadas da aorta foram reduzidas em setenta por cento após o tratamento. A associação LDE-paclitaxel conseguiu redução acentuada dos processos inflamatórios e proliferativos da aterogênese, com a redução da presença de macrófagos e da invasão SMC da íntima

(5). Resultados semelhantes foram obtidos com o tratamento dos coelhos com outros agentes quimioterápicos associados à LDE, como carmustina (6), etoposídeo (7), metotrexato (8) e docetaxel (9) em coelhos alimentados com 1% de colesterol na ração.

Estes estudos experimentais abrem caminho para que novos tratamentos possam ser avaliados e implementados em seres humanos, tendo-se em vista que a doença arterial coronária (DAC) é a principal causa de óbito no Brasil, a exemplo do que acontece nos países industrializados do ocidente (10).

No que se refere ao tratamento da DAC, afora as técnicas invasivas, os progressos recentes que levaram a maior sobrevida e diminuição de eventos mórbidos foram todos resultantes de intervenções nos fatores de risco dos pacientes. Neste sentido, destacam-se as estatinas, que diminuíram os eventos cardiovasculares entre 25 e 30%, além dos antiagregantes plaquetários e os inibidores da ECA. Apesar desses avanços, cerca de 70% dos eventos cardiovasculares continuam a ocorrer (11). Portanto, os progressos ficaram restritos a um melhor controle dos fatores de risco e não existe até agora terapêutica eficaz voltada para o processo proliferativo-inflamatório da patologia de base.

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica que tem início quando fatores de risco alteram o endotélio vascular. O endotélio regula várias funções importantes dos vasos através da secreção de uma grande variedade de moléculas ativas (4). A disfunção ou ativação endotelial pode ocorrer em resposta a vários estímulos, o que provoca aumento da permeabilidade vascular e facilita a penetração no espaço subendotelial de lipoproteínas, como LDL pequenas e densas. Estas lipoproteínas em circulação se ligam a proteoglicanos, o que aumenta seu tempo de

retenção na íntima arterial e são capazes de sofrer oxidação por radicais livres produzidos por células endoteliais adjacentes, células musculares lisas ou macrófagos (12, 13).

A LDL oxidada, altamente aterogênica, estimula a secreção de citocinas pelas células endoteliais e exerce ação quimiotática sobre os monócitos (14,15,16). Os monócitos penetram na íntima e no espaço subendotelial, transformam-se em macrófagos ativados; estes fagocitam a LDL oxidada, formando, pelo acúmulo intracelular de lípidos, as células espumosas (17,18,19,20). Células inflamatórias e vasculares liberam citocinas e fatores de crescimento, os quais estimulam a proliferação e migração das células musculares lisas e síntese de componentes da matriz extracelular na parede do vaso (21). Conseqüentemente, é desencadeada a formação da placa lipofibrosa que, por sua vez, aumenta a espessura da parede arterial e diminui o lúmen do vaso (22,23).

Tendo em vista o forte componente proliferativo-inflamatório da doença, uma estratégia de tratamento baseada em fármacos antiproliferativos, como os usados no tratamento do câncer pode ser uma rota terapêutica muito promissora (14). No entanto, estes agentes têm toxicidade muito alta, intolerável em esquemas para tratamento médico das doenças cardiovasculares. Descobertas recentes do nosso laboratório podem chegar à resolução desses vieses, possibilitando a introdução de fármacos dessa classe terapêutica em Cardiologia, sem que haja o ônus dos seus efeitos colaterais.

Em pesquisas pioneiras no campo nanotecnológico aplicado às Ciências Biomédicas, mostramos que nanopartículas sólidas produzidas em laboratório podem concentrar-se em tumores malignos após injeção na corrente sanguínea (24,25). As

partículas das nanoemulsões são parecidas com as partículas da LDL. São esféricas, têm diâmetro na faixa de 40-60 nm e consistem em um núcleo formado de ésteres de colesterol com pequena proporção de triglicérides envolto por uma monocamada de fosfolípidos e colesterol livre. As nanoemulsões são manufaturadas sem proteína, mas após injeção na corrente sanguínea, adquirem a apolipoproteína E (apo E). A apo E adere à superfície das partículas da nanoemulsão e faz a ligação das partículas aos receptores da LDL, na membrana celular. Dessa maneira, as nanoemulsões são captadas para o interior da célula, através da endocitose mediada por receptores.

Nas neoplasias malignas e em outros processos de natureza inflamatória e proliferativa, como a aterosclerose, as células apresentam superexpressão dos receptores da LDL. O aumento de receptores faz-se necessário para que as células aumentem a captação de colesterol e fosfolípidos, presentes na LDL, para síntese de membranas constituídas por esses lípidos e requerida pela aceleração na taxa de mitose nos processos de proliferação celular. Injetadas em pacientes com câncer, as nanoemulsões realmente concentraram-se nos tecidos neoplásicos (26,27), sendo possível direcionar quimioterápicos aos tecidos neoplásicos através da sua associação às partículas da nanoemulsão. Em camundongos e ratos com implantação de tumores, as associações de nanoemulsões com os quimioterápicos daunorrubicina, carmustina, etoposídeo e paclitaxel reduziram drasticamente a toxicidade dos quimioterápicos e aumentou a ação antitumoral e a sobrevivência dos animais (28, 29, 30, 31, 32, 33).

Em experiências mais recentes (5), mostramos que as nanopartículas concentram-se também nas artérias com lesões ateroscleróticas e conforme relatado pela primeira vez por Anitschkow no início do século 19 (1) coelhos alimentados com

colesterol desenvolvem lesões ateroscleróticas rapidamente, enquanto a concentração de colesterol no plasma atinge níveis elevados. Essas experiências realizadas em coelhos com aterosclerose e também em pacientes com doença arterial coronária, onde observamos que as nanopartículas se concentram em segmentos arteriais lesionados (34). Estudos para avaliar a efetividade das preparações de quimioterápicos associados às nanopartículas no tratamento das lesões ateroscleróticas se fizeram necessários. Assim, demonstramos a redução das lesões ateroscleróticas em coelhos tratados com carmustina, paclitaxel, metotrexato e daunorrubicina, associados às nanopartículas, além da diminuição da toxicidade (5, 8). Dados promissores também foram observados ao associar dois tratamentos (paclitaxel e metotrexato), aonde a redução das placas chegou a 75% (35).

Amplificando estes resultados, outra abordagem levantou a proposta de um manejo medicamentoso no pós-transplante cardíaco, onde além dos problemas relacionados à rejeição do órgão, ocorre a doença coronária do transplante cardíaco, que se caracteriza pelo processo de aterosclerose acelerado com anatomopatologia diferente da DAC comum. Este processo torna-se a principal causa de insucesso após o primeiro ano de transplante. Em coelhos submetidos ao transplante heterotrópico de coração, foi demonstrado que as nanopartículas se concentram quatro vezes mais no coração transplantado quando comparado ao coração autóctone. Esses animais foram tratados com paclitaxel associado às nanopartículas, o que resultou em grande redução no processo inflamatório, causado principalmente pela invasão de macrófagos no miocárdio (36).

Devido ao sucesso das demonstrações do uso de fármacos quimioterápicos antiproliferativos associados à LDE na aterosclerose experimental e à toxicidade

reduzida observada nestes estudos, faz-se necessária uma avaliação mais detalhada do perfil toxicológico do fármaco utilizado, ampliando o arsenal farmacológico e diminuindo os efeitos colaterais tão comuns a essa classe terapêutica.

2. OBJETIVOS

Avaliar o efeito do tratamento com LDE-paclitaxel em coelhos com aterosclerose induzida por dieta rica em colesterol sobre lesões de aorta, coração e fígado, e sobre a expressão gênica de citocinas inflamatórias nesses tecidos.

3. MÉTODOS

3.1. Protocolo experimental em coelhos

3.1.1. Animais utilizados no estudo

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob número 088/17, e os coelhos foram adquiridos no Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

Foram utilizados coelhos machos da raça New Zealand brancos, pesando aproximadamente 3 Kg. Os animais foram acondicionados em gaiolas individuais em sala com temperatura controlada (20-22°C) e sob ciclo de claro/escuro de 12 horas no biotério da Divisão Experimental do Instituto do Coração (InCor) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). A água foi fornecida *ad libitum*.

Inicialmente os coelhos consumiram ração comercial usual (Purina Inc.) constituída de 16% de proteínas, 7% de lipídeos, 14% de fibra bruta, 7% de cinzas e 50% de extrato não nitrogenado por uma semana para adaptação às condições ambientais do biotério.

3.1.2. Preparo da dieta rica em colesterol

Para dar início ao protocolo de aterosclerose, foi preparada uma dieta enriquecida com 1% de colesterol. Sobre a ração comercial usual (Purina Inc) foi adicionada uma solução de colesterol, éter etílico e etanol absoluto. Para cada 30 g de colesterol, foram adicionados 200 mL de éter etílico e 100 mL de etanol absoluto, e a solução foi homogeneizada sob agitação. A ração usual foi misturada com esta solução e permaneceu em repouso por 24 horas em capela de exaustão para evaporação dos solventes. A ração enriquecida com colesterol foi armazenada em sacos plásticos lacrados a -20°C.

3.1.3. Animais e protocolo de tratamento das lesões ateroscleróticas

A aterosclerose foi induzida em vinte e sete coelhos através da administração de dieta rica em colesterol durante oito semanas (150 g de ração/dia suplementado com 1% de colesterol), tendo início após a primeira semana de adaptação dos animais. Todos os dias a ração restante foi coletada e pesada para avaliar a quantidade consumida durante o período do estudo. As alterações de peso dos animais foram observadas antes do início da dieta hipercolesterolêmica e durante todo protocolo, semanalmente.

Após 4 semanas de administração da dieta rica em colesterol os coelhos foram divididos em 2 grupos, de acordo com o tratamento a ser administrado: o grupo LDE, que recebeu uma injeção endovenosa contendo somente nanopartícula (LDE, n=12),

e o grupo tratado com paclitaxel (PTX) associado a nanopartícula lipídica (LDE-PTX, n=15), na dose de 4 mg/Kg. Ambos os tratamentos foram administrados uma vez por semana, pelo período de quatro semanas. A dieta rica em colesterol foi mantida até o final do estudo.

Ao final da oitava semana, os animais foram submetidos à eutanásia com injeção endovenosa de uma dose letal de tiopental sódico. As carcaças dos animais foram descartadas, segundo as normas vigentes de descarte dos resíduos de serviço de saúde, e devidamente alocadas para recolhimento pela empresa LOGA Logística Ambiental de São Paulo, onde foram transportados para o crematório da Vila Alpina para incineração.

3.2. Síntese de PTX e Preparo da LDE-PTX

Para aumentar a lipofilicidade do fármaco e melhorar sua incorporação à LDE, o paclitaxel (PTX) foi submetido a uma reação de derivatização, em que foi adicionada uma cadeia de ácido oléico em sua molécula. O PTX modificado foi denominado de oleato de paclitaxel (OPTX).

Em um balão de reação foram adicionados ácido oléico, os catalisadores N,N'-diclorohexilcarbodiimida (DCC) e dimetilaminopiridina (DMAP) e o PTX (Pharmaceuticals Co., Shanghai, China), dissolvidos em diclorometano anidro (31). O meio reacional permaneceu em agitação em atmosfera inerte (N₂) por 2 h à temperatura ambiente. Após as 2 h, a reação foi analisada em cromatografia líquida de alta eficiência, UHPLC (Nexera X2, Shimadzu, MO, EUA) para verificar se a massa inicial de PTX adicionada foi convertida em aproximadamente 100%. Logo após

análise de rendimento da reação, o produto foi filtrado para retirada do resíduo de DCU e sofreu sucessivas extrações líquido-líquido com solução 5% de ácido clorídrico, água ultrapura e solução saturada de cloreto de sódio. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio, filtrada e evaporada em rotaevaporador (Rotavapor R-300, Buchi, Suíça). Ao produto foi adicionado éter etílico para precipitar resíduo final de DCU, sendo novamente filtrado e evaporado em roataevaporador. Por último, o produto foi precipitado em hexano, obtendo-se um precipitado branco (OPTX), filtrado e secado a vácuo.

A LDE foi preparada a partir de uma mistura de lípides constituída por 55% de fosfatidilcolina (Lipoid, Alemanha), 25% de éster de colesterol (Alfa Aesar, EUA), 1% de colesterol não esterificado (Fabrichem, EUA), 19% de triglicérides (Migyol 812N, Sasol Germany GmbH, Alemanha) (24).

Para o preparo da associação LDE-PTX, na mistura de lípides, adicionou-se o PTX na proporção fármaco:lípides 1:10.

A emulsificação dos lípides com e sem o fármaco, foi iniciada adicionando-se tampão Tris-HCl 0,01 M pH 8,05 e o agente tensoativo, polisorbato 80 (Tween 80) em um homogeneizador de alta pressão Emulsiflex C5 (Avestin Inc., Ottawa, Canadá). O tamanho da partícula (50-70 nm) foi analisado através do método de espalhamento de luz dinâmico a 90° em ZetaSizer Nano ZS90 (Malvern, Malvern, Reino Unido). A taxa de associação do fármaco à LDE foi analisada por UHPLC (Nexera X2, Shimadzu) pelo método de gradiente de baixa pressão em coluna de sílica C18 em fase móvel 100% metanol, detector UV/visível 227 nm. A preparação foi esterilizada por filtração em membrana de policarbonato de 0,22 µm (Merck, Millipore, MA, EUA) em fluxo laminar e armazenada a 4°C em frascos de vidro estéreis.

3.3. Determinação do perfil lipídico dos coelhos

O perfil lipídico dos coelhos foi determinado antes da dieta rica em colesterol (basal), após as quatro primeiras semanas (pré-tratamento) e ao término do tratamento. O soro foi obtido por centrifugação a 2.500 rpm por 10 minutos a 4° C. As análises dos níveis plasmáticos de triglicérides, colesterol total e colesterol de HDL (HDL-c) foram realizados utilizando-se kits enzimáticos comerciais.

3.4. Avaliação da toxicidade do tratamento

Foram analisadas variação de peso corporal dos animais, consumo de ração, hemograma, ureia, creatinina, alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST) durante o período do estudo.

As amostras de sangue dos coelhos foram coletadas por punção da veia auricular, antes do início da dieta rica em colesterol (basal), antes e após os tratamentos administrados (pré e pós tratamentos). As amostras foram coletadas com anticoagulante heparina para as análises do perfil bioquímico e com EDTA para o perfil hematológico. As amostras foram enviadas para o Laboratório de Análises Especiais (LAR), Laboratório de Investigação Médica LIM 03, do HC-FMUSP.

O hemograma foi realizado em analisador hematológico automatizado veterinário Sysmex Poch 100iv (Roche, EUA). Foi realizado estudo morfológico de esfregaços sanguíneos com corantes panópticos para complementar as análises quando necessário.

O perfil bioquímico foi realizado em equipamento COB AS 111 (Roche, EUA). Para as determinações de colesterol total, HDL, triglicérides, glicemia e fosfatase alcalina foi utilizado o método enzimático colorimétrico.

As transaminases ALT e AST foram analisadas por método cinético UV – IFCC (Ultravioleta – *International Federation of Clinical Chemistry*).

3.5. Análise morfométrica das aortas

A artéria aorta foi removida, desde o arco aórtico até a artéria abdominal, aberta longitudinalmente, lavada com solução salina e imersa em solução tamponada de formalina a 10%. Após a fixação, cada aorta foi corada com Sudan IV e fotografias foram obtidas para mensuração das lesões macroscópicas.

3.6. Histologia e imunohistoquímica

O arco aórtico foi seccionado em seguimentos de 5 milímetros e embebidos em parafina. Os cortes de cada segmento foram corados com hematoxilina-eosina para a mensuração da área total das lesões. A porcentagem de lesão aterosclerótica microscópica foi obtida pela razão entre a porcentagem da área lesionada e a área total. Para medir o colágeno presente na camada íntima, a fração de volume de colágeno foi determinada em cortes corados por Masson sob ampliação de 400x e calculada como a porcentagem de áreas de tecido conjuntivo coradas de azul por área íntima total.

Secções adicionais foram marcadas utilizando anticorpos anti-alfa actina para células de músculo liso vascular e anti-macrófagos de coelho (clone RAM 11, Dako).

Para o estudo da localização e a área de marcação dos receptores de lipoproteínas LDLR (do inglês, “low density lipoprotein receptor”), TNF- α (do inglês, tumor necrosis facto alpha”) e macrófago nas aortas, nos corações e fígados, foi realizada a imunohistoquímica. Secções histológicas de 5 μ m foram submetidas à reação de imunoperoxidase utilizando-se anticorpos primários. Os cortes foram submetidos à recuperação de antígenos em calor úmido em câmara de pressão para recuperação antigênica Pascal em tampão citrato pH 6,0. A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio a 3%. Em seguida foram incubadas com albumina 1% por 1 h a 37 °C para bloqueio de reações inespecíficas. Os cortes histológicos foram então incubados com os anticorpos primários anti LDLR, anti TNF- α e anti RAM 11 (macrófagos de coelho) *overnight* a 4 °C. Em seguida, as lâminas foram incubadas com polímero SuperPicture (Invitrogen, CA, EUA) por 30 minutos. As lâminas foram colocadas em uma solução cromogênica de 3,3'-diaminobenzidina (DAB – Sigma Chemical Corporation, St Louis, MA, EUA) por 90 segundos em temperatura ambiente e em seguida contra-coradas com Hematoxilina de Harris. Como controle negativo, foi omitido o anticorpo primário nas mesmas secções dos casos estudados, para detectar possíveis ligações inespecíficas. As análises foram realizadas pela quantificação da área marcada pelo DAB levando-se em conta a intensidade de marcação positiva para os receptores utilizando-se um sistema computadorizado de imagens (Aperio ImageScope, Leica BioSystems, California).

3.7. Análise da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

No momento da eutanásia os tecidos de artéria aorta, coração e fígado foram retirados dos animais e conservados em solução de RNA^{later}® (Ambion by Thermo Fisher Scientific, EUA) em freezer -80°C. As aortas foram homogeneizadas com cadinho e pistilo em nitrogênio líquido, e os tecidos de coração e fígado foram homogeneizados em politron utilizando-se o reagente TRIzol® (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, EUA) para o isolamento do RNA total, conforme instruções do fabricante. A integridade do RNA foi analisada por eletroforese e sua concentração determinada através de leitura em espectrofotômetro a densidade óptica de 260nm, no aparelho *NanoDrop 2000 Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific Inc). O RNA isolado foi armazenado a -80 °C e uma alíquota de 1 µg de RNA total foi utilizada para a reação de transcrição reversa.

Com relação ao fígado dos animais, a integridade do RNA extraído estava comprometida e por este motivo não foi possível continuar com a análise de expressão gênica neste tecido.

Para cada 16 µL contendo 1 µg de RNA a ser reversamente transcrito, foram adicionados 4 µL do *mix* de reação SuperScript® VILO™ 5x (SuperScript® VILO™ MasterMix, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific). Cada amostra foi levemente homogeneizada e incubada por 10 minutos a 25°C, por 60 minutos a 42°C e, por fim, por 5 minutos a 85°C. Ao término da reação de transcrição reversa, dos 20 uL de cada amostra, foram acrescentados 80 uL de tampão Tris-EDTA, resultando num volume

final de 100 uL e diluição final de 1:5 para cada cDNA, que foram armazenados a -20 °C para posterior utilização na reação de qRT-PCR.

Para análise da expressão gênica dos receptores de lipoproteínas LDLR (receptor de lipoproteína de baixa densidade), LRP-1 (proteína 1 relacionada ao receptor da LDL) e CD36 (*Cluster of differentiation 36*); e dos fatores anti- e pró-inflamatórios: interleucina (IL) 1 beta (IL-1 β), IL-10 e IL-18, fator de necrose tumoral (TNF), proteína 1 de adesão vascular (VCAM-1), proteína 1 quimiotática de monócitos (MCP-1), metaloproteinases da matriz extracelular (MMP) 9 e 12, foi realizada a técnica de reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR). O sistema de emissão de luz selecionado para o estudo foi o sistema TaqMan, que utiliza, além dos primers, sondas fluorescentes para a detecção e quantificação do produto de PCR. Esse tipo de detecção é altamente específico, não necessitando a padronização da reação.

As reações de amplificação foram realizadas no equipamento StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific) que contém um *software* que gera um gráfico de intensidade de fluorescência em função do número de ciclos de amplificação. Um limiar (“threshold”) é definido automaticamente, no qual a intensidade de fluorescência é estatisticamente diferente da fluorescência de fundo (“background”) e a curva apresenta a fluorescência da amplificação aumentando exponencialmente. O número do ciclo cuja fluorescência da amostra intercepta o “threshold” é chamado Ct (“cycle threshold”).

Todas as reações foram realizadas em duplicata e foram consideradas aceitáveis quando apresentaram desvio padrão menor que 0,4 ou quando apresentaram diferença de Ct < 1. Em cada reação foram pipetados um volume final

de 12 uL, constituídos de 6 uL do reagente “TaqMan Gene Expression Master Mix 2x” (Applied Biosystems); 2,4 uL de água MilliQ; 0,6 uL do sistema “TaqMan Gene Expression Assays 20x” (Applied Biosystems) específico para cada gene alvo a ser analisado, e um para o gene normalizador (*GAPDH*); no final foram adicionados 3 uL do cDNA diluído (1:5). As condições de termociclagem da reação seguiram os parâmetros de fábrica do aparelho ajustados para um pré-aquecimento a 50°C por 2 minutos, denaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos de denaturação e 60°C por 1 minuto de anelamento dos primers e extensão.

A Tabela 1 mostra a identificação dos primers e sondas dos genes alvos e normalizador utilizados no presente estudo.

A quantificação da expressão gênica bruta foi calculada através do método Ct comparativo demonstrado pelo algoritmo $2^{-\Delta Ct}$ (37). O valor de ΔCt equivale à diferença entre o Ct do gene de interesse e o Ct do gene normalizador. A diferença entre os valores de Ct (ΔCt) entre as amostras para cada gene alvo, após normalização pelo Ct do gene de expressão constante (“housekeeping gene” ou “endogenous control gene”), reflete sua expressão diferencial

Tabela 1. Descrição dos ensaios TaqMan® utilizados para análise da expressão do RNAm por qRT-PCR.

Gene	Nomenclatura	*Assay ID
CD36	“Cluster of differentiation 36”	Oc03395926_m1
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	Oc03823402_g1
IL-10	Interleucina 10	Oc03396940_m1
IL-18	Interleucina 18	Oc03399565_m1
IL-1β	Interleucina 1 beta	Oc03823250_s1
LDL-R	Receptor da lipoproteína de baixa densidade	Oc03396245_g1
LRP-1	Proteína 1 relacionada ao receptor da lipoproteína de baixa densidade	Oc03396403_m1
MCP-1	Proteína 1 quimiotática de monócitos	Oc03823583_s1
MMP9	Metaloproteinase da matriz extracelular 9	Oc03397520_m1
MMP12	Metaloproteinase da matriz extracelular 12	Oc03398610_m1
TNF	Fator de necrose tumoral	Oc03397715_m1
VCAM-1	Proteína 1 de adesão vascular	Oc03397346_m1

*Assay ID: ensaios TaqMan® adquiridos da *Thermo Fisher Scientific, EUA*.

3.8. Análise estatística

O “n” amostral foi baseado em resultados de estudos anteriores realizados no Laboratório de Metabolismo e Lípidos, onde ficou evidenciado que um “n” de 12 animais por grupo é adequado para as análises dos parâmetros experimentais.

Todos os dados foram submetidos a teste de normalidade de Shapiro-Wilk e estão expressos em média e desvio padrão. Os dados foram avaliados de maneira que, nos diferentes momentos do protocolo (basal, pré e pós tratamento), foi utilizado o *two-way* ANOVA com pós teste de Bonferroni para amostras com distribuição gaussiana ou Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn para amostras com distribuição não gaussiana.

Dados que foram analisados ao final do protocolo, utilizou-se teste *t de Student* para distribuição gaussiana e Mann-Whitney para distribuição não gaussiana.

O programa estatístico utilizado foi GraphPad Prism 6.0. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS

4.1. Perfil ponderal

Coelhos New Zealand, que receberam dieta rica em colesterol, foram tratados com apenas LDE ou LDE-PTX, na dose de 4 mg/Kg/semana, durante 4 semanas. Os pesos e o consumo de ração de cada animal foram avaliados semanalmente.

Os grupos de estudo não apresentaram variação de peso durante o período experimental, como mostrado na Figura 1.

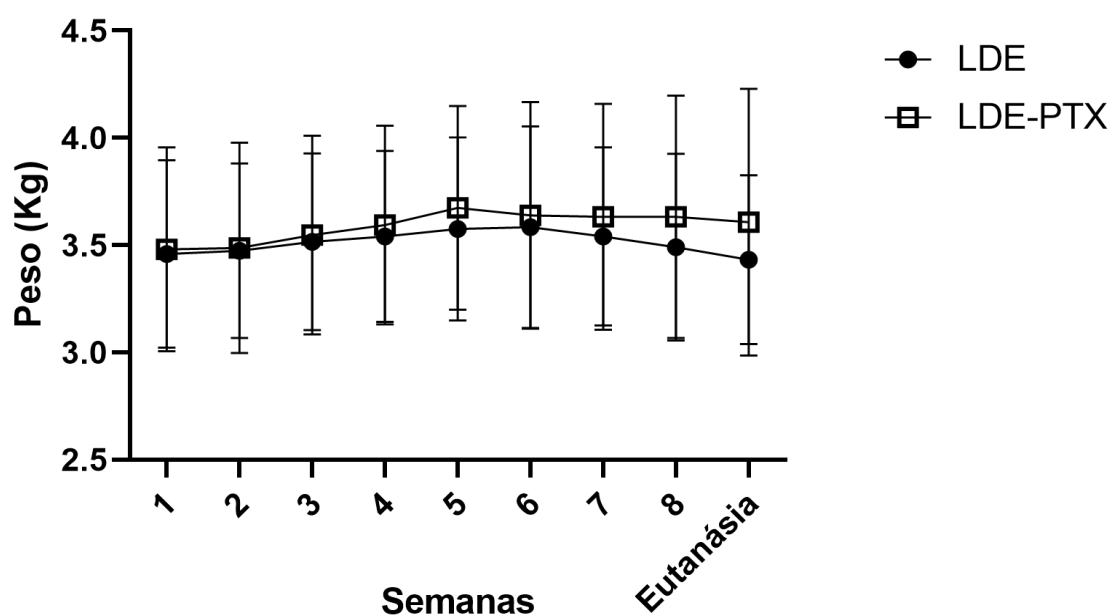


Figura 1 – Peso corporal dos grupos LDE e LDE-PTX.

4.2 Consumo de ração

A Figura 2 mostra a média do consumo de ração suplementada com 1% de colesterol pelos coelhos de ambos os grupos durante todo o protocolo experimental.

Notamos uma discreta diminuição no consumo de ração após a quarta semana nos grupos LDE-PTX e LDE, mas essa diferença não se mostrou significativa.

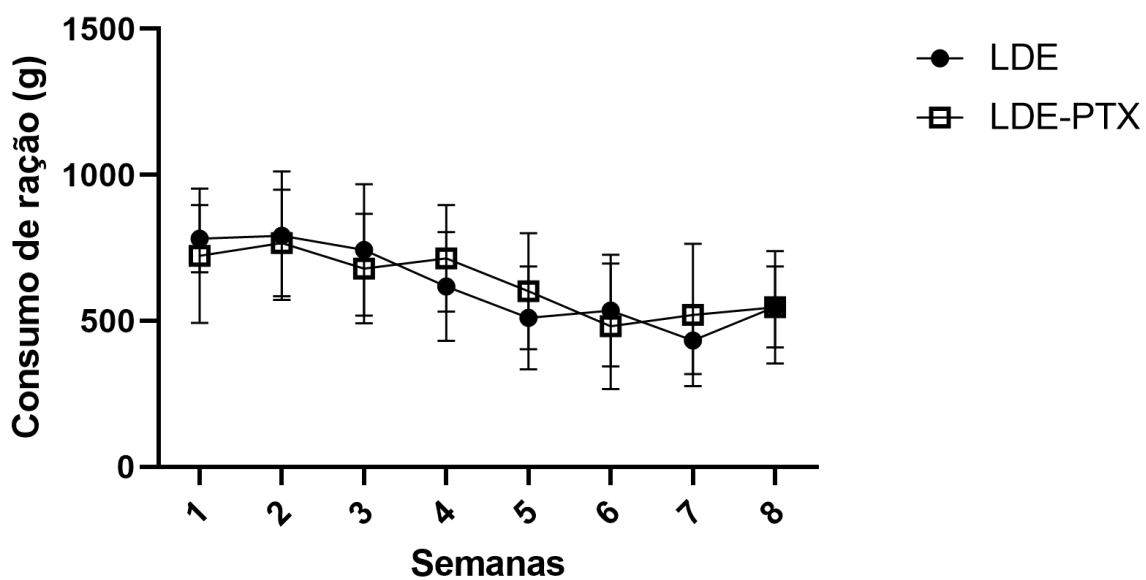


Figura 2 – Consumo semanal de ração (g) nos grupos LDE e LDE-PTX.

4.3 Perfil hematológico e toxicológico

Como se pode observar na Tabela 2, a dieta enriquecida com colesterol não teve influência nos níveis de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito dos coelhos, não havendo diferença entre os tempos e, tampouco, entre os grupos estudados.

A contagem de leucócitos, a percentagem diferencial de leucócitos e o número de plaquetas também não apresentaram diferença.

Ao analisar as enzimas hepáticas aspartato e alanina transaminases (AST e ALT) e as enzimas renais ureia e creatinina, não houve diferença durante todo o protocolo.

Tabela 2 – Perfis hematológico e toxicológico nos tempos basal, pré-tratamento e pós-tratamento dos grupos LDE e LDE-PTX.

Perfil hematológico e toxicológico	LDE (n=12)			LDE-PTX (n=15)		
	Basal	Pré	Pós	Basal	Pré	Pós
Hemoglobina (g/dL)	10,9±2,8	9,8±3,3	8,6±1,5	12,6±1,86	10,2±3,5	9,7±2
Hematócrito (%)	35±8,8	32±5,4	28±4,5	40±6,2	31±11,3	31±6,8
Leucócitos (mil/mm ³)	8,2±3	12,6±3,1	17,7±5	10,3±4,5	10,7±4,3	17,7±4,4
Neutrófilos (%)	33,2±11,5	36,8±11,8	34,5±5,3	30,5±10	31,2±5,3	30,9±5,5
Linfócitos (%)	64,8±11,5	60,7±12	63,6±5,7	67,7±10,5	66,2±6,1	67,6±5,5
Monócitos (%)	1,4±0,5	2,4±2,3	1,3±0,5	1,4±0,9	2,5±2,6	1,4±0,5
Plaquetas (mil/mm ³)	248±108,1	265±88,2	329±79	220±97,2	214±82	256±79
Ureia (mg/dL)	34±8	36±12	47±10	36±7	30±9	48 ±9
Creatinina (mg/dL)	0,9±0,3	1,2±0,4	1,3±0,5	0,9±0,34	1±0,41	1,2±0,5
ALT (U/L)	28±22	41±48	35±22	30±19	44±48	44±24
AST (U/L)	27±16	67±44	63±20	23±12	46±23	81±59

4.4 Perfil lipídico

Como esperado, após 4 semanas de dieta suplementada com 1% de colesterol, os níveis de colesterol total, colesterol de HDL (HDL-c) e de não-HDL (não-HDL-c) aumentaram nos dois grupos de estudo, comparando os períodos de pré-tratamento e basal. Ao final do protocolo de tratamento, os níveis de colesterol se mantiveram elevados em todos os grupos, conforme mostrado na Tabela 3.

Em relação aos níveis de triglicérides, não houve diferença entre os grupos ou entre os períodos observados.

Tabela 3 – Perfil lipídico nos tempos basal, pré-tratamento e pós-tratamento dos grupos LDE e LDE-PTX.

Perfil lipídico	LDE (n=12)			LDE-PTX (n=15)		
	Basal	Pré	Pós	Basal	Pré	Pós
Colesterol total (mg/dL)	49±14	1334 ±715*	1505±274	46±13	1465±729*	1261±368
não-HDL-c (mg/dL)	27±11	1119±668*	1193±241	25±12	1213±694*	987±360
HDL-c (mg/dL)	22±9	215±76*	312±95	20±8	251±85*	273±99
Triglicérides (mg/dL)	83±32	130±92*	305±212	85±45	92±65	212±138

P<0,05 versus basal

4.5 Macroscopia das lesões ateroscleróticas

As artérias aortas dos coelhos foram mensuradas utilizando-se o Software “Image J”, e as porcentagens de área de lesão, com depósitos lipídicos marcados em vermelho (Figura 3A), foram calculadas. O grupo LDE tem média de lesão de 10,4%, enquanto o grupo LDE-PTX tem 11,55% de média de lesão aterosclerótica, conforme mostrado na Figura 4. Apesar de não haver diferença entre as médias dos grupos, ao observarmos seus respectivos desvios padrão, podemos ver que a variação do grupo LDE-PTX ($\pm 8,9$) foi menor quando comparada ao grupo LDE ($\pm 15,2$). As medidas das lesões microscópicas no arco aórtico também não apresentaram diferença (Figura 3B).

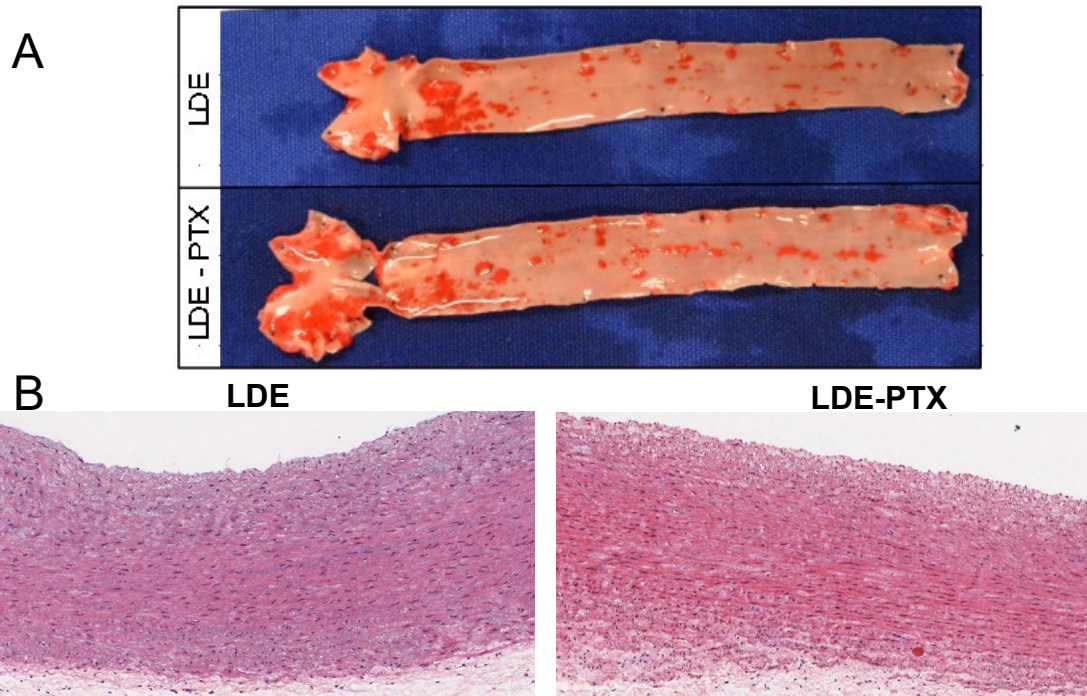
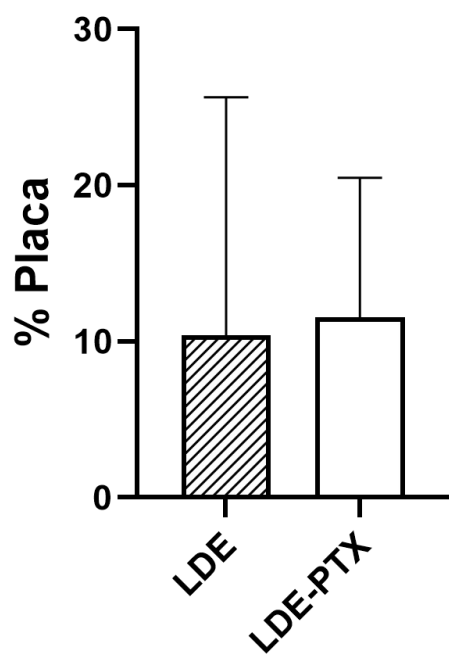


Figura 3 – Imagens representativas das áreas de placas marcadas com corante Sudan e cortes histológicos corados com Hematoxilina-eosina (aumento 80x) dos grupos estudados.

A



B

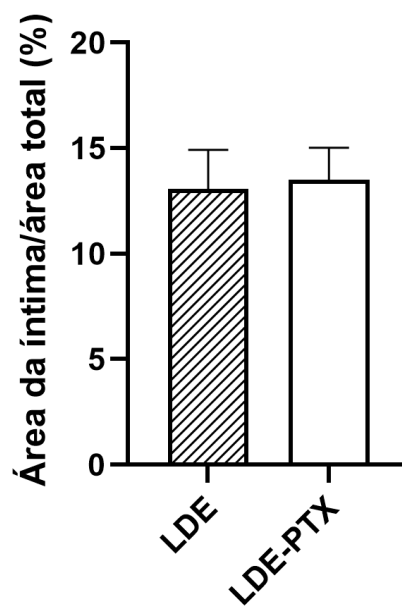


Figura 4 – Porcentagem de área de placa (A) e área da íntima (%) (B) nos grupos LDE e LDE-PTX.

4.6. Imunohistoquímica

As Figuras 5 e 6 ilustram e apresentam, respectivamente, a porcentagem de área da marcação para a identificação de macrófagos em secções do arco aórtico, do coração e fígado dos coelhos dos grupos LDE e LDE-PTX. Não foram observadas diferenças nas áreas marcadas para macrófago nos órgãos estudados, quando comparados os dois grupos.

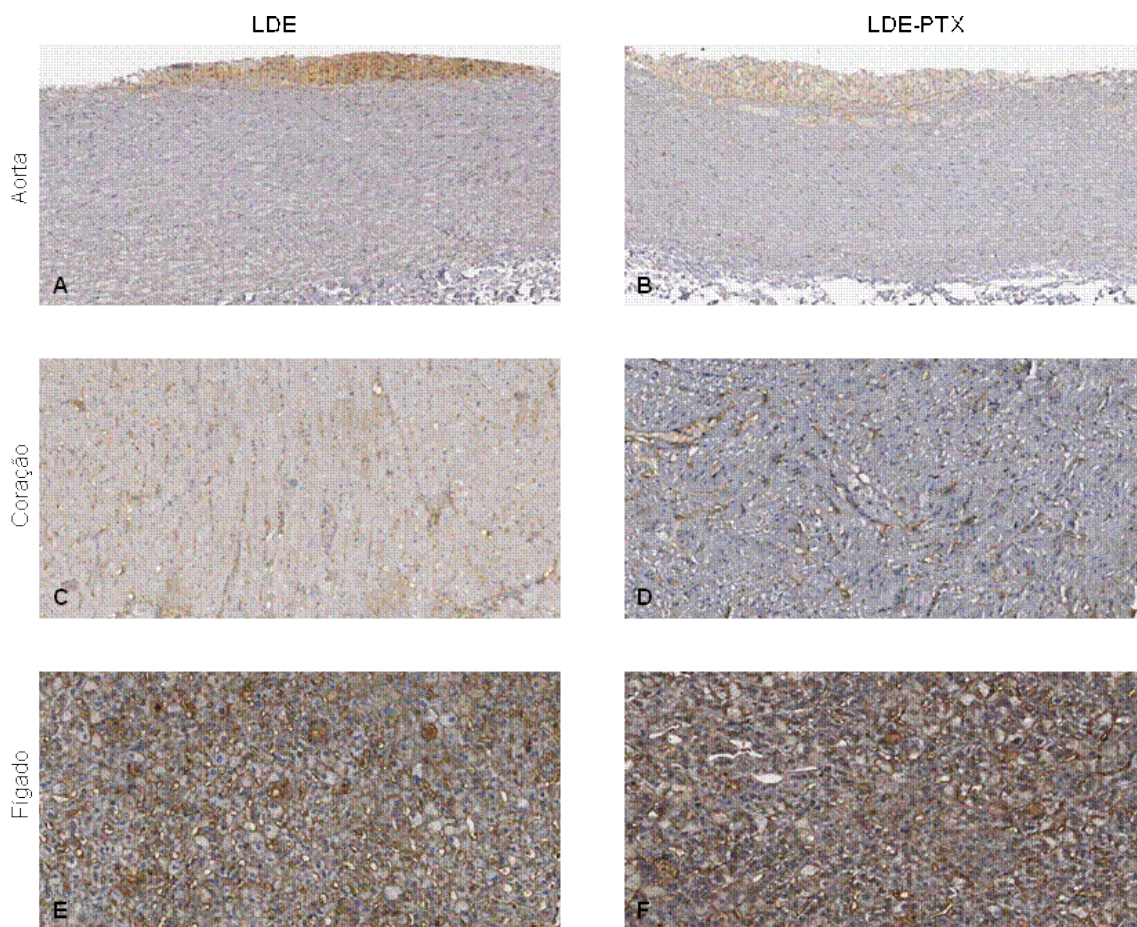


Figura 5 – Cortes histológicos do arco aórtico (A e B), coração (C e D) e fígado (E e F), respectivamente, dos animais, imunomarcados para macrófagos nos grupos LDE e LDE-PTX (aumento 80x).

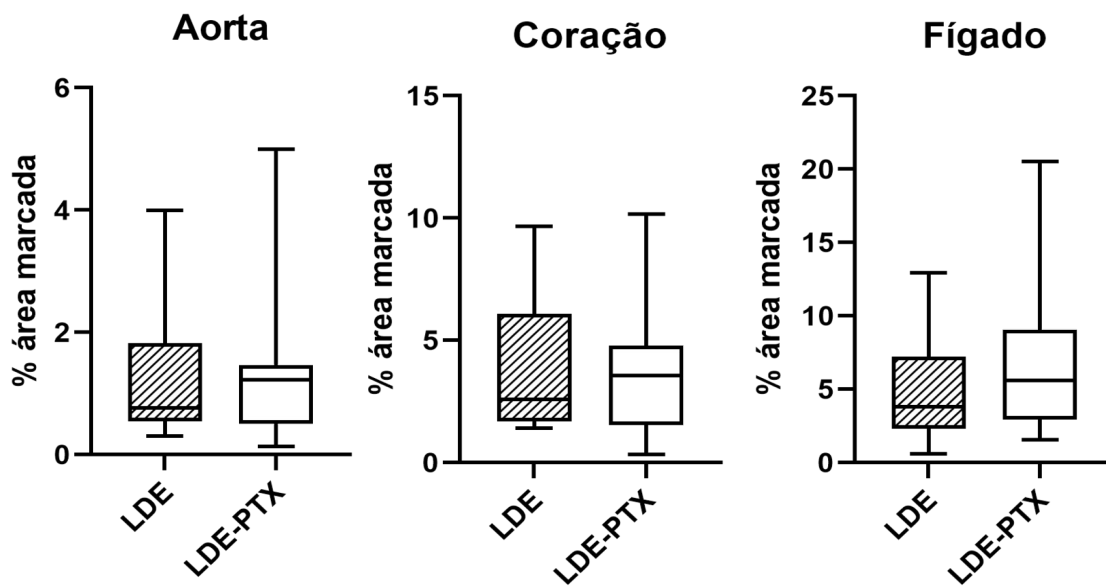


Figura 6 – Porcentagem de área de imunomarcacão para macrófagos na aorta, coração e fígado dos coelhos dos grupos LDE e LDE-PTX.

A porcentagem de área da imunomarcção para LDLR no arco aórtico, coração e fígado dos coelhos dos grupos LDE e LDE-PTX pode ser observada na Figura 8, ilustrada pela Figura 7. Não houve diferença entre os grupos estudados.

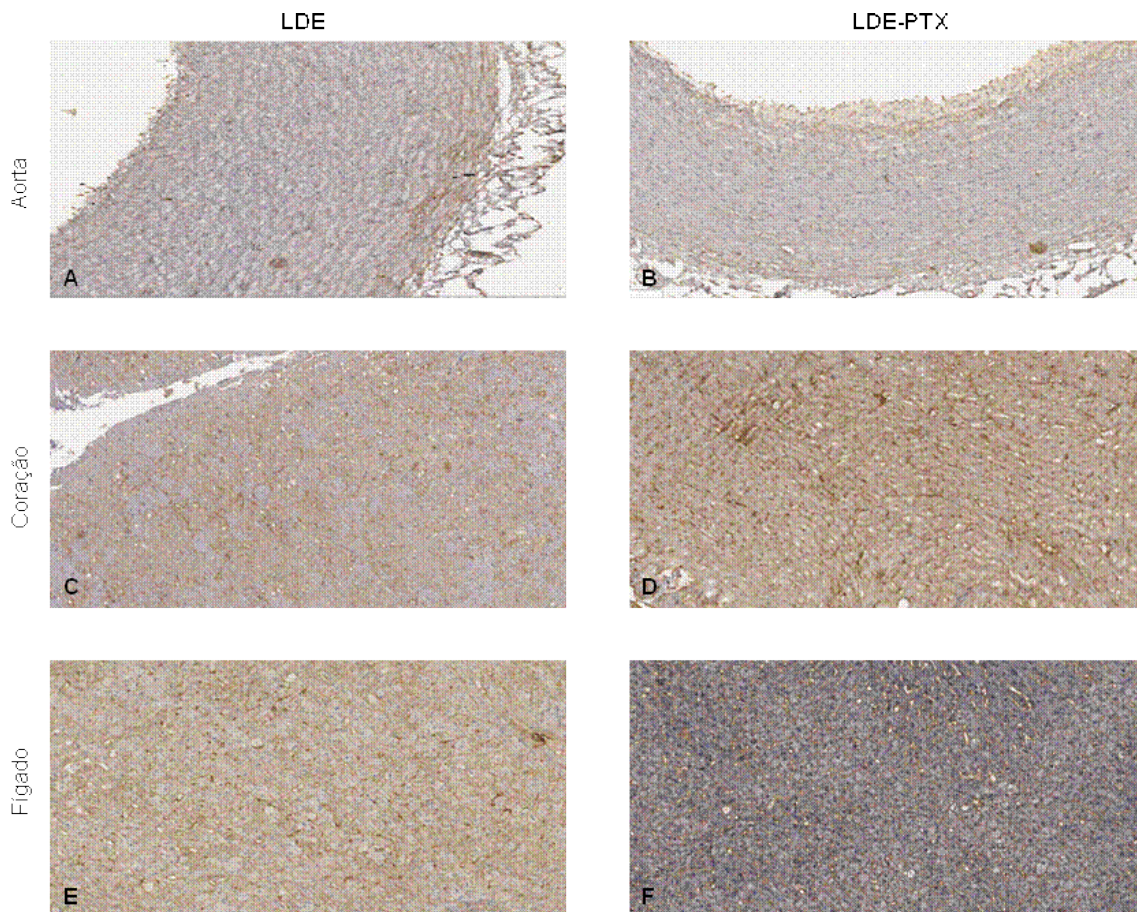


Figura 7 – Cortes histológicos do arco aórtico (A e B), coração (C e D) e fígado (E e F), respectivamente, dos animais, imunomarcados para LDLR nos grupos LDE e LDE-PTX (aumento 80x).

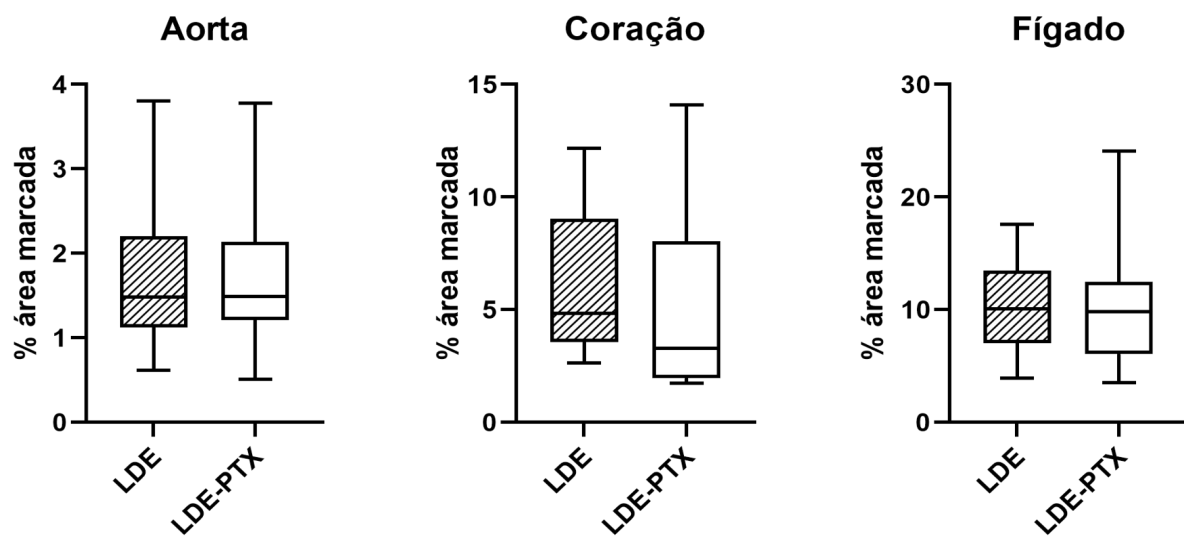


Figura 8 – Porcentagem de área de imunomarcção para LDLR na aorta, coração e fígado dos coelhos dos grupos LDE e LDE-PTX.

Foi utilizada a coloração Tricômio de Masson, ilustrada pela Figura 9, para análise da porcentagem de área de colágeno presente no arco aórtico, coração e fígado dos coelhos dos grupos estudados, onde não houve diferença entre os grupos, conforme gráficos da Figura 10.

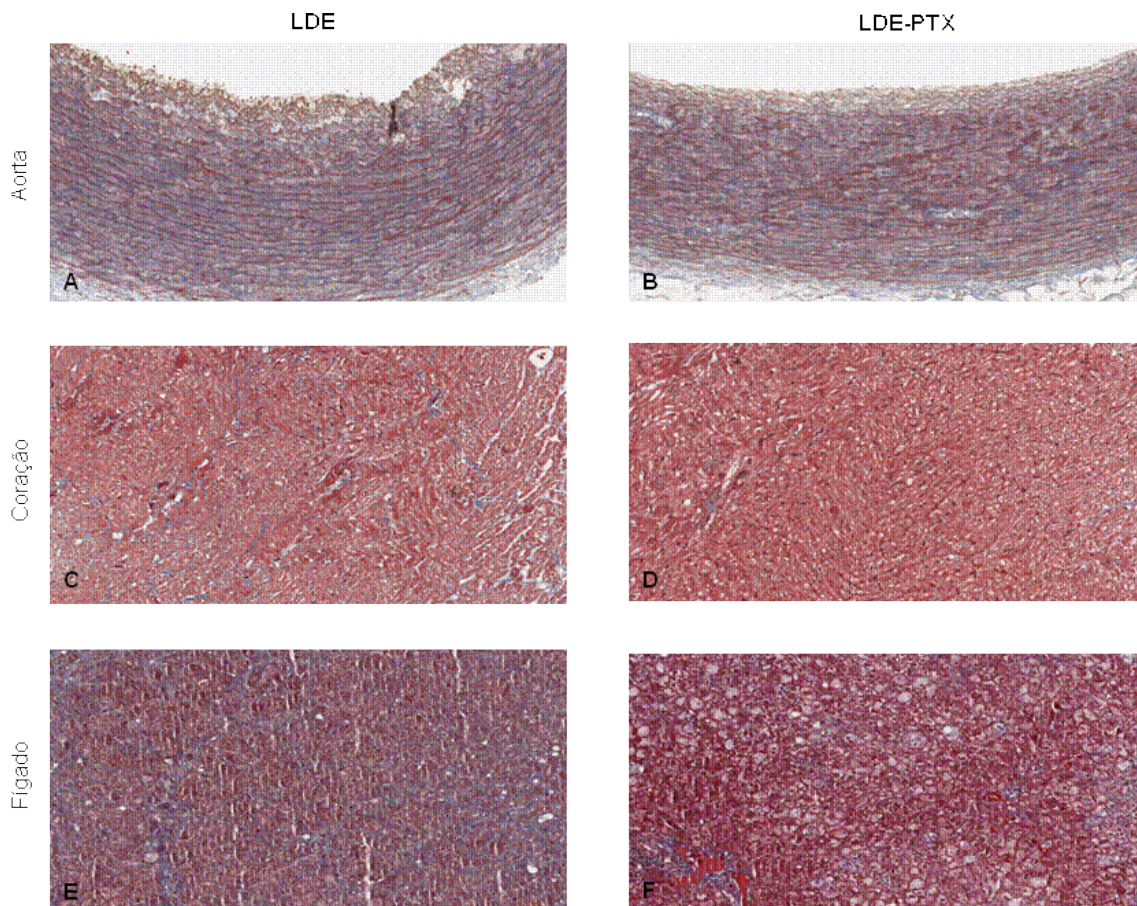


Figura 9 – Cortes histológicos do arco aórtico (A e B), coração (C e D) e fígado (E e F), respectivamente, dos animais, corados Tricômio de Masson nos grupos LDE e LDE-PTX (aumento 80x).

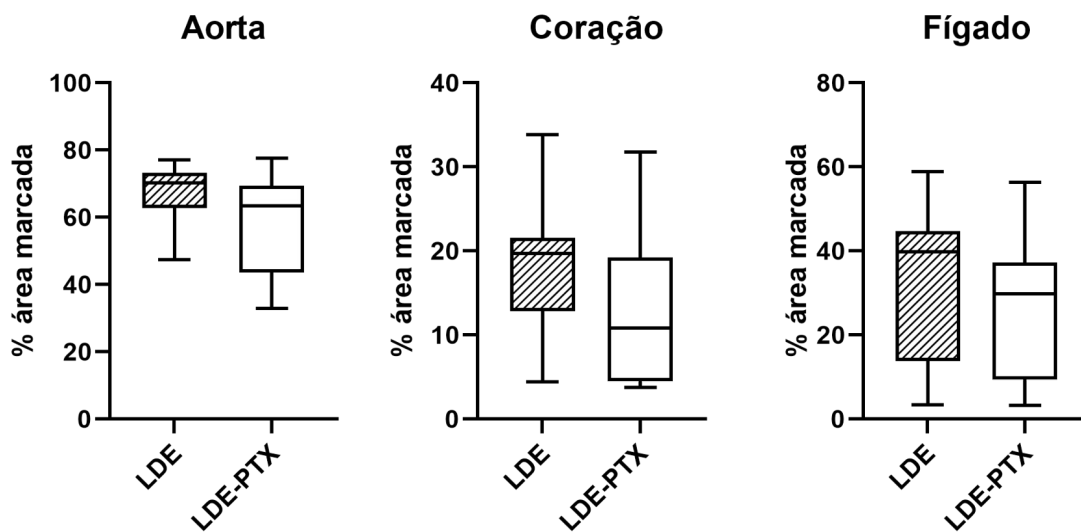


Figura 10 – Porcentagem de área de colágeno na aorta, coração e fígado dos coelhos dos grupos LDE e LDE-PTX.

Na Figura 12, vemos a porcentagem de área de imunomarcção para TNF- α no arco aórtico, coração e fígado dos coelhos dos grupos LDE e LDE-PTX, ilustradas pela Figura 11. Não houve diferença significativa entre os grupos de estudo.

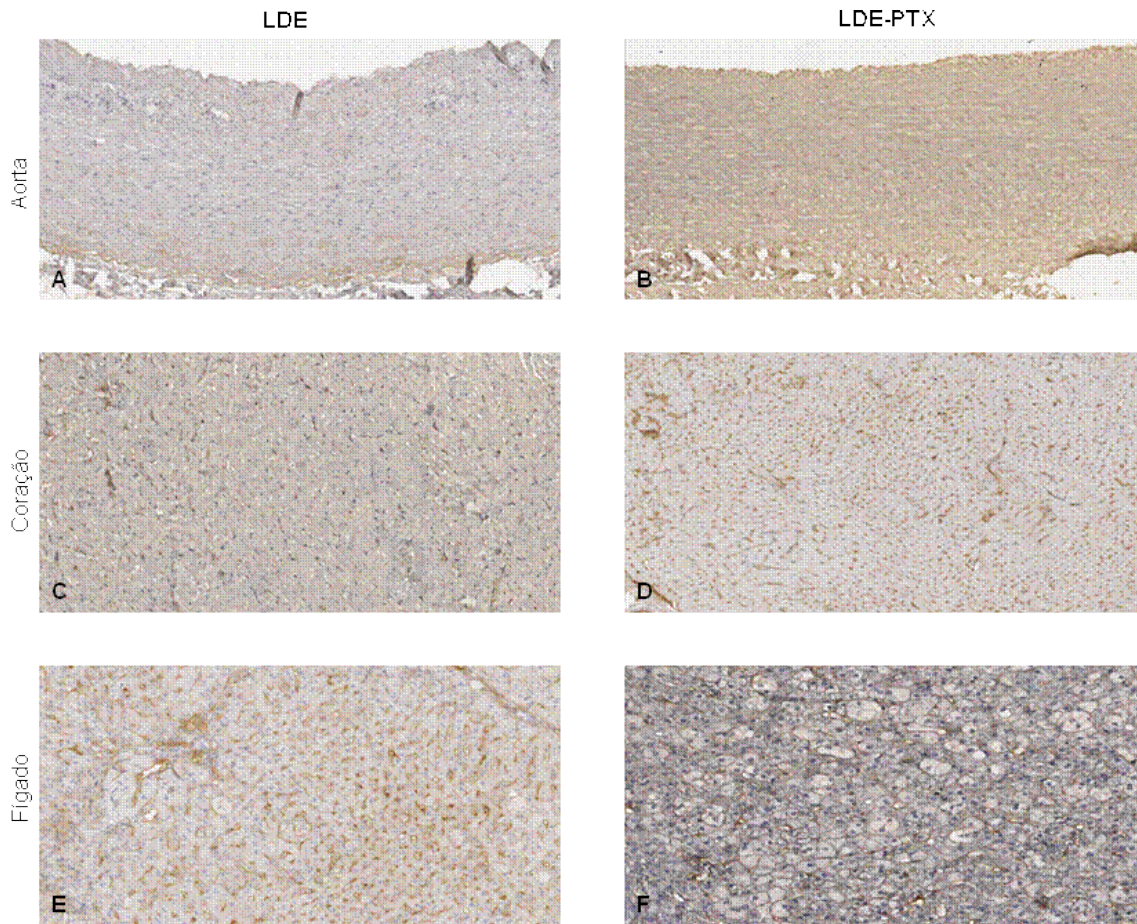


Figura 11 – Cortes histológicos do arco aórtico (A e B), coração (C e D) e fígado (E e F), respectivamente, dos animais, imunomarcados para TNF- α nos grupos LDE e LDE-PTX (aumento 80x).

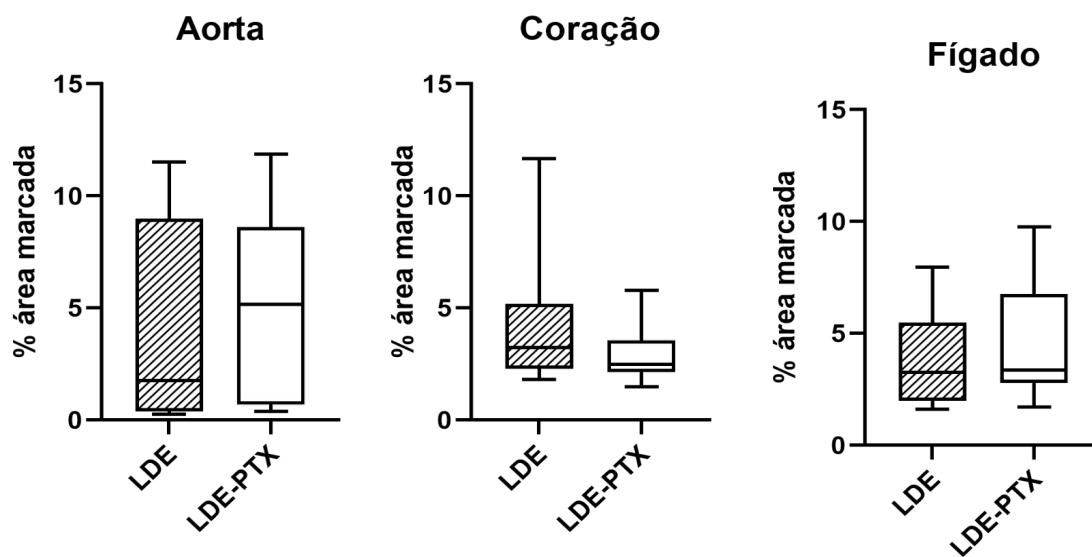


Figura 12 – Porcentagem de imunomarcagem para TNF- α na aorta, coração e fígado dos coelhos dos grupos LDE e LDE-PTX.

4.7 Expressão gênica

Foi avaliada a expressão do RNAm nos fragmentos de artéria aorta e do coração para os receptores de lipoproteínas e fatores relacionados à resposta inflamatória.

No coração, a análise da expressão gênica bruta para os receptores de LDL, o LDLR e os “scavengers” LRP-1 e o CD36, não apresentou diferença entre os grupos, como mostrado na Figura 13.

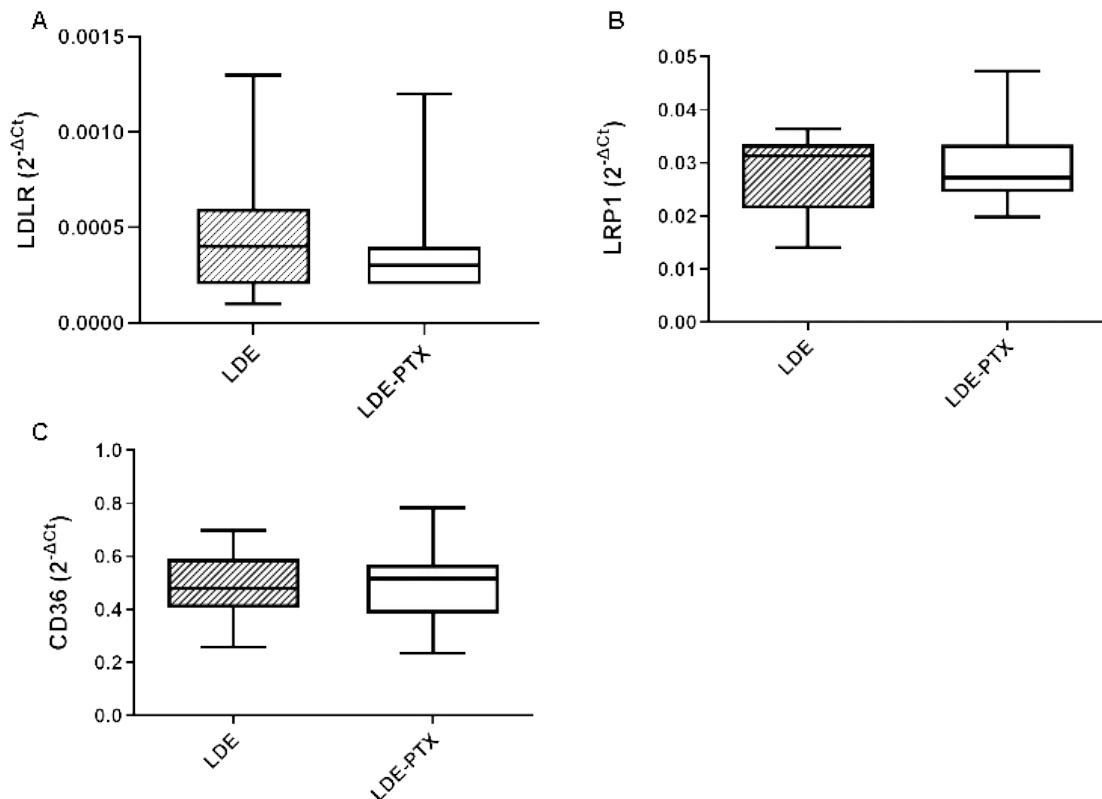


Figura 13 – Expressão gênica bruta de LDLR (A), LRP-1 (B) e CD36 (C) no tecido cardíaco comparando-se os grupos LDE e LDE-PTX.

As Figuras 14 e 15 mostram a expressão gênica bruta dos fatores inflamatórios no tecido cardíaco. Destes, apenas a IL-18 e MMP9 apresentaram diferença entre os grupos. Enquanto a expressão gênica de IL-18 (Figura 6D) foi maior no grupo LDE-PTX ($p=0,0343$), a expressão gênica de MMP9 foi menor ($p=0,0061$; Figura 7C).

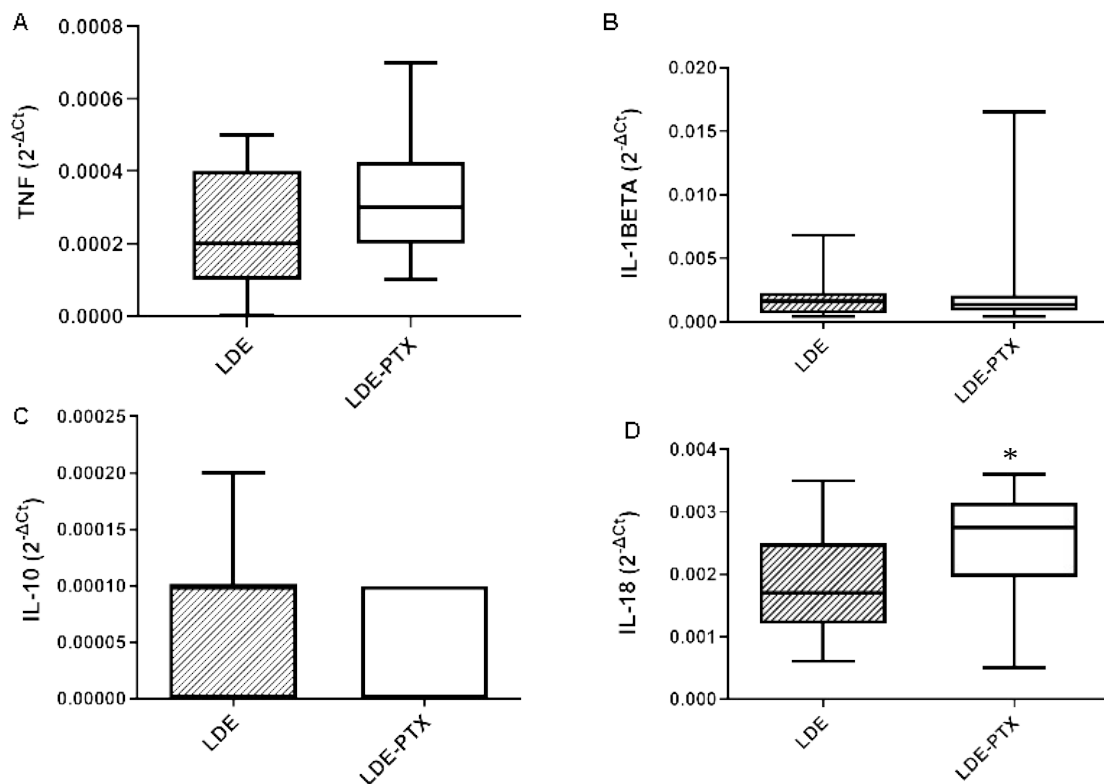


Figura 14 – Expressão gênica bruta de TNF (A), IL-1BETA (B), IL-10 (C) e IL-18 (D) no tecido cardíaco, comparando-se os grupos LDE e LDE-PTX. * $p<0,05$

Os demais fatores inflamatórios analisados (IL-1beta, IL-10, TNF, VCAM, MCP1 e MMP12) não apresentaram diferença entre os grupos.

Para todos os cálculos de expressão gênica o gene GAPDH foi utilizado como normalizador.

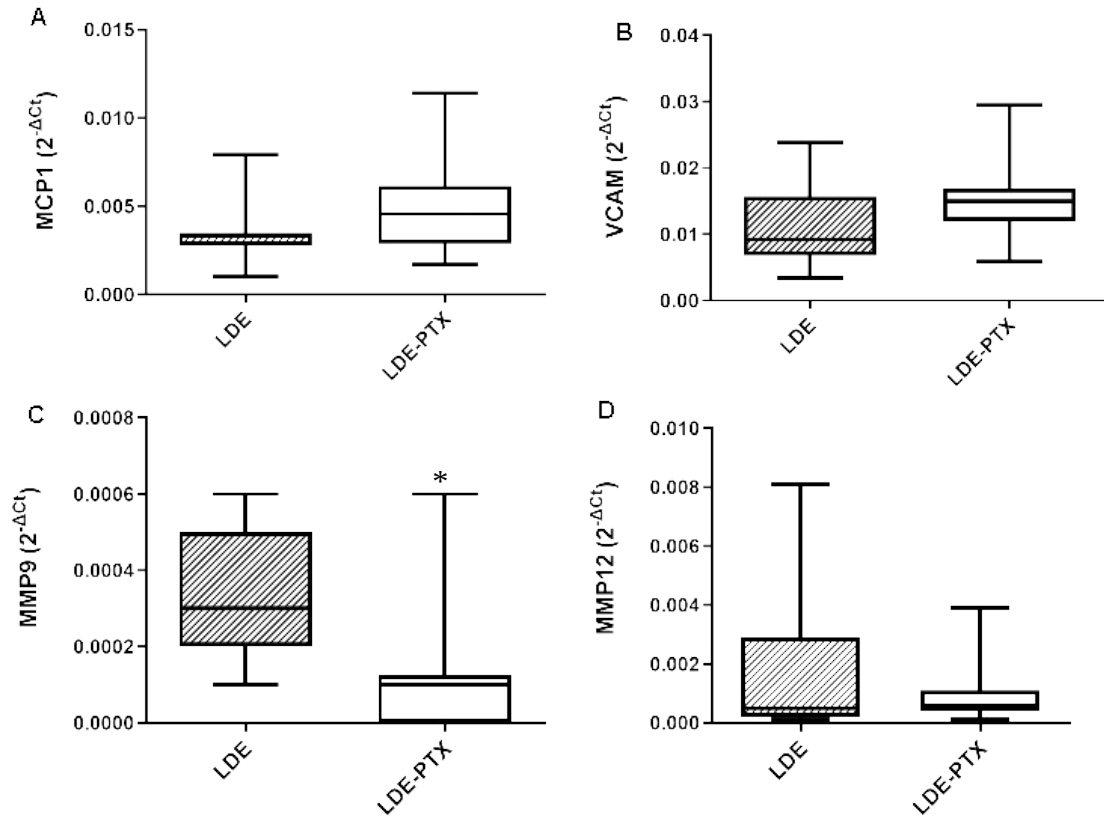


Figura 15 – Expressão gênica bruta de MCP1 (A), VCAM (B), MMP9(C) e MMP12 (D) no tecido cardíaco, comparando-se os grupos LDE e LDE-PTX. *p<0,05

As Figuras 16, 17 e 18 mostram a análise da expressão gênica nas aortas dos coelhos. A expressão gênica bruta de LDLR, LRP1, CD-36, VCAM, MCP1, IL-10, IL-18, MMP9 e MMP12 não apresentou diferença entre os grupos estudados.

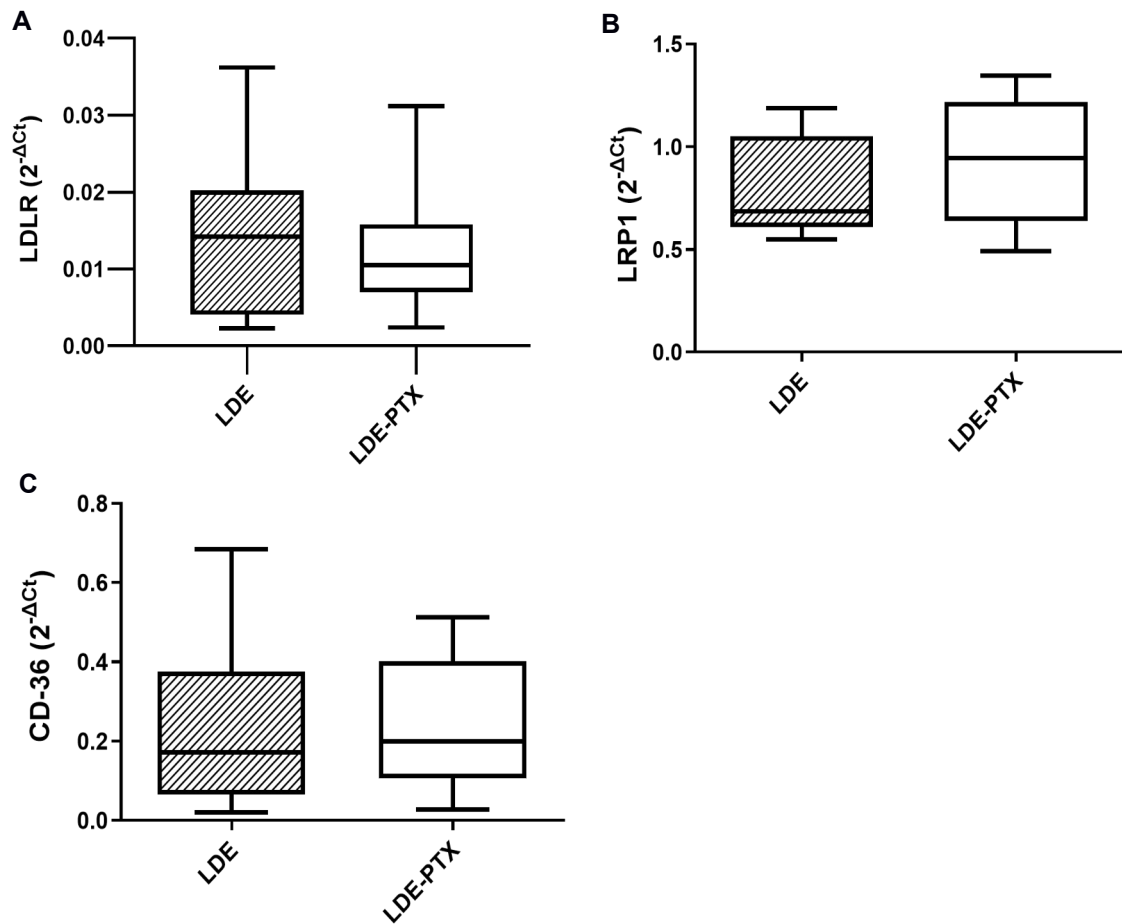


Figura 16 – Expressão gênica bruta de LDLR (A), LRP-1 (B) e CD-36 (C) nas aortas comparando-se os grupos LDE e LDE-PTX.

Por outro lado, a expressão gênica de IL-1BETA ($p=0,0372$) e de TNF ($p=0,0084$) foi maior no grupo LDE-PTX.

Para todos os cálculos de expressão gênica o gene GAPDH foi utilizado como normalizador.

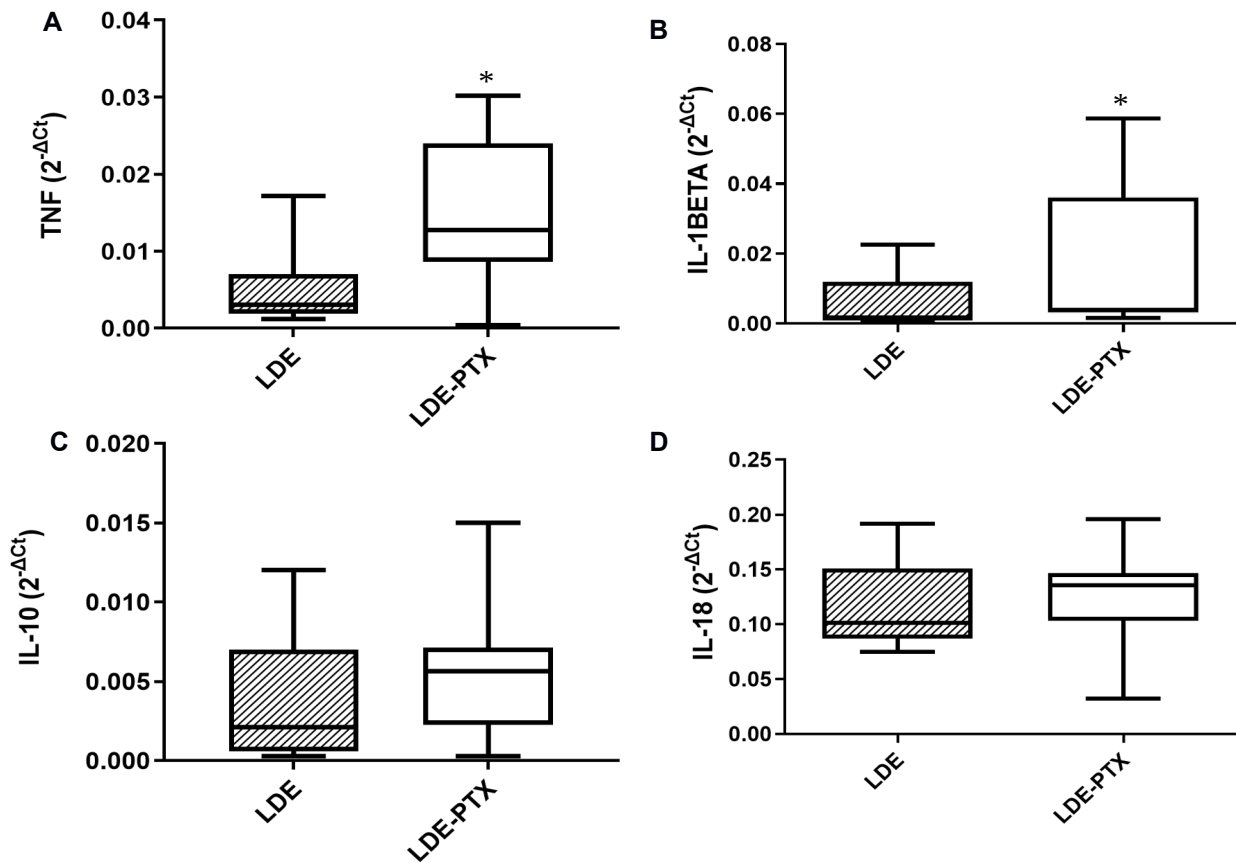


Figura 17 – Expressão gênica bruta de TNF (A), IL-1BETA (B), IL-10 (C) e IL-18 nas aortas comparando-se os grupos LDE e LDE-P TX. * $p<0,05$

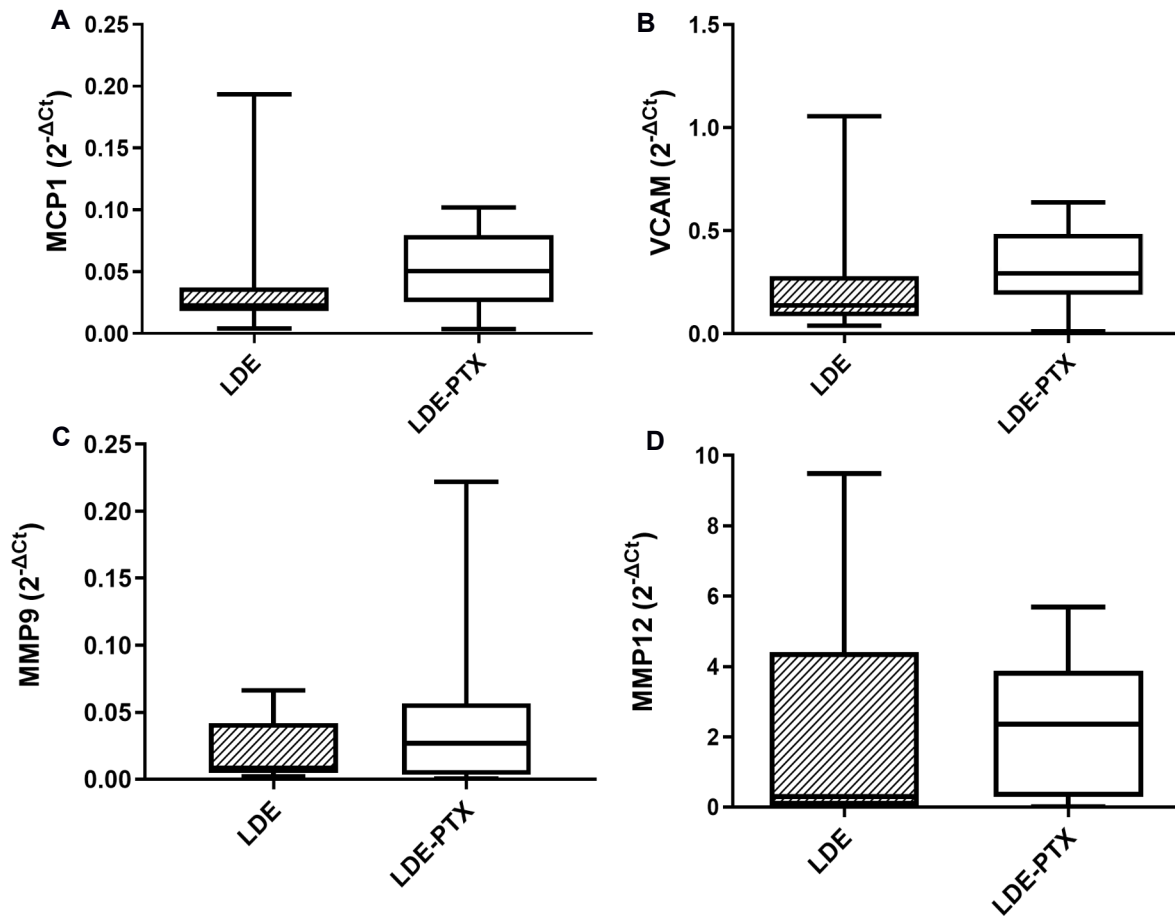


Figura 18 – Expressão gênica bruta de MCP1 (A), VCAM (B), MMP9 (C) e MMP12 (D) nas aortas comparando-se os grupos LDE e LDE-PTX.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho buscamos elucidar a aplicação de farmacoterapia a base do antineoplásico paclitaxel associado a nanoemulsão lipídica LDE para o tratamento da aterosclerose induzida em coelhos, de modo a ampliar o arsenal farmacológico contra a doença. Estudos prévios de nosso laboratório demonstraram que fármacos associados à LDE tem maior concentração no tecido alvo (5), neste caso artérias aortas.

Podemos observar que coelhos submetidos à alimentação suplementada com 1% de colesterol, apesar da boa aceitação da dieta no começo, não apresentam grandes variações de peso durante o protocolo experimental. Os animais, no início do protocolo, já estão em idade reprodutiva (tendo passado da fase de engorda), sendo a alimentação oferecida uma vez ao dia, então espera-se que não tenham um aumento de peso significativo (37). Neste ponto, também observamos que, após 4 semanas de alimentação suplementada com colesterol, a ingesta da ração hipercolesterolêmica pelos animais diminui de maneira discreta, podendo ser em decorrência do início de tratamento, LDE ou LDE-PTX, que aumenta os estímulos de estresse no animal, 0e/ou da diminuição da palatalabilidade.

Em relação ao perfil hematológico dos animais, vemos que a dieta e o tratamento baseado na nanopartícula, com ou sem paclitaxel, não promove alterações significativas nos parâmetros analisados, inclusive evidenciando que não se observa neutropenia nesses animais, um dos efeitos colaterais típicos do fármaco (38), dado este que já observamos em trabalhos anteriores. Neste ínterim, a dieta hipercolesterolêmica e o tratamento baseado na LDE também

não modificam níveis séricos das enzimas transaminases (ALT e AST) no fígado, não havendo grande concentração de macrófagos, receptores de LDL e TNF- α no órgão, quando comparados os dois grupos de estudo, além da área de deposição de colágeno ser condizente com os altos níveis séricos de colesterol proveniente da dieta. Tampouco as enzimas renais ureia e creatinina sofreram alteração, reafirmando a baixa toxicidade do tratamento e sua boa tolerabilidade, sem reações adversas.

Apesar da formação de placas de ateroma ter se mostrado diminuída neste trabalho em comparação a outros estudos, vemos que houve um aumento de mais de 40x nos níveis séricos de colesterol total, o que comprova a efetividade do modelo experimental, mas abre debate em relação a resistência dos animais em desenvolver placas ateroscleróticas que observamos. Esse dado se comprova ao analisarmos as imagens macroscópicas das artérias marcadas com corante Sudan IV. Enquanto já se observou até 70% de área de placa em relação a área total do vaso (8), os animais utilizados neste estudo pouco tem alterações macro ou microscópicas, reforçando a especulação acerca da possível resistência deste grupo de animais.

Também podemos inferir que tanto a dieta hipercolesterolêmica quanto o tratamento baseado na LDE, associada ao paclitaxel ou não, não interfere na expressão gênica bruta dos receptores de LDL e scavengers LRP1 e CD36 no tecido cardíaco dos coelhos, do mesmo modo que não apresentou diferença nos fatores pró e anti-inflamatórios, com exceção da interleucina 18 e metaloproteinase 9. Enquanto o tratamento com LDE-PTX aumentou a

expressão gênica de IL-18, de caráter pró inflamatório, a expressão gênica de MMP9 diminuiu, observando-se o tecido cardíaco.

Ainda na expressão gênica, ao examinarmos as artérias aortas dos animais, não houve diferenças nos fatores LDLR, LRP1, CD-36, VCAM, MCP1, IL-10, IL-18, MMP9 e MMP12. Apenas os fatores IL-1Beta e TNF, ambos de caráter pró inflamatório, tiveram aumento significativo nos animais tratados com LDE-PTX. Esse aumento vai de acordo com a teoria que explica o início da resposta inflamatória no processo aterosclerótico (4), apoiando que houve desenvolvimento da doença nos animais, talvez de maneira mais lenta e gradual, sugerindo que um aumento no tempo de indução e tratamento poderiam diminuir os reveses enfrentados no protocolo.

Confirmando nossos estudos anteriores com a preparação LDE-PTX em animais de experimentação (5, 6,7 8, 9) e em pequenos ensaios clínicos com pacientes com cânceres sólidos avançados (39) e com ateromas da aorta (40), o tratamento foi virtualmente desprovido de toxicidade observável. Nosso estudo anterior em coelhos (5) e um estudo piloto em pacientes com ateroma aórtico (41) levantam expectativas esperançosas de que a formulação LDE-PTX pode ser um tratamento de resposta rápida para pacientes com doença aterosclerótica grave, com risco de vida (42). Um ensaio clínico em andamento está explorando os efeitos do LDE-PTX em pacientes com doença arterial coronariana. Deste modo, pelo que sabemos, animais com hiperlipidemia intensa, mas sem desenvolvimento correspondentemente de ateroma não foram anteriormente relatados na literatura. Nesse cenário, nossos achados atuais podem ser úteis para a interpretação de resultados de experimentos com

animais e ensaios clínicos que do tratamento da aterosclerose com sistemas de nanopartículas.

6. CONCLUSÃO

– Apesar da exuberante resposta plasmática à ração com 1% de colesterol, com hipercolesterolemia intensa, os animais, inesperadamente, apresentaram escasso desenvolvimento de lesões ateroscleróticas, caracterizando um padrão de resistência à indução da doença não descrito na literatura.

– Além disso, o tratamento com LDE-paclitaxel, que havia resultado em diminuição marcante da extensão e espessura das lesões em nosso estudo anterior, não produziu resposta no presente estudo. Isto certamente se relaciona com a ausência de efeitos destacados da LDE-paclitaxel sobre os fatores inflamatórios.

– Esses resultados podem ser úteis para a interpretação de dados de futuros ensaios clínicos LDE-PTX e os coelhos com hipercolesterolemia intensa e baixa resposta aterogênica podem vir a ser um interessante modelo experimental para estudo da resistência à aterogênese.

7. REFERÊNCIAS

1. Ueber experimentelle Choleserinsteatose und ihre Bedeutung fur die Entstehung einiger pathologischer Prozesse. N. Anitschkow and S. Chalатов, Zentralbl. Allg. Pathol., 24 (1913), pp. 1-9
2. Ueber die Veranderungen der Kaninchenaorta bei experimenteller Cholesterinsteatose. N. Anitschkow Beitr. Pathol. Anat., 56 (1913), pp.379-404
3. Orlandi A, Ferlosio A, Gabbiani G, Spagnoli LG, Ehrlich PH. Phenotypic heterogeneity influences the behavior of rat aortic smooth muscle cells in collagen lattice. *Exp Cell Res.* 2005 Dec 10;311(2):317-27. doi: 10.1016/j.yexcr.2005.10.008.
4. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999; 14;340(2):115-126.
5. Maranhão RC, Tavares ER, Padoveze AF, Valduga CJ, Rodrigues DG, Pereira MD. Paclitaxel associated with cholesterol-rich nanoemulsions promotes atherosclerosis regression in the rabbit. *Atherosclerosis.* 2008;197(2):959-66.
6. Daminelli EN, Martinelli AE, Bulgarelli A, Freitas FR, Maranhão RC. Reduction of Atherosclerotic Lesions by the Chemotherapeutic Agent Carmustine Associated to Lipid Nanoparticles. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2016 Oct;30(5):433-443. doi: 10.1007/s10557-016-6675-0.
7. 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. doi: 10.2147/IJN.S24048. Epub 2011 Oct 12.

8. Bulgarelli A, Martins Dias AA, Caramelli B, Maranhão RC. Treatment with methotrexate inhibits atherogenesis in cholesterol-fed rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2012 Apr;59(4):308-14. doi: 10.1097/FJC.0b013e318241c385.
9. Meneghini BC, Tavares ER, Guido MC, Tavoni TM, Stefani HA, Kalil-Filho R, Maranhão RC. Lipid core nanoparticles as vehicle for docetaxel reduces atherosclerotic lesion, inflammation, cell death and proliferation in an atherosclerosis rabbit model. *Vascul Pharmacol.* 2019 Apr;115:46-54. doi: 10.1016/j.vph.2019.02.003.
10. World Health Organization. Cardiovascular diseases. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)). Acesso em julho, 2022.
11. Faludi AA, Izar MCO, Saraiva JFK, Chacra APM, Bianco HT, Afiune A Neto, Bertolami A, Pereira AC, Lottenberg AM, Sposito AC, Chagas ACP, Casella A Filho, Simão AF, Alencar AC Filho, Caramelli B, Magalhães CC, Negrão CE, Ferreira CEDS, Scherr C, Feio CMA, Kovacs C, Araújo DB, Magnoni D, Calderaro D, Gualandro DM, Mello EP Junior, Alexandre ERG, Sato EI, Moriguchi EH, Rached FH, Santos FCD, Cesena FHY, Fonseca FAH, Fonseca HARD, Xavier HT, Mota ICP, Giuliano ICB, Issa JS, Diamant J, Pesquero JB, Santos JED, Faria JR Neto, Melo JX Filho, Kato JT, Torres KP, Bertolami MC, Assad MHV, Miname MH, Scartezini M, Forti NA, Coelho OR, Maranhão RC, Santos RDD Filho, Alves RJ, Cassani RL, Betti RTB, Carvalho T, Martinez TLDR, Giraldez VZR, Salgado W Filho. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017. *Arq Bras Cardiol.* 2017 Jul;109(2 Supl 1):1-76. Portuguese. doi: 10.5935/abc.20170121. Erratum in: *Arq Bras Cardiol.* 2017 Nov;109 (5):499.

12. Zipes DP, Libby P, Bonow RO, Braunwald E. *Braunwald's heart disease: a textbook of cardiovascular disease*. 7 ed. Philadelphia: Saunders, 2005.
13. Choy P C, Siow YL, Mymin D, Karmin O. Lipids and atherosclerosis. *Biochem. Cell Biol.*, v.82, p. 212-224, 2004.
14. Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med*. 2002;8(11):1249-1256.
15. 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.
16. Ho YK, Smith RG, Brown MS, Goldstein JL. Low-Density Lipoprotein (LDL) Receptor Activity in Human Acute Myelogenous Leukemia Cells. *Blood*. 1978;52:1099.
17. Ylä-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Carew TE, Butler S, Witztum JL, Steinberg D. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J. Clin. Invest.*, v.84, p.1086-1095, 1989.
18. Wu H, Moulton KS, Glass CK. Macrophage scavenger receptors and atherosclerosis. *Trends Cardiovasc. Med.*, v.2, p. 220-225, 1992.
19. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis: The road ahead. *Cell.*, v.104, p.503-516, 2001.
20. Stocker R, Keaney Junior JF. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol. Rev.*, v.84, p.1381-1478, 2004.

21. Kaperonis EA, Liapis CD, Kakisis JD, Dimitroulis D, Papavassiliou VG. Inflammation and atherosclerosis. *Eur J VascEndovasc Surg*. 2006 Apr;31(4):386-393.
22. de Nigris F, Sica V, Herrmann J, Condorelli G, Chade AR, Tajana G, Lerman A, Lerman LO, Napoli C. c-Myc oncoprotein: cell cycle-related events and new therapeutic challenges in cancer and cardiovascular diseases. *Cell Cycle*. 2003; 2(4):325-328.
23. Geng YJ, Libby P. Progression of atheroma: a struggle between death and procreation. *ArteriosclerThrombVasc Biol*. 2002;22(9):1370-1380.
24. Maranhão RC, Garicochea B, Silva E, Llacer PD, Pileggi FJC, Chamone DAF. Increased plasma removal of microemulsions resembling the lipid phase of low-density lipoproteins (LDL) in patients with acute myeloid leukemia: a possible new strategy for treatment of the disease. *Brazilian J Med Biol Res*, v.25, p.1033-7, 1992.
25. Maranhão RC, Garicochea B, Silva EL, Llacer PD, Cadena SMS, Coelho IJC, Meneghetti JC, Pileggi FJC, Chamone DAF. Plasma kinetics and biodistribution of a lipid emulsion resembling low-density lipoprotein in patients with acute leukemia. *Cancer Research*, v. 54, p. 4660-66, 1994.
26. 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) 81: 84.
27. Graziani SR, Igreja FAF, Hegg R, Meneghetti C, Brandizzi LI, Barboza R, Amâncio RF, Pinotti JA, Maranhão RC. Uptake of a cholesterol-rich emulsion by breast cancer. *Gynecol. Oncol* (2002) 85: 493.

28. Dorlhiac-Llacer PE, Marquezini MV, Toffoletto O, Carneiro RCG, Maranhão RC, Chamone DAF. In vitro cytotoxicity of the LDE: daunorubicin complex in acute myelogenous leukemia blast cells. *Brazi J. Med. Biol. Res.*, v. 34, p. 1257-1263, 2001.
29. Valduga CJ, Fernandes DC, LoPrete AC, Azevedo CH, Rodrigues DG, Maranhão RC. Use of a cholesterol-rich microemulsion that binds to low-density lipoprotein receptors as vehicle for etoposide. *J PharmPharmacol.* 2003;55(12):1615-1622.
30. Teixeira RS, Cury R, Maranhão RC. Effects on Walker 256 tumour of carmustine associated with a cholesterol-rich microemulsion (LDE). *J PharmPharmacol* 2004;56(7):909–14.
31. Rodrigues DG, Maria DA, Fernandes DC, Valduga CJ, Couto RD, Ibanez OC, Maranhão RC. Improvement of paclitaxel therapeutic index by derivatization and association to a cholesterol-rich microemulsion: *in vitro* and *in vivo* studies. *CancerChemotherPharmacol.* 2005;55(6):565-576
32. LoPrete A, Maria DA, Rodrigues DG, et al. Evaluation in melanomabearing mice of an etoposide derivative associated to a cholesterol-rich nanoemulsion. *J Pharm Pharmacol* 2006;58(6):801–8.
33. 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 Chemother. Pharmacol* (2002)49: 487.
34. David-Couto R, Dallan LAO, Lisboa LAF, Kawabe LT, de Oliveira SA, Maranhão RC. Deposition of cholesterol from a lipid microemulsion in fragments of blood vessels excised from patients during coronary bypass surgery. *Atheroscler Suppl.* 2003;(2):227-228. Abstract.

35. Gomes, F. L. T., Maranhão, R. C., Tavares, E. R., Carvalho, P. O., Higuchi, M. L., Mattos, F. R., ... Serrano, C. V. (2018). Regression of Atherosclerotic Plaques of Cholesterol-Fed Rabbits by Combined Chemotherapy With Paclitaxel and Methotrexate Carried in Lipid Core Nanoparticles. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. 2018 Apr; 23(6), 561–569.
36. Puk CG, Vinagre CG, Bocchi E, Bacal F, Stolf N, Maranhão RC. Plasma kinetics of a cholesterol-rich microemulsion in patients submitted to heart transplantation. *Transplantation*. 2004 Oct 27;78(8):1177-81. doi: 10.1097/01.tp.0000137788.15004.7f.
37. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
38. COUTO; S, E, R. “CRIAÇÃO E MANEJO DE COELHOS”. Available from SciELO Books . Editora FIOCRUZ. RIO DE JANEIRO – RJ, BRASIL, 2002.
39. Pazdur R, Kudelka AP, Kavanagh JJ, Cohen PR, Raber MN. The taxoids: paclitaxel (Taxol) and docetaxel (Taxotere). *Cancer Treat Rev*. 1993 Oct;19(4):351-86. doi: 10.1016/0305-7372(93)90010-o.
40. Vital CG, Maranhão RC, Freitas FR, Van Eyll BM, Graziani SR. Use of paclitaxel carried in lipid core nanoparticles in patients with late-stage solid cancers with bone metastases: Lack of toxicity and therapeutic benefits. *J Bone Oncol*. 2022 Apr 20;34:100431. doi: 10.1016/j.jbo.2022.100431.
41. Shiozaki AA, Senra T, Morikawa AT, Deus DF, Paladino-Filho AT, Pinto IM, Maranhão RC. Treatment of patients with aortic atherosclerotic disease with paclitaxel-associated lipid nanoparticles. *Clinics (Sao Paulo)*. 2016 Aug;71(8):435-9. doi: 10.6061/clinics/2016(08)05.

42. Xu H, Li S, Liu YS. Nanoparticles in the diagnosis and treatment of vascular aging and related diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 2022 Jul 11;7(1):231. doi: 10.1038/s41392-022-01082-z.