

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

NÚBIA DA SILVA NASCIMENTO

AVALIAÇÃO IN VIVO DO CILOSTAZOL NANOENCAPSULADO EM
ARTÉRIACARÓTIDA DE RATOS WISTAR: ESTUDO INTERDISCIPLINAR

PONTA GROSSA
2018

NÚBIA DA SILVA NASCIMENTO

AVALIAÇÃO IN VIVO DO CILOSTAZOL NANOENCAPSULADO EM ARTÉRIA
CARÓTIDA DE RATOS WISTAR: ESTUDO INTERDISCIPLINAR

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Zanetti
Gomes

PONTA GROSSA

2018

Nascimento, Núbia da Silva

N244 Avaliação in vivo do Cilostazol Nanoencapsulado em artéria carótida de ratos Wistar: estudo interdisciplinar/ Núbia da Silva Nascimento. Ponta Grossa, 2018.
60f.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Estadual de Ponta Grossa

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Zanetti Gomes.

1. Cilostazol. 2. Doença carotídea extracraniana. 3. Inibidor da fosfodiesterase III. 4. Liberação modificada. 5. Nanotecnologia. I. Farago, Paulo Vitor. II. Gomes, Ricardo Zanetti. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. IV. T.

CDD : 610

NÚBIA DA SILVA NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO IN VIVO DO CILOSTAZOL NANOENCAPSULADO EM
ARTÉRIA CARÓTIDA DE RATOS WISTAR: ESTUDO
INTERDISCIPLINAR**

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde na
Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de Atenção Interdisciplinar em Saúde.

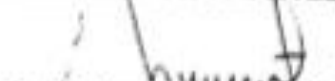
Ponta Grossa, 28 de maio de 2018.



Prof. Dr. Paulo Vítor Farnago - Orientador
Doutor em Química
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Profa. Dra. Andréia Cristina Conegero Sanches
Doutora em Ciências Farmacéuticas
Universidade Estadual do Oeste do Paraná



Prof. Dr. Cesar Roberto Busato
Doutor em Princípios de Cirurgia
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Dedico o presente trabalho para a minha avó Hilda (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, instituição na qual sempre sonhei em estudar e finalmente tive a oportunidade na pós-graduação.

Aos idealizadores do programa de pós-graduação em Ciências da Saúde, pois devido ao seu ímpeto visionário, várias pessoas poderão disseminar a importância do estudo.

Ao professor Dr. Paulo Vitor Farago pela grande oportunidade de ser sua orientanda.

Ao professor Dr. Ricardo Zanetti pela sua generosidade.

Aos professores Dr. Leandro Lipinski, Dr. Mário Montemore, Dr. Eduardo Campagnoli, Dr. Marcelo Schafranski.

Aos acadêmicos Luís Daniel Pilatti e Ricardo Rodrigues.

À Dra. Mona Lisa Simionatto Gomes pelo precioso trabalho proporcionou a realização do presente estudo.

Aos colegas e professores do mestrado.

Ao técnico de patologia Alexandre Ribeiro.

Aos colegas da instituição que de alguma forma contribuíram para a realização do presente trabalho.

Pelo suporte rotineiro: Iasmin, Simone, Marina, Laryssa, Meire Anne: “vale a pena nos esforçarmos por ações das quais nos orgulharemos no futuro”.

Ao confrontar diferentes hipóteses para explicar um mesmo fenômeno,
há de se selecionar as que envolvem menos ações e entidades.

(Guilherme de Ockham)

NASCIMENTO, N. S. **Avaliação in vivo do cilostazol nanoencapsulado em artéria carótida de ratos Wistar**: estudo interdisciplinar. Ponta Grossa, 2018. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2018.

RESUMO

O cilostazol é um inibidor seletivo da fosfodiesterase III que atua como antiagregante plaquetário e vasodilatador. Faz parte do tratamento clínico da doença aterosclerótica carotídea extracraniana, apresentando benefícios para o adequado fluxo sanguíneo local. Devido à sua característica lipofílica, é um excelente fármaco para o estudo do desenvolvimento de sistemas de liberação modificada, que objetivam melhorar a disponibilidade biológica. A aplicação de tecnologias em formulações, como nanosuspensões, caracteriza uma estratégia atrativa para melhorar a ação de compostos pouco solúveis em água como o Cilostazol. Este trabalho avaliou a ação do Cilostazol nanoencapsulado na túnica média da artéria carótida esquerda e no perfil lipídico de ratos Wistar. Os animais foram divididos em 4 grupos, que receberam soluções de nanocápsulas contendo cilostazol, nanocápsulas sem cilostazol, solução de propilenoglicol e cilostazol pesado. Foi observada diferença entre a espessura da carótida em micrômetros, entre os grupos que receberam o cilostazol nanoencapsulado e o grupo que recebeu a solução de propilenoglicol [70.22(9.2±47-81)IC95% 62-72] (P 0,019), sendo a maior espessura observada no grupo que recebeu o cilostazol nanoencapsulado. Não houve diferença em relação à celularidade em números absolutos, entre os grupos. Em relação ao perfil lipídico, o grupo que recebeu propilenoglicol apresentou valores maiores de HDL comparativamente ao grupo que recebeu a solução de cilostazol nanoencapsulado [56.85(10.5±37.7-83.7)IC95% 52.56-61.38] (P 0,01). O nível de triglicérides em mg/dL foi maior no grupo que recebeu o cilostazol pesado em relação ao grupo que recebeu a solução de nanocápsulas [116,92(56.37±45-266)IC95% 74.15-132.33] (P 0,01). O cilostazol pesado apresentou melhores resultados em relação ao perfil lipídico. A apresentação do cilostazol nanoencapsulado não demonstrou ser adequada para o tratamento da doença carotídea extracraniana devido ao fato de aumentar o perfil lipídico dos animais estudados. A estrutura da nanocápsula, por conter lipídios em seu interior, piorou o perfil lipídico. Os achados laboratoriais foram condizentes com os achados histopatológicos.

Palavras-chave: cilostazol, doença carotídea extracraniana, inibidor da fosfodiesterase III, liberação modificada, nanotecnologia.

NASCIMENTO, N. S. **In vivo evaluation of nanoencapsulated cilostazol in carotid artery of Wistar rats:** interdisciplinary study. Ponta Grossa, 2018. 60 p. Dissertation (Master in Health Sciences). State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2018.

ABSTRACT

Cilostazol is a selective inhibitor of phosphodiesterase III that acts as a platelet antiaggregant and vasodilator. It is part of the clinical treatment of extracranial atherosclerotic carotid disease, presenting benefits for adequate local blood flow. Due to its lipophilic characteristics, it is an excellent drug for the study of the development of modified release systems, which aim to improve biological availability. The application of technologies in formulations, such as nanosuspensions, characterizes an attractive strategy to improve the action of compounds little soluble in water like Cilostazol. This study evaluated the effect of nanoencapsulated Cilostazol on the left carotid artery layers and in the lipid profile of Wistar rats. The animals were divided into 4 groups, which received solutions of nanocapsules containing cilostazol, nanocapsules without cilostazol, solution of propylene glycol and heavy cilostazol. Differences were observed between carotid thickness in micrometers between groups receiving nanoencapsulated cilostazol and the group receiving the propylene glycol solution (70.22 (9.2 ± 47-81) 95% CI 62-72) (P <0.019), with the highest thickness observed in the group receiving nanoencapsulated cilostazol. There was no difference in cellularity in absolute numbers between the groups. Regarding the lipid profile, the group receiving propylene glycol had higher values of HDL in mg/dL, compared to the group that received the nanoencapsulated cilostazol solution [56.85 (10.5 ± 37.7-83.7) 95% CI 52.56-61.38] (P 0.01). The level of triglycerides in mg/dL was higher in the group that received the heavy cilostazol compared to the group that received the nanocapsule solution [116 (56.37 ± 45-116.92) CI95% 74.15-132.33] (P 0.01). The heavy cilostazol presented better results in relation to the lipid profile. The presentation of nanoencapsulated cilostazol has not been shown to be adequate for the treatment of extracranial carotid disease due to the fact that it increases the lipid profile of the animals studied. The structure of the nanocapsule, as it contained lipids, worsened the lipid profile. Laboratory findings were consistent with histopathological findings.

Keywords: cilostazol, extracranial carotid disease, phosphodiesterase III inhibitor, modified release, nanotechnology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Etapas do desenvolvimento da placa aterosclerótica.....	19
Figura 2	Placa aterosclerótica instável.....	20
Figura 3	Mecanismo intrínseco de ação do cilostazol no endotélio e nas plaquetas.....	29
Figura 4	Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliliméricas.....	33
Figura 5	Armazenamento da artéria carótida esquerda.....	40
Figura 6	Medidas da espessura da túnica média arterial.....	42
Figura 7	Aferição da celularidade.....	42
Figura 8	Aspectos histológicos da carótida do grupo 1.....	46
Figura 9	Aspectos histológicos da carótida do grupo 2.....	46
Figura 10	Aspectos histológicos da carótida do grupo 3.....	47
Figura 11	Aspectos histológicos da carótida do grupo 4.....	47

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Espessura da túnica média.....	45
Gráfico 2	Valores do colesterol HDL em mg/DL.....	49
Gráfico 3	Valores de triglicérides em mg/dL.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Peso dos ratos submetidos à análise histológica por grupos.....	38
Tabela 2	Peso dor ratos submetidos à análise bioquímica por grupos.....	38
Tabela 3	Média e desvio padrão da espessura da túnica média em micrômetros.....	45
Tabela 4	Celularidade em números absolutos.....	48
Tabela 5	Valores de colesterol total em mg/dL.....	48
Tabela 6	Valores de colesterol LDL em mg/dL.....	49
Tabela 7	Valores de colesterol HDL em mg/dL.....	50
Tabela 8	Valores de triglicerídeos em mg/dL.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA	Análise de variância
AVE	Acidente VascularEncefálico
CIL	Cilostazol
CT	Colesterol Total
DAOP	Doença Arterial Obstrutiva Periférica
DCE	Doença aterosclerótica carotídea extracraniana
DP	Desvio padrão
FDA	Food and Drug Administration
FED	Fosfodiesterases
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HE	Hematoxilina-Eosina
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
HDL	High Density Lipoprotein
NC0-PCL/PEG	Suspensões de nanocápsulas de PCL/PEG sem cilostazol
NC1-PCL/PEG	Suspensões de nanocápsulas de PCL/PEG com cilostazol (10,mg/mL)
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
μ	Micrômetro
NO	Óxido nítrico
PCL	poli (ε-caprolactona)
PEG	Polietilenoglicol
PVPI	Povidona-iodo
PTFE	Politetrafluoroetileno
QM	Quilomícron
RPM	Rotações por minuto
Span® 80	Monooleato de sorbitano
TCM	Triglicerídeos dos ácidos cápricocaprílico
TM	Túnica Média
TGL	Triglicerídeos
TMO	Terapia médica otimizada
Tween® 80	Polissorbato 80, monooleato de sorbitanoetoxilado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	15
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	15
3. REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1 COLESTEROL E SUAS FORMAS DE TRANSPORTE NO PLASMA.....	16
3.2 ATEROSCLEROSE	17
3.3 DOENÇA CAROTÍDEA EXTRACRANIANA E ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO ISQUÊMICO	19
3.4 ASPECTOS HISTOLÓGICOS DA ARTÉRIA CARÓTIDA.....	22
3.4.1 Túnica íntima e função do endotélio	22
3.4.2 Túnica Média	25
3.4.3 Túnica Adventícia	25
3.5 DOENÇA ATEROSCLERÓTICA E PROCESSO INFLAMATÓRIO ARTERIAL ...	26
3.6 ASPECTOS FARMACOLÓGICOS DO CILOSTAZOL	28
3.6.1 Farmacocinética	28
3.6.2 Mecanismo de ação do cilostazol.....	28
3.6.3 Ações farmacológicas do cilostazol.....	29
3.7 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA DO CILOSTAZOL.....	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 EQUIPAMENTOS	35
4.2 REAGENTES E SOLVENTES	35
4.2.1 Fármaco	35
4.2.2 Polímeros	35
4.2.3 Água Purificada	36
4.2.4 Solventes e demais reagentes	36
4.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	36
4.3.1 OBTENÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS.....	36
4.3.2 ANÁLISE <i>IN VIVO</i>	37
4.3.2.1 Divisão dos animais	37

4.3.2.2	Anestesia e eutanásia	39
4.3.2.3	Ato operatório e coleta de material biológico	39
4.3.3	Macroscopia	39
4.3.4	Microscopia	39
4.3.4.1	Preparo do material	40
4.3.4.2	Leitura das lâminas	41
4.3.5	Análise do perfil lipídico	42
4.3.6	VARIÁVEIS ANALISADAS	42
5	RESULTADOS	43
5.3.1	Dosagem do Colesterol Total	48
5.3.2	Dosagem do LDL	49
5.3.3	Dosagem do HDL	49
5.3.4	Dosagem de Triglicerídeos	50
6	DISCUSSÃO	52
7	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

O adequado suprimento sanguíneo cerebral é necessário para o bom funcionamento das funções cognitivas e motoras do ser humano. O fluxo sanguíneo alcança o território encefálico através das artérias carótidas e vertebrais. Os referidos vasos sanguíneos são alvo da aterosclerose, uma doença inflamatória difusa e degenerativa das artériascomplacas constituídas por células necróticas, lipídeos e cristais de colesterol. Tais placas podem causar estenose, embolização e trombose distal (QAJA; BHIMJI,2017). A aterosclerose tem predileção por determinadas artérias, incluindo a artéria carótida (SINGH et al.,2017).

A ocupação do lúmen arterial por uma placa de aterosclerose implica em riscode eventos isquêmicos cerebrais, devido ao potencial embolígenorelacionado à constituíçãoda placa aterosclerótica. O espectro de complicações em indivíduos jovens e economicamente ativos atingea economia e a qualidade de vida dos pacientes e familiares, como consequência de um evento neurológico restritivo e limitante. Estes são responsáveis pela morbimortalidade que complicações como paralisia de membros, dificuldade na fala e na deglutição implicam. As doenças cardiovasculares e suas consequências clínicas oneram o sistema público de saúde, representando significativos gastos na assistência médica. No Brasil, são registradas cerca de 68 mil mortes por acidente vascular encefálico (AVC) anualmente, o que representa a maior causa de morte no país (DATASUS, 2017).

Paralelamente à ocorrência de doenças ligadas a dietas ricas em lipídeos, tabagismo e doenças crônicas, o desenvolvimento de novos fármacos ativos contra a degeneração aterosclerótica no sistema vascular ocorre de forma substancial. O cilostazolé utilizado para o tratamento das doenças vasculares devido aos seus efeitos pleiotrópicos. Através da inibição seletiva da fosfodiesterase III, evita a agregação plaquetária e desempenha um papel como vasodilatador arterial direto (LEE et al.,2005). A despeito de sua eficaz ação farmacológica, a adequada adesão ao esquema terapêutico encontra limites nosefeitos colaterais associados, que incluem diarreia, taquicardia e cefaléia. Neste contexto, a utilização de sistemas nanocarreadores pode oferecer vantagens em relação às formas farmacêuticas convencionais. Tais sistemas compõem uma associação com determinado composto, sem alterações estruturais de ambos (carreador e composto carreado). São sistemas promissores para o transportedefármacos devido às suas

propriedades físico-químicas, que podem ser exploradas para melhorar o tratamento e a prevenção de diversas doenças (CHAVES et al.,2018).

Dessa forma, a existências de poucos trabalhos voltados à liberação modificada do cilostazol, aliada aos seguintes fatores: I) aumento da disponibilidade biológica do fármaco; II) necessidade de redução dos efeitos colaterais, almejando uma distribuição mais seletiva e ofertando maior segurança na administração; III) necessidade de otimizar a atividade vasodilatadora e antiagregante plaquetária do cilostazol; IV) importância do tratamento medicamentoso otimizado para a doença aterosclerótica carotídea extracraniana, são os principais argumentos que justificam a realização do presente estudo.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o efeito farmacológico do cilostazol nanoencapsulado nas túnicas arteriais da carótida esquerda e no perfil lipídico de ratos Wistar.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Efetuar a administração de nanosuspensões com e sem Cilostazol, cilostazol puro e solução de propilenoglicol (veículo) em ratos Wistar;
- Produção de lâminas histológicas e avaliação da celularidade na túnica muscular da artéria carótida esquerda de ratos Wistar;
- Avaliação do colesterol total, triglicerídeos, colesterol HDL e LDL no plasma de ratos Wistar.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 COLESTEROL E SUAS FORMAS DE TRANSPORTE NO PLASMA

O colesterol é um composto vital para diversos processos do organismo, dentre eles a formação das membranas celulares, a produção de hormônios sexuais, da vitamina D e sais biliares (SANTOS et al., 2013). O seu transporte pelo organismo é realizado por lipoproteínas, que são partículas compostas por um centro com ésteres de colesterol e triglicerídios, e envolvidos por uma camada de fosfolípídios (RAFIEIAN-KOPAEI et al., 2014; RAMASAMY, 2014)

As lipoproteínas são incorporadas às células por receptores específicos da membrana plasmática e metabolizados por sistemas enzimáticos próprios. Transportam o colesterol para as células e são classificadas de acordo com o seu tamanho e densidade. Os ácidos graxos livres, colesterol e glicerol formam micelas com ácidos biliares no lúmen do intestino. Essas então interagem com enterócitos, que permitem sua difusão. Após esse processo, ocorre o empacotamento desses componentes com a proteína apoproteína B-48, formando os quilomicrons (QM), que são secretados para a circulação distribuindo lipídios da dieta para o corpo. O HDL transfere a apoproteína E e a apoCII para quilomícrons. A apoCII permite que os QM sejam hidrolisados pela enzima lipoproteína lipase e sejam então absorvidos pelo fígado. Os lipídios intra-hepáticos são então secretados na forma de VLDL na circulação. Nos capilares, o LPL digere os triglicerídios do VLDL, formando ácidos graxos e glicerol, que serão utilizados ou armazenados pelos tecidos. Os remanescentes do catabolismo do VLDL formam IDL, e em seguida, o LDL (RAFIEIAN-KOPAEI et al., 2014; RAMASAMY, 2014).

A lipoproteína de alta densidade (HDL) realiza o transporte reverso do colesterol e inibe a oxidação de lipoproteínas, além de induzir a liberação de óxido nítrico. A lipoproteína de baixa densidade (LDL) é a principal transportadora de colesterol para as células. As LDLs possuem características aterogênicas quando em concentração excessiva no plasma, devido ao seu pequeno tamanho e consequente maior facilidade em penetrar no interior do vaso, gerando uma resposta inflamatória do endotélio. As enzimas presentes executam reações de oxidação e internalização da LDL oxidada para o interior da camada endotelial.

A LDL oxidada induz a ativação das células endoteliais, que produzem citocinas e quimiocinas responsáveis pela quimiotaxia, migração e adesão de leucócitos e expressão de moléculas de adesão. Dentro do espaço subendotelial, ocorre a diferenciação de monócitos em macrófagos. Devido à impossibilidade de degradar a LDL oxidada, os macrófagos tornam-se células espumosas, e ocorre uma resposta inflamatória intensa e produção de uma cápsula fibrótica. Após a formação da placa de aterosclerose, ocorre a migração de células musculares lisas oriundas da túnica média do vaso. Em seguida, ocorre a proliferação das mesmas e secreção de colágeno, componente da matriz extracelular.

Há uma forte associação entre o alto nível de colesterol plasmático e a incidência de aterosclerose (RAFIEIAN-KOPAEI et al., 2014). A causa desse fenômeno é o processo inflamatório desencadeado pelo LDL na camada subendotelial. A perda do fluxo laminar em leitos arteriais mais vulneráveis (locais de maior curvatura ou com bifurcação) causa estresse nas células do endotélio, que secretam óxido nítrico em resposta, acarretando em uma vasodilatação. Isso favorece a entrada de LDL e leucócitos na camada subendotelial. Nesse trajeto, o LDL liga-se a proteoglicanos, aumentando sua suscetibilidade à oxidação pelas espécies reativas de oxigênio; passando a apresentar um potencial inflamatório (ZMYSŁOWSKI; SZTERK, 2017). Em resposta, o endotélio passa a secretar quimiocinas, estimulando a migração de macrófagos para a região e a proliferação de tecido fibroso e muscular. Essa proliferação, associada ao crescimento da placa ateromatosa e a deposição de cálcio, causa esclerose e endurecimento dos vasos (RAFIEIAN-KOPAEI et al., 2014; ZMYSŁOWSKI; SZTERK, 2017).

3.2 ATEROSCLEROSE

A aterosclerose é uma das doenças com mais impacto na saúde mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) define aterosclerose como doença de artérias de grande ou médio calibre caracterizadas pelo acúmulo, na íntima, de lipídeos, carboidratos complexos, componentes do sangue e células. Tal doença, que acomete artérias elásticas e musculares, é uma das mais importantes causas de óbito em todo o mundo. É uma doença difusa que pode acometer todo o sistema arterial do organismo e consiste na formação de uma placa de ateroma na parede arterial (BARBALHO et al., 2015). Os sinais e sintomas da doença são referentes ao

órgão acometido como, por exemplo, rins, coração e cérebro. Inicia-se na infância, com a presença de estrias gordurosas assintomáticas ao longo dos vasos sanguíneos, podendo permanecer assintomática por décadas (LIBBY; THEROUX, 2005). Acomete preferencialmente a camada íntima das artérias, podendo afetar secundariamente também a camada média. As lesões são mais comuns em regiões onde o fluxo sanguíneo sofre alterações hemodinâmicas (SELWANESS et al., 2014), como em pontos de turbulência, o que ocorre em bifurcações ou na emergência de vasos de menor calibre.

Os principais fatores de risco são a predisposição genética e hábitos de vida. A presença de doenças crônicas é marcadamente associada com a aterosclerose, tais como tabagismo, obesidade, sedentarismo e hipertensão arterial sistêmica. O tabaco, devido à variedade de gases em sua composição, contribui com o desenvolvimento da aterosclerose na medida em que promove o estresse oxidativo do endotélio. Pacientes tabagistas têm maiores chances de desenvolver a doença aterosclerótica comparativamente à indivíduos não fumantes. A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é o fator de risco mais importante para acidente vascular encefálico. O espectro clínico de complicações relacionadas à HAS é amplo, tais como, além do acidente vascular encefálico (AVE), infarto agudo do miocárdio (IAM), insuficiência renal e doença arterial obstrutiva periférica (DAOP). As doenças cardiovasculares são um denominador comum em indivíduos diabéticos, e suas complicações representam a maior causa de morte nesta população de pacientes. A obesidade e o sedentarismo também estão associados com taxas elevadas de doenças crônicas do sistema cardiovascular (PHARR; COUGHENOUR; BUNGUM, 2018). Há uma íntima relação entre a obesidade e a aterosclerose. O aumento da concentração de lipídeos no plasma, principalmente LDL, concorre com o a elevação do risco de doenças cardiovasculares, que está intimamente associada à disfunção endotelial, que culmina com a resposta inflamatória e o estresse oxidativo, levando ao desenvolvimento da aterosclerose.

A aterosclerose também progride com uma elevação do colesterol sérico. O cilostazol demonstrou redução no colesterol total e triglicerídeo em alguns trabalhos (ITO et al., 2012).

Figura 1: Etapas do desenvolvimento da placa aterosclerótica



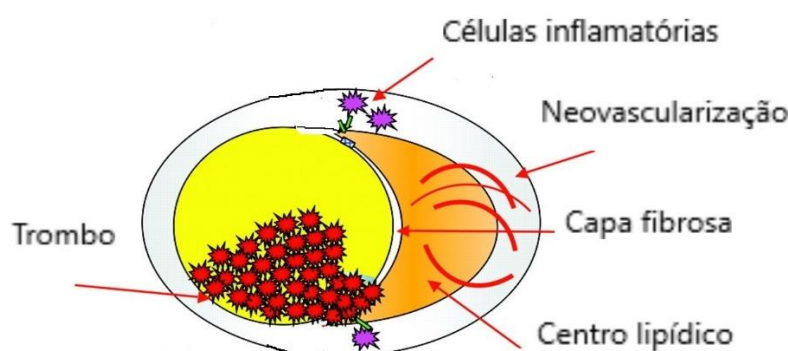
Fonte: MARICELIA-EDILMA. **Bioquímica celular**: blog de maricelia-edilma - UOL Blog. Disponível em: <<http://bioquimica.faculdade.zip.net/>>. Acesso em: 25 dez. 2017

3.3 DOENÇA CAROTÍDEA EXTRACRANIANA E ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO ISQUÊMICO

A artéria carótida representa a principal via de irrigação sanguínea cerebral. Por meio do seu aporte sanguíneo ocorre a nutrição do tecido cerebral e a realização de atividades vitais como execução motora, de planejamento; funções como visão, audição; dor, calor, tato e percepção de estímulos oriundos do ambiente exterior, o controle de emoções e das experiências sensoriais (MORAES, 2009). Anatomicamente, a artéria carótida é dividida em segmentos extra e intracranianos. O segmento extracraniano, localizado na região cervical, é composto pela artéria carótida comum, artéria carótida externa e artéria carótida interna. A artéria carótida externa é responsável pela irrigação sanguínea de estruturas do pescoço e face. A artéria carótida interna estende-se desde a bifurcação da artéria carótida comum até a base do crânio. Quando inicia seu trajeto dentro da caixa craniana, emite ramos responsáveis pela irrigação do tecido cerebral. Havendo alteração hemodinâmica ou morfológica no trajeto do fluxo sanguíneo para o território cerebral, ocorre o acidente vascular encefálico e seu consequente espectro de alterações clínicas. A doença oclusiva da artéria carótida pode causar acidente vascular cerebral por embolização, trombose e hipoperfusão. Acredita-se que a maioria dos acidentes vasculares

cerebrais secundários à aterosclerose carotídea cervical seja de etiologia embólica ou trombose no sítio de ruptura da placa (NIGHOGHOSSIAN; DEREK; DOUEK, 2005). Embora o grau de obstrução do lúmen arterial ainda seja um marcador do risco de acidente vascular encefálico, o papel da composição da placa é reconhecido como responsável por eventos neurológicos.

Figura 2: Placa aterosclerótica instável



Fonte: adaptado de NIGHOGHOSSIAN, N.; DEREK, L.; DOUEK P. The Vulnerable Carotid Artery Plaque: Current Imaging Methods and New Perspectives. *Stroke*, v. 36, n. 12, p. 2764-2772, 2005.

A placa aterosclerótica pode sofrer uma lesão superficial chamada de erosão da placa. Além da embolização distal de pequenos fragmentos, com consequente oclusão de ramos vasculares intracerebrais, ocorre a formação de irregularidades da superfície da placa propiciando a aderência de elementos figurados do sangue e formação de trombo. As placas calcificadas da artéria carótida extracraniana têm uma probabilidade significativamente menor de serem sintomáticas e, portanto, podem ser mais estáveis clinicamente do que placas não calcificadas. Foi encontrada uma relação inversa entre o grau de calcificação da placa e a infiltração de macrófagos nas estenoses carotídeas críticas (SHAALAN et al., 2004). A placa considerada responsável por eventos isquêmicos agudos geralmente apresenta uma capa fibrosa fina, grande concentração de lipídios e inflamação densa sob ou abaixo de sua superfície (NAGHAVI et al., 2003). Diferenças na frequência de trombose, ruptura da capa fibrosa, erosão e presença de infiltrado inflamatório já foram pesquisadas em pacientes com acidente vascular encefálico e em pacientes

assintomáticos. Acredita-se que a neovascularização patológica e a inflamação precipitam a ruptura ou a erosão da placa.

A primeira apresentação da doença carotídea extracraniana pode ser o acidente vascular encefálico isquêmico, provocando sintomas na dependência da área afetada. A embolização de fragmentos da placa aterosclerótica promove interrupção, mesmo que transitória, do suprimento sanguíneo cerebral, promovendo dano irreversível das células neuronais. Existem diferenças na espessura e composição da placa aterosclerótica entre ambas as artérias carótidas, que podem ser explicadas por fatores geométricos como o ângulo de bifurcação, e a configuração da artéria carótida esquerda com o arco aórtico. A conexão direta da artéria carótida esquerda com o arco aórtico, ao contrário da posição da artéria carótida direita, que surge a partir do tronco braquiocefálico, seria uma justificativa anatômica para a diferença de espessura detectada na espessura das placas ateroscleróticas, devido ao estresse hemodinâmico aplicado. A anatomia influencia as forças e vetores hemodinâmicos e devido à sua topografia, a artéria carótida esquerda pode ser exposta a pressões arteriais mais elevadas (SELWANESS et al., 2014).

A doença aterosclerótica da carótida extracraniana é uma das principais causas evitáveis de acidente vascular. O Acidente Vascular Encefálico (AVE) é principal causa de morte não violenta no Brasil e a principal causa de incapacidade no mundo. A Organização Mundial de AVE (World Stroke Organization) prevê que uma a cada seis pessoas no mundo terá um AVE ao longo de sua vida (MENEZES et al., 2013).

O AVE é uma síndrome causada por diferentes etiologias. Manifesta-se com um déficit neurológico súbito. Divide-se em hemorrágico, quando há ruptura de um vaso sanguíneo intracerebral, isquêmico, que é ocasionado pela interrupção ou redução significativa da irrigação sanguínea no território cerebral. Cerca de 50% a 80% de todos os AVEs são isquêmicos. Dentre estes, 15% a 50% dos acidentes isquêmicos decorrem da emissão de trombos por uma placa aterosclerótica instável localizada na artéria carótida extracraniana (MENEZES et al., 2013).

O ritmo de crescimento das doenças cardiovasculares é bem maior nas economias em desenvolvimento do que nos países do primeiro mundo: entre 1990 e 2020 estima-se nas primeiras um aumento de 130% e 110% na ocorrência de, respectivamente, cardiopatia isquêmica e doença cerebrovascular e, nos países

desenvolvidos um aumento respectivo de 35% e de 60% (GAZIANO, 2001). Os fatores de risco para a doença aterosclerótica carotídea extracraniana relacionam-se principalmente a doenças crônicas de alta prevalência, como idade avançada, tabagismo, dislipidemia e hipertensão arterial sistêmica. O diagnóstico é feito com exames de imagem, principalmente o ecodoppler arterial, um exame não invasivo que demonstra a presença da placa de aterosclerose em diferentes níveis de espessura.

O tratamento da doença aterosclerótica carotídea extracraniana (DCE) compõe-se de ações que visam ao combate dos fatores que causam danos à parede arterial como a hipertensão arterial sistêmica, diabetes, obesidade e tabagismo. O tratamento cirúrgico para a DCE foi o padrão-ouro durante vários anos. Porém, nem toda placa aterosclerótica torna-se sintomática e resulta em AVE, levando ao questionamento do tratamento cirúrgico em pacientes clinicamente estáveis. O paciente acometido pela doença aterosclerótica carotídea é considerado sintomático e candidato à intervenção cirúrgica em até 6 meses a partir do evento isquêmico, seja um acidente isquêmico vascular transitório ou permanente. Após este período, a conduta é a manutenção da terapia medicamentosa otimizada (NAYLOR et al., 2017). A terapia médica otimizada tem importância crucial devido ao fato de apresentar maior benefício quando observada a morbimortalidade do procedimento cirúrgico da doença aterosclerótica cerebral extracraniana. O tratamento medicamentoso orienta-se no sentido de aumentar a fluidez do sangue através da diminuição da agregação plaquetária e da formação e estabilização das placas de aterosclerose.

3.4 ASPECTOS HISTOLÓGICOS DA ARTÉRIA CARÓTIDA

Os vasos do sistema vascular sanguíneo são formados por camadas denominadas túnicas. Existem três túnicas nos vasos: túnica íntima, a mais interna, túnica média que é a camada intermediária, e a túnica adventícia, mais externa.

3.4.1 Túnica íntima e função do endotélio

A túnica íntima é constituída pelo endotélio, pela camada subendotelial de tecido conjuntivo frouxo com células musculares ocasionais e pela lâmina elástica

interna, de tecido elástico. Há relatos de que ocilostazol está associado à diminuição do espessamento da túnica íntima arterial (TAKIGAWA et al., 2010). As células endoteliais formam uma superfície lisa, diminuindo a fricção do fluxo sanguíneo. Essa superfície tem propriedades anticoagulantes e antitrombogênicas, relacionadas com a secreção do fator ativador de plasminogênio, a trombomodulina, o glicosaminoglicano sulfato de heparina, derivados de prostaglandina e prostaciclina e óxido nítrico. A prostaglandina e o óxido nítrico induzem o relaxamento das células musculares lisas. O endotélio modula o tônus vascular através da liberação de óxido nítrico e prostaglandinas. É um regulador primário da homeostase vascular (VITA; HAMBURG, 2010). A homeostase vascular é mantida pelo balanço entre fatores de contração e dilatação derivados do endotélio (MAIS; SILVA, 2009).

O endotélio forma uma camada contínua que reveste internamente todos os vasos sanguíneos. É constituído por um epitélio pavimentoso simples. Tais células são achatadas e alongadas de forma que cada célula endotelial circunde quase que totalmente o lúmen de um vaso de pequeno calibre. Repousa sobre uma lâmina basal. Esta camada de células é muito delgada e geralmente não costuma ser visível ao microscópio. É um epitélio formado por uma única camada de células planas, semelhantes a ladrilhos, porém de formas irregulares. Imediatamente abaixo das células endoteliais está a camada subendotelial, composta de tecido conjuntivo frouxo e poucas células musculares lisas, ambos orientados longitudinalmente. Abaixo da camada subendotelial há uma lâmina limitante elástica interna composta por camadas de elastina, que formam uma membrana que permite a difusão de substâncias para as regiões mais profundas da parede arterial e a nutrição das células ali localizadas.

Fatores importantes da disfunção endotelial são a diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) e aumento da afinidade do endotélio a leucócitos que estão associados aos eventos iniciais do processo aterogênico (LIMA; COUTO, 2006). O óxido nítrico é importante para a inibição da agregação plaquetária, da proliferação de células lisas musculares, adesão de células inflamatórias e angiogênese. Em condições patológicas, o endotélio também pode ser "ativado" para expressar fatores pró-trombóticos e pró-inflamatórios (VITA et al., 2010).

Trabalhos indicam que a vasodilatação induzida pelo ocilostazol em aorta torácica de ratos é dependente do endotélio (NAKAMURA; HOUCHI; MINAMI,

2001). Ao redor das células endoteliais, compartilhando a mesma lâmina basal, há os pericitos, de origem mesenquimatosa como as células endoteliais. Eles possuem núcleo alongado, prolongamentos citoplasmáticos e junções comunicantes com as células endoteliais. Filamentos de actina e miosina promovem a sua contração, regulando o fluxo sanguíneo. O endotélio é uma barreira funcional entre o lúmen e o vaso sanguíneo, e foi considerado durante muito tempo uma barreira inerte. Contudo, as funções das células endoteliais foram elucidadas, como a de fibrinólise, coagulação, tônus vasculares, crescimento e resposta imune. Há algum tempo, tem sido reconhecido não apenas como uma barreira física entre o sangue e a parede vascular, mas também como um órgão estrategicamente localizado e com múltiplas funções endócrinas, autócrinas e parácrinas (MATTHEWS et al., 2009). É um tecido altamente especializado, que regula a homeostase vascular. Suas funções básicas consistem na regulação do tônus vascular, da adesão de leucócitos, do crescimento das células musculares lisas e da agregação plaquetária. Fisiologicamente, o endotélio desempenha papel protetor do vaso sanguíneo. Essa ação acontece através de estímulos fisiológicos, como o estresse de cisalhamento, exercido pelo fluxo sanguíneo sobre as células endoteliais, que resulta na formação basal de óxido nítrico, mantendo o vaso sanguíneo em um estado de vasodilatação (TAKIGAWA et al., 2012). O endotélio ainda mantém as células musculares lisas com baixo poder de desenvolvimento e penetração. Exerce ações antitrombóticas locais através da produção do ativador do plasminogênio tecidual, mantendo sua superfície carregada negativamente, além de realizar a secreção de heparina e trombomodulina (BAHIA et al., 2006). As células endoteliais também exibem em sua constituição a enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). A disfunção das células endoteliais está associada a diminuição da capacidade de vasodilatação arterial, aumento da agregação plaquetária e espessamento da túnica íntima (ISHIZAKA et al., 1999).

O espessamento na camada íntima é uma causa comum de vasculopatia. É caracterizada pela transformação das células que compõem o compartimento multicamada da túnica íntima. A hiperplasia intimal é responsável por complicações vasculares em diferentes sistemas incluindo artérias coronárias, renais e periféricas. A disfunção endotelial é definida como a perda das propriedades vasoprotetoras do endotélio e piora das funções de relaxamento, com consequente perda do controle do tônus vascular. O dano endotelial direto é fator mais importante que induz a hiperplasia endotelial na DCE e na DAOP. O cilostazol diminui a hiperplasia intimal

através de múltiplos mecanismos, como a vasodilatação e ação antiplaquetária. Atenuou a hiperplasia intimal da artéria Aorta e diminuiu a liberação de mediadores inflamatórios em um modelo de isquemia renal unilateral em ratos (CHANCHAROENTHANA et al.,2017).

3.4.2 Túnica Média

A túnica média contém fibras musculares lisas e fibras colágenas, em quantidade variável conforme o tipo de vaso (artéria ou veia) e o seu calibre. Nas artérias a túnica média tem um número variável de lâminas elásticas, constituídas de material elástico, e representa a túnica predominante. Possui tecido elástico ou tecido muscular liso. O tecido elástico é composto por várias lâminas elásticas, produzidas por células musculares lisas. As lâminas elásticas são fenestradas, permitindo a difusão dos nutrientes. As células musculares lisas, organizadas em espiral, aparecem dispostas circularmente no corte do vaso. Possui uma lâmina elástica espessa. As camadas celulares concêntricas são formadas de células musculares. Entremeadas com as camadas de músculo liso estão as lâminas elásticas, colágeno de tipo III e proteoglicanos. As células musculares lisas secretam a matriz extracelular existente na túnica média dos vasos. As artérias musculares maiores possuem uma lâmina limitante externa, que separa a túnica média da túnica adventícia que a envolve (BRASILEIRO et al.,2011). Essas células musculares lisas são ligadas umas às outras por junções GAP, que permitem contrações coordenadas da túnica média.

3.4.3 Túnica Adventícia

A túnica adventícia é formada por tecido conjuntivo frouxo, o qual se continua com o tecido conjuntivo frouxo do órgão onde o vaso está inserido. Possui fibras colágenas, elásticas e proteoglicanas sintetizadas pelos fibroblastos. Pode conter feixes musculares dispostos longitudinalmente. Formada de tecido conjuntivo propriamente dito e tem principalmente fibroblastos, fibras colágenas do tipo I e fibras elásticas orientadas longitudinalmente. A adventícia também possui vasos sanguíneos destinados à nutrição dos tecidos que constituem as várias túnicas do próprio vaso. São pequenas artérias e veias que podem existir na adventícia. Nas

veias mais calibrosas existem também na túnica média (BRASILEIRO et al.,2011). Estes vasos são denominados *vasa vasorum*, expressão em latim que significa "vasos dos vasos". Os vasos são nutridos pela difusão de metabólitos do sangue que passa na sua luz, mas as túnicas média e adventícia de vasos de grande calibre não são alcançadas.

3.5 DOENÇA ATEROSCLERÓTICA E PROCESSO INFLAMATÓRIO ARTERIAL

Devido à pressão sistólica, a túnica íntima das artérias apresenta lesões em sua integridade, evoluindo com espessamento pela infiltração de material lipídico e deposição de colágeno. A lesão pode atingir a túnica média, com destruição do tecido elástico e células musculares seguindo-se pela deposição do colágeno. As alterações na constituição da parede dos vasos prejudicam o fluxo de sangue e contribuem para a formação de trombos. Estes resultam da agregação plaquetária sobre a superfície lesada e podem até mesmo causar a obstrução do vaso. A artéria carótida é um vaso elástico, com grande quantidade de material distribuído paralela e concêntricamente em relação à sua luz, na túnica média. Tal estrutura possibilita o ciclo de constrição e dilatação ao qual os vasos arteriais são submetidos.

Devido à agressão ao endotélio, ocorre a liberação de mediadores inflamatórios, expressão de moléculas de adesão e exsudação de leucócitos para a camada íntima das artérias. Placas ateromatosas contêm células inflamatórias, sobretudo macrófagos e linfócitos T ativados, sendo os últimos atraídos por quimiocinas. Após lesão do vaso, como a instalação de uma placa aterosclerótica, leucócitos circulantes são recrutados e migram para o local acometido e, em seguida, ocorre a proliferação de células musculares lisas e a proliferação da camada íntima. A aterosclerose é caracterizada pela lesão do endotélio, adesão de leucócitos mononucleares, migração e proliferação de células musculares lisas, além da deposição de matriz extracelular (ROSS, 1999). É considerada uma doença inflamatória e, do ponto de vista patológico, todos os estágios de desenvolvimento da placa aterosclerótica – formação, crescimento e complicações – podem ser considerados como uma resposta inflamatória à lesão endotelial (LIBBY, 2002). Isso justifica não só o manejo agressivo dos fatores de risco modificáveis, como também o tratamento da lesão relacionada e a estabilização de outras lesões (LIBBY; THEROUX, 2005).

Na primeira etapa da imigração linfocitária, as células endoteliais e as células musculares lisas expressam e-selectina em sua superfície e fatores de adesão, resultando em acúmulo celular na área inflamatória. As células endoteliais expressam VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina para regular a adesão de leucócitos a adesão das próprias células endoteliais à matriz extracelular (OMI et al., 2002). Alguns leucócitos, então, aderem firmemente ao endotélio através de interações entre as moléculas de adesão dos leucócitos e várias moléculas como a molécula de adesão vascular (VCAM) -1 e molécula de adesão intercelular (TAKIGAWA et al., 2012).

O cilostazol tem um efeito anti-inflamatório, impedindo a expressão de VCAM-1 e de monócitos, impedindo a adesão de linfócitos nas células endoteliais (KIM et al., 2005). Recentemente, vários ensaios clínicos relataram que o uso de Cilostazol após o tratamento endovascular de artérias periféricas, coronárias e da artéria carótida diminuiu a taxa de estenose dentro do *stent* no caso do tratamento via endovascular (TAKIGAWA et al., 2010).

Estudos pré-clínicos mostraram que o cilostazol tem efeito protetor da apoptose em células endoteliais e inibe o crescimento e proliferação de células musculares lisas (HONG et al., 2003). A apoptose, ou morte celular programada, é uma importante função tecidual para manter a homeostase através da eliminação de células não desejadas e/ou prejudiciais. Está associada ao desenvolvimento da placa aterosclerótica e ocorre com maior frequência em placas avançadas.

Além do crucial papel do endotélio na aterogênese, devemos enfatizar a função das plaquetas. São organelas citoplasmáticas desprovidas de maquinário sintético proteico. Originam-se de megacariócitos oriundos da medula óssea. Permanecem a circulação durante aproximadamente 10 dias, sendo então inativadas pelas células reticuloendoteliais do baço e fígado (JÚNIOR; PEREIRA; PASA, 2006). Em condições normais, as plaquetas circulam em sua forma inativa, atuando em prol da hemostasia e trombose apenas quando a integridade do endotélio e a homeostase do fluxo sanguíneo sofrem alterações patológicas. A adesão das plaquetas ao endotélio é mediada via fibrinogênio. O choque das plaquetas com o endotélio desnudo provoca instabilidade e desintegração da placa aterosclerótica, com progressão do processo inflamatório da mesma ou até mesmo embolização distal de fragmentos.

3.6 ASPECTOS FARMACOLÓGICOS DO CILOSTAZOL

3.6.1 Farmacocinética

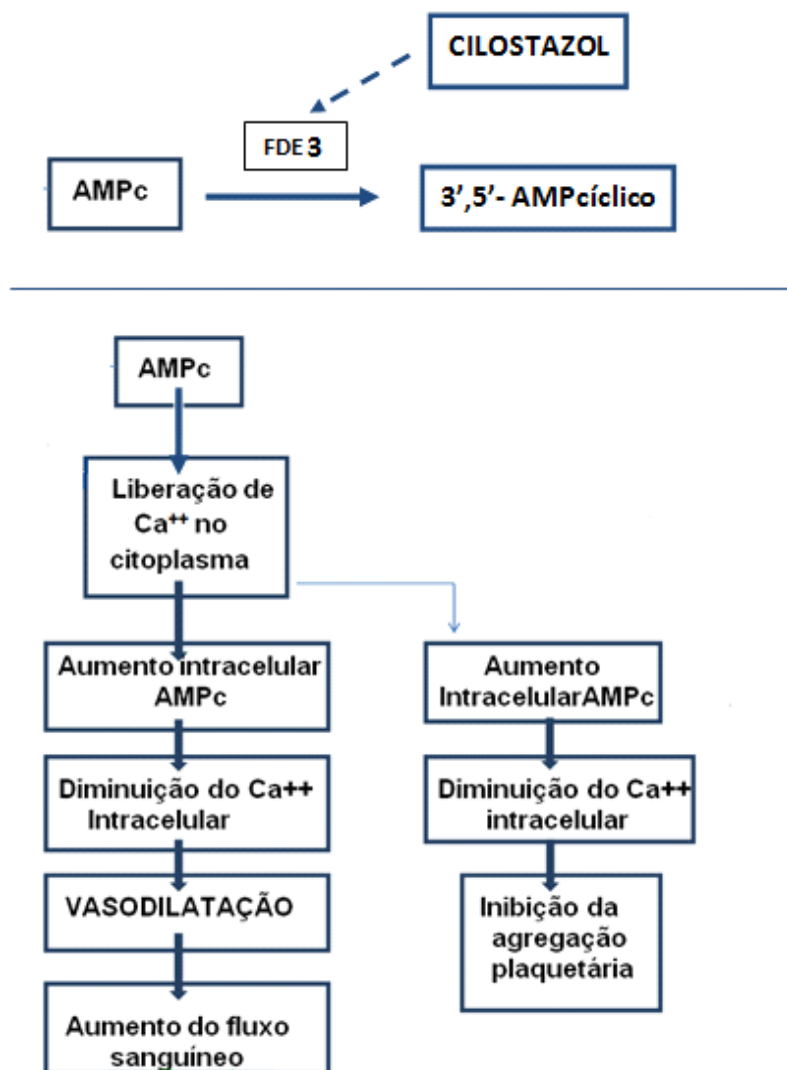
O cilostazol é um medicamento classe II do sistema de classificação biofarmacêutica, pouco solúvel em água, porém altamente lipofílico (SEO et al., 2015). Por isso, é fracamente absorvido no trato gastrointestinal, levando à redução da suabiodisponibilidade (DESAI; PRABHAKAR, 2014). As propriedades físico-químicas do cilostazol e sua influência bioquímica na homeostase vascular fazem dele um potencial candidato para sua incorporação em materiais novos para a aplicação na farmacologia cardiovascular (RYCHTER et al., 2018).

3.6.2. Mecanismo de ação do cilostazol

O monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) é um mensageiro químico que desempenha um papel fundamental na regulação da proliferação celular, apoptose, agregação de plaquetas e dilatação dos vasos sanguíneos. Tal processo de promoção e de regulação ocorre devido a sua conversão em 3',5'- AMP cíclico pela atividade da enzima fosfodiesterase III (FDE3). O cilostazol é um potente e seletivo inibidor da FDE3. O acúmulo de AMPc, causado pelo cilostazol por meio da diminuição da atividade da fosfodiesterase III, inicia uma cascata de eventos. Sua ação é justificada por evitar a agregação plaquetária e estimular o relaxamento dos vasos pelo aumento dos níveis de AMPc e liberação do vasodilatador óxido nítrico (ROSA; BARONI; PORTAL, 2008).

O mecanismo de ação do cilostazol se opõe aos fatores aterogênicos, resultando em melhora na hemodinâmica circulatória. Também inibe reversivelmente a agregação plaquetária induzida pelo difosfato de adenosina (ADP), colágeno, ácido araquidônico, epinefrina, tromboxano A₂, fator de ativação plaquetária e o estresse associado à deformação da plaqueta.

Figura 3: Mecanismo intrínseco de ação do cilostazol no endotélio e nas plaquetas



Fonte: Adaptado de ZHAO et al., 2007

3.6.3 Ações farmacológicas do cilostazol

O cilostazol é um antiagregante plaquetário e antitrombótico com ação vasodilatadora, não existindo evidências de prolongamento do tempo de sangramento quando comparado a outros medicamentos como ácido acetilsalicílico ou clopidogrel mesmo nas diversas combinações (KIM et al., 2005). Estudos recentes têm demonstrado que a terapia com cilostazol está associada a melhoria significativa na aterosclerose da artéria carótida em comparação com a aspirina em pacientes com risco cardiovascular aumentado (KAMAL et al., 2011). Também

exerce funções antiaterogênicas ao aumentar os níveis de HDL e diminuir os níveis de LDL (WEINTRAUB et al., 2006).

Inibe a replicação e o crescimento das células musculares lisas da artéria, possuindo efeito antiproliferativo (ROSA; BARONI; PORTAL, 2008). Estudos demonstraram que o cilostazol melhora a função endotelial aumentando a liberação de óxido nítrico e inibindo a formação de células espumosas e proliferação de células musculares lisas (KO et al., 2014).

É o fármaco de primeira escolha na claudicação intermitente devido à doença arterial obstrutiva periférica. Além disso, há evidências de que o cilostazol é eficaz no processo aterosclerótico cerebral, promovendo aumento do fluxo e volume sanguíneos e prevenindo infartos, especialmente lacunares e recorrentes, por diminuir a morte celular devido à apoptose e ao estresse oxidativo nas substâncias branca e parda (ROSA; BARONI; PORTAL, 2008).

Na dislipidemia, é capaz de reduzir eficazmente os níveis séricos de triglicerídeos e de elevar significativamente o HDL-colesterol no sangue, promovendo a redução do risco cardiovascular, principalmente em pessoas com diabetes *mellitus*. Pode reduzir marcadores inflamatórios envolvidos na resposta à lesão endotelial da aterosclerose, controlando a adesão de leucócitos, migração e proliferação de células musculares lisas, além da deposição de matriz extracelular (ROSA; BARONI; PORTAL, 2008).

Devido às propriedades vasodilatadoras, o cilostazol atua regulando o tônus vasomotor arterial que abrange tanto a microcirculação cerebral quanto os vasos de membros inferiores. É utilizado para o tratamento da doença arterial obstrutiva periférica e de distúrbios vasculares cerebrais (AZEVEDO et al., 2014). Apresenta melhora na qualidade de vida dos pacientes claudicantes ao aumentar a distância de caminhada.

As FDE são as enzimas responsáveis pela quebra das ligações fosfodiéster presentes em nucleotídeos cíclicos, representados pelo monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) e guanilato de adenosina cíclico (GMPc). Compõem uma família ampla de aproximadamente 12 subtipos, exercendo ações diversas. Os genes das famílias das FDE estão presentes em quase todas as células teciduais. São responsáveis por diversas funções fisiológicas como divisão e diferenciação celular, transporte de íons e homeostase de fluidos. Diferem pela preferência em relação à

clivagem do AMPc e ao GMPc(LA FUENTE et al.,2001). Nas plaquetas, existem três FDEs: os tipos 2, 3 e 5. Diferem entre si pela capacidade de degradação do AMPc e GMPc e pelo estímulo dos níveis de GMPc intraplaquetários, sendo que as FDEs 2 e 5 são estimuladas pelo GMPc e a FDE 3 é inibida. A FDE 3 degrada preferencialmente o AMPc.

O cilostazol foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) e é recomendado como tratamento de classe I para pacientes com doença arterial periférica e claudicação intermitente. No entanto, não foi aprovado pelo FDA como tratamento em pacientes com derrame ou outra doença vascular cerebral e, portanto, não foi incorporado nas recomendações oficiais para a prevenção primária ou secundária da doença aterosclerótica carotídea extracraniana (GALYFOS; SIANOU, 2017).

Considerando o expressivo número de efeitos colaterais, a solubilidade baixa e a posologia de 12/12h, existe o interesse de adotar estratégias farmacotécnicas capazes de otimizar as características físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas do CIL. Nesse sentido, as formas farmacêuticas de liberação modificada apresentam-se com alternativas promissoras para assegurar a estabilidade, a biodisponibilidade e a resposta farmacológica adequada.

3.7 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA DO CILOSTAZOL

A nanotecnologia aplicada nas ciências farmacêuticas é direcionada ao desenvolvimento, à caracterização e à aplicação de sistemas terapêuticos em escala nanométrica. O estudo desses sistemas tem sido realizado com o objetivo de direcionar e/ou controlar a liberação de inúmeros fármacos. Comparados à terapia convencional, podem carrear o fármaco diretamente nas células doentes e minimizar os danos às células saudáveis (CHEN et al., 2011).

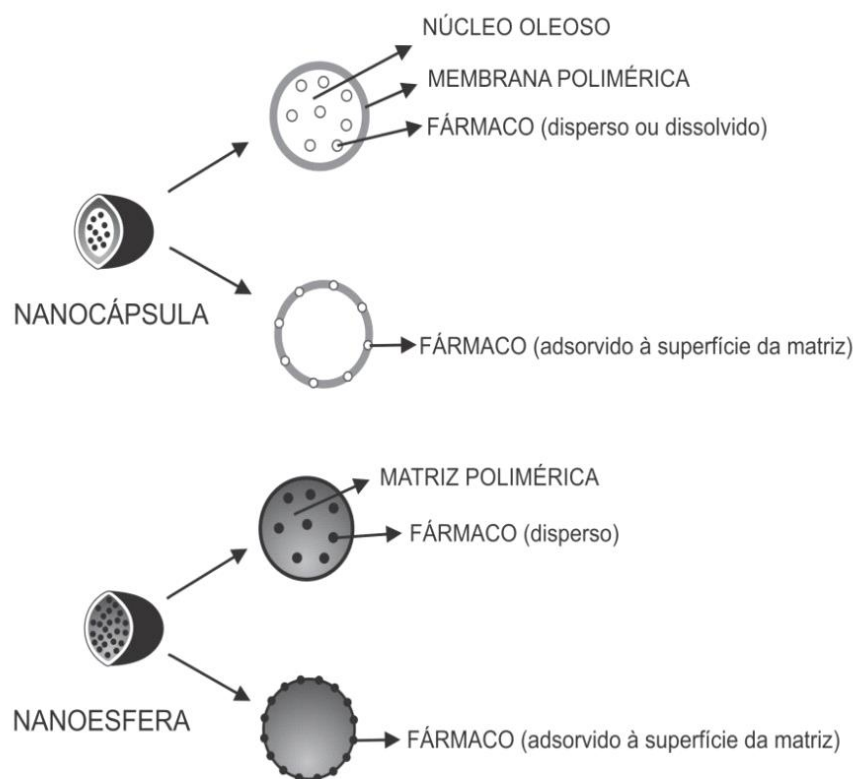
A nanotecnologia farmacêutica compreende a investigação de diferentes sistemas nanoestruturados como: nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas, lipossomas e nanoemulsões; além de se interessar pela consequente aplicação desses sistemas como dispositivos carreadores de fármacos, proteínas, genes e vacinas. A versatilidade, a flexibilidade e a adaptabilidade dos sistemas de liberação nanoestruturados são algumas das vantagens dessa

tecnologia, que têm provado seus benefícios na área médica/farmacêutica, principalmente pelo aumento da adesão à terapêutica pelos pacientes haja vista a menor incidência de efeitos colaterais e melhor biodisponibilidade do fármaco. Essa área de estudo, de intensa pesquisa nos últimos anos, investe no controle da liberação de fármacos em sítios específicos de ação, inclusive usando vetores que permitem a otimização da velocidade de liberação e o regime posológico. As nanopartículas, constituídas por polímeros biodegradáveis, têm sido alvo de grande interesse dos pesquisadores, devido às suas potencialidades terapêuticas e à maior estabilidade nos fluídos biológicos e durante o armazenamento (SCHAFFAZICK et al., 2003). Podem proteger os fármacos da degradação biológica durante a circulação das mesmas.

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a 1 μm . O termo nanopartícula inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural. As nanocápsulas apresentam um invólucro polimérico ao redor de um núcleo oleoso, onde o fármaco pode estar dissolvido nesse núcleo e/ou estar aderido à superfície da partícula na parede polimérica. Em contrapartida, as nanoesferas são destituídas de óleo em sua composição, sendo formadas por uma matriz polimérica, na qual o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (ZAMPIERI, 2009).

As nanopartículas são capazes de proteger o fármaco da degradação (estabilidade física durante o armazenamento e nos fluídos biológicos) e promover vantajosas propriedades *in vivo*, como o aumento da sua absorção, a maior capacidade de ultrapassar barreiras biológicas, a distribuição diferenciada e otimizada. Dessa forma, podem ser direcionadas para células e tecidos específicos (macrófagos, células tumorais, cérebro, etc.), uma vez que a superfície e a carga superficial podem ser modificadas pela inserção de determinados ligantes, como, por exemplo: anticorpos, tensoativos, polímeros, entre outros. Assim, caracterizam estratégias de alto desempenho para prolongar a liberação do fármaco e, conseqüentemente, potencializar o tempo de meia-vida nos compartimentos biológicos (ZAMPIERI, 2009).

Figura 4: Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas



Fonte: Adaptado de KUMARI, A.; YADAV, S.K.; YADAV, S.C.
 Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems.
Colloids and Surfaces Biointerfaces, v. 75, n. 1, p. 1–18, 2010.

O preparo baseia-se na razão fármaco/polímero adequada à obtenção de uma eficiência de encapsulação elevada e toxicidade reduzida. Em regra, a escolha de um método de preparação é determinada pelas características de solubilidade da substância terapeuticamente ativa.

Os métodos de preparação de nanopartículas a partir de polímeros pré-formados são particularmente adaptados para incorporar princípios ativos lipofílicos. Utilizamos o método de deposição interfacial do polímero pré-formado descrito por Fessiet al. (1989) e previamente validado por Gomes (2014). Baseia-se na dissolução do fármaco, polímero, óleo e tensoativo em um solvente orgânico miscível em água constituindo a fase orgânica, a qual é transferida, sob agitação vigorosa, em uma fase aquosa contendo um tensoativo hidrofílico. São obtidas nanocápsulas quando o princípio ativo é previamente dissolvido em um óleo, e este em seguida emulsificado na solução orgânica polimérica antes da dispersão da fase

orgânica na fase inorgânica. A rápida difusão do solvente faz com que ocorra a diminuição da tensão interfacial entre as fases levando à formação de pequenas gotículas de solvente orgânico, devido ao aumento da área de superfície. Finalmente, o solvente orgânico, que deve ser de fácil remoção, é evaporado por pressão reduzida e a suspensão é concentrada através da evaporação de parte da água. A acetona tem sido empregada como solvente orgânico de escolha para tais preparações.

Os fatores que influenciam o tamanho das nanocápsulas poliméricas são: a concentração e a natureza química do polímero, do fármaco, do óleo e do tensoativo e, finalmente, o método de preparação. Quanto maior a afinidade do óleo com o fármaco, maior o percentual de encapsulação e menor a tendência de problemas de instabilidade dos sistemas (SCHAFFAZICK et al., 2003). É de extrema importância que o óleo, além de ser compatível com a substância ativa, não interaja com o polímero.

Entre os óleos utilizados, os triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico são os mais empregados, devido a sua biocompatibilidade e solubilidade de grande escala de fármacos. Outros óleos como, por exemplo, girassol, soja, benzoato de benzila, álcool benzílico, ácido oleico e oleato de etila são boas alternativas de uso, embora não muito frequentemente utilizados (ZAMPIERI, 2009).

Quanto aos polímeros, devem ser biocompatíveis e biodegradáveis. Podem ser de origem natural, como: albumina, gelatina, quitosana e colágeno; ou sintéticos, como: poli (ácido lático) (PLA), poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), poli (ϵ -caprolactona) (PCL), polietilenoglicol (PEG), entre outros. Os naturais possuem a desvantagem relacionada ao grau de pureza, alto custo de obtenção (JAIN, 2000) e risco de contaminações (LEE; YUK, 2007). A poli (ϵ -caprolactona) (PCL) é um polímero hidrofóbico e semicristalino caracterizado por um tempo de degradação lento e baixa toxicidade (GOMES, 2014).

Assim, muitas técnicas têm sido desenvolvidas para modificar a superfície de nanopartículas com o objetivo de diminuir, retardar ou até mesmo eliminar a adsorção às proteínas plasmáticas e, conseqüentemente prolongar o tempo de circulação das nanopartículas no organismo (GOMES, 2014).

Um método que tem sido largamente usado é a modificação de superfície das nanopartículas realizada principalmente por: (I) revestimento da superfície com polímeros hidrofílicos/tensoativos; e (II) desenvolvimento de copolímeros

biodegradáveis com segmentos hidrofílicos, que podem reduzir as interações eletrostáticas e hidrofóbicas, pelas quais as opsoninas se adsorvem a superfície das partículas (MOSQUEIRA et al., 2001).

A presença de uma cobertura feita com cadeias longas de polímeros hidrofílicos promove uma estabilização estérica das nanopartículas, por meio de uma camada protetora que é capaz de repelir as opsoninas do plasma por forças repulsivas, evitando os processos de opsonização e fagocitose (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EQUIPAMENTOS

- Agitador magnético com aquecimento (SOLAB, modelo SL-91, Piracicaba, Brasil);
- Balança analítica (CELTAC, modelo FA2104N, São Paulo, Brasil);
- Destilador de água (FANEM LTDA, modelo 724/2-A, São Paulo, Brasil);
- Evaporador rotativo (FISATOM, modelo 801, São Paulo, Brasil);
- Sistema de ultrapurificação de água (Milli-Q[®], MILLIPORE, Bedford, Estados Unidos);
- Potenciômetro digital de bancada (HANNA INSTRUMENTS, modelo HI 221, São Paulo, Brasil);
- Microscópio óptico Olympus BX 41;
- Câmera Olympus DP 72.

4.2 REAGENTES E SOLVENTES

4.2.1 Fármaco

- Cilostazol (CIL) - $C_{20}H_{27}N_5O_2$, 369,46 g.mol⁻¹ (100,1% de pureza, IPCA Laboratories Limited, Mumbai, Índia).

4.2.2 Polímeros

- Poli (ϵ -caprolactona) (PCL, M_w 10.000-14000 g.mol⁻¹, SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, Estados Unidos);
- Polietilenoglicol (PEG, M_w 5.400-6.600 g.mol⁻¹, CROMATO PRODUTOS QUÍMICOS, Diadema, Brasil).

4.2.3 Água Purificada

Na elaboração das suspensões de nanocápsulas, determinação do tamanho de partícula e potencial zeta foi empregada água ultrapura, obtida por meio do Milli-Q® (MILLIPORE, Bedford, Estados Unidos).

4.2.4 Solventes e demais reagentes

- Monooleato de sorbitanoetoxilado (polissorbato 80, Tween® 80, DELAWARE, Porto Alegre, Brasil);
- Monooleato de sorbitano (Span 80®, OXITENO, Mauá, São Paulo);
- Acetona P.A (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil);
- Triglicerídeos dos ácidos cáprico-caprílico (FOCUS QUÍMICA, São Paulo, Brasil).

4.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.3.1 OBTENÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS

O trabalho iniciou com a produção de nanocápsulas de PCL-PEG. A determinação quantitativa do cilostazol incorporado nas nanopartículas poliméricas foi realizada pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência previamente validado por Gomes (2014), avaliando a eficiência de incorporação do fármaco. As nanopartículas poliméricas foram caracterizadas por meio de estudos morfológicos e espectroscópicos. As suspensões de nanocápsulas obtidas a partir dos polímeros poli- ϵ caprolactona(PCL) e de polietilenoglicol (PEG)contendo cilostazol foram preparadas pelo procedimento de deposição interfacial do polímero pré-formado

desenvolvido e descrito por Fessi et al. (1989) e padronizado pelo nosso grupo de pesquisa, segundo Gomes (2014).

A blenda polimérica (0,075 de PCL e 0,025 de PEG) foi solvatada em acetona em presença de Span 80[®] (0,077 g), CIL (0,010 g) e triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico (TCM) 0,300 gramas, constituindo assim a fase orgânica. Em seguida a essa fase, foi gotejada lentamente na fase aquosa contendo Tween 80[®] (0,077 g) previamente preparada e mantida sob agitação magnética e temperatura controlada de 40 °C. A agitação magnética foi mantida por mais 10 min após o término do gotejamento e o solvente orgânico foi, então, eliminado por rotaevaporação, atingindo um volume final de 10 mL e concentração de Cilostazol de 10mg. mL⁻¹. Nanocápsulas sem fármaco foram igualmente obtidas como controle negativo (NC0-PCL/PEG). Foi realizada a produção de cilostazol pesado na concentração de 10 mg. mL⁻¹, utilizando o propilenoglicol como solvente e solução de propilenoglicol a 20% para controle negativo dos animais que não receberam as formulações com nanocápsulas.

4.3.2 ANÁLISE *IN VIVO*

Este protocolo experimental foi previamente submetido à análise e à aprovação da COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) sob o número 017/2013.

O efeito do tratamento com o cilostazol nanoencapsulado na artéria carótida e perfil lipídico foi investigado por análises morfológicas *in vivo* em ratos Wistar.

4.3.2.1 Divisão dos animais

Foram utilizados 28 ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*) de 90 dias de idade e peso aferido no início do experimento, indicado na tabela. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) para análise bioquímica do perfil lipídico. Utilizaram-se 24 animais para análise histológica da artéria carótida esquerda. O cálculo da amostra necessária para o estudo foi realizado com o software *Gpower*[®] versão 3.1.9.2. Os animais foram divididos em quatro grupos, de acordo com a medicação administrada. O Grupo 1 recebeu a formulação de nanocápsulas de PCL-PEG contendo o

cilostazol NC1-PCL/PEG (50 mg/kg/dia do fármaco, v.o.), o grupo 2 recebeu a formulação de nanocápsulas controle sem o fármaco NC0-PCL/PEG, o grupo 3 recebeu uma solução preparada em propilenoglicol e água (20/80 v/v) e o Grupo 4 recebeu a formulação suspensão de cilostazol livre (50 mg/kg/dia, v.o.). As doses foram administradas a cada 12 horas (07 e 19 horas) por um período de 30 dias, por gavagem. Com relação ao tratamento, os animais foram alojados em gaiolas contendo quatro animais e mantidos em ambiente com temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) e ciclo de claro/escuro (12/12 h) controlados automaticamente. Água e ração comercial (Nuvilab®) foram fornecidos *ad libitum*.

Tabela 1: Peso dos ratos submetidos à análise histológica, por grupos

	NC1-PCL/PEG	NC0-PCL/PEG	VEÍCULO	CIL LIVRE
Peso (g)/Grupo	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Rato 1	305	263	370	357
Rato 2	325	306	332	380
Rato 3	322	316	368	319
Rato 4	305	320	296	369
Rato 5	286	348	-	338
Rato 6	273	367	-	307
Rato 7	260	335	-	-
Média (g)	296	322	341	345

Fonte: O autor.

Tabela 2: Peso dos ratos submetidos à análise bioquímica, por grupos

	NC1-PCL/PEG	NC0-PCL/PEG	VEÍCULO	CIL LIVRE
Peso (g)/Grupo	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Rato 1	305	263	370	357
Rato 2	325	306	332	380
Rato 3	322	316	368	319
Rato 4	305	320	296	369
Rato 5	286	348	350	338
Rato 6	273	367	-	307
Rato 7	260	322	-	299
Rato 8	296	-	-	338
Média (g)	296	320	343	338

Fonte: O autor.

4.3.2.2 Anestesia e eutanásia

Após 24 h do recebimento da última dos tratamentos, foi realizada a eutanásia dos animais com sobredose anestésica (3,5 mL de cloridrato de cetamina a 10% e 3,0 mL de xilazina a 2%, via intraperitoneal, respectivamente), e realizada a cervicotomia para a retirada da artéria carótida esquerda.

4.3.2.3 Ato operatório e coleta de material biológico

No 31º. dia do experimento, os animais foram identificados e submetidos à cirurgia para coleta da artéria carótida esquerda e amostra sanguínea. A cirurgia foi realizada no laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da UEPG pela equipe constituída por um cirurgião, primeiro auxiliar e segundo auxiliar. O cirurgião e o primeiro auxiliar realizaram a anestesia, eutanásia e cervicotomia com retirada do segmento carotídeo e o segundo auxiliar atuou no acondicionamento e identificação das peças cirúrgicas.

A incisão cirúrgica foi a cervicotomia longitudinal esquerda seguida de divulsão e secção por planos. A artéria carótida esquerda foi localizada e, de forma cuidadosa separada do nervo vago e tecidos adjacentes. Em seguida foi armazenada em frascos contendo formol a 10% (v/v).

Foram coletados 5mL de sangue através da punção do ventrículo esquerdo. A seguir, o líquido foi centrifugado durante 10 minutos a 3000 rotações por minuto (rpm) e armazenado em tubos sem anticoagulante, para análise do perfil lipídico (triglicérides, colesterol total e frações LDL e HDL).

4.3.3 Macroscopia

Foi realizado o registro fotográfico com câmera Sony, dsc-W320, (Okinauawa, Japão).

4.3.4 Microscopia

4.3.4.1 Preparo do material

As artérias carótidas esquerdas dos animais foram conservadas em solução de formol a 10% (v/v) e encaminhados para o Laboratório de Anatomia Patológica de Ponta Grossa para a confecção de lâminas histológicas.

Os fragmentos foram coletados e armazenados em cassetes específicos e compatíveis para a amostra (Figura5). Em seguida, submersos em solução de formol a 10%(v/v).

Figura 5: solução de formol a 10% (v/v) e cassete para armazenamento da artéria carótida esquerda



Fonte: O autor.

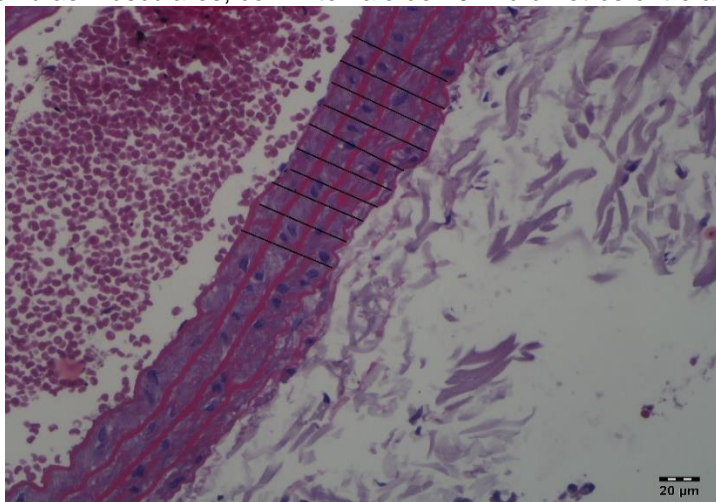
Para o preparo das lâminas, os fragmentos das peças foram cortados e colocados em um cassete para processamento. Em seguida, procedeu-se com a fixação da mesma. A fixação visa permitir o estudo celular como *in vivo*, evitando alterações na constituição química celular, fixando proteínas e inativando enzimas proteolíticas e sua consequente autólise. O material então foi mergulhado em frascos contendo álcool em concentrações crescentes (70%, 80%, 90%, 95%, 99%) para a desidratação. Foi utilizado o xilol para realizar a diafanização do material, que permitiu a penetração de parafina na peça e tornou o material translúcido e apto para receber a parafina. Esta etapa foi conduzida na estufa e com a parafina em estado de fusão. Em seguida, as peças seguiram para o micrótomo, com a intenção de secções entre 5 a 7 μ m. Os cortes foram estendidos em banho-maria e colados em lâminas de vidro. A coloração foi realizada pelo método hematoxilina-eosina

(HE). Após realizada a etapa de coloração, desidratação e clareamento, a lâmina foi coberta com uma lamínula, identificada e finalizada.

4.3.4.2 Leitura das lâminas

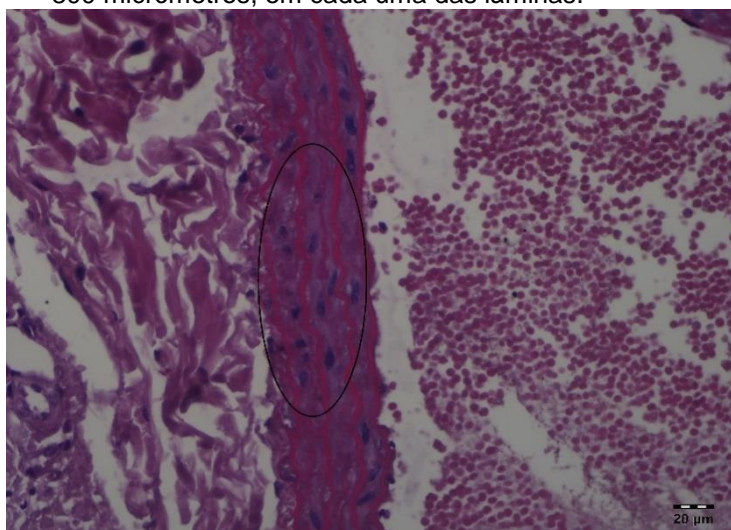
As lâminas foram avaliadas com relação à morfoanatomia padrão da artéria carótida esquerda. A análise histológica das lâminas foi feita utilizando-se um microscópio óptico (Olympus BX 41), que estava acoplado uma câmera fotográfica (Olympus DP72), sob magnificação de 400 vezes. Obtiveram-se 5 lâminas de cada amostra arterial, abrangendo as três túnicas arteriais, com ênfase na túnica média. As imagens foram digitalizadas por meio do programa CellSens Standard®, obtendo-se as medidas em pixels, que foram convertidas para micrômetros. A captura seguida da digitalização das fotografias e a análise das lâminas foram feitas por pesquisadores independentes. A análise das lâminas foi realizada de maneira cega em que o avaliador das alterações histológicas desconhecia a qual grupo pertencia cada lâmina. Por meio do programa ImageJ® Software (NIH, Bethesda, MD, USA) foi realizada a análise qualitativa que consistiu na investigação da presença de resposta inflamatória através da visualização de núcleos celulares na túnica média da artéria carótida, bem como uma análise quantitativa para determinação da espessura da túnica média, entre 10 medidas realizadas por lâmina. As medidas para aferição da espessura da túnica média foram realizadas no sentido perpendicular às fibras musculares, com intervalo de 20 micrômetros entre elas. A aferição da celularidade foi realizada em uma área da túnica média equivalente à 800 micrômetros, em cada uma das lâminas.

Figura 6: Medidas da espessura da túnica média arterial. Foram realizadas 10 medidas perpendiculares às fibras musculares, com intervalo de 20 micrômetros entre as mesmas



Fonte: O autor.

Figura 7: A aferição da celularidade foi realizada em uma área da túnica média equivalente à 800 micrômetros, em cada uma das lâminas.



Fonte: O autor.

4.3.5 Análise do perfil lipídico

As amostras de sangue foram acondicionadas em tubos sem anticoagulante e centrifugadas durante 10 minutos a 3.000 rpm. A seguir, encaminhadas ao laboratório para aferição do colesterol total, HDL, LDL e triglicerídeos através de kits de ensaio comerciais pelo método enzimático -colorimétrico.

4.3.6 VARIÁVEIS ANALISADAS

As variáveis analisadas foram: espessura da túnica média, número de células em uma área de 800 micrômetros da túnica arterial média; valores do colesterol total, colesterol HDL e LDL e triglicerídeos.

4.3.6.1 ANÁLISE ESTATÍSTICAS

Para análise deste estudo analítico intervencionista, foi usado o programa Medcalc®. Após a avaliação da normalidade dos dados, com variáveis quantitativas contínuas foi utilizado o teste ANOVA one-way. Para análises comparativas das variáveis foi feito o teste de comparação múltipla de Tukey. Foi definido como estatisticamente significativo um $P < 0,05$. As variáveis foram apresentadas por média e desvio-padrão.

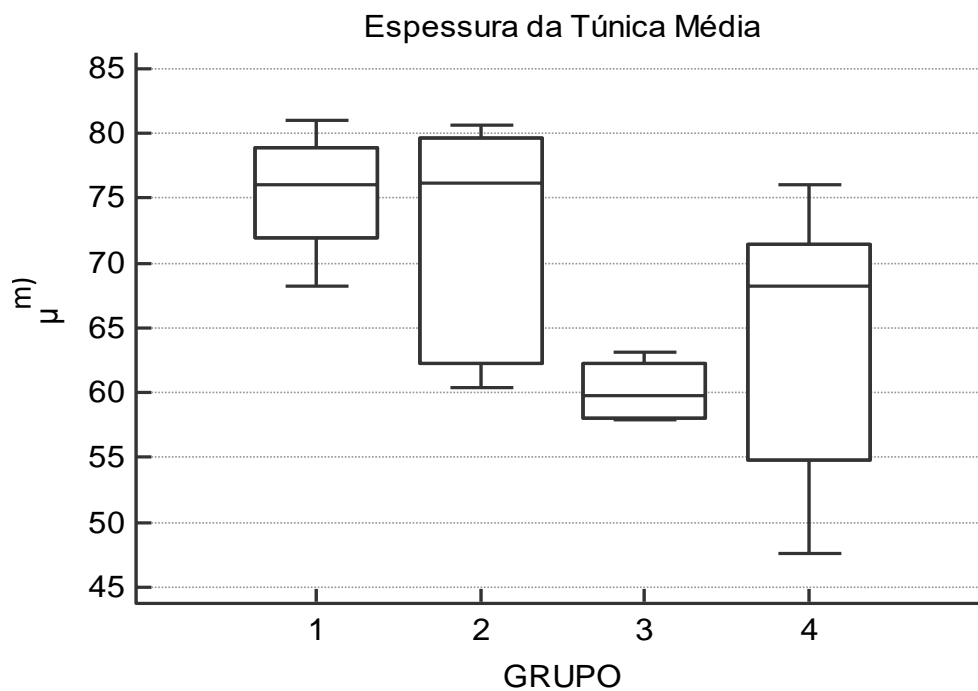
5 RESULTADOS

As nanocápsulas poliméricas foram obtidas com sucesso pelo método proposto. A caracterização encontra-se no trabalho de Gomes (2014). A definição do tamanho da amostra foi calculada para uma força de 95%. Os animais foram alocados em quatro grupos, compostos por 8 animais. Ao longo do experimento, ocorreu a morte de 4 animais devido à trauma mecânico, durante o período da administração dos fármacos, sendo um animal do grupo 2 (nanocápsulas controle) e três animais do grupo 3 (propilenoglicol controle). As análises bioquímicas foram realizadas nos animais remanescentes, totalizando 28 animais. Houve a perda de 4 amostras histológicas para a confecção das lâminas durante o preparo das mesmas, referente a um animal de cada grupo. A análise histológica foi realizada em 24 animais: sete animais do grupo 1, 6 animais do grupo 2, quatro animais do grupo 3 e sete animais do grupo 4.

A pesquisa iniciou com 32 ratos adultos, albinos, da raça Wistar, que foram divididos em quatro grupos experimentais: cilostazol nanoencapsulado (animais que receberam a preparação de cilostazol na apresentação em nanocápsulas), nanocápsulas sem cilostazol (animais para os quais foi administrada solução de nanocápsulas sem associação com o fármaco), solução de propilenglicol (administração do veículo propilenoglicol na concentração de 30%) e cilostazol livre (fármaco em sua apresentação usual), com duração de quatro semanas.

5.1 Espessura da túnica média

Na análise da espessura da túnica média das artérias carótidas, observamos diferença estatisticamente significativa entre as médias entre os grupos 1 e 3 [70.22 (± 9.2 , 47-81) IC95% 62-72] ($P < 0,019$). Entre os demais grupos, não houve diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$). A espessura da túnica média do grupo 1 apresentou maiores valores. As figuras de 8 a 11 exemplificam os resultados obtidos na avaliação da espessura da túnica média das artérias carótidas.



Fonte: o autor

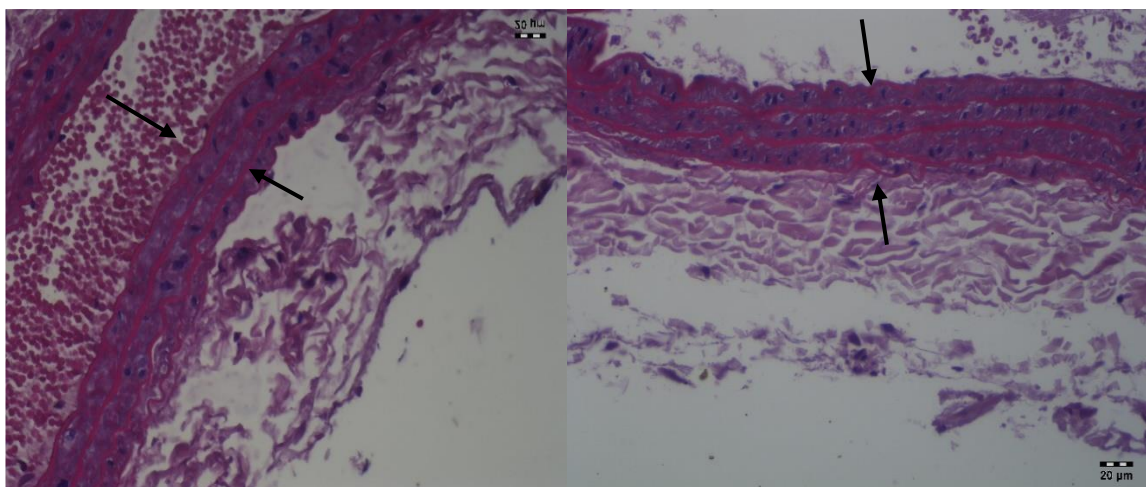
Tabela 3: Média e desvio padrão da espessura da túnica médiadas artérias carótidas em micrômetros

Grupo	Média (μm)	N	Desvio Padrão (μm)
1	75,17	7	4,51
2	71,78	7	8,98
3	60,16	4	2,53
4	64,39	6	10,84

Fonte:O autor

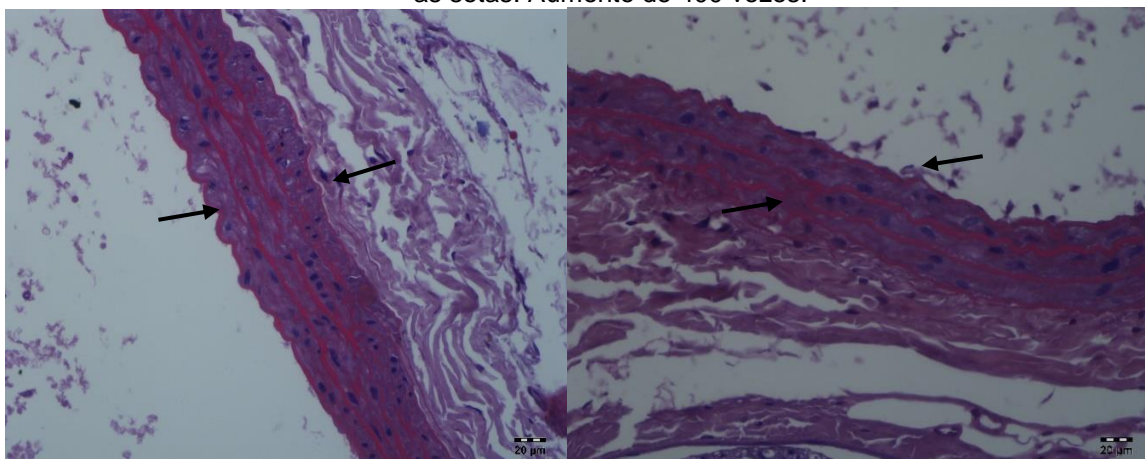
-valores expressos como média e desvio padrão (n=24, ANOVA one-way).

Figura 8: Aspectos histológicos da carótida do grupo 1. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina; microscopia representativa de dois animais. A túnica média está indicada entre as setas. Aumento de 400 vezes.



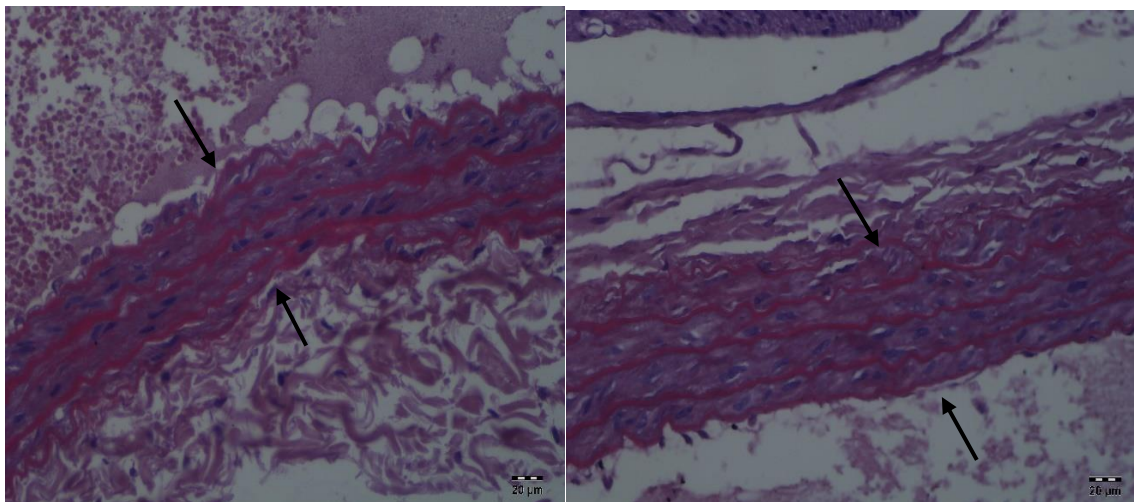
Fonte: o autor.

Figura 9: Aspectos histológicos da carótida do grupo 2. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina; microscopia representativa de dois animais. A túnica média está indicada entre as setas. Aumento de 400 vezes.



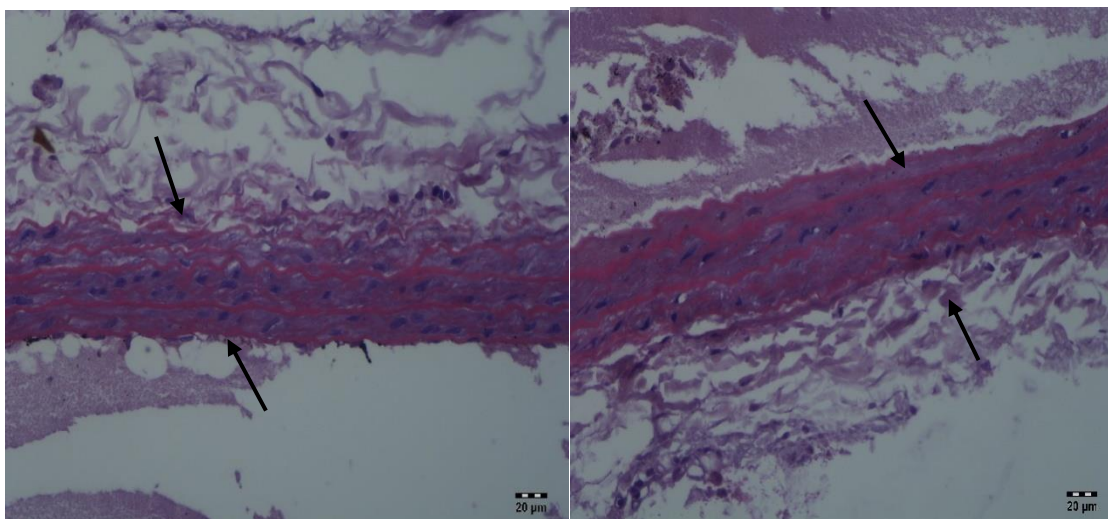
Fonte: O autor.

Figura 10: Aspectos histológicos da carótida do grupo 3. As secções foram coradas com hematoxilina-eosina; microscopia representativa de dois animais. A túnica média está indicada entre as setas. Aumento de 400 vezes.



Fonte: O autor.

Figura 11: Aspectos histológicos da carótida do grupo 4. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina; microscopia representativa de dois animais. A túnica média está indicada entre as setas. Aumento de 400 vezes.



Fonte: o autor.

5.2 Análise da Celularidade

Na contagem celular de uma área delimitada em 800 micrômetros, não encontramos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos avaliados [24(\pm 7.2,33-67) IC95% 60-91] ($P > 0,05$).

Tabela 4: celularidade em números absolutos.

GRUPO	Média	N	Desvio Padrão
1	26,57	7	7,13
2	24,51	7	2,16
3	25,40	4	1,29
4	28,60	6	10,90

Fonte: o autor.

-valores expressos como média e desvio padrão (n=24, ANOVA one-way).

5.3 Análise do perfil lipídico

5.3.1 Dosagem do Colesterol Total

Neste parâmetro avaliado, observamos que não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de colesterol total [104.5 (\pm 2.44,101-108) IC95% 101,81-107,18] ($P 0,4$).

Tabela 5: Valores de colesterol total em mg/dL

GRUPO	Média	N	Desvio Padrão
1	104	8	2,44
2	155	7	2,16
3	84	5	1,58
4	80	8	2,44

Fonte: O autor.

-valores expressos como média e desvio padrão (n=28, ANOVA one-way).

5.3.2 Dosagem do LDL

Os níveis de LDL não demonstraram diferença estatística entre os grupos avaliados [42 ($\pm 15,16$, 21-60) IC95% 24,24-55,13] ($P 0,334$).

Tabela 6: Valores de colesterol LDL total em mg/dL.

GRUPO	Média	N	Desvio Padrão
1	40	8	15,16
2	26	7	12,51
3	34	5	15,24
4	25	8	24,04

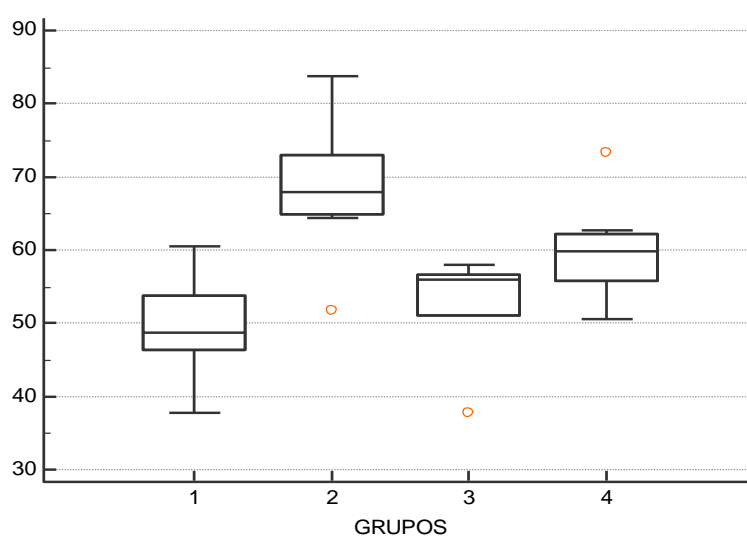
Fonte: o autor.

-valores expressos como média e desvio padrão (n=28, ANOVA one-way).

5.3.3 Dosagem do HDL

Neste parâmetro avaliado, observamos diferença estatística entre os grupos 1 e 3 [56,85(10,5 \pm 37,7-83,7)] IC 95% 52,56-61,38 ($P 0,01$). Entre os demais grupos, não houve diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$). O grupo 3 demonstrou maiores valores de HDL em relação ao grupo 1, com diferença estatisticamente significativa.

Gráfico 2: Valores do colesterol HDL em mg/dL



Fonte: O autor.

Tabela 7: Valores de colesterol HDL em mg/dL

GRUPO	Média	N	Desvio Padrão
1	49,45	8	6,92
2	68,14	7	9,74
3	52,70	5	8,37
4	59,90	8	6,77

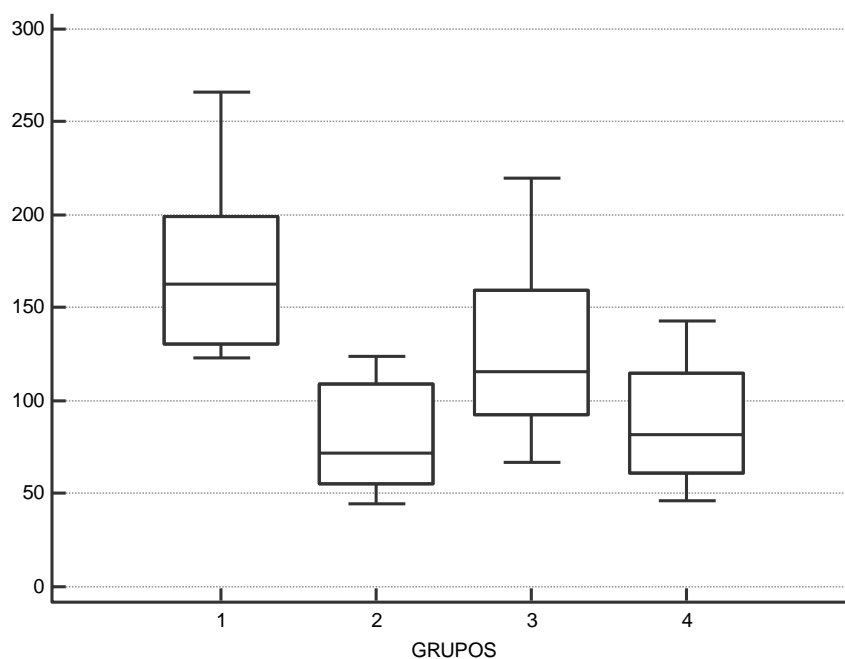
Fonte: o autor.

-valores expressos como média e desvio padrão (n=28, ANOVA one-way)

5.3.4 Dosagem de Triglicerídeos

Os resultados laboratoriais dos níveis de triglicerídeos apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos 2 e 4 [116,92(±56.37,45-266) IC95% 74.15-132.33] $P < 0,01$. O grupo 2 apresentou menores valores de triglicerídeos comparativamente ao grupo 4, com diferença estatística.

Gráfico 3: valores de triglicerídeos em mg/dL.



Fonte: O autor.

Tabela 8: Valores de triglicérides em mg/dL

GRUPO	Média	N	Desvio Padrão
1	171,75	8	49,43
2	78,85	7	31,45
3	128,60	5	57,39
4	88,12	8	33,95

Fonte: O autor.

-valores expressos como média e desvio padrão (n=28, ANOVA one-way).

6 DISCUSSÃO

O cilostazol aumenta as concentrações intracelulares de AMP cíclico bloqueando seletivamente a FDE tipo 3. As implicações clínicas e a farmacocinética em relação aos efeitos e à segurança dessa droga já estão bem estabelecidas. Estudos pré-clínicos mostraram que o cilostazol protegeu células endoteliais da apoptose e inibiu o crescimento e a proliferação de células musculares lisas vasculares (KIM et al., 2005). Além disso, o cilostazol tem um efeito antiinflamatório, impedindo a expressão de proteínas quimioatraentes, dessa forma impedindo a adesão de linfócitos à células endoteliais (HATTORI et al., 2009). Kim et al. (2005) relataram que o cilostazol suprimiu as espécies intracelulares reativas de oxigênio e diminuiu o nível do fator de necrose tumoral α (KIM et al., 2002).

Para melhorar a eficácia dos fármacos, algumas estratégias surgiram no campo da nanotecnologia, como o uso de nanopartículas poliméricas sintéticas (PSARROS et al., 2012). Estas estratégias fornecem características extremamente promissoras, tais como controle preciso da farmacocinética, biodisponibilidade e estabilidade melhorada de drogas e biofármacos, maior interação celular, devido a sua maior superfície de contato e melhor direcionamento para administração de medicamentos (CAVALCANTE et al., 2016). Neste contexto, a nanotecnologia tem sido muito útil, porque o projeto e a obtenção de nanopartículas podem ser controlados com precisão, permitindo variações em seu tamanho, forma, estabilidade, carga superficial e várias outras características para melhorar seu comportamento em diferentes sistemas (CAVALCANTE et al., 2016). Porém, ainda não existe bibliografia abundante sobre a segurança dos nanocarreadores e pouco se sabe sobre a relação entre as suas características toxicodinâmicas e toxicocinéticas. Existem poucos estudos sobre a toxicidade in vivo de nanopartículas poliméricas, e geralmente são focados em um fármaco e não ao sistema nanocarreador.

Em relação ao desenvolvimento da aterosclerose, já é estabelecido o papel da inflamação e da hiperlipidemia. Estratégias medicamentosas são propostas para minimizar estes efeitos nos vasos sanguíneos. Neste contexto, o cilostazol mostra-se como um fármaco apropriado, devido aos seus efeitos pleiotrópicos. Este trabalho

objetivou avaliar o efeito do cilostazol sobre a espessura e celularidade na túnica íntima arterial da carótida de ratos Wistar e no perfil lipídico.

Quanto à espessura da túnica média, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos que receberam o cilostazol nanoencapsulado (grupo 1) e o grupo que recebeu a solução de propilenoglicol (grupo 3). O cilostazol está associado a diminuição da migração de células musculares lisas para o endotélio. Neste contexto, esperávamos observar diminuição da espessura da túnica média, devido ao fato de a mesma ser composta por células musculares lisas. A espessura observada no grupo que recebeu propilenoglicol foi menor do que a espessura muscular no grupo que recebeu o cilostazol carregado por nanopartículas, o que vai contra a expectativa de que o fármaco, no presente estudo, diminuiria a espessura da túnica média arterial. Podemos atribuir tal resultado ao pequeno número da amostra. Um estudo futuro com um maior número de indivíduos submetidos ao tratamento proposto pode demonstrar com maior definição a atuação do fármaco na túnica média.

O cilostazol pode atuar principalmente diante de um estímulo inflamatório, promovendo menor migração celular para os tecidos. Há uma diversa gama de gatilhos que podem desencadear alterações vasculares, pois o processo inflamatório arterial envolve diferentes fatores como por exemplo compressão interna ou externa, hiperlipidemia e estados de hipercoagulabilidade. Alterações nos parâmetros hemorreológicos são associadas a doenças crônicas como diabetes e tabagismo. Mudanças na deformabilidade das hemáceas, aumento da agregação plaquetária e aumento da viscosidade do sangue e plasma também podem promover danos micro e macrovasculares (TRIPOLINO et al., 2017). Tais fatores representam uma proposta de estudo futuro para a atuação protetora do cilostazol.

No presente estudo, não observamos diferença na contagem de células das túnicas musculares avaliadas. Quanto à média da celularidade, não houve diferença estatisticamente significativa na presença de núcleos celulares na túnica média da artéria carótida entre os grupos avaliados. Os resultados obtidos podem ser condizentes com a idade dos animais utilizados no experimento (ratos jovens e sem comorbidades associadas, além do tamanho reduzido da amostra). Também não fornecemos dieta hiperlipídica aos animais jovens e saudáveis, devido ao objetivo de o estudo ter sido a avaliação do efeito protetor do cilostazol. O tempo de tratamento não permitiu que alterações histológicas se desenvolvessem.

O aumento dos níveis séricos de colesterol total está associado ao desenvolvimento da aterosclerose, que inicia com o acúmulo de lipoproteínas no endotélio. Desse modo, fármacos que promovem o aumento do HDL e diminuição dos níveis de LDL triglicerídeos retardam a evolução da doença. Em relação aos níveis de HDL, o grupo que recebeu propilenogicol apresentou valores maiores do que o grupo que recebeu a solução de cilostazol nanoencapsulado. Os valores de triglicerídeos foram maiores no grupo que recebeu o cilostazol pesado em relação ao grupo que recebeu a solução de nanocápsulas poliméricas. Não foi observada diferença estatisticamente significativa nos demais parâmetros bioquímicos avaliados.

Tais achados demonstram que o cilostazol pesado mostrou maior benefício em relação ao perfil lipídico do que o cilostazol nanoencapsulado. As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo a substância ativa estar dissolvida neste núcleo e/ou adsorvida à parede polimérica (SCHAFFAZICK et al., 2003). A presença de óleo em sua composição torna a medicação inadequada para o combate da doença aterosclerótica em suas diferentes apresentações.

Um aspecto que poderá ser observado em futuros estudos é a capacidade de liberação do fármaco da estrutura da nanocápsula. Tal sistema carregador é capaz de transportar o fármaco, porém maiores estudos são necessário para demonstrar a quantidade de droga realmente depositada em determinado sítio biológico.

Ainda não existe bibliografia abundante sobre a segurança dos nanocarreadores e pouco se sabe sobre a relação entre as suas características toxicodinâmicas e toxicocinéticas. Existem poucos estudos sobre a toxicidade in vivo de nanopartículas poliméricas, e geralmente são focados em um fármaco e não ao sistema nanocarreador.

7 CONCLUSÃO

As propriedades das nanopartículas oferecem uma ampla gama de aplicações com possibilidades de melhorara no tratamento clínico aliando otimização de recursos humanos e do meio ambiente, em que pese a expansão da pesquisa dentro de um ambiente interdisciplinar que envolve as ciências farmacêuticas, medicinaveterinária, biologia, engenharia de materiais, física, química, medicina. Esta pesquisa interdisciplinar demonstrou a atuação de diferentes setores da área da saúdeem prol da implementação de novas tecnologias para o tratamento da aterosclerose, utilizando o Cilostazol, que é um fármaco com papel bem estabelecido no tratamento de doenças cardiovasculares.

O cilostazol pesado apresentou melhores resultados em relação ao perfil lipídico. A apresentação do Cilostazol nanoecapsulado não demonstrou ser adequada para o tratamento da doença carotídea extracraniana devido ao fato de aumentar o perfil lipídico dos animais estudados. A estrutura da nanocápsula, por conter lipídios em seu interior, piorou o perfil lipídico. Os achados laboratoriais foram condizentes com os achados histopatológicos.O presente estudo contribui para estudos futuros relativos à toxicidade das nanocápsulas poliméricas, na medida em que apresenta a tendência na piora do perfil lipídico nos animais que receberam o sistema nanocarreador.

REFERÊNCIAS

AZEVEDO, M. et al. Clinical and molecular genetics of the phosphodiesterases(PDEs). **Endocrine Reviews**, v. 35, n. 2, p. 195-233, 2014.

BAHIA,L. et al.O endotélionasíndromemetabólica. **ArquivosBrasileiros de EndocrinologiaMetabólica**, v. 50 n. 2, p. 291-303, ab r. 2006.

BARBALHO, S.M. et al. Síndrome metabólica, aterosclerose e inflamação: tríade indissociável? **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 14, n. 4, p. 319- 327, 2015.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliopatologia**. 8. ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2011. 1524 p.

JÚNIOR, C.C.;PEREIRA,A.H.;PASA,M.B. Morphometricanalysisoftheintimalreactionafterstentimplantation in iliacarteriessubmittedtoangioplasty in pigs. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 139-43, may./jun. 2006.

CAVALCANTE, M. et al. A nanoformulation containing a scFv reactive to electronegative LDL inhibits atherosclerosis in LDL receptor knockout mice. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 107, p. 120-129, 2016.

CHANCHAROENTHANA, W. et al. Cilostazol attenuatesintimalhyperplasia in a mouse modelofchronickidneydisease.**PLoS ONE**, v. 12, n. 12, p. e0187872, 2017.

CHAVES,P. et al. Applicationsofpolymericnanoparticles in oral diseases: a review ofrecentfindings. **Currentpharmaceutical design**, v.24,p. 23-37,2018.

CHEN, L.; HENEIN, G.; LUCIANI, V. Nanofabrication techniques for controlled drugrelease devices. **Nanomedicine**, v.6, n.1, p.1-6, 2011.

DATASUS - DEPARTAMENTO DE INFORMÁTICA DO SUS.**Informações de Saúde, Epidemiológicas e Morbidade**: banco de dados. Disponível em:<<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203>>. Acesso em: 10 de jun. 2018.

DESAI, C.; PRABHAKAR, B. Development and evaluation of orally disintegrating tablets of cilostazol- β -cyclodextrin inclusion complexes. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 41, n. 10, p. 1589-1607, 2014.

FESSI H. et al. Nanocapsules formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutical**, Amsterdam, v.55, n. 1, p. R1-R4, 1989.

GALYFOS,G.; SIANOU, A. Cilostazol for secondarypreventionofstroke: shouldtheguidelinesperhapsbeextended?**Vascular SpecialistInternational**, v. 33, v. 3, p. 89-92, 2017.

GAZIANO, J. **Global burden of cardiovascular disease: heart disease**. 6. ed. Philadelphia: W B Saunders, 2001.

GOMES, M.S. **Desenvolvimento tecnológico e caracterização de nanocápsulas poliméricas contendo cilostazol**. 2014, 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2014. Disponível em: <<http://tede2.uepg.br/jspui/bitstream/prefix/88/1/Mona%20Lisa%20S%20Gomes.pdf>>. Acesso em: 10 de jul. 2018.

HATTORI, Y. et al. Cilostazol inhibits cytokine-induced nuclear factor- κ B activation via AMP-activated protein kinase activation in vascular endothelial cells. **Cardiovascular Research**, v. 81, n. 1, p. 133-139, 2009.

HONG, K. et al. Cilostazol prevents tumor necrosis factor- α -induced cell death by suppression of phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 phosphorylation and activation of akt/cyclic amp response element-binding protein phosphorylation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 306, n. 3, p. 1182-1190, 2003.

ISHIZAKA, N. et al. Effects of a single local administration of cilostazol on neointimal formation in balloon-injured rat carotid artery. **Atherosclerosis**, v. 142, n. 1, p. 41-6, 1999.

ITO, H. et al. Cilostazol Inhibits Accumulation of Triglyceride in Aorta and Platelet Aggregation in Cholesterol-Fed Rabbits. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. e39374, 2012.

JAIN, R. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterials**, v. 21, p. 2475-2490, 2000.

KAMAL, A.K. et al. Cilostazol versus aspirin for secondary prevention of vascular events after stroke of arterial origin. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 19, n. 1, p. CD008076, 2011.

KIM, K. et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced apoptosis by cilostazol in human umbilical vein endothelial cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 300, n. 2, p. 709-715, 2002.

KIM, M. et al. Cilostazol inhibits vascular smooth muscle cell growth by downregulation of the transcription factor E2F. **Hypertension**, v. 45, n. 4, p. 552-556, 2005.

KO, Y. et al. Effects of combination therapy with cilostazol and probucol versus monotherapy with cilostazol on coronary plaque, lipid and biomarkers: secure study, a double-blind randomized controlled clinical trial. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 21, n. 8, p. 816-830, 2014.

KUMARI, A.; YADAV,S.K.;YADAV,S.C. Biodegradablepolymericnanoparticlesbaseddrug delivery systems. **ColloidsandSurfacesBiointerfaces**, v. 75, n. 1, p.1-18, 2010.

LA FUENTE,J. et al. A família das fosfodiesterases. **Acta Urológica Portuguesa**, v. 18, n. 2, p. 17-21, 2001.

LEE, J. et al. Cilostazol reduces atherosclerosis by inhibition of superoxide and tumor necrosis factor- α formation in low-density lipoprotein receptor-null mice fed high cholesterol. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 313, n. 2, p. 502-509, 2005.

LEE, K. Y.; YUK, S.H., Polymeric protein delivery systems. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 7, p. 669-697, 2007.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 868-874, 2002.

LIBBY, P.; THEROUX, P. Pathophysiology of Coronary Artery Disease. **Circulation**, v. 111, n. 25, p. 3481-3488, 2005.

LIMA, E.S.; COUTO, R.D. Estrutura, metabolismo e funções fisiológicas da lipoproteína de alta densidade. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 3, p. 169-178, 2006.

MAIS, L.N.; SILVA, E.P. Ácidos graxos trans, disfunção endotelial e exercício físico. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 8, n. 2, p. 171-176, 2009.

MATTHEWS, F. et al. Epidemiological Pathology of Dementia: Attributable-Risks at Death in the Medical Research Council Cognitive Function and Ageing Study. **PLoS Medicine**, v. 6, n. 11, p. e1000180, 2009.

MENEZES, F. et al. Comparações preliminares entre a histologia virtual ultrassonográfica in vivo e os achados histopatológicos da placa carotídea produto de endarterectomia. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 12, n. 3, p. 193-201, 2013.

MORAES, A. P. Q. **O livro do cérebro**.1. ed. São Paulo: EditoraDuetto, 2009. 64 p.

MOSQUEIRA, V. C. F. et al. Biodistributionoflong-circulating PEG-Graftednanocapsules in mice: effectsof PEG chainlengthanddensity. **PharmaceuticalResearch**, v. 18, n.10, p. 1411-1419, 2001.

NAKAMURA, T.;HOUCHI,H.;MINAMI,A. Endothelium-dependentrelaxationbycilostazol, a phosphodiesterase III inhibitor, onratthoracic aorta. **Life Sciences**, v. 69, p. 1709-15, 2001.

NAGHAVI, M., et al. Fromvulnerable plaque tovulnerablepatient a call for new definitionsandrisk assessment strategies: partI. **Circulation**, v. 108, n. 14, p. 1664-1672, 2003.

NAYLOR, et al. Management of atherosclerotic carotid and vertebral artery disease: 2017 clinical practice guidelines of the European Society for Vascular Surgery (ESVS). **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, v. 55, n. 1, p. 3-81, 2017.

NIGHOGHOSSIAN, N.; DEREX, L.; DOUEK P. The Vulnerable Carotid Artery Plaque: Current Imaging Methods and New Perspectives. **Stroke**, v. 36, n. 12, p. 2764-2772, 2005.

OMI, H. et al. Participation of high glucose concentrations in neutrophil adhesion and surface expression of adhesion molecules on cultured human endothelial cells. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 16, n. 3, p. 201-208, 2002.

PHARR, J. R.; COUGHENOUR C. A.; BUNGUM T. J. An assessment of the relationship of physical activity, obesity, and chronic diseases/conditions between active/obese and sedentary/normal weight American women in a national sample. **Public Health**. v. 156, p. 117-123, 2018.

PSARROS, C. et al. Nanomedicine for the prevention, treatment and imaging of atherosclerosis. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 8, p. S59-S68, 2012.

QAJA, E.; BHIMJI, S. S. **Carotid artery stenosis**. US: StatPearls Publishing, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK442025/> . Acesso em: 10 de jul. 2018.

RAFIEIAN-KOPAEI, M. et al. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. **International Journal of Preventive Medicine**, v. 5, n. 8, p. 927-946, 2014.

RAMASAMY, I. Recent advances in physiological lipoprotein metabolism. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 52, n. 12, 2014.

ROSA, M.P.; BARONI, G.; PORTAL, V. Contribuição na prevenção da isquemia cerebral pelo cilostazol, um inibidor da fosfodiesterase III: revisão de literatura. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 7, n.1, p. 49-55, 2008.

ROSS, R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. **New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 2, p. 115-126, 1999.

RYCHTER, M. et al. Cilostazol-Loaded poly(ϵ -caprolactone) electrospun drug delivery system for cardiovascular applications. **Pharmaceutical Research**, v. 35, n. 2, p. 32, 2018.

SANTOS, R. et al. Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 100, n. 1, p. 01-40, 2013.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SHAALAN, W. E. et al. Degree of carotid plaque calcification in relation to symptomatic outcome and plaque inflammation. **Journal of Vascular Surgery**, v.40, n. 2, p. 262-9,2004.

SELWANESS, M. et al. Atherosclerotic Plaque in the Left Carotid Artery Is More Vulnerable Than in the Right. **Stroke**, v. 45, n. 11, p. 3226-3230, 2014.

SINGH, N. Atherosclerotic Disease of the Carotid Artery. **Medscape**, v. 2017, p. 1-16, 2017. Disponível em: <http://emedicine.medscape.com/article/463147-overview>. Acesso em: 25 de nov. 2017.

TAKIGAWA, T. et al. Cilostazol reduces restenosis after carotid artery stenting. **Journal of Vascular Surgery**, v. 51, n. 1, p. 51-56, 2010.

TAKIGAWA, T. et al. Cilostazol suppression of arterial intimal hyperplasia is associated with decreased expression of sialyl Lewis X homing receptors on mononuclear cells and E-selectin in endothelial cells. **Journal of Vascular Surgery**, v. 55, n. 2, p. 506-516, 2012.

TRIPOLINO, C. et al. Body fat and blood rheology: evaluation of the association between different adiposity indices and blood viscosity. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 65, n. 3, p. 241-248, 2017.

VICKERS, K.; REMALEY, A. HDL and cholesterol: life after the divorce? **Journal of Lipid Research**, v. 55, n. 1, p. 4-12, 2013.

VITA, J.A.; HAMBURG, N.M. Does endothelial dysfunction contribute to the clinical status of patients with peripheral arterial disease? **Canadian Journal of Cardiology**, v.26, n. Suppl A, p. 45A-50A, 2010.

WEINTRAUB, W.S. The vascular effects of cilostazol. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 22, n. Suppl B, p. 56B-60B, 2006.

ZAMPIERI, A. L. T. C. **Desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação cutânea da isoflavonagenisteína em nanocápsulas poliméricas**. 2009, 114 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) -Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

ZHAO, Y.; BROWN, M.B.; JONES, S.A. The topical delivery of benzoyl peroxide using elegant dynamic hydrofluoroalkane foams. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, p. 1384-1398, 2010.

ZMYSŁOWSKI, A.; SZTERK, A. Current knowledge on the mechanism of atherosclerosis and pro-atherosclerotic properties of oxysterols. **Lipids in Health and Disease**, v. 16, n. 188, p. 1-19, 2017.