



## EFEITO DO INIBIDOR MULTIKINASE SORAFENIBEE SOBRE CÉLULAS MUSCULARES LISAS ARTERIAIS *IN VITRO* – RESULTADOS PRELIMINARES

Laura Bairy Rodrigues de Freitas<sup>1</sup>  
Gabriela Jouglard Vasquez Amado<sup>2</sup>  
Rafael de Nogueira Ribeiro<sup>3</sup>  
Ivana Grivicich<sup>4</sup>

### Resumo

As doenças cardiovasculares (DCV) são, na atualidade, a principal causa de óbitos no mundo e a aterosclerose principal causa responsável. Dentre os tratamentos, a angioplastia se destaca. No entanto, há muita chance de reestenose após o procedimento. A adição de medicamentos antiproliferativos para atuarem localmente na parede vascular foi a maneira encontrada para combater a hiperplasia miointimal. Portanto o objetivo do trabalho é avaliar os efeitos do inibidor multiquinase Sorafenibe sobre os três principais mecanismos da reestenose arterial (proliferação, migração e produção de matriz extracelular) em células musculares lisas arteriais *in vitro*. A avaliação do efeito proliferativo induzido pelo Sorafenibe será realizada conforme descrito por Sigalas (2004). Como controle positivo será utilizado o antineoplásico Paclitaxel. Para avaliação da migração celular, será utilizado o teste de *Scratch wound assay*. A citotoxicidade será avaliada utilizando o ensaio colorimétrico de MTT. Na avaliação da citotoxicidade, o Sorafenibee apresentou um efeito 1,6 vezes maior quando comparado com o paclitaxel. Ao avaliarmos a migração celular *in vitro*, observamos que os dois agentes inibiram a migração celular, sendo esse efeito mais pronunciado com o Sorafenibee (2 x). A avaliação do ciclo celular demonstrou que o paclitaxel induz um bloqueio em G2/M, o que era esperado uma vez que é um agente inibidor de fuso mitótico (Tabela 2). Já o Sorafenibee não alterou a distribuição das células no ciclo celular quando comparado com o controle negativo.

Palavras-chave: reestenose arterial; paclitaxel; tirosina quinase

### INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) são, na atualidade, a principal causa de óbitos no mundo. As DCV atribuíveis à aterosclerose foram as principais causas responsáveis por óbitos (193.309 mortes) (MANSUR; FAVARATO, 2012). Sabe-se que a aterosclerose é uma doença inflamatória crônica multifatorial, provavelmente iniciada por uma disfunção endotelial e também associada à ativação do sistema imunológico (ROSS, 1999; SPOSITO et al., 2007; MIZUNO et al., 2011). O seu tratamento medicamentoso e cirúrgico ainda permanece um desafio em constante evolução. Os stents vasculares surgiram apenas em 1985, implantados em vasos periféricos (BRITO et al., 2002). Os stents surgiram como dispositivo intravascular devido à dificuldade encontrada em se manter a patência vascular após as angioplastias realizadas somente com cateter-balão. A reestenose coronária mostrava-se presente em cerca de 30% a 40% dos pacientes submetidos à angioplastia coronária somente

---

1 Aluno do curso de graduação de Medicina – Bolsista PROBIC/Fapergs – laurabrfreitas@gmail.com

2 Aluno do curso de graduação de Medicina – gabivasques@gmail.com

3 Aluno do PPGGTA – rribeiro@ghc.com.br

4 Professora do curso de graduação de Medicina, PPGBioSaúde e PPGGTA – grivicich@ulbra.br

com a utilização do cateter-balão (BEATT et al., 1990). Embora a desobstrução fosse conseguida com sucesso, a reestenose ou o remodelamento elástico negativo (elastic recoil) do vaso submetido à angioplastia era um problema comum logo após a desinsuflação do balonete, dada a fragmentação das camadas internas da parede vascular, aliadas à agressão causada pela passagem do balonete do cateter-balão de angioplastia (HAUDE et al., 1993). Busca-se então, uma solução para o impasse da reestenose pós-angioplastia e seus eventos isquêmicos secundários. A melhor compreensão da fisiopatologia da reestenose arterial renovou o interesse pelo uso de agentes antiproliferativos. A adição de medicamentos antiproliferativos para atuarem localmente na parede vascular foi a maneira encontrada para combater a hiperplasia miointimal (SCHWARTZ et al, 2002). Atualmente, os dispositivos endovasculares farmacológicos mais utilizados na prática médica utilizam os fármacos paclitaxel e sirolimus (rapamicina) e sua eficácia está comprovada por vários estudos clínicos randomizados. O paclitaxel apresenta potente ação citotóxica demonstrada contra vários tipos de tumores.(WISKIRCHEN et al., 2004). Entretanto, apesar da sua eficácia já demonstrada em estudos clínicos, os dispositivos endovasculares farmacológicos ainda não foram capazes de solucionar integralmente o problema da reestenose e assim prevenir os seus desfechos isquêmicos. Portanto, parece clara a necessidade da busca por novos fármacos que possam auxiliar no controle da hiperplasia miointimal, na prevenção da reestenose após a intervenção endovascular e nos desfechos clínicos adversos.

Nesse sentido, as proteínas quinases são importantes alvos terapêuticos em função do seu envolvimento com a diferenciação e proliferação celular. As isoformas dos receptores quinases Raf serina/tirosina (A-Raf, B-Raf e Raf1 ou C-Raf) são as primeiras quinases da cascata MAPK (mitogen-activated protein kinase). A MAPK é uma via intracelular de transdução, composta por Raf, MEK (MAPK quinase) e ERK (quinase reguladora extracelular), reguladores essenciais da proliferação e sobrevivência celular (KOLCH et al, 2002). A desregulação das vias de controle dessas proteínas, geralmente através de mutação gênica, a qual pode conduzir a uma superexpressão ou a uma danificação das vias inibitórias, está associada com a maior parte dos cânceres (JOSHI, PLATANIAS, 2014). Os inibidores multiquinases são descritos como inibidores que possuem como alvo dois ou mais tipos de quinases. O Sorafenibe é um inibidor multiquinase aprovado nos Estados Unidos para o tratamento de pacientes com carcinoma renal avançado e hepatocarcinoma irrissecável. Originalmente foi identificado como um potente inibidor da Raf serina/treonina quinase, mas posteriormente também foi identificada ação inibitória sobre os receptores da tirosina quinase que estão envolvidos na progressão do tumor e da angiogênese (WILHELM et al, 2006). Também tem sido demonstrada a sua capacidade de induzir apoptose de várias linhas tumorais (JUAN et al., 2014). Além disso, é um importante inibidor dos receptores pró-angiogênicos do fator de crescimento endotelial (VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3) (Raf serina/treonina quinase) e do receptor- $\beta$  do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR- $\beta$ ) (tirosina quinase), em testes bioquímicos *in vitro* (WILHELM et al, 2008).

Portanto o objetivo o trabalho foi avaliar os efeitos do inibidor multiquinase Sorafenibe sobre os três principais mecanismos da reestenose arterial (proliferação, migração e produção de matriz extracelular) em células musculares lisas arteriais *in vitro*.

## **METODOLOGIA**

Utilizou-se a linhagem celular de músculo liso de aorta torácica de *Rattus norvegicus* A7r5, adquirida do RJC Collection (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). As células foram cultivadas em condições padrões em meio de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM), suplementado

com 10% de soro bovino fetal inativado, glutamina a 0,2 mg/mL, penicilina a UI/mL e estreptomicina a 100 µg/mL, pH 7.4. As células foram mantidas em frascos de cultivo a 37°C, em atmosfera úmida, contendo 5% de gás carbônico e coletadas por tratamento com tripsina 0,15%-EDTA 0,08% em tampão fosfato salino 0,1 mol/L pH 7,4 (PBS).

A citotoxicidade foi avaliada utilizando o ensaio colorimétrico de MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide). Culturas em triplicata foram expostas ao Sorafenibee ou Paclitaxel (controle positivo) nas concentrações variando de 0 a 10 µM por 24 h. O efeito citotóxico foi determinado com base na classificação de citotoxicidade de materiais com estratificação dos níveis de viabilidade celular em porcentagem segundo categorias de toxicidade dos materiais do documento ISO 10993-5: 1999.

A distribuição das células nas fases do ciclo celular após os tratamentos foi determinada nas culturas através de citometria de fluxo por coloração com iodeto de propídio. Os resultados foram expressos em percentual de células por fase do ciclo celular.

Para avaliação da migração celular, foi utilizado o teste de *Scratch wound assay*. As células foram plaqueadas, em triplicata, em uma concentração de 10<sup>5</sup> células/poço em uma placa de 24 poços e mantidas em condições padrão de cultura, durante 24 h para permitir a adesão celular e formação de uma monocamada confluenta. Passado esse período, as monocamadas foram marcadas com uma ponta de ponteira para capacidade de pipeta p200 µL estéril, utilizando uma régua estéril para criar um risco retilíneo, formando uma lesão de comprimento próximo ao diâmetro do poço. Após, as células foram lavadas com PBS 1X para completa remoção dos *debris* celulares resultantes da criação do risco. A seguir, as células foram tratadas com Sorafenibe nas concentrações variando de 0 a 5 µM, e novamente incubadas a 37°C em ambiente com 5% de CO<sub>2</sub>. A migração celular foi analisada por fotografia após 0 h, 4 h, 8 h, 12 h e 24 h subsequentes à criação da lesão. Considerou-se o tempo 0 como sendo equivalente a 100% da medida da largura do risco.

## RESULTADOS

Até o momento demonstramos que o Sorafenibe apresenta um efeito superior ao paclitaxel no que diz respeito a citotoxicidade (Tabela 1). O Sorafenibe apresentou um efeito 1,6 vezes maior quando comparado com o paclitaxel.

Tabela 1: Valores de IC<sub>50</sub> (µM; média ± DP, n = 6) na linhagem celular músculo liso de aorta torácia de *Rattus novergicus* A7r5 após tratamento por 24 h com Paclitaxel ou Sorafenibee

	IC <sub>50</sub> (µM)
<b>Paclitaxel</b>	4,8 ± 0,5
<b>Sorafenibee</b>	3,0 ± 0,5*

\*Estatisticamente diferente do Paclitaxel (p < 0.05).

A avaliação do ciclo celular demonstrou que o paclitaxel induz um bloqueio em G2/M, o que era esperado uma vez que é um agente inibidor de fuso mitótico (Tabela 2). Já o Sorafenibee não alterou a distribuição das células no ciclo celular quando comparado com o controle negativo.

Tabela 2: Distribuição das células nas fases do ciclo celular na linhagem celular músculo liso de aorta torácica de *Rattus norvegicus* A7r5 após tratamento por 24 h com Paclitaxel ou Sorafenibee. Os resultados estão representados como percentual de células nas fases do ciclo celular (média ± desvio padrão, n = 3)

	G0/G1(%)	S (%)	G2/M (%)
<b>Controle Negativo</b>	53,3 ± 2,1	16,5 ± 1,3	25,1 ± 2,8
<b>Paclitaxel</b>	23,7 ± 6,1*	17,0 ± 1,0	49,8 ± 8,7*
<b>Sorafenibee</b>	54,4 ± 4,3	18,2 ± 1,9	22,7 ± 1,4

\*Diferente do controle negativo (p<0,05).

Ao avaliarmos a migração celular *in vitro*, observamos que os dois agentes inibiram a migração celular (Tabela 3), sendo esse efeito mais pronunciado com o Sorafenibee (2 x).

Tabela 3: Percentual de fechamento da superfície de ferimento *in vitro* na linhagem celular músculo liso de aorta torácica de *Rattus norvegicus* A7r5 após tratamento por 24 h com Paclitaxel ou Sorafenibee. Os resultados (média ± DP; n = 6) estão expressos em relação ao tempo 0 de tratamento

	Fechamento da Ferida (%)
<b>Controle</b>	30,3 ± 6,2
<b>Paclitaxel</b>	5,0 ± 0,9*
<b>Sorafenibee</b>	10,0 ± 7,0***

\* Estatisticamente diferente do Controle Negativo (p < 0.05). \*\* Estatisticamente diferente do paclitaxel (p < 0.05).

## CONCLUSÕES

Os estudos demonstraram, portanto, que o Sorafenibe age diminuindo a proliferação e a migração de células musculares lisas arteriais *in vitro*. Também se demonstrou mais efetivo que o Paclitaxel, medicamento atualmente utilizado juntamente da angioplastia.

## REFERÊNCIAS

ARRUDA, J.A., COSTA, M.A., BRITO Jr, F.S., et al. Effect of systemic immunosuppression on coronary in-stent intimal hyperplasia in renal transplant patients. **Am J Cardiol**, v. 91, p. 1363-1365, 2003.

BEATT, K.J., SERRUYS, P.W., HUGENHOLTZ, P.G. Restenosis after coronary angioplasty: new standards for clinical studies. **J Am Coll Cardiol**, v. 15, p. 491-498, 1990.

HAUDE, M., ERBEL R., ISSA, H., MEYER, J. Quantitative analysis of elastic recoil after ballon angioplasty and after intracoronary implantation of ballon-expandable Palmaz-Schatz stents. **J Am Coll Cardiol**, v. 21, p. 26-34, 1993.

JOSHI S, PLATANIAS LC. Mnk kinase pathway: Cellular functions and biological outcomes. **World J Biol Chem**, v. 5, p. 321-333, 2014.

JUAN LW, EN LM, HAO L, KAI HY, JU H. Sorafenibe regulating ERK signals pathway in gastric cancer cell. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 38, p. 438-443, 2014.

KOLCH, W., KOTWALLWALE, A., VASS, K., et al. The role of Raf kinases in malignant transformation. **Expert Rev Mol Med**, v.4, p.1-18, 2002.

MANSUR, A.P., FAVARATO, D. Mortalidade por doenças cardiovasculares no Brasil e na região metropolitana de São Paulo: atualização 2011. **Arq Bras Cardiol**, v. 9, p. 775-761, 2012.

MIZUNO, Y., JACOB, R.F., MASON, R.P. Inflammation and the development of atherosclerosis. **J Atheroscler Thromb**, vol. 18, p. 351-358, 2011.

ROSS, R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. **N Engl J Med**, v. 340, p. 115-126, 1999.

SCHWARTZ, R.S., EDELMAN, E.R., CARTER, A., CHRONOS, N., ROGERS, C., ROBINSON, K.A., et al. Drug-eluting stents in preclinical studies: recommended evaluation from a consensus group. **Circulation**, v. 106, p. 1867-1873, 2002.

SPOSITO, A.C., CAMELI, B., FONSECA, F.A., BERTOLAMI, M.C., AFIUNE, N.A., SOUZA, A.D., et al; Sociedade Brasileira de Cardiologia. IV Diretriz Brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose. Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq Bras Cardiol**, v. 88 (supl. 1), p. 2-19, 2007.

WILHELM, S., ADNANE, L., NEWELL, P., et al. Preclinical overview of Sorafenibe, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. **Mol Cancer Ther**, v.7, p.3129-3140, 2008.

WILHELM, S., CARTER, C., LYNCH, M., et al. Discovery and development af Sorafenibe: a multikinase inhibitor for treating cancer. **Nat Rev Drug Discov**, v.5, p.835-844, 2006.

WISKIRCHEN, J., SCHÖBER, W., SCHAT, N., et al. The effects of Paclitaxel on the three phases of restenosis: smooth muscle cell proliferation, migration, and matrix formation: an in vitro study. **Investigative Radiology**, v.39, p.565-571, 2004.