



EFEITO DO INIBIDOR MULTIQUINASE SORAFENIBE SOBRE CÉLULAS MUSCULARES LISAS ARTERIAIS *IN VITRO* – RESULTADOS PRELIMINARES

Laura Bainy Rodrigues de Freitas¹, Gabriela Jouglard Vasquez Amado², Rafael de Nogueira Ribeiro³, Ivana Grivicich⁴

¹Aluna do curso de graduação de medicina/ULBRA – Bolsista PROBIC/Fapergs ; ²Aluna do curso de graduação de medicina/ULBRA;

³Aluno do PPGGTA/ULBRA ; ⁴Professora do curso de graduação de medicina, PPGBioSaúde e PPGGTA /ULBRA

Introdução

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.

Objetivo

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

Linhagem Celular:

Utilizou-se a linhagem celular de músculo liso de aorta torácia de *Rattus norvegicus* A7r5, adquirida do RJCB Collection (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). As células foram cultivadas em meio de cultivo 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, e mantidas em frascos de cultivo a 37°C, em atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂.

Citotoxicidade:

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 Sorafenibe 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.

Ciclo Celular:

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.

Migração Celular:

Para avaliação da migração celular, foi utilizado o teste de *Scratch wound assay*. As células foram plaqueadas, em triplicata, em uma concentração de 105 células/poço em uma placa de 24 poços 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, formando uma lesão de comprimento próximo ao diâmetro do poço. Após, as células foram lavadas com PBS 1X e tratadas com Sorafenibe nas concentrações variando de 0 a 5 µM. 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 IC₅₀ (µM; média ± DP, n = 6) na linhagem celular músculo liso de aorta torácia de *Rattus norvegicus* A7r5 após tratamento por 24 h com Paclitaxel ou Sorafenibe.

	IC50 (µM)
Paclitaxel	4,8 ± 0,5
Sorafenibe	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 sorafenibe 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 torácia de *Rattus norvegicus* A7r5 após tratamento por 24 h com Paclitaxel ou Sorafenibe. Os resultados estão representados como percentual de células nas fases do ciclo celular (média ± desvio padrão, n = 3).

	G0/G1(%)	S (%)	G2/M (%)
Controle Negativo	53,3 ± 2,1	16,5 ± 1,3	25,1 ± 2,8
Paclitaxel	23,7 ± 6,1*	17,0 ± 1,0	49,8 ± 8,7*
Sorafenibe	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 sorafenibe (2 x).

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

	Fechamento da Ferida (%)
Controle	30,3 ± 6,2
Paclitaxel	5,0 ± 0,9*
Sorafenibe	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. Também se demonstrou mais efetivo que o Paclitaxel, medicamento atualmente utilizado juntamente da angioplastia.