

AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR EM FIBROBLASTOS HUMANOS SUBMETIDOS A TRATAMENTO COM ÁCIDO UROCÂNICO NAS ISOFORMAS *CIS* E *TRANS*

JÚLIA ARAÚJO DA SILVA¹; LARISSA MENEZES DA SILVEIRA²; GIULIA BUENO DE OLIVEIRA DA SILVA³; NATHALIA STARK PEDRA⁴; FABIANA VIEIRA LIMA SOLINO PESSOA⁵; REJANE GIACOMELLI TAVARES⁶;

¹Universidade Federal de Pelotas – juliaaraujodsilva@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – e-mail do autor 2 (se houver)

³ Universidade Federal de Pelotas – giuliadasilvas2002@gmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – nathaliastark@hotmail.com

⁵ Universidade Federal do Espírito Santo – fabianavlimag@gmail.com

⁶ Universidade Federal de Pelotas – tavares.rejane@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O ácido urocânico (AUC), derivado do ácido imidazol-acrílico, é um cromóforo produzido no estrato córneo (EC) durante o processo de queratinização da pele a partir da degradação de resíduos de histidina provenientes da proteína filagrina, por meio da ação da enzima hitidase (L-histidina amônia-liase) (LIMA et al., 2021). Ao longo dos anos, inúmeras funções foram descobertas para o composto, como a regulação da homeostase da pele, a contribuição para a manutenção da retenção hídrica e do pH ácido local, conferindo suporte à hidratação natural e a prevenção da colonização microbiana (HART & NORVAL, 2021).

Além disso, em humanos, a melanina e o *trans*-AUC desempenham as principais funções de defesa da pele, absorvendo os raios UV e gerando fotoproteção por meio da isomerização da molécula após a exposição à radiação UVB (BOO, 2020). Dessa forma, atua como um protetor solar natural para a pele, protegendo-a dos danos ao DNA causados pela exposição solar (HART & NORVAL, 2021). O composto é encontrado naturalmente na forma isomérica *trans* e, ao ser exposto à luz solar, sofre fotoisomerização para a forma *cis*.

Entretanto, a isoforma *cis* é descrita na literatura como tendo atividade imunossupressora por meio de uma série de mecanismos de ação ainda não totalmente compreendidos. Parte desses mecanismos envolve a ligação ao receptor 5HT_{2A} em mastócitos, células de Langerhans (CLs) e queratinócitos. Essa ligação estimula a liberação do fator de necrose tumoral (TNF α) pelos queratinócitos, impedindo que as CLs migrem para o linfonodo de drenagem e apresentem抗ígenos às células T. Além disso, estimula a liberação de histamina pelos mastócitos, levando à subsequente produção de prostaglandina E2 (PGE2) (BERNARD et al., 2019).

Devido às mudanças no estilo de vida da população e aos impactos ambientais, a exposição à radiação UVB tem aumentado ao longo dos anos (KAUNDINYA et al., 2023). Como resultado, o diagnóstico de câncer de pele aumentou exponencialmente. Estatísticas epidemiológicas mostram que aproximadamente 95% dos cânceres de queratinócitos e 70-95% dos melanomas são causados pela exposição excessiva a esse tipo de radiação (GARBE et al., 2024). O uso de filtros solares que possam bloquear eficazmente os raios UVB e reduzir a taxa de desenvolvimento de câncer é essencial. Nesse contexto, o *trans*-AUC pode ser um excelente candidato para inclusão em formulações

fotoprotetoras, visto que o composto atua naturalmente nessa função. No entanto, para uso em formulações tópicas, é necessário avaliar a potencial citotoxicidade da isoforma *cis* para garantir que, após a exposição da pele à radiação, a conversão do *trans*-AUC em *cis*-AUC não se torne tóxica para as células saudáveis. Portanto, o objetivo deste estudo, foi avaliar a citotoxicidade do AUC em suas duas isoformas (*trans* e *cis*) em culturas de células de fibroblastos humanos (MRC5) a partir do ensaio de MTT.

2. METODOLOGIA

2.1 Cultivo de fibroblastos humanos (MRC5)

As células de fibroblastos humanos (MRC5) foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC) (Rockville, MD, EUA). As mesmas foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas em estufa a 37 °C contendo 5% de CO₂. Após atingir confluência desejada, as células foram semeadas em placas de 96 poços com densidade de 5x10³ por poço.

2.2 Tratamento com *trans* e *cis*-AUC

Para os tratamentos, os compostos *trans*-AUC (SIGMA-ALDRICH, 859796) e *cis*-AUC (SIGMA-ALDRICH, U6883) foram obtidos da Sigma-Aldrich. Para tal, duas soluções estoque de 0,1 g/mL foram preparadas utilizando os compostos *trans* e *cis*, os quais foram dissolvidos em água para injeção. Essas soluções estoque foram então diluídas em meio DMEM para obtenção das concentrações finais de 10, 100 e 500 µg/mL. As placas foram posteriormente tratadas com essas concentrações por 24, 48 e 72 horas para avaliação de citotoxicidade.

2.3 Teste de viabilidade celular (MTT)

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio colorimétrico de [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT), de acordo com a metodologia proposta por Mosmann (1983). Este ensaio consiste na redução celular do reagente MTT, onde será observada coloração mais intensa em células com mitocôndrias ativas.

Para a realização, após o término dos tempos de tratamento (24, 48 e 72 h), o meio DMEM foi removido dos poços e estes foram lavados com solução isenta de cálcio e magnésio (CMF). Após a lavagem, uma solução de MTT na concentração de 0,5 mg/mL foi adicionada. Em seguida, as placas foram incubadas por 90 minutos em condições padrão de cultura. Por fim, o MTT foi removido e o precipitado formado foi dissolvido com 50 µL de DMSO para leitura das absorbâncias no comprimento de onda de 492 nm em um leitor de microplacas.

2.4 Análise estatística

Os dados foram analisados em triplicata e expressos como média ± erro padrão da média. A mesma foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 8. Utilizaram-se análises de variância (ANOVA) unifatorial seguidas do teste post-hoc de Tukey, sendo considerados significativos quando P < 0,05.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliar a citotoxicidade do AUC, a viabilidade celular foi determinada utilizando o ensaio de MTT. Na Figura 1, estão evidenciados os resultados obtidos

na viabilidade celular da linhagem celular MRC5 quando exposta aos isômeros *trans* e *cis* do composto. É evidente que o aumento das concentrações de 10 para 500 µg/mL não causou alterações significativas na viabilidade das células tratadas em comparação com o controle.

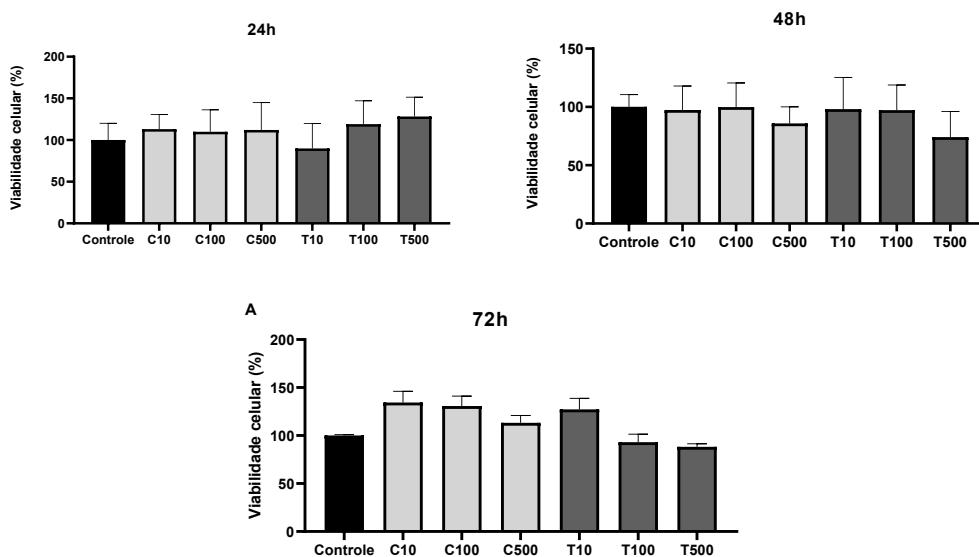


Figura 1. Análise da viabilidade celular após 24, 48 e 72 horas de tratamento com *trans*-AUC (T) e *cis*-AUC (C), na linhagem celular MCR5 com concentrações crescentes (10 a 500 µg/mL). Os valores representam a média ± erro padrão da média, analisados por ANOVA unidirecional seguida do teste post-hoc de Tukey. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Os resultados apresentados neste trabalho demonstraram boa tolerabilidade de ambas as isoformas do composto até a concentração máxima de 500 µg/mL. No entanto, os dados disponíveis na literatura sobre a citotoxicidade da isoforma *cis* não são claros. Korhonen et al. (2023) indicam que o composto *cis* nas concentrações de 10 e 500 µg/mL apresentou redução na viabilidade celular em 24 horas de exposição após a realização do ensaio de MTT em uma linhagem de células epiteliais pigmentares da retina (ARPE-19; CRL-2302). Neste mesmo estudo, a concentração de 100 µg/mL não apresentou redução significativa.

Em contrapartida, Viiri et al. (2009) obtiveram resultados diferentes, semelhantes aos obtidos neste trabalho, onde a viabilidade celular não foi afetada em concentrações abaixo de 1000 µg/mL em linhagens celulares de células epiteliais da córnea humana (HCE-2) e células epiteliais da conjuntiva humana (HCECs). Além disso, juntamente com a exposição à radiação UVB e o tratamento com o composto *cis*, a HCE-2 demonstra uma diminuição na secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e IL-8) em comparação às células expostas apenas à radiação, fazendo com que a redução na proliferação celular seja controlada nas células tratadas. Isso está correlacionado com a inibição da fosforilação das proteínas c-Jun (Ser63) e JNK (Thr183/Tyr185), que são ativadas pelo estresse celular e desempenham um papel fundamental na iniciação da cascata apoptótica (JAUHONEN, 2011).

Uma hipótese para a divergência dos resultados se deve à sensibilidade de cada tipo celular à exposição aos compostos por meio da expressão de diferentes receptores celulares. Portanto, os resultados sugerem que, além de ser dose-dependente, o efeito citotóxico do *cis* também é sítio-dependente, necessitando de

sítios de ligação específicos para gerar o efeito citotóxico. Nesse sentido, Bouscarel et al. (1998) identificaram que o *cis*, mas não o *trans*, foi capaz de inibir a formação de AMPc a partir da indução de PGE1 e PGE2 em fibroblastos dérmicos. No entanto, não demonstrou eficácia em hepatócitos de hamster ou em adenocarcinoma humano, sugerindo que fibroblastos humanos confluentes possuem seus próprios receptores de ligação para *cis*-UCA.

4. CONCLUSÕES

É possível concluir com este trabalho que o AUC em ambas as isoformas (*trans* e *cis*) não foi capaz de gerar citotoxicidade em células saudáveis de fibroblastos humanos até a concentração máxima de 500 µg/mL em 72 horas de exposição. Entretanto, este estudo é limitado e há a necessidade de mais ensaios a fim de determinar os efeitos prolongados e o mecanismo de ação em torno da ligação das isoformas nas células.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERNARD, J.J. et al. Photoimmunology: how ultraviolet radiation affects the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 11, p. 688-701, 2019.
- BOO, Y.C. Emerging strategies to protect the skin from ultraviolet rays using plant-derived materials. **Antioxidants**, v. 9, n. 7, p. 637, 2020.
- BOUSCAREL, Bernard et al. Regulation of stimulated cyclic AMP synthesis by urocanic acid. **Photochemistry and photobiology**, v. 67, n. 3, p. 324-331, 1998.
- DE SZALAY, S.; WERTZ, P.W. Protective barriers provided by the epidermis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 4, p. 3145, 2023.
- FINLAY-JONES, J.J.; HART, P.H. Ultraviolet irradiation, systemic immunosuppression and skin cancer: role of urocanic acid. **Australasian Journal of Dermatology**, v. 38, 1997.
- GARBE, C. et al. Skin cancers are the most frequent cancers in fair-skinned populations, but we can prevent them. **European journal of cancer**, v. 204, p. 114074, 2024.
- HART, P.H.; NORVAL, M. The multiple roles of urocanic acid in health and disease. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 141, n. 3, p. 496-502, 2021.
- JAUHONEN, Hanna-Mari et al. Cis-urocanic acid inhibits SAPK/JNK signaling pathway in UV-B exposed human corneal epithelial cells in vitro. **Molecular Vision**, v. 17, p. 2311, 2011.
- KAUNDINYA, T. et al. The epidemiology of skin cancer by UV index: Cross-sectional analysis from the 2019 behavioral risk factor surveillance survey. **Archives of Dermatological Research**, v. 315, n. 3, p. 613-615, 2023.
- KORHONEN, E. et al. Cis-urocanic acid improves cell viability and suppresses inflamasome activation in human retinal pigment epithelial cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 216, p. 115790, 2023.
- LIMA, F.V. et al. Analytical tools for urocanic acid determination in human samples: A review. **Journal of Separation Science**, v. 44, n. 1, p. 438-447, 2021.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- VIIRI, J. et al. Cis-urocanic acid suppresses UV-B-induced interleukin-6 and -8 secretion and cytotoxicity in human corneal and conjunctival epithelial cells in vitro. **Molecular vision**, v. 15, p. 1799, 2009.