

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

JÚLIA ARAÚJO DA SILVA<sup>1</sup>; LARISSA MENEZES DA SILVEIRA<sup>2</sup>; GIULIA BUENO DE OLIVEIRA DA SILVA<sup>3</sup>; NATHALIA STARK PEDRA<sup>4</sup>; FABIANA VIEIRA LIMA SOLINO PESSOA<sup>5</sup>; REJANE GIACOMELLI TAVARES<sup>6</sup>;

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [juliaaraujodsilva@gmail.com](mailto:juliaaraujodsilva@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – e-mail do autor 2 (se houver)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [giuliadasilvas2002@gmail.com](mailto:giuliadasilvas2002@gmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – [nathaliastark@hotmail.com](mailto:nathaliastark@hotmail.com)

<sup>5</sup>Universidade Federal do Espírito Santo – [fabianavlimag@gmail.com](mailto:fabianavlimag@gmail.com)

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – [tavares.rejane@gmail.com](mailto: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 histidase (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<sub>2A</sub> em mastócitos, células de Langerhans (CLs) e queratinócitos. Essa ligação estimula a liberação do fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ) pelos queratinócitos, impedindo que as CLs migrem para o linfonodo de drenagem e apresentem antígenos 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 CO<sub>2</sub>. Após atingir confluência desejada, as células foram semeadas em placas de 96 poços com densidade de 5x10<sup>3</sup> 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.

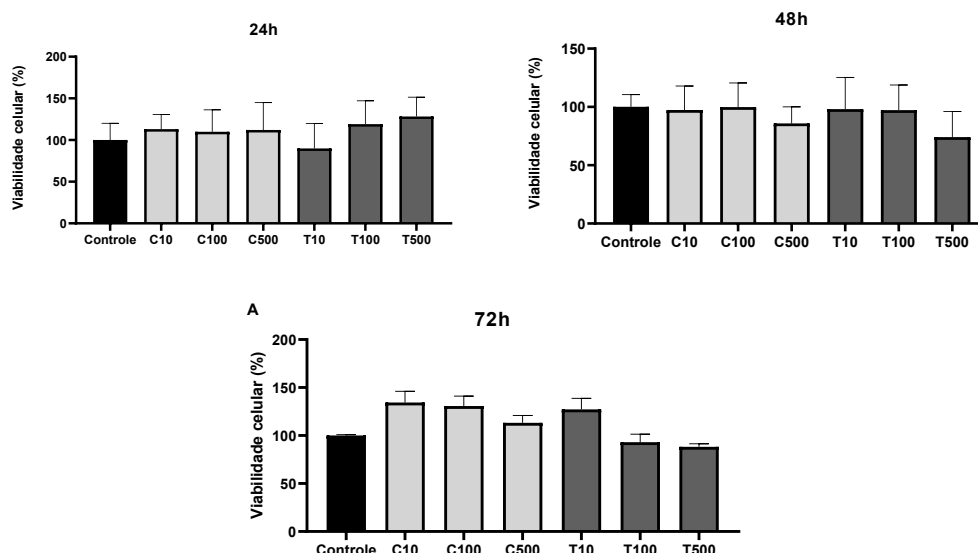
### 2.4 Análise estatística

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 inflammasome 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.