

ESTUDOS DOS MECANISMOS DE AÇÃO DO TMBP EM CÉLULAS L-929 EXPOSTAS À RADIAÇÃO UVB.

Clara Fernandes Torre (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Bruna Terra Alves da Silva, Sueli de Oliveira Silva Lautenschlager (Orientador). E-mail: lautenschlager@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Maringá, PR.

Area e sbárea do conhecimento: Farmácia/Farmacognosia

Palavras-chave: Fotoproteção; Radiação UVB; Antioxidante.

RESUMO

A radiação ultravioleta B (UVB), devido sua alta energia, penetra na epiderme, causando danos diretos ao DNA e danos indiretos via produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Substâncias antioxidantes, como o 3,3',5,5'-tetrametoxibifenil-4,4'-diol (TMBP), contribuem para manter o equilíbrio redox celular. O objetivo foi estudar o efeito do tratamento com TMBP em fibroblastos L-929 submetidos à radiação UVB. Foi avaliado o potencial de membrana mitocondrial, a lipoperoxidação, a fragmentação do DNA e a integridade da membrana celular. O TMBP apresentou eficácia in vitro e pode ser promissor para fotoproteção.

INTRODUÇÃO

A pele é uma barreira protetora e está diretamente exposta aos efeitos nocivos da radiação solar, que inclui três faixas com base em suas características de propagação e efeito biológico: UVC, UVB e UVA. A UVC, apesar de ser um potente agente mutagênico, não atinge a superfície terrestre devido à absorção pela camada de ozônio. Já a radiação UVB e UVA alcançam a Terra e causam danos cutâneos (SOLANO, 2020). A UVB, por sua alta energia, penetra na epiderme, causando danos diretos ao DNA e indiretos, através da produção de ERO.

As ERO desempenham papel crucial no funcionamento celular, mas se tornam prejudiciais quando sua produção é excessiva ou quando há uma redução nos agentes antioxidantes, levando ao estresse oxidativo. Antioxidantes são essenciais para a saúde da pele, pois neutralizam ERO e previnem o estresse oxidativo (GEÇOTEK, 2020). O TMBP demonstrou potencial antioxidante em ensaios livre de células, sugerindo ser um composto promissor para proteção solar. Nosso objetivo

foi estudar possíveis mecanismos de ação do TMBP como agente fotoquimioprotetor em fibroblastos L-929 submetidos à radiação UVB.

MATERIAIS E MÉTODOS

Avaliação do potencial de membrana mitocondrial e peroxidação lipídica.

Para avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) foi usado o marcador tetrametilrodamina (TMRE) que se concentra nas mitocôndrias ativas, e para a peroxidação lipídica foi usado o DPPP (difênil-1-pirenilfosfina) que reage com hidroperóxidos lipídicos. Células L-929 foram tratadas com TMBP por 1 hora, lavadas com PBS e irradiadas com UVB. Após 24 horas as células foram marcadas com TMRE ou DPPP, incubadas por 30 minutos em estufa de CO₂ e lavadas com PBS. A leitura da fluorescência foi feita em espectrofluorímetro a 540nm.

Avaliação da fragmentação do DNA e da integridade da membrana celular.

A avaliação da fragmentação do DNA e da integridade da membrana celular foi feita usando os marcadores fluorescentes Hoeschst e PI. O Hoeschst cora de azul o núcleo de células viáveis enquanto PI cora de vermelho o DNA de células não viáveis. Células L-929 foram tratadas com TMBP durante 1 h, irradiadas com UVB. Após 24 horas as células foram incubadas com Hoechst por 20 min seguido de incubação com PI por 15 min. A fluorescência foi analisada utilizando um microscópio de fluorescência.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra os efeitos do TMBP sobre o $\Delta\psi_m$ em fibroblastos L-929 irradiados com UVB usando o marcador TMRE. É possível observar que as células irradiadas com UVB apresentaram uma redução significativa no $\Delta\psi_m$ em comparação com o controle negativo. No entanto, as células irradiadas com UVB e pré-tratadas com TMBP 1 - 25 μ M diminuiu a perda de $\Delta\psi_m$, não de forma significativa, mas com valores similares a quercetina, um conhecido antioxidante.

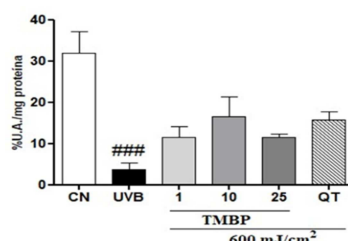


Figura 1 - Avaliação do potencial de membrana mitocondrial em fibroblastos L-929 tratados com TMBP e irradiados com UVB usando marcador fluorescente TMRE. CN: controle negativo; células não tratadas e não irradiadas; UVB: células irradiadas com UVB (600 mJ/cm²); TMBP: células tratadas com TMBP (1 - 25μM) e irradiadas com UVB; QT: células tratadas com quercetina (20Mm) e irradiadas com UVB; ### p < 0.001, diferença significativa em comparação com CN.

A Figura 2 mostra que a radiação UVB aumentou significativamente a peroxidação lipídica em comparação com o controle CN. O H₂O₂ também induziu danos semelhantes comparado com o controle. Em contrapartida, o pré-tratamento com TMBP 1 μM induziu reduções significativas na lipoperoxidação em células irradiadas, em comparação com o controle UVB.

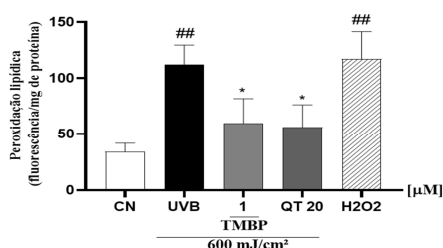


Figura 2. Avaliação da peroxidação lipídica em fibroblastos L-929 tratados com TMBP e irradiados com UVB usando marcador fluorescente DPPP. CN: controle negativo; células não tratadas e não irradiadas; UVB: células irradiadas com UVB (600 mJ/cm²); TMBP: células tratadas com TMBP (1 μM) e irradiadas com UVB; QT: células tratadas com quercetina (20 Mm) e irradiadas com UVB; H₂O₂: células tratadas com peróxido de hidrogênio; ## p < 0.0011, diferença significativa em comparação com o grupo CN; * p < 0,0011, diferença significativa em comparação com o grupo UVB.

A Figura 3 mostra os resultados da condensação do DNA e a integridade da membrana celular em fibroblastos L-929 tratados com TMBP e irradiados com UVB, utilizando dupla coloração com Hoechst e IP. A radiação UVB alterou o DNA nos fibroblastos, refletido por um aumento na intensidade da fluorescência azul em comparação com o grupo CN. O tratamento com TMBP a 1-25 μM diminuiu a intensidade de fluorescência induzida por UVB. A Figura 3 mostra também uma diminuição na integridade da membrana celular no grupo UVB, refletida por um aumento na intensidade da fluorescência vermelha em comparação com o grupo NC. O tratamento com TMBP de 1 - 25 μM diminuiu esta intensidade em

comparação com o grupo UVB. Digitonina (80 μ M), uma saponina que solubiliza lipídios, foi utilizada como controle positivo.

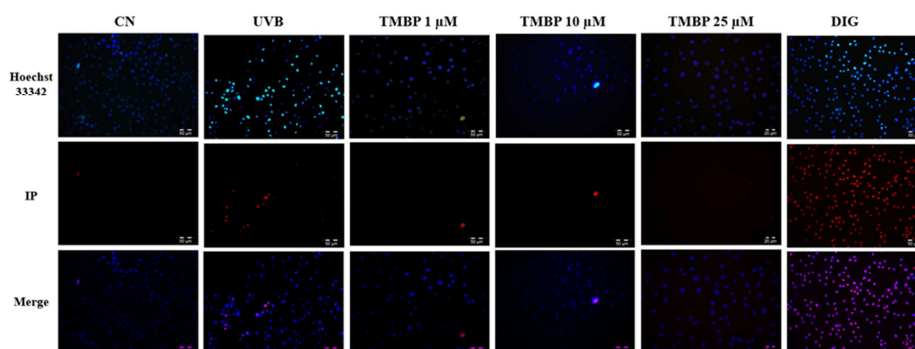


Figura 3. Avaliação da condensação do DNA e da integridade da membrana celular em fibroblastos L-929 tratados com TMBP e irradiados com UVB usando marcadores fluorescentes Hoeschst (fluorescência azul) e PI (fluorescência vermelha).

CONCLUSÕES

O TMBP preveniu o fotodano em fibroblastos L-929 diminuindo os efeitos da radiação UVB na $\Delta\Psi_m$, na peroxidação lipídica, na fragmentação do DNA e na integridade da membrana celular. Este efeito está provavelmente relacionado com as propriedades antioxidantes do TMBP que modula o estado redox da célula.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Araucária, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Universidade Estadual de Maringá, ao Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos.

REFERÊNCIAS

GEȢOTEK, A.; DOMINGUES, P.; SKRZYDLEWSKA, E. Natural Exogenous Antioxidant Defense against Changes in Human Skin Fibroblast Proteome Disturbed by UVA Radiation. **Oxid Med Cell Longev**. Nov 5:2020:3216415. doi: 10.1155/2020/3216415. 2020.

SOLANO, F. Photoprotection and Skin Pigmentation: Melanin-Related Molecules and Some Other New Agents Obtained from Natural Sources. **Molecules**. 2020 Mar 27;25(7):1537. doi: 10.3390/molecules25071537.