AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO ANTIOXIDANTE E FOTOQUIMIOPROTETOR DO TMBP EM CÉLULAS L929 IRRADIADOS POR UVB

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

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

Área e subárea do conhecimento: Ciências da Saúde/Farmácia

Palavras-chave: Fotoproteção; Radiação UVB; Fibroblastos.

RESUMO

A radiação UVB, oriunda da exposição solar, causa danos diretos ao DNA e indiretos por meio da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), que, em excesso superam a capacidade antioxidante do corpo de neutralizá-las. Diante disso, substâncias antioxidantes são estudadas com objetivo de auxiliar na fotoquimioproteção e manter o equilíbrio redox. O 3,3′,5,5′-tetrametoxibifenil-4,4′-diol (TMBP) demonstrou efeito sobre a atividade de enzimas antioxidantes endógenas, contribuiu para a manutenção da morfologia celular favorecendo o processo de cicatrização de fibroblastos L-929 expostos à radiação UVB, indicando ter um potencial fotoquimioprotetor contra danos induzidos pela radiação solar UVB.

INTRODUÇÃO

A pele é uma barreira protetora e está diretamente exposta aos efeitos nocivos da radiação solar. A radiação que atinge a pele pode ser dividida em três faixas com base em suas características de propagação e efeito biológico, sendo a UVA e a UVB aquelas que alcançam a Terra e causam danos cutâneos (Solano et al., 2020).

A UVB penetra a epiderme e induz danos diretos ao DNA e indiretos, via produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs envolvem radicais livres de oxigênio, altamente instáveis que causam danos ao DNA, lipídios e proteínas (Chaudary et al., 2023). O desequilíbrio redox é atingido quando enzimas antioxidantes não conseguem neutralizar as EROs, comprometendo a integridade celular.

Dessa maneira, antioxidantes são essenciais, pois neutralizam EROs e previnem o estresse oxidativo (Gegotek et al., 2020). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do TMBP sobre fibroblastos L-929 expostos a radiação UVB, avaliando o sistema antioxidante, as alterações morfológicas e a capacidade de migração e regeneração celular *in vitro*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Determinação nos níveis de glutationa reduzida

Os níveis intracelulares de GSH foram determinados por fluorescência utilizando o reagente o-ftalaldeído (OPT). Fibroblastos L-929 foram tratados por 1h com TMBP ou NAC, e expostos à radiação UVB. Após 24 h, o lisado celular obtido por lise, sonicação e centrifugação foi incubado com OPT por 15 min. A fluorescência foi medida a 350/420 nm e os níveis de GSH foram determinados a partir de curva padrão e normalizados pela concentração de proteínas, pelo método de Bradford.

Quantificação de enzima Catalase e Superóxido dismutase

A atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) foi determinada por espectrofotometria utilizando lisado celular. Para SOD, a reação com piragolol foi monitorada a 420 nm por 2 min a 25ºC. Para catalase, a decomposição do H_2O_2 foi acompanhada a 240 nm por 5 min a 25ºC. As atividades enzimáticas foram determinadas por comparação com curvas padrão de SOD e CAT de fígado bovino.

Análise morfológica através da microscopia eletrônica de varredura

A morfologia celular foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Fibroblastos L-929 foram tratados com TMBP por 1 h, lavadas com PBS e irradiadas com UVB. Após as 24 h, fixados com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato (0,1 M) e desidratados em série crescente de etanol (30–100%). As amostras foram submetidas ao ponto crítico, metalizadas com ouro e analisadas em MEV.

Avaliação da migração celular cicatrizante

A migração celular foi avaliada por ensaio de cicatrização (“wound healing”). Fibroblastos L-929 foram semeados em placas de 24 poços e submetidos a um risco linear com ponteira estéril. As células foram tratadas com TMBP por 24 h e expostas à UVB. As Imagens foram obtidas em 0, 24 e 48 h após a irradiação em microscópio óptico, e a área de fechamento da ferida foi quantificada utilizando o software ImageJ.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os níveis de CAT e SOD **(Figura 1A e B)** foram reduzidos significativamente após à radiação UVB em 47,1% e 30,4%, respectivamente, indicando um comprometimento do sistema antioxidante celular natural. Enquanto o tratamento com TMBP em 1, 10 e 25 µM promoveu um aumento dos níveis da enzima CAT de 64,2%, 44,3% e 81,4%, respectivamente e para SOD de 29,7%, 32,3% e 45,1% respectivamente sugerindo uma recuperação parcial da ação antioxidante. Da mesma maneira, a enzima GSH **(Figura 1C)** apresentou uma redução de 29,9% na atividade antioxidante quando expostas à radiação UVB, destacando um aumento

na sua atividade quando pré-tratadas com TMBP 1, 10 e 25 µM de 24,8%, 19,8% e 23% respectivamente.

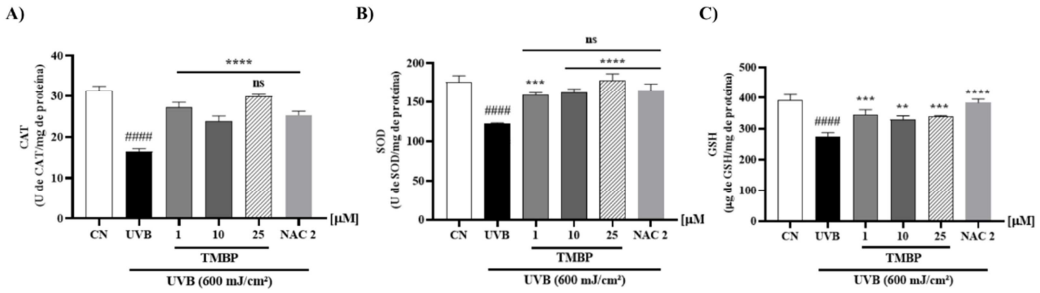


Figura 1. Avaliação da atividade da CAT (A), SOD (B) e GSH (C) em fibroblastos L-929 tratados com TMBP e irradiados com UVB. Controle Negativo (CN): células não tratadas e não irradiadas; UVB: células não tratadas e irradiadas com UVB (600 mJ/cm²); TMBP: células irradiadas e tratadas com TMBP (1, 10 e 25 µM); N-acetilcisteína (NAC): células irradiadas e tratadas com NAC (2 µM). #### $p < 0.0001$ comparando com CN. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$ em comparação com UVB, ns: sem relevância significativa em relação ao CN.

A morfologia celular de fibroblastos L-929 tratados com TMBP e irradiados com UVB é apresentada na Figura 2. As células do controle negativo apresentam um formato alongado fusiforme, com uma superfície com poucas irregularidades e diversos prolongamentos citoplasmáticos que indicam adesão dessas células. Porém, a exposição à radiação UVB, promoveu alterações morfológicas caracterizadas pela perda do formato e células mais arredondadas, uma diminuição dessa aderência celular e prolongamentos do citoplasma. O TMBP atenuou essas alterações, promovendo uma maior preservação na morfologia típica dos fibroblastos.

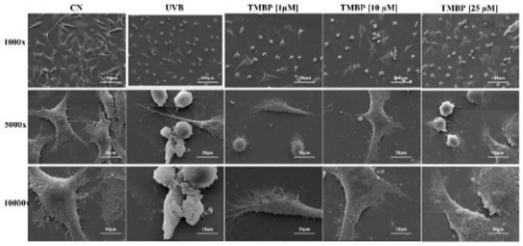


Figura 2. Avaliação da morfologia por MEV de células L-929 tratadas com TMBP e irradiadas com UVB. 1000x, 5000 e 10000x: ampliação da microscopia; CN: controle negativo, células não tratadas e não irradiadas; UVB: células não tratadas e irradiadas com UVB (600 mJ/cm²); TMBP: células irradiadas e tratadas com TMBP (1, 10 e 25 µM).

As imagens do ensaio de *wound healing* (**Figura 3**) mostram que todos os grupos apresentaram zonas de lesões semelhantes ao tempo 0h, logo após a radiação UVB. Ao longo do tempo, o grupo CN exibiu um fechamento progressivo da ferida, enquanto o grupo UVB apresentou um agravamento da lesão de -7,30% em 24 horas e -13,80% em 48 horas. Em contrapartida, os grupos que foram tratados com TMBP demonstraram uma redução da área da ferida em até 32,32%, indicando um efeito protetor tempo dependente sobre a proliferação celular. A análise quantitativa confirmou essa representação visual.

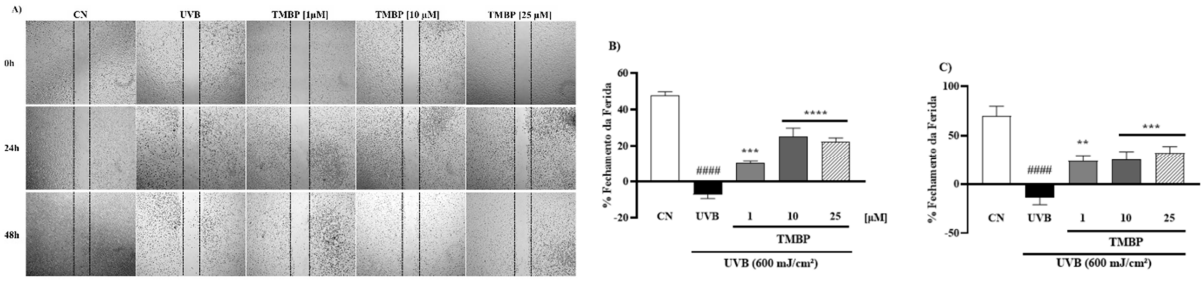


Figura 3. Avaliação da migração de fibroblastos L-929 tratados com TMBP. Imagens obtidas nos tempos de 0, 24 e 48 h após a realização da lesão. **A)** Imagens em contraste de fase capturadas utilizando microscópio invertido (aumento de 10×; barra de escala: 200 µm). **B e C)** Quantificação da área de fechamento da ferida realizada por meio do software ImageJ comparando os tempos de 0 e 24 e 0 e 48 h, respectivamente. Controle Negativo (CN): células não tratadas e não irradiadas; UVB: células não tratadas e irradiadas com UVB (600 mJ/cm²); TMBP: células irradiadas e tratadas com TMBP (1,10 e 25 µM). #### $p < 0.0001$, em comparação com CN, **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$ e ** $p < 0.01$, em comparação com UVB.

CONCLUSÕES

O TMBP preservou a atividade das enzimas antioxidantes endógenas CAT, SOD e GSH, a integridade morfológica e a capacidade de regeneração celular de fibroblastos L-929 após a exposição à radiação UVB. Esses resultados indicam que o TMBP possui potencial para o desenvolvimento de estratégias de prevenção do fotodano cutâneo, embora estudos adicionais sejam necessários para confirmar sua eficácia em modelos mais complexos.

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

CHAUDHARY P. *et al*. Oxidative stress, free radicals and antioxidants: potential crosstalk in the pathophysiology of human diseases. **Frontiers Chemistry**. 2023 May 10;11:1158198. DOI: https://doi.org/10.3389/fchem.2023.1158198

GĘGOTEK, A. *et al*. Natural Exogenous Antioxidant Defense against Changes in Human Skin Fibroblast Proteome Disturbed by UVA Radiation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2020, p. 1-12, 5 nov. 2020. DOI: https://doi.org/10.1155/2020/3216415.

SOLANO, F. *et al*. Photoprotection and Skin Pigmentation: Melanin-Related Molecules and Some Other New Agents Obtained from Natural Sources. **Molecules**.

v. 25, n. 7, p. 1537, 27 mar. 2020. MDPI AG. DOI: https://doi.org/10.3390/molecules25071537.