

EFEITOS DO ÁCIDO P-CUMÁRICO SOBRE FIBROBLASTOS IN VITRO: IMPLICAÇÕES NOS PARÂMETROS DA CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA

Aquino FLT^{1,4*}, Ferro JNS^{2,4}, Barreto E^{3,4}.

1. Estudante de mestrado do PPGCS da UFAL
2. Pesquisadora do Laboratório de Terras Raras, UFPE
3. Professor adjunto UFAL - ICBS / Orientador
4. Laboratório de Biologia Celular

Resumo

A cicatrização é um processo fisiológico pelo qual o organismo tende a reparar um tecido lesado e sua ineficiência compromete a integridade tecidual. Desta forma, a busca por moléculas capazes de contribuir com o fechamento de feridas de forma rápida e eficiente é altamente relevante. Os fibroblastos são células importantes para cicatrização por estarem envolvidos com a manutenção da integridade tecidual. Logo, identificar substâncias com potencial de modular funções de fibroblastos se mostra relevante. Neste contexto, os compostos fenólicos de origem natural têm merecido destaque devido a seus efeitos sobre a cicatrização de feridas. No entanto, pouco se conhece sobre os efeitos do ácido *p*-cumárico sobre as funções de fibroblastos. Portanto, neste estudo objetivou-se avaliar *in vitro* o efeito do ácido *p*-cumárico sobre funções relacionadas aos fibroblastos nos eventos de cicatrização de feridas como proliferação, migração, produção de laminina.

Palavras-chave: Cicatrização; Fibroblasto; Ácido *p*-cumárico.

Apoio financeiro: CAPES

Introdução

O processo cicatricial possui fases distintas e subsequentes que se sobrepõem, sendo elas: fase inflamatória, fase proliferativa, e fase de remodelamento (DULMOVITS, 2012). Durante todo processo eventos bioquímicos e diversos tipos celulares encontram-se envolvidos para garantir o apropriado fechamento da ferida. Dentre as diversas células teciduais associadas ao processo de cicatrização, os fibroblastos merecem destaque por estarem presentes desde a fase inflamatória até a fase final chamada de remodelamento, onde possuem um papel crucial para o estabelecimento do tecido cicatricial (PASTAR et al., 2014). Os fibroblastos possuem diversas funções essenciais no processo de cicatrização, incluindo a produção de proteínas estruturais como o colágeno, sendo este o principal componente do tecido conjuntivo maduro e fundamental na constituição da matriz extracelular (EMING, 2014).

No entanto, nem sempre o processo de cicatrização mostra-se eficiente o que gera feridas crônicas e sequelas para o indivíduo (GOULD, 2015). Múltiplos são os fatores que prejudicam uma ou mais fases do processo de cicatrização, como: falhas na oxigenação tecidual, infecções, idade e certos tipos de medicamentos. Algumas patologias também podem acarretar comprometimento na cicatrização, como é o caso do diabetes, distúrbios circulatórios e hipertensão (GUO, 2010).

Para atender o desafio de garantir uma cicatrização eficiente torna necessária a procura de novos fármacos e/ou novos métodos de manejo de feridas. Neste contexto, deve-se enfatizar o importante papel dos produtos naturais, visto que vários compostos oriundos de fontes vegetais e/ou animais possuem uma gama diversificada de efeitos úteis para o tratamento de diversas doenças (CHEN, 2016). Integrando um diversificado grupo de substâncias de origem vegetal, os compostos fenólicos são conhecidos por suas propriedades antimicrobiana, antitumoral, anti-inflamatória e cicatrizante (MARTINEZ et al., 2016; SU et al., 2014). Neste grupo, o ácido *p*-cumárico vem recebendo atenção devido aos seus efeitos farmacológicos de interesse. Portanto, o presente estudo objetivou avaliar o efeito do ácido *p*-cumárico sobre a migração de fibroblastos *in vitro*.

Metodologia

Foram utilizadas células da linhagem 3T3 cultivadas em DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal, 2 mM L-glutamina e 0,02% de penicilina/estreptomicina, sendo as células mantidas em estufa com atmosfera úmida de CO₂ a 5% à 37 °C. A viabilidade das células foi avaliada pelo ensaio colorimétrico do MTT. Para isso, as células (7x10³ células/poço) foram mantidas em cultivo por 24 h em placas de 96 poços com diferentes concentrações de ácido *p*-cumárico (3-100 µM) ou meio de cultura (controle) em uma incubadora umidificada com 5% de CO₂ a 37 °C. Após este tempo, foi adicionado MTT (22,5 µL/poço) de MTT e, seguido o período de incubação por 4 h com MTT, foi adicionado 150 µL de dimetilsulfóxido. A absorbância de cada poço foi mensurada usando um espectrofotômetro de microplacas e a densidade óptica (DO) foi medida a 540 nm.

A capacidade do ácido *p*-cumárico em induzir a migração em fibroblastos foi avaliado pelo ensaio de migração horizontal ("scratch assay"). Neste, as células (1,5 x 10⁵ células/poço) foram semeadas em placas de 24 poços e mantidas *overnight* em estufa para a adesão celular. Em seguida, foi realizado um risco linear na

monocamada de células, utilizando uma ponteira p200. Os poços foram tratados com ácido *p*-cumárico (3, 10 ou 30 μM) ou apenas meio de cultura (controle). Com o objetivo de avaliar as possíveis vias moleculares envolvidas na migração celular induzida pelo ácido *p*-cumárico, as células foram pré-tratadas por 60 minutos antes do risco, com SB203580 (10 μM), JNK-IN-8 (10 μM), PKI-(6-22)-amida (10 μM) e KG-501 (25 μM), inibidores das vias p38MAPK, JNK, PKA ou CREB, respectivamente.

O efeito do ácido *p*-cumárico sobre a produção de laminina foi avaliado através da técnica de imunofluorescência indireta. Para isso, as células (1×10^4) foram semeadas em lâminas LabTeks e mantidas *overnight* em estufa. Após a adesão, as células foram tratadas com ácido *p*-cumárico (30 μM) ou meio de cultura (controle) por 24 horas. As células fixadas foram incubadas em temperatura ambiente e em câmara escura e úmida com anticorpo primário anti-laminina (1:50) por 1 hora. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo secundário conjugado ao fluorocromo FITC por 45 minutos. Os núcleos foram contra-corados com DAPI. As fotomicrografias foram obtidas por microscopia de fluorescência e avaliadas utilizando o *software* ImageJ. A intensidade de fluorescência em pixels das áreas que sofreram reatividade com o anticorpo é diretamente proporcional a produção da molécula analisada. As marcações em verde indicam a marcação específica da laminina e as marcações em azul evidenciam os núcleos celulares.

Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), realizados em triplicata e analisados estatisticamente empregando-se o teste *t* ou a análise de variância (ANOVA), seguida de pós-teste de Newman-Keuls. Os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

Como demonstrado na Figura 1, a exposição ao ácido *p*-cumárico por 24 h induziu um aumento no número de células viáveis quando comparado ao grupo tratado apenas com meio de cultivo DMEM (linha tracejada), indicando um potencial efeito indutor de proliferação sobre fibroblastos.

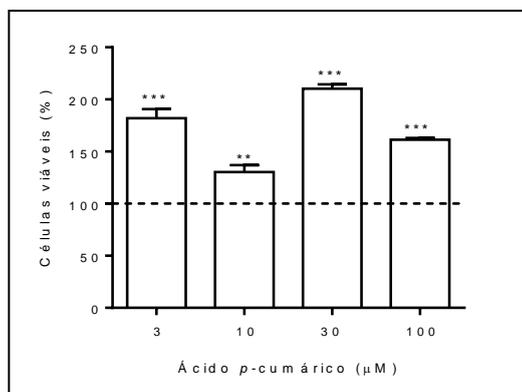


Figura 1. Efeito do ácido *p*-cumárico sobre a viabilidade de fibroblastos. As células foram expostas ao tratamento com diferentes concentrações de ácido *p*-cumárico e após 24 h a viabilidade foi avaliada pelo teste do MTT. A linha tracejada representa as células mantidas sem tratamento e com meio de cultivo DMEM (controle). As barras representam média \pm erro padrão da média (EPM). As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguida com o teste de Newman-Keuls, onde (**) e (***) representam $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente, quando comparados ao grupo controle tratado apenas com meio de cultivo DMEM.

Em seguida, com propósito de avaliar o efeito do ácido *p*-cumárico sobre parâmetros funcionais dos fibroblastos, decidimos submeter as células tratadas com o ácido *p*-cumárico ao ensaio de migração horizontal *in vitro* ("scratch assay"). Como demonstrado na Figura 2, apenas os fibroblastos tratados por 30 h com ácido *p*-cumárico na concentração de 30 μM exibiram um aumento significativo na taxa de migração celular (52%). Mesmo que as menores concentrações de ácido *p*-cumárico (3 μM e 10 μM) tenham induzido um aumento na migração celular (32% e 36%, respectivamente), este aumento não apresentou diferença estatística quando comparado as células do grupo sem tratamento (controle).

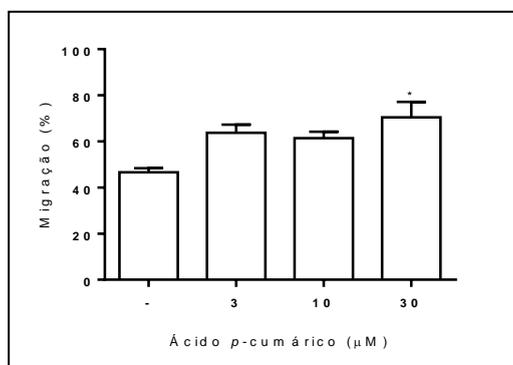


Figura 2. Efeito do ácido *p*-cumárico sobre a migração de fibroblastos submetidos ao teste de migração horizontal ("scratch assay"). As células foram expostas ao tratamento e após 30 h a área livre de células foi mesurada. As barras representam média \pm erro padrão da média (EPM). As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguida com o teste de Newman-Keuls, onde (*) representa $p < 0,05$ quando comparado ao grupo sem tratamento (controle) tratado apenas com meio de cultivo DMEM.

Com intuito de esclarecer se a capacidade de fechamento da área livre de células no ensaio de migração horizontal foi decorrente de ações do ácido *p*-cumárico sobre a atividade migratória ou proliferativa, submetemos as células tratadas com ácido *p*-cumárico ao ensaio de "scratch assay" utilizando o inibidor da proliferação celular, mitomicina C. Neste conjunto de experimentos, as células foram tratadas por 30 h com ácido *p*-cumárico e simultaneamente expostas a mitomicina C (5 μM). Como observado na Figura 3, fibroblastos tratados com ácido *p*-cumárico (30 μM) exibiram um aumento na capacidade migratória quando comparado as células do grupo controle. Porém, quando mitomicina C foi adicionado as células tratadas com ácido *p*-cumárico foi observado

uma significativa redução na migração celular, indicando que o efeito do ácido *p*-cumárico em reduzir a área livre de células no ensaio de “scratch assay” é dependente principalmente do efeito deste ácido sobre a proliferação celular.

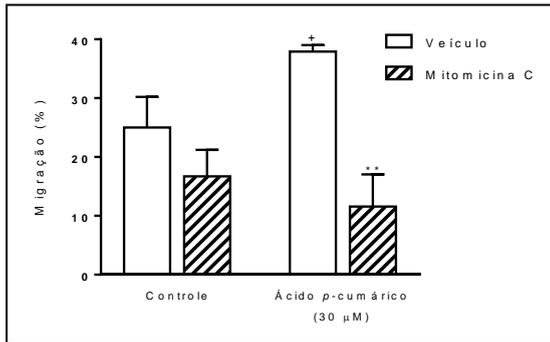


Figura 3. Efeito da mitomicina C sobre a ação do ácido *p*-cumárico em fibroblastos submetidos ao teste de migração horizontal (“scratch assay”). As barras representam média \pm erro padrão da média (EPM). As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguida com o teste de Newman-Keuls, onde (+) representa $p < 0,05$ quando comparado aos grupos controles, e (**) representa $p < 0,01$ quando comparado ao grupo tratado com ácido *p*-cumárico exposto ao veículo.

Em seguida, com propósito de avaliar as possíveis vias intracelulares de sinalização envolvidas na regulação da migração/proliferação de fibroblastos sensíveis ao ácido *p*-cumárico, os fibroblastos foram tratados com diferentes inibidores farmacológicos concomitantes a exposição ao ácido *p*-cumárico e submetidos ao ensaio de “scratch assay”. Para isso, as células foram incubadas com SB203580 (10 μM), JNK-IN-8 (10 μM), PKI-(6-22)-amida (10 μM) e KG-501 (25 μM), inibidores das vias p38MAPK, JNK, PKA ou CREB, respectivamente. Como mostrado na Figura 4, células expostas ao ácido *p*-cumárico exibiram um aumento na capacidade de migração/proliferação, fenômeno que foi inibido em aproximadamente 60% pelo tratamento com inibidor da via p38MAPK (SB203580). O tratamento com os outros inibidores não afetou, de maneira significativa, a resposta migratória induzida pelo ácido *p*-cumárico.

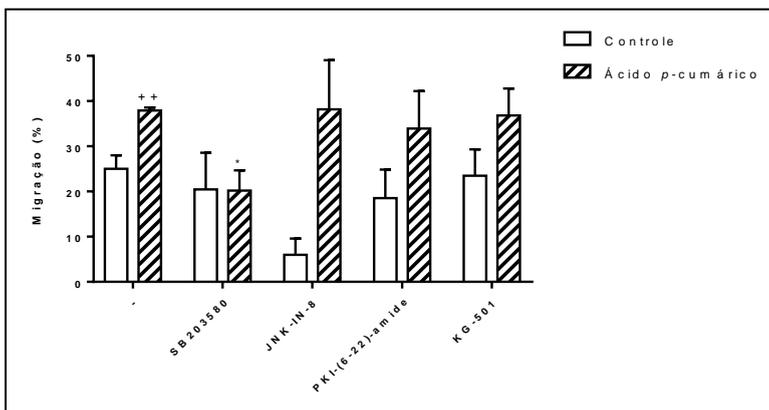


Figura 4. Efeito dos inibidores de p38MAPK (SB203580, 10 μM), JNK (JNK-IN-8, 10 μM), PKA (PKI-(6-22)-amida, 10 μM) ou CREB (KG-501, 25 μM) sobre a atividade do ácido *p*-cumárico em fibroblastos submetidos ao teste de migração horizontal (“scratch assay”). As barras representam média \pm erro padrão da média (EPM). As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguida com o teste de Newman-Keuls, onde (**) representa $p < 0,01$ quando comparado ao respectivo grupo controle, e (*) representa $p < 0,05$ quando comparado ao grupo tratado com ácido *p*-cumárico.

Considerando a importância dos componentes de matriz extracelular para a resposta migratória/proliferativa, em outro conjunto de experimentos avaliamos, pela técnica de imunofluorescência, a produção de laminina em fibroblastos tratados com o ácido *p*-cumárico. Como pode ser observado na Figura 5, o tratamento com ácido *p*-cumárico não foi capaz de aumentar a produção de laminina.

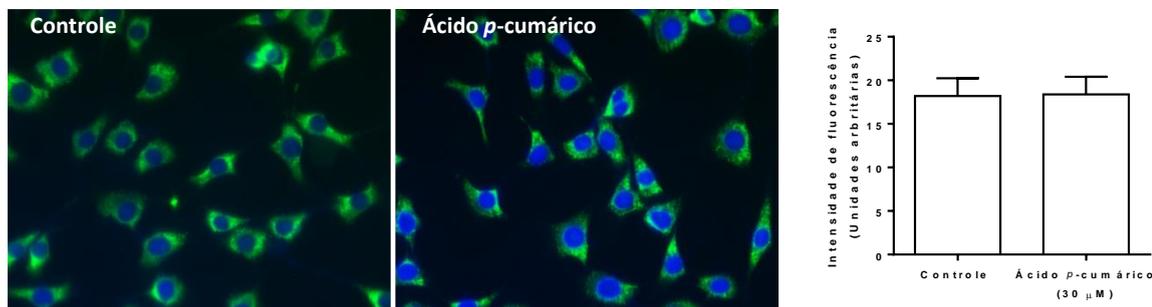


Figura 5. Conteúdo de laminina em fibroblastos tratados com ácido *p*-cumárico. As barras representam média \pm erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes.

Conclusão

Esses resultados demonstram o efeito do ácido *p*-cumárico em induzir uma resposta proliferativa em fibroblastos *in vitro*, fenômeno que se mostrou depender da via intracelular de sinalização p38MAPK, mas independente das vias de JNK, PKA e CREB.

Referências bibliográficas

- CHEN, S., YU, H., LUO, H., WU, Q., LI, C., & STEINMETZ, A. (2016). Conservation and sustainable use of medicinal plants: problems, progress, and prospects. *Chin Med*, 11
- DULMOVITS, B. M., & HERMAN, I. M. (2012). Microvascular remodeling and wound healing: A role for pericytes. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*.
- EMING, S. A., MARTIN, P., & TOMIC-CANIC, M. (2014). Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Science Translational Medicine*.
- GONZALEZ, A.C., COSTA, T.G., ANDRADE, Z. A., MEDRADO A.R.A.P. (2016) Wound healing - A literature review. *An Bras Dermatol*; 91(5):614-20,
- GUO, S., & DIPIETRO, L. A. (2010). Critical review in oral biology & medicine: Factors affecting wound healing. *Journal of Dental Research*.
- PASTAR, I., STOJADINOVIC, O., YIN, N. C., ET AL (2014). Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Advances in Wound Care*.