

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO GLUTÂMICO EM FIBROBLASTOS E MACRÓFAGOS¹

Palavras chaves: Cicatrização – Ácido Glutâmico – NMDA – Pele.

Aluno: Renan de Medeiros Bezerra²

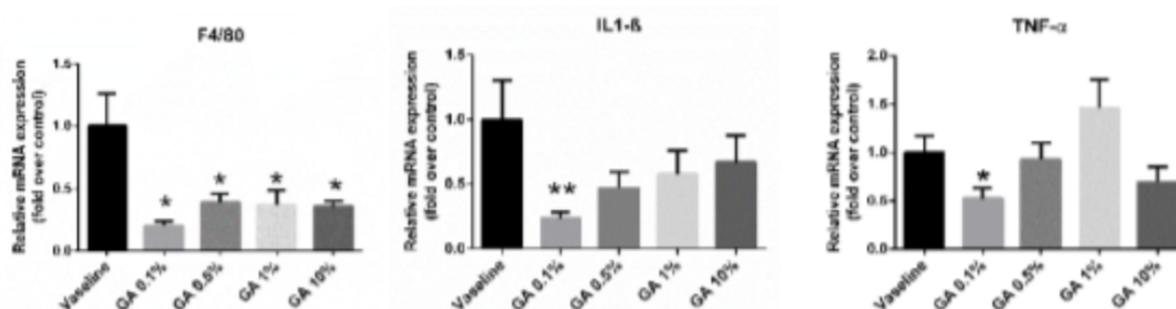
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliana Pereira de Araújo³

Coorientador: Dr. Carlos Poblete Jara⁴

Introdução

No nosso projeto prévio de Iniciação Científica (FAPESP # 2018/10248-3) tratamos topicamente a pele de camundongos Swiss com diferentes concentrações de ácido glutâmico. Verificamos que o Ácido Glutâmico (AG) regula a expressão e plasticidade de genes marcadores de macrófagos na pele após 14 dias de tratamento. Além disso, o AG na pele diminuiu significativamente a expressão do gene expresso em macrófagos F4/80, em todas as concentrações testadas. Verificamos também, que o AG diminuiu a expressão do gene Arginase 1, sendo este relacionado ao fenótipo pró-inflamatório dos macrófagos M1. Além do mais, em relação aos genes envolvidos com inflamação, o AG na pele saudável diminuiu significativamente a expressão de IL1- β e de TNF- α (Figura 1).

Figura 1



Por fim, demonstramos que o AG modula proliferação e diferenciação de células epiteliais. O tratamento levou a maior quantidade de células epidérmicas BrDU positivas quando

¹ Pesquisa financiada pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Vigência: set/2020 à ago/2021.

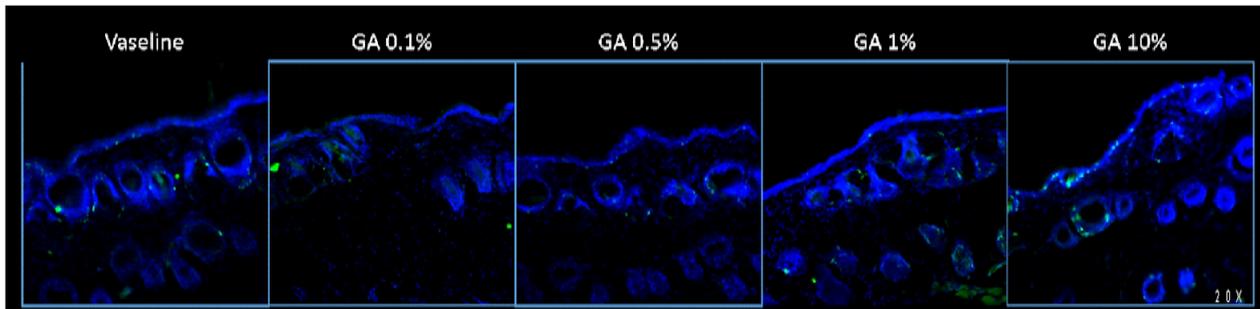
² Aluno do 8º semestre da graduação em enfermagem da Faculdade de Enfermagem da UNICAMP.

² Professora Doutora da Faculdade de Enfermagem da UNICAMP.

³ Aluno de Doutorado em enfermagem, Faculdade de Enfermagem da UNICAMP

comparado com o grupo controle (Figura 2). No entanto, até o momento, pelo que sabemos, não foi demonstrado o efeito do AG em células da pele isoladas, como fibroblastos e macrófagos.

Figura 2



Portanto, este trabalho se justifica devido ao aumento da incidência de feridas crônicas, doenças cutâneas e condições que dificultam suas melhoras como desnutrição, envelhecimento da população e doenças crônicas não transmissíveis, que tornam necessário a busca por novos tratamentos^(1,2). Tem sido demonstrado na literatura, que macrófagos participam amplamente em processos canônicos inflamatórios assim como os fibroblastos, processos de fibroses, em tecidos cutâneos^(3,4). Pesquisas do nosso grupo mostram que o AG é um excelente candidato para melhorar ou restaurar a integridade da pele por apresentar ações que regulam o processo de cicatrização (dados não publicados). No entanto, ainda é preciso identificar as concentrações mínimas e máximas de aplicação na pele para que se possa modular de forma eficiente a inflamação, proliferação e diferenciação celular.

Materiais e Métodos

Desenho experimental

Células Raw267 e Bj (fibroblastos) foram expostas as seguintes concentrações:

- 1- Grupo controles (CTL): receberam DMEM;
- 2- Células tratadas com DMEM e L-Ácido Glutâmico 1 μ M
- 3- Células tratadas com DMEM e L-Ácido Glutâmico 100 μ M
- 4- Células tratadas com DMEM e L-Ácido Glutâmico 1mM
- 5- Células tratadas com DMEM e L-Ácido Glutâmico 10mM
- 6- Células tratadas com DMEM e L-Ácido Glutâmico 100mM

Tratamento das células

Avaliar a viabilidade celular de fibroblastos e macrófagos expostos a ácido glutâmico em cultura de células

A viabilidade e proliferação celular foram determinadas pelo ensaio do MTT (capacidade das células viáveis reduzirem o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio com a formação de cristais de formazan de cor púrpura), executado 1, 2 e 4 dias de exposição às diferentes concentrações de ácido glutâmico: 1 μ M, 100 μ M, 1mM, 10mM e 100mM. Em cada período de análise, cada placa foi lavada com PBS pH 7,4 e adicionado MTT (solução de 5 mg/mL) juntamente com meio HEPES-Krebs. As células foram incubadas por 3 h a 37 °C. Após este período, o meio foi aspirado e adicionado 0,3 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Após a dissolução dos cristais, a absorbância foi lida no espectrofotômetro a 490 nm e 560 nm (Biotek Microplate Reader).

Detecção de proliferação celular através do ensaio com 5-Bromo-20-Desoxiuridina

5-bromo-20-deoxyuridine (BrdU; 50 mg / kg BrdU em 0,9% NaCl procurar concentração nas células) e após 4 horas. As células tratadas serão retiradas e fixadas em ácido formaldeído 4%. Em seguida as células serão incubadas com anticorpo monoclonal conjugado com peroxidase contra BrdU (Roche). As células BrdU-positivas serão visualizadas usando 3,3-diaminobenzidina como substrato (Sigma). As células BrdU positivas serão contadas em 15 campos em cada 05 diferentes lâminas.

Resultados

O Ácido Glutâmico aumenta a viabilidade celular de Fibroblastos

Em um projeto anterior (FAPESP # 2018/10248-3), o Ácido Glutâmico se mostrou eficiente na cicatrização de feridas em camundongos. Mas ainda não havia um entendimento adequado descrito na literatura das concentrações que poderiam ser terapêuticas ou danosas às células da epiderme humana.

O Ácido Glutâmico provou aumentar a viabilidade celular dos Fibroblastos Humanos (BJ-5ta), mesmo em condições confluentes de cultura. O soro bovino fetal foi totalmente removido das culturas durante o tratamento para evitar os efeitos dos fatores de crescimento presentes no soro por meio de lavagens com PBS 1X.

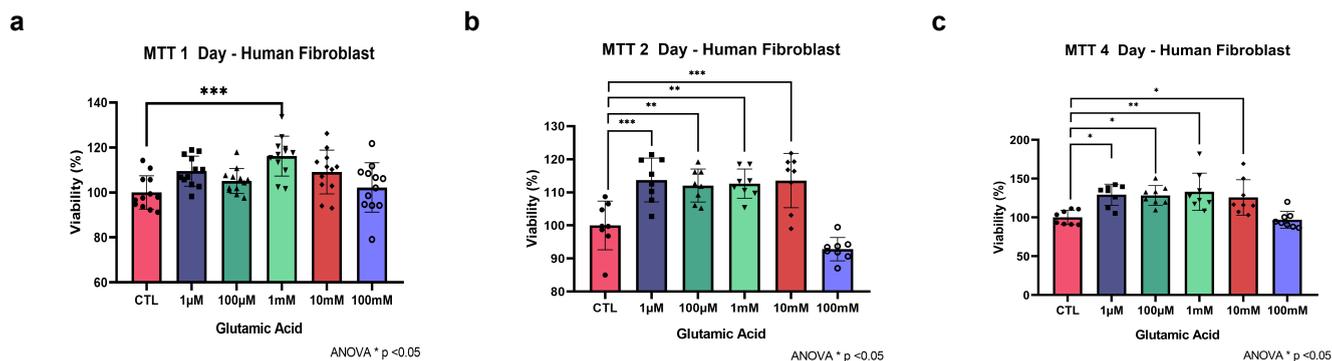


Figura 1: Resultado da viabilidade celular MTT de Fibroblastos Humanos tratados em diferentes concentrações de AG (a). Viabilidade celular por MTT de Fibroblastos Humanos com 1 dia de tratamento com AG (b). Viabilidade celular por MTT de Fibroblastos Humanos com 2 dias de tratamento com AG (c). Viabilidade celular por MTT de Fibroblastos Humanos com 4 dias de tratamento com AG.

Como mostra a Figura 1a, com 1 dia de tratamento com AG obtivemos aumento significativo na viabilidade celular na concentração de 1mM com 100% de confluência, enquanto que as demais concentrações não apresentaram alteração quando comparadas com o grupo controle.

As diferenças foram mais presentes após 2 dias de tratamento. As concentrações de 1µ, 100µM, 1mM e 10mM de AG obtiveram significativo aumento na viabilidade celular dos Fibroblastos Humanos em condições de confluência (Figura 1b). Com 4 dias de tratamento por AG, o aumento da viabilidade celular se manteve quando comparado com o grupo controle nas concentrações de 1µ, 100µM, 1mM e 10mM (Figura 1c). É importante ressaltar que devido a degradação natural do Ácido Glutâmico, a placa que obteve tratamento por 4 dias recebeu uma nova aplicação de AG no segundo dia de incubação.

A concentração de 100mM não se mostrou eficaz no aumento da viabilidade celular, e até mesmo, chegou a diminuir a viabilidade quando comparado com o grupo controle nas placas que receberam 2 e 4 dias de tratamento (Figuras 1b e 1c).

Considerações

Devido ao momento pandêmico atual devido ao SARS-COV-2 e ao distanciamento social imposto por ele, o cronograma inicial sofreu prejuízos uma vez que tivemos acesso limitado aos laboratórios determinado pelos Comitês de Crise da Faculdade de Enfermagem, Instituto de Biologia e da própria Unicamp, que vêm enfrentando e manejando com excelência a situação atual. No entanto, dados encontrados durante o desenvolvimento deste projeto foram incluídos em um artigo recentemente publicado no periódico Scientific Reports que pode ser acessado pelo link⁵: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-94816-y>

Conclusões

O AG leva a um aumento significativo da viabilidade celular de Fibroblastos Humanos em diferentes concentrações nos períodos de 1, 2 e 4 dias. Na concentração de 1µM, o AG foi eficaz em preservar a viabilidade celular já em 1 dia. O AG também mostrou-se eficiente nas concentrações de 100µM, 1mM e 10mM nos dias 2 e 4. No entanto, a concentração de 100mM, diminuiu a viabilidade celular.

Com base nesses dados, estudos futuros em modelos animais devem ser desenvolvidos com o intuito de encontrar a melhor concentração do AG tópico para o tratamento de dermatoses.

Referências

1. Duim E, Sá FHC, Duarte YAO, Oliveira RCB, Lebrão ML. Prevalência e características das feridas em pessoas idosas residentes na comunidade. Ver Esc Enferm USP. 2015, 49 (Esp):51-57.
2. Vieira CPB, Araújo TME. Prevalência e fatores associados a feridas crônicas em idosos na atenção básica. Ver. Esc. Enferm. USP [Internet] 2018. 52: e03415. Available from: <https://doi.org/10.1590/s1980-220x2017051303415>.
3. Sinha M, Sen CK, Singh K, Das A, Ghatak S, Rhea B, Blackstone B, Powell HM, Khanna S, Roy S. Direct conversion of injury-site myeloid cells to fibroblast-like cells of granulation tissue. Nat Commun. 2018 Mar 5;9(1):936. doi: 10.1038/s41467-018-03208-w.
4. Ellis, S., Lin, E.J. & Tartar, D. Immunology of Wound Healing. Curr Derm Rep 7, 350–358 (2018). <https://doi.org/10.1007/s13671-018-0234-9>
5. Jara, C.P., de Andrade Berti, B., Mendes, N.F. et al. Glutamic acid promotes hair growth in mice. Sci Rep 11, 15453 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94816-y>