



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Luana Alves Bassetti

Avaliação do impacto da Tangeritina sobre a atividade migratória e síntese de colágeno de fibroblastos L929

Araraquara

2023



UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Luana Alves Bassetti

Avaliação do impacto da Tangeritina sobre a atividade migratória e síntese de colágeno de fibroblastos L929

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para a obtenção do grau de Cirurgião-dentista.

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos Spolidorio

Araraquara

2023

B319a	Bassetti, Luana Alves Avaliação do impacto da Tangeritina sobre a atividade migratória e síntese de colágeno de fibroblastos L929 / Luana Alves Bassetti. -- Araraquara, 2023 25 p. : tabs. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Odontologia) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos Spolidorio 1. Cicatrização. 2. Fibroblastos. 3. Inflamação. 4. Flavonóides. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara**

Luana Alves Bassetti

**Avaliação do impacto da Tangeritina sobre a atividade migratória e síntese de
colágeno de fibroblastos L929**

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos Spolidorio

Assinatura Orientador (a):

Assinatura Aluno (a):

Araraquara, 28 de fevereiro de 2023.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Alexandre e Luciola, agradeço por toda a dedicação e amor, por todo o apoio para que meu sonho se tornasse realidade, pois sei mais do que ninguém o quanto cada conselho construiu a mulher que me tornei. Ao meu irmão Felipe Valentim, que manteve meu bom humor, me fazendo sorrir e me incentivando, mesmo nos dias mais tempestuosos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luís Carlos Spolidorio por todo o empenho, dedicação e orientação com este projeto, para comigo, sendo para mim um exemplo acadêmico e humano. Aos pós-graduandos Flávia Bione, Jhonatan Carvalho e Vinicius de Paiva, por todos os ensinamentos dentro e fora de laboratório, vocês foram essenciais para meu aprendizado e evolução como aluna de iniciação científica.

Ao Prof. Dr. Sergio Russi, por todo o empenho e incentivo, como um amigo pessoal de minha família, como um mentor em meus anos de graduação, sempre me acolhendo e orientando com amor e felicidade, sendo o maior exemplo de dedicação por aquilo que ama e acredita.

Ao nosso diretor Edson Alves de Campos e a vice-diretora Patrícia Petromilli Nordi Sasso Garcia por todo o trabalho impecável para que a instituição sempre progredisse da melhor maneira.

À PIBIC - Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – projeto 2630, processo/edital 4/2021; pelo apoio financeiro, essencial para realização desta pesquisa.

“Em meu fim, está meu começo.”
Mary Stuart*

* Stuart M. The Oxford Dictionary of Quotations. Oxford University Press: Ed. Elizabeth Knowles.; 2013.

Bassetti LA. Avaliação do impacto da Tangeritina sobre a atividade migratória e síntese de colágeno de fibroblastos L929 [Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Odontologia]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2023.

RESUMO

Fibroblastos participam ativamente na inflamação, formação de tecido de granulação, deposição da matriz extracelular e remodelação liberando mediadores biologicamente ativos. Sabe-se que alguns flavonoides abrangem um amplo espectro de atividades biológicas. Este estudo propõe avaliar a hipótese de que o flavonoide cítrico tangeritina (TANG) module, in vitro, a atividade migratória e a deposição de colágeno a partir de fibroblastos L929. Para isso, fibroblastos foram cultivados concomitante a diferentes concentrações de TANG e as seguintes análises foram realizadas: avaliação da citotoxicidade por ensaio de MTT após 48h; avaliação da proliferação celular por Alamar blue® após 1 e 5 dias; avaliação da síntese de colágeno por espectrofotometria após 3 e 7 dias e análise da atividade migratória após 3 dias. Observou-se que concentrações menores que 50µM apresentaram segurança para as demais análises, enquanto apenas tangeritina 1µM aumentou atividade metabólica após 5 dias. Tratamento com TANG nas concentrações 1 e 25 µM estimulou a síntese de colágeno quando comparado ao grupo controle em 3 dias. O tratamento com 1 e 10 µM TANG melhorou atividade migratória após 1 dia quando comparado ao grupo sem tratamento. Dessa maneira, podemos concluir que a TANG na menor concentração estimula a capacidade migratória e síntese de colágeno de fibroblastos L929 e que esses estímulos são tempo dependente.

Palavras-chave: Cicatrização. Fibroblastos. Inflamação. Flavonoides.

Bassetti LA. Evaluation of the impact of Tangeritine on the migratory activity and collagen synthesis of fibroblasts L929 [Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Odontologia]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2023.

ABSTRACT

Fibroblasts actively participate in inflammation, granulation tissue formation, extracellular matrix deposition and remodeling by releasing biologically active mediators. It is known that some flavonoids cover a wide spectrum of biological activities. This study proposes to evaluate the hypothesis that the citrus flavonoid tangeritin (TANG) modulates, in vitro, migratory activity and collagen deposition from L929 fibroblasts. For this, fibroblasts were cultured concomitantly with different concentrations of TANG and the following analyzes were performed: evaluation of cytotoxicity by MTT assay after 48h; assessment of cell proliferation by Alamar blue® after 1 and 5 days; evaluation of collagen synthesis by spectrophotometry after 3 and 7 days and analysis of migratory activity after 3 days. It was observed that concentrations lower than 50µM were safe for the other analyses, while only 1µM tangerine increased metabolic activity after 5 days. Treatment with TANG at concentrations 1 and 25 µM stimulated collagen synthesis when compared to the control group in 3 days. Treatment with 1 and 10 µM TANG improved migratory activity after 1 day when compared to the untreated group. Thus, we can conclude that TANG at the lowest concentration stimulates the migratory capacity and collagen synthesis of L929 fibroblasts and that these stimuli are time dependent.

Keywords: Wound healing. Fibroblasts. Inflammation. Flavonoids.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	08
2 PROPOSIÇÃO	09
3 REVISÃO DA LITERATURA	10
4 MATERIAL E MÉTODO.....	12
4.1 Linhagem e cultura celular	12
4.2 Preparo da solução de Tangeritina.....	12
4.3 Citotoxicidade da Tangeritina sobre linhagem celular de fibroblastos L929	12
4.4 Efeito da tangeritina sobre a proliferação celular	13
4.5 Análise das propriedades da tangeritina sobre a migração de fibroblasto L929	13
4.6 Avaliação das propriedades da tangeritina sobre a síntese de colágeno	14
4.7 Análise estatística	15
5 RESULTADO	16
5.1 Citotoxicidade da tangeritina sobre linhagem celular de fibroblastos L929.....	16
5.2 Efeito da tangeritina sobre a proliferação celular	17
5.3 Avaliação das propriedades da tangeritina sobre a síntese de colágeno a partir de fibroblastos L929	18
5.4 Análise da atividade migratória em fibroblastos de linhagem celular L92	19
6 DISCUSSÃO	20
7 CONCLUSÃO	22
REFERÊNCIAS.....	23

1 INTRODUÇÃO

O processo de cicatrização de feridas é complexo, integrando múltiplos estágios celulares e de reparo. Nesta rede de eventos humorais e celulares, a atividade dos fibroblastos é a mais proeminente, tendo como função secretar citocinas e fatores de crescimento, sendo assim, participa no desenvolvimento de novos tecidos e regulação dos processos de reparo. Diferentes fatores podem impedir o processo de reparação, o que faz com que a terapia de feridas seja restrita e de alto custo, mostrando-se necessário investimento para estabelecer novas terapias eficazes.

Vários estudos têm sido realizados sobre produtos naturais que podem facilitar o processo de cicatrização, pois demonstram efeitos anti-inflamatório, antioxidante e antimicrobiano. Essas propriedades medicinais podem ser atribuídas a várias famílias químicas, dentre elas, os flavonoides.

Os flavonoides são considerados alternativas estratégicas em diversas doenças imunoinflamatórias. A Tangeritina é uma flavona polimetoxilada, considerada como um dos flavonóides mais hidrofóbicos, sendo encontrada na polpa de frutas cítricas e, sobretudo, em suas cascas¹.

Embora as evidências sejam sugestivas de que os flavonoides beneficiem diversas funções cutâneas, o potencial terapêutico sobre o processo de cicatrização e os mecanismos subjacentes pelos quais esses compostos atuam ainda não são claros, evidenciando a necessidade de realização de novos estudos que corroborem com as evidências científicas já existentes. Portanto, considerando-se o essencial papel dos fibroblastos durante a cicatrização, e as possíveis ações benéficas dos flavonoides sobre esse processo, o objetivo desse projeto foi avaliar, in vitro, a ação da tangeritina sobre a atividade de fibroblastos L929.

2 PROPOSIÇÃO

Avaliar, in vitro, a ação de diferentes concentrações de tangeritina sobre a atividade de fibroblastos L929, avaliando-se especificamente as propriedades do flavonoide sobre:

- ✓ Análise de citotoxicidade e teste de proliferação em fibroblastos de linhagem celular L929;
- ✓ Análise de atividade migratória em fibroblastos de linhagem celular L929;
- ✓ Análise da síntese de colágeno a partir de fibroblastos de linhagem celular L929. Tirar numeração

3 REVISÃO DA LITERATURA

Segundo Lindley et al.² (2016), em um artigo científico a cicatrização de feridas constitui processo multifacetado regido por fases sequenciais, ainda que sobrepostas, incluindo hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação. De acordo com Stunova e Vistejnova³ (2018), durante muitos anos as várias funções dos fibroblastos dérmicos foram subestimadas, no entanto, tem sido estabelecido que os fibroblastos são capazes de detectar e responder a danos nos tecidos através da secreção de citocinas e fatores de crescimento, os quais estabelecem uma rede de conexões entre as células circundantes que participam e exercem fundamental papel ao processo de cicatrização de feridas.

Atualmente, o tratamento de feridas apresenta limitado sucesso e compreende estratégias de alto custo⁴, tornando-se necessário investimentos para o estabelecimento de inovadoras e eficientes terapias, como por exemplo o uso de substâncias capazes de acelerar a cicatrização interna ou externamente como abordado por Ustener et al.⁵ (2019), havendo um interesse crescente em opções de tratamentos naturais que suportem o processo de cicatrização de feridas⁵⁻⁷.

Flavonoides constituem um grupo de polifenóis de origem vegetal, sendo descritos mais de 5.000 tipos de compostos^{8,9} agrupados nas seguintes subclasses: antocianinas, flavonóis, flavanonas, flavonas, flavanolignanos e isoflavonas¹⁰. As atividades biológicas dos flavonoides abrangem um amplo espectro, desde propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antineoplásicas e antibacterianas^{8,11-13}. Os compostos flavonoides demonstram atividade farmacológica multidirecional, com propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antialérgicas, hepatoprotetoras, antitrombóticas, antimicrobianas e anticarcinogênicas e, portanto, podem afetar significativamente a função de vários sistemas celulares de mamíferos^{14,15}. Especificamente sobre a cicatrização de feridas, e mecanismos celulares envolvidos ao processo de reparo, as informações na literatura científica não são conclusivas quanto às propriedades dos flavonoides. Avaliando-se o efeito in vitro de 6 diferentes tipos de flavonoides sobre a expressão de colágeno a partir de fibroblastos dérmicos provenientes de humanos foi demonstrado, através de marcação com picrosirius red, que os flavonoides aumentaram significativamente a quantidade de colágeno total secretada pelas células. Ainda, os autores descreveram aumento significativo da

expressão gênica de colágeno tipo I e tipo II após tratamento com flavonoides, quando comparado ao grupo de fibroblastos que não receberam os compostos¹⁶.

A tangeritina é um flavonoide encontrado exclusivamente na casca de frutas cítricas e é amplamente estudada por suas ações anti-inflamatórias e antioxidantes, sendo capaz de restaurar níveis de IL-10 e diminuir a expressão de NF- κ B, demonstrando sua potencial ação anti-inflamatória¹⁶. Conforme mostrado por Ashrafizadeh e colaboradores¹⁷ (2020), a tangeritina aumentou a capacidade antioxidante e a sobrevivência celular e inibiu as respostas inflamatórias e através regulação negativa de NF- κ B, KIM-1, NGAL, TNF- α , iNOS e expressão de caspase e regulação positiva de Nrf2, HO-, e expressões NQO-. Além disso, estudos farmacocinéticos indicam que a tangeritina tem ampla aplicação farmacológica e pode ser consumido por via oral sem manifestar toxicidade risco lógico para o paciente, ou seja, isso faz com que ela se torne uma alternativa real de aplicação clínica odontológica¹⁸.

4 MATERIAL E MÉTODO

A seguir, serão descritos materiais e métodos utilizados no laboratório de cultura de células e microorganismos do Departamento de Fisiologia e Patologia da FOAr- Unesp, para a execução da presente pesquisa.

4.1 Linhagem e cultura celular

Os ensaios in vitro foram realizados a partir de linhagem celular de fibroblastos L929. As células foram cultivadas em placa para cultura celular contendo meio DMEM completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina, e 1% de glutamina (100UT/mL de penicilina, 100µm/mL de estreptomicina e 2mol/L de glutamina), e incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de O₂.

4.2 Preparo da solução de Tangeritina

As formulações de Tangeritina (USDA-ARS Horticultural Research Laboratory, Fort Pierce, Florida 34945, United States) foram preparadas no Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara. Foram estabelecidas soluções estoque de cada composto a 1M, diluídas em DMSO e em seguida, agitadas e filtradas. No momento da administração da tangeritina sobre as células, a partir das soluções estoque foram preparadas as concentrações de trabalho em DMEM completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina, e 1% de glutamina (100UT/mL de penicilina, 100µm/mL de estreptomicina e 2mol/L de glutamina).

4.3 Citotoxicidade da Tangeritina sobre linhagem celular de fibroblastos L929

Os efeitos citotóxicos da tangeritina foram avaliados por ensaio de MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, #cod M5655, Sigma-Aldrich). Fibroblastos L929 foram cultivados em placas de 96 poços (1x10⁴ células/poço) e mantidos em incubadora a 37°C com 5% de CO₂ por 24h. Em seguida, o meio de cultura gasto foi aspirado e substituído por novo meio contendo diferentes concentrações de tangeritina (1600µM, 800µM, 400µM, 200µM, 100µM, 50µM, 25µM, 10µM e 1µM), DMSO 0,1% e Triton 1% (utilizado como controle positivo, #cod T8787, Sigma- Aldrich). Como controle negativo para citotoxicidade, somente DMEM foi

adicionado às células. Após 48 horas, novo meio contendo 10% de MTT (preparado por meio da dissolução de 5mg do sal de MTT em 1 mL de PBS estéril) foi adicionado e as placas incubadas por um período de 4 horas a 37°C. Em seguida, o meio de cultura com a solução de MTT foi aspirado e, posteriormente, aplicado 200 µL de solução de isopropanol acidificado em HCL a 0.04N para solubilizar os cristais formados na presença de mitocôndrias ativas. A coloração produzida foi quantificada, considerando-se que as células com atividade mitocondrial normal foram coradas em violeta intenso. A citotoxicidade foi avaliada por espectrofotometria (570 nm) utilizando um espectrofotômetro (Synergy H1 Multi-Mode Reader - BioTek, EUA).

4.4 Efeito da tangeritina sobre a proliferação celular

Para avaliação da proliferação celular, fibroblastos L929 foram cultivados conforme descrito anteriormente e, quando confluentes, foram semeadas em placa de 96 poços na quantidade de 5×10^3 células/poço. Após 24 horas do plaqueamento foram adicionados os tratamentos, de acordo com cada grupo: 1-Células+DMEM (Controle), 2-Células+ Tangeritina 1µM (Tang 1), 3- Células+ Tangeritina 10µM (Tang 10), 4-Células+ Tangeritina 25µM (Tang 25), 5- Células+ Tangeritina 50µM (Tang 50). Os tratamentos com ou sem o flavonoide foram avaliados em 1 e 5 dias. Após cada período proposto, o sobrenadante de cada poço foi aspirado e, em seguida, foi adicionado sobre as células 200µL do corante AlamarBlue® (Invitrogen®, Life Technologies) preparado a 10% em meio DMEM sem soro. As células foram incubadas com o AlamarBlue® por 4 horas a 37°C e 5% de CO₂, e após esse período a placa foi lida no equipamento Synergy H1 (BioTek™) nos comprimentos de onda 570/600nm. Foram realizadas 3 repetições do ensaio, em momentos diferentes e, em cada repetição os grupos foram estabelecidos em triplicata. Os dados de absorbância foram expressos em porcentagem em relação ao grupo controle.

4.5 Análise das propriedades da tangeritina sobre a migração de fibroblasto L929

As células L929 foram cultivadas conforme descrito anteriormente e, quando confluentes, foram semeadas em placa de 24 poços na quantidade de 5×10^4 células/poço. Após 24 horas os poços foram lavados com PBS 1X e foi realizado um

“arranhão” in vitro na monocamada de células, na região central de cada poço, empregando-se a extremidade mais afilada de uma ponteira de 5ml. Após a confecção do arranhão, o meio de cultura foi aspirado, as células foram lavadas duas vezes com 500µL de PBS (Sigma-Aldrich®), e os tratamentos administrados de acordo com cada grupo: 1-Células+DMEM (Controle), 2-Células+ Tangeritina 1µM (Tang 1), 3- Células + Tangeritina 10 µM (Tang 10), 4- Células+ Tangeritina 25µM (Tang 25), 5- Células+ Tangeritina 50µM (Tang 50). Os tratamentos com ou sem tangeritina foram mantidos durante 24 e 72 horas e, após cada período, as células foram fixadas em paraformolaldeído 4% durante 1 hora a 4°C¹⁸. Posteriormente, a solução de paraformolaldeído 4% foi aspirada e os poços lavados com PBS (Sigma-Aldrich®), e após secagem em temperatura ambiente, as células foram coradas com Cristal Violeta 0.1% por 15 min. Em seguida, as células foram lavadas com água destilada, e após secagem, fotografias foram realizadas em cada poço por meio de uma câmera fotográfica (Leica DFC295, Leica Microsystems, Mannheim, Alemanha) acoplada a um estereomicroscópio (Leica MZ6, Leica Microsystems, Mannheim, Alemanha), com aumento focal de 4×. A área de “arranhão” referente a cada imagem foi determinada com o auxílio de um software de imagem utilizando-se o plug-in MRI Wound Healing Tool (ImageJ®; NIH, EUA). Cada imagem foi analisada por um mesmo examinador, e desta forma, a área de “arranhão” pode ser mensurada para determinação da atividade migratória celular. Os dados da área mensurada em cada poço/grupo foram expressos em porcentagem em relação ao baseline (tempo 0), que corresponde a área do arranhão imediatamente a sua realização.

4.6 Avaliação das propriedades da tangeritina sobre a síntese de colágeno

Para avaliação da síntese de colágeno os fibroblastos foram cultivados conforme descrito anteriormente e, quando confluentes, foram semeados em placas de 24 poços na quantidade de 5×10^4 células/poço¹⁸. Após 24 horas do plaqueamento foram adicionados os tratamentos, de acordo com cada grupo: 1-Células+DMEM (Controle), 2-Células+ Tangeritina 1µM (Tang 1), 3- Células+ Tangeritina 25µM (Tang 25), 4- Células+ Tangeritina 50µM (Tang 50). Após 3 dias, 500 µL do meio de cultura em contato com as células foram transferidos para tubos contendo o mesmo volume da solução de Direct Red em ácido pícrico saturado (0,1%), sendo em seguida incubados por 1 hora sob agitação a 400 rpm em banho seco a 25°C. Os tubos foram então centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado

e foram adicionados 300 μ L de ácido clorídrico 0,01 M. Os tubos foram centrifugados novamente (12.000 rpm/10 min), o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 250 μ L de hidróxido de sódio 0,5 M para solubilizar o material precipitado. Em seguida, os espécimes foram submetidos à análise de absorbância em espectrofotômetro (Synergy H1 BioTek™) a 555 nm. A porcentagem de síntese de colágeno para cada amostra foi calculada baseada nos valores médios de absorbância. Foram realizadas 3 repetições do ensaio, em momentos diferentes e, em cada repetição os grupos foram estabelecidos em triplicata. Os dados de absorbância foram também expressos em porcentagem em relação ao grupo controle.

4.7 Análise estatística

Dados foram analisados utilizando o programa de análise estatística GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Os dados da citotoxicidade, metabolismo celular e avaliação da síntese de colágeno foram transformados em porcentagem considerando ao grupo controle como 100%. A distribuição da normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk e os dados normalmente distribuídos foram analisados utilizando ANOVA one-way ou ANOVA two-way e pós teste de Tukey. Todos os testes foram aplicados com um nível de confiança de 95% ($p < 0.05$). Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

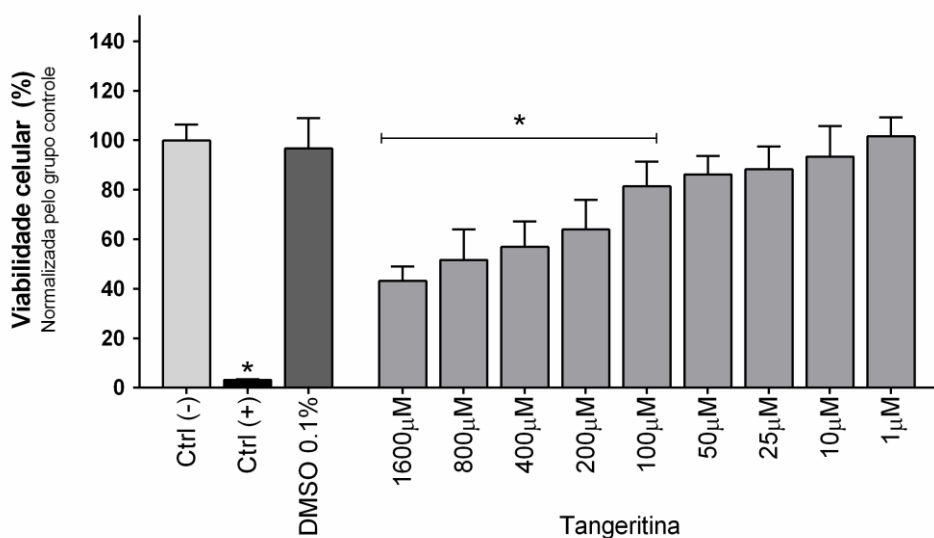
5 RESULTADO

A seguir, serão descritos os resultados encontrados, sua análise, interpretações e exemplificação gráfica, de modo padronizado.

5.1 Citotoxicidade da tangeritina sobre linhagem celular de fibroblastos L929

A avaliação da citotoxicidade da tangeritina sobre fibroblastos L929 estão representados na figura 1. Foi observada redução significativa da viabilidade celular dos fibroblastos tratados com tangeritina nas concentrações maiores que 100 μ M ($\leq 81,40 \pm 9,97$) após 48 horas comparado ao controle negativo ($p < 0,05$). Concentrações menores que 50 μ M ($\geq 86,19 \pm 7,46$) de tangeritina não mostraram efeitos citotóxicos após 48 horas ($p > 0,05$).

Figura 1 - Avaliação da viabilidade celular por ensaio de MTT



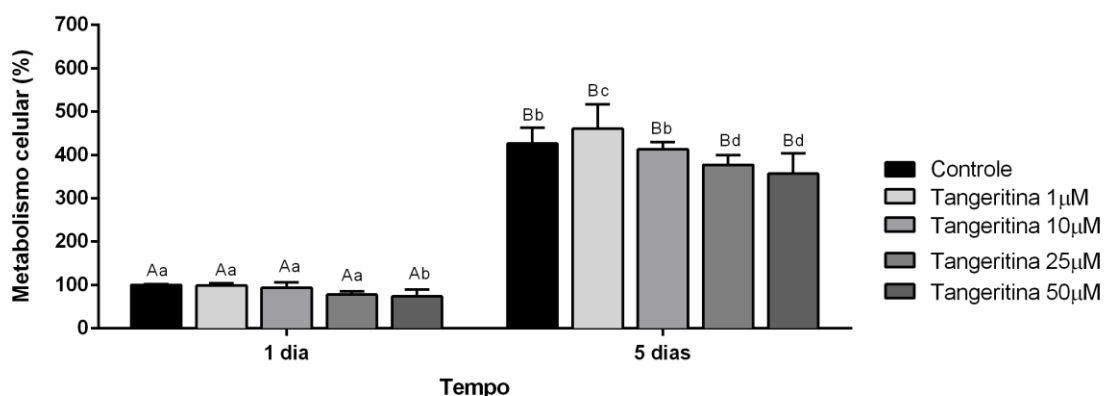
Verifica-se que 1 μ M resulta em melhor viabilidade celular. * $p < 0.05$ em relação ao grupo controle. One-Way ANOVA, pós-teste de Tukey.

Fonte: Elaboração própria.

5.2 Efeito da tangeritina sobre a proliferação celular

As concentrações utilizadas para avaliação da atividade metabólica em fibroblastos foram estabelecidas após a determinação do experimento de citotoxicidade celular. A figura 2 mostra o aumento significativo da atividade metabólica em todos os grupos após os 5 dias. Pode-se observar que não houve diferença estatística entre os grupos submetidos ao tratamento com tangeritina quando comparado ao grupo controle no período de 1 dia independente das concentrações utilizadas com exceção ao grupo Tangeritina 50 μ M. Após 5 dias de tratamento observou-se aumento significativo na atividade metabólica (indicativo indireto de proliferação celular) no grupo tangeritina 1 μ M quando comparado ao grupo controle e aos demais tratamentos.

Figura 2 - Atividade metabólica de fibroblastos (%) após 1 e 5 dias de tratamento com tangeritina 1, 10, 25 e 50 μ M



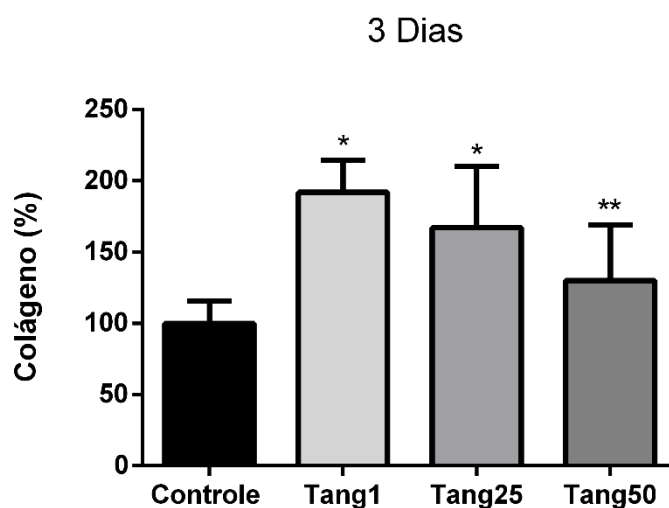
Letras maiúsculas diferentes representam diferença estatística entre o mesmo grupo nos diferentes períodos. Letras minúsculas diferentes representam diferença estatística entre os grupos no mesmo período. Two-way ANOVA, pós-teste de Tukey.

Fonte: Elaboração própria.

5.3 Avaliação das propriedades da tangeritina sobre a síntese de colágeno a partir de fibroblastos L929

De modo geral, a síntese de colágeno teve aumento significativo nas concentrações de 1 e 25 μM de tangeritina após 3 dias de tratamento quando comparado ao grupo controle. O tratamento com tangeritina 50 μM resultou em menor porcentagem de síntese de colágeno com significante diferença ao grupo tangeritina 1 μM .

Figura 3 - Avaliação da síntese de colágeno de fibroblastos



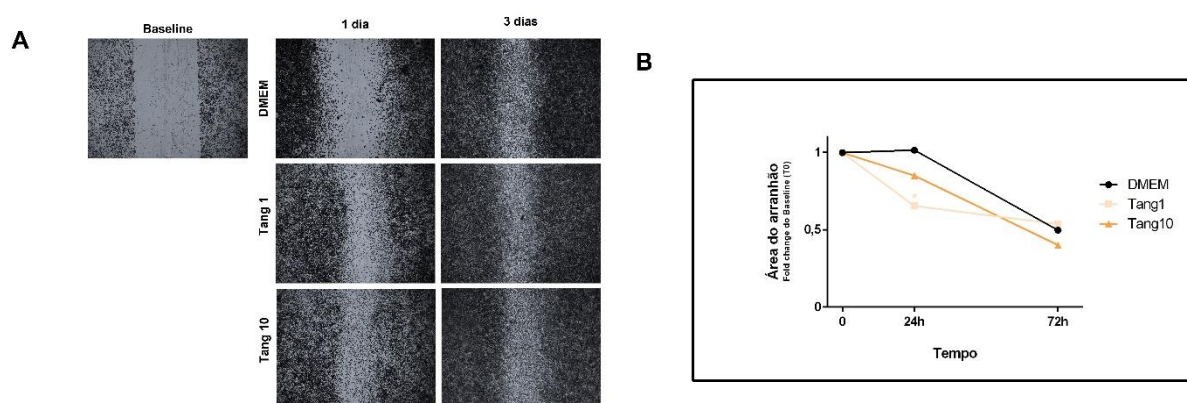
Após 3 dias de tratamento com tangeritina 1, 25 e 50 μM . * $p < 0.05$ em relação ao grupo controle; ** $p < 0.05$ em relação ao grupo Tang1. One-Way ANOVA, pós-teste de Tukey.

Fonte: Elaboração própria.

5.4 Análise da atividade migratória em fibroblastos de linhagem celular L929

Após o período de 24 horas, o grupo tratado com Tangeritina $1\mu\text{M}$ resultou em significativa redução da área do arranhão quando comparados ao grupo sem tratamento (DMEM). Observou-se que a área do arranhão do grupo tratado com $25\mu\text{M}$ de tangeritina também foi menor, mas sem diferença estatística ao grupo controle. Em contrapartida, após o período de 72h todos os grupos apresentaram similar característica de migração e consequente redução da área do arranhão.

Figura 4 – Resultado do ensaio de arranhão



(A) Ensaio de arranhão e (B) gráfico da área do arranhão após tratamento com tangeritina 1 e $10\mu\text{M}$ nos períodos de 24 e 72 horas. * $p < 0.05$ comparado ao grupo DMEM.

Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

Estudos prévios descrevem algumas propriedades de diferentes classes de flavonoides sobre mecanismos associados ao processo de reparação tecidual, demonstrando por exemplo a capacidade em estimular a secreção celular de colágeno total e promover a contração de feridas^{15,20-24}. Nessa perspectiva, os fibroblastos participam e exercem fundamental papel ao processo de cicatrização²⁵. No estágio atual do conhecimento sobre o uso de flavonoides, não há evidências conclusivas acerca do potencial terapêutico da tangeritina sobre o processo de reparação tecidual e os mecanismos subjacentes pelos quais esses compostos atuam, como por exemplo a modulação sobre fibroblastos. Portanto, considerando-se o potencial papel dos flavonoides em regular diferentes mecanismos implicados à cicatrização, e a crucial importância dos fibroblastos nesse processo, o presente estudo avaliou *in vitro* a ação do flavonoide tangeritina sobre cultura de fibroblastos, através da análise de diferentes atividades e mecanismos.

A avaliação da citotoxicidade constitui parâmetro fundamental na seleção e aplicação de novos agentes potencialmente terapêuticos e, desse modo, com a finalidade de excluir possíveis efeitos citotóxicos da tangeritina utilizada no presente estudo, diferentes concentrações de tangeritina foram previamente avaliadas através do ensaio de MTT²⁶. A porcentagem de células viáveis variou de acordo com as concentrações de tangeritina utilizadas, todas as concentrações de tangeritina acima de 100 μM apresentaram alta taxa de citotoxicidade sobre fibroblastos após 48 horas, portanto as concentrações abaixo de 50 μM foram eleitas.

Complementar à avaliação de citotoxicidade, pode-se observar que não houve diferença estatística na proliferação celular entre os grupos tratados com tangeritina quando comparado ao grupo controle no período de 1 dia, com exceção ao grupo tangeritina 50 μM que mostrou menor atividade metabólica. Após 5 dias de tratamento observou-se aumento significativo na atividade metabólica (indicativo indireto de proliferação celular) no grupo tangeritina 1 μM comparado ao grupo controle, o que demonstra que este flavonoide, em sua menor concentração, teve êxito em melhorar a atividade proliferativa. Em complemento a esses dados, observou-se aumento significativo na síntese de colágeno nos grupos que receberam tratamento com 1 e 25 μM de tangeritina após 3 dias quando comparado ao grupo controle. Neste mesmo período a Tang 50 μM mostrou menor porcentagem de síntese de colágeno se

comparada à Tang 1 μM . Assim, observa-se que as menores concentrações de tangeritina resultaram em melhores efeitos sobre mecanismos celulares relacionados ao reparo de feridas. Niknam e colaboradores mostram que o uso de extrato herbais (*Punica granatum L.* e *Matricaria chamomilla L.*) em concentrações menores foram mais efetivos para o reparo de feridas in vivo²⁷. Em relação a melhor efetividade nos períodos menores, vale destacar que uma vez que as lesões estão presentes em estágios inflamatórios iniciais, os potenciais efeitos anti-inflamatórios e antioxidante da tangeritina podem resultar em mais benefícios nesse período ^{27, 28}.

A capacidade dos fibroblastos repovoarem a área de células removidas foi avaliada através do ensaio de arranhão, que constitui um protocolo comumente empregado para a análise da atividade migratória de fibroblastos em cultura celular²⁹. Verificou-se que após o período de 24 horas, os grupos tratados com Tang 1 e Tang 25 μM apresentaram menor área de arranhão quando comparados ao grupo controle (DMEM). Em contrapartida, após o período de 72h, observou-se que todos os arranhões foram completamente fechados, tal qual o grupo controle, o que está em acordo com os achados anteriores. A possível justificativa para os melhores efeitos da tangeritina em menores concentrações é de que os mecanismos bioquímicos que regulam as mudanças avaliadas nesse estudo, saturam nas baixas concentrações testadas. Isso sugere que esses eventos bioquímicos preliminares são ativados e altamente controlados pelas baixas concentrações de tangeritina, entretanto como isso ocorre ainda é desconhecido. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos anteriores ^{27, 29}.

7 CONCLUSÃO

O conjunto de resultados nos permite concluir que a tangeritina, sendo uma substância tempo e dose dependente, em baixas concentrações, durante períodos menores, modulam a atividade e função in vitro dos fibroblastos L929 nas condições avaliadas, estimulando a migração celular e produção de colágeno in vitro.

REFERÊNCIAS*

1. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79(5): 727-47.
2. Lindley LE, Stojadinovic O, Pastar I, Tomic-Canic M. Biology and biomarkers for wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 2016; 138(3):18S-28S.
3. Stunova A, Vistejnova L. Dermal fibroblasts: a heterogeneous population with regulatory function in wound healing. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2018 Feb; 39: 137–50.
4. Kanji S, Das H. Advances of stem cell therapeutics in cutaneous wound healing and regeneration. *Mediators Inflamm.* 2017; 2017: 5217967.
5. Ustuner O, Anlas C, Bakirel T, Ustun-Alkan F, Diren Sigirci B, Ak S et al. In vitro evaluation of antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial and wound healing potential of *Thymus Sipyleus* Boiss. Subsp. *Rosulans* (Borbas) *Jalas. Molecules.* 2019; 24(18): 3353.
6. Bonini SA, Premoli M, Tambaro S, Kumar A, Maccarinelli G, Memo M, et al. *Cannabis sativa*: a comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. *J Ethnopharmacol.* 2018; 227: 300-15.
7. Kumar A, Premoli M, Aria F, Bonini SA, Maccarinelli G, Gianoncelli A, et al. Cannabimimetic plants: are they new cannabinoidergic modulators?. *Planta.* 2019; 249(6): 1681-94.
8. Nones J, Stipursky J, Costa SL, Gomes FC. Flavonoids and astrocytes crosstalking: implications for brain development and pathology. *Neurochem Res.* 2010; 35(7): 955-66.
9. Preethi Soundarya S, Sanjay V, Haritha Menon A, Dhivya S, Selvamurugan N. Effects of flavonoids incorporated biological macromolecules based scaffolds in bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol.* 2018; 110: 74-87.
10. Bakhtiari M, Panahi Y, Ameli J, Darvishi B. Protective effects of flavonoids against Alzheimer disease-related neural dysfunctions. *Biomed Pharmacother.* 2017; 93: 218-29.
11. Al Mamun MA, Hosen MJ, Khatun A, Alam MM, Al-Bari MAA. *Tridax procumbens* flavonoids: a prospective bioactive compound increased osteoblast differentiation and trabecular bone formation. *Biol Res.* 2017; 50(1): 28.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

12. Rothwell JA, Knaze V, Zamora-Ros R. Polyphenols: dietary assessment and role in the prevention of cancers. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2017; 20(6): 512-21.
13. Ahmed H, Moawad A, Owis A, AbouZid S, Ahmed O. Flavonoids of *calligonum polygonoides* and their cytotoxicity. *Pharm Biol*. 2016; 54(10): 2119-26.
14. Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther*. 2002; 96(2-3): 67-202.
15. Nazaruk J, Galicka A. The influence of selected flavonoids from the leaves of *Cirsium palustre* (L.) Scop. on collagen expression in human skin fibroblasts. *Phytother Res*. 2014; 28(9): 1399-405.
16. Nery M, Ferreira PS, Goncalves DR, Spolidorio LC, Manthey JA, Cesar TB. Physiological effects of tangeretin and heptamethoxyflavone on obese C57BL/6J mice fed a high-fat diet and analyses of the metabolites originating from these two polymethoxylated flavones. *Food Sci Nutr*. 2021; 9(4): 1997-2009.
17. Ashrafizadeh M, Ahmadi Z, Mohammadinejad R, Ghasemipour Afshar E. Tangeretin: a mechanistic review of its pharmacological and therapeutic effects. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2020; 31(4): 20190191.
18. Rocha MNd, Alves DR, Marinho MM, Morais SMD, Marinho ES. Virtual screening of citrus flavonoid Tangeretin: a promising pharmacological tool for the treatment and prevention of Zika fever and COVID-19. *Journal of Computational Biophysics and Chemistry*. 2021; 20(03): 283-304.
19. Santana LCL, Spolidorio LC, Pitombo JCP, Basso FG, Guarengi GG, Prates RC, et al. Testosterone increases fibroblast proliferation in vitro through androgen and estrogen receptor activation. *J Int Acad Periodontol*. 2020; 22(3): 146-55.
20. Li W, Kandhare AD, Mukherjee AA, Bodhankar SL. Hesperidin, a plant flavonoid accelerated the cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats: Role of TGF- β /Smads and Ang-1/Tie-2 signaling pathways. *Excli j*. 2018; 17: 399-419.
21. Man MQ, Yang B, Elias PM. Benefits of hesperidin for cutaneous functions. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2019; 2019: 2676307.
22. Portou MJ, Baker D, Abraham D, Tsui J. The innate immune system, toll-like receptors and dermal wound healing: a review. *Vascul Pharmacol*. 2015; 71:31-6.
23. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res*. 2012; 49(1): 35-43.

24. Wessels Q, Pretorius E, Smith CM, Nel H. The potential of a niacinamide dominated cosmeceutical formulation on fibroblast activity and wound healing in vitro. *Int Wound J*. 2014; 11(2): 152-8.
25. Bainbridge P. Wound healing and the role of fibroblasts. *J Wound Care*. 2013; 22(8): 407-8, 410-12.
26. Adan A, Kiraz Y, Baran Y. Cell proliferation and cytotoxicity assays. *Curr Pharm Biotechnol*. 2016; 17(14): 1213-21.
27. Niknam S, Tofighi Z, Faramarzi MA, Abdollahifar MA, Sajadi E, Dinarvand R, et al. Polyherbal combination for wound healing: *Matricaria chamomilla* L. and *Punica granatum* L. *DARU J Pharm Sci* . 2021; 29(1): 133-45.
28. Vaiyapuri S, Ali MS, Moraes LA, Sage T, Lewis KR, Jones CI, et al. Tangeretin regulates platelet function through inhibition of phosphoinositide 3-Kinase and cyclic nucleotide signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*..2013; 33(12): 2740-9.
29. Carvalho J, Ramadan D, Gonçalves V, Maquera Huacho P, Pires de Assis R, Lima T, et al. Impact of citrus flavonoid supplementation on inflammation in lipopolysaccharide-induced periodontal disease in mice. *Food & Funct*. 2021; 12(3): 103389.