



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



Flávia Theresa Soares de Castro Bione

**Análise in vitro das propriedades da eriocitrina e eriodictiol sobre
fibroblastos L929**

Araraquara

2022



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



Flávia Theresa Soares de Castro Bione

**Análise in vitro das propriedades da eriocitrina e eriodictiol sobre
fibroblastos L929**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Mestre em Odontologia, na área de Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos Spolidorio

Coorientador: Prof. Dr. Vinícius de Paiva Gonçalves

Araraquara

2022

B615a	Bione, Flávia Theresa Soares de Castro Análise in vitro das propriedades da eriocitrina e eriodictiol sobre fibroblastos L929 / Flávia Theresa Soares de Castro Bione. -- Araraquara, 2022 45 f. : il. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos Spolidorio Coorientador: Prof. Dr. Vinícius de Paiva Gonçalves 1. Cicatrização. 2. Fibroblastos. 3. Inflamação. 4. Flavonoides. 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.

Flávia Theresa Soares de Castro Bione

**Análise in vitro das propriedades da eriocitrina e eriodictiol sobre
fibroblastos L929**

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de mestre em Odontologia

Presidente e orientador: Prof. Dr. Luís Carlos Spolidorio

2º Examinador: Profa. Dra. Morgana Guimarães Stabili

3º Examinador: Profa. Dra. Leila Santana Coimbra

Araraquara, 31 de março de 2022

DADOS CURRICULARES

Flávia Theresa Soares de Castro Bione

NASCIMENTO: 19/12/1996 – Recife/PE

FILIAÇÃO: Flávio Aldênio de Araújo Bione Rocha
Christiane Soares de Castro Bione

2015 – 2019

Graduação em Odontologia

Universidade de Pernambuco – UPE, Recife, Pernambuco

2020 – 2022

Mestrado em Odontologia – Área de Concentração: Periodontia

Dedico este trabalho àqueles que são tudo para mim,

Deus, é tudo sobre você

Flávio Aldênio de Araújo Bione Rocha, meu pai

Christiane Soares de Castro Bione, minha mãe

Anderson Ricardo da Silva, meu noivo

Victor, João e Pedro, meus irmãos

AGRADECIMENTOS

A Deus pela saúde e pela vida. Gratidão por estar presente em todos os momentos e sempre conduzir os meus passos para o melhor caminho. Sou grata por colocar pessoas maravilhosas na minha vida que estiveram ao meu lado em todos os momentos.

Aos meus pais Flávio Aldênio de Araújo Bione Rocha e Christiane Soares de Castro Bione, obrigada por confiarem em mim e apoiarem minhas decisões. Obrigada por toda paciência, por todo amor e carinho que dedicam em minha vida. Amo muito vocês. Agradecimento especial ao meu pai, que partiu ano passado, e deixou muitas saudades. Ao meu irmão, Victor Hugo Soares de Castro Bione, por toda paciência, carinho e apoio em todos os momentos. Obrigada pela parceria e compreensão. Aos meus irmãos João e Pedro que deixaram tudo mais calmo e tranquilo. Eu amo vocês. Ao meu noivo Anderson Ricardo da Silva, por toda a parceria e companheirismo, por não deixar eu desistir e me apoiar em todos os momentos. Eu o amo e admiro muito.

Ao meu orientador, o Prof. Dr. Luís Carlos Spolidorio, com quem tive a feliz oportunidade e imenso prazer de conviver e aprender sobre o mundo encantador da Patologia. Obrigada pela amizade, confiança, respeito, competência e disposição em me orientar durante a realização desta dissertação. Espero ter correspondido às suas expectativas. E Obrigada pela paciência e por acreditar em mim. À Profa. Dra. Denise Palomari Spolidorio pelo carinho que sempre demonstrou por nós e por disponibilizar os seus laboratórios para realização de parte dos nossos experimentos. Ao meu Coorientador e amigo, o Prof. Dr. Vinicius de Paiva Gonçalves pela amizade, por todos os ensinamentos e por toda a paciência que teve comigo durante esses 2 anos. Você foi essencial para meu aprendizado e evolução como aluna de pós-graduação. Você é um exemplo de foco e compromisso para mim. À minha aluna de iniciação científica e amiga, Luana Bassetti por todos os momentos dentro do laboratório, por ter me ensinado a ensinar. Você vai muito longe! À prof. Dra. Leila Coimbra por ter me mostrado o caminho da pós-graduação, sem ela eu não teria conhecido a Universidade e chegado até aqui. Gratidão por tudo!

À Patricia Huacho pela amizade, carinho, conselhos e por todos os ensinamentos na execução das etapas in vitro. Aos funcionários do Laboratório de Patologia Térreo: José Antônio Zuanon e Juliana Pirola, obrigada por toda ajuda, conselhos, risadas e todo carinho que demonstraram ao longo da realização deste trabalho. A todos os funcionários do Departamento de Fisiologia e Patologia, em especial a Carla Molina, por sempre me ajudar com prontidão nas burocracias administrativas e por todo carinho que sempre demonstrou. A todos meus professores da graduação e pós-graduação pelo apoio, em especial ao meu orientador de TCC Prof. Dr. Renato de Vasconcelos Alves, por toda confiança que foi em mim depositada um dia. Graças às oportunidades que vocês me ofereceram, cheguei até aqui.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2020/10843-9) pelo apoio financeiro, essencial para realização desta pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“O mistério da vida me causa a mais forte emoção. É o sentimento que suscita a beleza e a verdade, cria a arte e a ciência. Se alguém não conhece esta sensação ou não pode mais experimentar espanto ou surpresa, já é um morto-vivo e seus olhos se cegaram.”
Albert Einstein*

* Einstein A. Como vejo o mundo. Rio de Janeiro: Nova Fronteira; 1981.

Bione FTSC. Análise in vitro das propriedades da eriocitrina e eriodictiol sobre fibroblastos L929 [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

RESUMO

A cicatrização de feridas é regida por fases sequenciais, e dentre a complexa rede de eventos humorais e celulares destaca-se a atividade de fibroblastos, os quais secretam citocinas e fatores de crescimento, participando ativamente do desenvolvimento de novo tecido e da regulação do processo de reparo. Fatores diversos podem comprometer os mecanismos implicados ao processo de reparo, retardando e/ou impedindo seu curso natural, o que faz com que o tratamento de feridas apresente limitado sucesso e compreenda estratégias de alto custo. Estudos acerca das propriedades cicatrizantes de produtos naturais têm sido realizados pois podem facilitar o processo de cicatrização, por demonstrarem desde ações anti-inflamatória, antioxidante, antibacteriana à síntese de pró-colágeno. Os flavonoides são apresentados como alternativas estratégicas para várias afecções imunoinflamatórias, por apresentarem potencial anti-inflamatório e antioxidante. O objetivo do trabalho foi avaliar a hipótese de que os flavonoides, eriocitrina (Erioc) e eriodictiol (Eriod), apresentam propriedades moduladoras sobre a atividade in vitro de fibroblastos L929. Os fibroblastos L929 foram cultivados concomitante a diferentes tratamentos, de acordo com cada grupo – 1-Células (Controle), 2-Células+Erioc1 μ M, 3-Células+Erioc25 μ M, 4- Células+Erioc50 μ M, 5-Células+Eriod1 μ M, 6-Células+Eriod25 μ M, 7-Células+Eriod50 μ M. As análises seguintes foram realizadas: proliferação celular e citotoxicidade (Alamar blue e MTT - 1, 3 e 7 dias); atividade migratória (ensaio de arranhão – 24 e 72hrs); síntese de colágeno (Espectrofotometria – 3 dias); expressão de fatores de crescimento FGF e TGF- β 1 (ELISA – 3 e 7 dias). A análise estatística dos dados foi realizada através do software GraphPad Prism 8. Os resultados demonstraram que o tratamento com eriocitrina ou eriodictiol não comprometeu a viabilidade in vitro dos fibroblastos L929 e a proliferação celular manteve-se similar entre os grupos tratados ou não com ambos os flavonoides. A atividade migratória dos fibroblastos, em 24 hrs, foi estimulada pelo tratamento com eriocitrina a 1 μ M e 25 μ M ($p < 0.05$) e, após em 72 horas, a administração de eriocitrina 1 μ M, 25 μ M e o eriodictiol 1 μ M promoveram significativa redução da área do arranhão, demonstrando maior atividade de migração celular ($p < 0.05$). Os tratamentos com eriocitrina e eriodictiol na concentração de 1 μ M promoveram significativo aumento na produção de colágeno, quando comparados aos grupos controle e eriocitrina 25 e 50 μ M ($p < 0.05$). O tratamento com eriocitrina e eriodictiol modulou apenas a expressão de TGF- β 1 aos 3 dias quando comparada ao grupo não tratado, enquanto em 7 dias, os compostos a 25 e 50 μ M reduziram significativamente a expressão de TGF- β 1 e FGF, e o tratamento com eriocitrina a 1 μ M aumentou de modo significativo a expressão de TGF- β 1 ($p < 0.05$). Os resultados permitem concluir que a eriocitrina e eriodictiol em baixa concentração, modulam a atividade e função in vitro dos fibroblastos L929 nas condições avaliadas, estimulando a migração celular e produção de colágeno in vitro, sugerindo-se uma correlação ao aumento expressivo de TGF- β 1.

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

Bione FTSC. In vitro analysis eriocitrin and eriodictiol properties on L929 fibroblasts [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

ABSTRACT

Wound healing occurs in sequential phases, and among the complex network of humoral and cellular events, fibroblasts show important activity secreting cytokines and growth factors, actively participating in the development of new tissue and in the regulation of the wound healing process. Several factors may compromise the mechanisms involved in the repair process, delaying and/or preventing its natural course, which makes the treatment of wounds with limited success and involves high-cost strategies. Studies on the healing properties of natural products have been performed, as they can facilitate the healing process, demonstrating from anti-inflammatory, antioxidant, antibacterial actions to the synthesis of pro-collagen. Flavonoids are presented as strategic alternatives for various immunoinflammatory disorders, as they have anti-inflammatory and antioxidant potential. The aim of the study was to evaluate the hypothesis that the flavonoids, eriocitrin (Erioc) and eriodictiol (Eriod), have modulating properties on the in vitro activity of L929 fibroblasts. L929 fibroblasts were cultured concomitantly with different treatments, according to each group – 1-Cells (Control), 2-Cells+Erioc1 μ M, 3-Cells+Erioc25 μ M, 4-Cells+Erioc50 μ M, 5-Cells+Eriod1 μ M, 6-Cells +Eriod25 μ M, 7-Cells+Eriod50 μ M. The following analyzes were performed: cell proliferation and cytotoxicity (Alamar blue and MTT - 1, 3 and 7 days); migratory activity (scratch test – 24 and 72 hrs); collagen synthesis (Spectrophotometry – 3 days); expression of growth factors FGF and TGF- β 1 (ELISA – 3 and 7 days). Statistical analysis of the data was performed using the GraphPad Prism 8 software. The results showed that treatment with eriocitrin or eriodictiol did not compromise the in vitro viability of L929 fibroblasts and cell proliferation remained similar between groups treated or not with both flavonoids. The migratory activity of fibroblasts, in 24 hrs, was stimulated by the treatment with eriocitrin at 1 μ M and 25 μ M ($p < 0.05$) and, after 72 hours, the administration of eriocitrin 1 μ M, 25 μ M and eriodictiol 1 μ M promoted a significant reduction in the scratch area, demonstrating higher cell migration activity ($p < 0.05$). The treatments with eriocitrin and eriodictiol at 1 μ M promoted a significant increase in collagen production, when compared to the control and eriocitrin 25 and 50 μ M groups ($p < 0.05$). Treatment with eriocitrin and eriodictiol just modulated the expression of TGF- β 1 at 3 days when compared to the untreated group, while at 7 days, compounds at 25 and 50 μ M significantly reduced the expression of TGF- β 1 and FGF, and the treatment with 1 μ M eriocitrin significantly increased TGF- β 1 expression ($p < 0.05$). The results allow to conclude that eriocitrin and eriodictiol in low concentration modulate the activity and function of L929 fibroblasts in vitro under the conditions evaluated, stimulating cell migration and collagen production in vitro, suggesting a correlation with the expressive increase of TGF- β 1.

Keywords: Wound healing. Fibroblasts. Inflammation. Flavonoids.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Cicatrização de Feridas (<i>Wound Healing</i>) Sob Perspectiva da Atividade de Fibroblastos	14
2.2 Cicatrização de Feridas Como um Problema de Relevância Clínica, Social e Perspectivas de Resolução.....	15
2.3 Aspectos Gerais dos Flavonoides.....	16
2.4 Ação de Flavonoides Sobre Fibroblastos e Potencial Terapêutico na Cicatrização de Feridas	18
3 PROPOSIÇÃO	20
3.1 Hipótese	20
3.2 Objetivos Geral e Específico	20
4 MATERIAL E MÉTODO	21
4.1 Preparo das Formulações de Eriocitrina e Eriodictiol	21
4.2 Linhagem e Cultura Celular	21
4.3 Determinação das Concentrações de Estudo	21
4.4 Avaliação do Efeito Citotóxico Após Tratamento com Eriocitrina e Eriodictiol em Fibroblasto L929.....	22
4.5 Análise do Tratamento com Eriocitrina e Eriodictiol Sobre Proliferação de Fibroblastos L929	23
4.6 Análise das Propriedades da Eriocitrina e Eriodictiol Sobre a Migração de Fibroblastos L929	23
4.7 Avaliação das Propriedades da Eriocitrina e Eriodictiol Sobre Síntese de Colágeno a Partir de Fibroblastos L929.....	24
4.8 Análise das Propriedades da Eriocitrina e Eriodictiol Sobre Expressão de Fatores de Crescimento por Fibroblastos L929.....	25
4.9 Análise Estatística dos Dados	26
5 RESULTADOS.....	27
5.1 As Concentrações de 1, 25 e 50µM Foram Mais Bem Toleradas Pelos Fibroblastos L929.....	27
5.2 O Tratamento com Eriocitrina ou Eriodictiol não Comprometeu a Viabilidade In Vitro dos Fibroblastos L929.....	28
5.3 A Proliferação In Vitro de Fibroblastos L929 Manteve-se Similar Entre os Grupos Tratados ou não com Eriocitrina ou Eriodictiol.....	29
5.4 As Menores Concentrações de Eriocitrina e Eriodictiol Estimularam a Migração In Vitro dos Fibroblastos L929	30
5.5 O Tratamento com 1µM de Eriocitrina e Eriodictiol Promoveu Aumento Significativo na Síntese In Vitro de Colágeno.....	32
5.6 O Tratamento com Eriocitrina e Eriodictiol Modulou Apenas a Expressão de TGF-β1 aos 3 dias Quando Comparada ao Grupo não Tratado.....	34

6 DISCUSSÃO	35
7 CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

O processo de cicatrização de feridas é de natureza multifacetada, sua complexidade integra uma variedade de células e fases de reparo, incluindo hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação^{1,2}. Dentre a emaranhada rede de eventos humorais e celulares destaca-se a atividade de fibroblastos, os quais secretam citocinas e fatores de crescimento, participando ativamente do desenvolvimento de novo tecido e da regulação do processo de reparo³⁻⁵.

Fatores diversos podem comprometer os mecanismos implicados ao processo de reparo, retardando e/ou impedindo seu curso natural, o que faz com que o tratamento de feridas apresente limitado sucesso e compreenda estratégias de alto custo⁶, tornando-se necessário investimentos para o estabelecimento de inovadores e eficientes terapias, como por exemplo o uso de substâncias capazes de acelerar a cicatrização interna ou externamente como abordado por Ustener et al.⁷ (2019), havendo um interesse crescente em opções de tratamentos naturais que suportem o processo de cicatrização de feridas⁷⁻¹⁰.

Diversos estudos acerca das propriedades cicatrizantes de produtos naturais têm sido realizados, pois podem facilitar o processo de cicatrização, por demonstrarem desde ações anti-inflamatória, antioxidante, antibacteriana à síntese de pró-colágeno. Tais propriedades medicinais podem ser atribuídas aos constituintes fitoquímicos bioativos das várias famílias químicas, como alcalóides, óleos essenciais, flavonoides, dentre outros^{11,12}.

Os flavonoides são apresentados como alternativas estratégicas para várias afecções imunoinflamatórias, por apresentarem potencial anti-inflamatório e antioxidante. A eriocitrina, um flavonoide abundante em limões e limas pertencente ao grupo das flavononas, é descrita como potente antioxidante em estudos in vitro^{13,14}, além de ter sido relacionada à redução de alterações metabólicas observadas em indivíduos obesos¹⁵⁻¹⁷. O eriodictiol, outro flavonoide da classe das flavanonas comumente presente em frutas e vegetais, especialmente frutas cítricas como o limão, foi associado à redução dos níveis de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias em ratos diabéticos.

Estudos prévios descrevem que a eriocitrina e o eriodictiol, apresentam potente atividade antioxidante in vitro, e também exercem atividades anti-inflamatórias e

antioxidantes em ratos diabéticos ou submetidos a exercício físico agudo, respectivamente¹⁶⁻²⁰.

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.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cicatrização de Feridas (*Wound healing*) Sob Perspectiva da Atividade de Fibroblastos

A cicatrização de feridas constitui processo multifacetado regido por fases sequenciais, ainda que sobrepostas, incluindo hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação, como descrito por Lindley et al.¹ (2016). De acordo com Reinke e Sorg²¹ (2012) a primeira fase do processo de reparo abrange a hemostasia e formação de uma matriz provisória à ferida, que ocorre imediatamente após a lesão, estando completa após algumas horas, e é acompanhada pela liberação de citocinas e fatores de crescimento que ativam o início do processo inflamatório^{21,22}. Subsequente à etapa inicial instala-se a fase inflamatória, que caracteriza-se pelo recrutamento de neutrófilos e liberação de mediadores inflamatórios, estímulo de fatores de crescimento, e mais tardiamente, aproximadamente 3 dias após a injúria tecidual, macrófagos invadem a área de lesão e iniciam a fagocitose^{23,24}, além de secretarem fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas, que mantêm o processo de cicatrização intacto e atuam ativando a próxima fase de cicatrização de feridas, denominada proliferativa²⁵.

Na fase de proliferação, que ocorre entre 3-10 dias após a injúria, o objetivo principal do processo de cicatrização reside em cobrir a superfície da ferida, formar tecido de granulação e restaurar a vascularização²¹, e consiste principalmente da migração de fibroblastos⁵. Os fibroblastos repovoam o dano tecidual promovendo a formação de uma nova matriz extracelular (MEC), acompanhada pelo fechamento da ferida, e essa nova MEC formada durante a fase proliferativa atua como *scaffold*, isto é, suporte em “forma de rede” sobre o qual os fibroblastos e outras células são depositados e, ainda, a matriz extracelular forma um tecido de granulação temporário juntamente às células endoteliais e macrófagos, fornecendo nutrição e oxigênio ao tecido⁵. Uma vez formado o tecido de granulação os fibroblastos aumentam a produção de colágeno, proporcionando maior resistência à matriz permanente da ferida^{5,26,27} e, além da função de suporte estrutural, os fibroblastos são capazes de responder a uma série de sinais de danos ao tecido, incluindo a presença de moléculas inflamatórias e patógenos e alterações nas propriedades mecânicas e nos

níveis de oxigênio^{5,28-30}. Portanto, os fibroblastos produzem variado número de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento em resposta às mudanças no ambiente da ferida³⁻⁵ e, como resultado, os fibroblastos participam ativamente do desenvolvimento de novo tecido e da regulação da cicatrização de feridas.

Alguns dos fibroblastos se diferenciam em miofibroblastos durante a fase proliferativa, principalmente após a estimulação exercida pela transformação do fator de crescimento beta (TGF- β) e, essas células que proporcionam a contração da ferida e, eventualmente, sofrem apoptose, são subsequentemente substituídos por uma segunda onda de fibroblastos que iniciam a remodelação do tecido^{5,31}. A fase de remodelação caracteriza-se pela reorganização ativa da matriz extracelular e redução no número de capilares^{5,32} e, concomitante, a maior parte do colágeno tipo III produzido pelos fibroblastos durante os estágios iniciais da cicatrização é substituída pelo colágeno tipo I^{5,33}, ocorrendo sua maturação pelo aumento no número de ligações cruzadas entre as fibras de colágeno.

Como descrito por Stunova e Vistejnova⁵ (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.

2.2 Cicatrização de Feridas Como um Problema de Relevância Clínica, Social e Perspectivas de Resolução

Há uma crescente preocupação a nível global acerca do problema de feridas agudas e crônicas, tanto para os países desenvolvidos como àqueles com escassez de recursos. A análise retrospectiva do *Medicare beneficiaries* em 2018 aponta que 8,2 milhões de pessoas apresentaram morbidades relacionadas a feridas infecciosas ou não infecciosas, gerando um custo de tratamento entre 28,1 bilhões e 96,8 bilhões de dólares⁷. Portanto, o gradativo aumento de custos em cuidados em saúde, acrescido a potencial ocorrência de infecções com maior complexidade de tratamento, evidenciam a relevância clínica, social e econômica acerca do tratamento de feridas, como enfatizado pelo *Compêndio atualizado de estimativas sobre feridas em humanos*^{7,34}.

Atualmente, o tratamento de feridas apresenta limitado sucesso e compreende estratégias de alto custo⁶, tornando-se necessário investimentos para o estabelecimento de inovadores e eficientes terapias, como por exemplo o uso de substâncias capazes de acelerar a cicatrização interna ou externamente como abordado por Ustener et al.⁷ (2019), havendo um interesse crescente em opções de tratamentos naturais que suportem o processo de cicatrização de feridas⁷⁻¹⁰. Nesse contexto, as plantas têm sido consideradas fontes viáveis para vários fitoconstituintes, os quais comparados às drogas sintéticas são assimilados mais facilmente, tanto por humanos quanto por animais. Compostos à base de plantas são alternativas tradicionais de tratamento, constituindo-se opções de tratamento de fácil acesso, além de eliminarem as interrupções associadas aos métodos modernos de tratamento^{7,35,36} e serem reconhecidos como seguros e eficazes³⁷, enfatizando a recomendação e incentivo ao uso de tratamentos à base de plantas pela Organização Mundial de Saúde (OMS)⁷.

Diversos estudos como os de Thakur et al.¹¹, 2011 e Ibrahim et al.¹², 2018 acerca das propriedades cicatrizantes de produtos naturais têm sido realizados demonstrando desde ações anti-inflamatória, antioxidante, antibacteriana à síntese de pró-colágeno, e tais propriedades medicinais podem ser atribuídas aos constituintes fitoquímicos bioativos das várias famílias químicas, como alcaloides, óleos essenciais, flavonoides, dentre outros. Cada agente bioativo pode apresentar função específica nas propriedades de cicatrização de feridas; por exemplo, saponinas podem melhorar a síntese de pró-colágeno^{12,38}, enquanto taninos e flavonoides têm atividades antissépticas e antibacterianas^{12,39}.

2.3 Aspectos Gerais dos Flavonoides

Flavonoides constituem um grupo de polifenóis de origem vegetal, sendo descritos mais de 5.000 tipos de compostos^{40,41} agrupados nas seguintes subclasses: antocianinas, flavonóis, flavanonas, flavonas, flavanolignanos e isoflavonas⁴². Flavanona é uma das maiores classes de flavonoides e, dentre suas formas conhecidas, aproximadamente 350 são aglicosadas e 100 glicosadas^{20,43}. Sua estrutura é baseada na forma genérica dos flavonoides e composta por um núcleo formado por dois anéis aromáticos (A e B) ligados através de um anel de grupamento

pirona (C). Todos os flavonoides derivam seus 15-carbonos de dois metabólitos básicos, o malonil-CoA e o p-cumaroil-CoA 48. Três moléculas de malonil-CoA se condensam com o p-cumaroil-CoA formando uma chalcona intermediária. Chalcona é uma classe de flavonoides de dois anéis fenólicos conectados por uma ponte de 3 carbonos, sendo subsequentemente catalisada pela chalcona isomerase em flavanona (4',5,7-trihidroxi-flavanona) e, baseada nessa estrutura todas as outras classes de flavonoides são geradas^{20,43-45}.

As atividades biológicas dos flavonoides abrangem um amplo espectro, desde propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antineoplásicas e antibacterianas, à inibição da reabsorção óssea^{40,46-49}. Flavonoides com mais grupos OH, como a eriocitrina, apresentam maior atividade antioxidante e efeito anti-inflamatório⁵⁰, propriedades essas que atuam sobre o estresse oxidativo e evitam danos teciduais pela oxidação das membranas celulares.

Dentre os compostos pertencentes ao grupo das flavanonas destaca-se a eriocitrina, um flavonoide abundante em limões e limas, descrita como potente antioxidante em estudos *in vitro*^{13,14}, além de ter sido relacionada à redução de alterações metabólicas observadas em indivíduos obesos¹⁵⁻¹⁷. Ainda, estudos prévios descrevem que a eriocitrina e o eriodictiol, apresentam potente atividade antioxidante *in vitro*, e também exercem atividades anti-inflamatórias e antioxidantes em ratos diabéticos ou submetidos a exercício físico agudo, respectivamente¹⁶⁻²⁰.

O eriodictiol, outro flavonoide da classe das flavanonas comumente presente em frutas e vegetais, especialmente frutas cítricas como o limão, foi associado à redução dos níveis de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias em ratos diabéticos¹⁶. No estudo de Huang et al.⁵¹ (2010), foi demonstrado que eriodictiol regula moléculas de adesão e a migração trans-endotelial de monócitos, que são eventos imunes envolvidos na patogênese de doenças inflamatórias, como a aterosclerose. Ainda, o eriodictiol tem sido também identificado como ativador do fator de transcrição relacionado ao NF-E2 (Nrf2), induzindo enzimas de desintoxicação de fase 2 em queratinócitos, células da retina humana, e em modelo de isquemia cerebral^{52,53}. O Nrf2 regula a transcrição de enzimas de fase 2 que protegem contra danos causados ao DNA pelo estresse oxidativo e evita a morte celular^{20,54}.

2.4 Ação de Flavonoides Sobre Fibroblastos e Potencial Terapêutico na Cicatrização de Feridas

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^{55,56}.

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. No trabalho de Nazaruk e Galicka⁵⁶ (2014) os autores avaliaram o efeito in vitro de 6 diferentes tipos de flavonoides sobre a expressão de colágeno a partir de fibroblastos dérmicos provenientes de humanos e demonstraram, 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 compostos⁵⁶.

Em ensaio in vitro de arranhão, a partir de fibroblastos, foi observado que o tratamento das células com 0.05% de hesperidina acelerou a migração celular em 39% comparado ao grupo controle^{57,58}. Em ratos diabéticos, a administração oral de hesperidina (100mg/Kg) promoveu fechamento de 97 % de lesão cutânea, enquanto nos animais que receberam tratamento veículo não ocorreu oclusão da ferida^{58,59}. Os autores observaram também aumento significativo na expressão gênica de TGF- β e VEGF em amostras de tecido de ratos diabéticos tratados com hesperidina via oral; sendo esses dois fatores de crescimento cruciais para a cicatrização de feridas⁵⁹.

Singh et al.⁶⁰, (2019) mostraram que a aplicação tópica de outro tipo de flavonoide (icariin) sobre lesão cutânea em ratos, aumentou a contração das feridas, elevou a deposição de colágeno e acelerou a reepitelização. Palungwachira et al.⁶¹, (2019) avaliaram o efeito da antocianina sobre a atividade in vitro de fibroblastos dérmicos de ratos, e observaram que o flavonoide promoveu a migração das células comparando-se ao grupo controle, aumentou a expressão gênica de colágeno tipo I alfa2 e regulou a expressão proteica de colágeno tipo I.

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.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Hipótese

A hipótese geral do projeto é que os flavonoides, eriocitrina e eriodictiol, apresentam propriedades moduladoras sobre a atividade in vitro de fibroblastos.

3.2 Objetivo Geral e Específico

Avaliar, in vitro, a ação da eriocitrina e eriodictiol sobre a atividade de fibroblastos L929, avaliando-se especificamente as propriedades dos flavonoides sobre:

- Proliferação celular e citotoxicidade em fibroblastos L929;
- Atividade migratória de fibroblastos L929;
- Síntese de colágeno a partir de fibroblastos L929;
- Expressão de fatores de crescimento por fibroblastos L929.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Preparo das Formulações de Eriocitrina e Eriodictiol

As formulações de eriocitrina e eriodictiol (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 em concentração de 0.1% e, em seguida, agitadas e filtradas. No momento da administração da eriocitrina e eriodictiol 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)²⁰.

4.2 Linhagem e Cultura Celular

Os ensaios in vitro foram realizados a partir de linhagem celular de fibroblastos L929 (ATCC CCL-1). 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 O₂⁶².

4.3 Determinação das Concentrações de Estudo

Para excluir os efeitos citotóxicos das flavanonas utilizadas testes de citotoxicidade foram realizados previamente. Os fibroblastos L929 foram cultivados conforme descrito acima e, quando confluentes, foram semeadas em placa de 96 poços na quantidade de 2×10^4 células/poço²⁰. Após 24 horas do plaqueamento foram adicionados os tratamentos, de acordo com cada grupo: **1-Células+DMEM (Controle)**, **2- Células+DMSO 0.1%**, **3- Células+Triton 0.1%**, **4- Células+Eriocitrina 1000µM**, **5- Células+Eriocitrina 500µM**, **6- Células+Eriocitrina 200µM**, **7-**

Células+Eriocitrina 100µM, 8- Células+Eriocitrina 50µM, 9- Células+Eriocitrina 25µM 10- Células+Eriocitrina 1µM, 11-Células+Eriodictiol 1000µM, 12- Células+Eriodictiol 500µM, 13-Células+Eriodictiol 200µM, 14-Células+ Eriodictiol 100µM, 15-Células+Eriodictiol 50µM, 16-Células+Eriodictiol 25µM, 9- Células+Eriodictiol 1µM. O grupo triton corresponde ao grupo controle positivo pois apresenta alta taxa de toxicidade às células, proporcionando um parâmetro máximo de citotoxicidade para comparação da viabilidade celular nos demais grupos. Os tratamentos com ou sem os flavonoides foram avaliados em 48 horas. Após o período proposto, o sobrenadante de cada poço foi aspirado e, em seguida, foi adicionado sobre as células 100µL de metiltetrazolium (MTT - Sigma, MO, EUA) preparado a 10% em meio DMEM sem soro. As células foram incubadas com o MTT por 4 horas a 37°C e 5% de CO₂, e após esse período, foram adicionados 100µL de isopropanol acidificado e, em seguida, a placa foi lida no equipamento Synergy H1 (BioTekTM) no comprimento de onda de 570 nm.

4.4 Avaliação do Efeito Citotóxico Após Tratamento com Eriocitrina e Eriodictiol em Fibroblastos L929

Os fibroblastos L929 foram cultivados conforme descrito acima e, quando confluentes, foram semeadas em placa de 96 poços na quantidade de 2×10^4 células/poço²⁰. Após 24 horas do plaqueamento foram adicionados os tratamentos, de acordo com cada grupo: **1-Células+DMEM (Controle), 2-Células+DMSO 0.1%, 3- Células+Triton 0.1%, 4-Células+Eriocitrina1µM, 5-Células+Eriocitrina25µM, 6- Células+Eriocitrina50µM 7-Células+Eriodictiol1µM, 8-Células+Eriodictiol25µM, 9-Células+ Eriodictiol50µM.** O grupo triton corresponde ao grupo controle positivo pois apresenta alta taxa de toxicidade às células, proporcionando um parâmetro máximo de citotoxicidade para comparação da viabilidade celular nos demais grupos. Os tratamentos com ou sem os flavonoides foram avaliados em 1, 3 e 7 dias. Após cada período proposto, o sobrenadante de cada poço foi aspirado e, em seguida, foi adicionado sobre as células 100µL de metiltetrazolium (MTT - Sigma, MO, EUA) preparado a 10% em meio DMEM sem soro. As células foram incubadas com o MTT por 4 horas a 37°C e 5% de CO₂, e após esse período, foram adicionados 100µL de isopropanol acidificado e, em seguida, a placa foi lida no equipamento Synergy H1

(BioTek™) no comprimento de onda de 570 nm. 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 do Tratamento com Eriocitrina e Eriodictiol Sobre Proliferação de Fibroblastos L929

Para avaliação da proliferação celular os fibroblastos L929 foram cultivados conforme descrito anteriormente e, quando confluentes, foram semeadas em placa de 96 poços na quantidade de 5×10^3 células/poço²⁰. Após 24 horas do plaqueamento foram adicionados os tratamentos, de acordo com cada grupo: **1-Células+DMEM (Controle), 2-Células+DMSO 0.1%, 3-Células+Triton 0.1%, 4-Células+Eriocitrina1μM, 5-Células+Eriocitrina25μM, 6-Células+Eriocitrina50μM 7-Células+Eriodictiol1μM, 8-Células+Eriodictiol25μM, 9-Células+Eriodictiol50μM**. Os tratamentos com ou sem os flavonoides foram avaliados em 1, 3 e 7 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.

4.6 Análise das Propriedades da Eriocitrina e Eriodictiol Sobre a Migração de Fibroblastos 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/poço⁶². Em seguida os poços foram tratados com 5μg/mL de mitomicina C (Sigma-Aldrich) por 15 minutos. O pré-tratamento com mitomicina C garante que as células estejam migrando e não proliferando. 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. Após a confecção do arranhão, o meio de cultura foi aspirado, as células foram lavadas duas vezes com 500µL de PBS estéril (Sigma-Aldrich®), e os tratamentos administrados de acordo com cada grupo: **1-Células+DMEM (Controle), 2-Células+Eriocitrina1µM, 3-Células+Eriocitrina25µM, 4-Células+Eriocitrina50µM 5-Células+Eriodictiol1µM, 6-Células+Eriodictiol25µM, 7-Células+Eriodictiol50µM**. Os tratamentos com ou sem os flavonoides foram mantidos durante 24 e 72 horas e, após cada período, as células foram fixadas em paraformaldeído 4% durante 1 hora a 4°C⁶² (Santana et al., 2020). Posteriormente, a solução de paraformaldeído 4% foi aspirada e os poços lavados com PBS estéril (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 celular⁶². Os dados da área mensurada em cada poço/grupo foram expressos em cm² e porcentagem em relação ao baseline (tempo 0), que corresponde a área do arranhão imediatamente a sua realização.

4.7 Avaliação das propriedades da eriocitrina e eriodictiol sobre síntese de colágeno a partir de fibroblastos L929

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/poço⁶². Após 24 horas do plaqueamento foram adicionados os tratamentos, de acordo com cada grupo: **1-Células (DMEM), 2-Células+Eriocitrina1µM, 3-Células+Eriocitrina25µM, 4-Células+Eriocitrina50µM 5-Células+Eriodictiol1µM, 6-Células+Eriodictiol25µM, 7-Células+**

Eriodictiol 50 µM. Os tratamentos com ou sem os flavonoides foram avaliados em 3 e 7 dias e, após completados esses períodos, 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 µL de ácido clorídrico 0,01 M. Os tubos foram centrifugados novamente (12.000 rpm/10 min), o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 250 µL de hidróxido de sódio 0,5 M para solubilizar o material precipitado. Em seguida, os espécimes foram submetidos à análise de absorbância em espectrofotômetro (equipamento 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.

4.8 Análise das Propriedades da Eriocitrina e Eriodictiol Sobre Expressão de Fatores de Crescimento por Fibroblastos L929

Fibroblastos L929 foram cultivados conforme descrito anteriormente e, quando confluentes, foram semeados em placa de 24 poços na quantidade de 5×10^4 células/poço. Após 24 horas do plaqueamento foram adicionados os tratamentos, de acordo com cada grupo: **1-Células (DMEM), 2-Células+Eriocitrina 1 µM, 3-Células+Eriocitrina 25 µM, 4-Células+Eriocitrina 50 µM, 5-Células+Eriodictiol 1 µM, 6-Células+Eriodictiol 25 µM, 7-Células+Eriodictiol 50 µM.** Os tratamentos com ou sem os flavonoides foram avaliados em 3 e 7 dias. Após os períodos propostos, o sobrenadante de cada poço foi coletado e congelado a -80°C e, posteriormente, foi realizada a quantificação da concentração de proteína total de cada amostra coletada pelo ensaio BCA Protein Assay (Novagen, EMD Chemicals), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram avaliadas através de imunoensaio ELISA para avaliação da produção dos fatores de crescimento TGF-β1 (#BMS608 – Invitrogen ELISA KIT) e FGF (#EMFGF2 Thermo Scientific ELISA KIT). Brevemente, os sobrenadantes coletados foram incubados em placas pré-tratadas de acordo com os anticorpos específicos de cada Kit ELISA e, em seguida incubados com um

anticorpo universal e estreptavidina, de acordo com as orientações do protocolo de cada fabricante. A absorbância foi lida no comprimento de onda de 450nm. Os dados de absorbância obtidos pelo ensaio ELISA foram calculados através de curva padrão, e os resultados foram normalizados dividindo-se o valor de cada amostra pelos respectivos valores de proteína alvo obtidos na quantificação pelo método de ensaio de proteína BCA. Foram realizadas 3 repetições do ensaio, em momentos diferentes e, em cada repetição os grupos foram estabelecidos em triplicata. Os dados de absorbância foram calculados e expressos em fold-change em relação ao grupo controle.

4.9 Análise Estatística dos Dados

Os dados foram submetidos aos testes de homogeneidade e distribuição usando o teste de Shapiro-Wilk. De acordo com a distribuição dos dados, os testes one-way ANOVA e o pós-teste de Tukey ou Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn foram realizados para análise comparativa entre três ou mais grupos. O *t* teste de Student foi empregado para comparação entre dois grupos. Todas as análises foram realizadas usando o software de análises estatísticas GraphPad Prism 8. 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 RESULTADOS

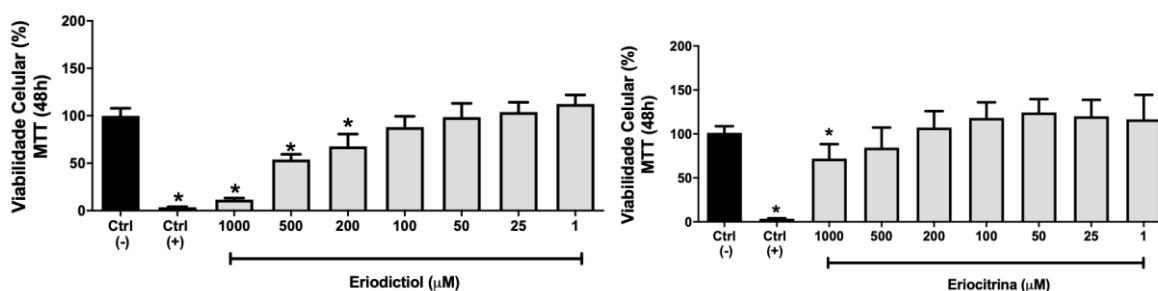
5.1 As Concentrações de 1, 25 e 50µM Foram Mais Bem Toleradas Pelos Fibroblastos L929

A avaliação da viabilidade celular através do ensaio MTT mostrou que as concentrações de eriodictiol a 200, 500 e 1000µM apresentaram-se citotóxicas sobre fibroblastos após 48 horas, reduzindo significativamente a viabilidade celular em média à 67, 53 e 11%, respectivamente ($p<0.05$), enquanto sob a concentração de 100 µM a porcentagem de células viáveis apresentou-se 88%, e o tratamento com eriodictiol a 1, 25 e 50µM manteve a porcentagem de fibroblastos viáveis acima de 98% (**Figura 1**).

Por outro lado, as concentrações de eriocitrina de 1 até 500µM foram bem toleradas pelos fibroblastos após 48hrs de tratamento, variando a porcentagem de células viáveis em média entre 116 e 84%. O tratamento com o composto a 1000µM reduziu significativamente a viabilidade celular para aproximadamente 72% ($p<0.05$) (**Figura 1**).

As concentrações de estudo foram baseadas a partir das concentrações teste, e portanto, foram estabelecidas as concentrações de 1, 25 e 50µM de eriodictiol e eriocitrina para a realização dos experimentos do presente trabalho.

Figura 1 – Determinação das concentrações de estudo



As concentrações de estudo foram baseadas a partir das concentrações teste. * $p<0.05$ comparado ao grupo controle.

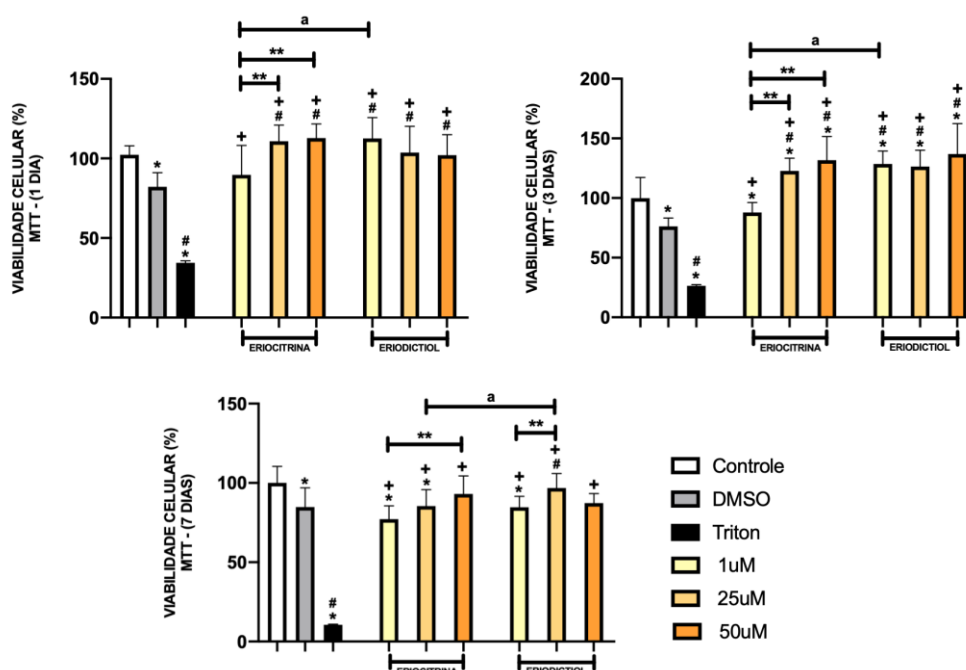
Fonte: Elaboração própria.

5.2 O Tratamento com Eriocitrina ou Eriodictiol não Comprometeu a Viabilidade In Vitro dos Fibroblastos L929

A citotoxicidade das diferentes concentrações de eriocitrina e eriodictiol sobre os fibroblastos L929 foi avaliada após 1, 3 e 7 dias de tratamento, através do ensaio MTT.

De modo geral, a média percentual de células viáveis variou entre 78 e 136% considerando-se os grupos tratados com as diferentes concentrações dos flavonoides em comparação ao grupo controle ($p < 0.05$), observando-se uniformidade nos diferentes períodos avaliados com discreta redução da viabilidade celular no período de 7 dias em relação os períodos de 1 e 3 dias. O grupo de células que recebeu apenas DMSO (solvente da eriocitrina e eriodictiol) também apresentou média de porcentagem de viabilidade celular entre aproximadamente 76 e 84%, demonstrando baixa citotoxicidade nas condições avaliadas quando comparada ao grupo de células sem tratamento ($p < 0.05$). Comparando-se as diferentes concentrações do mesmo flavonoide, observou-se que o tratamento com 25 e 50 μM de eriocitrina manteve aumentada a porcentagem de células viáveis em relação a menor concentração (1 μM) ($p < 0.05$). (Figura 2)

Figura 2 – Porcentagem média de células viáveis após 1, 3 e 7 dias de tratamento com eriocitrina e eriodictiol



Em todos os períodos, a administração dos flavonoides apresentou baixo efeito citotóxico sobre os fibroblastos independente da concentração dos compostos. * $P < 0.05$ comparado ao grupo controle; # $P < 0.05$ comparado ao grupo DMSO; + $P < 0.05$ comparado ao grupo triton; ** $P < 0.05$ comparado aos grupos 1 μM de erioc ou eriod; ### $P < 0.05$ comparado ao grupo eriod 25 μM ; a $P < 0.05$ comparado ao grupo com respectiva concentração de erioc.

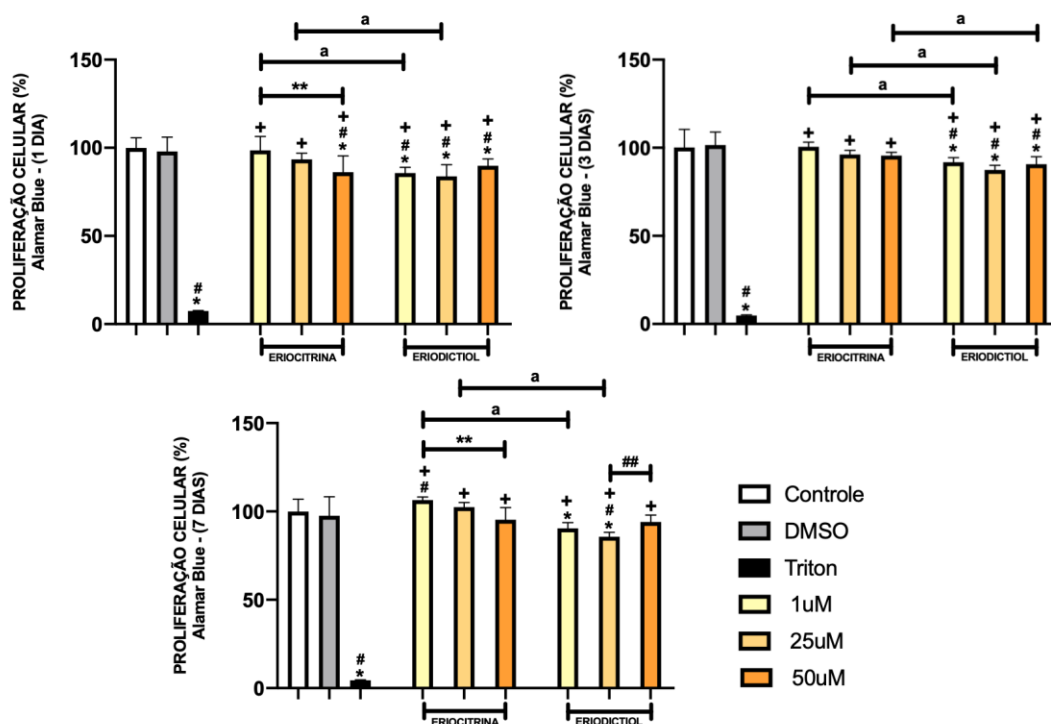
5.3 A Proliferação In Vitro de Fibroblastos L929 Manteve-se Similar Entre os Grupos Tratados ou Não com Eriocitrina ou Eriodictiol

O ensaio de Alamar blue foi utilizado para avaliação do tratamento com os flavonoides sobre a proliferação dos fibroblastos nos períodos de 1, 3 e 7 dias.

A taxa percentual média de proliferação celular variou entre 83 e 106% em relação ao grupo controle ($p < 0.05$) após os diferentes tempos de tratamento com eriocitrina e eriodictiol, apresentando-se reduzida pelas diferentes concentrações de eriodictiol após 1, 3 e 7 dias de tratamento ($p < 0.05$). A média percentual de proliferação no grupo DMSO manteve-se similar ao grupo sem tratamento (controle). Quando comparadas as diferentes concentrações do mesmo tratamento, observou-se que a proliferação celular foi menor no grupo eriocitrina 50 μ M em relação a concentração de 1 μ M, nos períodos de 1 e 7 dias de tratamento ($p < 0.05$), e ainda, comparando-se as respectivas concentrações de eriocitrina e eriodictiol, verificou-se que a proliferação celular foi menor nos grupos tratados com eriodictiol ($p < 0.05$).

(Figura 3)

Figura 3 – Taxa percentual média de proliferação celular após o tratamento com eriocitrina e eriodictiol em 1, 3 e 7 dias



De modo geral, os diferentes tratamentos não comprometeram a atividade proliferativa dos fibroblastos. * $P < 0.05$ comparado ao grupo controle; # $P < 0.05$ comparado ao grupo DMSO; + $P < 0.05$ comparado ao grupo triton; ** $P < 0.05$ comparado aos grupos 1 μ M de erioc ou eriod; ### $P < 0.05$ comparado ao grupo eriod 25 μ M; a $P < 0.05$ comparado ao grupo com respectiva concentração de erioc.

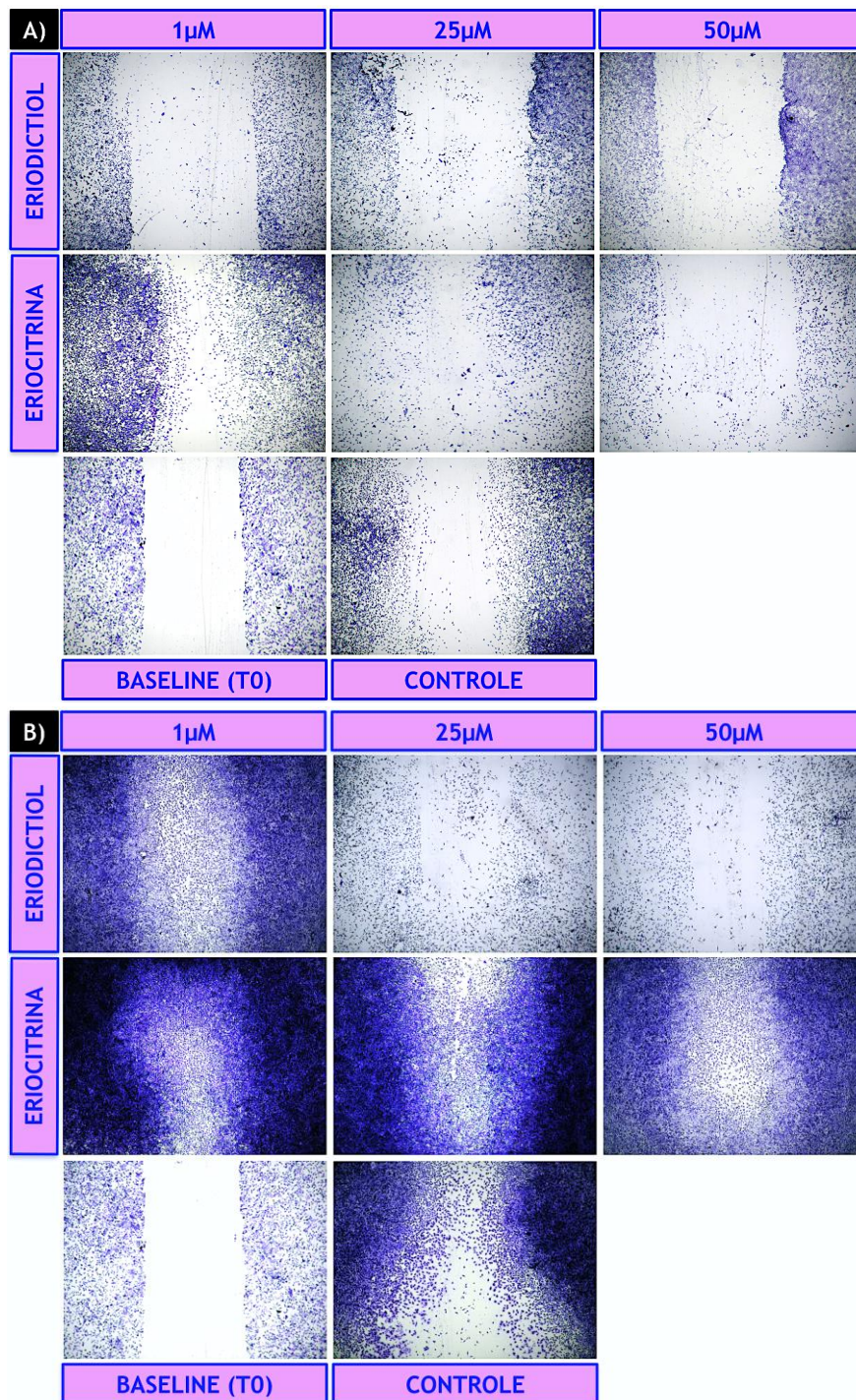
Fonte: Elaboração própria.

5.4 As Menores Concentrações de Eriocitrina e Eriodictiol Estimularam a Migração In Vitro dos Fibroblastos L929

A atividade migratória dos fibroblastos L929 sob o tratamento de diferentes concentrações de eriocitrina e eriodictiol, foi avaliada após 24 e 72 horas de tratamento, através do ensaio de arranhão. A área mensurada do arranhão é apresentada na unidade de cm^2 e em porcentagem média em relação ao grupo baseline (tempo 0) (**Figura 5**).

A média percentual da área de arranhão variou entre 26 e 111% nos grupos controle e tratados com flavonoides em relação ao baseline ($p < 0.05$) (**Figura 5**). Após 24 horas de tratamento com os compostos, observou-se reduzida quantidade de células na área central referente ao arranhão em relação às extremidades. No entanto, pode-se observar que no intervalo de 1 dia há a migração de fibroblastos das extremidades do arranhão para a área central (**Figura 4A**). Em comparação aos grupos baseline, controle e eriocitrina $50\mu\text{M}$, verificou-se redução da área de arranhão na monocamada celular dos fibroblastos L929, após o tratamento com eriocitrina a $1\mu\text{M}$ (66%) e $25\mu\text{M}$ (77%), enquanto a administração de eriodictiol nas concentrações de 25 e $50\mu\text{M}$ foi associada a maior área de arranhão comparando-se aos grupos controle e eriodictiol $1\mu\text{M}$ (**Figura 5**). Quando avaliado em 72 horas, observou-se grande quantidade de fibroblastos na área central do arranhão em todos os grupos, demonstrando maior atividade migratória das células aos 3 dias (**Figura 4B**). Nesse período, em comparação ao controle, constatou-se a redução da área de arranhão na monocamada celular dos fibroblastos L929 após o tratamento com eriocitrina e eriodictiol em todas as concentrações testadas com taxa percentual variando entre 26 e 87%, com destaque para a eriocitrina $1\mu\text{M}$, $25\mu\text{M}$ e o eriodictiol $1\mu\text{M}$ que apresentaram significativa redução da área do arranhão quando comparados ao baseline e controle ($p < 0.05$) (**Figura 5**). Em ambos os períodos, 24 e 72 horas, a redução na área de arranhão observada pelo tratamento com eriocitrina 1 e $25\mu\text{M}$ foi significativa em comparação aos respectivos grupos de eriodictiol ($p < 0.05$) (**Figura 5**).

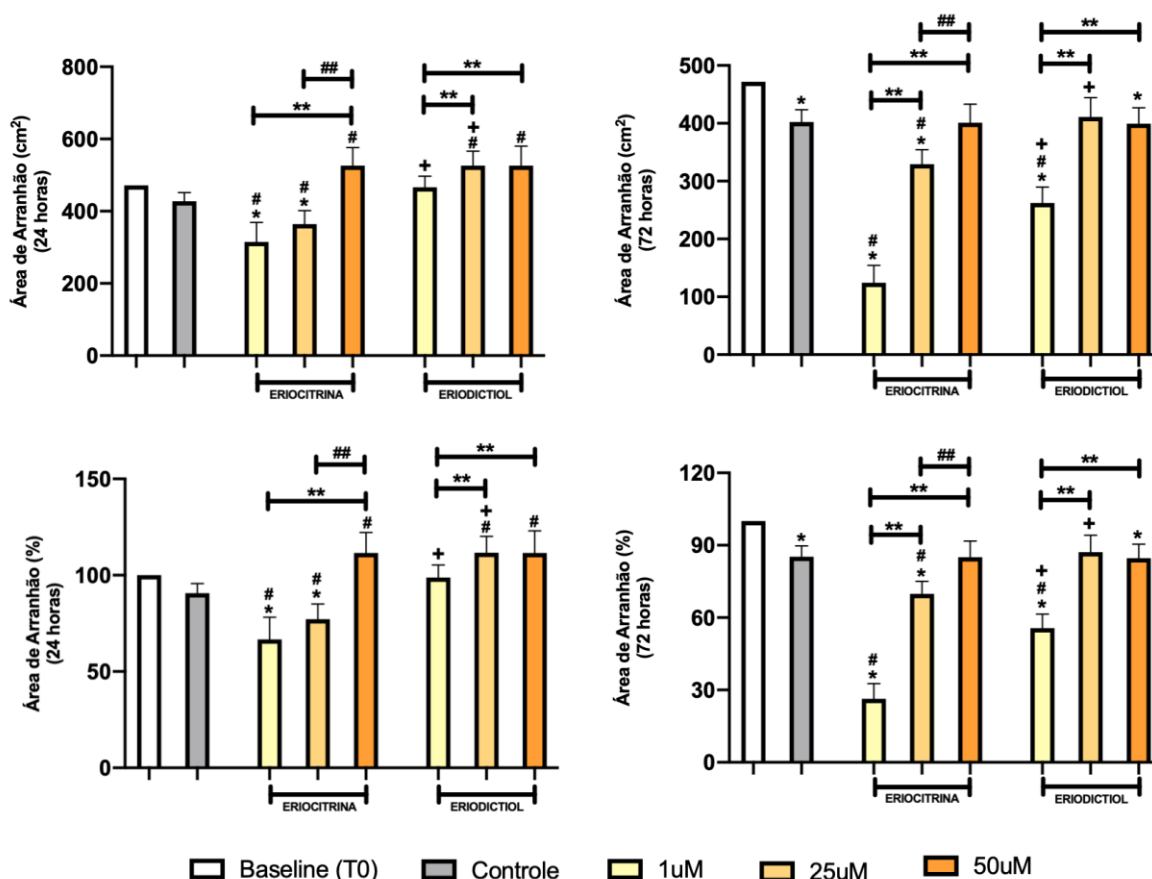
Figura 4 – Imagens representativas da avaliação qualitativa da migração de fibroblastos em ensaio in vitro de arranhão



A) Pode-se observar que no intervalo de 24 horas (1 dia) há reduzida migração de fibroblastos das extremidades do arranhão para a área central. **B)** Em 72 horas, verificou-se grande quantidade de fibroblastos na área central do arranhão em todos os grupos, demonstrando maior atividade migratória das células aos 3 dias.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 5 – Área (cm²) e porcentagem média da área de arranhão nos grupos tratados ou não com eriocitrina e eriodictiol.



Os dados demonstram que a eriocitrina e eriodictiol na concentração de 1μM estimularam a migração in vitro dos fibroblastos L929. * $P < 0.05$ comparado ao grupo Baseline (TEMPO 0); # $P < 0.05$ comparado ao grupo controle; ** $P < 0.05$ comparado aos grupos 1uM de erioc ou eriod; ### $P < 0.05$ comparado ao grupo erioc 25uM; + $P < 0.05$ comparado ao grupo com respectiva concentração de eriocitrina.

Fonte: Elaboração própria.

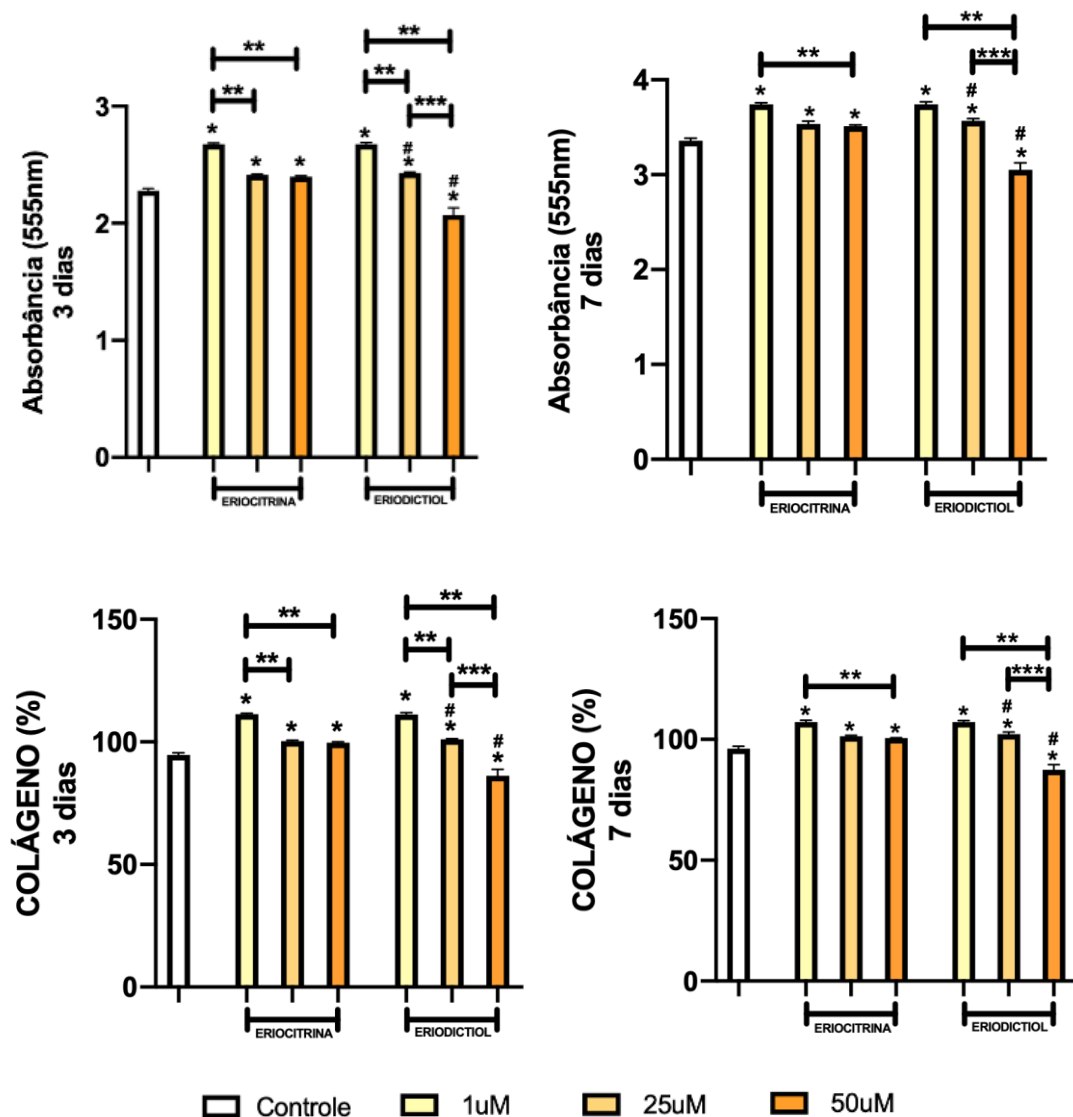
5.5 O Tratamento com 1μM de Eriocitrina e Eriodictiol Promoveu Aumento Significativo na Síntese In Vitro de Colágeno

O ensaio de espectrofotometria foi utilizado para avaliação do tratamento com os flavonoides sobre a síntese de colágeno pelos fibroblastos aos 3 e 7 dias.

De modo geral, a quantificação de colágeno foi alterada significativamente pelas diferentes concentrações da eriocitrina ou eriodictiol. A taxa percentual média de síntese de colágeno variou entre 86 e 111% em relação ao grupo controle ($p < 0.05$) após os diferentes tempos de tratamento (**Figura 6**). Os tratamentos com eriocitrina e eriodictiol na concentração de 1μM promoveram significativo aumento na produção de

colágeno, quando comparados aos grupos controle e eriocitrina 25 e 50 μ M ($p<0.05$) (**Figura 6**). Ambos os flavonoides nas concentrações de 25 e 50 μ M promoveram, respectivamente, significativo aumento e redução na porcentagem de colágeno em relação ao controle ($p<0.05$) (**Figura 6**).

Figura 6 – Absorbância média e porcentagem de colágeno após 3 e 7 dias de tratamento com eriocitrina e eriodictiol



Os tratamentos com eriocitrina e eriodictiol na concentração de 1 μ M promoveram significativo aumento produção de colágeno quando comparados aos grupos controle e eriocitrina 25 e 50 μ M * $p<0.05$ em relação ao controle; ** $p<0.05$ em relação aos grupos eriocitrina 1 μ M; *** $p<0.05$ em relação aos grupos eriocitrina ou eriodictiol 25 μ M; # $p<0.05$ em relação ao grupo com respectiva concentração de eriocitrina.

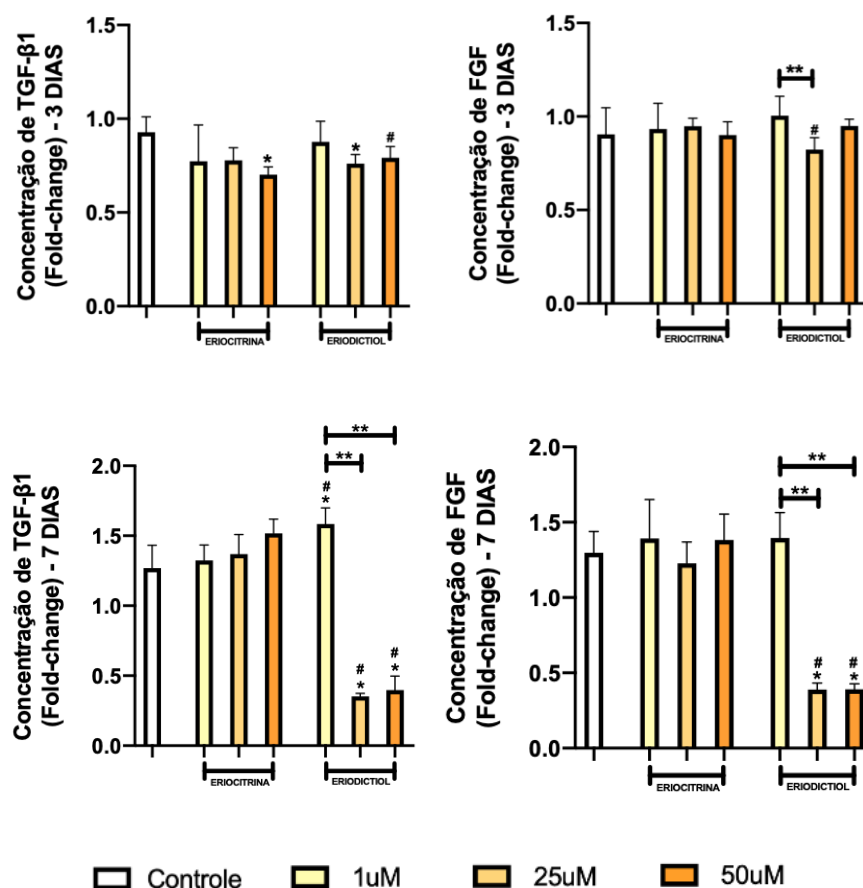
Fonte: Elaboração própria.

5.6 O Tratamento com Eriocitrina e Eriodictiol Modulou Apenas a Expressão de TGF- β 1 nos Períodos de 3 e 7 dias Quando Comparada ao Grupo Não Tratado

A expressão de TGF- β 1 foi significativamente aumentada pelo tratamento com eriodictiol 1 μ M em comparação ao grupo controle e a eriocitrina de mesma concentração no período de 7 dias ($p < 0.05$) (**Figura 7**). Enquanto a eriocitrina 50 μ M e eriodictiol a 25 μ M reduziu a expressão de TGF- β 1 em comparação ao controle em ambos os períodos testados, com acentuada redução principalmente em 7 dias ($p < 0.05$).

Por outro lado, após 3 dias, nenhum tratamento com eriocitrina modificou a expressão do fator de crescimento em fibroblastos (FGF) em relação ao controle, contudo, a concentração de eriodictiol a 25 μ M reduziu significativamente a produção de FGF comparando-se aos grupos eriodictiol 1 μ M e eriocitrina 25 μ M ($p < 0.05$), redução esta que apresentou-se acentuada ao final de 7 dias (**Figura 7**).

Figura 7 – Avaliação da expressão in vitro de TGF- β 1 e FGF a partir de fibroblastos L929



O tratamento com eriocitrina e eriodictiol modulou apenas a expressão de TGF- β 1 aos 3 dias quando comparada ao grupo não tratado. Em 7 dias, os compostos a 25 e 50 μ M reduziram significativamente a expressão de TGF- β 1 e FGF, enquanto o tratamento com eriocitrina a 1 μ M aumentou de modo significativo a expressão de TGF- β 1. * $P < 0.05$ comparado ao grupo controle; ** $P < 0.05$ comparado aos grupos eriodictiol 1 μ M; # $P < 0.05$ comparado ao grupo com respectiva concentração de erioc.

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, promover a contração de ferida, além de aumentar a expressão de fatores de crescimento presentes no reparo de tecidos⁵⁶⁻⁵⁹. Nessa perspectiva, os fibroblastos constituem células especializadas, 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 e, portanto, participam e exercem fundamental papel ao processo de cicatrização. No estágio atual do nosso conhecimento sobre o uso de flavonoides, não há evidências conclusivas acerca do potencial terapêutico da eriocitrina e eriodictiol 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 dos flavonoides eriocitrina (erioc) e eriodictiol (eriod) 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 dos flavonoides utilizados no presente estudo, diferentes concentrações de erioc e eriod foram previamente avaliadas através do ensaio de MTT. A porcentagem de células viáveis variou de acordo com o composto administrado e as diferentes concentrações, contudo, os tratamentos até 50µM mantiveram a viabilidade celular *in vitro* acima de 90% e, portanto, foram definidas para o estudo as concentrações de 1, 25 e 50µM. Quando avaliadas ao longo do tempo, as concentrações de estudo não foram citotóxicas aos fibroblastos, viabilizando o desenvolvimento dos experimentos propostos. Os dados na literatura avaliando-se especificamente a viabilidade *in vitro* de fibroblastos após o tratamento com erioc ou eriod são limitados, porém, recente estudo⁶³ demonstrou que concentrações mais baixas de eriodictiol (5, 10 e 20µM) não alteraram a viabilidade

celular em células RGC-5. Em fibroblastos de pulmão o tratamento com eriodictiol apresentou baixa toxicidade com concentração inibitória de 50% (IC50) de 410 μ M após 24h de tratamento *in vitro*⁶⁴. No entanto, enfatizamos que os autores utilizaram um período reduzido e avaliaram uma diferente linhagem celular, quando comparado ao nosso estudo. Complementar à avaliação de citotoxicidade, a atividade proliferativa celular foi avaliada, e os resultados demonstraram que após 1, 3 e 7 dias, a proliferação *in vitro* de fibroblastos não foi significativamente modulada pelos compostos flavonoides. San Miguel et al.⁶⁵, (2011) mostraram que, *in vitro*, determinadas concentrações de flavonoides promovem um aumento na quantidade de células endoteliais e fibroblastos gengivais humanos, sendo que altas concentrações mostrem efeito contrário. Os achados permitem sugerir que os mecanismos *in vitro* avaliados em nosso estudo, não são devido à menor ou maior atividade de proliferação celular induzida pela eriocitrina ou eriodictiol.

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 celular^{62,66}, e verificou-se que as menores concentrações de eriocitrina e eriodictiol estimularam a migração *in vitro* dos fibroblastos. Em geral, os compostos flavonoides testados foram capazes de aumentar a migração celular em comparação ao controle, com destaque para a eriocitrina em menores concentrações (1 μ M e 25 μ M) que promoveu maior aceleração da atividade migratória quando comparada ao eriodictiol e ao controle, sugerindo uma maior eficácia no aumento da migração celular²⁰. O mecanismo molecular da ação dos flavonoides eriocitrina e eriodictiol na migração celular ainda não está bem elucidado, entretanto os estudos previamente publicados^{57,58,61} reforçam os resultados obtidos no presente trabalho, demonstrando o aumento da migração de fibroblastos quando tratados com outras classes de flavonoides. Destacamos que a proliferação celular não foi um fator que contribuiu para a oclusão da área de arranhão, pois os fibroblastos foram previamente tratados com o antiproliferativo mitomicina C⁶⁷, com o propósito de avaliar realmente a capacidade de migração celular. Contribuindo aos nossos resultados, um estudo prévio avaliou a migração *in vitro* de fibroblastos tratados com naringenin, um outro tipo de flavonoide, e demonstrou que a concentração mais baixa do composto (50 μ M), promoveu maior porcentagem de

fechamento da área de arranhão comparando-se à concentração mais alta do flavonoide (100 μM)⁶⁸.

Acrescido à atividade de migração celular, através do ensaio de espectrofotometria observou-se o aumento significativo da síntese *in vitro* de colágeno nos grupos que receberam tratamento com 1 μM de eriocitrina e eriodictiol, reforçando a sugestão de que as menores concentrações dos flavonoides apresentam maior capacidade modulatória sobre cultura de fibroblastos. A técnica utilizada para a análise da síntese de colágeno a partir dos fibroblastos constitui um método clássico para avaliação da produção de colágeno celular. Corroborando aos nossos resultados, Nazaruk e Galicka⁵⁶ (2014) demonstraram que os flavonoides são capazes de aumentar a quantidade de colágeno total secretado pelas células. Nanashima et al.⁶⁹, (2018) também relataram o aumento da produção de colágeno em ratas tratadas com antocianina, um flavonoide da classe das flavonas.

Os fibroblastos são capazes de produzir TGF- β e FGF, fatores de crescimento capazes de modular diversas etapas do processo de reparo. No presente trabalho, a expressão gênica de TGF- β 1 foi significativamente aumentada pelo tratamento com eriodictiol 1 μM em comparação ao grupo controle e a eriocitrina de mesma concentração no período de 7 dias. Além disso, a eriocitrina 1 μM aumentou a expressão de TGF- β 1 no mesmo período quando comparada ao controle. O TGF- β 1 é responsável por estimular a transformação de fibroblastos em miofibroblastos promovendo a contração da ferida. Portanto, o aumento da expressão de TGF- β 1 pode estar relacionado com a aceleração da migração celular após tratamento com as menores concentrações de eriocitrina e eriodictiol. O trabalho de Li et al.⁵⁹, (2018) também mostrou aumento significativo na expressão gênica de TGF- β e VEGF em amostras de tecido de ratos diabéticos tratados com outra classe de flavonoide, a hesperidina, reforçando os achados do presente trabalho e confirmando as propriedades dos flavonoides em modular positivamente o processo de reparo tecidual.

Concomitante à expressão de TGF- β , a sinalização de FGF desempenha papel essencial no desenvolvimento, metabolismo e homeostase tecidual⁷⁰. A expressão gênica do FGF ocorreu nos grupos tratados com eriocitrina e eriodictiol e, apesar de não ser significativa, a produção foi visível principalmente nos grupos de menores

concentrações, eriocitrina e eriodictiol 1 μ M. No entanto, não há evidências que reforcem ou corroborem com os dados encontrados em nosso estudo.

De modo geral, os resultados mostraram claramente que os flavonoides eriocitrina ou eriodictiol foram capazes de modular mecanismos *in vitro* que mimetizam diversas fases do processo de reparo, como por exemplo a migração celular, a síntese de colágeno e expressão de fatores de crescimento como o TGF- β 1. Contudo, enfatizamos que é preciso ponderar que os achados são pertinentes à um estudo *in vitro*, o qual apresenta limitações e, além disso, estudos de biologia celular, modelos animais, e estudos clínicos demonstram que cada agente bioativo apresenta uma função específica nas propriedades de cicatrização de feridas sendo os flavonoides capazes de desempenhar diversas atividades farmacológicas.

7 CONCLUSÃO

Os resultados permitem concluir que a eriocitrina e eriodictiol em baixa concentração, modulam a atividade e função in vitro dos fibroblastos L929 nas condições avaliadas, estimulando a migração celular e produção de colágeno in vitro, sugerindo-se uma correlação ao aumento expressivo de TGF- β 1.

REFERÊNCIAS*

1. Lindley LE, Stojadinovic O, Pastar I, Tomic-Canic M. Biology and biomarkers for wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 2016; 138(Suppl. 3): 18S-28S.
2. Masson-Meyers DS, Andrade TAM, Caetano GS, Guimarães FR, Leite MN, Leite SN et al. Experimental models and methods for cutaneous wound healing assessment. *Int J Exp Path.* 2020; 101(1-2): 21-37.
3. Brouty-Boye D, Pottin-Clemenceau C, Doucet C, Jasmin C, Azzarone B. Chemokines and CD40 expression in human fibroblasts. *Eur J Immunol.* 2000; 30(3): 914-9.
4. Vistejnova L, Safrankova B, Nesporova K, Slavkovsky R, Hermannova M, Hosek P et al. Low molecular weight hyaluronan mediated CD44 dependent induction of IL-6 and chemokines in human dermal fibroblasts potentiates innate immune response. *Cytokine.* 2014; 70(2): 97-103.
5. Stunova A, Vistejnova L. Dermal fibroblast – a heterogeneous population with regulatory function in wound healing. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2018; 39: 137-50.
6. Kanji S, Das H. Advances of stem cell therapeutics in cutaneous wound healing and regeneration. *Mediators Inflamm.* 2017; 2017: 5217967.
7. Ustuner O, Anlas C, Bakirel T, Ustun-Alkan F, Sigirci BD, Ak S et al. In vitro evaluation of antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial and wound healing potential of thymus sipyleus boiss. Subsp. Rosulans (Borbis) Jalas. *Molecules.* 2019; 24(18): 3353.
8. Sarmiento PDA, Ataíde TDR, Barbosa APF, De Araújo-Júnior JX, Lúcio IML, Bastos MLDA. Evaluation of the extract of *Zeyheria tuberculosa* with a view to products for wound healing. *Rev Lat Am Enfermagem.* 2014; 22: 165-72.
9. Bonini SA, Premoli M, Tambaro S, Kumar A, Maccarinelli G, Memo M, Mastinu A. Cannabis sativa: a comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. *J Ethnopharmacol.* 2018; 227: 300-15.
10. Kumar A, Premoli M, Bonini SA, Maccarinelli G, Gianoncelli A, Memo M et al. Cannabimimetic plants: are they new cannabinoidergic modulators? *Planta.* 2019, 249: 1681-94.

* 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>.

11. Thakur R, Jain N, Pathak R, Sandhu SS. Practices in wound healing studies of plants. *Evid Based Complement Altern Med*. 2011; 2011: 438056.
12. Ibrahim N, Wong SK, Mohamed IN, Mohamed N, Chin KY, Ima-Nirwana S et al. Wound healing properties of selected natural products. *Int J Environ Res Public Health*. 2018; 25;15(11): 2360.
13. Unger RH, Scherer PE. Gluttony, sloth and the metabolic syndrome: a roadmap to lipotoxicity. *Trends Endocrinol Metab*. 2010; 21: 345-52.
14. WHO. Global Health Observatory - obesity: situation and trends. 2018. [acesso 2021 nov 14]. Disponível em: http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/obesity_text/en/.
15. Assini JM, Mulvihill EE, Huff MW. Citrus flavonoids and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2013; 24: 34-40.
16. Bucolo C, Leggio GM, Drago F, Salomone S. Eriodictyol prevents early retinal and plasma abnormalities in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochem Pharmacol*. 2012; 84: 88-92.
17. Miyake Y, Mochizuki M, Okada M, Hiramitsu M, Morimitsu Y, Osawa T. Isolation of antioxidative phenolic glucosides from lemon juice and their suppressive effect on the expression of blood adhesion molecules. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2007; 71: 1911-9.
18. Miyake Y, Yamamoto K, Tsujihara N, Osawa T. Protective effects of lemon flavonoids on oxidative stress in diabetic rats. *Lipids*. 1998; 33: 689-95.
19. Minato KI, Miyake Y, Fukumoto S, Yamamoto K, Kato Y, Shimomura Y et al. Lemon flavonoid, eriocitrin, suppresses exercise-induced oxidative damage in rat liver. *Life Sci*. 2003; 72: 1609-16.
20. Carvalho JS. Ingestão de flavonoides cítricos sobre a modulação da resposta inflamatória e nível de perda óssea promovida por periodontite induzida em camundongos saudáveis [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.
21. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res*. 2012; 49(1): 35-43.
22. Daley JM, Reichner JS, Mahoney EJ, Manfield L, Henry WL, Mastrofrancesco B. Modulation of macrophage phenotype by soluble product(s) released from neutrophils. *J Immunol*. 2005; 174(4): 2265-72.
23. Profyris C, Tziotziou C, Do Vale I. Cutaneous scarring: pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics part I. The molecular basis of scar formation. *J Am Acad Dermatol*. 2012; 66(1): 1-10.

24. Tziotzios C, Profyris C, Sterling J. Cutaneous scarring: pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics part II. Strategies to reduce scar formation after dermatologic procedures.. *J Am Acad Dermatol*. 2012; 66(1): 13-24.
25. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008; 453(7193): 314-21.
26. Greaves NS, Ashcroft KJ, Baguneid M, Bayat A. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. *J Dermatol Sci*. 2013; 72(3): 206-17.
27. Martin P, Nunan R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. *Br J Dermatol*. 2015; 173(2): 370-78.
28. Tandara AA, Mustoe TA. Oxygen in wound healing – more than a nutrient. *World J Surg*. 2004; 28(3): 294-300.
29. Achterberg VF, Buscemi L, Diekmann H, Smith-Clerc J, Schwengler H, Meister JJ et al. The nano-scale mechanical properties of the extracellular matrix regulate dermal fibroblast function. *J Invest Dermatol*. 2014; 134(7): 1862-72.
30. Portou MJ, Baker D, Abraham D, Tsui J. The innate immune system, toll-like receptors and dermal wound healing: a review. *Vasc Pharmacol*. 2015; 71: 31-6.
31. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002; 3(5): 349-63.
32. Dipietro LA. Wound-healing – the role of the macrophage and other immune cells. *Shock*. 1995; 4(4): 233-40.
33. O'Toole EA. Extracellular matrix and keratinocyte migration. *Clin Exp Dermatol*. 2001; 26(6): 525-30.
34. Sen CK. Human wounds and Its burden: an updated compendium of estimates. *Adv Wound Care*. 2019; 8: 39-48.
35. Pereira RF, Bártolo PJ. Traditional therapies for skin wound healing. *Adv Wound Care*. 2016; 5: 208-29.
36. Anlas C, Bakirel T, Ustun-Alkan F, Celik B, Baran MY, Ustuner O et al. In vitro evaluation of the therapeutic potential of Anatolian kermes oak (*Quercus coccifera* L.) as an alternative wound healing agent. *Ind Crop Prod*. 2019. 137: 24-32.
37. World Health Organization (WHO). Traditional Medicine Strategy: 2014–2023; World Health Organization: Geneva, Switzerland. 2013. [acesso 2021 dez 02] Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/92455/9789241506090_eng.pdf;jsessionid=3EEF37EEC1AE12ACD5DF9F8C103DBDDDB?sequence=1.

38. Chandel RS, Rastogi RP. Triterpenoid saponins and sapogenins: 1973–1978. *Phytochemistry*. 1980; 19: 1889-908.
39. Harbone J.B. *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plants analysis*. New York: Fakenham; 1973.
40. Nones J, Stipursky J, Costa SL, Gomes FCA. Flavonoids and astrocytes crosstalking: implications for brain development and pathology. *Neurochem Res*. 2010; 35: 955-66.
41. Soundarya PS, Sanjay V, Menon HA, Dhivya S, Selvamurugan N. Effects of flavonoids incorporated biological macromolecules based scaffolds in bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol*. 2018; 110: 74-87.
42. Bakhtiari M, Panahi Y, Ameli J, Darvishi B. Science direct protective effects of flavonoids against alzheimer's disease-related neural dysfunctions. *Biomed Pharmacother*. 2017; 93: 218-29.
43. Barreca D, Gattuso G, Bellocco E, Calderaro A, Trombetta D, Smeriglio A et al. Flavanones: citrus phytochemical with health-promoting properties. *Biofactors*. 2017; 43(4): 495-506.
44. Martens S, Mithöfer A. Flavones and flavone synthases [published correction appears in *Phytochemistry*. 2006; 67(5): 521]. *Phytochemistry*. 2005; 66(20): 2399-407.
45. Martens S, Preuss A, Matern U. Multifunctional flavonoid dioxygenases: flavonol and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* L. *Phytochemistry*. 2010; 71(10): 1040-9
46. Ahmad S, Alam K, Hossain MM, Fatima M. Anti-arthritis and cardioprotective action of hesperidin and daidzein in collagen-induced rheumatoid arthritis. *Mol Cell Biochem*. 2016; 423:115-27.
47. 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; 50:28.
48. 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.
49. Tree E, Nobakht M, Trueman SJ, Wallace HM, Brooks PR, Streeter KJ. Antibacterial properties of flavonoids from kino of the eucalypt tree, *Corymbia torelliana*. *Plants (Basel)*. 2017; 6:39.
50. Choi IY, Kim SJ, Jeong HJ, Park SH, Song YS, Lee JH et al. Hesperidin inhibits expression of hypoxia inducible factor-1 alpha and inflammatory cytokine production from mast cells. *Mol Cell Biochem*. 2007; 305: 153-61.

51. Huang TC, Tseng KY, Tsai SS, Liu HJ, Ho CT, Lin HY et al. Eriodictyol decreases very late antigen-4 (VLA-4) expression, cellular adhesion, and migration through an NF κ B-dependent pathway in monocytes. *J Funct Foods*. 2010; 2: 263-70.
52. Hu Q, Zhang DD, Wang L, Lou H, Ren D. Eriodictyol-7-O-glucoside, a novel Nrf2 activator, confers protection against cisplatin-induced toxicity. *Food Chem Toxicol*. 2012; 50: 1927-32.
53. Jing X, Ren D, Wei X, Shi H, Zhang X, Perez RG et al. Eriodictyol-7-O-glucoside activates Nrf2 and protects against cerebral ischemic injury. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013; 273: 672–9.
54. Johnson J, Maher P, Hanneken A. The Flavonoid, eriodictyol, Induces Long-term protection in ARPE-19 cells through Its effects on Nrf2 activation and phase 2 gene expression. *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 2009; 50: 2398.
55. Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Therapeut*. 2002; 96: 67-202.
56. 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.
57. 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.
58. Man MQ, Yang B, Elias PM . Benefits of hesperidin for cutaneous functions. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2019; 2019: 2676307.
59. 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-B/SMADS and ANG-1/TIE-2 signaling pathways. *EXCLI J*. 2018; 17: 399-419.
60. Singh WR, Devi HS, Kumawat S, Sadam A, Appukuttan AV, Patel MR et al. Angiogenic and MMPs modulatory effects of icariin improved cutaneous wound healing in rats. *Eur J Pharmacol*. 2019; 858: 172466.
61. Palungwachira P, Tanchaoen S, Phruksaniyom C, Klungsaeng S, Srichan R, Kikuchi K et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of anthocyanins extracted from *Oryza sativa* L. in primary dermal fibroblasts. *Oxid Med Cell Longev*. 2019; 31(2019):2089817.
62. 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): 146-155.

63. Lv P, Yu J, Xu X, Lu T, Xu F. Eriodictyol inhibits high glucose-induced oxidative stress and inflammation in retinal ganglial cells. *J Cell Biochem.* 2019; 120(4): 5644-56.
64. Matsuo M, Sasaki N, Saga K, Kaneko T. Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells. *Biol Pharm Bull.* 2005; 28(2), 253-9.
65. San Miguel SM, Opperman LA, Allen EP, Zielinski J, Svoboda KK. Bioactive antioxidant mixtures promote proliferation and migration on human oral fibroblasts. *Arch Oral Biol.* 2011; 56(8): 812-22.
66. Basso FG, Pansani TN, Turrioni AS, Bagnato VS, Hebling J, de Costa CA. In vitro wound healing improvement by low-level laser therapy application in cultured gingival fibroblasts. *Int J Dent.* 2012; 2012:719452.
67. Matos AA. Avaliação do efeito antiproliferativo da apocinina e diapocinina em células de osteossarcoma humano [tese de doutorado]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo; 2017.
68. Abbas MM, Al-Rawi N, Abbas MA, Al-Khateeb I. Naringenin potentiated β -sitosterol healing effect on the scratch wound assay. *Res Pharm Sci,* 2019; 14(6): 566–73.
69. Nanashima N, Horie K, Maeda H, Tomisawa T, Kitajima M, Nakamura T. Blackcurrant anthocyanins increase the levels of collagen, elastin, and hyaluronic acid in human skin fibroblasts and ovariectomized rats. *Nutrients* 2018; 10; 495.
70. Xie Y, Su N, Yang J, Tan Q, Huang S, Jin M, et al. FGF/FGFR signaling in health and disease. *Signal Transduct Target Ther.* 2020; 5:181.

Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de 2 anos após a data de defesa.

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 31 de março de 2022.

Flávia Theresa Soares de Castro Bione