

Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas - NUPEB
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia – BIOTEC

**Avaliação *in vitro* do efeito de 1,2,3-triazóis para
reparação tecidual**

Aluna: Fernanda Oliveira Gomes

Orientador: Laser Antônio Machado Oliveira

Coorientadora: Katiane de Oliveira Pinto Coelho Nogueira

OURO PRETO

2022

Fernanda Oliveira Gomes

**Avaliação *in vitro* do efeito de 1,2,3-triazóis para
reparação tecidual**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração: Biotecnologia aplicada à saúde humana e animal

**Orientador: Prof. Dr. Laser Antônio
Oliveira Machado**

**Coorientadora: Prof. Dra. Katiane de
Oliveira Pinto Coelho Nogueira**

OURO PRETO

2022

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

G633a Gomes, Fernanda Oliveira.

Avaliação in vitro do efeito de 1,2,3-triazóis para reparação tecidual.
[manuscrito] / Fernanda Oliveira Gomes. - 2022.
70 f.

Orientador: Prof. Dr. Laser Antônio Machado Oliveira.

Coorientadora: Profa. Dra. Katiane de Oliveira Pinto Coelho Nogueira.

Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde Humana e Animal.

1. Reparo Tecidual. 2. 1,2,3-triazóis. 3. Cicatrização. I. Nogueira, Katiane de Oliveira Pinto Coelho. II. Oliveira, Laser Antônio Machado. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 606:628

Bibliotecário(a) Responsável: Luciana De Oliveira - SIAPE: 1.937.800



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

Fernanda Oliveira Gomes

Avaliação in vitro do efeito de 1,2,3-triazóis para reparação tecidual

Dissertação apresentada ao Programa de Biotecnologia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Mestre

Aprovada em 28 de Setembro de 2022

Membros da banca

Doutor - Laser Antônio Machado Oliveira - Orientador (Universidade Federal de Ouro Preto)
Doutor - Breno de Mello Silva - (Universidade Federal de Ouro Preto)
Doutor - Gustavo Costa Bressan - (Universidade Federal de Viçosa)

Laser Antônio Machado Oliveira], orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 08/11/2022



Documento assinado eletronicamente por **Laser Antonio Machado Oliveira, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 10/11/2022, às 14:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0425455** e o código CRC **C4C13E90**.

DEDICATÓRIA

À Deus, por me amar o suficiente para não desistir.

Tua graça me basta. Teu amor me sustenta.

AGRADECIMENTOS

Tenho tanto para agradecer que com palavras é impossível expressar a minha gratidão. Começo reconhecendo que esse mestrado realizado na pandemia foi uma grande lição, diante o momento que nos colocou em situação de impacto em relação a muitas coisas que estão a nossa volta, fase difícil que trouxe vários gatilhos despertando sentimentos e emoções. Fase também que mostrou ainda mais o quanto precisamos da ciência, deixando bem claro sua importância nas nossas vidas e como nos ajuda a seguir em frente tornando tudo um pouco mais leve. Eu fico muito feliz e orgulhosa de poder contribuir com a ciência de alguma forma e por ter a oportunidade de procurar entender a natureza e a vida.

Agradeço ao professor Laser pelo convite do mestrado, pela confiança em mim depositada, pelas inúmeras lições, direcionamentos e todo aprendizado ao longo dessa trajetória. Expresso aqui meu sincero obrigada.

À Katiane, exemplo de mulher e profissional. Muito obrigada por todo cuidado diário, pelos cafés, conselhos, incentivos de leituras, motivações e por acreditar em mim.

À Miriam, exemplo de humildade, paciência e minha maior inspiração, quem ao longo de toda graduação me treinou com excelência, para trabalhos experimentais e resoluções de problemas. Todos seus ensinamentos compartilhados, em especial, o incentivo aos questionamentos, reflexões e críticas no desenvolvimento de projetos e estudos, nos quais fiz presente na minha caminhada. Com certeza sem você na minha trajetória tudo seria mais difícil, obrigada por tanto.

Ao amigo Crocco por ter me dado a primeira oportunidade de pesquisa, pelo apoio ilimitado e pela grande lição: “engrosse a casca”.

Ao Robson que não mediu esforços e sempre se fez instantâneo.

Agradeço aos queridos amigos que são verdadeiras joias para mim Talita, Lais, Thereza, Júlia, Carol, Camila, Vitor e Samuel.

À Lays, Rebeca, Jussara, Flávio, Rosana e Letícia por torcerem tanto para mim, em especial a Jesca que, mesmo não estando nesse plano, me motiva todos os dias a nunca desistir, essa vitória é nossa!

À Cinthya pela força, e por me ajudar enfrentar obstáculos e momentos difíceis. A memorável lição “todas as vezes que faz o certo você passa uma mensagem para quem faz errado, é possível fazer o certo. Ser honesto inevitavelmente vai incomodar os outros”.

Ao Alexandre, que sempre me acompanhou nessa caminhada demonstrando carinho, preocupações, sempre atencioso e disposto a me ajudar.

Aos professores pelos ensinamentos compartilhado, em especial Breno, Leandro, Leonardo, Camila e Glenda.

Aos colaboradores da limpeza e segurança do ICEB que se mantiveram presentes mesmo na pandemia e fizeram meus dias melhores com suas palavras e ações de amor.

Aos colegas de LNBIO que compartilharam o ambiente de trabalho comigo. E em especial à Iara que me ajudou com ideias e valiosas trocas.

Agradecimentos especiais

Aos meus pais pela vida e seus valores repassados. Agradeço a minha mãe, por ser o melhor exemplo de força, coragem, compaixão e servir ao próximo. Sua história sempre foi e será minha maior motivação. Ao meu pai, pelo exemplo de honestidade, humildade e esforço, e por me inspirar a nunca desistir dos meus sonhos.

À Deia, minha irmã gêmea, por me ensinar a dividir desde o ventre, por me motivar a viver intensamente, não me acomodar e superar meus limites sempre. E por me aproximar de Deus ainda mais nos momentos difíceis.

Ao Chico pelo apoio incondicional e equiparável, sem você seria mais difícil, obrigada de coração por tudo e tanto. Em especial, por acreditar em mim e ser essa pessoa incrível na minha vida, que o SOL sempre esteja no seu coração.

À Cyntia, pelo exemplo de profissional e ser humano. Pela sincera amizade e seu jeito único de tratar as pessoas tão bem. Aquela que tem um amor enorme pela educação, encantador de ver, e que me inspira ainda mais a amar o ensino e aumentar o brilho nos olhos por ele. Anjo que Deus me presenteou no momento certo.

Ao Valtemir pelo grande apoio e cuidado que sempre teve com minha família. Meu muito obrigada pela atenção e carinho.

Ao Tio Liliu e Thaynara que sempre fizeram parte da minha caminhada, e têm um lugar especial no meu coração.

À minhas origens, das quais tenho muito orgulho de suas trajetórias, eternos avós que guardo em memória Leonídio, Geraldo e Eni. À minha vovó, Neném, sua simplicidade que encanta, além de me ensinar a não reclamar mesmo nos momentos mais difíceis, a manter o sorriso no rosto sempre e amar na gratuidade.

À todos que me apoiaram de alguma forma. Muitíssimo obrigada, de coração.

RESUMO

O desenvolvimento biotecnológico da área de engenharia tecidual tem levado à expansão de novas possibilidades de pesquisas. Dentro desse âmbito, o processo reparatório é um mecanismo crucial para restabelecer a integridade do tecido lesionado e resgatar sua função. De forma simplificada, os fibroblastos atuam para restabelecer uma cascata de eventos que contribuem com o processo de reparo tecidual. Por outro lado, os estudos voltados para a melhoria de propriedades físico-químicas de materiais se tornaram o principal interesse nessa área, devido às crescentes aplicações clínicas de diferentes compósitos na reparação tecidual. Os compósitos 1,2,3- triazóis têm sido estudados como uma opção de substrato para cultivo de células, e, dentre as várias possibilidades, a interação direta das células com o substrato é uma variável importante a ser considerada. Tendo em conta esse objetivo, foi realizada uma cultura de fibroblastos 3T3 expostas a dosagens diferentes dos compostos triazólicos. Assim, no presente trabalho, procuramos entender qual é o papel dos compostos triazólicos no contexto da reparação tecidual. Para isso, células de fibroblastos de camundongos foram mantidas em cultura e expostas a concentrações diferentes de compostos 1,2,3- triazóis. A função dos compostos envolvidos no reparo foi avaliada inicialmente pelo ensaio de MTT. A avaliação do metabolismo, curiosamente, demonstrou o aumento da atividade metabólica celular. Posteriormente, a avaliação da viabilidade celular demonstrou, a princípio, uma biocompatibilidade composto-célula, não havendo alterações nesse processo. Desse modo, a avaliação em sequência da migração celular demonstrou um aumento no processo de fechamento da pseudo-ferida, *in vitro*. Além disso, a proliferação celular também foi mantida. Os compostos mostraram-se promissores agentes para o desenvolvimento de substâncias com propriedades farmacológicas cicatrizantes, já que podem otimizar eventos cruciais envolvidos no reparo tecidual, processo possivelmente relacionado com grupos químicos presentes nos compostos, como a cumarina e a ftalimida. Nossos resultados mostram o potencial biotecnológico de 1,2,3 triazóis para posterior aplicação comercial.

ABSTRACT

The biotechnological development of the tissue engineering area has led to the expansion of new research possibilities. Within this scope, the reparative process is a crucial mechanism to restore the integrity of an injured tissue and to rescue its function. In short, fibroblasts act to re-establish a cascade of events that contribute to the tissue repair process. On the other hand, studies aimed at improving the physicochemical properties of materials have become the main interest in this area, due to the increasing clinical applications of different composites in tissue repair. The 1,2,3-triazole composites have been studied as a substrate option for cell culture, and, among the many possibilities, the direct interaction of cells with the substrate is an important variable to be considered. Bearing this objective in mind, a culture of 3T3 fibroblasts exposed to different doses of triazole compounds was performed. Thus, in the present work, we seek to understand the role of triazole compounds in the context of tissue repair. For this purpose, mouse fibroblast cells were maintained in culture and exposed to different concentrations of the 1,2,3-triazole compounds. The function of the compounds involved in the repair was initially evaluated by the MTT assay. The metabolism assessment, interestingly, showed an increase in cellular metabolic activity. Subsequently, the evaluation of cell viability demonstrated, at first, a compound-cell biocompatibility, with no changes in this process. Thus, the sequential evaluation of cell migration demonstrated an increase in the process of closing the pseudo-wound, *in vitro*. In addition, cell proliferation was also maintained. The compounds showed to be promising agents for the development of substances with healing pharmacological properties, as they can optimize crucial events involved in tissue repair, a process possibly related to chemical groups present in the compounds, such as coumarin and phthalimide. Our results show the biotechnological potential of the 1,2,3 triazoles for further commercial application.

FINANCIAMENTO

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Neurobiologia e Biomateriais do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Crescimento do número correspondente de fibroblastos nas fases do processo de cicatrização.....	15
Figura 2: Arranjo do SRPIN340 e de compostos triazólicos usados neste trabalho.....	19
Figura 3: Estruturas químicas dos derivados de 1,2,3-triazólicos inspirados no SRPIN340.....	21
Figura 4: Atividade metabólica de 3T3 na presença de 1,2,3-triazóis.....	32
Figura 5: Viabilidade dos fibroblastos 3T3 em exposição a diferentes concentrações de compostos triazólicos.....	36
Figura 6: Aspecto dos fibroblastos expostos aos compostos (7, 15 e 34) e corados com azul de tripan após o tempo de 72h.....	37
Figura 7: Efeito da migração de fibroblastos mantidos em cultura, frente aos compostos em dosagens diferentes.....	38
Figura 8: Aspecto das fotomicrografias que permitem verificar a migração progressiva de células fibroblásticas.....	41
Figura 9: Proliferação de fibroblastos 3T3 em exposição a diferentes concentrações de compostos triazólicos.....	43
Figura 10: Diferentes momentos das capturas no ensaio de arranhão para rastrear a migração.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

μ L: microlitro

μ m: micrómetro

μ M: micromolar

μ mol/L: micromol por litro

CTCM: meio de cultura para células e tecidos

DMEM: meio de eagle modificado por dulbecco

DMSO: Dimetilsulfóxido

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

IL: interleucina

MEC: matriz extracelular

MTT: 3-[4,5-dimetiltiazol-2-]-2,5-difeniltetrazólio

nm: nanómetro

PBS: salina tamponada com fosfato

PDGE: fator de crescimento derivado de plaquetas

SFB: soro fetal bovino

SRPIN340: (N- [2- (piperidin-1-il) -5- (trifluorometil) fenil] -isonicotinamida)

SRPKs: proteínas quinase serina-arginina

TNF- α : fator de necrose tumoral

UFOP: universidade federal de ouro preto

US\$: dólar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Reparo tecidual	18
1.2 Processos envolvidos no reparo tecidual	19
1.3 Fibroblastos e sua dinâmica	21
1.4 Alternativas medicamentosas no auxílio ao reparo tecidual	23
1.5 SRPIN como inibidor modelo para a síntese de compostos para aplicação no reparo tecidual	24
1.6 Compostos triazólicos	25
2. OBJETIVO	29
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1. Reagentes	31
3.2. Meios de cultivo	31
3.3. Compostos triazólicos	32
3.4. Cultura de células 3T3	32
3.5. Ensaio de determinação da atividade metabólica <i>in vitro</i>	33
3.6. Ensaio de quantificação da viabilidade de células 3T3	34
3.7. Avaliação da migração por microscopia	34
3.8. Avaliação da proliferação <i>in vitro</i>	35
3.9. Análises estatísticas	35
4. RESULTADOS	37
4.1. Compostos triazólicos são capazes de aumentar atividade metabólica dos fibroblastos	37

4.2. Exposição com os 1,2,3-triazóis manteve a viabilidade celular, <i>in vitro</i>	40
4.3. A migração de fibroblastos 3T3 mantidos em cultura por 24h em exposição aos compostos altera o percentual de fechamento da pseudo-ferida..	42
4.4. Efeito dos compostos sobre a proliferação de fibroblastos, <i>in vitro</i> ...	47
5. DISCUSSÃO	51
5.1 Resposta da atividade metabólica frente à exposição de 1,2,3- triazóis	51
5.2 Influência dos 1,2,3 triazóis sobre a viabilidade, <i>in vitro</i>	52
5.3 Influência dos compostos triazólicos na migração celular	52
5.4 Influência dos compostos no processo de proliferação celular	55
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1. Introdução

1.INTRODUÇÃO

Do combate ao câncer à cicatrização de feridas, o processo de reparo tecidual é caracterizado por uma cadeia de eventos acompanhados por características diversas, tanto em indivíduos saudáveis quanto com doenças crônicas. Enquanto certas respostas requerem eventos naturais com a função de auxiliar a resgatar a integridade do tecido, outras dependem de estímulos externos. No contexto do reparo tecidual causado por procedimentos cirúrgicos, transplantes de órgãos, queimaduras, ferimentos e diversos outros danos, a proporção entre a reação do organismo à existência de micro-organismos e o reparo tecidual determina o curso da infecção e o estabelecimento de patologias. Em todos os casos, o papel do reparo celular é de crucial importância para o restabelecimento da função do tecido e para resgate da saúde do indivíduo. Dessa forma, a investigação de novos compostos pode contribuir com novas possibilidades na área de tratamentos para reparo tecidual. Atualmente, os custos financeiros demandados por políticas e programas de saúde têm sido cada vez maiores devido aos altos índices de doenças crônicas não transmissíveis, como diabetes e obesidade, além do envelhecimento da população e de diversas infecções de difícil tratamento (WILLIAMS *et al.*, 2018; BLAIR *et al.*, 2020). Esse cenário amplia a atenção para as feridas crônicas, que representam um grande fardo para muitos desses pacientes, especialmente considerando que outras condições subjacentes, que incluem desnutrição, estresse e síndrome metabólica, os predisõem a condições patológicas complicadoras do reparo tecidual. As feridas crônicas são assim classificadas quando não progredem no processo normal de cicatrização e permanecem abertas por mais de um mês. Além disso, se as feridas agudas não forem tratadas no tempo certo, podem se transformar em feridas crônicas. Nesse sentido, essa patologia representa uma preocupação crescente para a saúde e a economia global, já que, associado a ela, podem ser desenvolvidas infecções graves, que demandam custos ambulatoriais e hospitalares (NUSSBAUM *et al.*, 2018).

Além dos impactos econômicos e clínicos, as feridas crônicas também apresentam implicações sociais, uma vez que as cicatrizes e as preocupações funcionais e estéticas associadas causam déficits funcionais, emocionais e psicológicos (NEIL, 2004). Ainda, a falta de acesso a cuidados especializados de feridas pode resultar em amputações e perda de produtividade no trabalho (JÄRBRINK *et al.*, 2017). Portanto, o tratamento de feridas centrado no paciente tem se focado principalmente na qualidade de vida, minimização de dor, adesão e enfrentamento (CORBETT; ENNIS, 2014). Considerando essa

abordagem, espera-se que o mercado anual de produtos para o cuidado de feridas alcance US \$ 15–22 bilhões até 2024 (SEN, 2019), fato que destaca a importância de pesquisas relacionadas às feridas crônicas, especialmente em busca de conforto aos pacientes acometidos.

1.1 Reparo tecidual

O reparo tecidual é definido como uma primorosa e coordenada cascata de eventos celulares, moleculares e bioquímicos que interatuam, a fim de que aconteça a reconstituição tecidual. O processo cicatricial é trivial a todos os ferimentos, independentemente da fonte que a formou, é sistêmico e dinâmico e apresenta-se bem associado às situações gerais do organismo (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007). Evolutivamente, a cicatrização é um processo universal nos organismos vivos, que inclui uma comunicação complexa de componentes (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). Respostas ao reparo envolvem uma série de moléculas e células distintas, desde fatores de crescimento e citocinas até fibroblastos, macrófagos e outras.

A lesão tecidual é o impulso primordial para o processo de cicatrização, ou seja, a cicatrização de feridas é a reação biológica à lesão do tecido, e se inicia com padrões específicos que levam ao processo de recrutamento de células e modificações teciduais (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Com o andamento da cicatrização, tem-se a redução tecidual, com toda a fisiologia do organismo voltada em direção ao reparo (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

Apesar do processo de reparação ser direcionado à resolução da lesão, a resposta do organismo muda muito conforme o ambiente tecidual, além de ser frequente a exposição à entrada de microrganismos. Assim, o tipo de resposta é distinto dependendo do ambiente tecidual presente em uma situação de injúria, sendo que, por exemplo, ambientes com a presença de determinados compostos tendem influenciar no processo.

1.2 Processos envolvidos no reparo tecidual

No contexto da lesão tecidual, a dinâmica das fases de reparo é elementar em direção a eventos celulares resultantes do estímulo celular por reguladores químicos (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

Na lesão de pele, a cicatrização da ferida pode ser dividida em três estágios sobrepostos: fase inflamatória, fase proliferativa e fase de maturação (Figura 1).

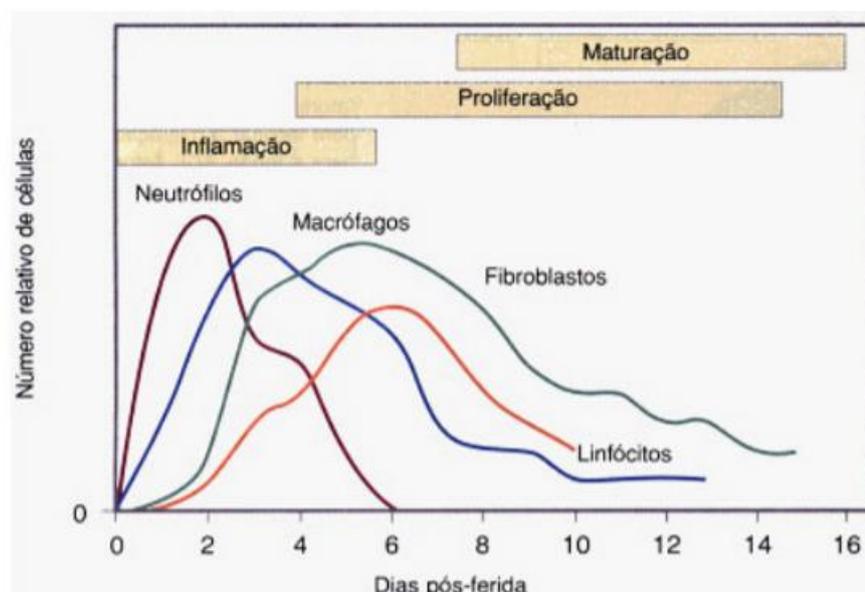


Figura 1: Crescimento do número correspondente de fibroblastos nas fases do processo de cicatrização. A cicatrização da ferida e seus três estágios sobrepostos: fase inflamatória, fase proliferativa e fase de maturação. Fonte: TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008.

A fase inflamatória inicia no momento da lesão. O sangramento traz consigo plaquetas, hemácias e fibrina selando as bordas da ferida (TAZIMA; VICENTE, YAMVA; MORIYA, 2008). Em especial, as plaquetas provisoriamente estabelecem coágulos formando uma barreira impermeabilizante que protege da contaminação (LEFKOVITS, JEFFREY; PLOW, EDWARD F.; TOPOL, 1995).

As plaquetas estimulam a cascata de coagulação e grânulos são liberados delas contendo fator de crescimento de transformação beta-TGF- β (e também fator de crescimento derivado das plaquetas PDGF, fator de crescimento derivados dos fibroblastos FGF, fator de crescimento epidérmico EGF, prostaglandinas e tromboxonas), que atraem neutrófilos à ferida (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006). Esses mediadores liberados pelas plaquetas ativadas, como TGF- β , PDGF se difundem pela

matriz provisória formando um gradiente quimiotático que orienta a migração das células envolvidas com a instalação da resposta inflamatória.

A proliferação é encarregada pelo "fechamento" da ferida (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003). A fase proliferativa é composta de três eventos relevantes: epitelização, fibroplasia e neo-angiogênese, e nessa trajetória a fase proliferativa é o sinal inicial da formação da cicatriz (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

Em uma revisão, Balbino e colaboradores (2005) descrevem as etapas da proliferação, com a presença de macrófagos provenientes de monócitos e a produção e disponibilização dos mediadores químicos feitos por eles, assim a migração e ativação de fibroblastos é otimizada e eles desempenham um papel crucial durante o reparo fisiológico e patológico. Informações coletivas de estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que a interação fibroblasto-macrófago está no centro da fisiopatologia do reparo tecidual (SCHUSTER *et al.*, 2021). Os fibroblastos são células centrais do tecido de granulação, após a influência de mediadores e dos fatores de crescimento. Após ativados, os fibroblastos migram no sentido ao centro da ferida. No período inicial de 24 a 36 horas depois da lesão, fatores de crescimento epidérmicos estimulam a proliferação de células do epitélio, ou seja, a epitelização (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008). Esse movimento acontece pela matriz provisória formada, que responde no sentido de elementos quimioatraentes e de gradiente químico. Com o aumento do percentual de fibroblastos ativados, no sentido de produzir colágeno no local, a matriz extracelular dá início a sua substituição por um tecido conjuntivo mais forte e mais elástico. Esse processo é designado de fibroplasia e, para sua eficácia, é essencial a ocorrência simultânea da geração de novos vasos sanguíneos, ou seja, é necessária a neo-angiogênese na região (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). Nesse último evento da proliferação tem-se o sistema de desenvolvimento de novos vasos sanguíneos alicerçados aos já existentes. A organização é vital, a fim de suprir oxigênio e nutrientes, para cicatrizar a ferida.

A fase de maturação é caracterizada pela deposição organizada de colágeno. A ferida sofre um processo de contração, por meio de um movimento centrípeto de toda a espessura da pele circundante, reduzindo a quantidade e o tamanho da cicatriz desordenada. Este processo é um importante aliado da cicatrização das feridas, principalmente nas abertas. Porém, se ocorre de forma exagerada e desordenada causa defeitos cicatriciais importantes por causa da diferenciação dos fibroblastos em

miofibroblastos, estimulados por fatores de crescimento (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008). A remodelação é o estágio final da cicatrização da ferida, começando várias semanas após a lesão e durando até 2 anos. Durante este período, as taxas de síntese e degradação de colágeno se igualam, e o colágeno tipo III é substituído pelo colágeno tipo I. As fibras de colágeno se organizam e se reticulam, reforçando ainda mais a ferida (FERNEINI; HASHIM, 2018). A resistência à tração da ferida aumenta gradualmente com o tempo. Em 3 semanas, a ferida atingiu 20% de sua força total (MORTON; PHILLIPS, 2016). A cicatrização tem sucesso quando há equilíbrio entre a síntese da nova matriz e a lise da matriz antiga, havendo sucesso quando a deposição é maior (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007).

Nesse âmbito, os fibroblastos são essenciais em todas as três fases, exercendo um papel fundamental na deposição de integrantes da matriz extracelular (MEC), movimento de contração da ferida e remodelação da nova MEC (DESJARDINS-PARK; FOSTER; LONGAKER, 2018). Vistos os mecanismos de ações desses eventos é possível concluir que a presença dos fibroblastos, em dado tecido, contribui significativamente para o resultado do processo de restabelecimento do tecido.

1.3 Fibroblastos e sua dinâmica

Os tecidos conjuntivos são dirigentes à determinação e manutenção da forma do corpo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Além disso, fornecem a estrutura de apoio e conexão para todos os demais tecidos do corpo. Também são compostos por células e matriz extracelular, que tem como característica uma combinação de colágenos, glicoproteínas não colagenosas e proteoglicanos que circundam as células do tecido conjuntivo, as quais têm papéis importantes no armazenamento de metabólitos, respostas imunológicas e no reparo tecidual após lesões (KIERSZENBAUM; TRES, 2012).

No contexto do processo de cura, no final da fase inflamatória e no início da fase proliferativa, entre 24 à 48 horas depois da lesão, os primeiros fibroblastos dirigem-se ao local da lesão (BAINBRIDGE, 2013). As células do tecido conjuntivo estão diretamente envolvidas na reparação tecidual e têm por indispensável função a manutenção da integridade do tecido conjuntivo, através da síntese dos elementos da matriz extracelular. Possuem características de adaptabilidade, da qual são capazes de modular seu metabolismo, que reflete na sua morfologia (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Este é um aspecto importante das respostas para muitos tipos de danos. Os fibroblastos alteram

suas características em resposta aos sinais químicos e físicos, quando o tecido é lesado, e os que se encontram nas proximidades proliferam e migram para a ferida e fazem quantidades relevantes de matriz rica em colágeno, a qual auxilia no isolamento e na reparação do tecido lesado (ALBERTS *et al.*, 2017). Além de orientar o processo de contração da ferida, conduz ao ressecamento da sua crosta superficial, que com a desidratação reduz de tamanho e arrasta o tecido (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). Distante de ser apenas produtor de colágeno, o fibroblasto produz elastina, fibronectina, glicosaminoglicana e proteases. Essas moléculas são responsáveis pelo desbridamento, no qual temos a remoção de qualquer tipo de carga biológica da ferida e remodelamento fisiológico do dano (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003). Não menos relevante que o papel mecânico, o tecido conjuntivo também contém os vasos sanguíneos condutores de oxigênio e nutrientes dos quais dependem as células (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

As diversas funções dos fibroblastos dependem de sinais existentes nos meios extracelulares, incluindo fatores de crescimento. O perfil de liberação de vários fatores de crescimento é considerado importante durante as diversas fases da cicatrização de feridas, auxiliando no recrutamento de células e na produção de colágeno (RAVI; SANTHANAKRISHNAN, 2020). O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) é um dos numerosos fatores de crescimento que regulam o crescimento e a divisão celular. Esse fator é produzido pelas plaquetas bem como macrófagos, células endoteliais. Por exemplo, a presença de fator de crescimento derivado de plaquetas induz nessa célula um fenótipo associado à proliferação e quimiotaxia de fibroblasto. A presença de outros fatores de crescimento, também induz respostas voltadas à proliferação deles, assim como outros mitogênicos, quimiotáticos, produção de matriz extracelular, angiogênese e a proliferação de células endoteliais (GEORGE BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006). Dessa forma, o papel do fibroblasto no reparo resulta em intensa atividade metabólica, proliferativa e migratória.

Visto a capacidade regenerativa promovida por um conjunto de células, não é de surpreender o importante papel dos fibroblastos para restabelecer uma cascata de eventos que contribui com o processo de reparo tecidual. Para tanto, voltamos o foco para os fibroblastos, já que são as principais células conjuntiva envolvidas no reparo tecidual sendo células centrais no processo de cicatrização.

1.4 Alternativas medicamentosas no auxílio ao reparo tecidual

Apesar da cicatrização ser uma resposta natural de cura do corpo para restabelecer a integridade do tecido após uma lesão (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015), nem sempre esse processo ocorrerá com eficácia, desencadeando feridas que não cicatrizam e feridas crônicas.

Nesse cenário, o uso de compostos naturais e sintéticos (derivados ou não de compostos naturais), representam uma opção para o tratamento de feridas, estimulando significativamente alguns eventos críticos da cicatrização, bem como os processos de proliferação, migração e adesão celular (CHOUHAN; MANDAL, 2020). E considerando algumas estratégias para tratamento de lesão tecidual no mercado tem se disponível algumas alternativas de produtos para cicatrização, como pomadas e géis a maioria apresenta faixas de tempo similares em torno de vários dias para alcançar o resultado. Porém é muito importante otimizar o processo para reduzir o tempo de cicatrização conservando a integridade do tecido, conseqüentemente, reduzindo a chance de infecção ou desenvolvimento de doenças associadas a comorbidades como diabetes e úlceras, cujas quais dificulta o processo de cicatrização.

Dentre os compostos naturais, inúmeras plantas são utilizadas para desenvolver medicamentos e para a extração de compostos ativos, a exemplo dos fotoquímicos bioativos e óleos essenciais que auxiliam na cicatrização (ARTEM ATAIDE et al., 2018 ; IBRAHIM et al., 2018). Também se tem aplicação tópica de peptídeos sinalizadores, os quais desencadeiam uma cascata de sinalização e estimulam a produção de colágeno de fibroblastos, a proliferação de elastina, fibronectina, laminina e outras biomoléculas (SKIBSKA; PERLIKOWSKA, 2021). Entre os compostos sintéticos, se tem material curativo para melhora de fechamento de feridas, assim como estratégia para o reparo sem cicatriz (ZHANG et al., 2021). Portanto, a busca para novos medicamentos tem incluído um amplo espectro de possibilidades, que atribuem inumeráveis propriedades para otimizar o reparo tecidual.

1.5 SRPIN como inibidor modelo para a síntese de compostos direcionados ao reparo tecidual

As proteínas quinases serina-arginina (SRPKS) podem ter alterações na sua atividade que resultam em reações celulares inadequadas, as quais estão relacionadas à multiplicação celular de diversos exemplos de câncer. Dessa forma, as SRPKS tornam-se alvo molecular para se pesquisar compostos antitumorais. Baseado nessa proteína, temos a substância SRPIN340 (N- [2- (piperidin-1-il) -5- (trifluorometil) fenil] -isonicotinamida) (Figura 2), que é um inibidor altamente seletivo de SRPKS (SIQUEIRA *et al.*, 2015). A partir dela, foram sintetizados novos compostos triazólicos, inspirados nesse inibidor (SOUSA *et al.*, 2021).

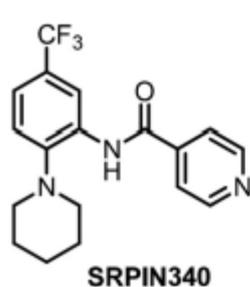


Figura 2: Arranjo do SRPIN340 e dos compostos triazólicos usados neste trabalho. Fonte: SOUSA, *et al.*, 2021.

Tal arranjo, bem como seus derivados, têm mostrado diversas atividades biológicas semelhantes, incluindo efeitos antimetastáticos em diferentes modelos de células leucêmicas (SIQUEIRA *et al.*, 2015), atribuindo exclusividade ao nosso grupo de pesquisa ao investigar novas funções de tais compostos. Além do SRPIN340, também temos relatos da investigação de efeitos da atividade reparadora dos compostos 1,2,3-triazólicos-1,4-dissubstituídos (SOUSA *et al.*, 2021).

Analisando as propostas iniciais, vislumbrou-se que compostos provenientes da associação entre uma subunidade 1,2,3-triazol-1,4- dissubstituída (representada em vermelho na Figura 2) e um fragmento trifluorometilfenil indicando um substituinte nitrogenado na posição 4 em relação ao grupo CF₃ (fragmento inspirado no SRPIN340 representado em azul na Figura 2) poderiam apresentar outras atividades biológicas,

devido a presença de grupos químicos que apresentam papéis biológicos importantes no metabolismo celular.

Assim, os resultados iniciais de tais trabalhos nos intrigaram a investigar qual seria o papel dos novos 1,2,3-triazóis-1,4-disubstituídos ao decorrer da cicatrização, *in vitro*. Para tanto, voltamos o foco para a avaliação desses compostos nas atividades celulares de fibroblastos.

1.6 Compostos triazólicos

Com o avanço recente nas pesquisas com derivados de triazóis abre-se um leque para investigações, já que seu significado biológico vem sendo mostrado em vários trabalhos de desenvolvimento de novos compostos relacionados à porção do anel triazol. Alguns estudos demonstram uma relação entre novos derivados triazólicos envolvidos em várias atividades farmacológicas, mostrando sua importância como agentes antimicrobianos, antiinflamatórios, hipoglicêmicos, antidepressivos, antituberculares, analgésicos, antimaláricos e anticâncer (SINGHAL *et al.*, 2011).

Em trabalho recente, uma série inédita de trinta derivados 1,2,3-triazólicos, inspirados no SRPIN340, foi preparada (SOUSA *et al.*, 2021). Um aspecto a ser destacado nessa inédita síntese é que os compostos **7**: 2-((1-(2-morfolino-5-(trifluorometilfenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil) isoindolina-1,3-diona, **15**: 2-((1-(2-piperidin-1-il)-5-(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil isoindolina-1,3-diona e **34**: (1-(2-morfolina-5-(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil 2-oxo-2H-benzopirano-3-carboxilato apresentam como características estruturais comuns a presença das subunidades piperidinila ou morfolinila além de grupos carbonilados (ftalimida e cumarina).

Essas características estruturais evidenciam o potencial desses compostos em aumentar a viabilidade celular, conforme evidenciado no trabalho de Sousa (2021). Além disso, deve ser destacado que a marcante atividade de aumento de viabilidade celular exibida pelos compostos é atrativa, uma vez que essa bioatividade pode ser útil no desenvolvimento de substâncias com propriedades cicatrizantes.

Nesse contexto, os compostos 7, 15 e 34 (Figura 3) apresentam grupos carbonilados, que são um dos mais importantes grupos funcionais responsáveis por reações biológicas e sintéticas (SINGHAL, *et al.*, 2011; DIAS *et al.*, 2021). Os compostos

7 e 15 apresentam o grupo ftalimida, já o composto 34 apresenta a cumarina associada à sua estrutura.

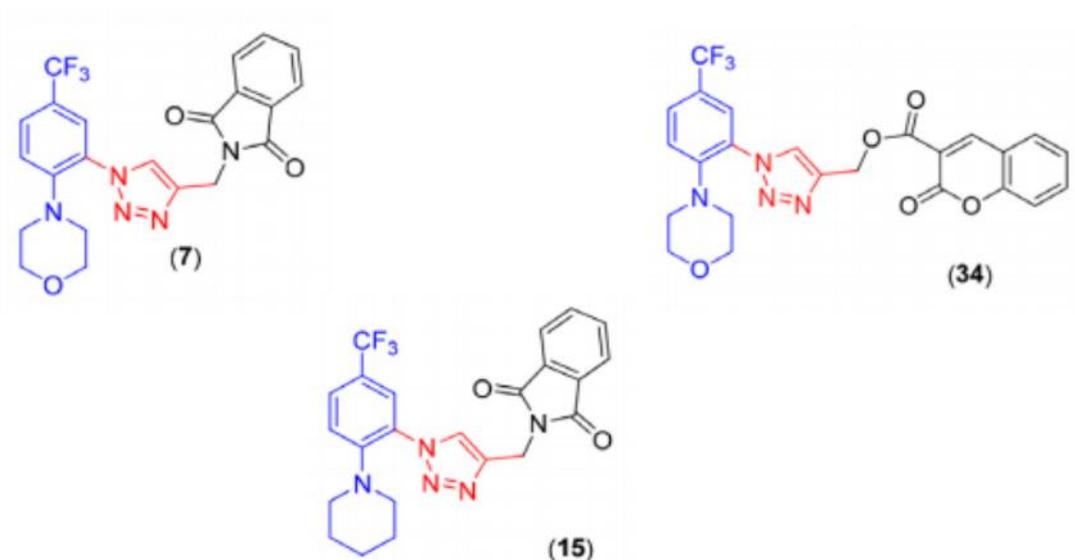


Figura 3. Estruturas químicas dos derivados de 1,2,3-triazólicos inspirados no SRPIN340. As porções destacadas em azul correspondem aos fragmentos 4-trifluorometilfenil contendo substituintes amino enquanto os destaques em vermelho correspondem às porções 1,2,3-triazólicas-1,4-dissubstituídas. Fonte: (SOUSA, 2021).

Tendo em consideração que o reparo celular é importante para restabelecer a integridade do tecido lesionado, resgatando sua função, a busca para entender tanto a ação de compósitos, quanto dos mecanismos envolvidos no processo, torna-se fundamental. Além disso, estudos como esses são essenciais na área da biomedicina e trabalhos voltados para a melhoria das propriedades físico-químicas de materiais são interessantes, em razão de progressivos destinos clínicos dos compósitos no reparo celular.

Atualmente, a relevância das alterações nas proteínas SRPKS em diversos tipos de câncer têm sido demonstradas por muitos estudos. Sabe-se que essas proteínas podem sofrer alteração na sua atividade, resultando em respostas celulares inadequadas que estão relacionadas à multiplicação celular nos processos tumorais. Nesse contexto, o inibidor SRPIN340, altamente seletivo para essas proteínas, tem se tornado alvo molecular para o estudo de compostos antitumorais. Estudos realizados por parceiros do nosso grupo de pesquisa demonstraram que compostos 1,2,3-triazóis (baseados no inibidor SRPIN340) não apresentaram os efeitos anti-proliferação celular desejados, e, ao contrário, levaram ao aumento da atividade metabólica celular, *in vitro*.

Nesse sentido, os compostos 1,2,3-triazóis mostram-se promissores para promover o crescimento celular durante os processos de reparo tecidual. Desse modo, esse trabalho propõe avaliar o efeito dos compostos triazólicos sobre os processos de reparo tecidual em cultura. Essa análise permite não só o entendimento dos mecanismos envolvidos, associados ou não ao reparo celular, assim com a investigação de novas formas para otimizar o reparo tecidual.

2. Objetivo

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliação *in vitro* do efeito de 1,2,3-triazóis para reparação tecidual.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Investigar o papel de diferentes concentrações dos 1,2,3-triazóis na atividade metabólica de fibroblastos da linhagem 3T3.
- ✓ Avaliar, *in vitro*, os efeitos dos compostos triazólicos em diferentes dosagens sobre a viabilidade e a morte celular.
- ✓ Investigar o papel dos compostos, em diferentes concentrações, na migração celular, *in vitro*.
- ✓ Avaliar o efeito de diferentes concentrações de 1,2,3-triazóis sobre a proliferação de fibroblastos da linhagem 3T3.

3. Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes

Garrafas, placas de cultura e tubos de fundo cônico foram obtidos da Sarstedt (Nümbrecht, Alemanha). DMEM, L-glutamina, penicilina-estreptomicina, azul de tripan e tripsina foram obtidos da Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brasil). O soro fetal bovino (SFB) foi obtido da Cultilab (Itapavi, SP, Brasil) e o bicarbonato de sódio da empresa Neon. O dimetilsulfóxido (DMSO) e o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) foram obtidos da LGC Biotecnologia (Cotia, SP, Brasil). O 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT) foi obtido da Life Technologies Corporation (Eugene, OR, EUA). O Cloreto de Sódio P.A foi obtido da Synth, Fosfato de Sódio Dibásico Anidro P.A. da Vetec, e Cloreto de potássio P.A. e Fosfato de Potássio Monobásico P.A. da Biotec Reagentes Analíticos.

3.2. Meios de cultivo

O meio de cultivo para as células 3T3 foi obtido conforme descrito na literatura, com algumas alterações (TODARO; GREEN, 1963). Os fibroblastos foram cultivados em meio de cultura para células e tecidos (CTCM) composto por DMEM enriquecido com 10% SFB, bicarbonato de sódio, glutamina (2 mM), 1% de penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (0,1mg/mL) pH 7,2 a 37°C/5% CO₂. A cada três dias, o sobrenadante de cultura foi centrifugado a 210xg/10 min 4 °C. As células foram cultivadas em garrafa de 75 cm², atingindo o ponto de confluência dentro de três dias. As células foram repicadas ao atingirem a confluência de 80-90%, para renovar o meio e garantir a viabilidade celular.

O meio para a migração celular foi composto por DMEM enriquecido com 2% SFB (DAS; EGGERMONT; TEN HAGEN, 2015), bicarbonato de sódio, glutamina (2 mM), 1% de penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (0,1mg/mL) pH 7,2 a 37°C/5% CO₂.

Todas as soluções utilizadas para cultivo e manutenção das culturas de fibroblastos foram esterilizadas em membrana Millipore 0,22 µm.

3.3. Compostos triazólicos

Os compostos triazólicos (inibidores das proteínas SRPKS) 2-((1-(2-morfolino-5-(trifluorometilfenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)isoindolina-1,3-diona (7); 2-((1-(2-piperidin-1-il)-5-(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil isoindolina-1,3-diona (15); (1-(2-morfolina-5-(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil 2-oxo-2H-benzopirano-3-carboxilato (34) foram obtidos do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa (Minas Gerais, Brasil), a partir da síntese orgânica realizada pelo Prof. Róbson Ricardo Teixeira.

O protocolo de síntese foi descrito por Souza (2021), que brevemente preparou as substâncias por meio de uma rota sintética de quatro etapas. Inicialmente a substância 4-fluoro-3-nitro-1-trifluorometil benzeno foi submetida a reações de substituição nucleofílica aromática com aminas apropriadas (PRODUTOS I). Em seguida, o grupamento nitro dos compostos I foi reduzido a grupo amina (NH₂) empregando cloreto de estanho (II) e HCl (PRODUTOS II). Na etapa seguinte, os PRODUTOS II, via reação de diazotização, foram convertidos nas correspondentes azidas (PRODUTOS III). Na última etapa, a reação CuAAC entre as azidas III e alquinos terminais apropriados forneceu os compostos investigados no presente trabalho.

A princípio foi preparada uma amostra estoque de 5000 µmol/L para cada composto, diluídos em PBS e 20% DMSO. Posteriormente, foi realizada uma nova diluição para o experimento nas concentrações de 50, 100 e 150 µmol/L para cada composto (7,15 e 34).

3.4. Cultura de células 3T3

Os fibroblastos (células da linhagem 3T3) são células imortalizadas de embriões de camundongos Swiss Albino, conforme estabelecidas por Todaro e Green (1963). As células foram fornecidas pelo professor Dr. Jônatas Santos Abrahão do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC, Arlington, VA).

As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM enriquecido com 10% SFB, glutamina (2 mM), 1% de penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (0,1mg/mL) (Tabela 1), pH 7,2 a 37°C/5% CO₂. Para os demais experimentos, as células foram expandidas e cultivadas. Ao atingir 80 a 90% de confluência, a cultura foi lavada em

salina tamponada com fosfato (PBS produzido com Cloreto de Sódio 137mM, Cloreto de potássio 2,7mM, Fosfato de Sódio Dibásico Anidro 10mM e Fosfato de Potássio Monobásico 2mM). Após a lavagem, as células foram desprendidas da garrafa usando Tripsina-EDTA (0,25%, 5g/L-2g/l) e foram incubadas a 37°C/5% CO₂, durante 10 minutos. A neutralização foi feita com 4 vezes o volume dela, com meio DMEM suplementado. As células foram lavadas uma vez (centrifugação a 210xg/ 10 min/4°C) em meio de cultura normal, pH 7,2, ressuspensas em meio DMEM suplementado, e então contadas, tendo sua concentração ajustada segundo a necessidade para os procedimentos experimentais.

3.5. Ensaio de determinação da atividade metabólica *in vitro*

Para avaliar o efeito das doses de compostos triazólicos sobre a atividade metabólica de células 3T3, foram realizados ensaios de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difeniltetrazólio), um sal tetrazólio de cor amarela que, quando metabolizado, forma cristais de formazan de cor azul (MOSMANN, 1983). O mecanismo envolve a atividade da enzima succinato desidrogenase existente nas mitocôndrias, permitindo quantificar a porcentagem de células metabolicamente ativas, uma vez que as células ativas são capazes de converter MTT em formazan (BERNAS, TYTUS; DOBRUCKI, 2002).

A suspensão de células 3T3 foi distribuída em placas de 96 poços (1,5x10⁴ células/poço) na ausência e na presença de compostos diluídos em meio para células nas concentrações de 50, 100, 150 µmol/L (SOUSA, 2021). Como controle, as células foram incubadas na presença de meio para 3T3 e DMSO correspondente a 100% de atividade metabólica. As placas foram incubadas por 24h, 48h e 72h a 37°C/5% de CO₂.

Após os diferentes tempos, retirou-se o meio de cultura e foram adicionados 150µL de MTT (0,5 mg/mL) a cada poço, seguido de incubação *overnight* a 37°C. A solução de MTT foi retirada e 100 µL de DMSO foram adicionados por poço para solubilizar os cristais de formazan. Após 1 hora, a quantidade de formazan gerado foi mensurada pela leitura da absorbância a 530 nm em leitor de microplacas (VICTOR™ X3, PerkinElmer). Os resultados foram normalizados considerando as culturas tratadas com 0,6% de DMSO (controle). O metabolismo foi considerado 100% para o controle, e os resultados das demais doses foram submetidos a análises estatísticas.

3.6. Ensaio de quantificação da viabilidade de células 3T3

Para avaliação do efeito dos compostos sobre a viabilidade das células foram realizadas contagens na presença ou na ausência dos novos triazóis. Utilizando-se placas de 24 poços. Para as capturas usou-se aumento de 10X e fez-se captura de dez campos de cada poço. As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado contendo, ou não, compostos nas concentrações de 50, 100, 150 $\mu\text{mol/L}$. O plaqueamento foi iniciado com $2,5 \times 10^3$ células/poço e mantidos a 37°C com 5% de CO_2 com meio DMEM suplementado com 10% SFB. A viabilidade foi obtida por contagem do número de células após 72h. Desprezou-se o sobrenadante, lavou-se os poços com PBS-1%, transferiu-se 100 μL de azul de tripan, durante 5 minutos. Em seguida, lavou-se os poços para retirar o corante e finalizamos com as capturas de imagens para contagem. Os resultados foram expressos em números percentuais de viabilidade celular.

3.7. Avaliação da migração por microscopia

A migração celular foi avaliada seguindo instruções da nossa padronização conforme descrito por Hulkowerb e Herber (2011), utilizando-se a técnica de ensaio de raspagem *in vitro* (LIANG; PARK; GUAN, 2007).

Os efeitos dos novos 1,2,3-triazóis sobre a migração celular foram observados tanto na presença quanto na ausência dos compostos. Para isso, foi necessário mimetizar a migração *in vitro*. Utilizou-se placas de 24 poços. As células foram plaqueadas (1×10^5 células/poço) e mantidas a 37°C com 5% de CO_2 , durante 24h. Em seguida, foi realizada uma pseudo-ferida com auxílio de uma ponteira para micropipetas de 200 μL (Kasvi), todos os poços foram lavados com o próprio meio e o sobrenadante da cultura foi descartado cautelosamente. Posteriormente, além do controle, foi adicionado meio com 2% SFB contendo os compostos em todas as doses testadas. As capturas foram realizadas em microscópio óptico (MOTIC, modelo AE2000) associados a uma câmera (AMSCOPE, modelo MU300) em objetiva de 10X. Realizou-se análise do ensaio da raspagem pelo programa ImageJ, que permite calcular a área das feridas ao longo dos tempos de 0h, 6h, 12h e 24h após o arranhão (pseudo-ferida) (JUSTUS, et al.,2014).

3.8. Avaliação da proliferação *in vitro*

Para avaliação do efeito dos compostos sobre a sobrevivência e o crescimento celular, foram realizadas contagens, na presença ou ausência dos compostos triazólicos. Utilizando-se placas de 24 poços. Para as capturas usou-se aumento de 10X e fez-se captura de dez campos de cada poço. As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado contendo, ou não, compostos nas concentrações de 0, 50, 100, 150 μM . O plaqueamento foi iniciado com $2,5 \times 10^3$ células/poço e mantidos a 37°C , 5% de CO_2 com meio DMEM suplementado com 10% SFB. Realizou-se a contagem do número de células, avaliando a quantidade de células após 24h e 72h. Os resultados foram expressos em números de células por campo.

3.9. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas com o software GraphPad Prism 5.0.3. Uma análise de variância (ANOVA) foi utilizada para determinar as diferenças estatísticas seguida do pós teste de Dunnet sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$.

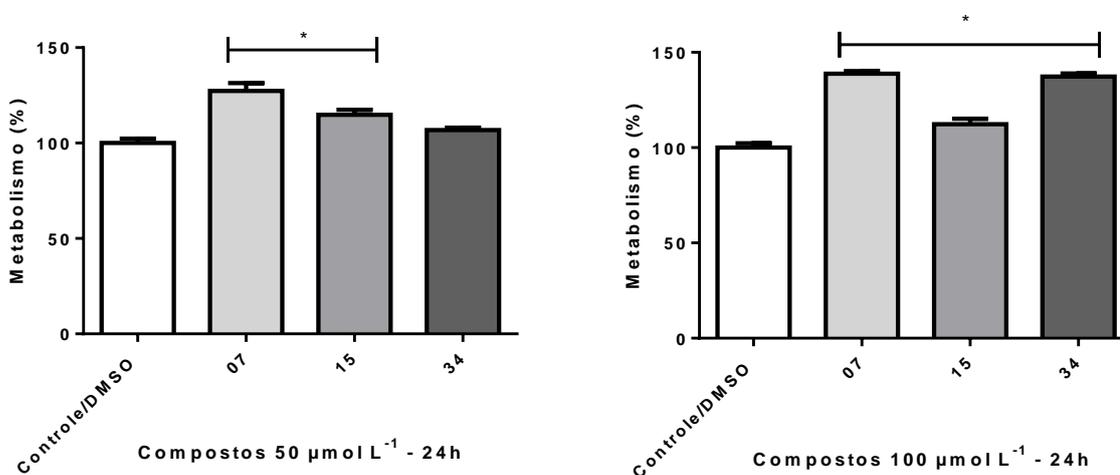
4. Resultados

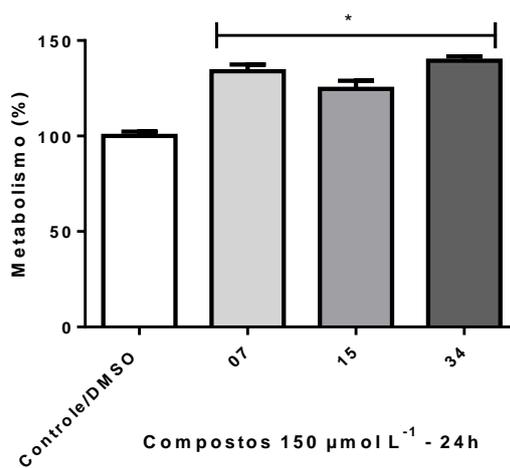
4. RESULTADOS

4.1. Compostos triazólicos são capazes de aumentar atividade metabólica dos fibroblastos

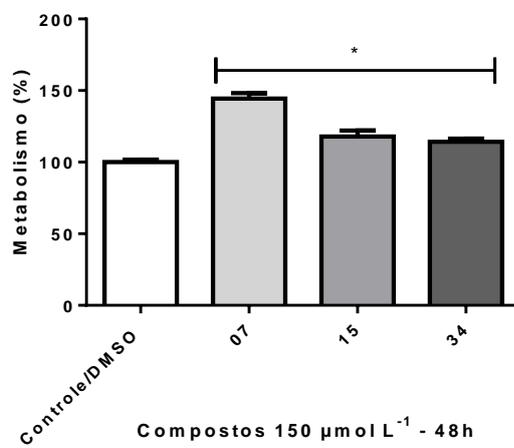
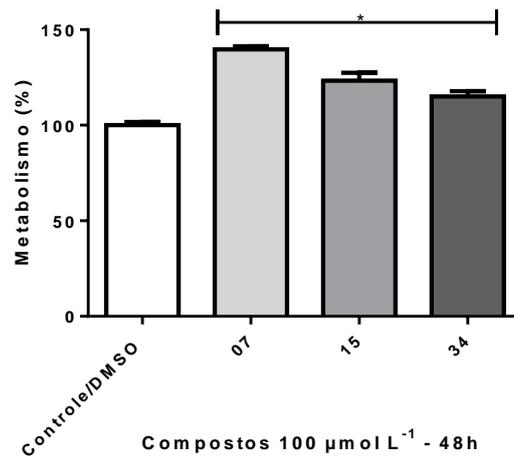
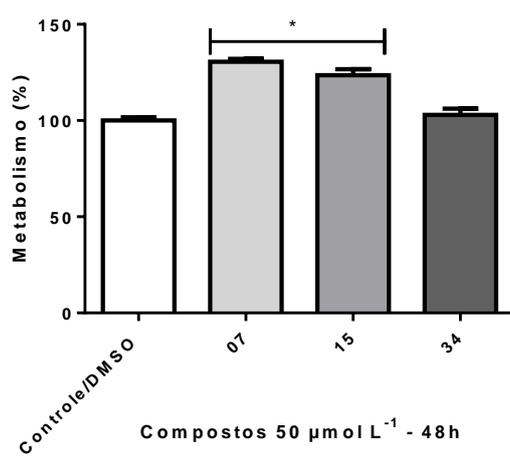
Dados anteriores de nosso laboratório indicaram diferenças marcantes na bioatividade *in vitro* de glioblastoma humano, quando expostos aos 1,2,3-triazóis (SOUSA *et al.*, 2021). Com os compostos 7, 15 e 34 foram observados expressivos efeitos de aumento de viabilidade celular. Acredita-se que essa bioatividade pode ser utilizada no desenvolvimento de substâncias com propriedades cicatrizantes. A fim de verificar essa observação, fibroblastos 3T3 foram cultivados e expostos em diferentes doses dos compostos 7, 15 e 34 por diferentes intervalos de tempo. Após os tempos de incubação, avaliou-se o metabolismo celular dos fibroblastos mantidos em cultura (Figura 4).

(A)





(B)



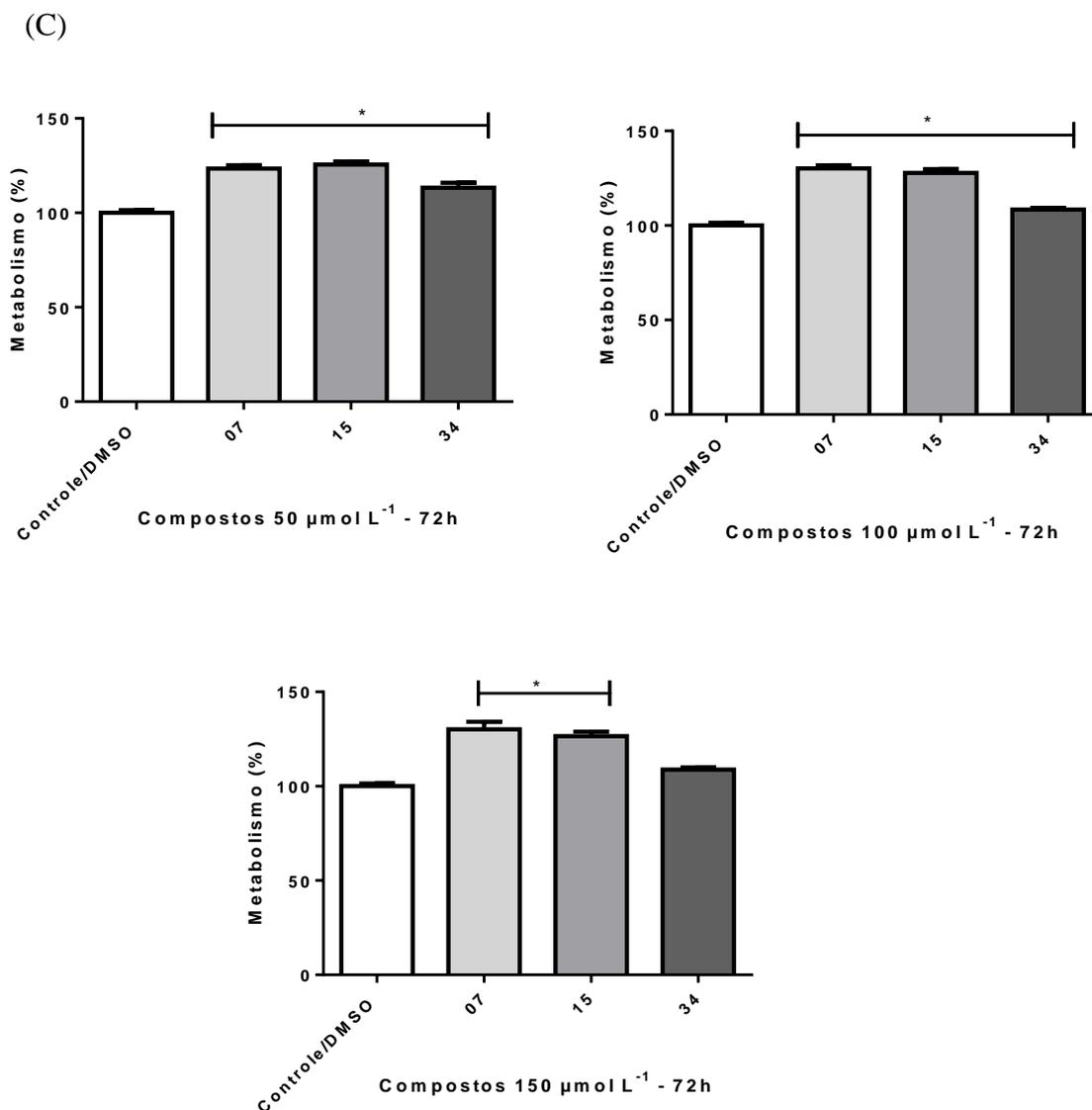


Figura 4: Atividade metabólica de 3T3 na presença de 1,2,3-triazóis. Células 3T3 foram cultivadas em meio de 3T3 contendo 0, 50, 100 e 150 µmol/L de compostos triazólicos (7, 15 e 34). A atividade metabólica foi analisada pelo ensaio de MTT. Os tempos de exposição foram 24 (A), 48 (B) e 72h (C). O asterisco representa a diferença estatística entre os grupos indicados. São apresentados a média e o desvio-padrão a partir de três experimentos independentes.

A alteração observada pode ser explicada pelo fato de os compostos influenciarem a atividade metabólica da linhagem celular 3T3. Os efeitos observados são dependentes tanto do tempo de tratamento bem como da concentração utilizada. A análise dos resultados apresentados na Figura 4 revela que os compostos químicos foram capazes de afetar o metabolismo celular, nos três tempos estipulados para o ensaio: nos períodos de

24, 48 e 72h houve um aumento da atividade metabólica celular, diante a exposição aos três compostos. Esse comportamento aconteceu em grande parte das dosagens.

No primeiro tempo notou-se um aumento significativo da atividade metabólica na faixa de 12,3 até 39,3%, com exceção do composto 34 na concentração 50 μ M. Com relação ao tempo de 48h observou-se também um aumento do metabolismo celular de 14% até 44%, com exceção do composto 34 na concentração de 50 μ M. E quando o tempo de exposição foi alterado de 48h para 72h notou-se um aumento metabólico entre 8,7 e 30,2, com exceção do composto 34 no último tempo na concentração de 150 μ M. Visto que em três momentos não houve aumento significativo da atividade metabólica na linhagem celular 3T3, mas se manteve semelhante ao controle, mostrando que o perfil em relação ao controle se manteve, e não comprometeu a atividade metabólica (Figura 4). Além disso, observou-se que o aumento da concentração potencializou este efeito para o composto 7 revelando aumento do metabolismo, proporcional a elevação da dose.

Conforme verificado, fibroblastos expostos aos novos compostos triazólicos 7,15 e 34 são capazes de aumentar a atividade metabólica das células mantidas em cultura, o estímulo dos compostos induziram uma resposta com perfis significativos de aumento metabólico.

4.2. Exposição com os 1,2,3-triazóis manteve a viabilidade celular, *in vitro*

Visto que os novos compostos foram capazes de aumentar a atividade metabólica de células 3T3, decidimos verificar qual seria a influência dos compostos na viabilidade celular da linhagem utilizada.

Fibroblastos murinos foram expostos aos compostos por 72h. Posteriormente, avaliou-se a quantidade de células viáveis de todos os grupos, em cada captura realizada (Figura 5).

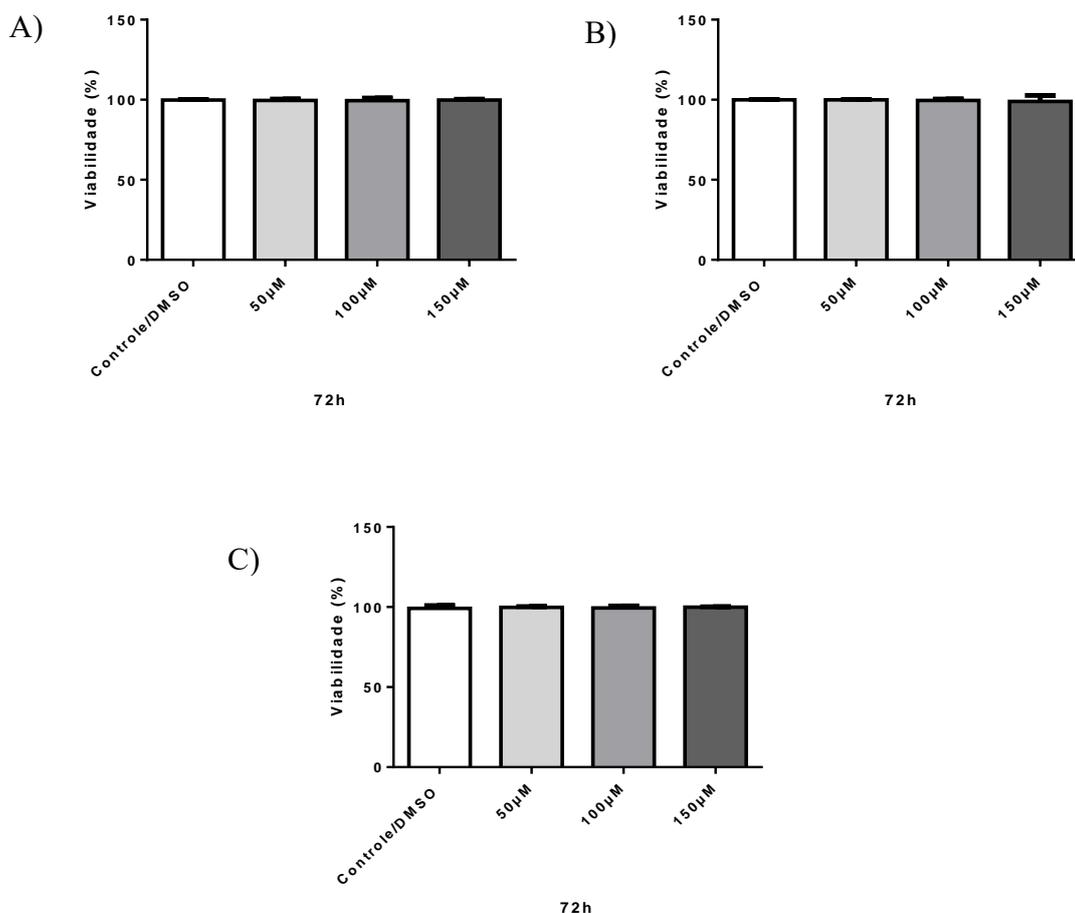


Figura 5: Viabilidade dos fibroblastos 3T3 em exposição a diferentes concentrações de compostos triazólicos. Células 3T3 foram cultivadas em meio 10% SFB, contendo 0, 50, 100, 150 µM de compostos 7(A), 15(B) e 34(C) por 72h. São apresentados a média e o desvio padrão de 3 experimentos independentes.

Nota-se a proximidade dos perfis de viabilidade de células cultivadas com diferentes concentrações dos novos compostos triazólicos, em todas as concentrações utilizadas, o que permite concluir que eles não exercem efeitos citotóxicos diretamente sobre a linhagem celular 3T3.

Pode-se observar que os fibroblastos mantidos em cultura com os compostos 7, 15 e 34 em todas as dosagens anteriormente citadas, não são capazes de afetar a viabilidade, qualitativamente, quando comparados com o controle. Isso revela uma biocompatibilidade entre células e compostos. Conforme pode ser observado na figura 6, as imagens apresentam poucas células coradas de azul tripan, em sua maioria.

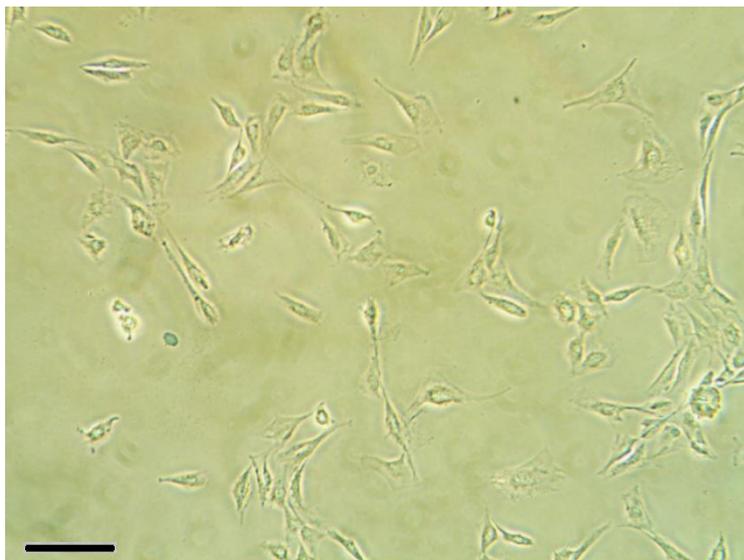


Figura 6: Aspecto dos fibroblastos expostos aos compostos (7, 15 e 34) e corados com azul de tripan após o tempo de 72h. As células em todas as concentrações descritas anteriormente foram expostas aos compostos, e as imagens dos poços foram capturadas com aumento de 10X, a fim de ilustrar a viabilidade das células. As barras representam 100 μm .

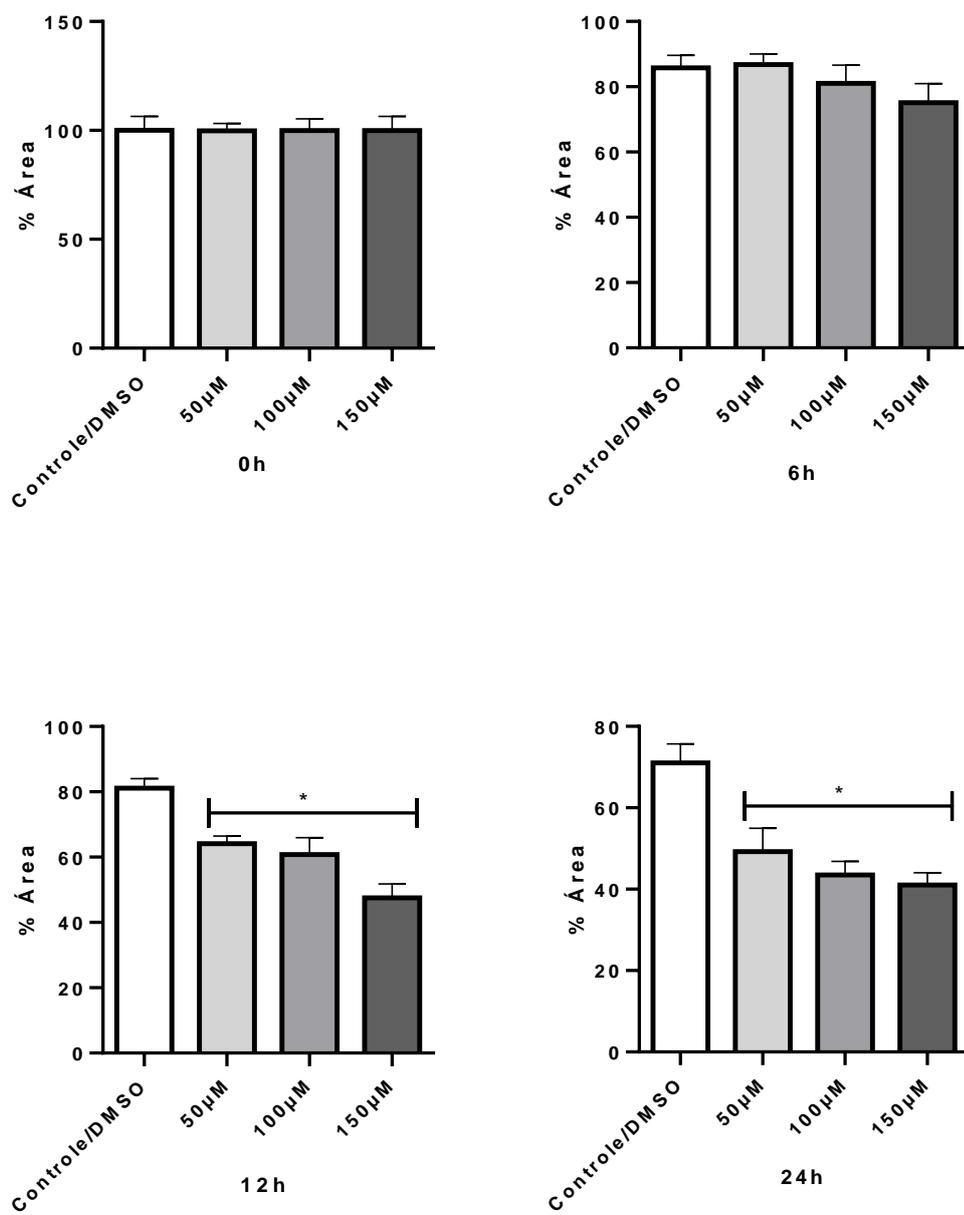
A contagem celular foi realizada para a obtenção da viabilidade celular, para análise do efeito dos compostos sobre os fibroblastos. A exclusão das células mortas coradas de azul durante a contagem geral serviu para determinação do número de células viáveis e da porcentagem de viabilidade celular (Figura 5).

A análise dos resultados apurados na figura 6, revela que para o período de exposição de 72h, os três compostos em todas as concentrações não surgem efeitos sobre a viabilidade da linhagem celular 3T3. A sobrevivência celular não foi afetada de acordo com o ensaio de exclusão do azul de tripan.

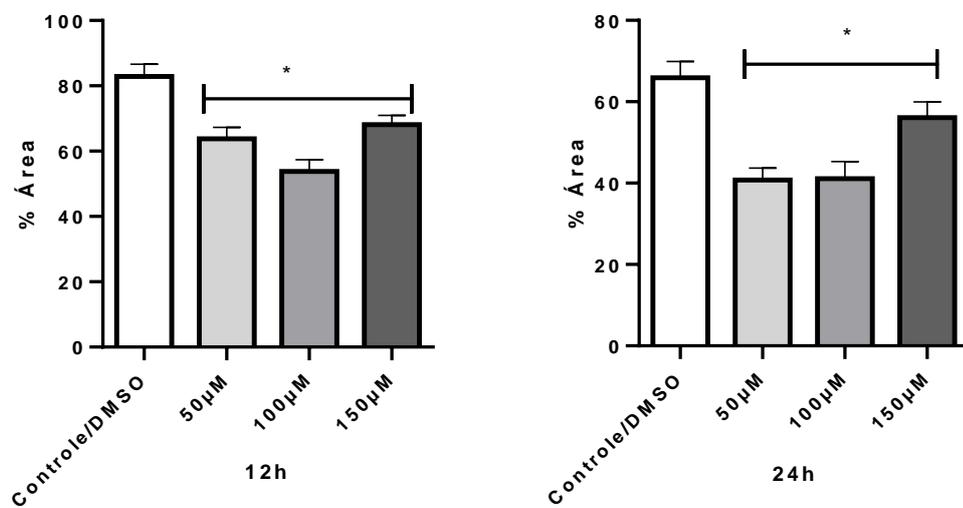
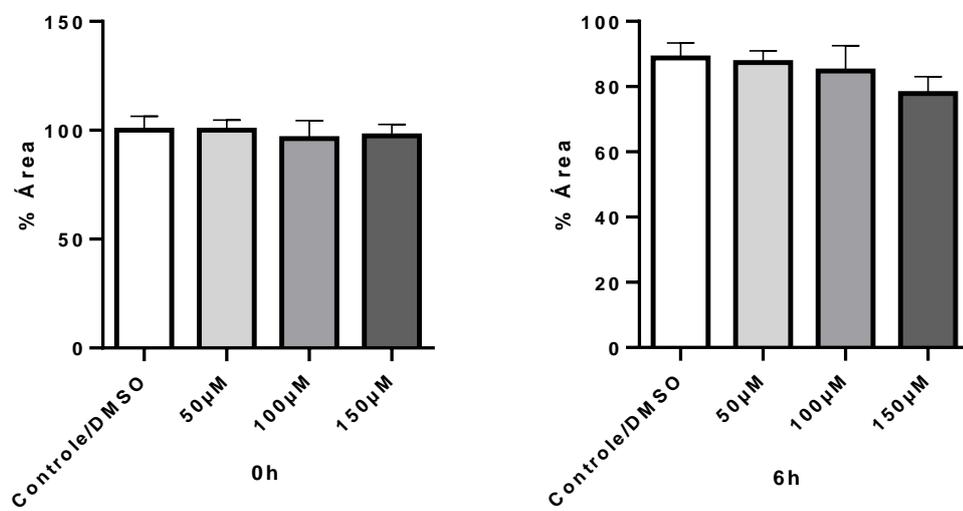
4.3. A migração de fibroblastos 3T3 mantidos em cultura por 24h em exposição aos compostos altera o percentual de fechamento da pseudo-ferida

Conforme verificado em trabalhos anteriores, o papel da migração é importante dentro do processo de reparo tecidual (CAPPIELLO; CASCIARO; MANGONI, 2018). Sendo assim, decidimos verificar se a exposição com compostos triazólicos seria capaz de estimular a atividade migratória, *in vitro*.

(A)



(B)



(C)

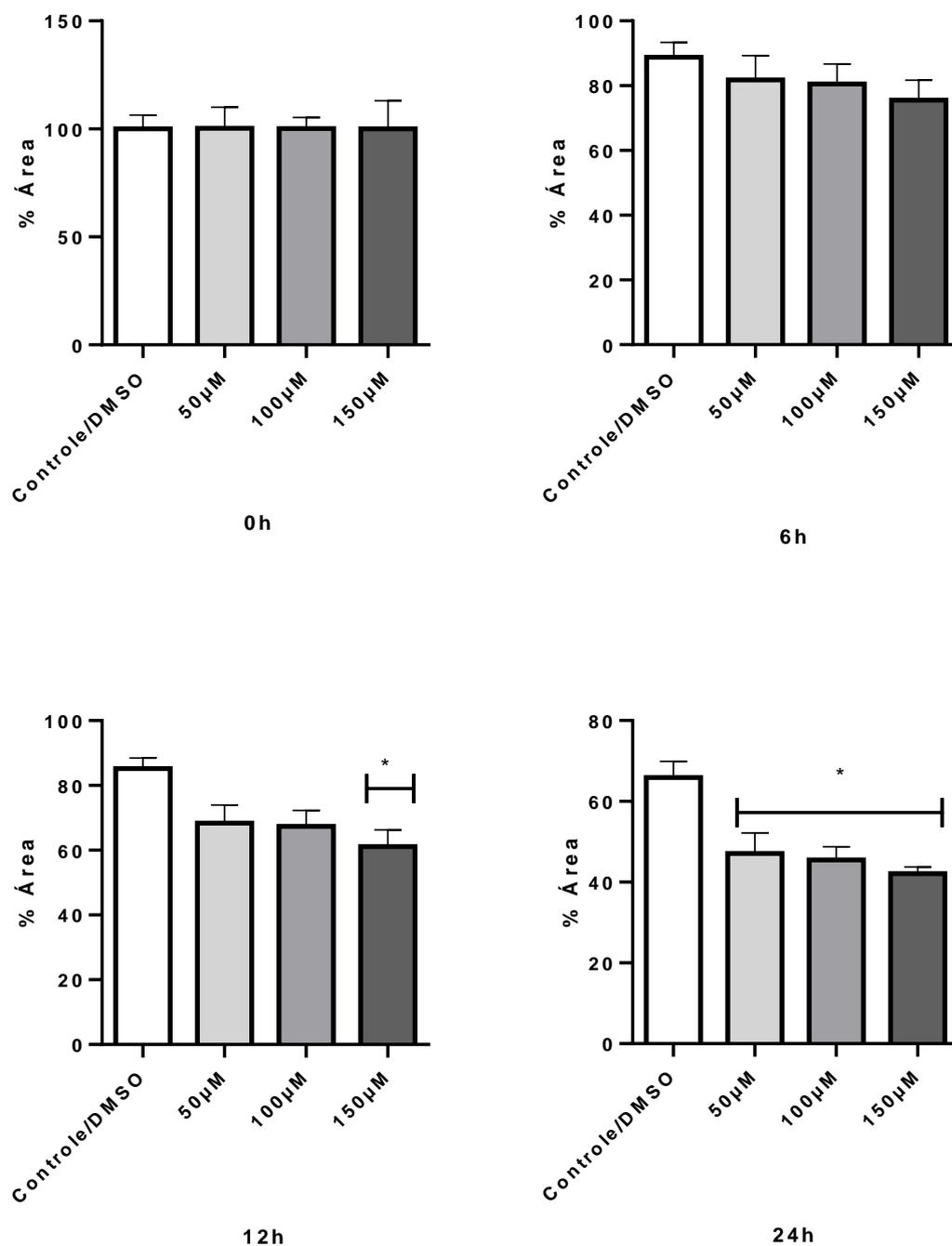


Figura 7: Efeito da migração de fibroblastos mantidos em cultura, frente aos compostos em dosagens diferentes. Células 3T3 foram plaqueadas e mantidas a 37°C com 5% CO₂, durante 24h. Após essa etapa, foi realizada uma pseudo-ferida; posteriormente adicionou-se meio 2% SFB com os compostos em todas as doses e o controle. Em (A), (B) e (C) respectivamente, compostos 7,15 e 34. Acompanhou-se a cicatriz por 24h e foram feitas capturas (microscópio óptico associado a uma câmera) em objetiva de 10X. Foi realizada uma análise de ensaio de raspagem pelo programa ImageJ que permite mensurar a área de

fechamento das feridas ao longo dos tempos. São apresentados a média e o desvio padrão obtido para um experimento representativo de três repetições.

Considerando a nova padronização experimental, foram realizados estudos de migração após 0, 6, 12 e 24h de exposição aos compostos. Em função da grande variabilidade entre experimentos, são apresentados os resultados de um experimento representativo (Figura 7).

Em destaque no tempo de 24h notou-se que houve um aumento da migração significativo para os três compostos em todas as dosagens (Figura 8).

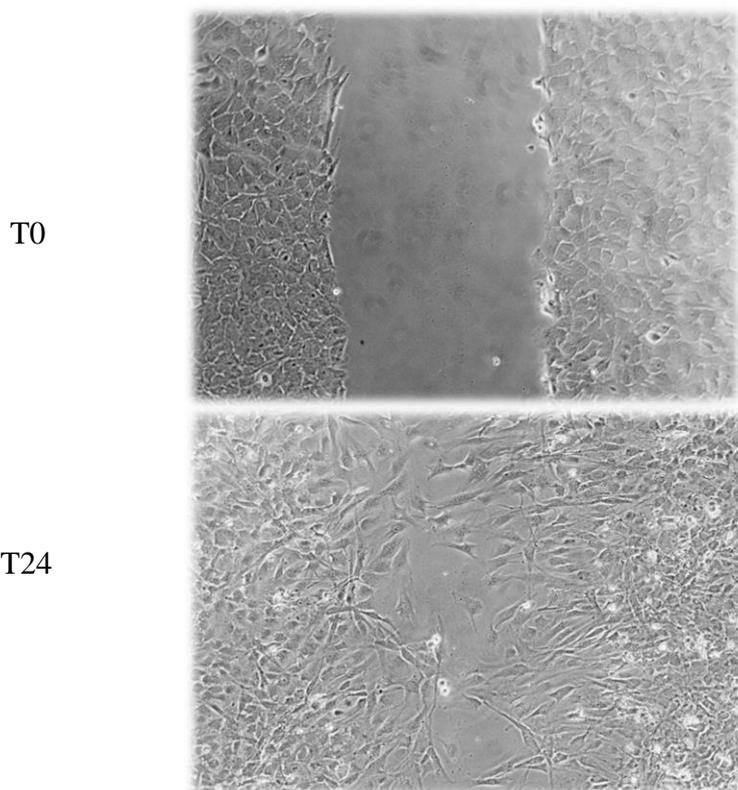


Figura 8: Aspecto das fotomicrografias que permitem verificar a migração progressiva de células fibroblásticas. Efeito de derivados 1,2,3-triazóis no fechamento de uma pseudo-ferida criada em uma monocamada de células de linhagem 3T3. Durante um ensaio de fechamento de ferida de 24 horas, as fotos foram tiradas usando um microscópio acoplado a uma câmera. Imagens representativas em 0, 24h horas são mostradas.

A análise dos resultados obtidos na figura 7 revela que para todos compostos observamos efeitos significativos de aumento da migração, conseqüentemente, reduzindo o percentual de área da pseudo-ferida. Esse aumento foi visualizado a partir de 12h até 24h de exposição para os três compostos. Para o composto 7 todas as concentrações foram significativas, e, levando em consideração o intervalo de 12 e 24h, a concentração mais

interessante foi de 150 $\mu\text{mol/L}$, a qual mostrou que o aumento da dosagem potencializou o efeito de migração (aproximadamente 33,5% para 12h e 30% para 24h). Já para o composto 15, também tivemos todas as concentrações expressivas, mas levando em consideração os dois últimos tempos, a concentração 100 $\mu\text{mol/L}$ foi mais interessante, pois aumentou o processo de migração, reduzindo ainda mais a ferida, quando comparada ao controle (aproximadamente 14% para 12h e 10% para 24h). Por último, o composto 34 manteve o perfil, no qual tivemos nos dois tempos finais diferenças significativas: com 12h a concentração interessante foi de 150 $\mu\text{mol/L}$ (reduzindo aproximadamente 24%) e com 24h observamos o mesmo comportamento, com destaque novamente na concentração 150 (reduzindo aproximadamente 24%), que mais uma vez otimizou a migração celular dos fibroblastos.

A análise dos resultados obtidos na figura 7 indica que fibroblastos expostos aos compostos triazólicos têm um aumento significativo no processo de migração celular, *in vitro*. Assim, podemos sugerir que os compostos podem estar envolvidos em algum mecanismo que proporciona um movimento orquestrado das células.

4.4. Efeito dos compostos sobre a proliferação de fibroblastos, *in vitro*

Visto que os compostos são capazes de estimular migração de células 3T3, decidimos verificar qual seria a influência dos compostos na proliferação celular.

Fibroblasto murinos foram expostos aos compostos por 24 e 72h. Posteriormente, lavou-se os poços com PBS 1X. Logo após, lavou-se os poços e foram acrescentados 100 μl de PBS 1X para fotografar os poços. Avaliou-se a quantidade de células em cada captura para os dois tempos de exposição (Figura 9).

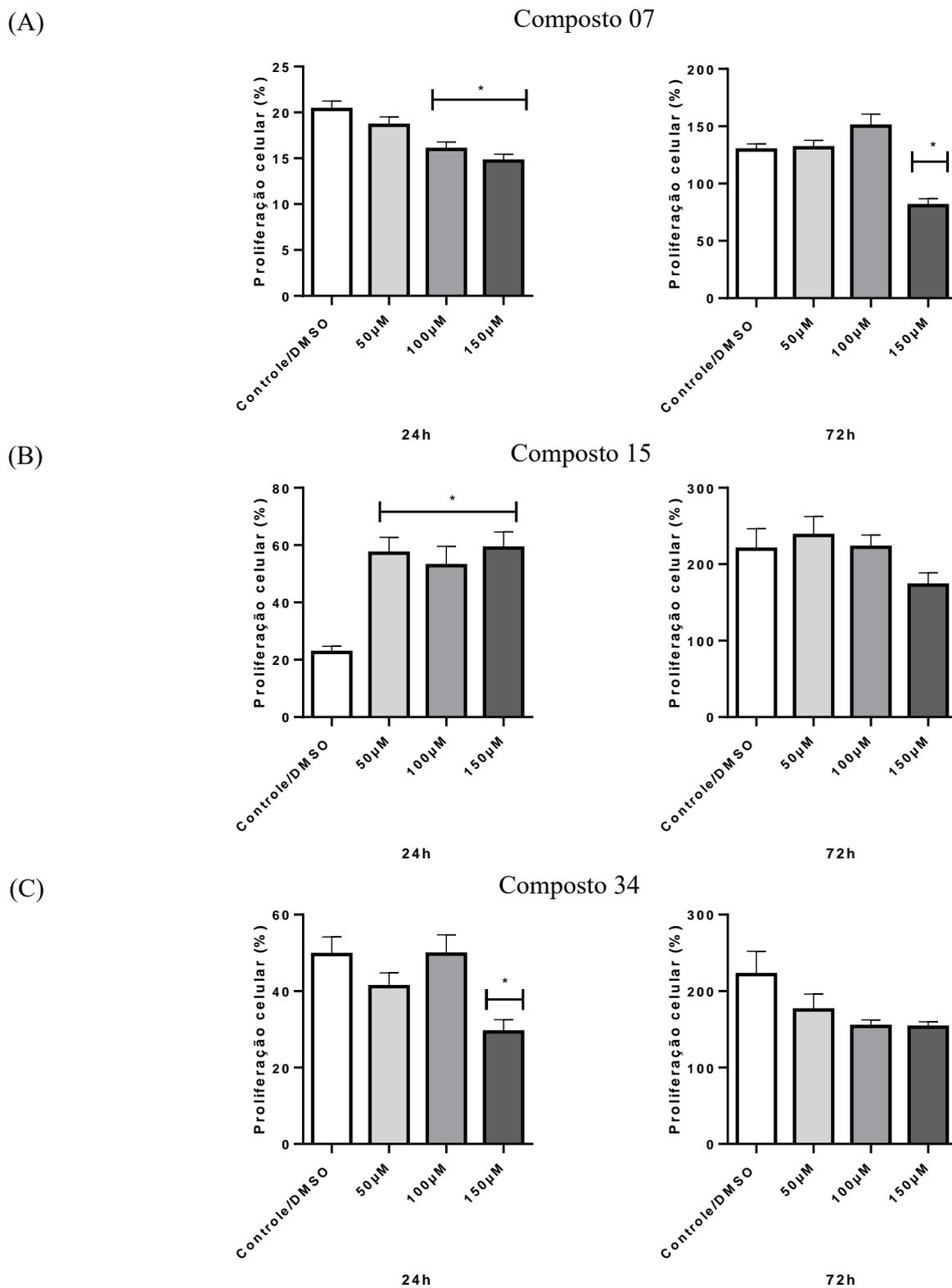


Figura 9: Proliferação de fibroblastos 3T3 em exposição a diferentes concentrações de compostos triazólicos. Células 3T3 foram cultivadas em meio 10% contendo 0, 50, 100, 150 μ M de compostos 7(A), 15(B) e 34(C). São apresentados a média e o desvio padrão de 3 experimentos independentes.

O composto 7 foi interessante, inicialmente, com dosagens de 50 μM , e posteriormente as concentrações de 50 e 100 μM tiveram uma taxa semelhante ao controle, demonstrando que o processo de proliferação acontece ao longo do tempo. O composto 15 no tempo de 24h em todas as dosagens demonstrou aumento significativo da proliferação e, após 72h, a proliferação se manteve semelhante ao controle, indicando uma taxa próxima de proliferação. Já o composto 34 na concentração de 50 e 100 μM , inicialmente manteve a proliferação com perfil próximo ao controle e no último período tivemos semelhança de proliferação entre todas as concentrações e o controle (Figura 9).

Assim, nota-se perfis próximos de proliferação de células cultivadas com diferentes concentrações dos novos compostos triazólicos, o que indica que estes compostos não prejudicam significativamente a proliferação celular, *in vitro*, a longo prazo. Na maioria das dosagens temos a taxa de proliferação se mantendo semelhante à do controle, ao longo do tempo. Com exceção apenas do composto 7 na concentração 150 μM no tempo de 72h, já que houve uma redução significativa, suponha que seja pelo perfil lento de solubilidade que foi observado no preparo do composto (Figura 9).

5. Discussão

5. DISCUSSÃO

Visto que o principal objetivo deste trabalho é avaliar o potencial biotecnológico de compostos triazólicos sobre o reparo tecidual na cultura de fibroblastos da linhagem 3T3, verificamos a capacidade dos compostos 7, 15 e 34 em influenciar os processos envolvidos na cicatrização de feridas.

5.1 Resposta da atividade metabólica frente à exposição de 1,2,3- triazóis

O reparo tecidual é restrito à presença de enzimas responsáveis pela recuperação de elementos estruturais e de moléculas de alta complexidade (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). A energia liberada nesse processo é utilizada também para atividades celulares, como o transporte através da membrana. Por outro lado, uma triagem e avaliação da atividade metabólica precisa ser abordada no início dos testes de descoberta de fármacos para reduzir as taxas de falha do composto estudado.

Dessa forma, decidimos quantificar a porcentagem de células metabolicamente ativas pelo ensaio de MTT, tal como demonstrado por Bernas (2002) e Mosmann (1983). Pudemos observar que os compostos triazólicos quando associados aos fibroblastos, demonstraram um papel fundamental no processo de cicatrização, *in vitro*. Em células fibroblásticas, levaram ao aumento da atividade metabólica (Figura 4), o que por sua vez reflete em células ativas capazes de converter o MTT em formazan por meio da succinato desidrogenase, visto que a redução só pode acontecer em células metabolicamente ativas (EL-SHARKAWY; SELIM, 2018). A alteração observada em nossos experimentos pode ser explicada pelo fato de os compostos serem indutores indiretos no processo de redução do sal do Brometo de Tetrazólio.

Os fibroblastos são responsáveis por interações com macromoléculas da matriz extracelular, as quais podem desempenhar um papel importante na atividade das células envolvidas no processo de cicatrização de feridas, modulando de forma indireta essa atividade, além da ativação e biodisponibilidade de várias citocinas e fatores de crescimento (MAQUART; MONBOISSE, 2014).

Sendo assim, a alteração observada em nossos experimentos pode ser explicada pelo fato de que os compostos 7, 15 e 34 contribuíram para aumentar a atividade metabólica (Figura 4). A partir dos resultados observados, decidimos verificar qual seria

a viabilidade e a taxa de morte celular *in vitro*, frente ao compostos triazólicos em diferentes dosagens, em virtude de que as interações iniciais entre célula e composto são fatores fundamentais para a compatibilidade biológica.

5.2 Influência dos 1,2,3 triazóis sobre a viabilidade, *in vitro*

Métodos baseados na exclusão do corante azul de tripan, o qual penetra em células mortas, permitem a visualização de lesões na membrana celular, já que células vivas não são coradas, por apresentarem a membrana íntegra (Schmalz, 1994). Dessa forma, por contagem celular, contabilizamos visualmente a viabilidade celular quando combinada com a exclusão das células coradas. Quantitativamente, pode-se observar o número de células que não se coram, conseqüentemente representando que a membrana está intacta (Figura 6).

Utilizamos os compostos como estímulo aos fibroblastos murinos e verificamos que a resposta dessa célula foi viável. Observamos que os perfis de viabilidade para todos os grupos foram equivalentes no período de 72h, o que significa que não houve variação de viabilidade pela exposição aos meios com distintas concentrações de 1,2,3 triazóis utilizadas (Figura 5). Mas no ensaio de MTT notamos que o aumento da concentração potencializou esse efeito, com destaque para o derivado 7 que, na maior concentração, provocou aumento de 44% da viabilidade celular assim como demonstrado por Sousa (2021), que também encontrou perfis viáveis para células de glioblastoma humano quando expostas aos compostos 7, 15 e 34.

Visto a importância não só da viabilidade, mas da motilidade de fibroblastos no processo de cicatrização da ferida, decidimos averiguar a migração celular.

5.3 Influência dos compostos triazólicos na migração celular

A migração celular é composta de etapas orquestradas por interações complexas (DAS; EGGERMONT; TEN HAGEN, 2015), e é indispensável em eventos patológicos e fisiológicos, em especial, a cicatrização de feridas, sendo um evento limitante durante esse processo (CAPPIELLO; CASCIARO; MANGONI, 2018).

Joyce e Pollard (2009) e Martin e Parkhurst (2004) observaram que a migração da folha ocorre em diversos processos, desde câncer até lesões teciduais. A folha consiste

em muitas células que se projetam coletivamente por mecanismos, expandindo-se mecanicamente e empurrando em direção ao estroma do tecido (KHALIL; FRIEDL, 2010). Os trabalhos de Khalil (2010) e Kim (2013) mostraram que a migração da folha envolve uma interação complexa entre forças mecânicas, interações moleculares e cascatas bioquímicas que são desencadeadas pela exposição da monocamada celular ao espaço livre, como quando as células são expostas à lacuna no ensaio de cicatrização de feridas. E os fibroblastos exibem algumas características de migração de folhas (BINDSCHADLER; MCGRATH, 2007).

Em alguns trabalhos, observa-se que ensaios *in vitro* podem ajudar a responder questões mecanísticas básicas relacionadas à sinalização celular em resposta à lesão celular ou ao estresse. Os ensaios quantificam diretamente um efeito em tipos específicos de células, tendo papel significativo no estudo da cicatrização de feridas (UD-DIN; BAYAT, 2017) como demonstrado no presente trabalho, pelo efeito do aumento de migração de fibroblastos mantidos em cultura frente aos compostos em dosagens diferentes (Figura 7). O ensaio de raspagem é altamente acessível em laboratórios de pesquisa (JUSTUS, et al., 2014) e sua conveniência e baixo custo (LIANG; PARK; GUAN, 2007) o caracterizam como uma importante ferramenta para descoberta de drogas (HULKOWER; HERBER, 2011), já que dentre as técnicas mais sofisticadas para análise de migração, o ensaio de raspagem apresenta resultados semelhantes, quando padronizado *in vitro* (Figura 10). Como ressalta Jonkman et al (2014) o ensaio de raspagem é monitorado por microscopia, mas precisa de uma padronização em sua aplicação para comparação de dados e para garantir a reprodutibilidade experimental.

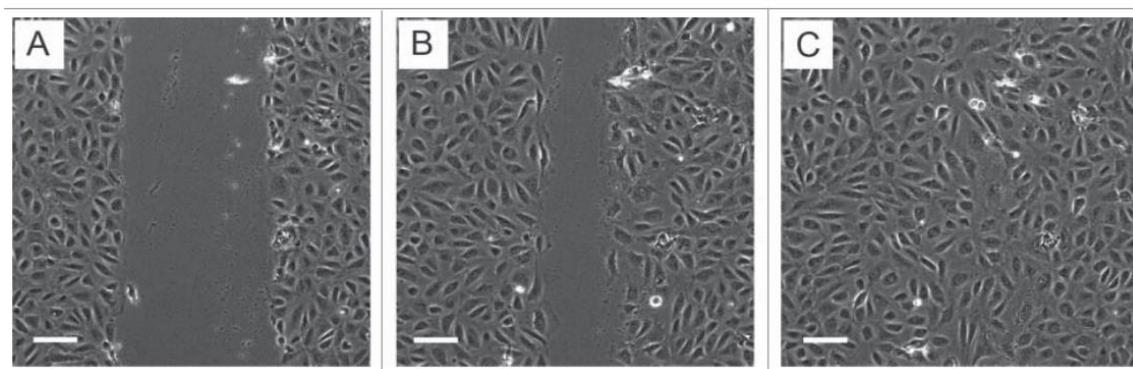


Figura 10: Diferentes momentos das capturas no ensaio de arranhão para rastrear a migração. As células foram plaqueadas em placas, a ferida feita com uma ponta de ponteira e, em seguida, fotografadas

em diferentes tempos usando um microscópio com câmera acoplada. Barra de escalada 120 μm . Fonte: (JONKMAN et al., 2014).

As concentrações séricas no meio de cultura durante a migração afetam a proliferação celular, para resolver esse episódio a redução das concentrações séricas é importante (DAS; EGGERMONT; TEN HAGEN, 2015). Levando-se em consideração esse aspecto, eventos moleculares induzidos pela inanição de soro é um mecanismo complexo, e uma interação de diferentes entradas sinérgicas ou antagônicas simultâneas é muito provável (PIRKMAJER; CHIBALIN, 2011). Métodos de sincronia que envolvem menos perturbação dos sistemas biológicos, como privação de soro, têm uma vantagem significativa (DAVIS; HO; DOWDY, 2001). Sendo assim, a redução do soro fetal bovino para 2% é capaz de mimetizar o evento de migração.

A regulação da motilidade celular é importante para os seres vivos e pudemos avaliar a migração bidimensional usando células densamente organizadas, por meio do ensaio de raspagem. Este nível de controle e integração possui relevância na investigação de processos do desenvolvimento, quadros de doenças e outros processos biológicos que dependem da migração celular (ASHBY; ZIJLSTRA, 2012), além de ser compatíveis com imagens de células durante a migração para monitoramento de eventos intracelulares (LIANG; PARK; GUAN, 2007).

Em nosso trabalho, observou-se que após 12h até 24h houve maior migração de células da linhagem 3T3, expostas aos compostos 7 e 15, em todas as concentrações, situação na qual tivemos uma redução significativa da ferida, equivalente ao percentual de redução da área dos demais grupos em relação ao controle (Figura 7). Estes dados estão de acordo com outros dados da literatura que permitem medir a movimentação sobre os efeitos das interações célula-célula e célula- matriz na migração celular, mimetizando a migração celular durante a cicatriz de feridas *in vivo* (LIANG; PARK; GUAN, 2007). Além disso, outra etapa crítica a considerar são os intervalos de tempo corretos em que as imagens devem ser capturadas, já que a migração é diferente entre tipos de células (CAPPIELLO; CASCIARO; MANGONI, 2018). Dessa forma, foram determinados os quatro tempos, conforme mostrado na figura 7. Enquanto a substância 34, com concentração de 150 μM , no tempo 12h, só aumenta a migração, pôde-se observar que o aumento da dosagem potencializou o efeito de cicatrização da ferida, com destaque para a maior concentração, que provocou aumento de 24%. Quando o tempo de exposição foi alterado para 24h, observou-se que os compostos 7, 15 e 34 tiveram um aumento da

migração significativo para todas as dosagens (Figura 8). Em trabalho semelhante, Martinet e colaboradores (1986) observaram que dentro de 24h algumas células estacionárias, como os fibroblastos, começam a mover-se.

Os fibroblastos estimulados a migrar passam por mudanças fenotípicas acentuadas. Como afirmado por Balbino e colaboradores (2005), o fenótipo de células imaturas migratórias e replicativas no início do processo, passa para fenótipo característico de células ativamente engajadas na síntese proteica. Com isto, eles passam a secretar grandes quantidades de colágeno, que se torna o principal componente da cicatriz em formação.

A migração celular é um evento crucial na cicatrização de feridas e as respostas imunológicas requerem o movimento orquestrado das células, que dependem de mecanismos muito diferentes, incluindo sinais elétricos, mecânicos e químicos. Yang e colaboradores (2019), sugerem algumas maneiras possíveis de integrar sinais para obter uma compreensão mais abrangente de migração celular coletiva. Assim, podemos pensar que existe uma sincronicidade entre sinais. O trabalho de Shellard e colaboradores (2020) sugere que diferentes sinais regulam um conjunto comum de componentes: pequenas GTPase e citoesqueleto de actina. As evidências desta e outras investigações apontam para uma forte influência do triazóis agindo como sinais. E a compreensão do mecanismo pelo qual a célula migra tende a levar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para tratamento, por exemplo, lesões teciduais.

Por último, visto também a importância não só da migração, mas como da proliferação de fibroblastos no processo de cicatrização da ferida decidimos verificar a proliferação celular.

5.4 Influência dos compostos no processo de proliferação celular

A cicatrização de feridas é uma resposta típica que resulta na restauração da integridade do tecido. É um processo complexo que envolve a migração celular, proliferação, diferenciação, apoptose e a síntese e remodelação da matriz extracelular (ZHOU, et al., 2017).

A proliferação de fibroblastos, diferenciação em miofibroblastos e aumento da síntese de colágeno são eventos-chave durante o reparo normal da ferida e formação de lesão fibrótica. Os fibroblastos exibem inibição de crescimento por contato, em que a aglomeração de células leva à diminuição da proliferação. Para representar com precisão

esse comportamento em células simuladas, precisávamos medir a taxa de divisão celular. Para medir a proliferação celular ao longo do tempo, uma contagem de todas as células identificadas forneceu o crescimento celular (GROTENDORST; RAHMANIE; DUNCAN, 2004).

No presente trabalho verificamos que a proliferação se manteve semelhante ao controle, observamos que compostos triazólicos não acometem significativamente a proliferação celular. As evidências desta e outras investigações apontam para uma forte influência dos compostos em fibroblastos, *in vitro*. Com base em mecanismos que otimiza e mantém processos que são cruciais para reparação tecidual.

As evidências desta e outras investigações apontam que os novos derivados triazólicos estão envolvidos em várias atividades. Como demonstrado nesse estudo, os compostos apresentam grande potencial farmacológico para cicatrização de feridas. Além disso, temos evidências de que eles apresentam baixa toxicidade, alta bioatividade e melhores efeitos curativos (SOUSA *et al.*, 2021).

A fim de aprofundarmos a discussão sobre o assunto, trazemos agora essa seção especial com enfoque no papel dos grupos associados aos compostos triazólicos, mostrando como esses podem estar envolvidos em processos chave durante o reparo tecidual. No ensaio de raspagem o rápido fechamento da ferida da cicatriz acontece por meio de algumas combinações de eventos como migração celular e proliferação. Curiosamente, pode-se supor que grupos presentes nos compostos, como a cumarina e ftalimida também são capazes de influenciar no reparo tecidual.

Em alguns trabalhos, observa-se uma relação entre grupos associados aos novos 1,2,3-triazóis, visto que os compostos cumarínicos contém estrutura típica de benzopirona. Esse tipo de estrutura permite que seus derivados interajam prontamente com uma diversidade de enzimas e receptores nos organismos por meio de interações de ligações fracas, exibindo ampla potencialidade como medicamentos (PENG; DAMU; ZHOU, 2013).

A Benzopirona aumenta a circulação linfática, melhorando o retorno venoso e o suprimento de sangue arterial. Atua também sobre a permeabilidade capilar reduzindo a inflamação e o edema, e auxilia no processo inicial de cicatrização da ferida. Tem ações de estímulo do metabolismo celular, com ação energética, estando potencialmente envolvida no aumento do metabolismo celular dos compostos, o que sugere seu envolvimento no processo de cicatrização, ajudando na fase proliferativa e contribuindo com a neovascularização (Figura 1).

O composto 34 apresenta o grupo cumarina, a qual possui estrutura química semelhante à da curcumina, diferenciando apenas o número dos elementos. A curcumina apresenta propriedades significativas de cicatrização de feridas (GOPINATH et al., 2004) e atua em vários estágios do processo natural de cicatrização de feridas para acelerar a cicatrização. Alguns trabalhos fornecem evidências de sua capacidade de aumentar a formação de tecido de granulação, deposição de colágeno, remodelação e contração da ferida (AKBIK et al., 2014). As cumarinas podem apresentar grande contribuição na pesquisa para prevenção e tratamento de doenças devido à capacidade de exercer interações não covalentes com estruturas proteicas, possuindo um amplo espectro de atividades biológicas (FRANCO et al., 2021).

Já os compostos 7 e 15 apresentam em comum o grupo ftalimida, e estudos demonstram que análogos de ftalimida são compostos ativos contra micro-organismos, apresentando atividade antibacteriana significativa (SRINIVASAN; KUMAR; KUMAR, 2010). Além disso, uma série de análogos de ftalimida apresentaram atividade anti-inflamatória e não exibiram nenhuma citotoxicidade significativa, *in vitro* (LEITE et al., 2014).

Dessa forma, pode-se perceber as vantagens desses grupos químicos em vários processos biológicos, tanto a cumarina quanto a ftalimida associados aos 1,2,3-triazóis. Estes dados vão de encontro ao trabalho de Beninato (2019), que observou que o ácido hialurônico (HA), contendo braços laterais ligados a porções de cumarina fotoativas para preparação de hidrogéis, demonstraram em ensaios de metabolismo e proliferação celular que fibroblastos encapsulados em hidrogel mantiveram sua viabilidade e que o HA-TEG-cumarina sustentou a proliferação de mioblastos não aderentes. Por todas essas razões e graças a uma abordagem segura de radicais livres, este novo derivado de cumarina de ácido hialurônico tende a ser um bom candidato para aplicações de engenharia de tecidos e medicina regenerativa (BENINATTO, 2019). Akgün (2012) também demonstrou que derivados de ftalimida apresentam atividade antibacteriana no tratamento da tuberculose multirresistente, bem como, também tende a auxiliar numa resposta protetora diante uma lesão tecidual (AKGÜN, 2012).

Estes dados corroboram com o trabalho Singal (2011), onde foi observado que a estrutura triazol com derivados apresenta diferentes atividades farmacológicas e tendem a estar envolvidas em diversas atividades biológicas, como no metabolismo, viabilidade, migração e proliferação celular demonstrados em nossa pesquisa, quando a célula 3T3 foi exposta aos compostos com agrupamentos. Considerando uma potencialização dos

efeitos, seria interessante ter uma abordagem mais criativa envolvendo o uso de misturas dos compostos em certas proporções para combinar vantagens de ambos os tipos (ABDELAZIZ *et al.*, 2021).

Os resultados obtidos neste trabalho e em trabalhos anteriores destacam a importância dos compostos como estimulador de respostas reparatórias no contexto de cicatrização de feridas.

6. Considerações Finais

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados obtidos permitem apontar importantes diferenças na resposta ao processo de cicatrização deflagrada pelo fibroblasto influenciadas pelos novos compostos 7, 15 e 34, os quais refletem um papel importante nos eventos de intensidade metabólica, viabilidade, migração e proliferação celular. *In vitro*, os compostos influenciaram na mimetização de etapas do reparo tecidual, executadas pelos fibroblastos, sem alterar a resposta de eventos clássicos desempenhada por essas células.

Com base nessas observações, pode-se propor um mecanismo geral pelo qual os compostos triazólicos, que expressam grupos responsáveis por atividades biológicas, como responsáveis pela otimização do reparo tecidual mais expressivo em fibroblastos 3T3.

Esses novos derivados triazólicos envolvidos em várias atividades farmacológicas mostraram-se importantes agentes para desenvolvimento de substâncias com propriedades farmacológicas cicatrizantes. Nas fases iniciais do reparo tecidual, esses compostos otimizaram eventos cruciais envolvidos no processo reparatório.

Neste trabalho, verificamos que os fibroblastos representam células cruciais para o processo de reparo no contexto da associação com os triazóis, e que essa dinâmica provavelmente está relacionada com os grupos presentes na estrutura química. Visto que foram encontradas alterações quanto à várias atividades biológicas, imaginamos que fibroblastos, atuando em conjunto, sejam capazes de estimular uma via de reações, no sentido de estabelecer uma resposta efetiva durante as primeiras etapas da fase de reparo tecidual decorrente de uma lesão. Na região lesionada *in vitro*, a exposição aos compostos 7 e 15 talvez crie um ambiente anti-inflamatório, devido a presença do grupo ftalimida, o que conseqüentemente contribuiu para restabelecer a integridade tecidual. Da mesma forma, a presença do grupo cumarina no composto 34, evidenciou propriedades cicatrizantes e estimulou a migração dos fibroblastos.

O estudo de reparação tecidual otimizada pelos triazóis foi de grande contribuição para a descoberta de mecanismos da resposta reparatória. No contexto da reparação associando compostos aos fibroblastos há várias características interessantes, não observados em outras linhagens de células, que nos levam ao entendimento dos mecanismos que influenciam no estabelecimento da cicatrização. Compreender os mecanismos reparatórios que permitem a relação entre célula e composto pode contribuir não só para o desenvolvimento de novos tratamentos para cicatrização, como também

para o entendimento de outras doenças cujas características de resposta reparatória são semelhantes.

7. Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8a Edição ed. Rio de Janeiro: Elsevier Inc., 2015.

ABDELAZIZ, D. ET AL. New biodegradable nanoparticles-in-nanofibers based membranas for guided periodontal tissue and bone regeneration with enhanced antibacterial activity. **Journal of advanced research**, v. 28, p. 51–62, 2021.

AKBIK, D. et al. Curcumin as a wound healing agent. **Life Sciences**, v. 116, n. 1, p. 1–7, out. 2014.

AKGÜN, H. et al. Synthesis and antimycobacterial activity of some phthalimide derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 13, p. 4149–4154, 2012.

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 6ª Edição ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

ARTEM ATAIDE, J. et al. Natural actives for wound healing: A review. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 9, p. 1664–1674, 2018.

ASHBY, W. J.; ZIJLSTRA, A. Established and novel methods of interrogating two-dimensional cell migration. **Integrative Biology**, v. 4, n. 11, p. 1338–1350, 2012.

BAINBRIDGE, P. Wound healing and the role of fibroblasts. **Journal of Wound Care**, v. 22, n. 8, p. 407–412, 2013.

BALBINO, CARLOS ABERTO; PEREIRA, LEONARDO MADEIRA; CURI, R. Mechanisms involved in wound healing: A revision. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 27–51, 2005.

BENINATTO, R. et al. Photocrosslinked hydrogels from coumarin derivatives of hyaluronic acid for tissue engineering applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 96, n. April 2018, p. 625–634, 2019.

BERNAS, TYTUS; DOBRUCKI, J. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: Interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. **Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 47, n. 4, p. 236–242, 1 abr. 2002.

BINDSCHADLER, M.; MCGRATH, J. L. Sheet migration by wounded monolayers as an emergent property of single-cell dynamics. **Journal of Cell Science**, v. 120, n. 5, p. 876–884, 2007.

BLAIR, M. J. et al. Skin Structure-Function Relationships and the Wound Healing Response to Intrinsic Aging. **Advances in Wound Care**, v. 9, n. 3, p. 127–143, 2020.

BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The basic science of wound healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, n. 7 SUPPL., p. 12–34, 2006.

CAMPOS, A. C.; LIGOCKI; BORGES-BRANCO, ALESSANDRA; GROTH, A. K. Wound healing. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, v. 20, n. 1, p. 51–58, 2007.

CAPPIELLO, F.; CASCIARO, B.; MANGONI, M. L. A novel in vitro wound healing assay to evaluate cell migration. **Journal of Visualized Experiments**, n. 133, p. 10–15, 2018.

CHOUHAN, D.; MANDAL, B. B. Silk biomaterials in wound healing and skin regeneration therapeutics: From bench to bedside. **Acta Biomaterialia**, v. 103, p. 24–51, 2020.

DAS, A. M.; EGGERMONT, A. M. M.; TEN HAGEN, T. L. M. A ring barrier-based migration assay to assess cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 10, n. 6, p. 904–915, 2015.

DAVIS, P. K.; HO, A.; DOWDY, S. F. Biological Methods for Cell-Cycle Synchronization of Mammalian Cells. **BioTechniques**, v. 30, n. 6, p. 1322–1331, jun. 2001.

DESJARDINS-PARK, HEATHER E.; FOSTER, DESHKA S.; LONGAKER, M. T. Fibroblasts and wound healing: An update. **Regenerative Medicine**, v. 13, n. 5, p. 491–495, 2018.

DIAS, M. C. ET AL. Synthesis of 1,2,3-triazole benzophenone derivatives and evaluation of in vitro sun protection, antioxidant properties, and antiproliferative activity on HT-144 melanoma cells. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, n. 3, p. 572–587, 2021.

EL-SHARKAWY, E.; SELIM, Y. Three new coumarin types from aerial parts of *Ammi majus* L. and their cytotoxic activity. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 73, n. 1–2, p. 1–7, 2018.

FRANCO, D. P. et al. The importance of coumarins for medicinal chemistry and the development of bioactive compounds in the last years. **Quimica Nova**, v. 44, n. 2, p. 180–197, 2021.

GEORGE BROUGHTON, I. I.; JANIS, JEFFREY E.; ATTINGER, C. E. Wound healing: An overview. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, n. 7S, p. 1–32, 2006.

GOPINATH, D. et al. Dermal wound healing processes with curcumin incorporated collagen films. **Biomaterials**, v. 25, n. 10, p. 1911–1917, 2004.

GROTENDORST, G. R.; RAHMANIE, H.; DUNCAN, M. R. Combinatorial signaling pathways determine fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation. **The FASEB Journal**, v. 18, n. 3, p. 469–479, 2004.

HULKOWER, K. I.; HERBER, R. L. Cell Migration and Invasion Assays as Tools for Drug Discovery. **Pharmaceutics**, v. 3, n. 1, p. 107–124, 11 mar. 2011.

IBRAHIM, N. ‘IZZAH et al. Wound healing properties of selected natural products. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 11, p. 2360, 2018.

JONKMAN, J. E. N. et al. An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. **Cell Adhesion and Migration**, v. 8, n. 5, p. 440–451, 2014.

JOYCE, J. A.; POLLARD, J. W. Microenvironmental regulation of metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 4, p. 239–252, 2009.

JUNQUEIRA, LUIZ C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10^a Edição ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2004. v. 10^o Edição

JUSTUS, C. R. ET AL. In vitro Cell Migration and Invasion Assays. **Journal of Visualized Experiments**, n. 88, p. 1–8, 1 jun. 2014.

KHALIL, A. A.; FRIEDL, P. Determinants of leader cells in collective cell migration. **Integrative Biology**, v. 2, n. 11–12, p. 568–574, 2010.

KIERSZENBAUM, A. L.; TRES, L. **Histologia e Biologia Celular**. 3^a Edição ed. Rio de Janeiro: Elsevier Inc., 2012.

KIM, J. H. et al. Propulsion and navigation within the advancing monolayer sheet. **Nature Materials**, v. 12, n. 9, p. 856–863, 2013.

LEFKOVITS, JEFFREY; PLOW, EDWARD F.; TOPOL, E. J. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. **New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 23, p. 1553–1559, 1995.

LEITE, A. C. L. et al. Phthaloyl amino acids as anti-inflammatory and immunomodulatory prototypes. **Medicinal Chemistry Research**, v. 23, n. 4, p. 1701–1708, 2014.

LIANG, C.-C.; PARK, A. Y.; GUAN, J.-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–333, 1 fev. 2007.

MANDELBAUM, SAMUEL HENRIQUE; DI SANTIS, ÉRICO PAMPADO; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrization: Current concepts and auxiliary resources - Part I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, p. 393–408, 2003.

MAQUART, F. X.; MONBOISSE, J. C. Extracellular matrix and wound healing. **Pathologie Biologie**, v. 62, n. 2, p. 91–95, 2014.

MARTIN, P.; PARKHURST, S. M. Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis. **Development**, v. 131, n. 13, p. 3021–3034, 2004.

MARTINET, Y. ET AL. Activated human monocytes express the c-sis proto-oncogene and release a mediator showing PDGF-like activity. **Nature**, v. 319, n. 6049, p. 158–160, 1986.

MORTON, L. M.; PHILLIPS, T. J. Wound healing and treating wounds Differential diagnosis and evaluation of chronic wounds. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 74, n. 4, p. 589–605, 2016.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of immunological**

methods, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

PENG, X.-M.; DAMU, G. L. V; ZHOU, C.-H. Current Developments of Coumarin Compounds in Medicinal Chemistry. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 21, p. 3884–3930, 2013.

PETER W. HASHIM, A. M. F. Wound healing. **South African Medical Journal**, v. 93, n. 7, p. 480, 2018.

PIRKMAJER, S.; CHIBALIN, A. V. Serum starvation: Caveat emptor. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 301, n. 2, p. 272–279, 2011.

RAVI, S.; SANTHANAKRISHNAN, M. Mechanical, chemical, structural analysis and comparative release of PDGF-AA from L-PRF, A-PRF and T-PRF - An in vitro study. **Biomaterials Research**, v. 24, n. 1, p. 1–10, 2020.

SCHMALZ, G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials-advantages and limitations. **Journal of Dentistry**, v. 22, p. S6–S11, 1994.

SCHUSTER, R. et al. The inflammatory speech of fibroblasts. **Immunological Reviews**, v. 302, n. 1, p. 126–146, 2021.

SHELLARD, A.; MAYOR, R. All Roads Lead to Directional Cell Migration. **Trends in Cell Biology**, v. 30, n. 11, p. 852–868, 2020.

SINGHAL, N. ET AL. Recent advancement of triazole derivatives and their biological significance. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 2, p. 126–133, 2011.

SIQUEIRA, R. P. ET AL. Potential antileukemia effect and structural analyses of SRPK inhibition by N-(2-(Piperidin-1-yl)-5-(Trifluoromethyl)Phenyl) isonicotinamide (SRPIN340). **Plos One**, v. 10, n. 8, p. 1–21, 2015.

SOUSA, S. M. R. DE ET AL. Síntese de novos 1,2,3-triazóis inspirados no srpin340 e avaliação de seus efeitos em linhagem celular de glioblastoma humano. **Química Nova**, v. 44, n. 00, p. 1268–1279, 2021.

SRINIVASAN, R.; KUMAR, K. RAVI; KUMAR, P. P. Synthesis and Antimicrobial Activity of some New α N-Phthilimido Amino Acids Analogues. **International Journal of ChemTech Research**, v. 2, n. 2, p. 895–898, 2010.

TAZIMA, M. F. G. S.; VICENTE, YAMVA; MORIYA, T. Wound biology and healing. **Medicina**, v. 41, n. 3, p. 259–264, 2008.

TODARO, G. J.; GREEN, H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. **The Journal of cell biology**, v. 17, n. 2, p. 299–313, 1 maio 1963.

UD-DIN, S.; BAYAT, A. Non-animal models of wound healing in cutaneous repair: In silico, in vitro, ex vivo, and in vivo models of wounds and scars in human skin. **Wound Repair and Regeneration**, v. 25, n. 2, p. 164–176, 2017.

WILLIAMS, J. et al. A systematic review of associations between non-communicable diseases and socioeconomic status within low- and lower-middle-income countries. **Journal of Global Health**, v. 8, n. 2, 2018.

YANG, Y.; JOLLY, M. K.; LEVINE, H. Computational Modeling of Collective Cell Migration: Mechanical and Biochemical Aspects. **Cell Migrations: Causes and Functions**, v. 1146, p. 1–11, 2019.

ZHANG, J. et al. A pulsatile release platform based on photo-induced imine-crosslinking hydrogel promotes scarless wound healing. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2021.

ZHOU, H. ET AL. The progress and challenges for dermal regeneration in tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 105, n. 4, p. 1208–1218, 2017.