



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

FERNANDA LIMA TORRES DE AQUINO

EFEITO DOS ÁCIDOS TRANS-CINÂMICO, *p*-CUMÁRICO E CINAMATO DE METILA, SOBRE A MIGRAÇÃO DE FIBROBLASTOS *IN VITRO*

Maceió - AL, 2019

FERNANDA LIMA TORRES DE AQUINO

EFEITO DOS ÁCIDOS TRANS-CINÂMICO, *p*-CUMÁRICO E CINAMATO DE METILA, SOBRE A MIGRAÇÃO DE FIBROBLASTOS *IN VITRO*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Emiliano de Oliveira Barreto.

Maceió - AL, 2019

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

- A657e Aquino, Fernanda Lima Torres de.
Efeito dos ácidos trans-cinâmico, *p*-cumárico e cinamato de metila, sobre a migração de fibroblastos *in vitro* / Fernanda Lima Torres de Aquino. – 2019.
72 f. : il.
- Orientador: Emiliano de Oliveira Barreto.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2019.
- Bibliografias: f. 61-72.
1. Fibroblastos. 2. Ácido cinâmico (Éster). 3. Ácidos cumáricos. I. Título.

CDU: 661.664



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL – Campus A. C. Simões
Av. Lourival Melo Mota, S/N
Cidade Universitária – Maceió-AL
CEP: 57072-900
E-mail: ppgcs9@gmail.com
Fone: 82 3214 1850

Folha de Aprovação

Fernanda Lima Torres de Aquino

Efeito dos ácidos trans-cinâmico, *p*-cumárico e cinamato de metila, sobre a migração de fibroblastos *in vitro*

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 9 de Agosto de 2019.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto (Orientador)

Prof.ª Dr.ª Maria Danielma dos Santos Reis – (UFAL)

Prof. Dr. Rodrigo da Silva Viana - (UFPE)

Dedico aos que fizeram do LBC minha segunda casa! A todos os meus colegas de bancada e professores que se tornaram minha segunda família e que dia após dia, continuaram do meu lado me ajudando a superar os momentos tristes e compartilharam comigo bons resultados e superações!

Agradecimentos

A Deus agradeço por tudo. Principalmente por uma intimidade com Ele que me enche de amor e esperança, me levando a crer que estou sendo guiada através de momentos que me levam até a conclusão deste mestrado!

Agradeço da forma mais pura e verdadeira que conheço aos meus pais, Diva e Fernando, pelo trabalho e incentivo para minha formação, amadurecimento e independência. Além de possuírem uma sabedoria ímpar, me inspirando a ser uma pessoa melhor todos os dias. Às minhas irmãs Giovanna e Victoria, que me trazem a felicidade e calma após os dias turbulentos e corridos. Também agradeço com um imenso carinho à minha avó Suely, tenho certeza que o imenso apoio e as incansáveis orações me ajudaram nessa vitória! À minha segunda família Juarez, Mônica, Kaio, Mariana e Carlos; pelo imenso suporte e por entenderem a minha rotina em frente ao computador, respeitando meus momentos de afastamento e concentração. Em especial ao Kaio por me incentivar todos os dias, suas palavras e encorajamento foram essenciais nesse e em muitos outros momentos. Obrigada pela calma e pelo suporte!

À Universidade Federal de Alagoas, pelo apoio institucional e pela oportunidade de crescer profissionalmente. Agradeço aos coordenadores, secretários e professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, do ICBS, pelo incentivo à pesquisa e aprimoramento científico dentro e fora da faculdade.

Em especial, agradeço ao meu orientador, Emiliano Barreto, pela atenção e encorajamento científico desde 2011. Me ensinando diariamente a competência, paciência e compreensão. Além de oferecer todo o amparo necessário para produção e aprendizado, sempre mostrando alegria a cada conquista de resultado, técnica ou produção. O meu sincero obrigada!

Com todo carinho agradeço aos professores do LBC Alexandre, Danielma, Janylle e Salete, que sempre foram muito atenciosos e compreensivos durante a minha jornada! Em especial, agradeço a Juliane, técnica do LBC, que desde sua entrada no laboratório nos ensinou diariamente sobre cuidado, zelo e paciência! Obrigada pela parceria diária, os dias no LBC são muito mais leves desde a sua chegada, e mais organizados também! Obrigada, principalmente, por se fazer sempre presente.

Aos meus colegas de bancada, amigos-família, vocês me fizeram sorrir todas as vezes que abri as portas do laboratório. Obrigada por me receberem com tanto carinho e sempre abrirem a

porta quando esqueço a chave! Karen (e Hannah), Marvin, Ana Rúbia, Ana Mendes, Andressa, Camila, Felipe, Flávio, Samário, Noé, Jaqueline, Julianderson, Keyla, Lylyan, Maria Elisa, Rayanne, Ruan, Tacio, Eloisa e Lays, muito obrigada pelos momentos de descontração e pelos papos científicos! A todos os novos membros Rodrigo, Everlaine, Rafael, Mirele, Jennifer, Euller, Matheus, Bia, Dandara ... que entraram agora no laboratório, seu eu puder dar um conselho ... aproveitem cada momento, valorizem cada pessoa, o LBC é muito especial! E com imenso carinho, às minhas amigas Lilian, Liliane, Polliane, Návylla, Clarice e Jordana, o meu muito obrigada!

Às professoras Dras. Priscila e Danielma pelas importantes considerações na minha etapa de qualificação. À Dra. Danielma e ao Dr. Rodrigo que gentilmente aceitaram o convite para compor minha banca de defesa, obrigada!

Agradeço às agências financiadoras FAPCAL e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro, assim como ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

E por fim, a todos que direta ou indiretamente participaram da concretização desse trabalho, muito obrigada!

“A vida só é possível através dos desafios. A vida só é possível quando você tem tanto o bom tempo quanto o mau tempo, quando tem prazer e dor; quando tem inverno e verão, dia e noite; quando tem a tristeza, tanto quanto a felicidade. A vida passa entre essas duas polaridades. Movendo-se entre essas duas polaridades, você aprende a se equilibrar... A vida, ela pertence ao que flui”.

(Osho)

RESUMO

Os ácidos hidroxicinâmicos são encontrados em abundância em frutas e em outros alimentos de origem vegetal. Seus derivados, cinamato de metila, ácido trans-cinâmico e ácido *p*-cumárico estão presentes em várias plantas medicinais que têm sido objeto de estudo no tratamento de condições patológicas distintas, incluindo feridas cutâneas. Várias propriedades medicinais dos derivados do ácido hidroxicinâmico, como seus efeitos antioxidantes, antiinflamatórios e cicatrizantes, têm sido relatadas na literatura. No entanto, não está claro se esses derivados exercem um efeito benéfico na função dos fibroblastos. Neste estudo, avaliamos os efeitos dos ácidos trans-cinâmico, *p*-cumárico e cinamato de metila na migração de fibroblastos *in vitro*. Os resultados mostraram que os derivados do ácido hidroxicinâmico não afetam apenas a viabilidade celular, mas também aumentam a migração de fibroblastos no ensaio de cicatrização de feridas *in vitro*. Eles também induziram um aumento nas fases S e G2 / M acompanhado por uma diminuição na fase G0/G1 do ciclo celular. Para diferenciar se o potencial cicatrizante *in vitro*, ocorre através proliferação e/ou migração, os fibroblastos foram tratados com mitomicina C e submetidos ao ensaio de migração horizontal (*scratch assay*). Este tratamento aboliu o efeito induzido pelo ácido *p*-cumárico e cinamato de metila, mostrando que apenas o ácido trans-cinâmico estimulou a migração. A migração de fibroblastos induzida por ácido trans-cinâmico foi diminuída pelo inibidor de PKA (6-22-amida) e pelo inibidor de p38-MAPK (SB203580), mas não pelo inibidor de JNK (JNK-IN-8). Adicionalmente, os fibroblastos tratados com ácido trans-cinâmico mostraram um aumento na produção de laminina e colágeno tipo I, e uma redução na produção de fibronectina. Nosso estudo mostrou que o ácido trans-cinâmico melhora a migração de fibroblastos e modula a síntese de matriz extracelular, indicando seu potencial para acelerar o processo de cicatrização.

Palavras-chave: Fibroblasto; Ácido trans-cinâmico; Cinamato de metila; Ácido *p*-cumárico.

ABSTRACT

Hydroxycinnamic acids are found in abundance in fruits and other foods of plant origin. Their derivatives, methyl cinnamate, trans-cinnamic, and p-coumaric acids are present in several medicinal plants that have been the object of study in the treatment of distinct pathological conditions, including skin wounds. Several medicinal properties of hydroxycinnamic acid derivatives such as its antioxidant, anti-inflammatory, and healing effects have been reported in literature. However, it is unclear whether these derivatives exert a direct beneficial effect on fibroblast function. In this study, we evaluated the effects of methyl cinnamate, trans-cinnamic, and p-coumaric acids on fibroblast migration in vitro. The results showed that hydroxycinnamic acid derivatives not only affect cell viability, but also increase fibroblast migration in the in vitro scratch-wound healing assay. They also induced an increase in S and G2/M phases accompanied by a decrease in the G0/G1 phase of the cell cycle. To differentiate between proliferation and migration, fibroblasts were treated with mitomycin C and subjected to the scratch assay. This treatment abolished the effect induced by p-coumaric acid and methyl cinnamate, showing that only the trans-cinnamic acid stimulated the migration. trans-Cinnamic acid induced fibroblast migration was decreased by PKA inhibitor (6-22-amide) and p38-MAPK inhibitor (SB203580) but not by JNK inhibitor (JNK-IN-8). Additionally, trans-cinnamic acid-treated fibroblasts showed an increase in the production of laminin and collagen type I, and a reduction in the production of fibronectin. Our study showed that trans-cinnamic acid improves fibroblast migration and modulates extracellular matrix synthesis, indicating its potential for accelerating the healing process.

Keywords: Fibroblast; trans-Cinnamic acid; Methyl cinnamate; *p*-Coumaric acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fibroblastos e suas múltiplas funções.....	21
Figura 2	Relação temporal do processo de cicatrização de feridas.....	23
Figura 3	Imagem representativa da fase inflamatória no reparo tecidual	25
Figura 4	Imagem representativa da fase proliferativa no reparo tecidual	27
Figura 5	Imagem representativa da finalização do reparo tecidual	28
Figura 6	Principais componentes da MEC e suas interações.....	30
Figura 7	Fases do ciclo celular e sua análise quantitativa por citometria de fluxo.....	33
Figura 8	Característica morfológica da linhagem de fibroblastos NIH3T3.....	36
Figura 9	Estrutura química dos ácidos hidroxicinâmicos: ácido trans-cinâmico, ácido <i>p</i> -cumárico e cinamato de metila.....	41
Figura 10	Esquema representativo do ensaio de <i>scratch</i>	44
Figura 11	Efeito do ácido trans-cinâmico, ácido <i>p</i> -cumárico e cinamato de metila sobre a viabilidade de fibroblastos murinos (NIH3T3).....	46
Figura 12	O efeito do ácido trans-cinâmico, ácido <i>p</i> -cumárico e cinamato de metila na migração celular de fibroblastos submetidos ao <i>scrach wound healing assay</i>	47
Figura 13	Efeito do ácido trans-cinâmico, ácido <i>p</i> -cumárico e cinamato de metila na progressão do ciclo celular de fibroblastos	50
Figura 14	Efeito da mitomicina C na migração de fibroblastos induzida pelo ácido trans-cinâmico, ácido <i>p</i> -cumárico e cinamato de metila.....	51
Figura 15	A inibição de vias específicas atenua a migração de fibroblastos induzida pelo ácido trans-cinâmico	52
Figura 16	Efeito do ácido trans-cinâmico nos níveis de laminina, fibronectina e colágeno tipo I em fibroblastos	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Quadro comparativo entre as diferenças entre fibroblastos ativados e não ativados.....	22
-----------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α-SMA	α -actina do músculo liso
p-CA	<i>p</i> -coumaric Acid
μM	Micromolar
μg	Micrograma
ATP	Adenosina trifosfato
AKT	Via de transdução de sinal AKT
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CD44	Glicoproteína de superfície celular
COL I	Colágeno I
COL III	Colágeno III
CREB	Via de transdução de sinal CREB
DDR2	Receptor de domínio de discoidina 2
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EPM	Erro padrão da média
FAP	Proteína ativadora de fibroblastos (<i>fibroblast activation protein</i>)
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FGF-2	<i>Fibroblast growth factor -2</i>
FGFR	<i>Fibroblast growth factor receptor</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FN	Fibronectina
G0	Fase G0 do ciclo celular
G1	Fase G1 do ciclo celular
G2	Fase G2 do ciclo celular
HCA	Ácido hialurônico (<i>hialuronic acid</i>)
HaCaT	Queratinócitos humanos
HT-29	Células cancerígenas do cólon humano
HDF	Fibroblastos dérmicos humanos

ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
JNK-IN-8	Inibidor irreversível da via JNK
KGF	<i>Keratinocyte growth factor</i>
KG-501	Inibidor da via CREB
LM	Laminina
M	Fase M do ciclo celular
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
MEC	Matriz extracelular
MEF	Fibroblastos embrionários murinos
Mit. C	Mitomicina C
MI	Mililitro
MMP	Metaloproteinase de matriz
MSC	<i>Mesenchymal stem cells</i>
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
NIH3T3	Fibroblastos embrionários murinos
NHDF	Fibroblastos dérmicos humanos normais
p38 MAPK	Via de transdução de sinal p38 MAPK
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PI	<i>Propidium iodide</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinases</i>
PKI-(6-22)-amide	Inibidor do fragmento (6-22)-amide da via PKA
PKA	Via de transdução de sinal PKA
rhEGF	<i>Recombinant human epidermal growth factor</i>
RNase	Ribonuclease
S	Fase S do ciclo celular
SB203580	<i>Pyridinyl imidazole inhibitor</i> , utilizado para investigar os efeitos da via p38 MAPK
SB202190	Inibidor altamente seletivo da via p38 MAPK
SBF	Soro bovino fetal

SLRP	Proteoglicanos ricos em lisina
TE-7	Anticorpo; Marcador para fibroblastos
TGF-β1	Fator transformador de crescimento – β 1
TGF-2	Fator transformador de crescimento – 2
Thy1	Thy-1 membrane glycoprotein
TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TLR-2	<i>Toll-like receptor 2</i>
TLR-4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TNF-α	Papel do fator de necrose tumoral - α
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3 REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 FIBROBLASTOS	20
3.2 FIBROBLASTOS NO REPARO TECIDUAL	21
3.2.1 Fase inflamatória.....	25
3.2.2 Fase proliferativa.....	26
3.3.3 Fase de remodelamento.....	27
3.3 MATRIZ EXTRACELULAR.....	29
3.4 REGULAÇÃO DO CICLO CELULAR.....	31
3.5 VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NA REGULAÇÃO DE FIBROBLASTOS.....	34
3.6 MÉTODOS <i>IN VITRO</i> PARA INVESTIGAR A FUNÇÃO DE FIBROBLASTOS	35
3.7 FATORES QUE AFETAM A FUNÇÃO DE FIBROBLASTOS	37
3.7.1 Abordagens terapêuticas relacionadas à eventos de cicatrização	38
3.8 PRODUTOS NATURAIS.....	39
3.8.1 Compostos fenólicos	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1 REAGENTES.....	42
4.2 CULTIVO CELULAR.....	42
4.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE MTT	42
4.4 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR.....	43
4.5 <i>SCRATCH WOUND ASSAY</i>	43
4.6 PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS DA MEC.....	44
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
5 RESULTADOS.....	46
5.1 Efeito do ácido trans-cinâmico, ácido <i>p</i> -cumárico e cinamato de metila sobre a viabilidade celular.....	46

5.2 Efeito do ácido do ácido trans-cinâmico, ácido <i>p</i> -cumárico e cinamato de metila sobre capacidade migratória de fibroblastos	46
5.3 Efeito do ácido trans-cinâmico, ácido <i>p</i> -cumárico e cinamato de metila sobre o ciclo celular de fibroblastos.....	49
5.4 Efeito da Mitomicina C na migração de fibroblastos induzida por ácidos hidroxicinâmicos...	51
5.5 O papel da vias de sinalização p38-MAPK, JNK e PKA na atividade migratória do ácido trans-cinâmico	52
5.6 Efeito do TCA sobre a síntese de proteínas de matriz extracelular.....	53
6 DISCUSSÃO.....	56
7 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS.....	61

1. INTRODUÇÃO

Os fibroblastos são células que atuam em diversos tecidos e órgãos, como a derme. Responsáveis por depositar constituintes da matriz extracelular, o que demonstra sua participação na arquitetura e suporte estrutural para os tecidos (MEC) (DRISKELL; WATT, 2015). Também são células sentinelas capazes de responder a diversos estímulos químicos, mecânicos ou físicos. Essa resposta dá-se principalmente através da sua mudança fenotípica e funcional, onde o fibroblasto parte de um estado de quiescência para um estado ativado que exibe fenótipo secretor, proliferativo e contrátil. Após ativados, e agora denominados miofibroblastos, essas células se mostram capazes de realizar uma variedade de funções biológicas, incluindo participação no reparo tecidual após lesão (HINZ et al., 2012; SERINI; GABBIANI, 1999; SERVAIS; EREZ, 2013; TOMASEK et al., 2002).

Quando um tecido é lesado, a continuidade em sua estrutura é rompida e as células presentes nele serão expostas ao novo ambiente. Essa exposição, funciona como gatilho de ativação para células sentinelas que darão início ao processo de reparo que é composto por eventos celulares e bioquímicos, orquestrados para restaurar a integridade tecidual (PARK; BARBUL, 2004). Essa resposta possui três fases distintas, subsequentes e que se sobrepõem: uma fase inflamatória, seguida pela fase proliferativa, e culmina na fase de remodelamento (DULMOVITS; HERMAN, 2012). Durante esse processo, os fibroblastos mostram-se envolvidos desde a fase inflamatória até a fase de remodelamento, exibindo funções como migração, proliferação e remodelamento. Cada uma dessas funções deve ocorrer de forma coordenada e controlada; pois, qualquer alteração positiva ou negativa desses parâmetros pode ocasionar em falhas de reparo, gerando feridas crônicas, ou ainda fibrose tecidual (ZIELINS et al., 2015). Mesmo que em certas condições fibrosantes, como a esteatose hepática, as alterações nas funções de fibroblastos possam levar à fibrose tecidual, em outras circunstâncias, a estimulação das funções de fibroblastos mostra-se vantajosa sob aspecto clínico, como no caso da cicatrização tecidual. Estratégias de manejo de feridas, ou fármacos capazes de acelerar a cicatrização, seja por estimular a produção de matriz extracelular e a proliferação de fibroblastos, são de grande importância para o tratamento das feridas cutâneas.

Como as funções dos fibroblastos podem ser moduladas por fatores exógenos e/ou endógenos, como úlceras de pressão, distúrbios metabólicos, hipertensão e idade, estudos que

visam a descoberta de moléculas bioativas capazes de aumentar a competência dos fibroblastos, a fim de melhorar os parâmetros funcionais de forma coordenada e contínua são cada vez mais necessários. Assim, estudos são necessários para a caracterização das funções biológicas de moléculas bioativas com propósito de acelerar o processo de reparo de modo eficiente e satisfatório.

Neste sentido, cabe destacar o importante papel que produtos obtidos de fontes naturais representam para obtenção de novos fármacos (CHEN et al., 2016). A crescente popularidade das terapias naturais estimula a pesquisa sobre o uso de compostos derivados de plantas no gerenciamento de feridas (AGRA et al., 2015; CHEN et al., 2016). Além disso, os fitoquímicos têm sido utilizados no tratamento de feridas durante anos. Os fitoquímicos compreendem várias famílias químicas, tais como alcalóides, flavonóides, terpenóides e compostos fenólicos (DZIAŁO et al., 2016). Os compostos fenólicos são amplamente distribuídos na natureza e são reconhecidos por suas propriedades antimicrobiana, antitumoral, anti-inflamatória e cicatrizante. Dentre eles, os ácidos hidroxicinâmicos que inclui o ácido trans-cinâmico, o ácido *p*-cumárico, e o cinamato de metila estão presentes de forma abundante em frutas e cereais. De uma maneira geral, a ação benéfica desses compostos na saúde humana vem sendo relacionada com suas atividades antioxidante microbianas, antitumorais, antiinflamatórias e de cicatrização de feridas (EL-SEEDI et al., 2012; NAGASAKA et al., 2007). Porém, até o momento estudos que descrevam os efeitos desses ácidos hidroxicinâmicos sobre funções de fibroblastos são escassos. Portanto, neste trabalho objetivamos investigar *in vitro* o efeito do ácido trans-cinâmico, do ácido *p*-cumárico e do cinamato de metila sobre algumas funções de fibroblastos relacionados aos eventos de cicatrização tecidual, como a migração, mitose e produção de matriz extracelular.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de três ácidos hidroxicinâmicos: ácido trans-cinâmico, cinamato de metila e ácido *p*-cumárico sobre as funções de fibroblastos *in vitro*, além de sugerir o mecanismo subjacente.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

De modo específico, buscou-se avaliar:

1. O efeito dos ácidos hidroxicinâmicos sobre a viabilidade de fibroblastos.
2. O efeito dos ácidos hidroxicinâmicos as fases do ciclo celular de fibroblastos.
3. O efeito dos ácidos hidroxicinâmicos sobre a migração de fibroblastos.
4. O envolvimento de vias intracelulares de sinalização envolvidas nos efeitos do ácido trans-cinâmico em fibroblastos.
5. O efeito do ácido trans-cinâmico sobre a produção de matriz extracelular em fibroblastos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 FIBROBLASTOS

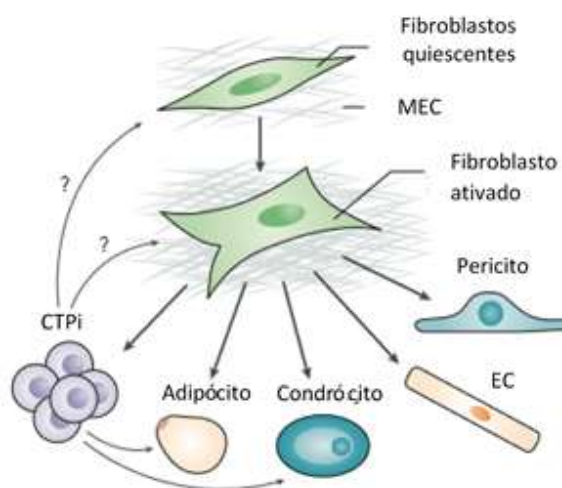
Os fibroblastos são células mesenquimais, com morfologia alongada e fusiforme, que se localizam principalmente nos tecidos conjuntivos, com o papel de sintetizar/depositar colágeno e fibras elásticas na matriz extracelular (MEC) (DRISKELL; WATT, 2015). Ainda que comuns, os fibroblastos são pouco caracterizados, sendo diferenciados principalmente por sua heterogeneidade funcional, de acordo com o tecido e o nível de desenvolvimento que se encontram (DRISKELL et al., 2011). De fato, esse tipo celular pode ser encontrado em diferentes órgãos e com origens embrionárias distintas (DRISKELL et al., 2011). Por exemplo, fibroblastos da pele da face têm como precursores as células da crista neural, já os presentes nos tecidos ventrais são derivados das placas laterais mesodérmicas, enquanto os fibroblastos do tecido dorsal são derivados dos dermomiótomos (FERNANDES et al., 2004; JINNO et al., 2010).

As características dos fibroblastos não são definidas, apenas, através das suas origens distintas, mas também pela sua diferenciação topográfica, de tal forma que populações individuais de fibroblastos possuem transcriptomas distintos que podem ser utilizados para determinar sua posição no corpo (JINNO et al., 2010). A derme, tecido conectivo subjacente à epiderme, é um exemplo característico de como, em um mesmo sítio tecidual e no mesmo estágio de desenvolvimento, esse tipo celular pode ser notavelmente diverso (BAYREUTHER et al., 1988; SORRELL, 2004). Por exemplo, os fibroblastos presentes nas bases dos folículos capilares ou papilas dérmicas (PD) possuem propriedades específicas e necessárias para a morfogênese dos folículos pilosos e coordenação do ciclo capilar (LEE; TUMBAR, 2012; SENNETT; RENDL, 2012). Além disso, há estudos que demonstram que algumas células das PDs possuem o potencial de se diferenciarem em outros tipos celulares (BIERNASKIE et al., 2009).

Também vale a pena ressaltar, que não existe um único marcador utilizado na identificação de fibroblastos; dependendo do tecido, combinações de marcadores, incluindo a proteína de superfície celular Thy1, o filamento vimentina, o receptor de colágeno DDR2, bem como a reatividade ao anticorpo monoclonal TE-7 podem ser utilizados para marcar fibroblastos (SORRELL, 2004; SORRELL; CAPLAN, 2009). Outro ponto importante, são as semelhanças entre fibroblastos e outros tipos celulares, como as células musculares lisas e as células-tronco

mesenquimais (MCSs), como observado na Figura 1. Estes tipos celulares também apresentam a característica de contractilidade além das semelhanças morfológicas (HALL, 2006). Mesmo contendo diferentes marcadores os fibroblastos dos diferentes tecidos são responsivos a diversos sinais, respondendo a lesões e neoplasias, saindo do estado de quiescência e apresentando um fenótipo secretor, proliferativo e contrátil. Esta população heterogênea de fibroblastos ativados, agora denominados miofibroblastos, determina uma variedade de funções biológicas, desempenhando um papel importante, principalmente, no reparo tecidual após lesão, como pode-se observar na Tabela 1, que compara as diferenças entre fibroblastos ativados e não ativados (SERVAIS; EREZ, 2013;).

Figura 1 - Fibroblastos e suas múltiplas funções.



Os fibroblastos ativados são facilmente transdiferenciados em condrócitos, miócitos, adipócitos e células endoteliais (EC). Além disso, podem se adaptar as funções perivasculares e vasculares. As células tronco pluripotentes (CTPi) foram modificadas, primeiramente, utilizando fibroblastos ativados, como fonte de reprogramação celular. Essa natureza plástica dos fibroblastos contribui diretamente para sua heterogeneidade funcional. MEC, matriz extracelular. Fonte: Adaptado de KALLURI, 2016.

Dentre as principais funções dos fibroblastos, a migração é um evento crucial no desenvolvimento e regeneração tecidual. Essas células são quimicamente atraídas por fragmentos de MEC e/ou produtos celulares para um determinado local, como por exemplo uma ferida cutânea. Além disso, outra característica dos fibroblastos, é a sua forte adesão aos componentes da MEC, como proteoglicanos (KUBOW et al., 2015). A proliferação de fibroblastos possui um papel importante na formação do novo tecido, agindo diretamente na quantidade sintetizada da nova MEC, fator determinante no remodelamento tecidual. Contudo, distúrbios na sinalização ou o

comportamento inadequado dessas células resulta em diversas modificações teciduais, caracterizadas principalmente por alterações na quantidade e/ou qualidade da MEC do tecido lesado (HECKMANN e KRIEG, 1989; AVERY et al., 2018).

Assim, patologias que ocasionam alteração da função do órgão afetado, como a fibrose e o câncer, são caracterizadas pelo acúmulo aberrante de fibroblastos no tecido (AVERY et al., 2018). Por exemplo, a proteína ativadora de fibroblastos (FAP) é um marcador de fibroblastos ativados em resposta à lesão, condições inflamatórias e fibrose (ACHARYA et al., 2006; BAUER et al., 2006; LEVY et al., 1999). Na maioria de tumores derivados do epitélio, a FAP e a α -actina do músculo liso (α -SMA - um canônico marcador de miofibroblastos) identificam subconjuntos de fibroblastos (ÖHLUND et al., 2017). De acordo com o marcador expresso, essas células são identificadas como FAP^{HI} fibroblastos ou α -SMA^{HI} miofibroblastos, que se assemelham geograficamente, mas divergem em seu impacto na tumorigênese (AVERY et al., 2018; YANG et al., 2016b).

Tabela 1 - Quadro comparativo entre as diferenças entre fibroblastos ativados e não ativados.

Fibroblastos quiescentes ou em repouso	Fibroblastos ativados
Morfolologicamente inativos (fusiformes)	Morfolologicamente ativos (estrelados)
Metabolicamente lento	Metabolicamente ativo
Ciclo celular em G0/G1	Proliferativo
Disponível a fatores de crescimento	Ativado por fatores de crescimento
FSP1+, α1β1 integrina	α SMA+, PDGFR β +, FAP+
Não-migratório	Migratório
Sem produção de MEC	Produção ativa de MEC
Sem atividade secretora	Atividade secretora ativa e dinâmica
Epigeneticamente estável	Modificado epigeneticamente (ex.: hipermetilação de RASAL 1)
Precursor de fibroblastos ativados	Precursor de iPSCs, condrócitos, adipócitos, miócitos e células endoteliais

α SMA - α -actina do músculo liso; MEC - matriz extracelular; iPSCs, - células-tronco pluripotente induzidas; PDGFR β , receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas β ; RASAL1, ativador da proteína RAS tipo 1. Adaptado de (KALLURI, 2016).

3.2 FIBROBLASTOS NO REPARO TECIDUAL

Em uma lesão, os componentes teciduais desencadeiam eventos celulares e bioquímicos que iniciam o processo de cicatrização visando eliminar o agressor e restaurar a integridade tecidual (PARK; BARBUL, 2004). Essa resposta possui três fases distintas e subsequentes que se sobrepõem: uma fase inflamatória, seguida pela fase proliferativa, e culmina na fase de remodelamento (DULMOVITS; HERMAN, 2012). Nestas fases, diversas células são estimuladas no processo de cicatrização, dentre estas: leucócitos, mastócitos, queratinócitos, fibroblastos, além de diversas citocinas e fatores de crescimento (GONZALEZ et al., 2016). Na figura 2 podemos observar como essas fases se organizam e como as células que se distribuem, atuando em uma ou mais fases.

Figura 2 - Relação temporal do processo de cicatrização de feridas.

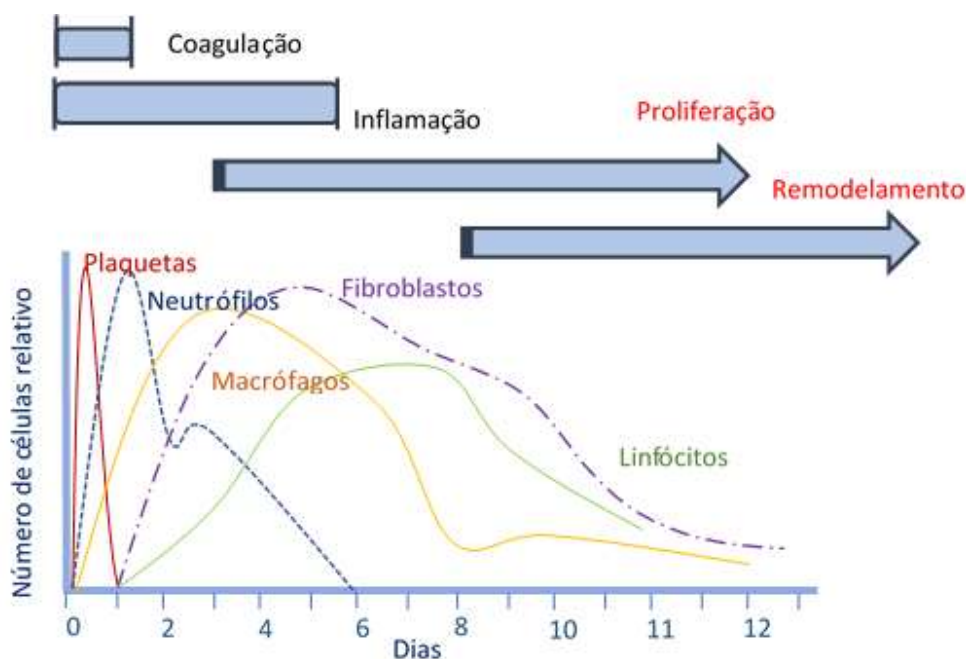


Gráfico demonstrativo da linha temporal das respostas celulares envolvidas no processo de reparo tecidual. FONTE: adaptado de PARK; BARBUL, 2004.

Os fibroblastos chamam atenção principalmente devido seus papéis proeminentes no reparo tecidual cutâneo, uma vez que sua função já se inicia na fase inflamatória, e se estende até a fase de remodelamento, onde desempenham diversas funções. Essas células são atraídas quimicamente por fatores inflamatórios produzidos por macrófagos e plaquetas, como: o fator de crescimento

derivado de plaquetas (PDGF), interleucina 1 β e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (ROZARIO; DESIMONE, 2010).

Após chegarem ao local da lesão e sob influência do fator de transformação do crescimento β (TGF- β) produzido por macrófagos, os fibroblastos são ativados a aderir às proteínas fibrosas da MEC, e iniciar a renovação do tecido pela produção de enzimas proteolíticas, como as metaloproteinases de matriz (MMPs), que se encarregam da degradação dos coágulos de fibrina e da MEC; ao mesmo tempo, será iniciada a síntese de novas moléculas estruturais, como: colágeno I e IV, glicoproteínas, proteoglicanos, laminina e ácido hialurônico, que formam o tecido de granulação. Esse novo complexo irá servir de arcabouço para os novos fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais que formarão o novo tecido (LI; WANG, 2011).

Ainda sobre efeito do TGF- β , os fibroblastos também têm papel crucial na contração e fechamento da ferida, papel atribuído a sua diferenciação em miofibroblastos. Essas novas células diferenciadas possuem características de fibroblastos e de células de músculo liso e assim como seus precursores, podem sintetizar proteínas de MEC (BAINBRIDGE., 2013). Contudo, ao contrário dos fibroblastos, as fibras de estresse dos miofibroblastos contém actina α -SMA, que atualmente é utilizada como um dos principais marcadores da diferenciação. Além disso, essas células exibem propriedades contráteis, uma vez que possuem cadeias pesadas de miosina SM ou desmina (proteínas com capacidade de sofrer contração) (DARBY et al., 2014; DESMOULIERE et al., 2014a; MOULIN et al., 1998). Essa contração é orquestrada pela adesão à MEC (via integrinas e na presença de TGF- β), rearranjo do citoesqueleto e subsequente movimento em direção as células presentes na borda da ferida, através de lemelipódios, criando um movimento de arrasto (BAINBRIDGE., 2013).

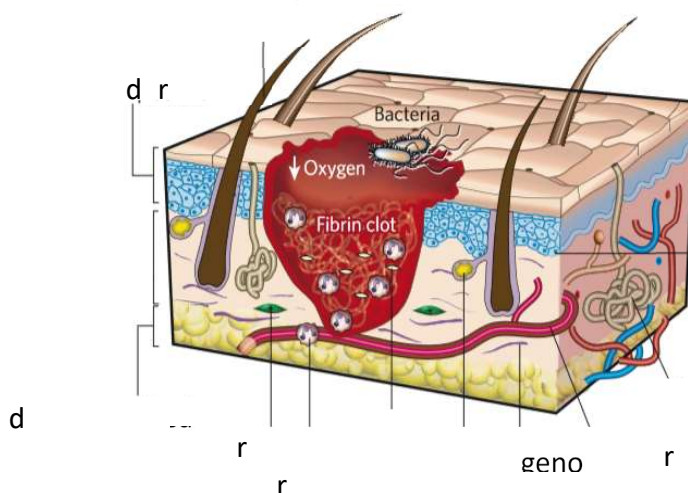
Durante o processo de remodelamento, é importante que exista um balanço entre a degradação da MEC que constitui o tecido e a síntese de proteínas que irão compor a nova estrutura. Diversas proteínas e enzimas estão envolvidas nesse balanço; a degradação da matriz é realizada pelas enzimas proteolíticas MMPs e sua ação é regulada por inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). Esse equilíbrio é orquestrado pelos miofibroblastos, uma vez que produzem e liberam MMPs, TIMPs e proteínas da MEC (VISSE; NAGASE, 2003). Por fim, ao se reestabelecer o conteúdo de moléculas estruturais, como elastina e colágeno I, o processo de apoptose dos miofibroblastos excedentes (que foram recrutados para o tecido) e células endoteliais

é iniciado rapidamente, para que más formações como cicatrizes hipertróficas e fibroses não ocorram (DARBY et al., 2014; DESMOULIERE et al., 2014b).

3.2.1 Fase inflamatória

A fase inflamatória é iniciada concomitantemente ao processo de coagulação e estende-se por um maior período de tempo (PARK; BARBUL, 2004). Após a ativação da hemostasia e agregação plaquetária no local da lesão (coagulação), os coágulos de fibrina vão servir de arcabouço para a adesão e proliferação das células inflamatórias migrantes, como observado na Figura 3 (XUE; JACKSON, 2015). O estabelecimento dessa fase é caracterizado pela permeabilidade vascular, atração quimiotática de células circulantes, produção e liberação de citocinas e fatores de crescimento por células residentes, além da ativação das células que migraram ao local lesado (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; WITTE; BARBUL, 1997)

Figura 3 - Imagem representativa da fase inflamatória no reparo tecidual.



Fase caracterizada pela formação do coágulo e migração de células inflamatórias, tem um tempo médio de duração de até 48h. FONTE: Adaptado de GURTNER et al., 2008.

Fatores como PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), TGF- β 1 (fator transformador de crescimento β 1) e TGF- β 2 são liberados durante a ativação plaquetária. Essas moléculas atuam no recrutamento de células inflamatórias ao local da lesão (DEMIDOVA-RICE; HAMBLIN; HERMAN, 2012; DULMOVITS; HERMAN, 2012). Em resposta a ativação do sistema complemento, também decorrente da ativação plaquetária; os neutrófilos são as primeiras

células a alcançar o sítio inflamatório (SINGH et al., 2013), atuando principalmente no combate a agentes externos como bactérias (GURTNER et al., 2008). Logo em seguida, células fagocíticas - macrófagos, iniciam a limpeza da ferida, fagocitando restos celulares da estrutura tecidual, além de bactérias (DEMIDOVA-RICE; HAMBLIN; HERMAN, 2012; DULMOVITS; HERMAN, 2012). Estes fagócitos também produzem e liberam fatores de crescimento e citocinas, amplificando a inflamação. Também nessa fase, células endoteliais e fibroblastos são atraídos por agentes quimiotático à lesão, facilitando a formação de novos capilares e a estruturação do novo tecido (DARBY et al., 2014). A resolução dessa fase ocorre gradativamente e é caracterizada pela apoptose das células inflamatórias (SINGH et al., 2013).

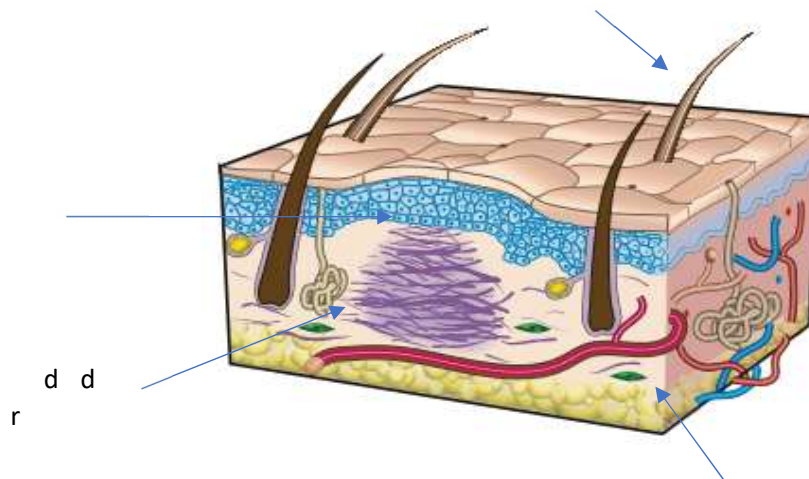
3.2.2 Fase proliferativa

Esta fase é caracterizada principalmente por eventos migratórios e proliferativos que resultam em processos como a angiogênese, reepitelização e fibroplasia (TAKEO; ITO, 2015). Essa etapa ocorre normalmente entre o quarto e o décimo primeiro dia após o início da lesão e nesse momento fatores de crescimento que atuaram na fase inflamatória irão agir de forma parácrina e endócrina na indução e manutenção da migração celular; todos esses eventos são responsáveis pela formação de um novo tecido, com uma matriz provisória, nomeado tecido de granulação (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006). Essa nova estrutura irá preencher o *gap* formado pela lesão, além de servir como suporte para o novo epitélio (DEMIDOVA-RICE; HAMBLIN; HERMAN, 2012). Na figura 4, podemos ver a disposição e o crescimento dessas novas estruturas.

À medida que a migração e proliferação das células da derme e epiderme vão ocorrendo, o fornecimento de nutrientes e oxigênio ao novo tecido vai se tornando cada vez mais necessário (DULMOVITS; HERMAN, 2012). Portanto, para que a cicatrização ocorra de forma eficiente, uma resposta angiogênica é iniciada (GOULD et al., 2015). Para isso, fibroblastos residentes no tecido, em resposta ao PDGF secretam o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) estimulando as células endoteliais, que irão degradar a membrana basal, a migrar em direção à ferida, proliferar e formar novos vasos sanguíneos (DEMIDOVA-RICE; HAMBLIN; HERMAN, 2012).

da integridade tecidual ocorrerá com a produção de uma nova MEC, que é sintetizada pelos fibroblastos que migraram e proliferaram nas fases anteriores (DEMIDOVA-RICE; HAMBLIN; HERMAN, 2012; OF; HEALING, 1999).

Figura 5 - Imagem representativa da finalização do reparo tecidual.



Essa fase é caracterizada pelo remodelamento e organização do novo tecido, essa fase pode demorar até um ano ou mais para ser finalizada. FONTE: Adaptado de GURTNER *et al.*, 2008.

O processo de remodelamento da MEC dar-se-á juntamente à contração do tecido. A nova MEC será constituída por colágeno I, fibrina, fibronectina e ácido hialurônico, sintetizados pelos fibroblastos e esse substrato fornecerá o suporte arquitetônico ao novo tecido (DEMIDOVA-RICE; HAMBLIN; HERMAN, 2012; OF; HEALING, 1999). Ao ser finalizada adequadamente, essa última fase do reparo tecidual garante o fechamento completo da ferida, além da restituição da funcionalidade tecidual (MAQUART; MONBOISSE, 2014). Contudo, se, após a lesão tecidual a fase inflamatória ainda persistir devido a presença do estímulo, as fases anteriores (inflamatória e proliferativa) se sobrepõem e intensificam a resposta dos fibroblastos levando à uma condição de reparo crônico resultando em fibrose tecidual. Portanto, a fibrose pode ser considerada como uma ferida que nunca completa seu processo de cicatrização, exibindo ativação contínua de reparo.

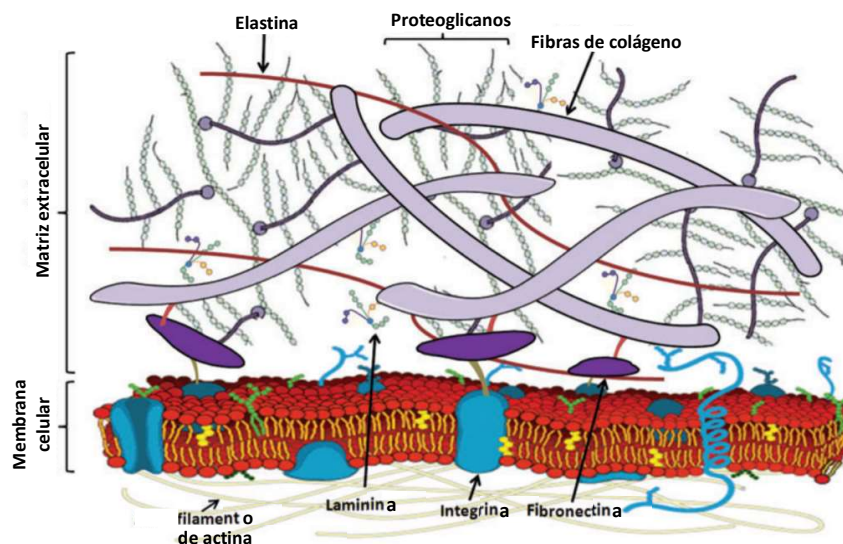
3.3 MATRIZ EXTRACELULAR

Na homeostase, os fibroblastos são protegidos contra o estresse pela arquitetura de diferentes proteínas dos tecidos conjuntivos intactos, denominada MEC, e uma das suas principais funções é manter a homeostasia dessa matriz. A MEC é uma estrutura sintetizada pelos fibroblastos e composta por diferentes fibras e proteínas, que devido ao seu arranjo e composição, fornecem um suporte bioquímico e estrutural à diversas células do tecido. Diversos estudos mostram que em conjunto, as macromoléculas da MEC (colágeno, glicoproteínas, proteoglicanos, glicosaminoglicanos e elastina) são capazes de regular funções celulares como a proliferação, migração, síntese e degradação de proteínas e apoptose, o que torna a síntese e manutenção da MEC uma das principais funções dos fibroblastos.

Um importante exemplo da regulação positiva da MEC é o reparo tecidual cutâneo, sendo essa extremamente importante nos eventos de coagulação, angiogênese e contração. Assim, os fibroblastos são responsáveis pela formação e manutenção do padrão de produção, deposição e substituição das macromoléculas da MEC (MAQUART; MONBOISSE, 2014). Primariamente, na pele, a MEC é composta por colágeno I e fibras elásticas imersas em uma substância composta por glicosaminoglicanos, proteoglicanos e glicoproteínas do tecido conjuntivo, essa composição pode ser observada na figura 6. Após a lesão, essa estrutura é rompida, e com o intuito de cessar o sangramento, a cascata de coagulação é ativada, substituindo a MEC anterior por um coágulo composto por fibrina (95%), fibronectina, trombospondina e vitronectina (CLARK et al., 1982; MAQUART; MONBOISSE, 2014).

Dentre as diversas células que agem na fase inflamatória os neutrófilos se destacam pela secreção de elastase que leva a rápida degradação da fibrina (JENNEWEIN; TRAN, 2011), iniciando o processo de degradação do coágulo. Esse processo irá desencadear a produção e liberação de diversos produtos, como: quimioatraentes, fatores de crescimento e moléculas que irão iniciar o processo de reparo (AHMANN et al., 2010; MAQUART; MONBOISSE, 2014). Com o final do processo inflamatório, fibroblastos são atraídos à ferida e iniciam a síntese do tecido de granulação. Essa nova estrutura será composta por colágeno III, elastina, proteoglicanos e ácido hialurônico (AH) que irão permitir a nutrição e oxigenação do tecido, através do aporte para o crescimento dos novos vasos sanguíneos (XUE; JACKSON, 2015).

Figura 6 - Principais componentes da MEC e suas interações.



Componentes da MEC e suas interações com a membrana plasmática. FONTE: Adaptado de XUE; JACKSON, 2013.

Especificamente, cada macromolécula é responsável por uma função. O AH é um importante glicosaminoglicano, muito abundante na pele e fornece ao tecido viscosidade, elasticidade e hidroflicidade. Além disso, interage com diversos receptores celulares como receptores do tipo Toll 2/4, CD-44 e receptores de adesão (ICAM-1). Essa interação induz diversos eventos do reparo tecidual, como: modulação da inflamação, quimiotaxia, migração e angiogênese (FRENKEL, 2014; NEUMAN et al., 2015). Além do AH outros glicosaminoglicanos promovem a modulação do reparo tecidual, como os sulfatos de heparina, condroitina e queratan (TAYLOR; GALLO, 2006). Em conjunto, essas moléculas estimulam a produção de óxido nítrico (modulador de angiogênese); liberação de interleucinas, prostaglandinas, TGF- β ; a inibição da atividade da elastase e de quimiocinas, além de estabilizarem complexos entre fatores de crescimento, como FGF (fator de crescimento de fibroblastos) e VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular), e seus receptores (MAQUART; MONBOISSE, 2014; NEVE et al., 2014).

Outros componentes estruturais da MEC, que estão envolvidos no reparo tecidual, são os proteoglicanos, mais especificamente proteoglicanos ricos em lisina (SLRPs). Na família SLRP, o versican será responsável por estimular a produção de elastina (ZHOU et al., 2004) e o sindecán, altamente expresso no tecido de granulação, estimula a migração e invasão de queratinócitos e células endoteliais possibilitando a angiogênese (STEPP, 2002). Consequentemente, quando sua

expressão está diminuída ocorre a inibição da angiogênese e do fechamento da ferida (LIN et al., 2005).

A regulação das células envolvidas direta ou indiretamente no processo de reparo é feita principalmente por glicoproteínas. A trombospondina 1, por exemplo, ativa o TGF- β que irá agir nos fibroblastos estimulando a produção da nova MEC. Outras importantes macromoléculas são fibronectina e laminina que executam uma função crucial no processo de reparo, uma vez que promovem diretamente a migração de queratinócitos e fibroblastos, além de possibilitarem a contração do tecido, por miofibroblastos, a estabilização e síntese da matriz de colágeno e a angiogênese (IORIO; TROUGHTON; HAMILL, 2015; LENSELINK, 2015; MAQUART; MONBOISSE, 2014).

O colágeno (COL) é a classe de proteínas mais abundante da MEC, estas são caracterizadas por serem proteínas em hélice-tripla e são encontradas em todos os mamíferos. Suas funções são diversas e incluem adesão, migração, morfogênese e reparo tecidual. Além disso, estão presentes na derme como proteínas fibrilares, que fornecem suporte estrutural e regulam a função das células residentes e inflamatórias (XUE; JACKSON, 2015). Existem 28 tipos de colágeno e cada um possui uma função de acordo com a sua localização e estrutura. Durante o reparo tecidual, alguns tipos de colágeno terão destaque em uma ou mais fases, uma vez que além de função estrutural, também possui atividade quimioatraente para fibroblastos e queratinócitos (HOCHSTEIN; BHATIA, 2014). A principal função do colágeno é fornecer suporte estrutural para a formação de camadas do tecido conjuntivo, para essa função destacam-se os colágenos I, II e III. Na formação do tecido de granulação ocorrerá a síntese e deposição de COL III que fornecerá ao tecido resistência à tração da ferida, sendo substituído progressivamente pelo COL I, durante a fase de remodelamento. Essa substituição ocorrerá pois o COL I é mais espesso e resistente. Em conjunto, essas características auxiliarão na restauração da continuidade e funcionalidade do tecido (BERRY, 1998; RANGARAJ; HARDING; LEAPER, 2011).

3.4 REGULAÇÃO DO CICLO CELULAR

A ativação do ciclo celular está envolvida em diversas funções de fibroblastos. A eficácia na resposta destas células a tratamentos e aos fatores de crescimento, depende da habilidade destes em estimular a competência celular dos fibroblastos, determinando os índices de divisão e

migração. O ciclo celular pode ser descrito como uma sequência de eventos que se assemelham a um relógio celular ou a um marcador, cuja atividade é perceber sinais, como fatores de crescimento e então regular comportamentos celulares, como: proliferação, quiescência e diferenciação (VANDE BERG; ROBSON, 2003).

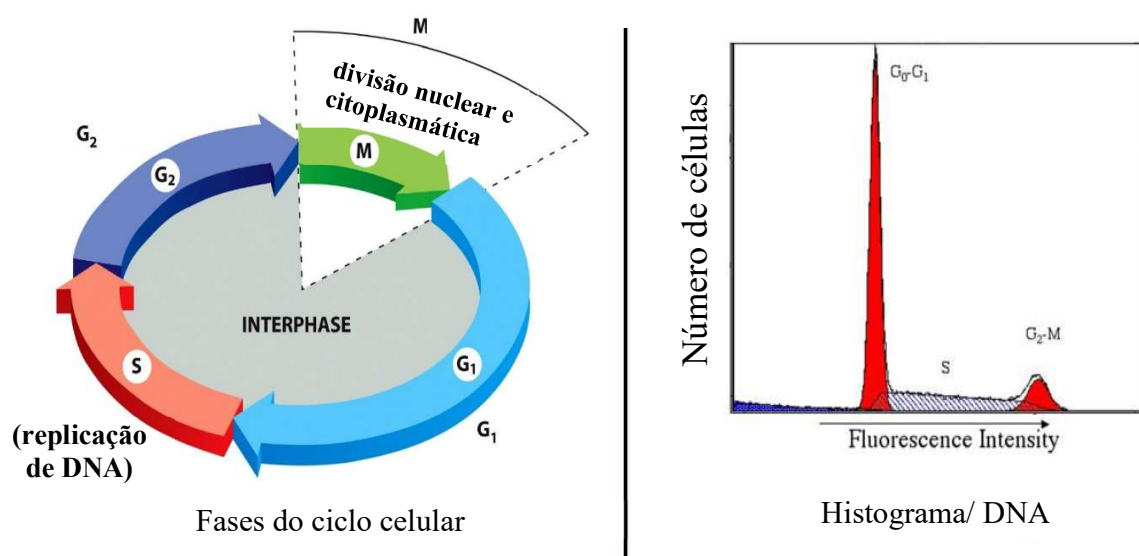
As atividades do ciclo celular são divididas em quatro fases, como mostrado na figura 7. Após a saída da mitose, a célula inicia seu ciclo pela fase G1 onde os sistemas básicos de funcionamento da célula se mantêm ativos. Ainda nesta fase, a célula entra em contato com fatores extracelulares (como fatores de crescimento), que promovem a ativação da célula e a sua progressão para a fase seguinte do ciclo celular denominado fase S. Nesta fase, assim chamada devido a síntese de DNA, ocorre o processo replicativo do material genético, onde a célula duplica seu conteúdo de DNA. Uma vez terminada a replicação do material genético na fase S, a célula avança para a fase G2, que funciona como uma preparação para a fase M, onde ocorre a duplicação do centríolo, uma estrutura chave para a fase M. A fase M, é a mitose propriamente dita, onde ocorrem as subfases responsáveis pela individualização do material genético duplicado e sua segregação em polos opostos para resultar em duas células distintas (C.H. GOLIAS; CHARALABOPOULOS; CHARALABOPOULOS, 2004).

Na pele saudável a maioria dos fibroblastos encontram-se na fase G0. Por outro lado, após a injúria tecidual, as células próximas a esse tecido serão ativadas por fatores teciduais e de crescimento, liberados durante a fase inflamatória, iniciando sua atividade em G1 e culminando na divisão e proliferação de células que irão auxiliar no reparo tecidual. Vale a pena ressaltar que fatores externos que acelerem o ciclo celular, diminuindo o número de células da fase G0/G1 e aumentando em S e/ou G2/M, vem sendo considerados fatores importantes a reconstrução tecidual por proporcionar a rápida integridade do tecido, como no caso das cicatrizações cutâneas. Além disso, para que uma célula ultrapasse a fase G1 é necessária a produção de MEC, uma vez que a interação célula-MEC é imprescindível na ativação de ciclinas, reguladores do ciclo celular (VANDE BERG; ROBSON, 2003).

Patologias como a fibrose e o câncer são caracterizadas por disfunções no ciclo celular, no qual se observa um acúmulo aberrante de fibroblastos, assim como, de MEC, o que resulta na alteração da função do órgão afetado (SERVAIS; EREZ, 2013). Contudo, ao associar essas informações ao fato de fibroblastos serem as células mais populosas da derme e capazes de produzir colágenos e outras proteínas da MEC, entende-se que o estudo e desenvolvimento de novas

moléculas capazes de estimular a entrada destas células no ciclo celular, aumentando conseqüentemente sua competência no ambiente lesado, é de extrema importância para o tratamento de lesões caracterizadas por deficiência na resposta de fibroblastos (BARTKOVA et al., 2003; MAO et al., 2016).

Figura 7 - Fases do ciclo celular e sua análise quantitativa por citometria de fluxo.



- a) Imagens representativa do ciclo celular. b) Quantificação de material genético e representação das fases por citometria de fluxo. FONTE: Adaptado de Alberts, 2012.

Atualmente, algumas técnicas estabelecidas na literatura permitem a análise quantitativa em relação ao conteúdo de DNA nas células. Permitindo assim, a identificação individual da fase específica do ciclo celular em que uma população está. Essa análise pode ser feita por citometria de fluxo utilizando células marcadas com iodeto de propídio, um corante fluorescente que se intercala ao DNA. Isso permite a clara separação de células em G₁, S ou G₂/M. Além disso, esta abordagem pode ser utilizada para investigar os efeitos de diferentes estímulos e agentes farmacológicos sobre a progressão do ciclo celular, em diferentes linhagens e tipos celulares (CECCHINI; AMIRI; DICK, 2012).

3.5 VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NA REGULAÇÃO DE FIBROBLASTOS

Diversos eventos como angiogênese, migração celular, proliferação, contração, inflamação e remodelamento estão envolvidos direta ou indiretamente na ativação de fibroblastos. Todos esses eventos de forma individual e/ou conjunta são regulados por uma ou mais vias de sinalização (PARK; BARBUL, 2004). A capacidade dos fibroblastos em exercer suas funções depende da ativação de diversos fatores que irão estimular sua competência, ativada por vias conhecidas ou que ainda estão sendo estudadas. Estas, são compostas por diversas moléculas que podem orquestrar a funcionalidade celular através de uma complexa rede de sinais, provenientes de receptores de superfície celular, fatores solúveis, outras células e/ou receptores de MEC, como: integrinas, fatores de crescimento, citocinas, interleucinas e fatores teciduais (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; SCHWARTZ; GINSBERG, 2002; WITTE; BARBUL, 1997).

Para o desenvolvimento de novas terapias e moléculas eficientes no tratamento de lesões teciduais é necessário estipular não apenas um sintoma ou mecanismo fisiológico, mas também um alvo celular e molecular de interesse. Para isso, entender os mecanismos moleculares e celulares envolvidos na regulação dos fibroblastos é de extrema importância para o desenvolvimento de novos tratamentos (DEMIRCI et al., 2018).

Dentre as diversas vias de sinalização existentes, a via da AKT (proteína quinase específica da serina-treonina) e suas moléculas efetoras orquestram eventos envolvidos na cicatrização de feridas (CASTILHO; SQUARIZE; GUTKIND, 2013). De forma específica, a via PI3K-Akt-mTOR, além da síntese de proteínas envolvidas no metabolismo também regula a proliferação, diferenciação e migração celular. Sendo regulada por fatores de crescimento como PDGF e pelo fator de crescimento epidérmico (EGF) (XUE; HEMMINGS, 2013).

A via da PKA, assim como AKT também está envolvida no reparo tecidual (HOWE *et al.*, 2005), uma vez que regula de forma positiva e negativa a migração e invasão celular, estimulando o rearranjo do citoesqueleto de fibroblastos (EDIN; HOWE; JULIANO, 2001; O'CONNOR; MERCURIO, 2001). Deldhandi, Johannessen e Moens, em 2005, descreveram o envolvimento da p38-PKA na fosforilação da quinase CREB em fibroblastos NIH3T3, vias de sinalização intimamente relacionadas à migração e proliferação celular.

Um importante complexo envolvido no reparo tecidual é a cascata da MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) c-Jun N-terminal (JNK), envolvida principalmente na resposta

apoptótica e pró-inflamatória (DAVIES; TOURNIER, 2012). Além disso, a JNK também está envolvida nos eventos de proliferação, sobrevivência e diferenciação celular (DAVIES; TOURNIER, 2012). Assim como a JNK, a p38-MAPK é uma MAPK ativada pelo estresse, uma vez que são ativadas por fatores externos que culminam em uma reação de estresse celular (HUANG; SHI; CHI, 2009), como: LPS, citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento (CUADRADO; NEBREDA, 2010).

A via p38-MAPK envolve quatro proteínas quinases que atuam sequencialmente interpretando diversos estímulos externos e respondendo apropriadamente através de diversos efeitos biológicos, incluindo reparo tecidual e angiogênese (HARPER, 2005). Nessa via existem receptores de fator de crescimento de fibroblastos (FGFR), por exemplo o FGF-2, que ativa a p38 para induzir a proliferação e migração de fibroblastos (LI et al., 2012; MAHER, 2002). A inibição da via p38-MAPK influencia negativamente o reparo tecidual, uma vez que a utilização de inibidores específicos, SB203580 e SB202190, resulta na diminuição na migração e aumento da apoptose em fibroblastos (CUADRADO; NEBREDA, 2010; KINASE et al., 1998).

Ainda assim, o papel da p38 no reparo tecidual ainda é muito controverso, uma vez que quando ativada em feridas agudas resulta em uma completa recuperação da injúria, já em feridas crônicas essa ativação pode resultar em um reparo não satisfatório (LOUGHLIN; ARTLETT, 2011).

3.6 MÉTODOS *IN VITRO* PARA INVESTIGAR A FUNÇÃO DE FIBROBLASTOS

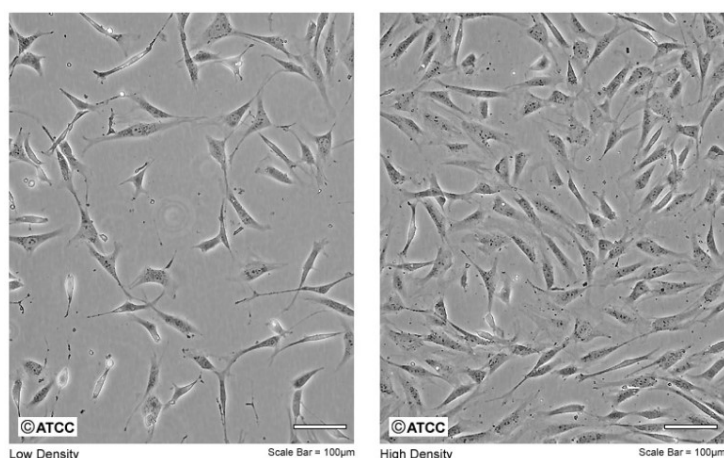
Sistemas *in vitro* são rápidos, simples e geralmente de baixo custo, além de não envolver animais e considerações éticas para estudos *in vivo*. Somado ao fato de serem realizados em ambientes controlados, os ensaios de cultura celular são indicados para o estudo de agentes farmacológicos que podem ser investigados de forma simultânea, sem a variação e heterogeneidade de estudos *in vivo* (GOTTRUP; ÅGREN; KARLSMARK, 2000).

Para mimetizar o reparo tecidual *in vitro* é importante entender o papel funcional dos fibroblastos na homeostasia dos tecidos, além de sua função nas três fases do reparo. Uma vez que o reparo é dinâmico e envolve diferentes fases e estágios. O estudo da cicatrização *in vitro*, normalmente é feito através de ensaios de migração que simulam o estresse mecânico o qual as células são submetidas *in vivo*. Nesses ensaios, em uma monocamada de células confluentes é

realizada a injúria (ferida), caracterizada pela formação de um “gap” que será preenchido por uma população de células a serem quantificadas e analisadas (LIANG; PARK; GUAN, 2007).

Ensaio neste formato nomeiam-se ensaios de *healing* ou *scratch*, que normalmente são realizados no formato bidimensional (2D). O princípio do *scratch* é o rompimento mecânico na confluência de uma monocamada de células em cultivo, composto por três etapas: formação do *gap* (ferida), monitoramento do reparo da ferida (fechamento do *gap*) e análise de dados (documentados por *time-lapse*) (LIANG; PARK; GUAN, 2007; STAMM et al., 2016). O fechamento do *gap* pode ocorrer pela ação combinada da migração celular e proliferação das células (GOTTRUP; ÅGREN; KARLSMARK, 2000).

Figura 8 - Característica morfológica da linhagem de fibroblastos NIH3T3.



Imagens do fibroblasto embrionário NIH3T3 em cultivo *in vitro*. FONTE: ATCC (*American Type Culture Collection*)

Para o estabelecimento de um método satisfatório, a escolha da linhagem celular é muito importante. Como já explanado anteriormente, fibroblastos são a célula alvo para o reparo tecidual e a identificação de novas terapias capazes de influenciar suas funções pode servir de base para o desenvolvimento de novos agentes com potencial de acelerar o fechamento da ferida. Dentre as mais diversas linhagens de fibroblastos, a linhagem de fibroblastos embrionários de camundongo NIH3T3, Figura 8, vem sendo amplamente utilizada para identificar moléculas que estimulam ações proliferativas (LIANG et al., 2015), migratórias (KUONEN et al., 2013; SIMPSON; LO; SUN, 2017), produção de MEC (CHEN et al., 2016; WANG; LIN-SHIAU; LIN, 2000), e na investigação de vias envolvidas no reparo tecidual (DELGHANDI; JOHANNESSEN; MOENS, 2005).

3.7 FATORES QUE AFETAM A FUNÇÃO DE FIBROBLASTOS

Para que o reparo tecidual seja eficiente, as três fases e suas funções fisiológicas devem ocorrer de forma adequada, no tempo ideal, mantendo a continuidade e sequência adequada. Diversos fatores podem afetar a eficiência do processo de reparo; fatores locais influenciam diretamente nas características da lesão, enquanto fatores sistêmicos afetam na capacidade de cura do indivíduo (GUO; DIPIETRO, 2010).

Dentre os fatores locais podemos citar a oxigenação, uma vez que o O₂ é importante para a produção de ATP e metabolismo celular, fatores essenciais no processo de cicatrização. Além de induzir angiogênese, síntese de colágeno, diferenciação de queratinócitos, proliferação de fibroblastos e proteção contra infecções (RODRIGUEZ et al., 2008). A falta de oxigênio, em feridas agudas, pode estimular a produção de citocinas e fatores de crescimento, promovendo angiogênese, migração e quimiotaxia (BISHOP, 2014). Outro importante fator local são as infecções causadas por microrganismos, que poderão liberar endotoxinas, intensificando e prolongando a fase inflamatória, com conseqüente retardo no reparo (GUO; DIPIETRO, 2010).

Dos fatores sistêmicos que influenciam indiretamente o processo de reparo, a idade é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como o um dos fatores que afetam o curso do processo de cicatrização. A influência da idade dá-se principalmente através de alterações nas respostas inflamatórias, atrasando a síntese de proteínas de matriz e respostas celulares (SWIFT et al., 2001). Outro importante fator que pode afetar sistemicamente o reparo é o estresse. É conhecido que o estresse regula positivamente a produção e secreção de glicocorticoides, como cortisol; que irá influenciar nos níveis de citocinas inflamatórias no local da injúria. Como conseqüência, há um atraso considerável no reparo (BOYAPATI; WANG, 2007).

O diabetes, também um fator sistêmico, afeta milhões de pessoas mundialmente. É amplamente documentado que indivíduos diabéticos exibem um retardo no reparo de feridas agudas, o que os tornam susceptíveis a desenvolver feridas crônicas. Complicações em feridas de indivíduos diabéticos podem acarretar no desenvolvimento de úlceras e até amputação de membros. Essas complicações em indivíduos diabéticos são decorrentes de disfunções celulares, angiogênese prejudicada, hipóxia, alto nível de MMPs, diminuição da resistência imune e neuropatias; conseqüências da patologia. Outros fatores que influenciam principalmente na falha ou prolongamento da fase inflamatória, também estão envolvidos no retardo da cicatrização, como:

obesidade, medicações, nutrição, cigarro e álcool (BALSA; CULP, 2015; GUO; DIPIETRO, 2010).

Em conjunto, essas alterações sistêmicas ou de estímulos persistentes, ocasionam disfunções na resposta de fibroblastos, levando à cicatrização tardia e/ou incompleta, esse quadro pode resultar em feridas crônicas ou úlceras. Nesses casos, o esforço e a hiperativação dos fibroblastos, pode levar a uma resposta exacerbada, resultando em cicatrizes patológicas (MENKE et al., 2007) ou na não recuperação tecidual. Especificamente, o retardo na cicatrização de feridas está associado a dores e limitações funcionais, aumento do risco de infecção e formação de úlceras malignas. O considerável impacto socioeconômico das feridas crônicas é perpetuada pela crescente incidência de condições que predispõem os pacientes a elas, ou seja, obesidade e diabetes. Segundo a Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica, o Brasil registrou um aumento de 60% no número de diabéticos e obesos desde 2009. Além disso, estima-se que até 2035 o número de diabéticos aumente mais de 150% (SBCBM, 2019). Essas estatísticas são acompanhadas por uma população idosa em expansão, que ainda está mais predisposta à lesão cutânea, devido à diminuição da espessura na pele e da integridade mecânica (ZIELINS et al., 2015).

3.7.1 Abordagem terapêutica para eventos relacionados à cicatrização

Uma vez que o processo de cicatrização, nem sempre, mostra-se eficiente e que múltiplos fatores prejudicam uma ou mais fases do processo de reparo a nível local e sistêmico, se faz necessário o desenvolvimento de novas técnicas de manejo de feridas, ou ainda, a caracterização de novas moléculas que sejam capazes de estimular a cicatrização (BALSA; CULP, 2015; CHEN et al., 2016). Além disso, existem diversos esforços que objetivam aumentar a competência celular, a fim de acelerar e aumentar a produção do tecido de granulação, aumentar o fluxo sanguíneo local e aumentar a produção de fatores de crescimento e citocinas (GEOFFREY; BARRANDON; LONGAKER, 2012; GOULD et al., 2015). Nesta abordagem, os fibroblastos vêm sendo considerados alvos celulares importantes por seu potencial determinante para as fases finais da cicatrização cutânea (PACHUAU, 2015).

Para se ter uma ideia, vários estudos já reportam os fibroblastos como células-alvo para ações de novas estratégias terapêuticas. Como exemplo, Brignant e colaboradores (2013) reportaram que polímeros contendo nanopartículas carregadas com FGF aumentam a eficiência do processo de reparo em camundongos diabéticos (BRIGANTI et al., 2013). Outro estudo mostra

que o rhEGF encapsulado por microesferas, possui efeito terapêutico em úlceras diabéticas, uma vez que estimula a proliferação de fibroblastos murinos (DONG et al., 2016). Além da proliferação, terapias que promovem a migração de fibroblastos também são amplamente estudadas, como por exemplo, a administração de MEC temporária na injúria, que já vem sendo clinicamente utilizada (KASUYA; TOKURA, 2014). Mesmo com todos esses avanços no campo do reparo tecidual, a procura por agentes cicatrizantes ainda continua sendo um desafio, uma vez que o mecanismo de reparo ainda não foi completamente elucidado (FATIMA et al., 2008).

Sendo assim, a necessidade de desenvolver terapias que estimulem as funções de fibroblastos, acelerando o processo de cicatrização de modo eficiente e satisfatório é um fator que impulsiona novas pesquisas. Diante disso, a descoberta de moléculas naturais e sintéticas menos invasivas, com menos efeitos colaterais e capazes de estimular uma melhor atividade dos fibroblastos é extremamente relevante. Para esses estudos é interessante a utilização de técnicas onde seja possível realizar um *screening* dessas moléculas, tornando essas pesquisas mais rápidas e satisfatórias.

3.8 PRODUTOS NATURAIS

Os produtos naturais ainda são uma importante fonte de agente terapêuticos, uma vez que a complexidade estrutural desses compostos possibilita as modificações químicas necessárias para a otimização do seu uso. Moléculas com potencial cicatrizante são encontradas nas mais diversas classes de produtos naturais e seus derivados (FATIMA et al., 2008). Dentre essas moléculas podemos citar o ácido asiático, representante da família dos terpenos (hidrocarbonetos naturais de cadeia aberta ou cíclica) e principal constituinte do Madecassol[®], formulado a partir do extrato de *Centella asiática* e responsável pela estimulação da síntese de colágeno em injúrias teciduais (FATIMA et al., 2008; INAMDAR et al., 1996). Outro importante representante natural é a embelin, quinona obtida do extrato de *Embelia ribes*, que possui potente efeito cicatrizante. Quando administrada por via oral, em animais, a embelin promove reepitelização e remodelamento da ferida, uma vez que estimula a produção de proteínas de MEC (CRONIN; SCHULTZ, 1996).

3.8.1 Compostos fenólicos

Integrando o grupo de substâncias de origem vegetal, os compostos fenólicos são conhecidos por suas propriedades antimicrobiana, antitumoral, anti-inflamatória e cicatrizante (DEMIDOVA-RICE; HAMBLIN; HERMAN, 2012; ORAK et al., 2016). São abundantemente encontrados em cogumelos, frutas e vegetais associados à redução de riscos cardiovasculares e outras doenças crônicas (SPENCER et al., 2008). Caracterizados pela presença de um ou mais anéis aromáticos ligados a anéis hidroxila e/ou substitutos, são classificados de acordo com o número de anéis fenólicos e com as estruturas às quais estão ligados (MOURA et al., 2011).

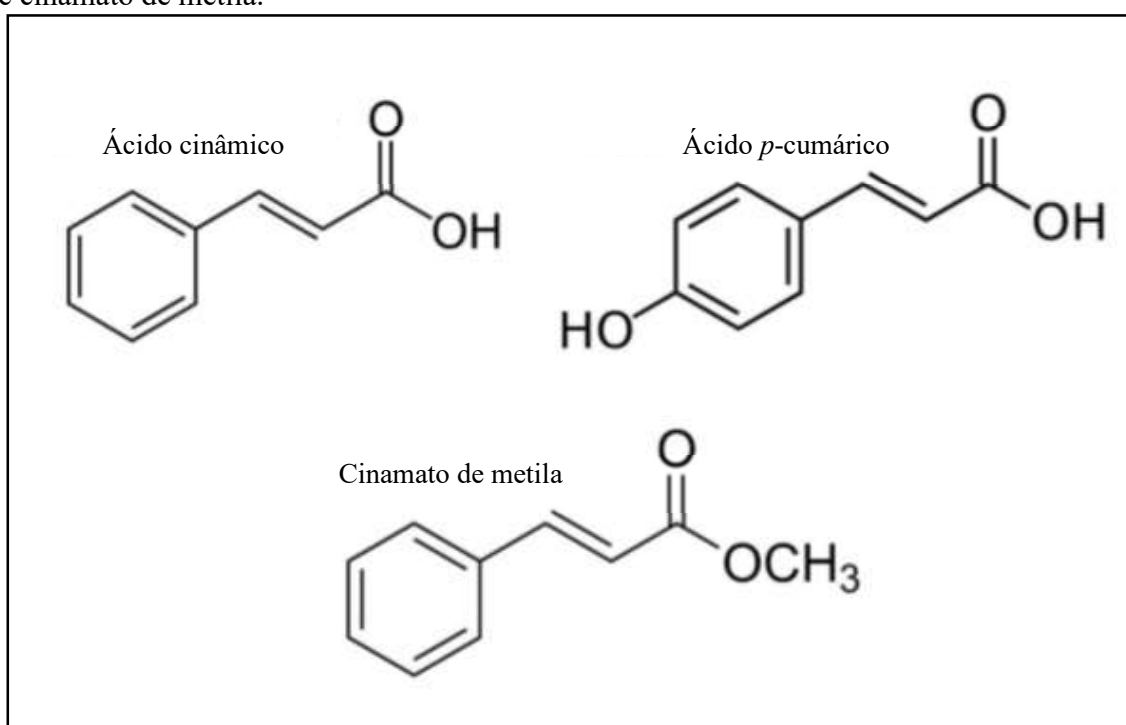
De acordo com o grupo funcional que apresentam, os compostos fenólicos podem ser classificados como ácidos hidroxibenzoicos ou hidroxicinâmicos. Os ácidos hidroxicinâmicos (HCAs) constituem a maior família de ácidos fenólicos, a família do ácido cinâmico, do qual fazem parte os ácidos ferúlico, caféico e *p*-cumárico, os quais estão presentes em cereais, café, frutas e vários alimentos e bebidas (MOURA et al., 2011). Esses compostos são metabolitos secundários, derivados dos aminoácidos fenilalanina e tirosina, possuem um esqueleto de carbono C₆C₃ com uma ligação dupla na cadeia lateral e podem ter uma configuração *cis* ou *trans* (EL-SEEDI et al., 2012).

Essas moléculas são raramente encontradas na forma livre, exceto em alimentos fermentados e processados. Diversos efeitos terapêuticos são associados aos derivados do ácido cinâmico, como efeito antioxidante (ORAK et al., 2016), anti-inflamatório (GABRIELE et al., 2017) e pró-angiogênico (CHOI et al., 2009), além de potencial cicatrizante (PHAN et al., 2001). Estudos recentes relataram que os ácidos hidroxicinâmicos exercem efeitos benéficos à saúde, como a redução dos níveis de glicose no sangue (KASPRZAK et al., 2018). Ácidos hidroxicinâmicos, como ácido *trans*-cinâmico, ácido *p*-cumárico e cinamato de metila têm sido reportados por possuírem efeitos antioxidantes, uma característica importante na cicatrização de feridas (AGAR et al., 2015). Além disso, tem sido relatado que o ácido *trans*-cinâmico melhora os efeitos dermatotóxicos induzidos pela luz UV, em fibroblastos dérmicos humanos e na pele de camundongos (HSEU et al., 2018). Além disso, o ácido *trans*-cinâmico também aumenta a capacidade de células imunes fagocíticas, um fenômeno importante para o processo reparo tecidual (YILMAZ; SOVA; ERGÜN, 2018).

Outros estudos relatam que o ácido *p*-cumárico tem capacidade de eliminar de radicais livres e atividade anti-úlceras (PRAGASAM; VENKATESAN; RASOOL, 2013). Estudos anteriores demonstraram a efeito do cinamato de metila na indução da produção de óxido nítrico,

um importante indutor da deposição de colágeno e estimulador da cicatrização de feridas (MURAKAMI et al., 2018). Todas as propriedades listadas acima indicam o potencial destes compostos fenólicos na promoção da cicatrização de feridas. No entanto, os efeitos do ácido trans-cinâmico, cinamato de metila e ácido *p*-cumárico nas funções de fibroblastos relacionadas com a cicatrização, como a migração, não foram demonstradas anteriormente.

Figura 9 - Estrutura química dos ácidos hidroxicinâmicos: ácido trans-cinâmico, ácido *p*-cumárico e cinamato de metila.



Esquema ilustrativo da estrutura química dos ácidos hidroxicinâmicos utilizados nesse estudo. FONTE: Adaptado de (EL-SEEDI et al., 2012).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

Os seguintes reagentes foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, EUA): ácido trans-cinâmico (TCA) (CID: 444539), ácido *p*-cumárico (*p*-CA) (CID: 637542), cinamato de metila (MC) (CID: 637520), Tween-20, dimetilsulfóxido (DMSO), solução salina tamponada com fosfato (PBS), *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM), mitomicina C, iodeto de propídio (PI), brometo de metiltiazolildifenil-tetrazólio (MTT), 4',6-diamidino-2'-fenilindole dicloridrato (DAPI), SB203580 (inibidor da p38-MAPK), JNK-IN-8 (inibidor da JNK1/ 2/ 3) e (6-22)-amida (inibidor da proteína quinase dependente de cAMP, CREB). Soro bovino fetal (SBF), tripsina, penicilina, estreptomicina e L-glutamina foram adquiridos da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). Anticorpos contra laminina, fibronectina e colágeno tipo I foram adquiridos da Novotec (St. Martin-LaGarenne, França), enquanto o isotiocianato de fluoresceína (FITC) foi adquirido através da Santa Cruz Biotechnology (CA, EUA).

4.2 CULTIVO CELULAR

Fibroblastos da linhagem NIH3T3 (fibroblastos embrionários de camundongos), obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), foram semeados em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium – DMEM, suplementado com 10% de SBF, L-glutamina (2 μ M) e gentamicina (40 μ g/mL), e mantidos em estufa à 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, utilizando células entre as 3^a e 5^a passagens. Os ácidos hidroxicinâmicos foram dissolvidos em DMSO e depois diluídos em DMEM livre de SBF.

4.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DAS CÉLULAS PELO MÉTODO DO MTT

O efeito do ácido trans-cinâmico do ácido *p*-cumárico e do cinamato de metila sobre a viabilidade dos fibroblastos foi avaliada pelo ensaio de MTT. As células (7×10^3 células/poço) foram semeadas em microplacas de 96 poços e mantidas em estufa de CO₂, overnight para adesão. Posteriormente, tratadas em diferentes concentrações (3, 30 e 300 μ M) ou apenas meio de cultura (controle). Após o tratamento de 30 h o meio foi substituído por DMEM livre de SBF, contendo MTT (5 mg/mL). Seguido o período de incubação de 4 h, o sobrenadante foi desprezado e sobre

as células foi adicionado 150 µL/ poço de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilizar o formazan produzido. Após a incubação em temperatura ambiente por 15', a absorbância do produto solubilizado foi mensurada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. O percentual de viabilidade celular foi determinado em relação à amostra de controle: (absorbância de células tratadas/absorbância de células não tratadas) × 100%.

4.4 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR

A análise do ciclo celular utilizando citometria de fluxo foi realizada conforme descrito anteriormente por Pozarowski e Darzynkiewicz (2004). Em resumo, as células foram semeadas em placas de 24 poços (6×10^4 células / poço) e mantidas em meio DMEM, em estufa de CO₂, overnight. Posteriormente, as células foram tratadas com os ácidos hidroxicinâmicos (30 µM) ou apenas meio de cultura (controle), por 30 h. Subsequentemente, as células foram tripsinizadas, lavadas com PBS, e depois fixadas em 70% de etanol gelado por 1 h. Então, o etanol foi removido por centrifugação (460 ×g por 10 min), e os pellets celulares foram ressuspensos em 300 µL de tampão de coloração de DNA contendo 5 µg / mL de iodeto de propídio e 0,05 mg/mL de RNase. Após 15 min de incubação à temperatura ambiente, no escuro, as células foram examinadas o sistema de citometria de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Desta forma foi possível identificar as fases do ciclo celular como G0/G1, S e G2/M.

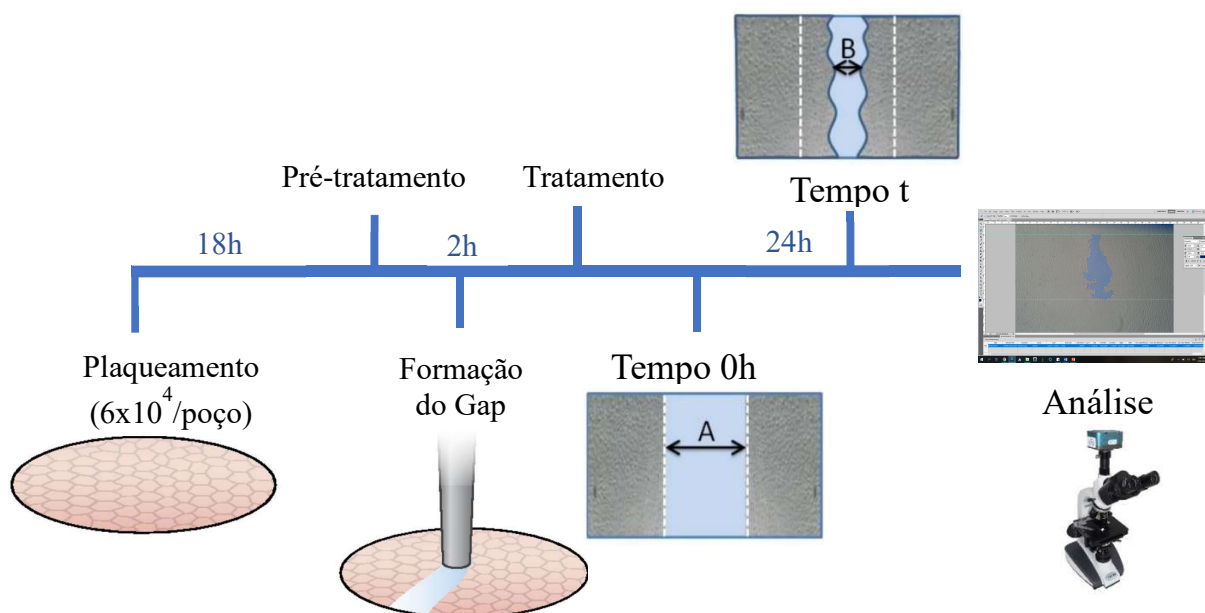
4.5 SCRATCH WOUND HEALING ASSAY

O efeito dos ácidos hidroxicinâmicos sobre a migração de fibroblastos foi avaliado através do ensaio de migração horizontal (*scratch wound healing assay*). Fibroblastos (2×10^5) foram semeados em uma placa de 24 poços e mantidos até atingir 90% de confluência. Em seguida, uma ponteira estéril de 200 µl foi usada para criar um *gap* sem células. Os poços foram lavados com PBS para remover células mortas e detritos, e depois as células foram expostas ao tratamento com 3 ou 30 µM de ácido trans-cinâmico, ácido *p*-cumárico ou cinamato de metila, em meio isento de soro. Como controle, as células foram tratadas apenas com meio. Após 18 ou 30 h de tratamento com ácidos hidroxicinâmicos, as células que migraram para a região formada foram fotografadas utilizando um microscópio invertido com uma câmera digital (Nikon Eclipse TS100, Nikon

Corporation, Tóquio, Japão). A migração celular foi analisada usando o software ImageJ e expressa (% fechamento de ferida). O valor foi obtido mediante o seguinte cálculo: $(\%) = [(A_0 - A_t)/A_0] \times 100$. Onde A_0 é a área no tempo 0 e A_t é a área no período de tempo após o risco.

Em outro conjunto de experimentos, a monocamada riscada foi pré-tratada com 10 μM SB203580, 10 μM JNK-IN-8 ou 10 μM (6-22)-amida por 1 h, ou 4 $\mu\text{g/mL}$ de mitomicina por 3 h, seguida pela adição dos ácidos hidroxicinâmicos ou apenas o ácido trans-cinâmico, por 30 h, como representado na figura 10.

Figura 10 - Esquema representativo do ensaio de *scratch*



Linha temporal do ensaio de migração horizontal *in vitro*. Fonte: AUTOR

4. 6 PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS DE MEC

Fibroblastos (7×10^3) foram cultivados em lamínulas de vidro de câmara Labtek de 8 poços (Nunc, NY, USA) por 24 h. O meio foi então substituído e as células foram tratadas com 30 μM de ácido trans-cinâmico por 30 h. Células mantidas em DMEM, sob as mesmas condições, foram utilizadas como controles. Após o tratamento, as culturas foram lavadas com PBS, fixadas com 100% de metanol por 10 min, e submetidos ao ensaio de imunofluorescência, como descrito

anteriormente (SMANIOTTO et al., 2005). Resumidamente: as células foram reidratadas em PBS e incubadas por 1 h com PBS contendo 1% de BSA, para bloquear as ligações não específicas. Em seguida, as amostras foram incubadas com os anticorpos primários anti-laminina, anti-fibronectina ou anti-colágeno tipo I (1:50) por 1h. Então, foram lavados com PBS e incubados com anticorpo secundário conjugado com FITC (1:100) durante 45 min à temperatura ambiente. A coloração DAPI foi usada para visualizar os núcleos. As amostras imunocoradas foram analisadas por microscopia de fluorescência. A coloração de cada secção foi analisada para obter um valor médio de densidade óptica, que representa a intensidade de fluorescência por pixel positivo/ μm^2 , utilizando o software Image-J (DONG et al., 2016).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

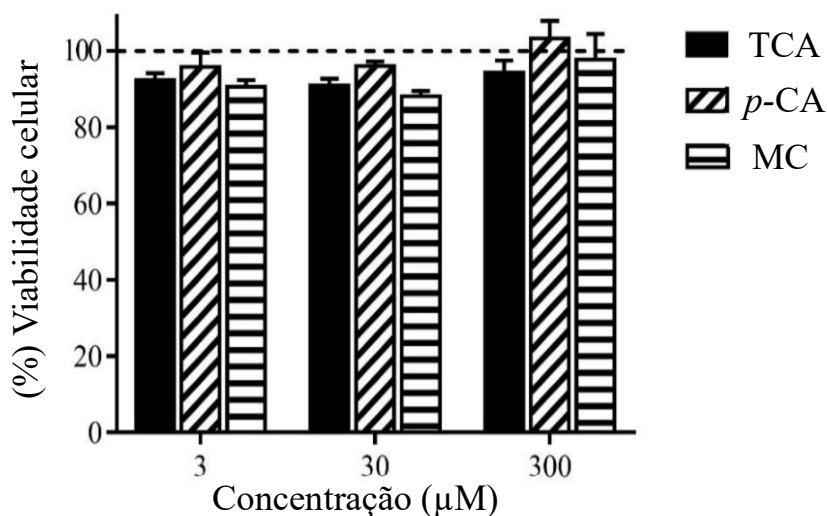
Os dados são relatados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e foram analisados utilizando o software GraphPad Prism, versão 7.0 (San Diego, CA, EUA). Comparações entre os grupos experimentais foram realizadas por via one-way ANOVA seguido do teste de Tukey, ou por ANOVA two-way seguido pelo Bonferroni teste. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

5 RESULTADOS

5.1 Efeito do ácido trans-cinâmico, ácido *p*-cumárico e cinamato de metila sobre a viabilidade celular

O ensaio de MTT foi utilizado para testar o potencial efeito citotóxico dos ácidos hidroxicinâmicos em fibroblastos. Como apresentado na Figura 11, identificamos que a viabilidade de fibroblastos não foi significativamente afetada pelo tratamento, por 30 h, com os ácidos hidroxicinâmicos nas concentrações de 3, 30 ou 300 μM .

Figura 11 - Efeito do ácido trans-cinâmico, ácido *p*-cumárico e cinamato de metila sobre a viabilidade de fibroblastos NIH-3T3



As células foram plaqueadas a 7×10^3 células/poço e tratadas com diferentes concentrações (3, 30 ou 300 μM) durante 30 h. A viabilidade celular foi medida pelo ensaio MTT. A linha tracejada representa células mantidas apenas com DMEM. As barras representam o média \pm erro padrão da média (SEM).

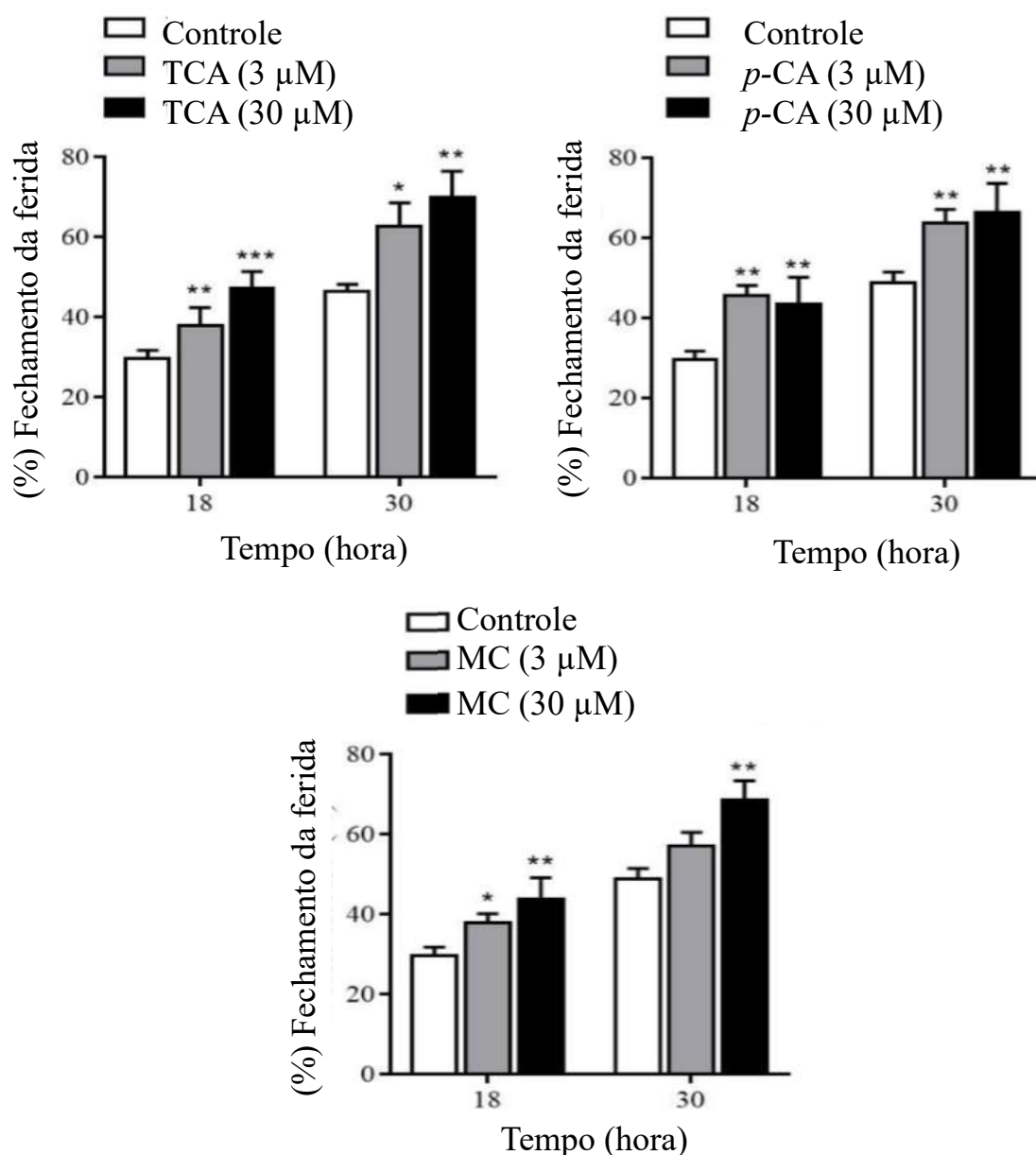
5.2 Efeito do ácido do ácido trans-cinâmico, ácido *p*-cumárico e cinamato de metila sobre capacidade migratória de fibroblastos

O efeito do ácido trans-cinâmico, ácido *p*-cumárico ou cinamato de metila na atividade migratória de fibroblastos foi examinado usando o *scratch wound healing assay*. Inicialmente, um

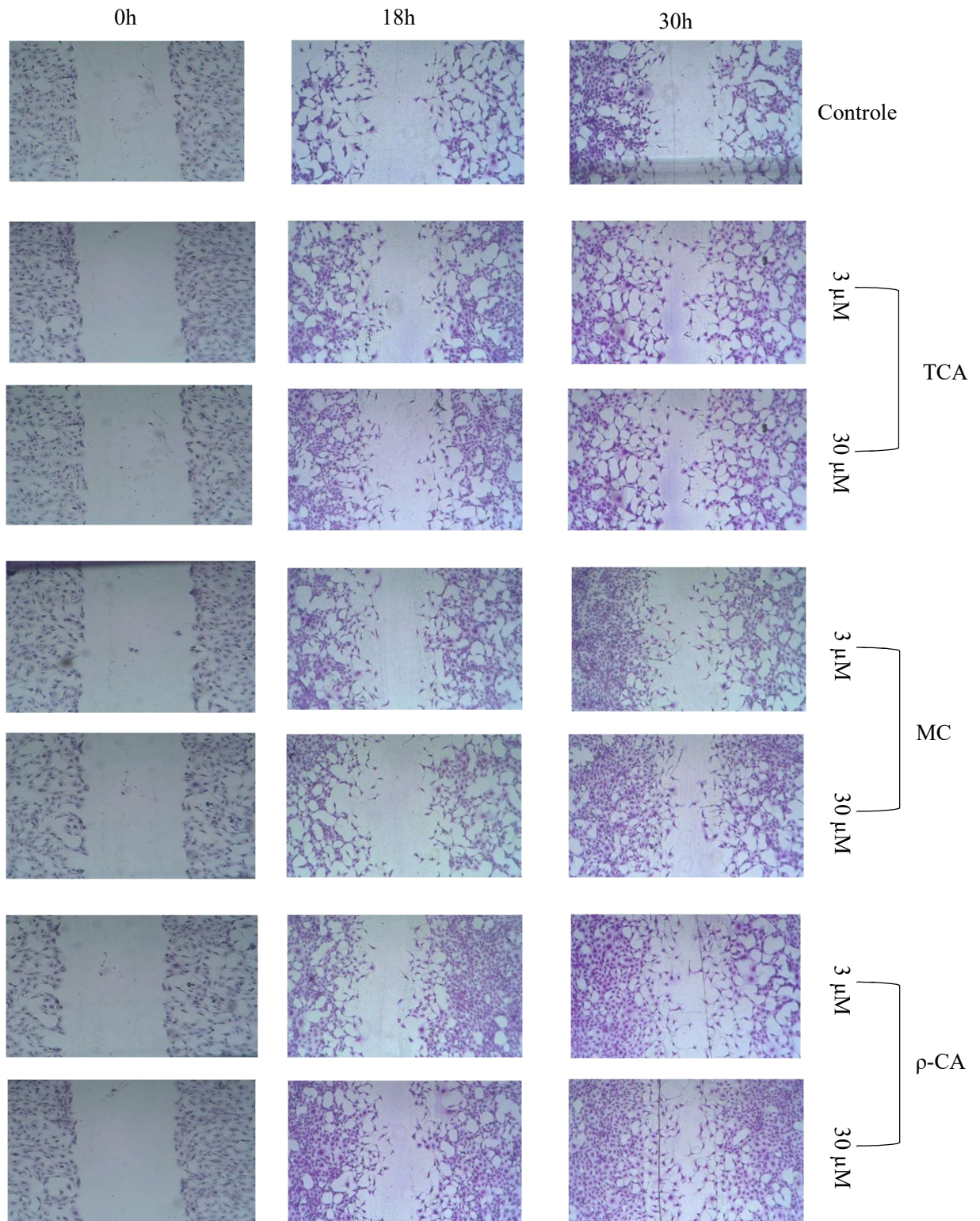
gap (ferida) foi formado na monocamada de células confluentes. Logo após, as células foram tratadas com DMEM (controle) ou os ácidos hidroxicinâmicos nas concentrações de 3 e 30 μM , nos intervalos de 18 e 30 h. Como mostrado na Figura 12, os fibroblastos tratados com TCA, *p*-CA ou MC exibiram um fechamento de *gap* mais rápido, comparado às células tratadas apenas com DMEM (controle).

Figura 12 - O efeito do ácido trans-cinâmico, ácido *p*-cumárico e cinamato de metila na migração celular de fibroblastos submetidos ao *scrach wound healing assay*.

A)



B)



Fibroblastos foram tratados com 3 e 30 μM de ácido hidroxicinâmico, e as imagens foram capturadas para o análise de fechamento do *gap*. A) A porcentagem de fechamento da ferida foi medida quantificando a distância total das

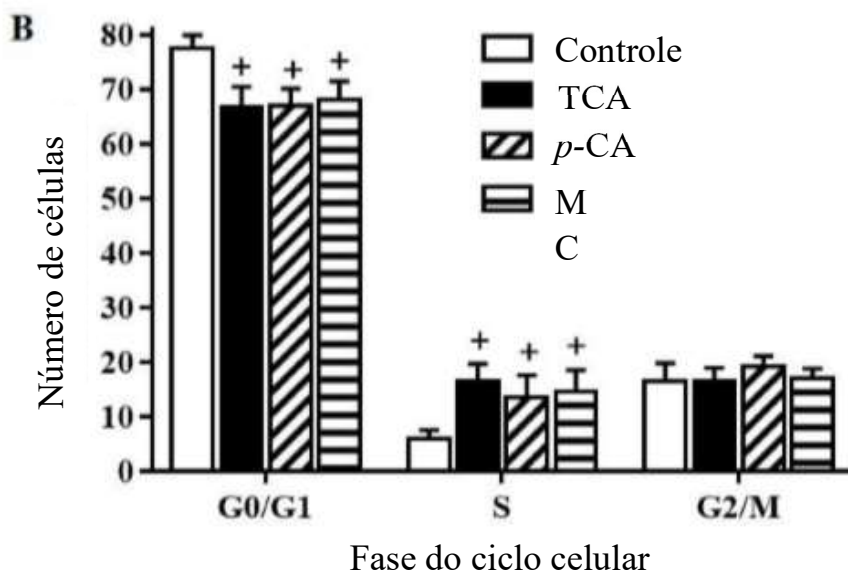
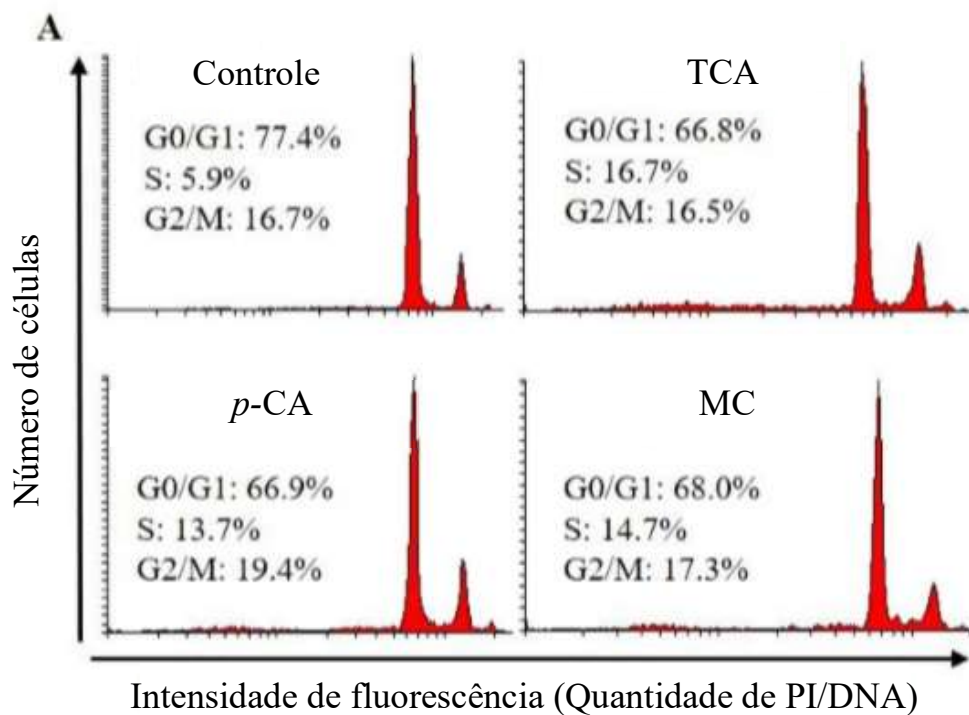
células que se moveram da periferia do *gap* até o centro, usando o ImageJ software, seguido por um cálculo de conversão para uma porcentagem de fechamento da ferida. Valores representam média \pm E.P.M. (*) $P < 0,05$ e (**) $P < 0,01$ em comparação com células tratadas com DMEM. B) Fotomicrografias representativas mostrando o *gap* de células tratadas com DMEM (controle), ácido trans-cinâmico, ácido *p*-cumárico ou cinamato de metila e a posterior migração celular para a área livre de células após 18 e 30 h.

Como pode-se observar através das fotomicrografias representativas na página 48, os níveis basais de fechamento do *gap* nas células tratadas com DMEM foram de 29% e 46%, respectivamente, enquanto os fibroblastos cultivados na presença de 3 e 30 μM de TCA exibiram respectivamente, um aumento na migração para 38% e 47% às 18 horas e para 62% e 70% às 30 horas. Um perfil semelhante de migração ocorreu em células cultivadas com 3 e 30 μM *p*-CA, onde as células tiveram sua capacidade migratória aumentada para 45% e 43% às 18 horas, e a 49% e 66% às 30 horas, respectivamente. Como observado nos dois tratamentos anteriores, a exposição das células a 3 e 30 μM de MC aumentou a taxa de migração para 38% e 44% às 18 horas, e para 57% e 69% às 30 horas, respectivamente.

5.3 Efeito do ácido trans-cinâmico, ácido *p*-cumárico e cinamato de metila sobre o ciclo celular de fibroblastos

Para determinar o efeito dos compostos fenólicos na progressão do ciclo celular, como mostrado na Figura 13, as células tratadas com DMEM por 30 h (grupo controle) apresentaram distribuição do ciclo celular nas fases G0/G1, S e G2/M de 77,4%, 5,9% e 16,7%, respectivamente. Comparado com o grupo controle, o grupo tratado com 30 μM de TCA mostrou uma redução da população na fase G0/G1 para 66,8% e um aumento concomitante de 16,7% na população em fase S, sem qualquer mudança na população da fase G2/M (16,5%). Da mesma forma, o tratamento com *p*-CA ou MC diminuiu, respectivamente, as células em G0/G1 para 66,9% e 68% e, simultaneamente, aumentou a população de células na fase S para 13,7% e 14,7%, mantendo o número de células na fase G2/M em 19,4% e 17,3%, respectivamente. Esses resultados indicam que a exposição, por 30 h, aos ácidos hidroxicinâmicos estudados, induziu um estado proliferativo em fibroblastos.

Figura 13 - Efeito do ácido trans-cinâmico, ácido *p*-cumárico e cinamato de metila na progressão do ciclo celular de fibroblastos



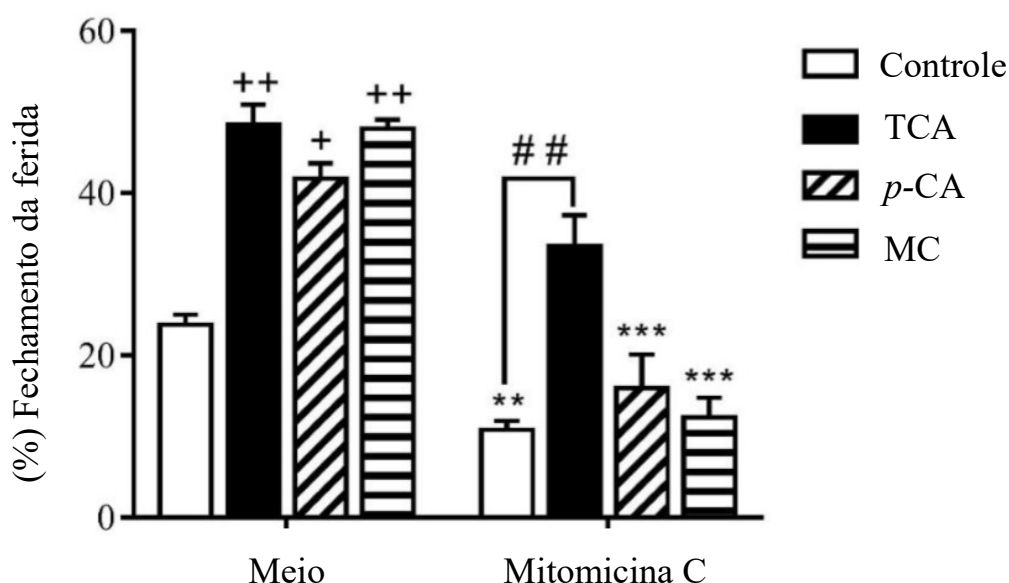
As células foram expostas ao tratamento por 30 h. O ciclo celular foi avaliado por citometria de fluxo através da análise de iodeto de propídio, com fluorescência na aquisição lenta e com discriminação de duplicatadas celulares; 10.000 eventos foram registrados. A) Histograma mostrando ciclo celular de células tratadas com 30 μ M dos ácidos hidroxicinâmicos. B) Quantificação do estágio G0/G1, S e G2/M em fibroblastos. As barras representam média \pm

E.P.M. A significância estatística entre os grupos foi determinada por ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. (+) $P < 0,05$ em comparação com células tratadas com DMEM, na sua respectiva fase.

5.7 Efeito da Mitomicina C na migração de fibroblastos induzida por ácidos hidroxicinâmicos

Com intuito de esclarecer se a capacidade de fechamento da área livre de células no ensaio de migração horizontal (*scratch*) foi decorrente de ações dos ácidos hidroxicinâmicos sobre a atividade migratória ou proliferativa; submetemos as células, tratadas com os compostos, ao *scratch assay* utilizando o inibidor da proliferação celular, mitomicina C. Como mostrado na Figura 10, as células foram pré-tratadas com 4 $\mu\text{g/ml}$ de mitomicina C durante 3 h e depois, expostas a 30 μM durante 30 h. Nessa etapa, foi observado que a proliferação celular foi interrompida pela mitomicina C, diminuindo o fechamento da ferida em 50%, aproximadamente. Também podemos observar que a resposta migratória dos fibroblastos após o tratamento com *p*-CA e MC foi reduzida para os níveis basais após a exposição à mitomicina. No entanto, esta situação não foi observada em células expostas ao TCA, onde o tratamento com mitomicina C não causou uma redução significativa resposta destes fibroblastos (Figura 14). Indicando que o efeito do *p*-CA e MC em reduzir a área livre de células no ensaio de *scratch assay* é dependente, principalmente, do efeito destes compostos sobre a proliferação celular. Por outro lado, a capacidade migratória induzida pela exposição de fibroblastos ao TCA foi confirmada.

Figura 14 - Efeito da mitomicina C na migração de fibroblastos induzida pelo ácido trans-cinâmico, ácido *p*-cumárico e cinamato de metila

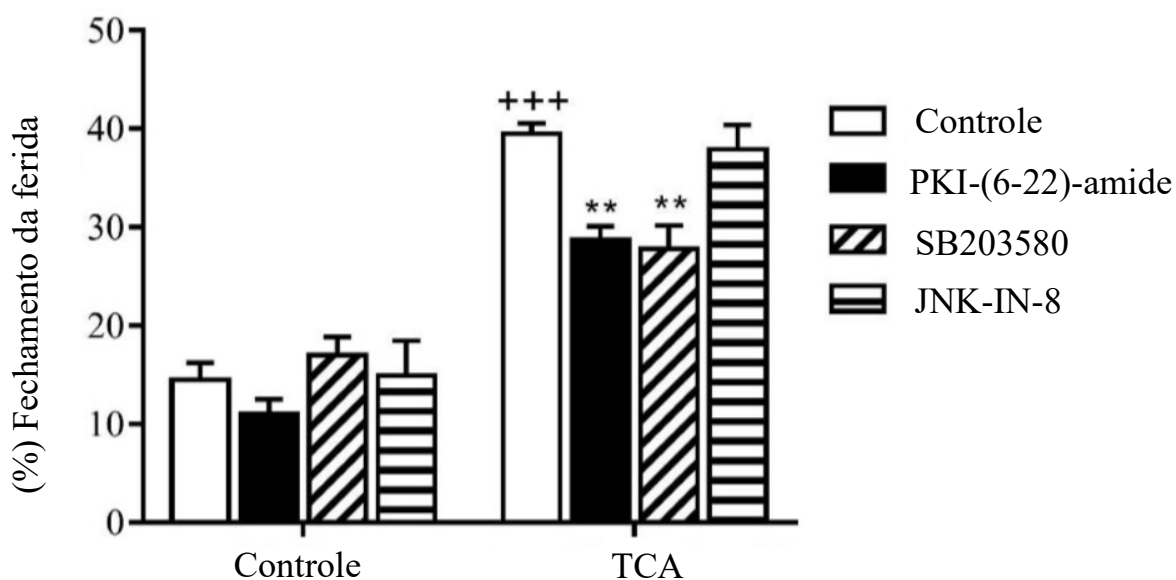


As células foram pré-tratadas com mitomicina C e após 30 h, o fechamento do *gap* foi mensurado. Barras representam média \pm E.P.M. A significância entre os grupos foi determinada por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. (+) $P < 0,05$ e (++) $P < 0,01$ em comparação com células tratadas com meio, (**) $P < 0,01$ e (***) $P < 0,001$ em comparação com células tratadas com meio expostas à mitomicina C. (## $P < 0,01$).

5.8 O papel da vias de sinalização p38MAPK, JNK e PKA na atividade migratória do ácido trans-cinâmico

Com intuito de identificar os possíveis mecanismos moleculares da migração induzida pelo ácido trans-cinâmico, foram utilizados inibidores específicos da sinalização intracelular no *scratch wound healing assay*. Como mostrado na Figura 15, o inibidor de PKA (6-22-amida, 10 μ M) e o inibidor de p38-MAPK (SB203580, 10 μ M) inibiram a migração de fibroblastos induzida por ácido trans-cinâmico em 27% e 29%, respectivamente. Contudo, a inibição da via da JNK (JNK-IN-8, 10 μ M) não causou alteração significativa na migração. Estes resultados indicam que o ácido trans-cinâmico exerceu um efeito positivo no fibroblasto migração através de mecanismos específicos.

Figura 15 - A inibição de vias específicas atenua a migração de fibroblastos induzida pelo ácido trans-cinâmico



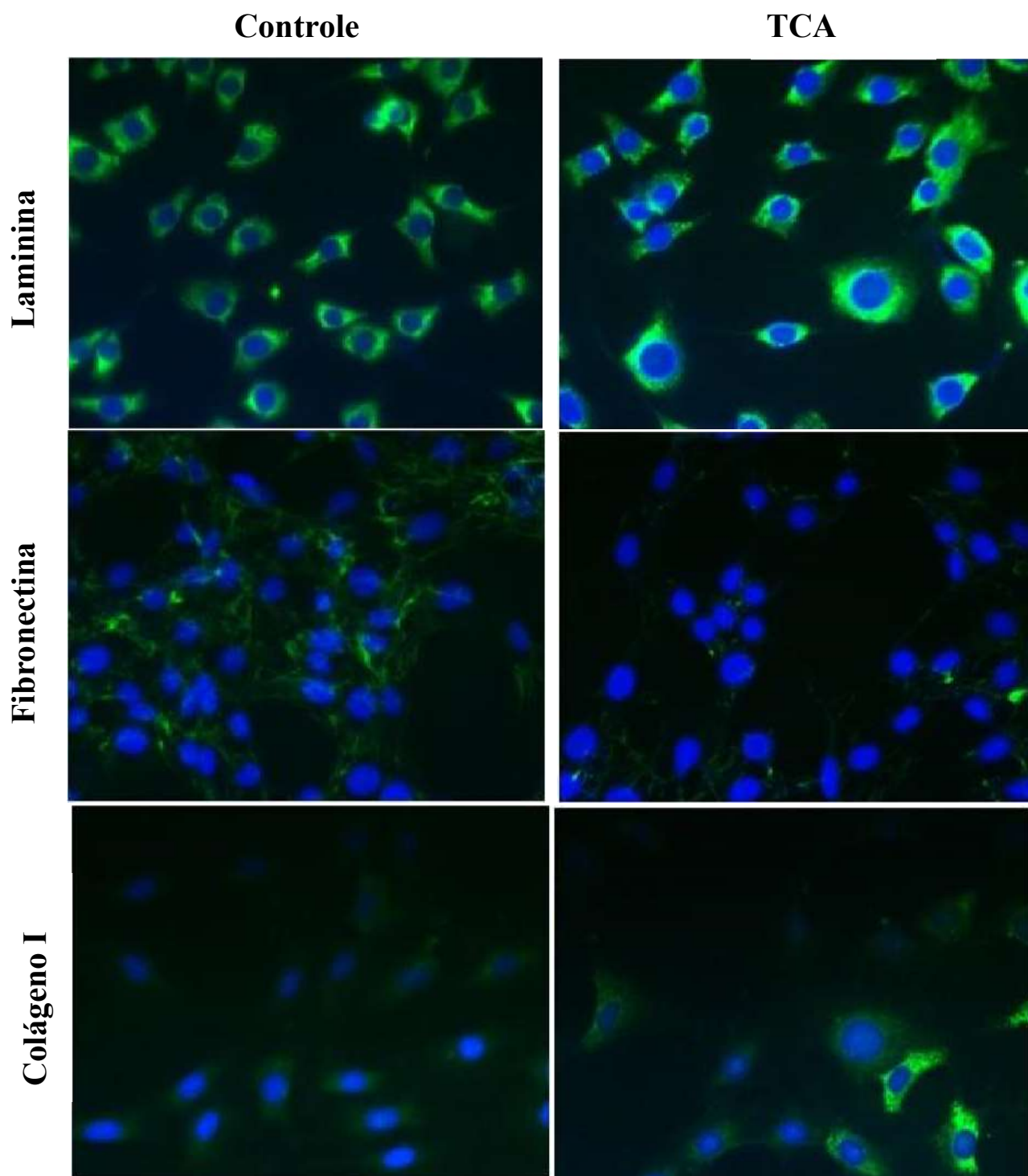
Após a monocamada atingir 90% de confluência, as células foram cultivadas apenas com DMEM ou (6-22)-amida (inibidor de PKA, 10 μ M), SB203580 (inibidor de p38-MAPK, 10 μ M), ou JNK-IN-8 (inibidor de JNK, 10 μ M) por uma hora. Logo após, foi realizada a formação do *gap* e então a exposição ao ácido trans-cinâmico, por 30 h. As barras

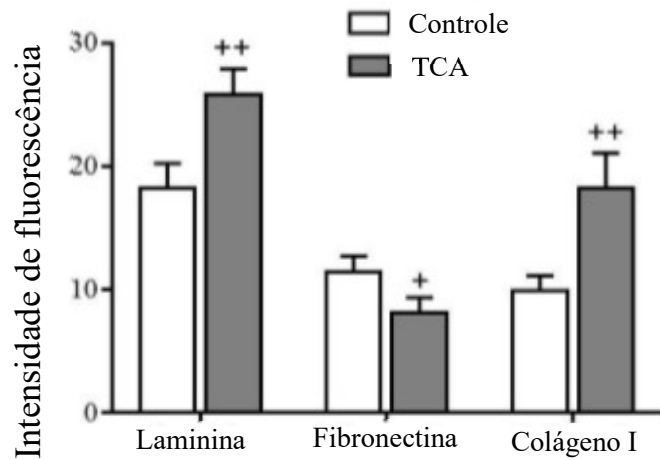
representam média \pm E.P.M. A significância entre os grupos foi determinada por two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni. (+++) $P < 0,001$ em comparação com as células tratadas com DMEM, (**) $P < 0,01$ em comparação com as células tratadas com TCA.

5.9 Efeito do TCA sobre a síntese de proteínas de matriz extracelular

Considerando a importância da MEC para as diversas funções dos fibroblastos, incluindo a migração, avaliamos se o tratamento com ácido trans-cinâmico poderia interferir na síntese de proteínas específicas da MEC. Para obtermos essa resposta, os fibroblastos foram expostos por 30 h ao ácido trans-cinâmico e então a produção de laminina, fibronectina e colágeno tipo I foi avaliada por análise de imunofluorescência. Como mostrado na Figura 16, as células tratadas apenas com o meio de cultura DMEM apresentaram um nível basal de produção de proteína laminina organizado ao redor do núcleo da célula. Ao analisarmos a intensidade da produção de laminina nas células após o tratamento com ácido trans-cinâmico (30 μ M), observamos que a exposição ao TCA intensificou essa coloração citoplasmática, por imunofluorescência. A análise quantitativa da imagem mostrou um aumento de 30% no nível de fluorescência, refletindo os níveis de laminina após o tratamento (Figura 16). O nível de fibronectina nos fibroblastos tratados com DMEM foi relativamente baixo e pareceu ser organizado em pequenos grupos ao redor do núcleo da célula (Figura 16). O tratamento com ácido trans-cinâmico causou uma redução significativa na quantidade de fibronectina produzida pelos fibroblastos e esta redução foi confirmada após a análise quantitativa mostrar uma redução de 27% na fluorescência citoplasmática para fibronectina, após tratamento com ácido trans-cinâmico (Figura 16). Quando a expressão do colágeno tipo I foi avaliada, os fibroblastos tratados com DMEM exibiram uma fraca coloração de imunofluorescência, que foi difundida no citoplasma. O tratamento com ácido trans-cinâmico (30 μ M) aumentou a intensidade imunofluorescência, com marcação colágeno tipo I. Quando a imagem foi analisada, a quantificação da intensidade mostrou um aumento no conteúdo de colágeno tipo I em 45% após o tratamento com ácido trans-cinâmico (30 μ M), por 30 h.

Figura 16 - Efeito do ácido trans-cinâmico nos níveis de laminina, fibronectina e colágeno tipo I em fibroblastos





Proteínas da Matriz Extracelular

Os fibroblastos foram cultivados com ou sem ácido trans-cinâmico (30 μ M) e após 30 h as células foram fixadas. Então, a matriz extracelular foi imunocorada utilizando anticorpos contra laminina, fibronectina, e colágeno tipo I. Os núcleos foram corados com DAPI. Cada painel mostra a imagem de um campo representativo. Abaixo, o gráfico mostra os resultados da quantificação da síntese de cada proteína específica da matriz extracelular. As barras representam média \pm E.P.M. A significância estatística entre grupos foi determinada por ANOVA seguido do teste de Bonferroni. (+) $P < 0,05$ e (++) $P < 0,01$ comparado com o respectivo grupo tratado com apenas meio, DMEM.

6. DISCUSSÃO

Os derivados do ácido hidroxicinâmico constituem uma classe de compostos fenólicos originários de plantas, com uma ampla gama de efeitos farmacológicos, que podem ser úteis para o tratamento de várias condições patológicas, incluindo feridas cutâneas (AMIGO-BENAVENT et al., 2017; TAOFIQ et al., 2017). No processo de reparo, diversos processos celulares destacam-se, dentre eles, a migração de fibroblastos para a área de lesão é um mecanismo vital e responsável pelo reparo tecidual satisfatório (TRACY; MINASIAN; CATERSON, 2016). Assim, a identificação de compostos com potencial de estimular funções celulares, como a migração de fibroblastos, pode levar à descoberta de novos fármacos de baixo custo para o tratamento feridas que não cicatrizam. No presente estudo, demonstramos que o ácido trans-cinâmico, mas não os seus derivados ácido *p*-cumárico e cinamato de metila, induziu a migração de fibroblastos *in vitro* por um mecanismo de sinalização envolvendo as vias PKA e p38-MAPK. Além disso, também identificamos que o ácido trans-cinâmico possui um efeito modulador de MEC, através do aumento da síntese de laminina e colágeno tipo I, além da redução na síntese de fibronectina, por fibroblastos.

As funções dos fibroblastos durante o processo de cicatrização são essenciais para restaurar integridade estrutural do tecido e a manutenção da sua funcionalidade. Após a lesão tecidual, as respostas iniciais de fibroblastos adjacentes ao local da ferida incluem proliferação, migração e a síntese e deposição de MEC (TRACY; MINASIAN; CATERSON, 2016). É importante mencionar que a falha de uma ou mais dessas funções pode comprometer a cicatrização e a disfunção dos fibroblastos, sendo assim um fator chave que leva à má cicatrização e ao, conseqüente, surgimento de úlceras crônicas (WALL et al., 2008). Vale a pena ressaltar que úlceras conseqüentes do falho reparo tecidual é um problema comum em pacientes diabéticos (LERMAN et al., 2003). Assim, essas observações demonstram claramente que os compostos com a capacidade de melhorar as funções de fibroblastos podem ter um papel positivo na cicatrização de feridas.

Estudos anteriores mostraram que os ácidos hidroxicinâmicos possuem citotoxicidade para linhagens celulares cancerígenas (MENEZES et al., 2017) e que mudanças na estrutura dessas moléculas podem alterar sua atividade biológica ou mesmo potencializar essas atividades (TAOFIQ et al., 2017). No presente estudo, avaliamos o efeito citotóxico *in vitro* do ácido trans-

cinâmico, ácido *p*-cumárico e cinamato de metila. Contudo, nós não observamos efeitos tóxicos nos fibroblastos nas concentrações de 3-300 μ M, durante 30 h de exposição. Este resultado confirma estudos anteriores que demonstraram a ausência de citotoxicidade destes ácidos hidroxicinâmicos em fibroblastos (BELSITO et al., 2007; HSEU et al., 2018; SEOK; BOO, 2015).

Em seguida, avaliamos o efeito dos ácidos hidroxicinâmicos na migração de fibroblastos, através do ensaio de *scratch*. Este ensaio é uma metodologia *in vitro* já bem estabelecida na literatura, que permite triagem de substâncias que são capazes de regular a migração celular (JONKMAN et al., 2014). Para isso, uma área livre de células (*gap*) é criada em uma monocamada confluyente através de danos mecânicos, e as células que permanecem na “borda da ferida” se movem em direção à injúria artificial, o que permite medir a taxa de fechamento do *gap* (fechamento da ferida) (LIANG; PARK; GUAN, 2007). Em nosso estudo o ácido trans-cinâmico, o ácido *p*-cumárico ou cinamato de metila foram usados como tratamento durante o ensaio de *scratch*. Todos estes compostos foram capazes de acelerar o fechamento do *gap*, sugerindo que essas moléculas têm um efeito direto sobre fibroblastos. Estes resultados são consistentes com um estudo anterior em que outro ácido hidroxicinâmico, o ácido ferúlico, melhorou significativamente a motilidade dos fibroblastos (SAN MIGUEL et al., 2010).

É bem conhecido que durante o ensaio de *scratch*, as células ocupam o *gap* formado através da migração e também proliferação. Assim, decidimos caracterizar o efeito desses ácidos hidroxicinâmicos na progressão do ciclo celular de fibroblastos. Nossos resultados revelaram que o ácido trans-cinâmico, o ácido *p*-cumárico e o cinamato de metila promoveram a proliferação de fibroblastos, acelerando a entrada das células para a fase S do ciclo celular. Está bem estabelecido que a privação de nutrientes é o método, não farmacêutico, mais comum para minimizar a proliferação celular nos ensaios de cicatrização de feridas (JONKMAN et al., 2014). Mesmo assim, decidimos realizar o ensaio de *scratch*, utilizando os ácidos hidroxicinâmicos e a mitomicina C, uma droga usada para parar a mitose em vários estágios. Ao contrário do que esperávamos, descobrimos que o uso da mitomicina C impedia a resposta de fibroblastos tratados com ácido *p*-cumárico ou cinamato de metila, mas não com o ácido trans cinâmico, no ensaio de *scratch*. Esta observação sustenta a noção de que entre o três compostos testados, apenas o ácido trans-cinâmico pode afetar diretamente a migração de fibroblastos. Essa influência na migração celular não é exclusiva do ácido trans-cinâmico, outro ácido hidroxicinâmico, o ácido gálico, também exerce efeito indutório da migração em fibroblastos humanos, sem, contudo, induzir a proliferação

(YANG et al., 2016a). Além disso, esta constatação mostra claramente que as modificações químicas na estrutura destes compostos têm um impacto direto no perfil de suas atividades biológicas, indicando a necessidade de mais estudos sobre a relação estrutura-atividade desses derivados do ácido hidroxicinâmico.

A migração de fibroblastos é um evento mediado por múltiplas vias de sinalização intracelular, incluindo as vias da proteína quinase A (PKA), CREB, p38-MAPK e JNK (CARGNELLO; ROUX, 2011). No entanto, apesar dos avanços científicos nos últimos anos, o conhecimento sobre as vias de sinalização de fibroblastos, ativadas pelo ácido trans-cinâmico, permanece escasso. Assim, para avaliar se o efeito pró-migratório do ácido trans-cinâmico é exercido através de vias específicas de sinalização intracelular, avaliamos a migração dos fibroblastos utilizando o ensaio de *scratch* na presença de inibidores específicos. Nossos resultados demonstraram que os inibidores PKI-(6-22)-amida e SB203580, mas não o inibidor JNK-IN-8, atenuaram a migração de fibroblastos induzida pelo ácido trans-cinâmico, indicando o envolvimento das vias de sinalização PKA e p38-MAPK, na atividade migratória do ácido trans-cinâmico. Estes dados estão de acordo com estudos anteriores que demonstram que o ácido trans-cinâmico induz um aumento na fosforilação da PKA e da p38-MAPK em outros tipos celulares, como adipócitos (KOPP et al., 2014) e células epiteliais (CHEN et al., 2015). Portanto, o envolvimento dessas vias de sinalização intracelular na regulação da migração de fibroblastos, induzida pelo ácido trans-cinâmico, fomenta a proposição deste composto como uma nova ferramenta para melhorar a migração de fibroblastos. Contudo, mais estudos são necessários para determinar como o ácido trans-cinâmico leva à ativação das vias PKA e p38-MAPK.

Também vale ressaltar, que estudos anteriores demonstraram que a ativação das vias de sinalização intracelular PKA e p38-MAPK induzem uma regulação positiva da produção de proteínas da MEC, por fibroblastos (LV et al., 2016; SCHILLER et al., 2010). Considerando que a deposição de MEC tem importantes implicações na migração de fibroblastos, avaliamos se o ácido trans-cinâmico também afeta a produção de proteínas do MEC. De fato, nós verificamos que o ácido trans-cinâmico aumenta a síntese de laminina e colágeno tipo I e inibe a síntese de fibronectina. Corroborando com nossos resultados, estudos anteriores também relatam o efeito duplo do ácido cinâmico na síntese da laminina e colágeno, inibindo simultaneamente a produção de fibronectina, em células epidérmicas (TAOFIQ et al., 2017). Considerando que a MEC pode induzir sinais intracelulares ou interagir com as vias de transdução desencadeadas por receptores,

promovendo assim a migração celular, pode-se inferir que o ácido trans-cinâmico pode representar um novo composto químico capaz de induzir a migração de fibroblastos.

7. CONCLUSÃO

Esses resultados demonstram o efeito do ácido *p*-cumárico e do cinamato de metila em estimular as funções de fibroblastos avaliadas pela resposta proliferativa. De modo interessante, apresentamos pela primeira vez, que além de estimular proliferação e a síntese de laminina e colágeno tipo I, o ácido trans-cinâmico estimula a funcionalidade de fibroblastos para promover a migração através das vias de sinalização PKA e p38-MAPK. Esses efeitos podem ter um papel importante no processo de cicatrização de feridas e são relevante no desenvolvimento de novas terapias que estimulem o reparo tecidual.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, P. S. et al. Fibroblast activation protein: A serine protease expressed at the remodeling interface in idiopathic pulmonary fibrosis. **Human Pathology**, v. 37, n. 3, p. 352–360, 2006.
- AGAR, O. T. et al. Comparative studies on phenolic composition, antioxidant, wound healing and cytotoxic activities of selected achillea L. species growing in Turkey. **Molecules**, v. 20, n. 10, p. 17976–18000, 2015.
- AGRA, L. C. et al. Triterpenes with healing activity: A systematic review. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 26, n. 5, p. 465–470, 2015.
- AHMANN, K. A. et al. Fibrin Degradation Enhances Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Matrix Deposition in Fibrin-Based Tissue Constructs Fabricated *In Vitro*. **Tissue Engineering Part A**, v. 16, n. 10, p. 3261–3270, 2010.
- AMIGO-BENAVENT, M. et al. Antiproliferative and cytotoxic effects of green coffee and yerba mate extracts, their main hydroxycinnamic acids, methylxanthine and metabolites in different human cell lines. **Food and Chemical Toxicology**, v. 106, p. 125–138, 2017.
- AVERY, D. et al. Extracellular matrix directs phenotypic heterogeneity of activated fibroblasts. **Matrix Biology**, v. 67, p. 90–106, 2018.
- BALSA, I. M.; CULP, W. T. N. Wound care. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 15, n. 2, p. 417–425, 2015.
- BARTKOVA, J. et al. Cell-cycle regulatory proteins in human wound healing. **Archives of Oral Biology**, v. 48, n. 2, p. 125–132, 2003.
- BAUER, S. et al. Fibroblast activation protein is expressed by rheumatoid myofibroblast-like synoviocytes. **Arthritis Research and Therapy**, v. 8, n. 6, p. 1–11, 2006.
- BAYREUTHER, K. et al. Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 14, p. 5112–5116, 1988.
- BELSITO, D. et al. A toxicologic and dermatologic assessment of related esters and alcohols of cinnamic acid and cinnamyl alcohol when used as fragrance ingredients. **Food and Chemical**

Toxicology, v. 45, n. 1 SUPPL., 2007.

berry1998_Human wound contraction collagen organization, fibroblasts, and myofibroblasts.pdf, [s.d.].

BIERNASKIE, J. et al. SKPs Derive from Hair Follicle Precursors and Exhibit Properties of Adult Dermal Stem Cells. **Cell Stem Cell**, v. 5, n. 6, p. 610–623, 2009.

BISHOP, A. Role of oxygen in wound healing. **Journal of Wound Care**, v. 17, n. 9, p. 399–402, 2014.

BOYAPATI, L.; WANG, H.-L. The role of stress in periodontal disease and wound healing. **Periodontology 2000**, v. 44, n. 1, p. 195–210, 2007.

BRIGANTI, E. et al. Fibrin-based scaffold incorporating VEGF- and bFGF-loaded nanoparticles stimulates wound healing in diabetic mice. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 8, p. 7814–7821, 2013.

BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. Wound healing: An overview. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, n. 7 SUPPL., p. 1–32, 2006.

BUSEK, P. et al. Fibroblast activation protein alpha is expressed by transformed and stromal cells and is associated with mesenchymal features in glioblastoma. **Tumor Biology**, v. 37, n. 10, p. 13961–13971, 2016.

C.H. GOLIAS; CHARALABOPOULOS, A.; CHARALABOPOULOS, K. Duals of a Banach algebra as dual Banach algebras. **Int J Clin Pract.**, v. 58, n. 12, p. 1134–41, 2004.

CALDERON, M.; LAWRENCE, W. T.; BANES, A. J. Increased proliferation in keloid fibroblasts wounded in vitro. **Journal of Surgical Research**, v. 61, n. 2, p. 343–347, 1996.

CARGNELLO, M.; ROUX, P. P. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, n. 1, p. 50–83, 2011.

CASTILHO, R.; SQUARIZE, C.; GUTKIND, J. Exploiting PI3K/mTOR signaling to accelerate epithelial wound healing. **Oral Diseases**, v. 19, n. 6, p. 551–558, 2013.

CECCHINI, M. J.; AMIRI, M.; DICK, F. A. Analysis of Cell Cycle Position in Mammalian Cells. **Journal of Visualized Experiments**, n. 59, p. 1–7, 2012.

CHEN, H. H. et al. Novel Nrf2/ARE Activator, trans-Coniferylaldehyde, Induces a HO-1-Mediated Defense Mechanism through a Dual p38 α /MAPKAPK-2 and PK-N3 Signaling Pathway. **Chemical Research in Toxicology**, v. 28, n. 9, p. 1681–1692, 2015.

CHEN, S. et al. Conservation and sustainable use of medicinal plants: problems, progress, and prospects. **Chin Med**, v. 11, 2016.

CHILDS, D. R.; MURTHY, A. S. Overview of Wound Healing and Management. **Surgical Clinics of North America**, v. 97, n. 1, p. 189–207, 2017.

CHOI, D. Y. et al. Stimulatory effect of Cinnamomum cassia and cinnamic acid on angiogenesis through up-regulation of VEGF and Flk-1/KDR expression. **International Immunopharmacology**, v. 9, n. 7–8, p. 959–967, 2009.

CLARK, R. A. F. et al. **Fibronectin and fibrin provide a provisional matrix for epidermal cell migration during wound reepithelialization** **Journal of Investigative Dermatology**, 1982.

CRONIN, M. T. D.; SCHULTZ, T. W. S0045-6535(96)00054-9. v. 32, n. 8, p. 1453–1468, 1996.

CUADRADO, A.; NEBREDA, A. R. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. **Biochemical Journal**, v. 429, n. 3, p. 403–417, 2010.

DARBY, I. A. et al. Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology Dovepress Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, p. 7–301, 2014.

DAVIES, C.; TOURNIER, C. Exploring the function of the JNK (c-Jun N-terminal kinase) signalling pathway in physiological and pathological processes to design novel therapeutic strategies. **Biochemical Society Transactions**, v. 40, n. 1, p. 85–89, 2012.

DELGHANDI, M. P.; JOHANNESSEN, M.; MOENS, U. The cAMP signalling pathway activates CREB through PKA, p38 and MSK1 in NIH 3T3 cells. **Cellular Signalling**, v. 17, n. 11, p. 1343–1351, 2005.

DEMIDOVA-RICE, T. N.; HAMBLIN, M. R.; HERMAN, I. M. Acute and impaired wound healing: Pathophysiology and current methods for drug delivery, part 2: Role of growth factors in normal and pathological wound healing: Therapeutic potential and methods of delivery.

Advances in Skin and Wound Care, v. 25, n. 8, p. 349–370, 2012.

DEMIRCI, S. et al. Cytoglobin inhibits migration through PI3K/AKT/mTOR pathway in fibroblast cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 437, n. 1–2, p. 133–142, 2018.

DESMOULIERE, A. et al. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, p. 301, 2014a.

DESMOULIERE, A. et al. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, p. 301, 2014b.

DONG, Z. et al. IL-27 attenuates the TGF- β 1-induced proliferation, differentiation and collagen synthesis in lung fibroblasts. **Life Sciences**, v. 146, p. 24–33, 2016.

DRISKELL, R. R. et al. Hair follicle dermal papilla cells at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 124, n. 8, p. 1179–1182, 2011.

DRISKELL, R. R.; WATT, F. M. Understanding fibroblast heterogeneity in the skin. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 2, p. 92–99, 2015.

DULMOVITS, B. M.; HERMAN, I. M. **Microvascular remodeling and wound healing: A role for pericytes** **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, 2012.

DZIAŁO, M. et al. The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 2, p. 1–41, 2016.

EDIN, M. L.; HOWE, A. K.; JULIANO, R. L. Inhibition of PKA blocks fibroblast migration in response to growth factors. **Experimental Cell Research**, v. 270, n. 2, p. 214–222, 2001.

EL-SEEDI, H. R. et al. Biosynthesis, natural sources, dietary intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 44, p. 10877–10895, 2012.

FATIMA, A. et al. Wound Healing Agents: The Role of Natural and Non-Natural Products in Drug Development. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 9, p. 879–888, 2008.

FERNANDES, K. J. L. et al. A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. **Nature Cell Biology**, v. 6, n. 11, p. 1082–1093, 2004.

FRENKEL, J. S. The role of hyaluronan in wound healing. **International Wound Journal**, v. 11, n. 2, p. 159–163, 2014.

GABRIELE, E. et al. New sulfurated derivatives of cinnamic acids and rosmarinic acid as inhibitors of STAT3 and NF- κ B transcription factors. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 1012–1028, 2017.

GEOFFREY, G. C.; BARRANDON, S. W. Y.; LONGAKER, M. T. Wound repair and regeneration. **European Surgical Research**, v. 49, n. 1, p. 35–43, 2012.

GONZALEZ, A. C. DE O. et al. Wound healing - A literature review. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 2016.

GOTTRUP, F.; ÅGREN, M. S.; KARLSMARK, T. Models for use in wound healing research: A survey focusing on in vitro and in vivo adult soft tissue. **Wound Repair and Regeneration**, v. 8, n. 2, p. 83–96, 2000.

GOULD, L. et al. Chronic wound repair and healing in older adults: Current status and future research. **Wound Repair and Regeneration**, v. 23, n. 1, p. 1–13, 2015.

GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Critical review in oral biology & medicine: Factors affecting wound healing. **Journal of Dental Research**, 2010.

HALL, A. P. Review of the Pericyte during Angiogenesis and its Role in Cancer and Diabetic Retinopathy. **Toxicologic Pathology**, v. 34, n. 6, p. 763–775, 2006.

HARPER, E. G. Wounding activates p38 map kinase and activation transcription factor 3 in leading keratinocytes. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. 15, p. 3471–3485, 2005.

HINZ, B. et al. Recent developments in myofibroblast biology: Paradigms for connective tissue remodeling. **American Journal of Pathology**, v. 180, n. 4, p. 1340–1355, 2012.

HOCHSTEIN, A. O.; BHATIA, A. Collagen : Its Role in Wound Healing. **Podiatry Management**, n. August, p. 103–110, 2014.

HSEU, Y. C. et al. Trans-cinnamic acid attenuates UVA-induced photoaging through inhibition of AP-1 activation and induction of Nrf2-mediated antioxidant genes in human skin fibroblasts. **Journal of Dermatological Science**, v. 90, n. 2, p. 123–134, 2018.

- HUANG, G.; SHI, L. Z.; CHI, H. Regulation of JNK and p38 MAPK in the immune system: Signal integration, propagation and termination. **Cytokine**, v. 48, n. 3, p. 161–169, 2009.
- INAMDAR, P. K. et al. Determination of biologically active constituents in *Centella asiatica*. **Journal of Chromatography A**, v. 742, n. 1–2, p. 127–130, 1996.
- IORIO, V.; TROUGHTON, L. D.; HAMILL, K. J. Laminins: Roles and Utility in Wound Repair. **Advances in Wound Care**, v. 4, n. 4, p. 250–263, 2015.
- JENNEWEIN, C.; TRAN, N. <Title/>. **Molecular Medicine**, v. 17, n. 5–6, p. 1, 2011.
- JINNO, H. et al. Convergent genesis of an adult neural crest-like dermal stem cell from distinct developmental origins. **Stem Cells**, v. 28, n. 11, p. 2027–2040, 2010.
- JONKMAN, J. E. N. et al. Cell Adhesion & Migration An introduction to the wound healing assay using livecell microscopy An introduction to the wound healing assay using livecell microscopy. **Cell adhesion and migration**, v. 8, n. 5, p. 440–451, 2014.
- KALLURI, R. The biology and function of fibroblasts in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 9, p. 582–598, 2016.
- KASPRZAK, K. et al. Phenolic Acid Content and Antioxidant Properties of Extruded Corn Snacks Enriched with Kale. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2018, 2018.
- KASUYA, A.; TOKURA, Y. Attempts to accelerate wound healing. **Journal of Dermatological Science**, v. 76, n. 3, p. 169–172, 2014.
- KINASE, M. P. et al. CELL BIOLOGY AND METABOLISM : Induction of Apoptosis by SB202190 through Inhibition of p38 β Induction of Apoptosis by SB202190 through Inhibition of p38 □ Mitogen-activated Protein Kinase *. v. 273, n. 26, p. 16415–16420, 1998.
- KOPP, C. et al. Trans-cinnamic acid increases adiponectin and the phosphorylation of AMP-activated protein kinase through g-protein-coupled receptor signaling in 3T3-L1 adipocytes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 2, p. 2906–2915, 2014.
- KUBOW, K. E. et al. Mechanical forces regulate the interactions of fibronectin and collagen I in extracellular matrix. **Nature communications**, v. 6, p. 8026, 2015.
- KUONEN, R. et al. Effects of Lipophilic Extract of *Viscum album* L. and Oleanolic Acid on

Migratory Activity of NIH/3T3 Fibroblasts and on HaCat Keratinocytes . **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1–7, 2013.

LEE, J.; TUMBAR, T. Hairy tale of signaling in hair follicle development and cycling. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 23, n. 8, p. 906–916, 2012.

LENSELINK, E. A. Role of fibronectin in normal wound healing. **International Wound Journal**, v. 12, n. 3, p. 313–316, 2015.

LERMAN, O. Z. et al. Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast: Impairment in migration, vascular endothelial growth factor production, and response to hypoxia. **American Journal of Pathology**, v. 162, n. 1, p. 303–312, 2003.

LEVY, M. T. et al. Fibroblast activation protein: A cell surface dipeptidyl peptidase and gelatinase expressed by stellate cells at the tissue remodelling interface in human cirrhosis. **Hepatology**, v. 29, n. 6, p. 1768–1778, 1999.

LI, B.; WANG, J. H. C. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: Force generation and measurement. **Journal of Tissue Viability**, v. 20, n. 4, p. 108–120, 2011.

LI, F. et al. Effect of celecoxib on proliferation, collagen expression, ERK1/2 and SMAD2/3 phosphorylation in NIH/3T3 fibroblasts. **European Journal of Pharmacology**, v. 678, n. 1–3, p. 1–5, 2012.

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, 2007.

LIANG, H. et al. Effect of earthworm active protein on fibroblast proliferation and its mechanism. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 4, p. 732–739, 2015.

LIN, F. et al. Three-dimensional migration of human adult dermal fibroblasts from collagen lattices into fibrin/fibronectin gels requires syndecan-4 proteoglycan. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 124, n. 5, p. 906–913, 2005.

LO, A. et al. Tumor-promoting desmoplasia is disrupted by depleting FAP-expressing stromal cells. **Cancer Research**, v. 75, n. 14, p. 2800–2810, 2015.

LOUGHLIN, D. T.; ARTLETT, C. M. Modification of collagen by 3-deoxyglucosone alters

wound healing through differential regulation of p38 MAP kinase. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, 2011.

LV, T. et al. Proliferation in cardiac fibroblasts induced by β 1-adrenoceptor autoantibody and the underlying mechanisms. **Scientific Reports**, v. 6, n. August, p. 1–15, 2016.

MAHER, P. Phorbol esters inhibit fibroblast growth factor-2-stimulated fibroblast proliferation by a p38 MAP kinase dependent pathway. **Oncogene**, v. 21, n. 13, p. 1978–1988, 2002.

MAO, G. et al. HHS Public Access. v. 43, n. 1, p. 31–39, 2016.

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

MENEZES, J. C. J. M. D. S. et al. Long Chain Alkyl Esters of Hydroxycinnamic Acids as Promising Anticancer Agents: Selective Induction of Apoptosis in Cancer Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 33, p. 7228–7239, 2017.

MENKE, N. B. et al. Impaired wound healing. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 1, p. 19–25, 2007.

MOULIN, V. et al. Modulated response to cytokines of human wound healing myofibroblasts compared to dermal fibroblasts. **Experimental Cell Research**, v. 238, n. 1, p. 283–293, 1998.

MOURA, D. et al. Revisão. v. 34, n. 6, p. 1051–1056, 2011.

MURAKAMI, Y. et al. Cytotoxicity and pro-/anti-inflammatory properties of cinnamates, acrylates and methacrylates against RAW264.7 cells. **In Vivo**, v. 32, n. 6, p. 1309–1321, 2018.

NAGASAKA, R. et al. Anti-inflammatory effects of hydroxycinnamic acid derivatives. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 358, n. 2, p. 615–619, 2007.

NEUMAN, M. G. et al. Hyaluronic acid and wound healing. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 18, n. 1, p. 53–60, 2015.

NEVE, A. et al. Extracellular matrix modulates angiogenesis in physiological and pathological conditions. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

O’CONNOR, K. L.; MERCURIO, A. M. Protein Kinase A Regulates Rac and Is Required for the Growth Factor-stimulated Migration of Carcinoma Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v.

276, n. 51, p. 47895–47900, 2001.

OF, B.; HEALING, W. Epstein1999_Woundhealing. 1999.

ÖHLUND, D. et al. Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. **The Journal of Experimental Medicine**, p. jem.20162024, 2017.

ORAK, H. H. et al. Antioxidant potential and phenolic compounds of some widely consumed Turkish white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 66, n. 4, p. 253–260, 2016.

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

PACHUAU, L. Recent developments in novel drug delivery systems for wound healing. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 12, n. 12, p. 1895–1909, 2015.

PARK, J. E.; BARBUL, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **American Journal of Surgery**, v. 187, n. 5 SUPPL. 1, p. S11–S16, 2004.

PHAN, T. T. et al. Phenolic compounds of *Chromolaena odorata* protect cultured skin cells from oxidative damage: implication for cutaneous wound healing. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, n. 12, p. 1373–1379, 2001.

PRAGASAM, S. J.; VENKATESAN, V.; RASOOL, M. Immunomodulatory and anti-inflammatory effect of p-coumaric acid, a common dietary polyphenol on experimental inflammation in rats. **Inflammation**, v. 36, n. 1, p. 169–176, 2013.

RANGARAJ, A.; HARDING, K.; LEAPER, D. Role of collagen in wound management. **Wounds UK**, v. 7, n. 2, p. 54–63, 2011.

RODRIGUEZ, P. G. et al. The role of oxygen in wound healing: A review of the literature. **Dermatologic Surgery**, v. 34, n. 9, p. 1159–1169, 2008.

ROZARIO, T.; DESIMONE, D. W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: A dynamic view. **Developmental Biology**, v. 341, n. 1, p. 126–140, 2010.

SAN MIGUEL, S. M. et al. Antioxidants Counteract Nicotine and Promote Migration via RacGTP in Oral Fibroblast Cells. **Journal of Periodontology**, v. 81, n. 11, p. 1675–1690, 2010.

SCHILLER, M. et al. Increased cAMP levels modulate transforming growth factor- β /smad-induced expression of extracellular matrix components and other key fibroblast effector functions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 1, p. 409–421, 2010.

SCHWARTZ, M. A.; GINSBERG, M. H. Networks and crosstalk: Integrin signalling spreads. **Nature Cell Biology**, v. 4, n. 4, p. 65–68, 2002.

SENNETT, R.; RENDL, M. Mesenchymal-epithelial interactions during hair follicle morphogenesis and cycling. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 23, n. 8, p. 917–927, 2012.

SEOK, J. K.; BOO, Y. C. P-coumaric acid attenuates UVB-induced release of stratifin from keratinocytes and indirectly regulates matrix metalloproteinase 1 release from fibroblasts. **Korean Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 19, n. 3, p. 241–247, 2015.

SERINI, G.; GABBIANI, G. Mechanisms of Myofibroblast Activity and Phenotypic Modulation. **Experimental Cell Research**, v. 250, n. 2, p. 273–283, 1999.

SERVAIS, C.; EREZ, N. From sentinel cells to inflammatory culprits: Cancer-associated fibroblasts in tumour-related inflammation. **Journal of Pathology**, v. 229, n. 2, p. 198–207, 2013.

SIMPSON, M. J.; LO, K. Y.; SUN, Y. S. Quantifying the roles of random motility and directed motility using advection-diffusion theory for a 3T3 fibroblast cell migration assay stimulated with an electric field. **BMC Systems Biology**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2017.

SINGH, M. R. et al. Innovative approaches in wound healing: Trajectory and advances. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 41, n. 3, p. 202–212, 2013.

SMANIOTTO, S. et al. Growth hormone modulates thymocyte development in vivo through a combined action of laminin and CXC chemokine ligand 12. **Endocrinology**, v. 146, n. 7, p. 3005–3017, 2005.

SORRELL, J. M. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 5, p. 667–675, 2004.

SORRELL, J. M.; CAPLAN, A. I. Chapter 4 Fibroblasts-A Diverse Population at the Center of It

All. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 276, n. C, p. 161–214, 2009.

SPENCER, J. P. E. et al. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. **British Journal of Nutrition**, v. 99, n. 1, p. 12–22, 2008.

STAMM, A. et al. In vitro wound healing assays - State of the art. **BioNanoMaterials**, v. 17, n. 1–2, p. 79–87, 2016.

STEPP, M. A. Defects in keratinocyte activation during wound healing in the syndecan-1-deficient mouse. **Journal of Cell Science**, v. 115, n. 23, p. 4517–4531, 2002.

SWIFT, M. E. et al. Age-related alterations in the inflammatory response to dermal injury. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 117, n. 5, p. 1027–1035, 2001.

TAKEO, M.; ITO, M. Hair follicle and skin regeneration. **Biomaterials and Regenerative Medicine**, p. 590–602, 2015.

TAOFIQ, O. et al. Hydroxycinnamic acids and their derivatives: Cosmeceutical significance, challenges and future perspectives, a review. **Molecules**, v. 22, n. 2, 2017.

TAYLOR, K. R.; GALLO, R. L. Can the patient make treatment decisions? Evaluating decisional capacity. **Cleveland Clinic journal of medicine**, v. 64, n. 9, p. 461–464, 2006.

TCHOU, J. et al. Fibroblast activation protein expression by stromal cells and tumor-associated macrophages in human breast cancer. **Human Pathology**, v. 44, n. 11, p. 2549–2557, 2013.

TOMASEK, J. J. et al. Myofibroblasts and mechano: Regulation of connective tissue remodelling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 5, p. 349–363, 2002.

TRACY, L. E.; MINASIAN, R. A.; CATERSON, E. J. Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. **Advances in Wound Care**, v. 5, n. 3, p. 119–136, 2016.

VANDE BERG, J. S.; ROBSON, M. C. Arresting cell cycles and the effect on wound healing. **Surgical Clinics of North America**, v. 83, n. 3, p. 509–520, 2003.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. **Circulation Research**, v. 92, n. 8, p. 827–839, 2003.

WALL, I. B. et al. Fibroblast dysfunction is a key factor in the non-healing of chronic venous leg ulcers. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, n. 10, p. 2526–2540, 2008.

WANG, I. K.; LIN-SHIAU, S. Y.; LIN, J. K. Suppression of invasion and MMP-9 expression in NIH 3T3 and v-H-Ras 3T3 fibroblasts by lovastatin through inhibition of Ras isoprenylation. **Oncology**, v. 59, n. 3, p. 245–254, 2000.

WITTE, M. B.; BARBUL, A. General principles of wound healing. **Surgical Clinics of North America**, v. 77, n. 3, p. 509–528, 1997.

XUE, G.; HEMMING, B. A. PKB/akt-dependent regulation of cell motility. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 105, n. 6, p. 393–404, 2013.

YANG, D. J. et al. Gallic Acid Promotes Wound Healing in Normal and Hyperglucidic Conditions. **Molecules**, v. 21, n. 7, p. 1–15, 2016a.

YANG, X. et al. **FAP Promotes immunosuppression by cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment via STAT3-CCL2 Signaling.** [s.l: s.n.]. v. 76

YILMAZ, S.; SOVA, M.; ERGÜN, S. **Antimicrobial activity of trans-cinnamic acid and commonly used antibiotics against important fish pathogens and nonpathogenic isolates.** [s.l: s.n.]. v. 125

ZHOU, Z. et al. Impaired angiogenesis, delayed wound healing and retarded tumor growth in Perlecan heparan sulfate-deficient mice. **Cancer Research**, v. 64, n. 14, p. 4699–4702, 2004.

ZIELINS, E. R. et al. Emerging drugs for the treatment of wound healing. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 20, n. 2, p. 235–246, 2015.