

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MARK DE SOUSA PINHEIRO FIDELIX

EFEITO DO ÁCIDO TRANS-CINÂMICO NA TRANSDIFERENCIAÇÃO EPITELIAL-
MESENQUIMAL EM CÉLULAS DO EPITÉLIO ALVEOLAR

MACEIÓ

2023

MARK DE SOUSA PINHEIRO FIDELIX

EFEITO DO ÁCIDO TRANS-CINÂMICO NA TRANSDIFERENCIAÇÃO EPITELIAL-
MESENQUIMAL EM CÉLULAS DO EPITÉLIO ALVEOLAR

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Bacharelado em Ciências Biológicas, do
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, da
Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial
para obtenção do título de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Orientador: Prof. Emiliano de Oliveira Barreto

Maceió

2023

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

F451e Fidelix, Mark de Sousa Pinheiro.

Efeito do ácido trans-cinâmico na transdiferenciação
epitelial- mesenquimal em células do epitélio alveolar / Mark
de Sousa PinheiroFidelix. – 2023.
30 f. : il. color.

Orientador: Emiliano de Oliveira Barreto.

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências
Biológicas: Bacharelado) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto
de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2023.

Bibliografia: f. 28-30.

1. Transição Epitelial-Mesenquimal. 2. Fibrose. 3. Ácido trans-
cinâmico.

I. Título.

CDU: 611.018.7

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARK DE SOUSA PINHEIRO FIDELIX

EFEITO DO ÁCIDO TRANS-CINÂMICO NA TRANSDIFERENCIAÇÃO EPITELIAL-MESENQUIMAL EM CÉLULAS DO EPITÉLIO ALVEOLAR

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Coordenação do
Bacharelado em Ciências
Biológicas como requisito
parcial para obtenção do grau de
Bacharel em Ciências
Biológicas.

Aprovado em 1º de Março de 2023.

Banca examinadora

Dr. Emiliano de Oliveira Barreto

Dra. Jordana Rodrigues de Santana

Dr. Rafael Vital dos Santos

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Alagoas por me fornecer ensino de qualidade, com professores excepcionais e estrutura para o desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação do Curso de Ciências Biológicas – Bacharelado, pela atenção e ajuda em diversos momentos, não só durante a realização deste trabalho, como durante todo meu tempo no curso.

À todos os membros do Laboratório de Biologia Celular, pela disposição em ajudar e ensinar, em especial ao professor Emiliano por me orientar e incentivar e aos meus colegas de laboratório Erick Ferreira e Alef Batista por me ensinarem e auxiliarem durante todo o desenvolvimento experimental deste trabalho.

RESUMO

A transição epitelial-mesenquimal (EMT) é um processo de transdiferenciação em que células epiteliais passam a apresentar fenótipo mesenquimal. Pode ocorrer de forma fisiológica, como na embriogênese ou de forma patológica, como nas respostas fibróticas. Em condições de inflamação crônica, a EMT tem participação importante na patogênese e progressão da fibrose. A fibrose decorre de uma deposição excessiva de componentes de matriz extracelular que leva a perda de função do tecido original. A principal célula efetora na fibrose é o miofibroblasto, que durante uma resposta inflamatória crônica acumula-se no tecido devido a diferenciação de fibroblastos e também devido à transdiferenciação de células epiteliais. Estudos científicos publicados na última década apontam que a inibição dos eventos associados à EMT reduzem a progressão do processo fibrótico nos tecidos, indicando que a EMT é um potencial alvo para tratamento de desordens fibróticas. Doenças fibróticas possuem impacto negativo na saúde da população, e, até o momento, não há um tratamento farmacológico eficaz. Na tentativa de buscar novas moléculas com potencial terapêutico para a fibrose, os produtos naturais têm sido promissores para pesquisas farmacológicas. Compostos fenólicos da classe do ácido cinâmico mostraram efeitos anti-inflamatório, antioxidante e antibacteriano. O ácido *trans*-cinâmico (TCA) é a isoforma do ácido cinâmico mais presente na natureza e seus potenciais efeitos na EMT no contexto da fibrose não foram reportados na literatura científica até o momento. Neste contexto, o objetivo deste projeto foi investigar *in vitro* o efeito do ácido *trans*-cinâmico sobre aspectos morfológicos e moleculares associados à transdiferenciação epitelial-mesenquimal em células do epitélio alveolar humano. Para isso, foram utilizadas células humanas da linhagem A549. O efeito citotóxico do TCA foi avaliado pelo método MTT. As células foram tratadas com TGF- β para indução da EMT. Após 24 horas de exposição ao TCA, aspectos morfológicos foram observados por microscopia de luz e produção da fibronectina (marcador mesenquimal) foram quantificados por microscopia de fluorescência. A capacidade migratória foi mensurada pelo ensaio de migração horizontal. Resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Nossos resultados revelaram que o TCA não demonstrou efeito citotóxico relevante nas concentrações testadas. O TCA inibiu a produção da fibronectina e a capacidade migratória das células e afetou a morfologia celular. Em conjunto, os resultados do presente estudo são inéditos na literatura científica, e sugerem que o TCA possui um potencial modulador sobre o processo de EMT.

Palavras-chave: ácido *trans*-cinâmico, transição epitelial-mesenquimal, fibrose

ABSTRACT

The epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a process of transdifferentiation in which epithelial cells start to show a mesenchymal phenotype. It can occur in a physiological form, as in embryogenesis or in a pathological form, as in fibrotic responses. In chronic inflammation conditions, EMT has an important role on the pathogenesis of fibrosis. Fibrosis is caused by excessive deposition of extracellular matrix components and loss of function of the original tissue. The main effector cell in fibrosis is the myofibroblast, which during a chronic inflammatory response accumulates in the tissue due to the differentiation of fibroblasts and due to the transdifferentiation of epithelial cells. Scientific studies published in the last decade indicate that the inhibition of events associated to EMT reduce the progression of the fibrotic process on tissues, suggesting that EMT is a potential target for treatment of fibrotic disorders. Fibrotic diseases have a great impact on populational health. However, there is yet no cure for fibrosis and the available drugs are not efficient. In the attempt to search for new molecules with therapeutic potential, natural products have been promising for pharmacological research. Phenolic compounds from the cinnamic acid class have showed anti-inflammatory, antioxidant and anti-bacterial effects. The *trans*-cinnamic acid (TCA) is the most present isoform of cinnamic acid in nature and its potential effects on EMT in the fibrosis context are not reported in the scientific literature until now. In this context, the objective of this project was to investigate the effect of *trans*-cinnamic acid *in vitro* on morphological and molecular aspects associated to the epithelial-mesenchymal transdifferentiation on human alveolar epithelial cells. For this were used human cells of the A549 line. The cytotoxic effect of TCA was evaluated by the MTT method. Cells were treated with TGF- β to induce EMT. After 24 h after TCA treatment, morphological aspects were observed through microscopy and fibronectin production (a mesenchymal molecular markers) were quantified by fluorescent microscopy. The migratory capacity was measured by the scratch-wound healing assay. Results of this study showed no cytotoxic effect at low concentrations. TCA inhibited the production of fibronectin and the migratory capacity of cells and seem to affect cell morphology. Taken together, the results of the present study are new in the scientific literature, and suggest that TCA has a potential modulator effect on EMT process.

Keywords: *trans*-cinnamic acid, epithelial-mesenchymal transition, fibrosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do ácido <i>trans</i> -cinâmico	16
Figura 2. Efeito do ácido <i>trans</i> -cinâmico na viabilidade celular de pneumócitos da linhagem A549 depois de 24 horas de exposição à diferentes concentrações.	19
Figura 3. Morfologia de células A549 coradas com cristal violeta e observadas sob microscópio após 24 horas de exposição a TCA (30 µM).	20
Figura 4. (A) Expressão de fibronectina observada em microscópio de fluorescência após 24 horas de exposição a TCA 30 µM. (B) Quantificação da fluorescência da fibronectina após 24 horas de exposição a TCA 30 µM.	22
Figura 5. Migração celular após 24 horas de exposição a diferentes concentrações de TCA (1/3/10/30 µM) representada pela % de fechamento do risco no ensaio de migração horizontal.	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	Proteína quinase RAC- α serina/treonina
α-SMA	Actina de músculo liso α
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
DMEM	Meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECM	Matriz extra-celular
EMT	Transição epitelial-mesenquimal
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
FSP1	Proteína específica de fibroblastos 1
JNK	Quinase JUN N-terminal
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MTT	3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-brometo de difeniltetrazólio
PBS	Tampão fosfato-salino
PLGA-NPs	Nanopartículas de poli (ácido lático-co-ácido glicólico)
ROCK	Quinase associada a RHO
TCA	Ácido <i>trans</i> -cinâmico
TGF-β	Fator de crescimento transformativo β 1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVO GERAL E OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3	REFERÊNCIAL TEÓRICO	12
3.1	Células epiteliais	12
3.2	Epitélio alveolar	12
3.3	Transdiferenciação epitelial-mesenquimal	13
3.4	Fibrose	14
3.5	Produtos naturais.....	15
3.6	Ácido <i>trans</i> -cinâmico	16
4	METODOLOGIA	17
4.1	Células	17
4.2	Ensaio de viabilidade celular	17
4.3	Ensaio de migração celular	17
4.4	Avaliação da morfologia celular.....	17
4.5	Avaliação da produção de constituintes de matriz extracelular por imunofluorescência	18
4.6	Análise estatística	18
5	RESULTADOS	19
5.1	Citotoxicidade do TCA.....	19
5.2	Efeito do TCA na morfologia epitelial	19
5.3	Efeito do TCA na expressão de fibronectina	21
5.4	Efeito do TCA na migração celular	22
6	DISCUSSÃO.....	24
7	CONCLUSÃO	27
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

1 INTRODUÇÃO

A transição epitelial-mesenquimal (EMT) é um processo de transdiferenciação em que células epiteliais passam a apresentar fenótipo mesenquimal, onde a célula de forma gradativa e simultânea, perde a polarização típica de células epiteliais e adquire características de células mesenquimais. Como resultado funcional, as células passam a exibir um aumento na capacidade migratória, capacidade invasiva, produção de componentes de matriz extracelular (ECM) e resistência a apoptose (KALLURI e WEINBERG, 2009). A EMT pode ocorrer de forma fisiológica, durante a embriogênese e no reparo tecidual normal, ou de forma patológica, no câncer ou deflagrada pela resposta inflamatória. Em condições de inflamação crônica, a EMT vêm sendo apontada como um mecanismo importante na patogênese da fibrose (MARCONI et al., 2021).

A fibrose é um estado patológico do reparo tecidual decorrente da evolução de respostas inflamatórias crônicas. É representada pela contínua substituição do tecido afetado por tecido cicatricial, causando remodelação da arquitetura do órgão e seu mal funcionamento (LI et al., 2016). Em geral, a condição fibrótica decorre quando algum estímulo permanece no tecido de maneira crônica e estimula a produção contínua de fatores de crescimento, fatores angiogênicos, citocinas fibrogênicas e enzimas proteolíticas, estimulando a deposição excessiva de elementos de tecido conjuntivo e, conseqüentemente, causando dano permanente no órgão (WYNN, 2008).

O principal tipo celular responsável pela deposição de componentes de ECM como colágeno tipo I e, especialmente em condições patológicas, colágeno tipo III é o miofibroblasto (GABBIANI, 2003). Miofibroblastos possuem fenótipo intermediário de fibroblasto e de músculo liso e são originados de diferentes maneiras, incluindo a partir da diferenciação de fibroblastos residentes no tecido. Contudo, a EMT vêm sendo apontada como um mecanismo importante para a formação destas células em doenças fibróticas (LI et al., 2016). Eventos moleculares associados à EMT, como a expressão excessiva do fator de crescimento transformativo β (TGF- β), têm sido propostos como alvos terapêuticos para diferentes condições fibróticas (PENG et al, 2022).

Em países desenvolvidos, mais de 40% das mortes são atribuídas à doenças relacionadas a fibroproliferação, como fibrose pulmonar, esclerose sistêmica, cirrose hepática, doenças cardiovasculares, dentre outras (WYNN, 2007). Os fármacos utilizados atualmente no tratamento da fibrose possuem eficácia limitada e efeitos adversos ao paciente. Assim, a fibrose continua sendo uma condição patológica sem cura (WANG et al., 2021). Portanto, há

necessidade de identificar moléculas bioativas capazes de modular a resposta fibrótica, especialmente aquelas que podem afetar aspectos celulares e moleculares da EMT (PENG et al., 2020).

Diversos produtos naturais são estudados como potenciais fontes de novas moléculas bioativas para tratamento de diversas condições patológicas (CHOPRA e DHINGRA, 2021). Metabólitos primários ou secundários de plantas são comumente estudados, como por exemplo, compostos fenólicos, que estão presentes em várias plantas que ocorrem no Brasil (PEREIRA et al., 2017).

Dentre os compostos com propriedades terapêuticas, os derivados do ácido cinâmico, que estão presentes em muitos frutos e vegetais, principalmente na forma de isômeros E (*trans*), vêm sendo reportados como possuidores de efeitos anti-inflamatórios, anti-oxidantes e anti-bacterianos (HERRMANN e NAGEL, 1989; CONTARDI et al., 2021). O ácido *trans*-cinâmico (TCA) é o isômero E do ácido cinâmico. Porém, até o momento não há registros de estudos sobre o potencial modulador do TCA sobre a EMT em células do epitélio alveolar. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito do ácido *trans*-cinâmico na transdiferenciação epitelial-mesenquimal *in vitro*, utilizando como modelo células do epitélio alveolar humano da linhagem A549.

2 OBJETIVO GERAL E OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito do ácido *trans*-cinâmico na transdiferenciação epitelial-mesenquimal *in vitro*, utilizando como modelo células do epitélio alveolar da linhagem A549.

De forma específica os objetivos foram:

1. Avaliar o efeito do ácido *trans*-cinâmico sobre a viabilidade de células do epitélio alveolar.
2. Avaliar, em células do epitélio alveolar, o efeito do ácido *trans*-cinâmico em modificações morfológicas relacionadas a transição epitelial-mesenquimal.
3. Avaliar, em células do epitélio alveolar, o efeito do ácido *trans*-cinâmico sobre a migração celular.
4. Avaliar, em células do epitélio alveolar, o efeito do ácido *trans*-cinâmico sobre a produção de proteínas de matriz extracelular (fibronectina).

3 REFERÊNCIAL TEÓRICO

3.1 Células epiteliais

As células epiteliais são o tipo celular mais comum nos metazoários. Em geral, possuem forma poliédrica e organizam-se como folhetos, tubos ou aglomerados, sempre justapostas umas com as outras, firmemente ligadas por junções intercelulares e ancoradas no tecido subjacente. Estas células possuem uma assimetria estrutural denominada de polarização apical-basal. Esta polaridade é essencial para a forma e função das células epiteliais. A porção da célula que fica voltada para o exterior ou para o lúmen de órgãos ocos é chamada de porção apical e o resto da superfície celular, que fica ancorada no tecido conjuntivo subjacente é chamada de porção basal. Funcionalmente, a membrana plasmática pode ser dividida em superfície apical (voltada ao lúmen), e superfície basolateral (em contato com células adjacentes ou com o tecido conjuntivo subjacente). (ALBERTS et al., 2021; BUCKLEY e ST JOHNSTON, 2022; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2017).

Estas superfícies da membrana plasmática são separadas por um cinturão de junções de oclusão localizado na porção apical da membrana, que impede a difusão livre de proteínas e lipídios entre elas, além também impedir a difusão de substâncias pelos espaços intercelulares. Adjacente à este, há outro “cinturão” na superfície basolateral, desta vez com junções aderentes que são mediadas pelo receptor de adesão transmembrana E-caderina (XU, LAMOUILLE e DERYNCK, 2009).

O epitélio é geralmente o primeiro tecido a encontrar substâncias nocivas como poluentes, microorganismos ou alergênicos. Quando se consideram os processos inflamatório, as células do epitélio são classicamente vistas como alvos que respondem ao estímulo. Porém, muitas vezes, especialmente no epitélio pulmonar, as células epiteliais também atuam como efetoras da inflamação (MARTIN et al., 1997).

3.2 Epitélio alveolar

O epitélio alveolar é classificado como epitélio simples pavimentoso e possui dois tipos celulares: pneumócitos tipo I e pneumócitos tipo II (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2017). As células tipo I cobrem mais de 90% da área total do epitélio alveolar e não entram em divisão celular. Já as células tipo II são mais numerosas e possuem diferentes funções no epitélio

alveolar, além de serem capazes de entrar em mitose. A linhagem celular A549, que foi utilizada neste trabalho, pertence aos pneumócitos tipo II (FOSTER et al., 1998).

Quando sob estresse causado por dano inflamatório, além das típicas respostas como o aumento na secreção de muco e alteração na atividade ciliar, as células do epitélio alveolar também atuam como efetoras, secretando fatores pró-inflamatórios e pró-fibróticos como interleucinas e TGF- β , intensificando o processo fibrótico (WANG et al., 2020). Por exemplo, na fibrose pulmonar idiopática, o TGF- β é principalmente derivado de macrófagos e pneumócitos tipo II (PENG et al., 2022).

3.3 Transdiferenciação epitelial-mesenquimal

A transdiferenciação ou transição epitelial-mesenquimal (EMT) foi, inicialmente, denominada “transformação epitelial-mesenquimal”. A mudança para a utilização do termo “transição” se deu para diferenciá-la da transformação neoplásica, causada pelo efeito de carcinógenos, e pela reversibilidade desta transição sob a forma de outro fenômeno denominado transição mesenquimal-epitelial (KALLURI e WEINBERG, 2009).

A EMT pode ser dividida em 3 tipos: EMT tipo 1, que ocorre durante o desenvolvimento embrionário, onde células do epitélio embrionário dão origem a células de mesenquima primário que migram para formar outros órgãos. Há também a EMT tipo 3, que ocorre em carcinomas epiteliais que sofreram mudanças genéticas e epigenéticas e é um processo importante para a capacidade invasiva e migratória de tumores metastáticos. Já a EMT tipo 2 é a mais relevante no contexto da regeneração e reparo de ferimentos e será o foco deste trabalho. Nesta, as células epiteliais adquirem fenótipos de fibroblastos para auxiliar no processo de cicatricial (LI et al. 2016; MORENO-BUENO et al., 2009).

As células epiteliais perdem suas junções aderentes e a aderência à ECM mediada por integrinas, além de sofrer uma profunda reorganização do citoesqueleto de actina, perdendo a polaridade funcional apical-basolateral típica de células epiteiliais, passando a ter uma morfologia mesenquimal (LAMOUILLE, XU e DERYNCK, 2014). As células em transição diminuem a produção de marcadores epiteliais, como a E-caderina, a proteína de junções de oclusão 1 (ZO-1) e citoqueratina e aumentam a produção de marcadores mesenquimais, como vimentina, N-caderina, proteína específica de fibroblastos 1 (FSP1) e a actina de musculo liso alfa (α -SMA), além de também expressar metaloproteases. É importante mencionar que a transição nem sempre é completa, e, a depender dos estímulos, uma célula pode se manter em um fenótipo intermediário entre epitélio e mesenquima (LI et al., 2016; STONE et al., 2015).

Em contextos fisiológicos de cicatrização e regeneração, a EMT possui função importante, principalmente durante a re-epitelização, onde células epiteliais na margem da lesão passam por EMT e migram pela lesão. A EMT também contribui para a formação dos miofibroblastos, que além de secretar componentes de ECM, também possuem capacidade contratória e contribuem mecanicamente para o fechamento do ferimento. Após a re-epitelização, muitos miofibroblastos sofrem apoptose e a produção extensiva de componentes de ECM é cessada (STONE et al., 2016).

Na patogênese da fibrose, similarmente, as células epiteliais se tornam importantes precursores de fibroblastos e miofibroblastos por EMT e passam a ter características como aumento da capacidade migratória, capacidade contratória pela expressão de α -SMA e secreção de componentes de ECM como colágeno, fibronectina, laminina, elastina e tenacina, além de sinais pró-inflamatórios. Contudo, no contexto fibrótico, a EMT é desregulada e a ativação dos miofibroblastos é persistente, causando deposição excessiva de ECM (KALLURI e WEINBERG, 2009; STONE et al., 2016).

O principal indutor da EMT tipo 2 em muitos tipos celulares *in vitro* e *in vivo* é o fator de crescimento transformativo beta (TGF- β), uma citocina pluripotente que será utilizada neste trabalho para induzir EMT em células do epitélio alveolar (LI et al., 2016). Esta citocina é considerada uma importante molécula reguladora em repostas fibróticas. Muitos tipos celulares podem secretar TGF- β , como macrófagos, monócitos, células T, plaquetas, células epiteliais e fibroblastos. Os mediadores intracelulares mais comuns do TGF- β são da família de proteínas Smad, contudo, outras vias relevantes para a fibrose podem ser ativadas, como da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e quinase regulada por sinal extracelular (ERK), da p38 e quinase JUN N-terminal (JNK) e da quinase associada a RHO (ROCK) e proteína quinase RAC- α serina/treonina (AKT) (DEES, CHAKRABORTY e DISTLER, 2020).

3.4 Fibrose

A fibrose é uma consequência patológica da maioria das doenças inflamatórias crônicas. É caracterizada pelo excesso de deposição de componentes da ECM no tecido afetado, muitas vezes descrita, como um reparo tecidual fora dos limites fisiológicos. A formação de um quadro fibrótico pode ocorrer quando um ferimento é muito severo, repetitivo, ou se as respostas de cicatrização se tornam desreguladas. Pode causar cicatrizes permanentes no órgão afetado capazes de comprometer o funcionamento deste órgão e, em certos casos, ocasionar a morte do paciente (WYNN e RAMALINGAM, 2012).

Quando um ferimento ocorre, mediadores inflamatórios são liberados, iniciando uma cascata de coagulação e a formação de uma matriz provisória no local. Fibroblastos são ativados e que começam a secretar componentes de ECM (WYNN, 2008). As principais células responsáveis pela secreção de ECM durante a cicatrização são miofibroblastos, nome dado aos fibroblastos com capacidade contrátil. Miofibroblastos podem ser derivados de muitos tipos celulares, como fibroblastos residentes do tecido, células de músculo liso, células epiteliais e células endoteliais a partir do fenômeno denominado de transdiferenciação. (DEES, CHAKRABORTY e DISTLER, 2021).

A transdiferenciação é um processo de reprogramação celular que ocorre durante o desenvolvimento tecidual, e também, na regeneração após danos normais e fisiológicos. A reprogramação celular descreve o processo no qual uma célula totalmente diferenciada redefine seu programa existente de expressão gênica sendo induzida a se transformar em um tipo de célula diferente (SISAKHTNEZHAD e MATIN, 2012).

Em condições normais, os miofibroblastos são eliminados via apoptose quando o processo cicatricial é finalizado. Já em condições patológicas de fibrose, estas populações celulares podem perdurar e continuar depositando componentes de ECM por anos (DARBY e HEWITSON, 2007). É esse excesso de deposição de componentes de ECM que pode causar deformação e mal funcionamento do órgão afetado por doenças fibróticas (GABBIANI, 2003).

A fibrose ainda é um tipo de doença de difícil tratamento. Por exemplo, na fibrose pulmonar, além da pirfenidona e nintedanibe, que são os principais fármacos utilizados para tratar os pacientes, diversas outras substâncias como glicocorticóides, antioxidantes, entre outros, são comumente utilizados. Contudo, a fibrose pulmonar continua sendo considerada uma doença sem cura, pois estas substâncias possuem eficácia limitada e podem causar efeitos adversos no paciente (WANG et al., 2021).

3.5 Produtos naturais

Desde o início da civilização, produtos naturais são usados no tratamento de doenças. Hoje, os componentes naturais, os denominados metabólitos secundários de plantas, ou produtos obtidos de organismos aquáticos ou microrganismos, vêm sendo utilizados como fonte de novos fármacos por afetarem o funcionamento de alvos moleculares-chaves de vários processos patológicos, contribuindo assim com a terapêutica para várias doenças (CHOPRA e DHINGRA, 2021).

É comum que produtos naturais possuam padrões farmacóforos relevantes, podendo ser usados também como inspiração para o desenvolvimento de drogas sintéticas mais eficientes (RODRIGUES et al., 2016). No tratamento da fibrose pulmonar, muitos compostos de origem natural, tais como ácidos triterpênicos, luteolina e tanshinona IIA, mostraram ação positiva ao inibir citocinas e diminuir a infiltração de células efetoras do processo fibrótico (WANG et al., 2021).

3.6 Ácido *trans*-cinâmico

O ácido *trans*-cinâmico (TCA; Fig. 1) é a forma mais comum do ácido cinâmico, um ácido carboxílico aromático natural e com muitos derivados. O ácido cinâmico e seus derivados estão presentes em muitas espécies de plantas, quase sempre (>99%) na forma de isômeros E (*trans*), por ser mais estável que a forma Z (*cis*) (HERRMANN e NAGEL, 1989; BADAWI et al., 2022).

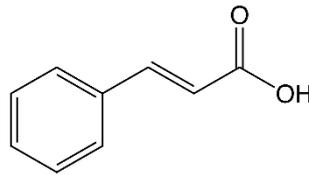


Figura 1. Estrutura química do ácido *trans*-cinâmico

Muitos dos derivados deste ácido (i.e. ácido ferulico, curcumina, ácido cafeico, ácido p-hidroxicinâmico, ácido coumarico, ácido clorogênico, entre outros) possuem efeitos farmacológicos importantes como efeitos anti-inflamatório, anti-oxidante, anti-bacteriano e anti-carcinogênico (CONTARDI et al., 2021; RUWIZHI e ADERIBIGBE, 2020). Contudo, o efeito do TCA na EMT no contexto da fibrose ainda não é conhecido na literatura científica.

4 METODOLOGIA

4.1 Células

Foram utilizadas células da linhagem epitelial alveolar humana A549 cultivadas em Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) com suplementação de 10% de soro bovino fetal, 2 μ M L-glutamina e 40 μ g/mL de penicilina e condicionadas em estufa a 37 °C e 5% CO₂.

4.2 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade das células em exposição ao ácido *trans*-cinâmico foi quantificada pelo ensaio de MTT. Células foram semeadas em microplacas de 96 poços (1x10⁴ células/poço) e mantidas durante a noite em estufa. Posteriormente, as células foram expostas a diferentes concentrações de ácido *trans*-cinâmico (TCA 0,1; 1; 3; 10; 30 μ M). Células do grupo controle foram mantidas apenas ao meio DMEM, ao veículo dimetilsulfóxido (DMSO) ou a uma solução de Tween 3% em DMEM. Após 24h de exposição, sobre as células foi acrescentado 22,5 μ L/poço de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) diluído em 5 mg/mL de tampão fosfato-salino (PBS) e mantidas por mais 4h em incubação na estufa. Após esta etapa, foi adicionado 150 μ L de DMSO para solubilizar os cristais de formazan produzidos, sendo a quantificação da densidade óptica ($\lambda = 540$ nm) realizada por meio de um espectrofotômetro de placas.

4.3 Ensaio de migração celular

A motilidade das células em resposta a exposição ao TCA foi mensurada pelo ensaio de migração horizontal (*scratch-wound healing assay*). Foram semeadas em placas de 24 poços (7x10⁴ células/poço) mantidas durante a noite em estufa. Após este período, foi realizado um risco na monocamada de células de cada poço com ponteira de 200 μ l, sendo o meio de cultura substituído por um novo. As células foram expostas a mitomicina C por 1 hora e então cada poço foi lavado com PBS e tratados por TCA com ou sem o estímulo de TGF- β (10 ng/mL). Foram feitas fotomicrografias de cada poço nos tempos de 0 e 24 horas após tratamento. Ao final deste período, foi então mensurada a taxa de fechamento da área inicial do risco após 24 horas utilizando o *software* Adobe® Photoshop®.

4.4 Avaliação da morfologia celular

O efeito do TCA sobre a transição epitelial-mesenquimal (EMT) em células da linhagem A549 foi avaliado inicialmente através da análise morfológica. As células foram cultivadas em

lamínulas circulares de 13 mm de diâmetro e mantidas a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. Após este período, as células foram tratadas com TCA (30 µM) com ou sem o estímulo de TGF-β (10 ng/mL) e mantidas por 24 h. Em seguida, as células foram fixadas com metanol por 10 minutos e coradas com a solução de cristal violeta (cristal violeta 0,05% em etanol 20%) e visualizadas em microscópio de luz.

4.5 Avaliação da produção de constituinte de matriz extracelular por imunofluorescência

As células (7×10^4 células/poço) foram cultivadas em lamínulas circulares de 13 mm de diâmetro em placas de 24 poços e mantidas a 37°C e 2,5% de CO₂ por 24 horas. Após este período, as células foram expostas ao TCA com ou sem o estímulo de TGF-β (10 ng/mL) e mantidas por mais 24 h. Posteriormente, o meio de cultura foi removido e as células lavadas 2 vezes com PBS gelado, fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos. As células foram incubadas com os anticorpos primários para identificar fibronectina durante a noite. Após este período de incubação as células foram lavadas com PBS e foi adicionado anticorpo secundário conjugado ao fluorocromo. Após 1h as células foram lavadas com PBS e observadas em microscópio de fluorescência.

4.6 Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente com o a análise de variância (ANOVA) one-way seguida de pós-teste de Newman-Keuls. Os resultados serão considerados significantes estatisticamente quando $p < 0,05$. Todos os resultados serão analisados com auxílio do programa GraphPad Prism[®] versão 8.0.1.

5 RESULTADOS

5.1 Citotoxicidade do TCA

Inicialmente, com propósito de identificar um possível efeito citotóxico do TCA sobre as células epiteliais, células A549 foram incubadas com concentrações de 0,1, 1, 3, 10 e 30 μM TCA e a viabilidade celular mensurada pelo método MTT após 24 horas. Como apresentado na Figura 2, o TCA não exibiu efeitos citotóxicos significativos sobre as células epiteliais em nenhuma das concentrações avaliadas em comparação com as células mantidas apenas em DMEM (controle negativo) ou ao veículo (DMSO) (Fig. 2).

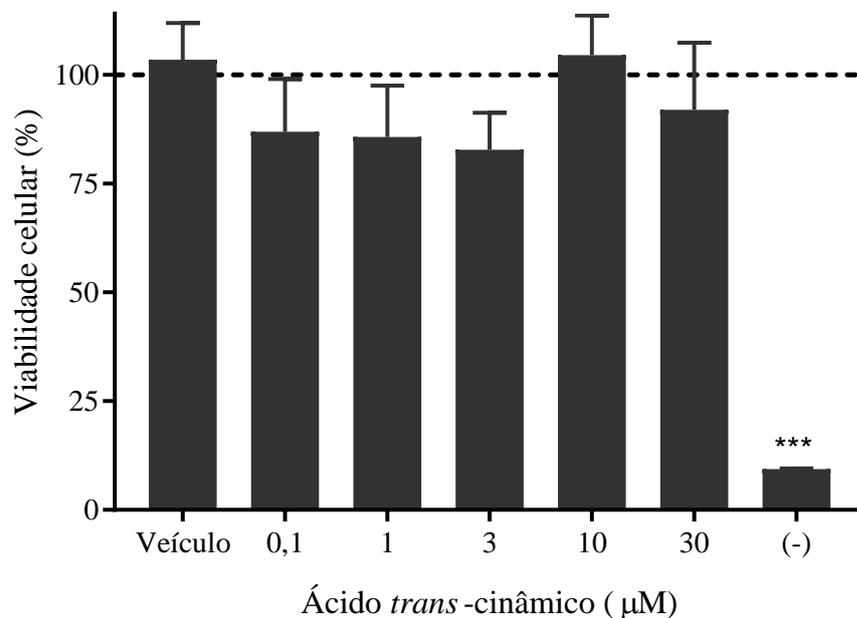


Figura 2. Efeito do ácido *trans*-cinâmico na viabilidade celular de pneumócitos da linhagem A549 depois de 24 horas de exposição. A linha tracejada representa o controle negativo (células mantidas apenas em DMEM), o grupo veículo representa DMSO 0,04% em DMEM, (-) representa Tween 3% em DMEM. Valores representados como média \pm desvio padrão. Significancia estatística *** $P < 0,001$.

5.2 Efeito do TCA na morfologia epitelial

Na análise morfológica, as células epiteliais foram coradas com cristal violeta e observadas em microscópio de luz. Após 24 horas em cultivo, as células mantidas apenas em meio DMEM exibiram um fenótipo cubóide, com uma morfologia poligonal e “cobblestone”

característica, tipicamente presente em células epiteliais (Fig. 3). A exposição ao TCA (30 μM) não causou alteração nesta morfologia cubóide nas células epiteliais A549 (Fig. 3). No entanto, após 24 h sob estímulo com TGF- β (10 ng/mL) as células epiteliais exibiram uma drástica mudança em sua morfologia, alterando seu formato cubóide para um formato alongado e com características fibroblastóides (Fig. 3), o que indica as trocas associadas ao perfil EMT. Já nos grupos estimulados por TGF- β e tratados com TCA (30 μM) foi observado uma atenuação nas mudanças induzidas pelo estímulo, de modo que, mesmo sob tratamento, as alterações na morfologia das células A549 não foram na mesma intensidade comparadas aquelas induzidas pelo TGF- β , indicando uma interferência do TCA em afetar as trocas morfológicas associadas à EMT (Fig. 3).

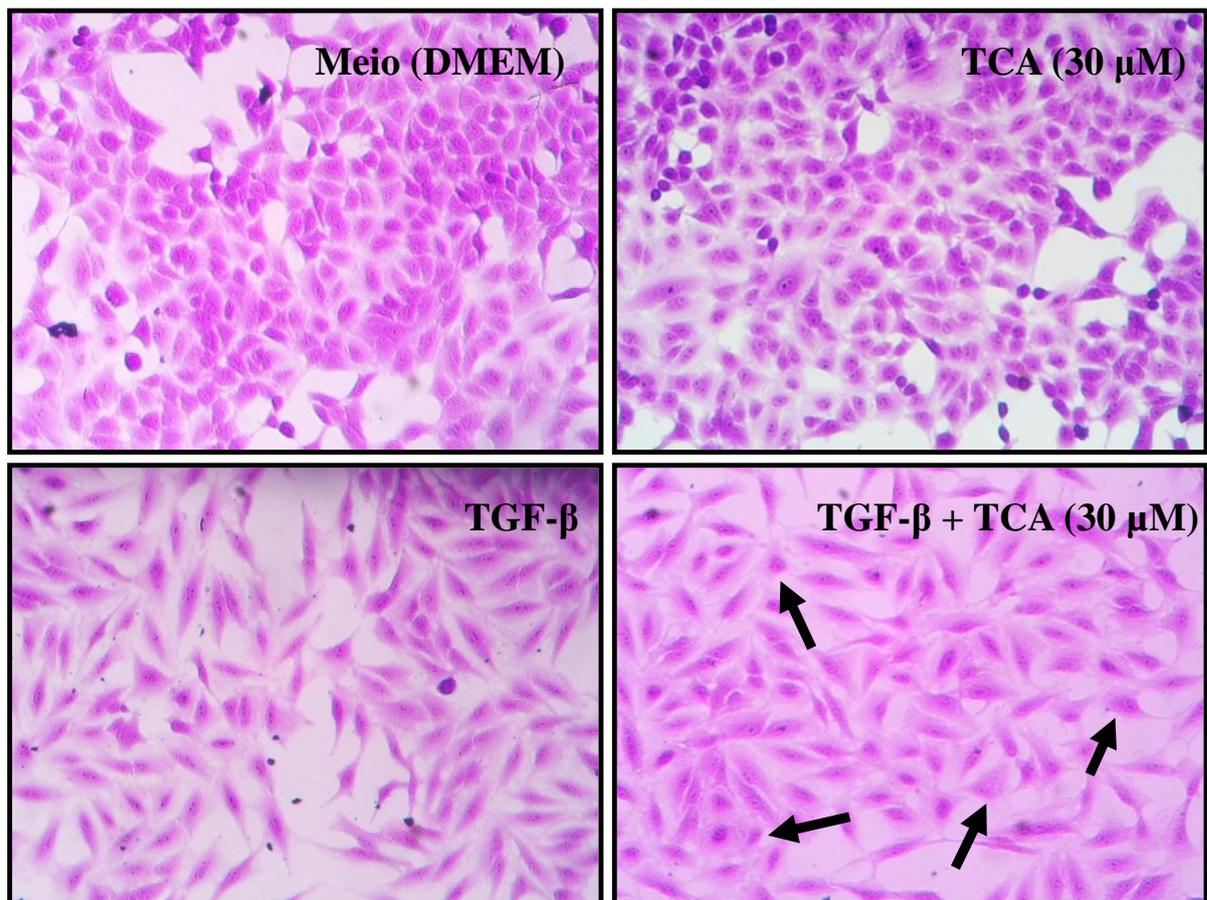
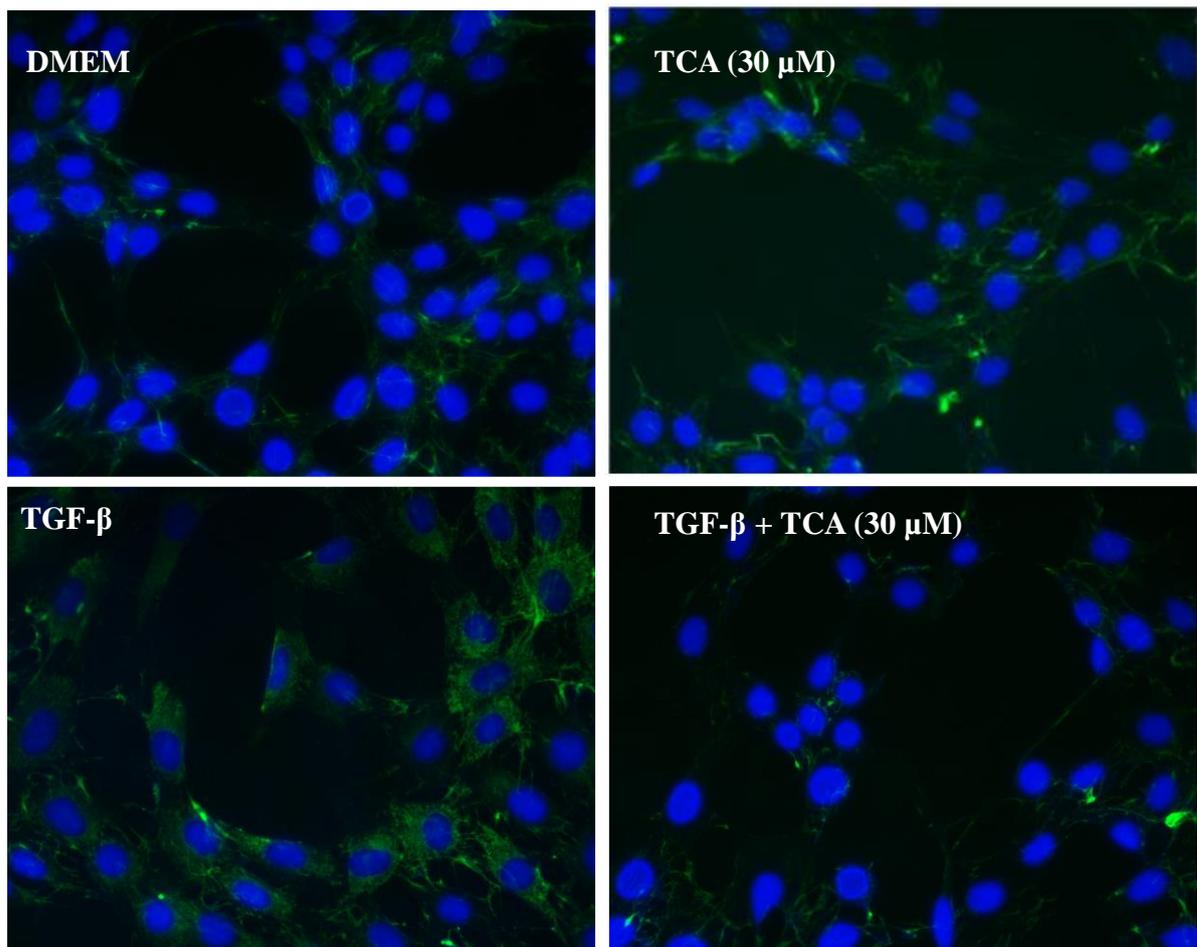


Figura 3. Morfologia de células A549 coradas com cristal violeta e observadas sob microscópio após 24 horas de exposição a TCA (30 μM) e estímulo com TGF- β (10 ng/mL). As setas indicam células com perfil morfológico poligonal típica de células epiteliais.

5.3 Efeito do TCA na expressão de fibronectina

A fibronectina é um importante componente de matriz extracelular produzido por células mesenquimais durante etapas da cicatrização tecidual. Como apresentado pela Figura 4, análises por imunofluorescência revelaram que células A549 exibem uma expressão basal de fibronectina quando mantidas em meio DMEM (Fig. 4A). Esta expressão basal de fibronectina não foi alterada quando as células foram expostas ao TCA (30 μ M) por 24 h. Entretanto, quando as células epiteliais foram estimuladas por 24h com TGF- β (10 ng/mL) foi observado uma significativa elevação na produção de fibronectina, fenômeno que foi suprimido pelo tratamento com TCA (30 μ M). A quantificação desta expressão de fibronectina por imunofluorescência fica demonstrada na Figura 4B que mensura a intensidade de fluorescência média (IFM) das fotomicrografias obtidas após os experimentos. Nesta figura, fica evidente o efeito inibidor do TCA sobre o conteúdo de fibronectina induzido pelo estímulo.

A)



B)

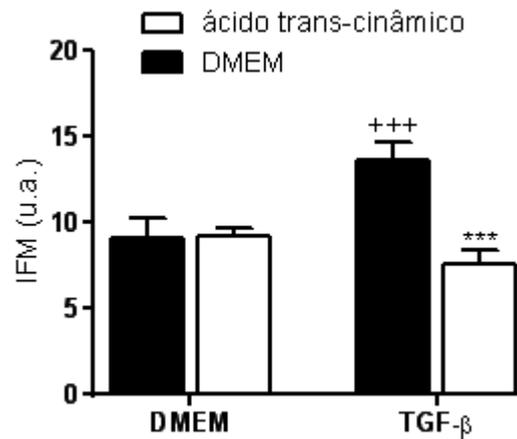


Figura 4. (A) Imunomarcção de fibronectina observada em microscópio de fluorescência após 24 horas de tratamento com TCA (30 μ M) e estímulo com TGF- β . A coloração verde representa a imunomarcção para fibronectina. A coloração azul representa a imunomarcção para ácidos nucleicos (DAPI). (B) Quantificação da fluorescência da fibronectina após 24 horas de exposição ao TCA (30 μ M). Valores representados como média \pm desvio padrão. Significancia estatística +++ p <0,001 e *** p < 0,001.

5.4 Efeito do TCA na migração celular

A migração foi mensurada comparando as taxas de fechamento do ferimento na monocamada de células A549 nos grupos com e sem estímulos por TCA. Houve diminuição significativa nas taxas de migração nos grupos tratados por TCA nas concentrações 1, 10 e 30 μ M em relação ao grupo tratado apenas por TGF- β (10 ng/mL) (Fig. 5). Em relação ao grupo controle (DMEM) não houve diferença significativa com o grupo tratado apenas com TCA (30 μ M).

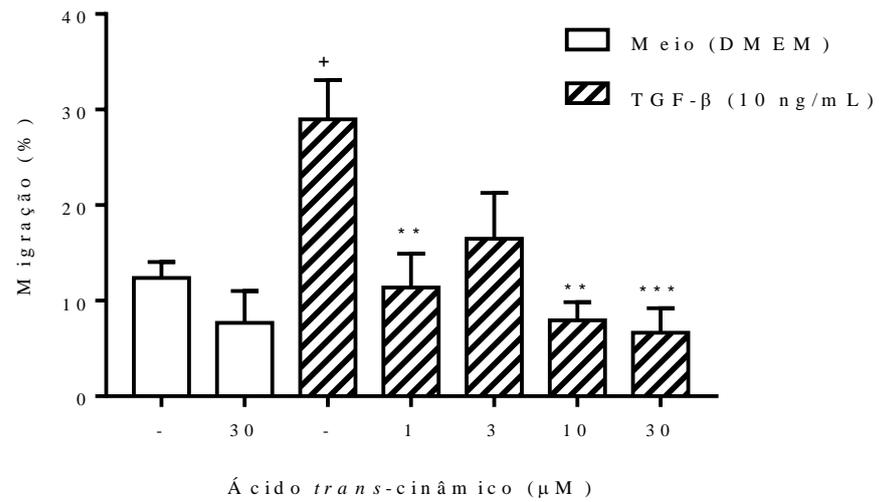


Figura 5. Migração das células A549 após 24 horas de tratamento com TCA e estímulo com TGF-β. O gráfico representa a % de fechamento do risco no ensaio de migração horizontal. Valores representados como média ± desvio padrão. Significância estatística em relação ao grupo TGF-β representada por ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Significância do grupo TGF-β em relação ao grupo controle (DMEM) representada por + $p < 0,001$.

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho, foi avaliado de forma inédita o potencial do ácido *trans*-cinâmico (TCA) em interferir com o processo de transição epitelial-mesenquimal (EMT) em células A549 *in vitro*. Para tanto, foi verificado o efeito do TCA sobre a viabilidade das células, bem como suas ações sobre as alterações morfológicas induzidas pelo estímulo TGF- β , sobre o marcador molecular da produção de ECM, a fibronectina e também sobre um parâmetro funcional que foi a migração celular.

Inicialmente, com intuito de descartar ações citotóxicas do TCA sobre as células A549, decidimos avaliar os efeitos do TCA sobre a viabilidade de células epiteliais usando a técnica do MTT. Utilizando o teste do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) é possível avaliar a capacidade das desidrogenases mitocondriais de células vivas, uma vez que estas enzimas converterem o substrato MTT em cristais de formazan que apresentam cor violeta. As enzimas permanecem ativas somente em células vivas, portanto, a intensidade da cor violeta é proporcional ao número de células viáveis. Os resultados obtidos revelaram que, nas concentrações utilizadas, o TCA não foi capaz de induzir efeitos citotóxicos nas células A549.

Em um estudo anterior, os autores demonstraram que o TCA possui efeitos citotóxicos em células epiteliais somente quando utilizado em concentrações maiores (de 0,9 a 2 mM) (BINGYAN et al., 2016). Estas concentrações estão em uma ordem de grandeza de cerca de 1000 vezes superior às concentrações utilizadas em nosso estudo, onde a concentração máxima utilizada foi de 30 μ M. Reforçando a ausência de citotoxicidade do TCA em baixas concentrações, Badawi e colaboradores (2022), em seu estudo recente utilizando o TCA livre ou encapsulado por nanopartículas de PLGA (TCA-PLGA-NPs) demonstraram que o TCA livre se mostrou menos citotóxico que as TCA-PLGA-NPs. Adicionalmente, a ausência de toxicidade também foi constatada em modelos animais tratados *in vivo*. Assim, a partir destes resultados podemos garantir em nosso estudo que os possíveis efeitos sobre as células epiteliais não decorrem de efeitos do TCA sobre as vias associadas à morte celular.

Com a certeza da ausência de efeitos citotóxicos das concentrações do TCA, partimos para avaliar os efeitos do TCA sobre a morfologia de células A549 submetidas à EMT induzida por TGF- β . É amplamente conhecido que o TGF- β possui papel determinante na indução da EMT por ativar distintos fatores de transcrição capazes de regular a transdiferenciação do epitélio (KIM et al., 2007). Assim, utilizando o modelo de indução da EMT por TGF- β , que já está bem estabelecido na literatura científica, foi avaliado o efeito do TCA sobre os aspectos morfológicos das células 24 h após a estimulação da EMT. Utilizando a microscopia de luz

constatou-se que o TGF- β foi capaz de induzir drásticas alterações nas células epiteliais alterando o formato da célula para o perfil mesenquimal, e que, o tratamento com TCA foi capaz de atenuar este processo.

Em vários estudos, moléculas envolvidas nas etapas da EMT são usadas como marcadores fenotípicos do evento de transdiferenciação, provando a passagem de uma célula de um perfil epitelial para um perfil mesenquimal. Neste cenário, a produção de componentes de ECM, tal como a fibronectina, mostra-se como um indicador da transformação para o perfil mesenquimal. Em nosso estudo, células A549 estimuladas com TGF- β , que passaram a apresentar um perfil mesenquimal, passaram a exibir um aumento no conteúdo de fibronectina após 24h de estímulo. Este fenômeno reforça a capacidade do TGF- β em induzir a EMT.

Diversos derivados do ácido cinâmico também foram reportados com detetores de efeitos inibidores de EMT em estudos recentes. Por exemplo, o ácido ferúlico que reverteu parcialmente a EMT na fibrose pulmonar, diminuindo a expressão da vimentina, proteína de filamentos intermediários e importante marcador mesenquimal na EMT, assim como de α -SMA, importante marcador da fibrogênese (ALI, et al., 2021). Outro produto natural derivado do ácido cinâmico, a curcumina, foi reportada como inibidora da EMT na fibrose hepática, diminuindo também a expressão da vimentina e α -SMA, assim como inibindo produção de componentes de matriz, como o colágeno tipo IV, em hepatócitos (KONG et al., 2020). Outros derivados como ester fenetil do ácido cafeico, foram reportados como moduladores da EMT e já tiveram seus efeitos investigados no contexto do câncer, e exibiram capacidade de inibir o fator de transcrição Twist 2, que é um repressor da E-caderina em células neoplásicas do pâncreas (CHEN, et al., 2013).

Em nosso estudo, ao submeter as células A549 ao tratamento com TCA e, em seguida, realizar a estimulação com TGF- β , constatamos que a produção fibronectina foi consideravelmente inibida pelo TCA na concentração de 30 μ M. Este resultado reforça os dados anteriores, onde verificamos que o TCA foi capaz de atenuar as alterações morfológicas do epitélio induzida por TGF- β .

Os primeiros eventos na EMT são a redução de marcadores epiteliais, notavelmente a E-caderina, proteína de junções aderentes responsável por manter o contato célula-célula e a aderência do epitélio ao tecido subjacente (LI et al., 2016). A vimentina, um componente dos filamentos intermediários, é muito importante como marcador do estado mesenquimal na EMT e também tem efeito regulador na E-caderina, impedindo a chegada desta proteína a membrana plasmática, onde teria sua ação na junção aderente (STONE et al., 2016). Tendo por base estas

informações, estudos futuros se fazem necessários para confirmar se o TCA mostra-se capaz de interferir na expressão destes marcadores clássicos de EMT.

Além das alterações na morfologia das células e na expressão de marcadores fenotípicos, a EMT também é marcada pelo ganho de capacidades tipicamente mesenquimais, como o aumento da motilidade celular (PENG et al., 2022; ZHENG, 2019). Em sintonia com estudos anteriores, nossos resultados também revelaram que o TGF- β mostrou-se capaz de induzir um aumento na resposta migratória das células *in vitro*. Nossos resultados revelaram que a migração aumentada das células A549 foi significativamente inibida pelo tratamento com TCA.

Apesar do efeito do TCA sobre a EMT não ser bem conhecido, foi recentemente reportado por Aquino e colaboradores (2021) que este composto tem um efeito cicatrizante pelo aumento da migração em fibroblastos *in vitro* na concentração de 30 μ M. No mesmo estudo, o TCA não demonstrou citotoxicidade mesmo em concentrações consideravelmente mais altas (300 μ M). Além disso, em sintonia com nossos achados, um estudo prévio demonstrou que a capacidade migratória das células neoplásicas foi significativamente reduzida pelo TCA livre e foi potencializada nas TCA-PLGA-NPs (BADAWI et al., 2022). Os autores atribuíram este efeito ao tamanho das nanopartículas, que teriam melhorado a solubilidade e a absorção celular do composto. Em modelos *in vivo* as TCA-PLGA-NPs aumentaram a presença de E-caderina em tumores sólidos e inibiram a produção de N-caderina, indicando um potencial inibitório da EMT.

Os resultados do presente trabalho são inéditos na literatura científica, porém a maioria dos marcadores da EMT não são produzidos exclusivamente por um tipo celular e nem exclusivamente na EMT. Por isso, é ideal que se considere uma variedade de marcadores para avaliar a EMT (LI et al., 2016). Este trabalho foi limitado neste aspecto, sendo necessária a realização de mais estudos para confirmar os efeitos do TCA sobre a EMT de células alveolares.

7 CONCLUSÃO

Este trabalho apresentou resultados inéditos do efeito do TCA em marcadores da EMT em células do epitélio alveolar que indicam que o TCA possui baixa citotoxicidade no epitélio alveolar, uma capacidade de atenuar as alterações morfológicas associados ao perfil mesenquimal, e um efeito inibitório na produção da fibronectina e na capacidade migratória de células alveolares em EMT.

Contudo, a quantidade de marcadores analisados foi limitada e mais estudos são necessários para conhecer os efeitos do TCA na EMT no contexto da fibrose, utilizando marcadores moleculares como E-caderina e vimentina, e marcadores de produção de ECM, como colágeno e laminina, além de identificar as vias de sinalização envolvidas para sustentar que o TCA é um inibidor de processos relacionados a EMT.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. et al. **Molecular biology of the cell**. 7. ed. Garland Science, 2021.

ALI, S. A. et al. Ferulic acid ameliorates the progression of pulmonary fibrosis via inhibition of TGF- β /smad signalling. **Food Chem Toxicol.**, England, v. 149, 2021. DOI: 10.1016/j.fct.2021.111980

AQUINO, F. L. T. et al. *trans*-Cinnamic acid, but not *p*-coumaric acid or methyl cinnamate, induces migration through PKA- and p38-MAPK signalling pathways. **J Tissue Viability**, Salisbury, v. 30, p. 363-371, 2021. DOI: 10.1016/j.jtv.2021.05.003.

BADAWI, N. M. et al. Investigating the impact of optimized *trans*-cinnamic acid-loaded PLGA nanoparticles on epithelial to mesenchymal transition in breast cancer. **Int J Nanomedicine**, New Zealand, v. 17, p. 733-750, 2022. DOI: 10.2147/IJN.S345870.

BINGYAN Z. et al. Inhibition of histone deacetylases by *trans*-cinnamic acid and its antitumor effect against colon cancer xenografts in athymic mice. **Mol Med Rep**. Athens, v. 13, p. 4159–4166, 2016. DOI: 10.3892/mmr.2016.5041

BUCKLEY, C. E.; ST JOHNSTON, D. Apical–basal polarity and the control of epithelial form and function. **Nat Rev Mol Cell Biol**. v. 23, p. 559-577, 2022. DOI: 10.1038/s41580-022-00465-y.

CHOPRA, B.; DHINGRA, A. K. Natural products: a lead for drug discovery and development. **Phytother Res**. London, v. 35, 2021. DOI: 10.1002/ptr.7099.

CONTARDI, M. et al. Hydroxycinnamic acids and derivatives formulations for skin damages and disorders: a review. **Pharmaceutics**, Basel, v. 13, p. 999, 2021. DOI: 10.3390/pharmaceutics13070999.

DARBY, I. A.; HEWITSON, T. D. Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. **Int Rev Cytol**. New York, v. 257, p. 143-179, 2007. DOI: 10.1016/S0074-7696(07)57004-X.

DEES, C.; CHAKRABORTY, D.; DISTLER, J. H. W. Cellular and molecular mechanisms in fibrosis. **Exp. Dermatol.**, Compenhagen, v. 30, p. 121-131, 2020. DOI: 10.1111/exd.14193.

GABBIANI, G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. **J. Pathol.**, London, v. 200, p. 500-503, 2003. DOI: 10.1002/path.1427.

HERRMANN, K.; NAGEL, C. W. Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. **Crit Rev Food Sci Nutr**. Boca Raton, v. 28, p. 315-347, 1989. DOI: 10.1080/10408398909527504.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas**. 13. ed. Guanabara Koogan, 2017.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **J Clin Invest**. New Haven, v. 119, p. 1420-1428, 2009. DOI: 10.1172/JCI39104.

KIM, J. H. et al. Transforming Growth Factor β 1 Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition of A549 Cells. **J Korean Med Sci**. Seoul, v. 22, p. 898–904, 2007. DOI: 10.3346/jkms.2007.22.5.898.

KONG, D. et al. Curcumin blunts epithelial-mesenchymal transition of hepatocytes to alleviate hepatic fibrosis through regulating oxidative stress and autophagy. **Redox Biomol**. Amsterdam, v. 36, 2020. DOI: 10.1016/j.redox.2020.101600.

LAMOUILLE, S.; XU, J.; DERYNCK, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, London, v. 15, p. 178-196, 2014. DOI: 10.1038/nrm3758.

LI, M. et al. Epithelial-mesenchymal transition: an emerging target in tissue fibrosis. **Exp Biol Med.**, Maywood, v. 241, p. 1-13, 2016. DOI: 10.1177/1535370215597194.

MARCONI, G. D. et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT): the type-2 EMT in wound healing, tissue regeneration and organ fibrosis. **Cells**. v. 10, 2021. DOI:10.3390/cells10071587.

MARTIN L. D., et al. Airway epithelium as an effector of inflammation: molecular regulation of secondary mediators. **Eur Respir J**. Copenhagen, v. 10, p. 2139-2146. DOI: 10.1183/09031936.97.10092139.

MORENO-BUENO, G. et al. The morphological and molecular features of the epithelial-to-mesenchymal transition. **Nat Protoc**. London, v. 4, p. 1591-1613, 2009. DOI: 10.1038/nprot.2009.152.

PENG. D. et al. Targeting TGF- β signal transduction for fibrosis and cancer therapy. **Mol Cancer**. London, v. 21, p. 104, 2022. DOI: 10.1186/s12943-022-01569-x

PENG. L., et al. Scutellarin ameliorates pulmonary fibrosis through inhibiting NF- κ B/NLRP3-mediated epithelial–mesenchymal transition and inflammation. **Cell Death Dis**. London, v. 11, 2020. DOI: 10.1038/s41419-020-03178-2.

PEREIRA, L. X. et al. *Achyrocline alata* potentiates repair of skin full thickness excision in mice. **J Tissue Viability**. v.26, p. 289-299, 2017. DOI: 10.1016/j.jtv.2017.09.005.

RODRIGUES, T. et al. Counting on natural products for drug design. **Nat Chem**. London, v. 8, p. 531-541, 2016. DOI: 10.1038/nchem.2479.

RUWIZHI, N.; ADERIBIGBE, B. A. Cinnamic acid derivatives and their biological efficacy. **Int J Mol Sci**. Basel, v. 21, 2020. DOI: 10.3390/ijms21165712

SISAKHTNEZHAD, S.; MATIN, M. M. Transdifferentiation: a cell and molecular reprogramming process. **Cell Tissue Res.**, Berlin, v. 348, p. 379-396, 2012. DOI: 10.1007/s00441-012-1403-y.

STONE, R. C. et al. Epithelial-mesenchymal transition in tissue repair and fibrosis. **Cell Tissue Res**. Berlin, v. 365, p. 495-506, 2016. DOI: 10.1007/s00441-016-2464-0.

WANG, L. et al. The role of natural products in the prevention and treatment of pulmonary fibrosis: a review. **Food Funct.** Cambridge, v. 12, p. 990-1007, 2021. DOI: 10.1039/d0fo03001e.

WYNN T. A. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. **J Clin Invest.**, New Haven, v. 117, p. 524-529, 2007. DOI: 10.1172/JCI31487.

WYNN T. A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. **J Pathol.**, London, v. 214, p. 199-210, 2008. DOI: 10.1002/path.2277.

WYNN T. A.; RAMALINGAM, T. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. **Nat Med.**, New York, v. 18, p. 1028-1040, 2012. DOI: 10.1038/nm.2807.

ZHENG, Z. et al. Clopidogrel reduces fibronectin accumulation and improves diabetes-induced renal fibrosis. **Int J Biol Sci.** Lake Haven, v. 15, p. 239-252, 2019. DOI: 10.7150/ijbs.29063.