

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

ALEF BATISTA BEZERRA BARROS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE REGULADORA DO CINAMATO DE METILA
SOBRE FIBROBLASTOS

MACEIÓ – AL

2024

ALEF BATISTA BEZERRA BARROS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE REGULADORA DO CINAMATO DE METILA
SOBRE FIBROBLASTOS

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 o título de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto

MACEIÓ – AL

2024

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

Bibliotecária: Helena Cristina Pimentel do Vale CRB4 - 661

- B277a Barros, Alef Batista Bezerra.
Avaliação da atividade reguladora do cinamato de metila sobre fibroblastos /
Alef Batista Bezerra Barros. – 2024.
40 f. : il.
- Orientador: Emiliano de Oliveira Barreto.
Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas) –
Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde.
Maceió, 2024.
- Bibliografia: f. 35-40.
1. Fibroblastos. 2. Fibrose. 3. TGF- β 1. 4. Ácido hidroxicinâmico.
5. Cinamato de metila. I. Título.

CDU: 611.018:661.664

Folha de Aprovação

ALEF BATISTA BEZERRA BARROS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE REGULADORA DO CINAMATO DE METILA SOBRE FIBROBLASTOS

Trabalho de Conclusão de Curso
submetido à banca examinadora do curso de
bacharelado em ciências biológicas da
Universidade Federal de Alagoas e aprovada
em 08 de novembro de 2024

Documento assinado digitalmente
 EMILIANO DE OLIVEIRA BARRETO
Data: 18/11/2024 11:43:04-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

(Orientador – Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto)

Banca examinadora:

Documento assinado digitalmente
 LILIAN MARIANE PEREIRA DA SILVA NASCIMENT
Data: 18/11/2024 11:53:33-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

(Examinadora Externa – Dr^a. Lilian Mariane Pereira da Silva)

Documento assinado digitalmente
 SARAH DE SOUSA FERREIRA
Data: 19/11/2024 08:33:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

(Examinadora Interna – Prof^a. Dr^a. Sarah de Sousa Ferreira)

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a minha mãe, Anne Luce, por ser este ser humano incrível, forte, determinada e resiliente no qual me espelho constantemente, cujo o trabalho constante e incansável em benefício da minha felicidade tem sido a luz para que eu pudesse chegar até aqui. Também agradeço profundamente a minha amada irmã, Alexia Kiara, por ser um dos pilares nos quais me sustentam e suportam. Obrigado por todas as vezes em que me foi ombro enquanto reclamava dos enclaves da vida e por me ouvir sempre que necessário (principalmente para falar de célula, kkkk). Agradeço também a minha avó, Francisca Vandete, Tia Leila, Tio João, Tia Ju, ao meu primo Lucas Matheus, João Marcus e a minha prima Maria Eduarda por toda a preocupação com a minha formação e bem estar. Mesmo se eu dominasse todo o dicionário Aurélio eu seria incapaz de descrever o quão grato eu sou por toda a ajuda que vocês me forneceram e fornecem. Com certeza sem a sua ajuda de vocês jamais teria chegado até aqui. Tudo o que faço é em prol de um dia retribuir de alguma forma o que fizeram e fazem por mim, amo vocês.

Os meus mais sinceros agradecimentos a todos os meus amigos, em especial a Alícia Cristia, Marcos Henrique, Antônio Aquiles, Salatiel Bezerra e José Victor, por terem me incentivado, me acompanhado no decorrer de todo o caminho, ouvirem todos os meus desabafos e por sempre se fazerem presente mesmo estando longe. Agradeço também ao meu irmão de outra mãe, Ediclesio Danton, por sempre se fazer presente e me ajudar em toda e qualquer circunstância. Muito obrigado por tudo!

A minha amada namorada, Isadora Hart, pela contínua compreensão, presença e incentivo que vem fornecendo por todo esse tempo. Obrigado por ser a pessoa que sempre acredita na minha capacidade e por ser a voz que me tranquiliza, principalmente nos momentos mais difíceis. Eu te amo!

Agradeço a todos os professores que passaram na minha vida durante a minha formação desde o ensino básico até os dias de hoje. Em especial, agradeço ao professor Marcelo Severo, pois desde o dia em que me conheceu sempre me ajudou e acreditou na minha capacidade.

À Universidade Federal de Alagoas por me fornecer um ensino de qualidade e proporcionar a realização de pesquisa científica de qualidade. Agradeço também a coordenação do curso por toda a disponibilização, em especial ao professor Gilberto Justino, pois sempre foi um professor presente e disposto a ajudar aqueles que

precisavam. Obrigado pela ajuda não só no desenvolvimento desse trabalho, mas também por toda ajuda no decorrer da minha formação.

Agradeço aos meus amigos da graduação, em especial a Karen Laís (rainha da ecofisiologia), Sarah Oliveira, Letycia Aciolly e Dhandara Evelyn pelas resenhas e desabafos durante a graduação.

Agradeço profundamente ao meu orientador, professor Emiliano Barreto. Sou imensamente grato pela oportunidade que me foi dada há quatro anos, quando se deu início a minha iniciação científica e por consequência o meu trajeto na vida científica. Agradeço pela confiança depositada em mim, pelo tempo dedicado no meu desenvolvimento, tanto científico quanto pessoal. Agradeço grandiosamente aos direcionamentos ofertados até o presente momento.

Ao Laboratório de Biologia Celular (LBC) por proporcionar toda a infraestrutura necessária para o desenvolvimento deste trabalho, bem como pela oportunidade em ter o privilégio em acessar um ambiente com todos os meios necessários para desenvolver uma pesquisa de qualidade.

A todos os professores do LBC que ajudam diariamente na formação de recursos humanos de grande qualidade Prof. Alexandre Borbely, Profa. Janylle Ferro e Profa. Maria Danielma, muito obrigado por toda as contribuições no meu crescimento técnico-científico.

Também não poderia deixar de agradecer a pessoa mais especial do LBC, a nossa técnica maravilhosa e impecável: Juliane Barreto. Ju, agradeço demais por ser primeiramente uma profissional de excelência e que rege o bem estar do nosso laboratório. Além do lado profissional, obrigado por ser essa pessoa tão doce e solícita, pois durante esses quatro anos sempre se propôs a ouvir meus desabafos e que também sempre se mostrou disposta em ajudar no que fosse possível. Muito obrigado, Ju!

Agradeço ao meu amigo e mentor Julianderson Carmo por primeiro ter lembrado de mim quando surgiu a oportunidade de vaga no LBC (obrigado pela aula sobre material genético) e por ter contribuído com o início da minha vida científica e que foi essencial na minha formação.

Agradeço também a minha amiga e mentora, Jordana Rodrigues, que desde o dia 1 no laboratório sempre se mostrou presente, fornecendo todo apoio profissional e pessoal necessário - principalmente naquele monte de experimentos kkkk. Obrigado por todo o conhecimento científico e metodológico fornecido.

Gostaria de agradecer a todos os membros do grupo de pesquisa orientados pelo professor Emiliano: Erick, Mark, Jordana e Grazi pelo suporte nos experimentos e na discussão dos resultados.

A todos os integrantes da família LBC. Obrigado por toda a ajuda direta ou indireta que foi fornecida, bem como pelo ótimo ambiente de trabalho. Em especial, agradeço: Erick Ferreira (minha dupla desde o primeiro dia na graduação, bem como no LBC), Ashley Kettylem (Ash), Mariana Dutra, Mark Fidelix, Luana Lucena, Emelly Cristina (Cris), Anderson Marcos, Ana Lúcia (queridinha, haha), Keyla Nobre, James Henrique, Marvin Lins (uma das pessoas que mais admiro, grato pela sua amizade), Felipe Porto (Porto; pessoa que eu mais fico enchendo a paciência pra discutir metodologia), Camilla Mendes e Grazielle Regina. Obrigado por tudo!

RESUMO

Os fibroblastos são amplamente reconhecidos pelo seu papel crucial na deposição e remodelação da matriz extracelular (MEC). No entanto, a ativação desregulada dos fibroblastos resulta no acúmulo excessivo de MEC, fenômeno diretamente associado ao desenvolvimento de doenças fibróticas, como a cirrose hepática e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Dentre os fatores envolvidos na formação do ambiente fibrótico, o fator de crescimento transformador beta-1 (TGF- β 1) desempenha um papel central na migração e diferenciação de fibroblastos em condições patológicas. Nesse contexto, a busca por compostos capazes de modular a ativação de fibroblastos representa uma estratégia promissora para o desenvolvimento de terapias eficazes. Com base no fato de que produtos de origem natural podem conter substâncias com potencial terapêutico para condições fibrogênicas, este estudo teve como objetivo investigar o efeito de um derivado do ácido hidroxicinâmico sobre ativação de fibroblasto. Selecionamos o cinamato de metila (CM) devido às suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. Para tanto, utilizamos fibroblastos de camundongos da linhagem L929 mantidos em meio de cultivo DMEM, submetidas ao tratamento com distintas concentrações de CM e estimuladas com TGF- β 1. Nossos achados demonstram que o CM foi capaz de atenuar a ativação de fibroblastos estimulados com TGF- β 1, levando à redução da migração celular e da produção de proteínas de matriz extracelular, sem comprometer a viabilidade celular. Mecanicamente, o CM inibiu a translocação nuclear de Smad3 fosforilada (p-Smad3), um fator de transcrição crítico para via de sinalização do TGF- β 1. Assim, o CM apresentou efeitos significativos na inibição de fenômenos associados ao estado fibrogênico tecidual, o que potencialmente o coloca como um candidato promissor para o tratamento de fibroses.

Palavras-chaves: fibroblastos, fibrose, TGF- β 1, ácido hidroxicinâmico, cinamato de metila.

ABSTRACT

Fibroblasts are widely recognised for their crucial role in the deposition and remodelling of the extracellular matrix (ECM). However, deregulated activation of fibroblasts results in excessive accumulation of ECM, a phenomenon directly associated with the development of fibrotic diseases such as liver cirrhosis and Chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Among the factors involved in the formation of the fibrotic environment, transforming growth factor beta-1 (TGF- β 1) plays a central role in the migration and differentiation of fibroblasts under pathological conditions. In this context, the search for compounds capable of modulating fibroblast activation represents a promising strategy for developing effective therapies. Based on the fact that products of natural origin may contain substances with therapeutic potential for fibrogenic conditions, this study aimed to investigate the effect of a hydroxycinnamic acid derivative on fibroblast activation. We selected methyl cinnamate (MC) because of its anti-inflammatory and antioxidant properties. To this end, we used mouse fibroblasts of the L929 strain maintained in DMEM culture medium, subjected to treatment with different concentrations of CM and stimulated with TGF- β 1. Our findings show that CM was able to attenuate the activation of fibroblasts stimulated with TGF- β 1, leading to a reduction in cell migration and the production of extracellular matrix proteins, without compromising cell viability. Mechanically, CM inhibited the nuclear translocation of phosphorylated Smad3 (p-Smad3), a transcription factor critical to the TGF- β 1 signalling pathway. Thus, CM showed significant effects in inhibiting phenomena associated with the tissue fibrogenic state, which potentially places it as a promising candidate for the treatment of fibrosis.

Keywords: fibroblasts, fibrosis, TGF- β , hydroxycinnamic acid, methyl cinnamate.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	12
3. REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1. Fibroblastos.....	13
3.2 Matriz Extracelular (MEC)	15
3.3 Reparo Tecidual e Fibrose.....	16
3.4 Produtos Naturais	19
3.5 Cinamato de Metila	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 Reagentes e Soluções	22
4.2 Cultura Celular	22
4.3 Ensaio de Viabilidade	22
4.4 Avaliação da Produção componentes de matriz extracelular	23
4.5 Ensaio de Migração	23
4.6 Avaliação da via canônica do TGF- β 1	24
5. RESULTADOS	26
5.1 Efeito do cinamato de metila sobre a viabilidade celular de fibroblastos.....	26
5.2 Efeito do cinamato de metila sobre a produção de proteínas de matriz extracelular em fibroblastos estimulados por TGF- β 1.....	27
5.3 Efeito do Cinamato de Metila sobre a capacidade migratória de fibroblastos estimulados com TGF- β 1	28
5.4 Efeito do cinamato de metila sobre sinalização de fibroblastos estimulados por TGF- β 1	31
6. DISCUSSÃO	33
7. CONCLUSÃO	36
8. REFERÊNCIAS	37

1. INTRODUÇÃO

Os fibroblastos são células de aspecto alongado com um núcleo oval e achatado, encontrados nos espaços intersticiais dos órgãos. Essas células são as principais responsáveis pela produção e manutenção de todo o arcabouço da matriz extracelular (MEC) nos tecidos, e desempenham papéis importantes na determinação do fenótipo e função de outras células teciduais (Kendall; Bostwick, 2014). Nesse contexto, os fibroblastos contribuem para as respostas à lesão tecidual nas fases de iniciação e resolução (Gharbia, *et al.*, 2023).

Geralmente, fibroblastos são encontrados em um estado de dormência, sendo chamados de fibrócitos, mas podem ser ativados por múltiplos fatores como dano tecidual, citocinas e fatores de crescimento (Shi, *et al.*, 2011). Em resposta, os fibroblastos adquirem um fenótipo mais alongado, proliferativo e aumento da capacidade migratória. O aumento da capacidade migratória está associado a expressão de α -SMA, proteína do citoesqueleto usualmente encontrada no músculo liso, que deixa os fibroblastos (agora miofibroblastos) com um caráter contráctil e migratório (Pakshir, *et al.*, 2021).

A matriz extracelular é uma estrutura complexa e dinâmica encontrada na grande maioria dos tecidos capaz de fornecer nutrição e sustentação, formada principalmente por proteínas fibrosas e estruturais, tais como o colágeno, fibronectina, laminina, proteoglicanos e glicosaminoglicanos (GAG) (Dzobo; Dandara, 2023). Além disso, os componentes formadores da MEC também influenciam o comportamento das células, desempenhando um papel chave em processos celulares essenciais como na migração, proliferação e captação de nutrientes (e.g., metabólitos, oxigênio e outros íons) e na lesão tecidual (Saraswathibhatla; Indana; Chaudhuri, 2023). Nos casos em que ocorre uma desestruturação da MEC, os fibroblastos são as principais células sentinelas responsáveis pelo reparo (Plikus, *et al.*, 2021).

Os fibroblastos são células extremamente dinâmicas e participam ativamente do reparo, desde a sua fase inflamatória até a fase de remodelamento. Ainda sobre o reparo, os fibroblastos respondem a diversos estímulos, como citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e a fatores de crescimento, sendo o TGF- β 1 a principal citocina. O TGF- β 1 é uma citocina de ação pleiotrópica e sobre fibroblastos exerce influência na sua diferenciação em miofibroblastos, bem como no aumento da

migração de deposição de proteínas de matriz (Dong, *et al.*, 2016; Cheng, *et al.*, 2022). Importante salientar que a sinalização dos fibroblastos deve ser feita de forma coordenada e que distúrbios na sinalização podem levar ao desenvolvimento de patologias associadas a ação aberrante de fibroblastos, como o câncer e a fibrose tecidual (Zielins, *et al.*, 2015; Karin; Clevers, 2016). A fibrose é um termo referente aos vários tipos de doenças que envolvem uma inflamação crônica, microambiente pró oxidativo e a alta deposição de matriz, podendo afetar órgãos como pulmão, rins, fígado e coração, sendo esses fatores associados principalmente a grande presença do TGF- β 1 (Friedman, *et al.*, 2013).

A manifestação da fibrose pode acontecer nos mais diversos órgãos. A fibrose pulmonar idiopática (FPI) por exemplo, é a forma mais comum de doença intersticial que está associada a lesões no tecido pulmonar devido a fatores como estresse ambiental ou poluição (Tomos, *et al.*, 2021) e inalação excessiva de partículas pró – fibrogênicas como a sílica ou uso crônico de cigarro (Samara, *et al.*, 2011; Koga, *et al.*, 2021). Em doenças pulmonares crônicas, incluindo asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e fibrose pulmonar idiopática há alterações no número e no fenótipo dos fibroblastos (Ark; Cao; Li, 2018). Essas mudanças desempenham um papel crítico na perda da arquitetura e função normal do tecido associada a essas doenças (Friedman *et al.*, 2013).

Outros tipos de fibrose como a renal e hepática estão mais relacionadas com uma variedade de estímulos crônicos como doenças autoimunes e doenças metabólicas (Elpeck, 2014) ou em decorrência de outras patologias, como a diabetes do tipo II que, pelo excesso de glicose sanguínea, pode comprometer o microambiente dos rins e favorecer o desenvolvimento da fibrose renal (Kim, *et al.*, 2017; D'Alessandro, *et al.*, 2022). A interseção entre os mais diversos tipos de fibrose é que não se tem nenhum fármaco capaz de reduzir ou até mesmo inibir a progressão fibrogênica (Sheng, *et al.*, 2016). Além disso, os fibroblastos desempenham papel chave nessa patologia devido ao seu papel canônico na produção da MEC.

Embora um considerável esforço de pesquisa tenha se concentrado na modulação da função leucocitária e da inflamação, relativamente poucos estudos investigaram os efeitos de terapias existentes ou novas na função dos fibroblastos. Neste sentido, uma melhor compreensão de compostos que possam modular a função dos fibroblastos pode destacar caminhos específicos para patologias de doenças, dando origem a terapêuticas direcionadas.

Nesse sentido, é importante destacar o papel fundamental dos produtos naturais na descoberta de novos fármacos. Moléculas obtidas de fontes naturais têm-se mostrado de extrema importância devido aos mais variados efeitos, incluindo capacidade anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana (Taguchi, *et al.*, 2015; Ali, *et al.*, 2021). Outro fator que deve ser apontado é que os produtos naturais se mostram uma excelente fonte de obtenção de fármacos, principalmente devido a abrangente diversidade química encontrada *in natura* junto da sua capacidade moduladora nas funções biomoleculares (Hong, 2011). Dentre os produtos naturais, os metabólitos secundários são os mais utilizados devido a sua grande presença em plantas e microrganismos. Dentre eles, os compostos fenólicos merecem destaque devido ao amplo espectro de aplicações, principalmente terapêuticas e são encontrados principalmente em frutas e cereais (Olas, *et al.*, 2018).

Nos últimos anos, diversos estudos têm sido mostrados para evidenciar os potenciais efeitos dos compostos fenólicos, em especial o cinamato de metila. O cinamato de metila (CM) é um éster metílico natural derivado do ácido hidroxicinâmico, encontrado principalmente em frutas e cereais (Nunes, *et al.*, 2017), detentor de várias atuações biológicas e de interesse farmacológico, tais como sua capacidade antimicrobiana (Chen *et al.*, 2012), antiespasmódica (Lima *et al.*, 2014) e anti-inflamatória (Murakami *et al.*, 2018) embora seu papel sobre fibroblastos seja pouco descrito. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar os possíveis efeitos do cinamato de metila sobre a ativação de fibroblastos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito *in vitro* do cinamato de metila sobre fibroblastos murinos da linhagem L929.

2.2 Objetivos específicos

De modo específico, este trabalho buscou avaliar:

1. O efeito do cinamato de metila sobre a viabilidade de fibroblastos;
2. O efeito do cinamato de metila sobre a produção de proteínas de matriz extracelular;
3. O efeito do cinamato de metila sobre a migração de fibroblastos;
4. A ação do cinamato de metila na ativação da via SMAD3 estimulada por TGF- β 1 em fibroblastos.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Fibroblastos

Os fibroblastos são células mesenquimais abundantes no tecido conjuntivo, caracterizadas por seu núcleo ovoide e formato alongado e fusiforme, sendo encontrados principalmente no tecido conjuntivo em um estado de quiescência na forma de fibrótico, um tipo celular com citoplasma pequeno, poucos ribossomos e cromatina condensada, sendo este um reflexo do seu estado de dormência (Lendhal; Muhl; Betsholtz, 2022) e são vastamente heterogêneos, se diferenciando de acordo com o tecido em que estão presentes (Younesi, *et al.*, 2024). Essas células apesar de quiescentes podem ser ativadas por múltiplos estímulos como fatores de crescimento ou em resposta ao dano tecidual, aumentando seu metabolismo junto da sua taxa de proliferação e capacidade migratória (Shaw; Rognoni, 2020), iniciando o processo de produção e expressão de proteínas associadas aos fibroblastos ativados (Linthout; Miteva; Tschöpe, 2014).

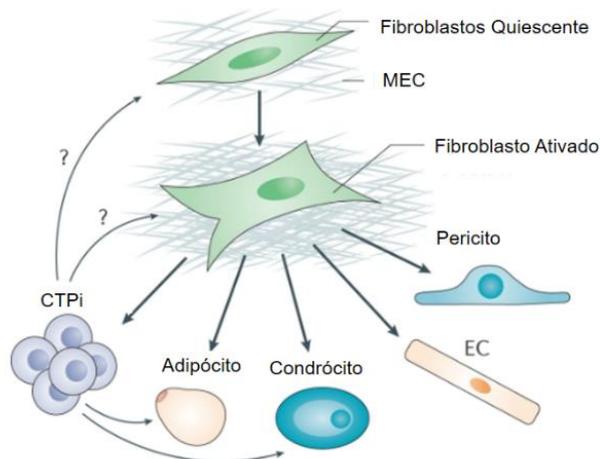
Apesar de serem células abundantes, a identificação tecidual dos fibroblastos é difícil, principalmente devido à heterogeneidade de sua população celular, que varia conforme o tecido e o órgão em que estão presentes. Devido a sua notável plasticidade, o perfil fenotípico e comportamental dos fibroblastos pode sofrer mudanças significativas, seja em condições fisiológicas de homeostase ou em resposta a estímulos regulatórios em doenças como câncer e fibrose tecidual (Miki; Manresa, 2023). A grande diversidade entre os fibroblastos ainda está sendo identificada por sequenciamento de RNA de célula única (single-cell RNA-seq), embora haja um consenso de que, em geral, os fibroblastos expressam colágeno I e o receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR α), além de outros marcadores, como vimentina e a proteína específica de fibroblastos (FSP, Fibroblast Specific Protein) (Dulbecco *et al.* 1983; Strutz *et al.*, 1995; Kissleva *et al.*, 2012; Yao *et al.*, 2022).

Os fibroblastos são responsáveis pela produção, deposição e manutenção de componentes da matriz extracelular (MEC) como colágeno I e glicoproteínas como a fibronectina e laminina. Participam ativamente da cicatrização de feridas, sendo responsáveis pelo remodelamento do estroma tecidual por meio da secreção de

metaloproteinases (MMPs) e de forma concomitante participam ativamente nas fases da cicatrização como a fase inflamatória, proliferativa e de remodelamento, sendo seu papel crucial na contração de feridas e remodelamento da MEC, junto da resposta imune e diferenciação de outros tipos celulares (Park; Foster; Longaker, 2018; Cialdai; Risaliti; Monici, 2021). Apesar da sua associação canônica na manutenção do arcabouço da MEC, os fibroblastos também detêm uma função chave em outros fenômenos que compreendem a homeostase, como o fornecimento do nicho ideal para outras células, como a garantia do batimento cardíaco por meio da formação de junções com vários tipos de células que compõem o microambiente cardíaco e que na sua ausência leva a complicações patológicas, como o infarto do miocárdio e a fibrose cardíaca (Camelliti, *et al.*, 2004; Baudino *et al.*, 2006; Harrington, 2024).

Fibroblastos também servem como uma célula norteadora para outros tipos de células mesenquimais especializadas como osteoblastos e adipócitos (Figura 1), isso porque fibroblastos não são células totalmente diferenciadas e detêm a capacidade de serem ativados e diferenciados em outros sub tipos de células semelhante a fibroblastos, sendo o miofibroblastos o tipo mais frequente (Kendall; Bostwick, 2014). A diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos acontece principalmente em situações de estresse, ocorrendo principalmente na cicatrização (por conta da sua alta contractilidade) ou na fibrose tecidual, sendo recrutados em função de várias vias de sinalização incluindo o fator transformante do tipo beta (TGF- β), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e por citocinas pró-inflamatórias tais como fator de necrose tumoral do tipo α (TNF- α) e algumas interleucinas como IL-1 e IL-6 (Kendall; Bostwick, 2014; Plikus *et al.*, 2021; Tai, *et al.*, 2021).

Figura 1. Plasticidade de fibroblastos.



Fibrócitos quando ativados tornam-se fibroblastos. Fibroblastos ativados por fatores são transdiferenciados em outros tipos celulares como pericito, célula endotelial, condrócico e adipócito. Fonte: Adaptado de Kalluri (2016).

3.2 Matriz extracelular (MEC)

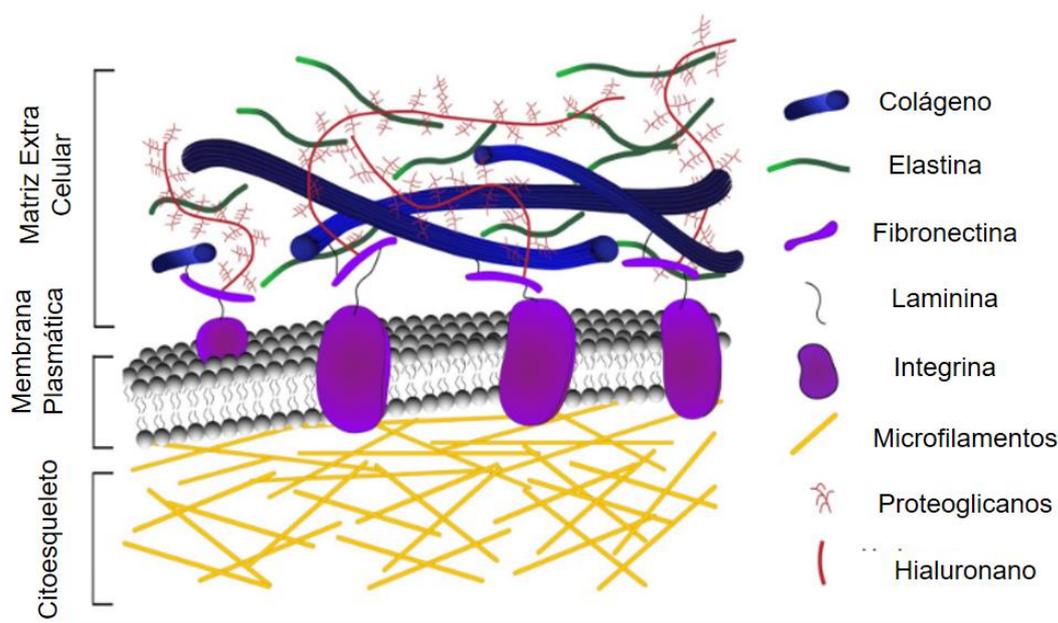
Uma das principais formas de manter a homeostase tecidual é produção e manutenção da matriz extracelular e uma das principais funções dos fibroblastos é a manutenção dessa matriz. A MEC é uma estrutura tridimensional formada por macromoléculas essencial para a sobrevivência celular por desempenhar um papel essencial no suporte de tecidos e exercer influência em processos bioquímicos, biomecânicos e nas atividades celulares como proliferação, migração e apoptose, favorecendo a homeostase dos diferentes tecidos (Hynes, 2009; Faria, *et al.*, 2024).

A estrutura da MEC além de influenciar na homeostasia do tecido, também exerce influência na sua função. Por exemplo, a MEC do tecido ósseo é densa por conta da deposição de minerais e alta presença de fibras de colágeno, já a MEC sanguínea é constituída pelo plasma e mantém as células em suspensão (Poole; Guidolin, 2021), enquanto a do cérebro é escassa no que se refere a fibras, mas rica em ácido hialurônico e proteoglicanos (Kaushik, *et al.*, 2021).

Importante salientar que a MEC é uma estrutura altamente dinâmica composta principalmente por proteínas fibrosas como o colágeno, elastina, fibronectina e

laminina (Figura 2). Além disso, enquanto as proteínas fibrosas conferem as propriedades mecânicas da MEC, o espaço entre elas é preenchido por proteínas estruturais chamadas de proteoglicanos e glicosaminoglicanos (GAGs), que desempenham um papel fundamental na capacidade de suportar forças compressivas (Frantz; Stewart; Weaver, 2010; Faria, *et al.*, 2024) e por conta do seu alto dinamismo sofre modificações de remodelamento associados a um estado fisiológico ou patológico, como no câncer e fibrose tecidual (Faria, *et al.*, 2024).

Figura 2. Principais constituintes da matriz extracelular.



Os principais componentes formadores da matriz extracelular e a interação célula-matriz. Fonte: adaptado de Poole; Guidolin (2021).

3.3 Reparo Tecidual e Fibrose

O reparo tecidual é um processo organizado que utiliza vias de sinalização específicas para a ativação de células presentes no microambiente lesionado e para o recrutamento de outras células do sistema imune. Durante uma lesão, uma série de eventos celulares são deflagrados em prol de restaurar a homeostase tecidual e são divididas em três fases: inflamatória, proliferativa e remodelamento. Cada uma das três fases sofre uma fina regulação de citocinas e fatores de crescimento, facilitando

a ativação e recrutamento de diversas células como fibroblastos, neutrófilos, macrófagos e mastócitos.

Os fibroblastos ganham destaque em função do seu papel canônico durante a produção da MEC. Seu papel se estende durante as três fases, uma vez que já na fase inflamatória é capaz de secretar citocinas pró inflamatórias e quimiocinas. Os macrófagos residentes em decorrência da lesão secretam TGF- β 1, que por consequência ativam os fibroblastos de forma parácrina e inicia o processo de adesão, produção e deposição de proteínas associadas a MEC, além de também mediar o balanço entre MMPs e proteínas inibidoras de MMP (TIMP) (Visse; Nagase, 2003; Ueshima, *et al.*, 2019). Ainda durante o reparo, após a produção da MEC, células como fibroblastos, miofibroblastos e células endoteliais iniciam o processo de apoptose, mecanismo este que impede patologias como a fibrose (Darby, *et al.*, 2014).

Embora os tecidos tenham uma fina regulação durante o reparo tecidual, a ativação aberrante de fibroblastos pode ocorrer devido a desregulação nas vias de sinalização provenientes de lesões constantes ou de forma idiopática. Vários tipos de fibroses como a pulmonar, cardíaca e renal os fibroblastos são as células chave na progressão da patogênese. A fibrose é um processo patológico associado ao reparo tecidual desordenado, inflamação crônica e principalmente a produção excessiva de MEC, levando a falência progressiva do órgão (Vasse, *et al.*, 2021) e várias doenças podem deflagrar o processo fibrótico como a cirrose hepática, doença renal crônica e fibrose pulmonar idiopática (Zhao, *et al.*, 2022), podendo ter várias causas a depender do tecido afetado. A fibrose pulmonar idiopática (FPI) por exemplo pode ser deflagrada por fatores ambientais devido a exposição a diversas partículas que quando acumuladas deflagram respostas pró-fibrogênicas como o asbesto (asbestose), sílica (silicose) e carvão (Pneumoconiose), além do uso crônico de cigarro ou causas genéticas (Oh; Murray; Molfino, 2012; Hoy; Chambers, 2020).

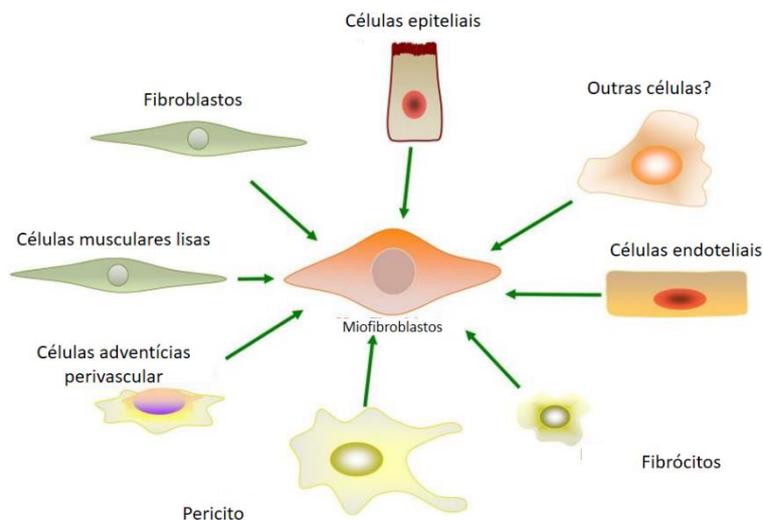
Outros tipos de fibrose como a hepática, renal e cardíaca ocorrem em resposta ao dano e ao estresse prolongado. A fibrose hepática pode ser causada devido ao uso crônico de álcool ou infecção por *Schistosoma mansoni* (; Andrade, 2009; Baglieri; Brenner; Kisseleya, 2019), enquanto a renal pode ocorrer em consequência de outros fatores também pró-fibróticos, podendo ser inflamatório (e.g., pielonefrite), obstrução renal (e.g., pedra nos rins) e metabólica (e.g., nefropatia diabética) (Meran; Steadman, 2011). A fibrose cardíaca por sua vez ocorre em decorrência do estresse excessivo sobre o músculo cardíaco como a lesão isquêmica e o aumento da pressão sanguínea

(Kurose, 2021). Apesar da progressão fibrótica ter um início diferente nos diversos tecidos, a interseção entre elas é a alta presença de fibroblastos, miofibroblastos e TGF- β 1. Estudos utilizando imunohistoquímica (IHC) apontam que a citocina mais presentes nesses tecidos fibróticos é o TGF- β 1. O TGF- β 1 é uma citocina de ação pleiotrópica, que atua sobre diversos alvos celulares, incluindo os fibroblastos (Broekelmann, *et al.*, 1991).

Ainda sobre o TGF- β 1 na progressão fibrótica, esta citocina induz a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos e tem sido extensamente estudada no contexto da fibrose (Wei; Nguyen; Brenner, 2021). O TGF- β 1 deflagra seus efeitos a partir da sua interação com o receptor de TGF (TGFBR), regulando as mudanças genômicas pela superfamília de SMADs, de forma que após a fosforilação das SMAD2 e SMAD3, estas formam um complexo heterotrimérico com a SMAD4, translocando para o núcleo e regulando genes pró-fibróticos (Lee; Massagué, 2022). Os efeitos do TGF- β 1 culminam não só na deposição desordenada de proteínas associadas a MEC, mas também na diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, estas que são células mais contrácteis em decorrência da alta expressão de α -SMA e leva a perda do órgão afetado (Deng, *et al.*, 2024).

Os miofibroblastos são células frequentemente encontradas em tecidos como a pele, fígado e pulmão, além de ter uma vasta fonte de células capazes de aumentar o arsenal de miofibroblastos no sítio fibrótico (Ye; Hu, 2021). Além dos fibroblastos, outras células como pericito, células endoteliais e células epiteliais servem como possíveis fontes de miofibroblastos (Kendal; Bosteick, 2014).

Figura 3. Miofibroblastos e suas possíveis origens.



Os miofibroblastos podem se diferenciar através de várias células precursoras. Fonte: adaptado de Kendal; Bosteick (2014).

Apesar dos inúmeros estudos sobre a fibrose, ainda não se tem um tratamento efetivo para esta patologia. No geral, o tratamento em alguns casos se restringe ao uso de fármacos sintéticos, como a pirfenidona e nintedanib para o tratamento da fibrose pulmonar, mas no geral não se tem fármacos que tratem a fibrose (Wang, *et al.*, 2021).

3.4 Produtos Naturais

Os produtos naturais são utilizados como fontes de alimento e medicamentos desde os primórdios das civilizações humanas (Ansari, *et al.*, 2023). Registros apontam que no Egito antigo utilizavam óleos provenientes de plantas que nos dias de hoje ainda são utilizadas para o tratamento de tosse, resfriado e inflamação (Cragg, 2005) No início dos anos 2000, entre 2005 e 2007, cerca de 13 fármacos baseados em produtos naturais foram aprovados no mundo, sendo desses cinco classificados como produtos naturais (Butler, 2008). Além disso, os produtos naturais representam uma vantagem na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, representando novidades químicas quando comparados com outras fontes, sendo os principais candidatos para alvos complexos (Calixto, 2019).

Atualmente, os componentes naturais como metabólitos secundários de plantas ou derivados de microorganismos tem sido amplamente investigados e utilizados como novos fármacos na terapêutica de várias patologias (Chopra; Dhingra, 2021). Fungos, microorganismos e plantas são fontes extremamente relevantes na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, principalmente pela produção de metabólitos secundários. Metabólitos secundários são componentes não essenciais para os organismos que produzem e que não afetam o seu crescimento, reprodução e desenvolvimento (Dias; Urban; Roessner, 2012). Geralmente, os metabólitos secundários são os “produtos naturais” propriamente dito, isto porque a sua biossíntese e aplicação é ilimitada. As principais rotas de produção desses metabólitos incluem a degradação de produtos intermediários, tais como: acetil coenzima A, rota do ácido chiquímico e ácido mevalônico (Dias; Urban; Roessner, 2012; Dewick, 2002), além do que o arsenal de produtos naturais possui grupos farmacofóricos de extrema relevância, o que auxilia no desenvolvimento de fármacos sintéticos (Rodrigues, *et al.*, 2016).

Os produtos naturais também detêm características relevantes no processo de descobertas de novos fármacos. Globalmente, um grande corpo de evidências tem sido mostrados utilizando a bioinformática e sendo capazes de demonstrar aspectos importantes de produtos naturais relacionados aos ensaios clínicos translacionais e aplicações de uma gama de produtos naturais bioativos (Singla, *et al.*, 2023), servindo com uma valiosa fonte relacionada descoberta terapêutica de fármacos, suplementos ou nutracêuticos (Capó, *et al.*, 2021; Dai *et al.*, 2021) e dentre os produtos derivados de plantas com propriedades terapêuticas destaca-se principalmente compostos fenólicos, flavonoides e as quinonas (Taguchi, *et al.*, 2015).

3.5 Cinamato de metila

Dentre os produtos de origem natural, os compostos fenólicos são dotados de propriedades farmacológicas importantes. A classe de compostos fenólicos é sintetizada principalmente pela rota do ácido chiquímico, uma rota metabólica importante para as plantas, mas também para fungos e algas. Dentre os compostos fenólicos, os derivados do ácido hidroxicinâmico têm sido explorados devido a sua

miríade de aplicações como na indústria durante a produção de cosméticos, produtos farmacêuticos e nutracêuticos (Ou, *et al.*, 2004; Yong; ; Taofiq, *et al.*, 2017; *et al.*, 2021). Os derivados do hidroxicinâmico são uma classe de compostos que detêm nove átomos de carbono e estruturalmente são formados por pelo menos um anel aromático, tendo a fenilalanina e tirosina como moléculas precursoras (Dulce, *et al.*, 2016; Contardi, *et al.*, 2021).

O Cinamato de Metila (CM) é um éster metílico derivado do ácido hidroxicinâmico e vem sido descrito como uma molécula detentora de vários efeitos farmacológicos como atividade larvicida, anti-inflamatória, antiespasmódica, gastroprotetora e inibidor da adipogênese *in vitro* (Chen, *et al.*, 2012; Lima, *et al.*, 2014; Fujiwara, *et al.*, 2017; Murakami, *et al.*, 2018; Lilin, *et al.*, 2023; Fu, *et al.*, 2024). Na classe desse composto também existem outras moléculas como os ácidos ferúlico, p-cumárico, caféico e gálico (Saavedra, *et al.*, 2015; Aquino, *et al.*, 2021).

Figura 4. Estrutura química do cinamato de metila

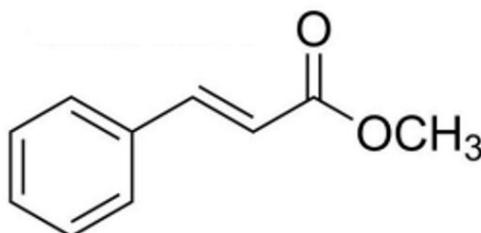


Imagem ilustrativa a respeito da estrutura química do éster metílico cinamato de metila. Fonte: adaptado de Aquino, *et al.* (2021).

O CM é encontrado de forma abundante em frutas como o morango e a amora, em cereais e plantas como a canela (*Cinnamomum*), manjeriço (*Ocimum basilicum*) e nos óleos essenciais como em plantas do gênero *Alpinia* (Fink, *et al.*, 2004; Ballabeni, *et al.*, 2009; Park, *et al.*, 2020). O CM também é uma substância utilizada na indústria como flavorizante, podendo ser encontrado em cosméticos, perfumes e outros produtos relacionados a higiene pessoal (Bhatia, *et al.*, 2007), sendo também utilizado no controle de pragas visto a sua ação inibitória sob receptores tirosina-quinase em fungos e a eliminação de radicais livres (Prakash, *et al.*, 2011).

Embora haja uma gama de aplicações do CM, seus potenciais efeitos sobre a ativação de fibroblastos não são bem esclarecidos. Desta forma, visto suas capacidades farmacológicas, neste trabalho objetivamos em avaliar os potenciais efeitos do cinamato de metila *in vitro* sob a ativação de fibroblastos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes e soluções

Os seguintes reagentes foram adquiridos na Sigma (St. Louis, MO, EUA): Cinamato de Metila (PubChem CID: 637520, $\geq 98\%$, CM), dimetilsulfóxido (DMSO), solução salina tamponada com fosfato (PBS), *Dulbecco's modified Eagle Medium* (DMEM) e tripsina-EDTA. Soro bovino fetal (SBF), penicilina, estreptomicina e L-glutamina foram adquiridas da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). O TGF- $\beta 1$ recombinante foi adquirido na Peprotech (peprotech, St.Louis, USA). Os anticorpos anti-fibronectina e anti-laminina foram adquiridos na Novotec (St. Martin, LaGerene, França), anticorpo anti-fosfo-Smad3 (p-Smad3) foi adquirido na Boster Biological Technology (Pleasanton, CA, EUA) e o isotiocianato de fluoresceína (FITC) foi adquirido através da Santa Cruz Biotechnology (CA, EUA). O cinamato de metila foi diluído em uma solução de PBS contendo DMSO 1%.

4.2 Cultura Celular

A linhagem de fibroblastos murino L929 foi obtida pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), cultivadas em garrafas T75 (Greiner), mantidas com meio DMEM e suplementada com 10% de SBF, L-glutamina (2mM), Penicilina e Estreptomicina (2 U/mL). As células foram mantidas em uma atmosfera 37° à 5% de CO₂. Todos os ensaios desenvolvidos neste trabalho foram feitos na presença do Soro Bovino Fetal (SBF).

4.3 Ensaio De Viabilidade

A fim de caracterizar os possíveis efeitos do cinamato de metila sob a viabilidade das células L929 foi feito inicialmente o ensaio de viabilidade colorimétrico utilizando o MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) como descrito por Mosmann (1983). Este ensaio baseia-se na atividade mitocondrial em que ocorre a redução do sal de MTT em cristais de formazan. Inicialmente, as células (7×10^3) foram

semeadas em placas de 96 poços e deixadas em estufa de CO₂ por 24h. Em seguida, as células foram expostas a diferentes concentrações do cinamato de metila (0.1, 1 e 10 µM), meio de cultura (controle) ou DMSO (veículo), e mantidas por mais 24h em estufa. Após o tratamento, foi adicionado 23 µl/poço de MTT (5 mg/mL), seguido por um período de incubação por 4h. Após este período, o sobrenadante foi removido e adicionado DMSO (150 µL/poço) para a solubilização dos cristais de formazan por 15min, para então realizar a leitura da absorbância. A mensuração foi feita utilizando espectrofotômetro de microplacas (Celer Biotecnologia S.A.), e a densidade óptica (DO) foi medida a 540 nm. A viabilidade foi estimada a partir da fórmula: (absorbância de células tratadas/absorbância de células não tratadas) × 100%.

4.4 Avaliação da produção componentes de matriz extracelular

A produção de fibronectina e laminina foi mensurada utilizando técnica de imunofluorescência. As células foram cultivadas em placas de 24 poços (2×10⁴) em DMEM *overnight*. Em seguida, as células foram tratadas por 24 h com o cinamato de metila (10 µM) ou meio de cultura, na presença ou ausência da estimulação com TGF-β1 (10 ng/ml) por 24 h. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células foram fixadas com paraformaldeído (PFA) 4% por um período de 10 min em temperatura ambiente e submetidas ao ensaio de imunofluorescência (Smaniotto, *et al.*, 2005). Para impedir a autofluorescência foi utilizado PBS/glicina, enquanto a pele de peixe (0,05%) foi utilizada para bloquear sítios inespecíficos. O anticorpo anti-laminina (1:50) ou anti-fibronectina (1:50) foi adicionado por um período de 1 h. Então, as células foram lavadas com PBS e adicionado o anticorpo secundário GARFITC (1:100) durante 45 min em temperatura ambiente. A contra marcação do núcleo foi feita utilizando DAPI por 10 min em temperatura ambiente. As lamínulas foram montadas para análise com PBS/glicerol.

4.5 Ensaio de migração

O efeito do CM sobre a taxa da migração dos fibroblastos foi mensurado utilizando o ensaio de migração horizontal. As células (2×10⁵/poço) foram semeadas

em placas de 24 poços para atingir uma conformação em monocamada. Após este período, as células foram pré-tratadas com mitomicina-C (4 µg/mL) pelo período de 2 h para evitar proliferação. Posteriormente, foi usado uma ponteira estéril 200 µl (p200) para criar uma área livre (gap) sem células e com margens limitadas. Em seguida, os debris formados foram removidos por lavagem com PBS, sendo, em seguida, as células expostas a concentração de 10 µM de cinamato de metila (CM) ou apenas meio de cultura (controle), na presença ou ausência do estímulo com TGF-β1 (10 ng/mL). A avaliação ocorreu mediante a análise das fotomicrografias nos tempos 0 e 24 horas após o risco utilizando o *software* ImageJ, de modo que permita a quantificação da porcentagem de fechamento da área inicial a partir da fórmula: Migração (%) = $[(A0 - At)/A0] \times 100$. Onde A0 é a área no tempo 0 e At é a área no período de tempo após o risco.

4.6 Avaliação da via canônica do TGF-β1

A avaliação da translocação do fator de transcrição fosforilado Smad3 (p-Smad3) foi feita por imunofluorescência. Resumidamente, as células foram tratadas com cinamato de metila (10 µM) ou meio de cultura, na presença ou ausência do estímulo por TGF-β1 (10 ng/ml) por 24 h. Por conseguinte, as células foram fixadas em PFA 4% e permeabilizadas com PBS/Triton-X100 (0,5%). PBS/BSA na proporção de 5% foi utilizado para bloquear sítios inespecíficos. Posteriormente, anti-p-Smad3 foi diluído em PBS/BSA 5% (1:50) e mantido em geladeira *overnight*. Em sequência, as células foram lavadas com PBS e adicionado anticorpo secundário GARFITC (1:100) em temperatura ambiente por 45 min, enquanto o núcleo foi marcado com DAPI. As lamínulas foram montadas para análise com PBS/glicerol.

4.7 Análise Estatística

Todos os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M) e analisados estatisticamente com a análise de variância one-way ANOVA seguida do pós-teste de Tukey's. Os resultados foram considerados significantes

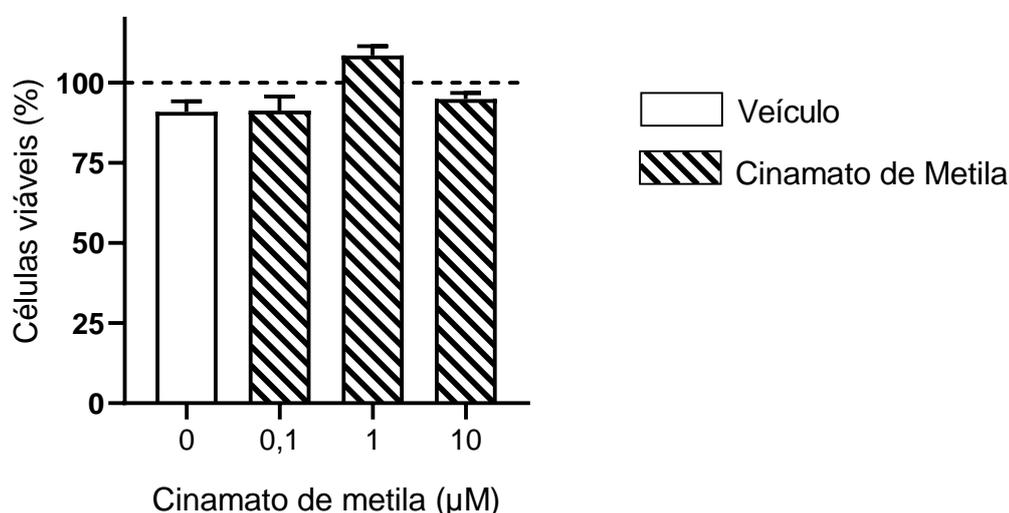
estatisticamente quando $P < 0,05$. Todos os resultados foram analisados com auxílio do programa GraphPad Prism® versão 8.0.

5. RESULTADOS

5.1 Efeito do cinamato de metila sobre a viabilidade celular de fibroblastos

Inicialmente, os potenciais efeitos citotóxicos do cinamato de metila (CM) foram avaliados utilizando o ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT, com fibroblastos expostos a diferentes concentrações de CM (0.1, 1 e 10 μM) durante o período de 24 horas. Como mostrado na Figura 5, os fibroblastos tratados com CM não apresentaram reduções significativas na viabilidade celular em comparação com o grupo controle (tratados apenas com meio de cultura, DMEM) ou com o grupo tratado com o veículo (DMSO). Esse dados indicam que o CM, nas concentrações testadas, não induziu citotoxicidade nos fibroblastos. Com base nesses resultados, e considerando que o CM, na concentração de até 10 μM , não promoveu alterações significativas na viabilidade celular, apenas a dose de 10 μM foi selecionada para os experimentos subsequentes.

Figura 5: Efeito do cinamato de metila sobre a viabilidade de fibroblastos.

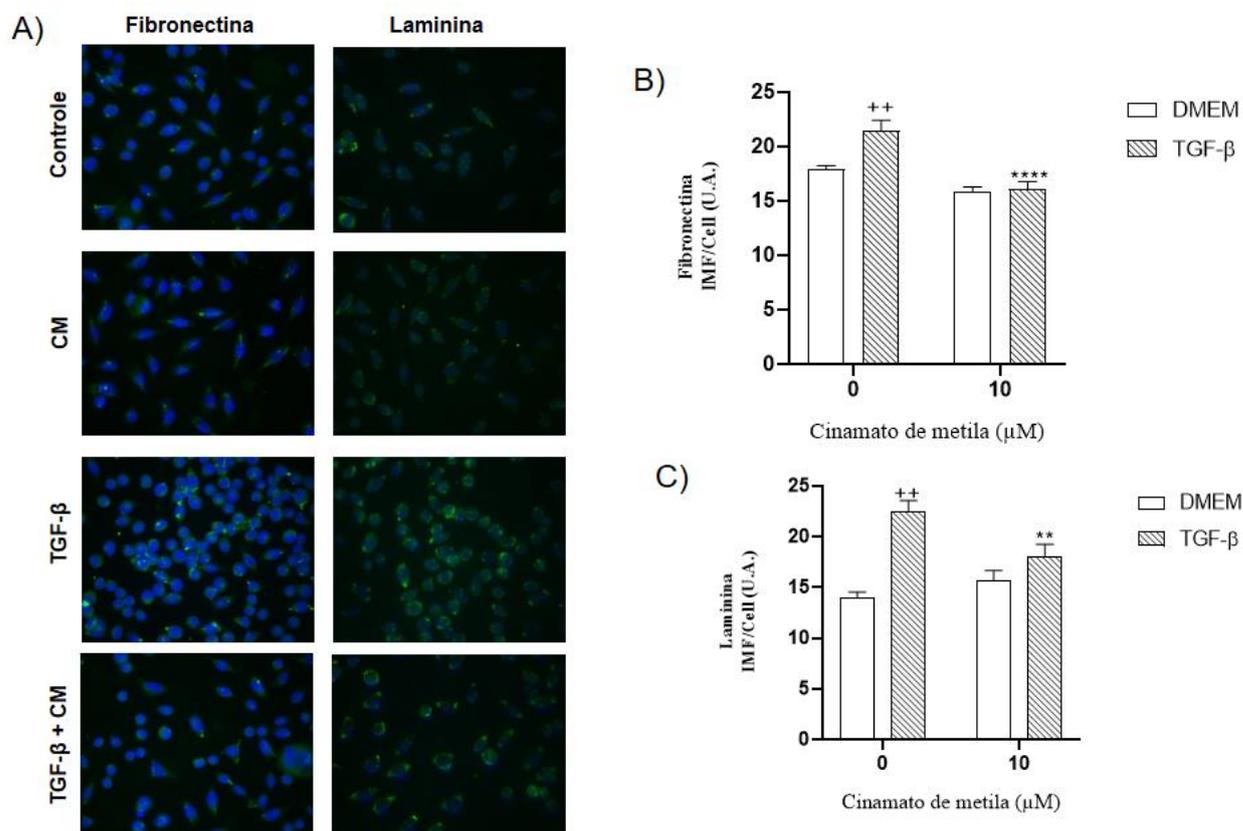


As células foram expostas a diferentes concentrações de cinamato de metila por 24 horas. Células sem tratamentos foram utilizadas como controle (linha tracejada). O DMSO foi utilizado como veículo. As células ficaram incubadas com o MTT por 4h e o D.O foi avaliada em 540 nm após a dissolução dos cristais de formazan com DMSO. As barras representam o média \pm erro padrão da média (SEM). A barra branca representa as células tratadas apenas com o veículo (DMSO).

5.2 Efeito do cinamato de metila sobre a produção de proteínas de matriz extracelular por fibroblastos estimulados por TGF- β 1

Para investigar os efeitos do CM na ativação de fibroblastos induzida por TGF- β 1, avaliamos a produção de componentes de matriz extracelular, como fibronectina e laminina. Conforme ilustrado na Figura 6A, as células estimuladas com TGF- β 1 apresentaram um aumento significativo na produção desses componentes em comparação com o grupo controle e com o grupo tratado apenas com o CM. Esse aumento, no entanto, foi significativamente reduzido quando as células foram tratadas com CM na concentração de 10 μ M. As fotomicrografias apresentadas revelaram a produção basal de fibronectina e laminina em células mantidas apenas com meio de cultura, sem estímulo adicional, enquanto nas células estimuladas com TGF- β 1 observou-se um aumento acentuado na intensidade de fluorescência, indicando maior produção desses componentes. Entretanto, a presença de CM foi capaz de atenuar essa resposta, resultando em uma diminuição notável na intensidade de fluorescência, evidenciando a capacidade do CM de modular a produção de matriz extracelular em fibroblastos ativados (Figura 6B e 6C).

Figura 6: Efeito do cinamato de metila sobre a produção de fibronectina e laminina.



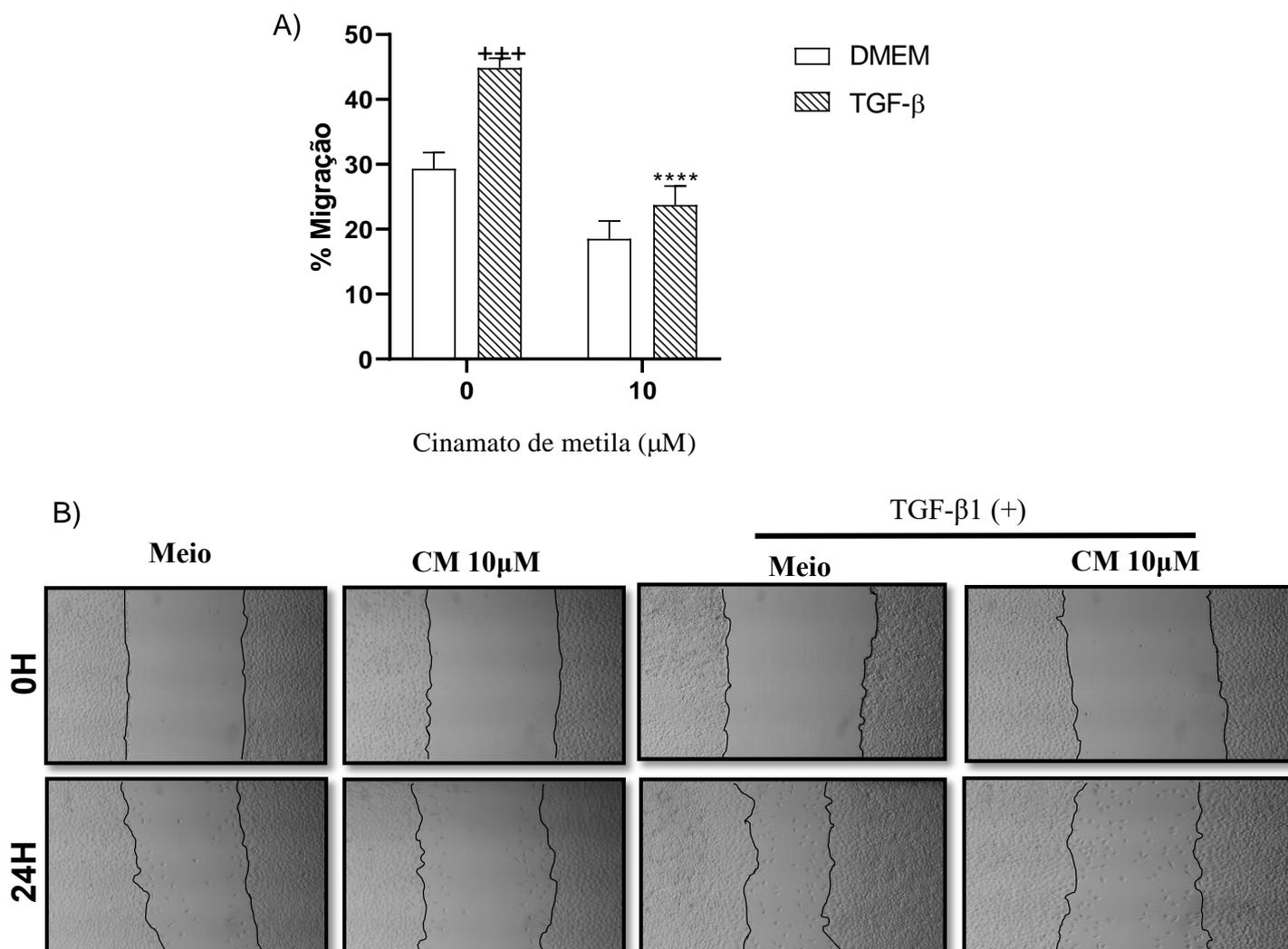
O ensaio foi feito utilizando a técnica de imunofluorescência. A) Representação de fibroblastos L929 marcados com anticorpos anti-fibronectina e anti-laminina (1:50) contendo FITC. (B) e (C) representam a quantificação da intensidade média de fluorescência (IMF) das imagens quantificadas pelo software ImageJ. Os valores representam média \pm E.P.M. (+++) $P < 0,001$ em comparação com as células mantidas apenas em meio de cultivo DMEM (controle). (****) $P < 0,0001$ e (**) $P < 0,01$ em comparação com as células estimuladas com TGF- β 1. Os resultados foram submetidos à análise estatística One way ANOVA utilizando-se o pós-teste de Tukey.

5.3 Efeito do cinamato de metila sobre a capacidade migratória de fibroblastos estimulados com TGF- β 1

Diante dos efeitos do cinamato de metila na produção de proteínas de matriz extracelular, investigamos se esse efeito se refletia também na capacidade migratória dos fibroblastos. A migração celular foi analisada por meio do ensaio de migração

horizontal. Inicialmente, após a formação de uma monocamada de fibroblastos, as células foram pré-tratadas com mitomicina-C, um inibidor clássico da proliferação celular, por 2 horas, para garantir que a migração analisada fosse independente da proliferação. Em seguida, foi criada uma área livre de células (gap), as células foram lavadas com PBS para remover células não aderentes e detritos, e posteriormente, tratadas com CM (10 μ M) ou estimuladas com TGF- β 1 (10 ng/mL). A Figura 7A mostra que o CM, isoladamente, não teve efeito significativo na migração espontânea dos fibroblastos após o tempo de 24 horas. No entanto, as células estimuladas com TGF- β 1 apresentaram um aumento de 64% na migração em comparação com o grupo controle (DMEM). Esse aumento na migração foi significativamente atenuada pelo tratamento com CM, resultando em uma redução de 47% na migração de células estimuladas com TGF- β 1. As fotomicrografias na Figura 7B sustentam esses achados, evidenciando uma diminuição visível na migração dos fibroblastos tratados com CM na presença de TGF- β 1.

Figura 7: O efeito do cinamato de metila (CM) na migração celular de fibroblastos submetidos ao ensaio de migração horizontal.

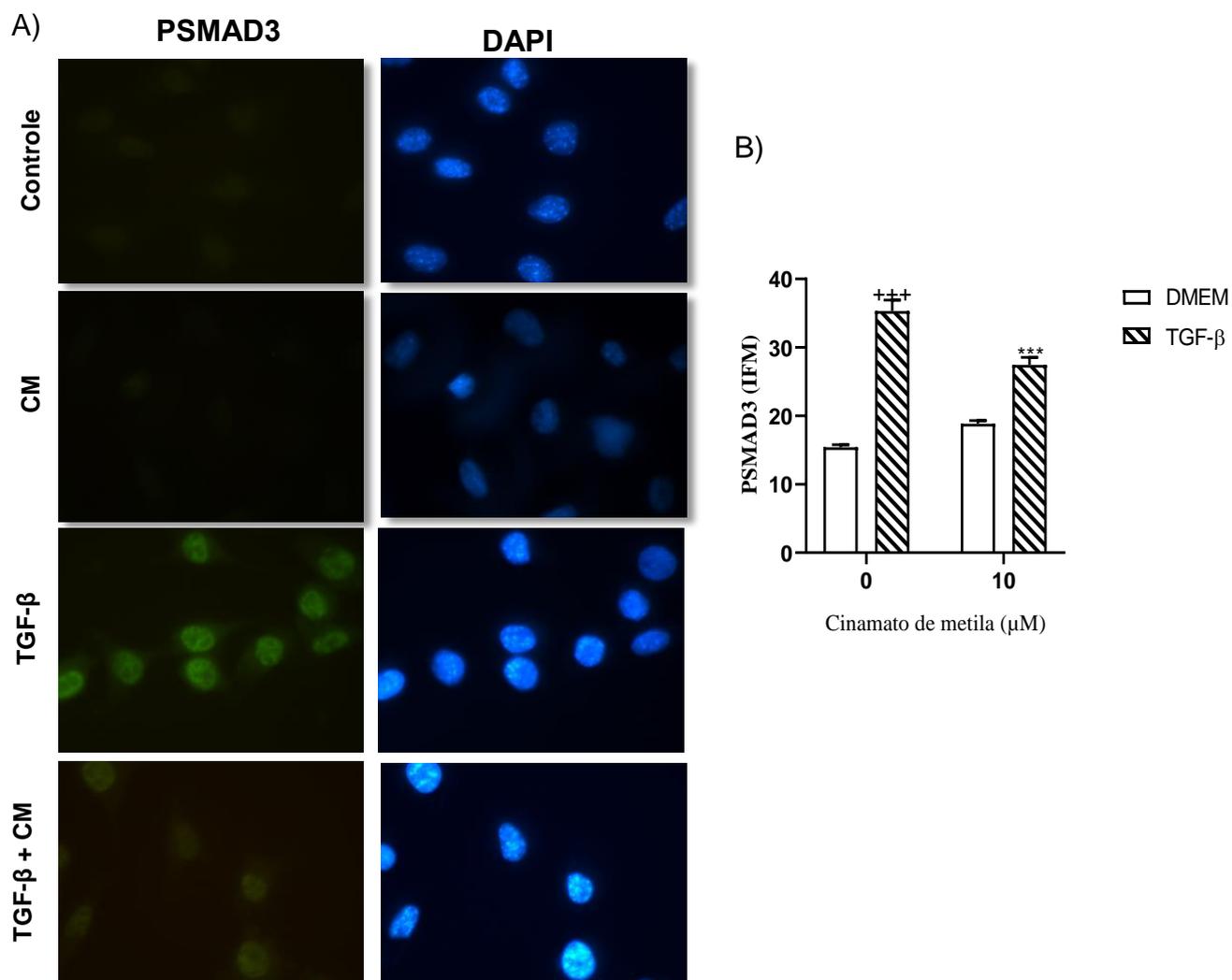


Fibroblastos foram pré-tratadas com mitomicina-C (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) seguido do tratamento com CM (10 μM) ou estímulo com TGF- β 1 (10 ng/mL). As imagens foram capturadas para a análise de fechamento do GAP. (7A) Análise quantitativa do fechamento do GAP após 24 horas. As barras representam o média \pm erro padrão da média (SEM). (++) $P < 0,001$ comparados com as células tratadas apenas com meio de cultura, e (****) $P < 0,0001$ comparado com o grupo estimulado com TGF- β 1. (7B) Fotomicrografias representativas do fechamento do GAP.

5.4 Efeito do cinamato de metila sobre sinalização de fibroblastos estimulados por TGF- β 1

Considerando que CM foi capaz de reduzir tanto a produção de proteínas de matriz extracelular quanto a capacidade migratória de fibroblastos, decidimos investigar se o CM interfere na via de sinalização dependente de Smad3, induzida pelo TGF- β 1. Na Figura 8, podemos observar que as células estimuladas com TGF- β 1 exibem uma imunomarcacão (marcacão em verde) de proteína p-Smad3, o que indica ativacão dessa via de sinalizacão. Esse fenômeno não foi observado nas células mantidas apenas com meio de cultivo. O aumento na marcaçao de p-Smad3 observado nas células estimuladas com TGF- β 1 foi significativamente reduzido pelo tratamento com CM, indicando que este composto inibiu a sinalizacão mediada pelo receptor para TGF- β 1. Esses resultados sugerem que os efeitos inibitórios do CM sobre a funçao dos fibroblastos ocorrem, ao menos em parte, por meio da inibicão da via de sinalizacão TGF- β 1/Smad3, um importante mediador da ativacão de fibroblastos em condições patológicas.

Figura 8: Efeito do cinamato de metila na sinalização de fibroblastos estimulados com TGF- β 1.



Células L929 foram cultivadas em *overnight*, então as células foram tratadas com CM (10 μ M), TGF- β 1 (10 ng/mL) ou meio de cultura por 24 h. A) representação das células marcadas com anticorpo anti-Fosfo-Smad3 (p-SMAD3). B) A significância estatística foi realizada utilizando one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Os valores representam média \pm E.P.M. (+++) $P < 0,001$ comparados com as células tratadas apenas com meio de cultura e (***) $P < 0,001$ quando comparado ao grupo estimulado por TGF- β 1.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliado os potenciais efeitos do cinamato de metila e a sua capacidade de reduzir a ativação de fibroblastos induzidos por TGF- β 1 *in vitro*. A princípio, foi avaliado os possíveis efeitos deletérios do CM por meio do ensaio de viabilidade por MTT. Além disso, foi avaliado a produção de fibronectina e laminina induzidas por TGF- β 1, enquanto funcionalmente foi-se avaliado a capacidade migratória de fibroblastos também estimulados por TGF- β 1. Também foi avaliado a interferência do CM na p-Smad3, via canônica utilizada pelo TGF- β 1 para deflagrar sua resposta biológica.

Inicialmente, foi avaliado o efeito do cinamato de metila na viabilidade de fibroblastos por meio do ensaio colorimétrico de MTT. Este ensaio baseia-se na interação de desidrogenases presentes na mitocôndria e a redução do tetrazolium, gerando os cristais de formazan. A quantidade gerada de cristais de formazan é diretamente proporcional a quantidade de células viáveis (Van Meerloo *et al.*, 2011). Os resultados obtidos indicam que o CM na concentração de até 10 μ M em 24 horas não afeta a sobrevivência de fibroblastos L929. Estes resultados estão em sintonia com trabalhos anteriores desenvolvidos no laboratório de biologia celular em que fibroblastos na presença de CM em concentrações superiores a 100 μ M após 24 horas também não afetaram a viabilidade de fibroblastos (Aquino, *et al.*, 2021). Outros trabalhos demonstram que diferentes tipos celulares como pré-adipócitos tratados com concentrações inferiores a 30 μ M de CM após 24 horas demonstram ausência de citotoxicidade, enquanto hepatócitos da linhagem HepG2 tratados com CM com concentrações de 400 μ M, uma concentração 40x maior do que a utilizada neste trabalho, só demonstram presença de citotoxicidade após 72 horas de exposição (Chen, *et al.* 2012; Fu, *et al.*, 2024).

O TGF- β 1 é uma citocina de ação pleiotrópica que regula diversos fenômenos celulares como a manutenção do sistema hematopoiético e regulação de células T reguladoras, além de ser uma citocina chave no processo de cicatrização por aumentar a migração e produção de MEC em fibroblastos (Chen, *et al.*, 2022; Kang, *et al.*, 2019). A literatura relata que alguns compostos fenólicos como a quercetina, ácido gálico, e o ácido ferúlico exercem papéis farmacológicos importantes durante a fibrogênese tecidual, sendo capazes de reduzir o quadro fibrótico cardíaco e pulmonar por meio da redução de células senescentes, componentes da MEC e citocinas pró

inflamatórias (Geng, *et al.*, 2022; Jin, *et al.*, 2018; Ali, *et al.*, 2021) e visto o papel fundamental do TGF- β 1 sob a indução de proteínas de matriz, decidimos avaliar os efeitos do CM na produção de proteínas da MEC. Nossos resultados indicam que o tratamento com CM frente ao estímulo por TGF- β 1 foi capaz de reduzir a produção de fibronectina e laminina, duas glicoproteínas da matriz extra celular extremamente presentes durante a fibrogênese tecidual. Lee e colaboradores demonstraram que pacientes com fibrose pulmonar idiopática apresentam uma maior expressão de laminina em relação ao tecido pulmonar de pacientes saudáveis e que a laminina é um importante marcador fibrótico, além de também ser um importante alvo terapêutico para portadores de desordens de origem fibrótica (Lee, *et al.*, 2018).

Apesar de alguns compostos fenólicos serem capazes de reduzir as proteínas associadas a matriz extracelular, nosso trabalho demonstra de forma inédita a ação do cinamato de metila sob a produção da MEC em fibroblastos estimulados por TGF- β 1. Visto que o CM foi capaz de reduzir a produção de proteínas associadas a MEC, buscamos avaliar se esta redução teria implicação na capacidade migratória dos fibroblastos. Para isso, fizemos um ensaio de migração horizontal, sendo este um ensaio fácil, de baixo custo e amplamente utilizado para medir a migração *in vitro* (Liliang, *et al.*, 2007), uma vez que o estímulo com TGF- β 1 *in vitro* aumenta a migração de fibroblastos, decidimos avaliar o potencial efeito do CM sobre a capacidade migratória dessas células.

Nesse sentido, em sintonia com estudos anteriores, nossos resultados demonstraram que fibroblastos quando estimulados com TGF- β 1 tem um aumento significativo na sua capacidade migratória quando comparados ao grupo controle. Os resultados também mostram que o CM possui uma capacidade em reduzir a migração de fibroblastos na presença de TGF- β 1 no período de 24h. Interessantemente, Park e colaboradores (2020) demonstraram que apenas o tratamento com o CM foi capaz de reduzir a migração de pré-osteoblastos (Park, *et al.*, 2020). Este resultado elenca a capacidade do cinamato de metila agir de forma distinta e moduladora em fibroblastos *in vitro*.

Sabe-se que que a produção de componentes da MEC e a migração dependem de diversas vias de sinalização. A via canônica do TGF- β 1 é ativada quando o ligante TGF- β 1 se liga ao receptor TGFBRII, que então fosforila o TGFBR I que quando fosforilado ativa a via *downstream* fosforilando as proteínas Smad2, Smad3 e Smad4, formando um complexo que então transloca para o núcleo e regula a transcrição de

genes relacionados ao TGF- β 1 (Hata, 2016; Heldin; Moustakas, 2011). As proteínas Smads são uma super família que medeiam a transdução de sinais gerados pelo TGF- β 1 quando interage com o seu receptor (Luo, 2017) e são fundamentais na ativação da via canônica do TGF- β 1. Estudos também apontam o papel crucial da ativação da via TGF- β 1/Smad em doenças fibróticas (Shi, *et al.*, 2020; Penke, 2019), sendo sua ativação relacionada com modificações no citoesqueleto, bem como no aumento da produção de proteínas da matriz extracelular e o aumento da motilidade de fibroblastos (Wnuk, *et al.*, 2020; Cheng, *et al.*, 2022; Zhang, *et al.*, 2020).

A literatura científica vem descrevendo o papel crucial da via TGF- β 1/Smad3 por mediar diversos fenômenos em fibroblastos. Por exemplo, estudos utilizando RNA de interferência (SiRNA) para Smad3 evidenciaram o papel fundamental da via na regulação negativa na produção de moléculas de matriz (Zeng, *et al.*, 2020), sugerindo que a via TGF- β 1/Smad3 possui um importante papel na resposta de fibroblastos frente a estímulos com TGF- β 1. Tendo em vista o efeito do CM sobre a produção de MEC e capacidade migratória, buscamos avaliar se o efeito redutor do CM poderia estar associado com a via canônica do TGF- β 1. Foi observado que quando as células são estimuladas com TGF- β 1 ocorre um aumento da intensidade de fluorescência nuclear dos fibroblastos em relação ao controle, sendo esta uma forma de avaliar, a nível proteico, a modificação da proteína Smad3 em fosfo-Smad3 (p-Smad3), mas que na presença do CM após 24h a intensidade de fluorescência nuclear diminui, mostrando que o efeito redutor do CM parece ser dependente da via TGF- β 1/Smad3.

Portanto, este trabalho demonstrou, pela primeira vez, que o tratamento com o cinamato de metila *in vitro* tem um potencial efeito redutor na ativação de fibroblastos induzidas por TGF- β 1 por reduzir a deposição de fibronectina e laminina. Além disso, também foi evidenciado que o cinamato de metila possui um efeito direto na capacidade migratória de fibroblastos, uma vez que o tratamento reduziu a ativação das células induzidas por TGF- β 1, sendo estes efeitos dependentes da via TGF- β 1/Smad3.

7. CONCLUSÃO

Tomados em conjunto, nossos resultados permitem concluir que o tratamento com o cinamato de metila afeta vias específicas do maquinário celular que desempenham funções chaves no funcionamento de fibroblastos, como a redução na produção de proteínas de matriz extracelular, bem como a redução da migração. Além disso, o cinamato de metila também demonstrou interferir na sinalização intracelular disparado pelo TGF- β 1 inibindo a translocação do p-Smad3 para o núcleo. Estes resultados apontam que o cinamato de metila tem um potencial reduzir a ativação de fibroblastos provocados pela estimulação pelo TGF- β 1 *in vitro*, visto a sua redução em aspectos chaves da função celular sem afetar a viabilidade.

REFERÊNCIAS

- AHLUWALIA, N.; SHEA, B. S.; TAGER, A. M. New therapeutic targets in idiopathic pulmonary fibrosis. Aiming to rein in runaway wound-healing responses. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 190, n. 8, p. 867-878, 2014.
- ALI, S. *et al.* Ferulic acid ameliorates the progression of pulmonary fibrosis via inhibition of TGF- β /smad signalling. **Food and Chemical Toxicology**, v. 149, p. 111980, 2021.
- AMBRIZ-PÉREZ, Dulce L. *et al.* Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 2, n. 1, p. 1131412, 2016.
- ANDRADE, Z. A. Schistosomiasis and liver fibrosis. **Parasite immunology**, v. 31, n. 11, p. 656-663, 2009.
- ANSARI, M. K. A. *et al.* The concept and status of medicinal and aromatic plants: history, pharmacognosy, ecology, and conservation. In: **Plants as medicine and aromatics**. CRC Press, 2023. p. 129-144.
- 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. **Journal of Tissue Viability**, v. 30, n. 3, p. 363-371, 2021.
- ARK, A. V.; CAO, J.; LI, X. TGF- β receptors: In and beyond TGF- β signaling. **Cellular signalling**, v. 52, p. 112-120, 2018.
- BAGLIERI, J.; BRENNER, D. A.; KISSELEVA, T. The role of fibrosis and liver-associated fibroblasts in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 7, p. 1723, 2019.
- BALLABENI, V. *et al.* Ocotea quixos Lam. essential oil: In vitro and in vivo investigation on its anti-inflammatory properties. **Fitoterapia**, v. 81, n. 4, p. 289-295, 2010.
- BAUDINO, T. A. *et al.* Cardiac fibroblasts: friend or foe?. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 291, n. 3, p. H1015-H1026, 2006.
- BROEKELMANN, T. J. *et al.* Transforming growth factor beta 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 15, p. 6642-6646, 1991.

- BROOK, K.; BENNETT, J.; DESAI, S. P. The chemical history of morphine: an 8000-year journey, from resin to de-novo synthesis. **Journal of anesthesia history**, v. 3, n. 2, p. 50-55, 2017.
- BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Natural product reports**, v. 25, n. 3, p. 475-516, 2008.
- CAMELLITI, P. *et al.* Fibroblast network in rabbit sinoatrial node: structural and functional identification of homogeneous and heterogeneous cell coupling. **Circulation research**, v. 94, n. 6, p. 828-835, 2004.
- CAPÓ, X. *et al.* 5-dodecanolide, a compound isolated from pig lard, presents powerful anti-inflammatory properties. **Molecules**, v. 26, n. 23, p. 7363, 2021.
- CHEN, B. *et al.* The love-hate relationship between TGF- β signaling and the immune system during development and tumorigenesis. **Frontiers in immunology**, v. 13, p. 891268, 2022.
- CHEN, Y. *et al.* Methyl cinnamate inhibits adipocyte differentiation via activation of the CaMKK2–AMPK pathway in 3T3-L1 preadipocytes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 4, p. 955-963, 2012.
- CHENG, L. *et al.* DR7dA, a novel antioxidant peptide analog, demonstrates antifibrotic activity in pulmonary fibrosis in vivo and in vitro. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 382, n. 2, p. 100-112, 2022.
- CHOPRA, B.; DHINGRA, A. K. Natural products: A lead for drug discovery and development. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 9, p. 4660-4702, 2021.
- CIALDAI, F.; RISALITI, C.; MONICI, M. Role of fibroblasts in wound healing and tissue remodeling on Earth and in space. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 10, p. 958381, 2022.
- CONTARDI, M. *et al.* Hydroxycinnamic acids and derivatives formulations for skin damages and disorders: A review. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 7, p. 999, 2021.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. **Pure and applied chemistry**, v. 77, n. 1, p. 7-24, 2005.
- D'ALESSANDRO, V. F. *et al.* Transforming Growth Factor β 1 Overexpression Is Associated with Insulin Resistance and Rapidly Progressive Kidney Fibrosis under Diabetic Conditions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 22, p. 14265, 2022.
- DAI, R. *et al.* Mycomedicine: a unique class of natural products with potent anti-tumour bioactivities. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 1113, 2021.

- DARBY, I. A. *et al.* Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. **Clinical, cosmetic and investigational dermatology**, p. 301-311, 2014.
- DENG, Z. *et al.* TGF- β signaling in health, disease, and therapeutics. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 9, n. 1, p. 61, 2024.
- DESJARDINS-PARK, H. E.; FOSTER, Deshka, S.; LONGAKER, M. T. Fibroblasts and wound healing: an update. **Regenerative medicine**, v. 13, n. 5, p. 491-495, 2018.
- DEWICK, P. M. Medicinal natural products: A biosynthetic approach. 2002.
- DIAS, D.I A.; URBAN, Sylvia; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 2, p. 303-336, 2012.
- DULBECCO, R. *et al.* Functional changes of intermediate filaments in fibroblastic cells revealed by a monoclonal antibody. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 80, n. 7, p. 1915-1918, 1983.
- FINK, K. *et al.* Determination of 2H/1H and 13C/12C isotope ratios of (E)-methyl cinnamate from different sources using isotope ratio mass spectrometry. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 10, p. 3065-3068, 2004.
- FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix at a glance. **Journal of cell science**, v. 123, n. 24, p. 4195-4200, 2010.
- FRIEDMAN, S. L. *et al.* Therapy for fibrotic diseases: nearing the starting line. **Science translational medicine**, v. 5, n. 167, p. 167sr1-167sr1, 2013.
- FU, Y. *et al.* Methyl Cinnamate (MC) Alleviates Free Fatty Acids (FFAs) Induced Lipid Accumulation Through the AMPK Pathway in HepG2 Cells. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity**, p. 1183-1197, 2024.
- FUJIWARA, G. M. *et al.* Evaluation of larvicidal activity and ecotoxicity of linalool, methyl cinnamate and methyl cinnamate/linalool in combination against *Aedes aegypti*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 139, p. 238-244, 2017.
- GENG, F. *et al.* Quercetin alleviates pulmonary fibrosis in mice exposed to silica by inhibiting macrophage senescence. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 912029, 2022.
- GHARBIA, F.. *et al.* Adult skin fibroblast state change in murine wound healing. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 886, 2023.
- GUAN, R. *et al.* Emodin ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats by suppressing epithelial-mesenchymal transition and fibroblast activation. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 35696, 2016.

- HARRINGTON, A.; MOORE-MORRIS, T. Cardiac fibroblasts in heart failure and regeneration. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 12, p. 1388378, 2024.
- HATA, A.; CHEN, Y. TGF- β signaling from receptors to Smads. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 8, n. 9, p. a022061, 2016.
- HELDIN, C.; MOUSTAKAS, A. Role of Smads in TGF β signaling. **Cell and tissue research**, v. 347, n. 1, p. 21-36, 2012.
- HENDERSON, N. C. *et al.* Targeting of α v integrin identifies a core molecular pathway that regulates fibrosis in several organs. **Nature medicine**, v. 19, n. 12, p. 1617-1624, 2013.
- HYNES, R. O. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. **Science**, v. 326, n. 5957, p. 1216-1219, 2009.
- JIN, L. *et al.* Gallic acid improves cardiac dysfunction and fibrosis in pressure overload-induced heart failure. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 9302, 2018.
- KALLURI, R. The biology and function of fibroblasts in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 9, p. 582-598, 2016.
- KANG, J. *et al.* Transforming growth factor beta induces fibroblasts to express and release the immunomodulatory protein PD- L1 into extracellular vesicles. **The FASEB Journal**, v. 34, n. 2, p. 2213-2226, 2020.
- KARIN, M.; CLEVERS, H. Reparative inflammation takes charge of tissue regeneration. **Nature**, v. 529, n. 7586, p. 307-315, 2016.
- KAUSHIK, R. *et al.* Fine structure analysis of perineuronal nets in the ketamine model of schizophrenia. **European Journal of Neuroscience**, v. 53, n. 12, p. 3988-4004, 2021.
- KIM, D. *et al.* Diabetes aggravates post-ischaemic renal fibrosis through persistent activation of TGF- β 1 and Shh signalling. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 16782, 2017.
- KISSELEVA, T. *et al.* Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 24, p. 9448-9453, 2012.
- KOGA, Y. *et al.* Progression of idiopathic pulmonary fibrosis is associated with silica/silicate inhalation. **Environmental Science & Technology Letters**, v. 8, n. 10, p. 903-910, 2021.
- KUROSE, H. Cardiac fibrosis and fibroblasts. **Cells**, v. 10, n. 7, p. 1716, 2021.

- LEE, C. *et al.* Laminin $\alpha 1$ is a genetic modifier of TGF- $\beta 1$ –stimulated pulmonary fibrosis. **JCI insight**, v. 3, n. 18, 2018.
- LEE, J. H.; MASSAGUÉ, J. TGF- β in developmental and fibrogenic EMTs. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2022. p. 136-145.
- LEND AHL, U.; MUHL, L.; BETSHOLTZ, C. Identification, discrimination and heterogeneity of fibroblasts. **Nature communications**, v. 13, n. 1, p. 3409, 2022.
- LIANG, C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. 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.
- LILIN, E. *et al.* Methyl cinnamate protects against dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by inhibiting the MAPK signaling pathway: Methyl cinnamate in dextran sulfate sodium-induced colitis. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 55, n. 11, p. 1806, 2023.
- LIMA, F.J.B. *et al.* Antispasmodic and myorelaxant effects of the flavoring agent methyl cinnamate in gut: Potential inhibition of tyrosine kinase. **European journal of pharmacology**, v. 740, p. 192-199, 2014.
- LUO, K. Signaling cross talk between TGF- β /Smad and other signaling pathways. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 9, n. 1, p. a022137, 2017.
- MERAN, S.; STEADMAN, R. Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis. **International journal of experimental pathology**, v. 92, n. 3, p. 158-167, 2011.
- MIKI, H.; MANRESA, M. C. Novel fibroblast phenotypes in homeostasis and chronic inflammation: From functions to potential regulators. **The Journal of Physiology**, v. 601, n. 12, p. 2273-2291, 2023.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- OH, C. K.; MURRAY, L. A.; MOLFINO, N. A. Smoking and idiopathic pulmonary fibrosis. **Pulmonary medicine**, v. 2012, n. 1, p. 808260, 2012.
- OLAS, B. *et al.* Comparative chemical composition, antioxidant and anticoagulant properties of phenolic fraction (a rich in non-acylated and acylated flavonoids and non-polar compounds) and non-polar fraction from *Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson fruits. **Food chemistry**, v. 247, p. 39-45, 2018.

- OU, S.; KWOK, K. Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, n. 11, p. 1261-1269, 2004.
- PAKSHIR, P. *et al.* The myofibroblast at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 133, n. 13, p. jcs227900, 2020.
- PARIMON, T. *et al.* Senescence of alveolar epithelial progenitor cells: A critical driver of lung fibrosis. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 325, n. 2, p. C483-C495, 2023.
- PARK, K. *et al.* A phytochemical constituent, (E)-methyl-cinnamate isolated from *Alpinia katsumadai* Hayata suppresses cell survival, migration, and differentiation in pre-osteoblasts. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 10, p. 3700, 2020.
- PENKE, L. R.; PETERS-GOLDEN, M. Molecular determinants of mesenchymal cell activation in fibroproliferative diseases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, p. 4179-4201, 2019.
- POOLE, J. J. A; MOSTAÇO-GUIDOLIN, L.B. Optical microscopy and the extracellular matrix structure: a review. **Cells**, v. 10, n. 7, p. 1760, 2021.
- RODRIGUES, T. *et al.* Counting on natural products for drug design. **Nature chemistry**, v. 8, n. 6, p. 531-541, 2016.
- SAMARA, K. D. *et al.* Smoking and pulmonary fibrosis: novel insights. **Pulmonary medicine**, v. 2011, n. 1, p. 461439, 2011.
- SARASWATHIBHATLA, A.; INDANA, D.; CHAUDHURI, O. Cell–extracellular matrix mechanotransduction in 3D. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 24, n. 7, p. 495-516, 2023.
- SHAW, T. J.; ROGNONI, E. Dissecting fibroblast heterogeneity in health and fibrotic disease. **Current rheumatology reports**, v. 22, p. 1-10, 2020.
- SHI, A. *et al.* TGF- β loaded exosome enhances ischemic wound healing in vitro and in vivo. **Theranostics**, v. 11, n. 13, p. 6616, 2021.
- 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.
- STRUTZ, F. *et al.* Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. **The Journal of cell biology**, v. 130, n. 2, p. 393-405, 1995.

- TAGUCHI, L. *et al.* A flavanone from *Baccharis retusa* (Asteraceae) prevents elastase-induced emphysema in mice by regulating NF- κ B, oxidative stress and metalloproteinases. **Respiratory research**, v. 16, p. 1-15, 2015.
- TAI, Y. *et al.* Myofibroblasts: function, formation, and scope of molecular therapies for skin fibrosis. **Biomolecules**, v. 11, n. 8, p. 1095, 2021.
- TAOFIQ, O. *et al.* Hydroxycinnamic acids and their derivatives: Cosmeceutical significance, challenges and future perspectives, a review. **Molecules**, v. 22, n. 2, p. 281, 2017.
- TOMOS, I. *et al.* Long-term personal air pollution exposure and risk for acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. **Environmental Health**, v. 20, p. 1-13, 2021.
- UESHIMA, E. *et al.* Macrophage-secreted TGF- β 1 contributes to fibroblast activation and ureteral stricture after ablation injury. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 317, n. 7, p. F52-F64, 2019.
- VAN MEERLOO, J.; KASPERS, G. J.L.; CLOOS, J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. **Cancer cell culture: methods and protocols**, p. 237-245, 2011.
- WANG, J. *et al.* Pulmonary fibrosis: pathogenesis and therapeutic strategies. **MedComm**, v. 5, n. 10, p. e744, 2024.
- WANG, L. *et al.* The role of natural products in the prevention and treatment of pulmonary fibrosis: a review. **Food & function**, v. 12, n. 3, p. 990-1007, 2021.
- WANG, Z. *et al.* The value of single biomarkers in the diagnosis of silicosis: A meta-analysis. **Isience**, v. 27, n. 6, 2024.
- WNUK, D. *et al.* Enhanced asthma-related fibroblast to myofibroblast transition is the result of profibrotic TGF- β /Smad2/3 pathway intensification and antifibrotic TGF- β /Smad1/5/(8) 9 pathway impairment. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 16492, 2020.
- YAO, L. *et al.* Temporal control of PDGFR α regulates the fibroblast-to-myofibroblast transition in wound healing. **Cell reports**, v. 40, n. 7, 2022.
- YE, Z.; HU, Y. TGF- β 1: Gentlemanly orchestrator in idiopathic pulmonary fibrosis. **International journal of molecular medicine**, v. 48, n. 1, p. 1-14, 2021.
- YONG, H. *et al.* Chitosan films functionalized with different hydroxycinnamic acids: Preparation, characterization and application for pork preservation. **Foods**, v. 10, n. 3, p. 536, 2021.
- YOUNESI, F. S. *et al.* Fibroblast and myofibroblast activation in normal tissue repair and fibrosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, p. 1-22, 2024.

- ZENG, X. *et al.* The effect of Smad2-and Smad3-targeting RNA interference on extracellular matrix synthesis in rat fibroblasts of peritoneal adhesion tissues. **American Journal of Translational Research**, v. 12, n. 11, p. 7420, 2020.
- ZHANG, J. *et al.* Engeletin ameliorates pulmonary fibrosis through endoplasmic reticulum stress depending on Inc949-mediated TGF- β 1-Smad2/3 and JNK signalling pathways. **Pharmaceutical Biology**, v. 58, n. 1, p. 1114-1123, 2020.
- ZHAO, X. *et al.* New insights into fibrosis from the ECM degradation perspective: the macrophage-MMP-ECM interaction. **Cell & bioscience**, v. 12, n. 1, p. 117, 2022.
- 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