

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

ERICK GABRIEL ALVES FERREIRA

**Avaliação do cinamato de metila sobre as funções das células epiteliais
estimuladas por TGF- β 1**

Maceió

2024

ERICK GABRIEL ALVES FERREIRA

Avaliação do cinamato de metila sobre as funções das células epiteliais estimuladas
por TGF- β 1

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto.

Maceió

2024

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

Bibliotecária: Helena Cristina Pimentel do Vale CRB4 - 661

F383a Ferreira, Erick Gabriel Alves.

Avaliação do cinamato de metila sobre as funções das células epiteliais estimuladas por TGF- β 1 / Erick Gabriel Alves Ferreira. – 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. Fibrose. 2. Cinamato de metila. 3. Transição epitelial-mesenquimal.
4. Epitélio. I. Título.

CDU:611.018.7

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família que me deu apoio e amparo durante os momentos mais complicados. À minha mãe Tânia que é meu exemplo de esforço, carinho e cuidado, ao meu pai Walter Jr que é minha inspiração de ser humano e meu melhor amigo, aos meus avós Liedja, Josete e Walter que me ensinam todos os dias o que é o amor; e às minhas irmãs Ingrid e Nataly que me fazem mais feliz e me ensinaram que ser paciente sempre traz bons frutos. Às minhas pets, Annie e Fanny, que sempre estarão no meu coração.

À Universidade Federal de Alagoas que tornou real a possibilidade de realizar minha formação acadêmica e me oferecer os recursos necessários para o desenvolvimento desse trabalho. Também à coordenação do curso de Ciências Biológicas Bacharelado por todo suporte.

Ao Laboratório de biologia celular que forneceu toda a estrutura e equipamentos onde tive a oportunidade de aprender e crescer como graduando, agradeço imensamente pelo acolhimento e pelo ambiente de constante aprendizado. À família LBC, meus amigos e colegas de trabalho, aos que estão atualmente no laboratório e aos que já saíram - mas que foram igualmente importantes para meu aprendizado: Asheley, Isadora, Luana, Cris, James, Fernanda, Everlaine, Ana Lúcia, Camilla, Keyla, Iasmin, Rayane, Anderson, Monaly, Julianderson, Vitor Monte, Felipe, Bia Santana, Laura, Bia Souza, Vanessa, e aos professores Danielma, Janylle, Alexandre e Marvin que sempre estiveram disponíveis para solucionar minhas dúvidas e compartilhar suas experiências. Agradeço em especial a técnica Juliane Barreto que com seu carinho e organização fez com que nada faltasse, sempre dando todo o apoio e pondo tudo em ordem.

Também, gostaria de agradecer em especial aos meus colegas e amigos de equipe que sempre estiveram dispostos a me prestar socorro: Alef Barros, Mark Fidelix, Jordana Santana e Grazielle Silva. Em especial ao professor Emiliano, meu orientador, por toda a orientação, paciência, dedicação e incentivo ao longo deste processo, sempre me fazendo enxergar uma luz.

“O homem morre como nasce: sem cabelo, sem dentes e sem ilusões.”

Voltaire, pseud. de François-Marie Arouet

RESUMO

A fibrose pulmonar é uma patologia crônica e fibroproliferativa caracterizada pela deposição exacerbada de matriz extracelular (MEC), na qual as células epiteliais submetidas ao processo de transdiferenciação epitelial-mesenquimal (TEM) tem papel relevante para o processo fibrogênico. Durante a TEM, as células epiteliais perdem suas características fenotípicas originais e adquirem propriedades mesenquimais, como maior motilidade e produção excessiva de MEC. Estudos prévios indicam que o cinamato de metila (CM) possui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, entretanto, seus efeitos antifibróticos ainda não foram investigados. Neste estudo, avaliamos os efeitos do CM em células de epitélio alveolar humano induzidas a passar por TEM após estimulação com TGF- β 1. Células da linhagem epitelial humana A549 foram expostas ao CM e tiveram a viabilidade celular avaliada por meio do ensaio MTT. Nossos resultados demonstraram que o CM não apresentou citotoxicidade nas concentrações analisadas. A TEM foi confirmada após 24 horas de estímulo com TGF- β 1, evidenciada por alterações morfológicas distintas e aumento na expressão de marcadores mesenquimais, como a vimentina. Contudo, o tratamento com CM resultou em uma redução significativa na expressão desse marcador. Adicionalmente, o ensaio de migração celular revelou que o CM inibiu o aumento na taxa de migração das células mesenquimais induzidas por TGF- β 1. Esses achados indicam que o cinamato de metila pode ser útil como agente modulador dos processos celulares associados à fibrose, indicando sua possível aplicação no controle da progressão dessa patologia.

Palavras-chave: fibrose; cinamato de metila; transição epitelial-mesenquimal; epitélio.

ABSTRACT

Pulmonary fibrosis is a chronic, fibroproliferative pathology characterised by the exacerbated deposition of extracellular matrix (ECM), in which epithelial cells undergoing the process of epithelial-mesenchymal transdifferentiation (EMT) play a relevant role in the fibrogenic process. During EMT, epithelial cells lose their original phenotypic characteristics and acquire mesenchymal properties, such as greater motility and excessive production of ECM. Previous studies indicate that methyl cinnamate (MC) has antioxidant and anti-inflammatory properties; however, its antifibrotic effects have not yet been investigated. In this study, we evaluated the effects of CM on human alveolar epithelial cells induced to undergo EMT after stimulation with TGF- β 1. Human epithelial A549 cells were exposed to CM and had their cell viability assessed using the MTT assay. Our results showed that CM was not cytotoxic at the concentrations analysed. EMT was confirmed after 24 hours of stimulation with TGF- β 1, evidenced by distinct morphological changes and increased expression of mesenchymal markers such as vimentin. However, treatment with CM resulted in a significant reduction in the expression of this marker. Additionally, the cell migration assay revealed that CM inhibited the increase in the migration rate of mesenchymal cells induced by TGF- β 1. These findings indicate that methyl cinnamate may be useful as a modulating agent for the cellular processes associated with fibrosis, indicating its possible application in controlling the progression of this pathology.

Keywords: fibrosis; methyl cinnamate; epithelial-mesenchymal transition; epithelium.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS E OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3. REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1 CÉLULAS EPITELIAIS	13
3.2 TRANSIÇÃO EPITELIAL MESENQUIMAL.....	14
3.3 FIBROSE PULMONAR.....	15
3.4 PRODUTOS NATURAIS	17
3.5 CINAMATO DE METILA.....	18
4. METODOLOGIA	19
4.1 CULTIVO CELULAR.....	19
4.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	19
4.3 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR.....	19
4.4 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR.....	19
4.5 AVALIAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS A TRANSIÇÃO EPITELIAL-MESENQUIMAL	20
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	21
5. RESULTADOS	22
5.1 EFEITO DO CINAMATO DE METILA SOBRE A VIABILIDADE CELULAR ..22	
5.2 EFEITO DO CINAMATO DE METILA SOBRE A MORFOLOGIA CELULAR23	
5.3 EFEITO DO CINAMATO DE METILA SOBRE A MIGRAÇÃO	26
5.4 EFEITO DO CINAMATO DE METILA SOBRE A EXPRESSÃO DE VIMENTINA.....	28
6. DISCUSSÃO.....	30
7. CONCLUSÃO	34
8. REFERÊNCIAS	35

1. INTRODUÇÃO

A fibrose pulmonar é uma doença fibroproliferativa crônica caracterizada pela inflamação persistente e deposição excessiva de matriz extracelular (MEC), resultando em danos estruturais no tecido pulmonar (Park et al., 2019). Até o momento, não existe uma terapia eficaz disponível capaz de reverter os danos causados por essa patologia. Estima-se que o tempo médio de sobrevivência dos pacientes diagnosticados com fibrose pulmonar seja de aproximadamente três anos (Bang et al., 2019). Essa condição leva ao enrijecimento do pulmão, diminuindo sua elasticidade e comprometendo a capacidade de realizar trocas gasosas adequadas. A fibrose pulmonar faz parte de um grupo de doenças respiratórias crônicas (DRCs), que inclui também a fibrose pulmonar idiopática, a asma e a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) que são responsáveis por 5% das mortes mundiais. (OMS, 2024).

Durante a progressão da fibrose pulmonar, fibroblastos e miofibroblastos, frequentemente derivados de células epiteliais que passaram pelo processo de transição epitelial-mesenquimal (TEM), desempenham um papel central na secreção de componentes da MEC (Marconi et al., 2021). Sabe-se que células epiteliais pulmonares do tipo II, sob condições de estresse, podem se diferenciar em células com características proliferativas e migratórias aprimoradas. Essas células, além de sintetizarem MEC de maneira exacerbada, elas perdem gradualmente suas características epiteliais, como formato poliédrico, contato célula-célula e expressão de proteínas epiteliais (Lamouille; Xu; Derynck, 2014).

A transição epitelial-mesenquimal é um processo fisiológico importante para a cicatrização e o desenvolvimento embrionário, mas, em condições patológicas, ocorre de forma desregulada, levando ao acúmulo excessivo de MEC devido à proliferação anormal de células mesenquimais (Ma et al., 2021; WU et al., 2021). Diversos fatores podem desencadear a TEM, com destaque para o estresse oxidativo e a inflamação crônica. Na literatura, é amplamente descrito que a citocina pró-inflamatória TGF- β 1 (fator de crescimento transformador-beta 1) atua como um dos principais indutores da TEM, através da ativação da via de sinalização Smad 2/3. O entendimento detalhado dessa via em condições patológicas associadas à fibrose suscita interesse na busca

por compostos capazes de inibir ou reverter os processos fibróticos relacionados a esse mecanismo (Lamouille; Xu; Derynck, 2014; Ma et al., 2021).

Nesse contexto, o cinamato de metila, um éster metílico derivado do ácido hidroxicinâmico, se destaca por suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (E et al., 2023; Gui et al., 2018). No entanto, seus efeitos antifibróticos ainda não foram completamente explorados, o que gera uma oportunidade para a investigação de suas potenciais ações nesse contexto. Assim, este estudo teve como objetivo caracterizar os efeitos do cinamato de metila nos eventos celulares relacionados à ativação de células epiteliais induzida por TGF- β 1 in vitro, com foco nos processos envolvidos na fibrose.

2. OBJETIVOS: GERAL E ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos do cinamato de metila sobre a função de células epiteliais induzidas por TGF- β 1 ao processo de transição epitelial-mesenquimal *in vitro*.

Avaliando de forma específica:

1. A citotoxicidade do cinamato de metila sobre células epiteliais.
2. O efeito do cinamato de metila sobre as modificações morfológicas na transição epitelial-mesenquimal em células epiteliais.
3. O efeito do cinamato de metila sobre as alterações migratórias relacionadas a transição epitelial-mesenquimal em células epiteliais
4. A interferência do cinamato de metila sobre a expressão de marcadores moleculares (vimentina) associados à transição epitelial-mesenquimal.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 CÉLULAS EPITELIAIS

As células do epitélio formam uma camada mais superficial dos tecidos que compõe a pele do corpo, possuem características morfológicas como justapostas e com contato célula-célula. Além disso, células do epitélio atuam como uma barreira formando uma linha de defesa contra o ambiente externo, e são mantidas por células tronco, acionadas por cascatas de sinalizações que equilibram a sua autorrenovação (Larsen; Cowley; Fuchs, 2020). As células epiteliais são sensíveis a perturbações no microambiente, tendo a capacidade de iniciar respostas inflamatórias, secretando proteínas sinalizadoras que estimulam a migração e proliferação de outros tipos celulares, como os fibroblastos (Debnath et al., 2022).

A natureza do epitélio alveolar se diferencia conforme a região da via aérea. Nas cavidades nasais, faringe e laringe há maior ocorrência do epitélio colunar pseudoestratificado. Na região mais inferior da traqueia e nos brônquios o epitélio colunar pseudoestratificado é transformado em células cuboidais formando um epitélio alveolar de camada única. O epitélio alveolar é formado por dois tipos de células: células epiteliais alveolares do tipo I (AT1), que possuem um formato plano e realizam as trocas gasosas, e células epiteliais alveolares do tipo II (AT2), que são progenitoras das células epiteliais alveolares do tipo I (Jakwerth et al., 2022).

As células do epitélio são a primeira barreira de defesa ao ambiente externo, conseguindo identificar perturbações no microambiente e sinalizar reforços. No entanto, na literatura é demonstrado que elas também podem estar atuando como efetoras da inflamação participando também na resposta imune inata. (Larsen; Cowley; Fuchs, 2020; Whitsett; Alenghat, 2015). Para a formação de uma barreira de proteção, é característico das células epiteliais uma riqueza de proteínas de junções. Sendo a E-caderina uma junção aderente essencial associada ao fenótipo epitelial. Além disso, há a presença da família de proteínas adaptadoras, zonula occludens, ZO-1, ZO-2, ZO-3 que estão localizadas na superfície citoplasmática das TJs (tight junctions); outras proteínas integrais de membrana como a família das claudinas; e proteínas associadas às TJs como é o exemplo da ocludina (Karetnikova et al., 2023; Van Itallie & Anderson, 2014).

3.2 TRANSIÇÃO EPITELIAL MESENQUIMAL

Em microambientes de lesão, células indiferenciadas iniciam suas diferenciações, enquanto células epiteliais se proliferam e ativam fibroblastos com sua secreção de citocinas. Ademais, as células epiteliais ainda podem passar por um processo de diferenciação para miofibroblastos, um tipo celular capaz de secretar matriz e colaborar em um reparo tecidual mais eficiente (Kendall; Feghali-Bostwick, 2014). Para que essa diferenciação para miofibroblastos ocorra, a célula epitelial necessita passar pelo processo de transição epitelial-mesenquimal (TEM), podendo ocorrer de maneira parcial ou completa. Quando a transição ocorre de maneira incompleta, as células são diferenciadas em células epiteliais fibroblásticas, no entanto, quando a diferenciação ocorre de forma completa as células epiteliais são diferenciadas em miofibroblastos (Hao; Baker; Ten Dijke, 2019; Li et al., 2016).

As células que passam pelo processo de transição epitelial-mesenquimal exibem características para além das células epiteliais não diferenciadas. Como exemplo, uma alta capacidade migratória, proliferativa e invasiva. Células epiteliais podem passar por transdiferenciação em condições de desenvolvimento, por exemplo em estágios embrionários, ou em condições patológicas, haja vista casos de fibrose tecidual e câncer (Moustakas; Heldin, 2016). Nesse sentido, a transição epitelial mesenquimal pode ficar subdivida em 3 tipos: TEM tipo 1 que ocorre em estágios embrionários; TEM tipo 2 que ocorre no contexto da regeneração e reparo tecidual; e TEM tipo 3 que é recorrente em tumores metastáticos (Li et al., 2016).

No processo de transição epitelial mesenquimal completo células epiteliais que possuem marcadores associados ao fenótipo epitelial como a proteínas de junção estreitas (tjs), queratinas, e-caderina, ocludina, ZO-2 tem seus níveis reduzidos (Karetnikova et al., 2023). Esses marcadores após processo de transição são reduzidos paulatinamente, enquanto proteínas relacionadas ao fenótipo mesenquimal como: vimentina, α -SMA, n-caderina, snail, slug, passam por uma superexpressão (Bang et al., 2019; Hao; Baker; Ten Dijke, 2019; Manfioletti; Fedele, 2023).

Diversos fatores podem induzir a transição epitelial-mesenquimal, estudos recentes apontam para que um forte indutor da TEM seriam as NETs (armadilhas extracelulares de neutrófilos), que estimulam a liberação citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento que induzem a transição (Manfioletti; Fedele, 2023). Além

disso, uma citocina amplamente relatada na literatura e que está relacionada ao processo de transição epitelial-mesenquimal é o TGF- β . O TGF- β é uma molécula que pode induzir uma cascata de sinalização através da via de SMAD2/3 ou vias não canônicas e provocar alterações morfológicas e funcionais nas células epiteliais. (Ji et al., 2016; Kyung et al., 2018). Também o TGF- β é amplamente utilizado como modelo de indução da transição epitelial-mesenquimal, tendo seus níveis aumentados em doenças fibroproliferativas como fibrose. Assim, nesse trabalho utilizamos essa citocina para nosso modelo experimental.

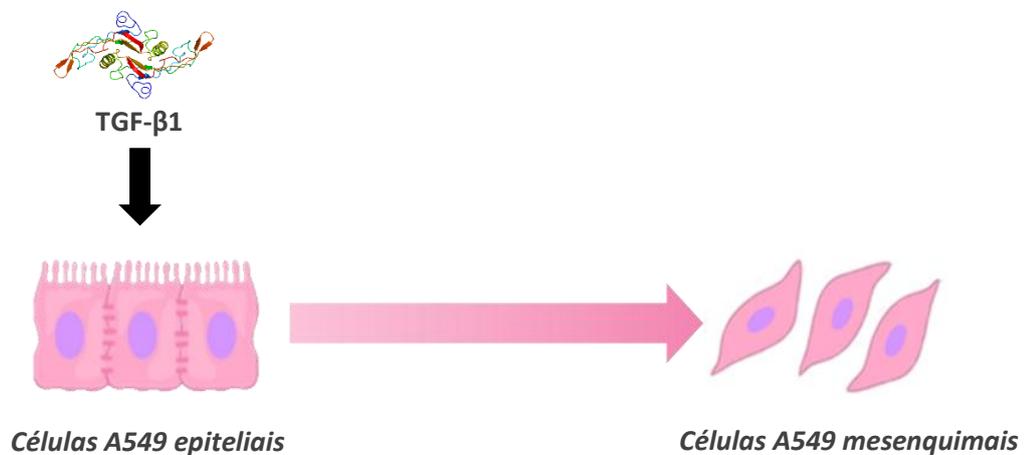


Figura 1. Modelo de indução da transição epitelial-mesenquimal com TGF- β . Fonte: autor (2024).

3.3 FIBROSE PULMONAR

Dentre as doenças respiratórias crônicas, a fibrose pulmonar demonstra um destaque pela sua agressividade. Segundo Cui et al., (2019) o tempo de sobrevivência de pacientes com fibrose é de aproximadamente 3 a 5 anos (apud Dong, *et al.*, 2019). O tabagismo é um hábito digno de atenção quando o assunto é doenças respiratórias, o dano gerado pela fumaça do cigarro pode ser bastante nocivo a longo prazo, gerando uma lesão no microambiente e a ativação de cascatas de sinalização e inflamação (Zhang et al., 2021). Em doenças fibroproliferativas os fibroblastos são ativados se diferenciando em miofibroblastos e células epiteliais passam pelo

processo de transdiferenciação para miofibroblastos (Moustakas; Heldin, 2016; Penke; Peters-Golden, 2019).

De acordo com Penke, Peters-Golden (2019) a fibrose patológica pode acometer diversos órgãos, sendo reconhecida como distúrbio fibrótico ou fibroproliferativo. Dessa forma, o distúrbio pode também ser provocado pelo ataque de células imunes às células epiteliais. Assim, a resposta para esse dano provocado em células epiteliais gera desregulações nas vias metabólicas e resulta em estresse e na ativação de outras células como fibroblastos.

A fibrose pulmonar idiopática (FPI) é uma das formas mais comuns e graves da doença, associada a alta taxa de mortalidade e uma resposta limitada aos tratamentos convencionais. A FPI está associada à ativação recorrente de fibroblastos e miofibroblastos, mediada por fatores de crescimento como TGF- β , que desempenha um papel fundamental na indução das alterações no tecido alveolar. Outro estudo relevante de Otoupalova et al., 2020 sugere que o estresse oxidativo e a ativação do sistema imunológico, especialmente por macrófagos alveolares, também contribuem para o desenvolvimento e progressão da fibrose. Eles produzem mediadores inflamatórios e citocinas fibrogênicas, que perpetuam o ciclo de lesão tecidual e reparo inadequado, levando à fibrogênese.

Diversos estudos apontam para o papel da transição epitelial-mesenquimal (TEM) na fibrose pulmonar, onde as células epiteliais alveolares sofrem transdiferenciação em miofibroblastos. Estes trabalhos destacam a importância da EMT como um dos mecanismos centrais na remodelação tecidual na fibrose pulmonar, reforçando o papel da sinalização TGF- β no processo fibrogênico pois permite a transformação de células epitelial em células mesenquimais, o que leva a uma reorganização do tecido pulmonar pela produção exacerbada de matriz extracelular e colágeno que contribui para a formação do tecido conjuntivo fibroso (Debnath et al., 2022; Salton; Volpe; Confalonieri, 2019).

A fibrose pulmonar é uma doença de difícil manejo terapêutico, principalmente devido à limitação dos tratamentos disponíveis. Embora a pirfenidona e o nintedanibe sejam os principais medicamentos aprovados para retardar a progressão da doença, ambos apresentam problemas significativos, como efeitos colaterais hepáticos, além de respostas terapêuticas limitadas (Aimo et al., 2022; Kyung et al., 2018; Tepede;

Yogaratnam, 2019). Esses fatores dificultam o controle da fibrose e a melhora da qualidade de vida dos pacientes. Diante disso, tem-se investigado novas alternativas, como o uso de produtos naturais. O cinamato de metila, foco deste trabalho, surge como uma promissora abordagem terapêutica devido às suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, o que pode oferecer uma via menos citotóxica e mais eficaz para o tratamento da fibrose pulmonar.

3.4 PRODUTOS NATURAIS

Os produtos naturais têm desempenhado um papel fundamental na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos ao longo da história da medicina, servindo como fontes valiosas de compostos bioativos utilizados na medicina tradicional e moderna. A biodiversidade presente nos ecossistemas oferece uma ampla diversidade de substâncias com potencial terapêutico com uma variedade estrutural e funcional, que possuem propriedades farmacológicas como atividades anti-inflamatórias, antimicrobianas, antioxidantes, anticancerígenas. Além disso, em outros estudos tem demonstrado eficiência no tratamento de doenças neurodegenerativas e propriedades antifibróticas (Kyung et al., 2018; Mittal et al., 2023; Prakash et al., 2012).

Além de seu uso tradicional em diversas culturas, o estudo científico de produtos naturais continua a ser uma abordagem estratégica na busca por novos agentes terapêuticos contra uma vasta gama de doenças. Várias moléculas derivadas de produtos naturais têm demonstrado uma capacidade moduladora do sistema imunológico, como ácidos graxos e polifenóis (Fernandes et al., 2023).

O estudo de produtos naturais, portanto, é essencial para a descoberta de novos fármacos, sendo que muitos medicamentos atualmente utilizados foram derivados ou inspirados por moléculas encontradas em plantas, microorganismos e outros organismos vivos. O entendimento dos mecanismos de ação e da estrutura química dessas substâncias é crucial para a exploração de seus benefícios e para o desenvolvimento de abordagens inovadoras na saúde.

3.5 CINAMATO DE METILA

Na classe dos produtos naturais o cinamato de metila é um composto amplamente encontrado em óleos essenciais de plantas, especialmente na canela (*Cinnamomum spp.*) e em outras espécies aromáticas. Pertencente à classe dos ésteres, ele possui uma estrutura simples, porém com propriedades biológicas promissoras, incluindo atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e antilipídica (Fu et al., 2024; Murakami et al., 2018; Park et al., 2020). Além de ser utilizado na indústria alimentícia e de cosméticos por seu aroma agradável, o cinamato de metila tem despertado o interesse da comunidade científica devido ao seu potencial terapêutico.

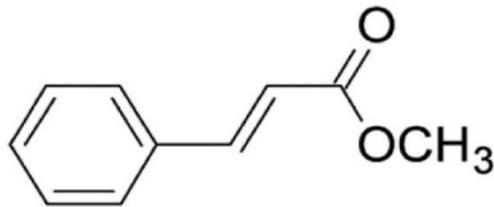


Figura 2. Fórmula molecular do cinamato de metila. Fonte: adaptado de Fu et al., 2024.

Estudos recentes têm investigado sua ação em processos celulares como atividade antilarvicida, antimicrobiana que são eficazes contra uma ampla gama de patógenos, incluindo bactérias e fungos, o que aumenta seu potencial de uso em formulações de medicamentos e produtos cosméticos. (Fujiwara et al., 2017; Huang et al., 2009). Além disso o cinamato também apresentou ser capaz de inibir a produção de mediadores inflamatórios e neutralizar os radicais livres, contribuindo para a redução do estresse oxidativo no organismo e um potencial efeito antitumoral pela inibição da tirosina quinase (Fu et al., 2024; Lima et al., 2014).

Essas características fazem do cinamato de metila um composto versátil (Guo et al., 2022), com aplicações que vão desde a indústria farmacêutica até o setor de cosméticos, reforçando a importância de pesquisas contínuas para explorar novas abordagens terapêuticas assim como objetivamos nesse trabalho.

4. METODOLOGIA

4.1 CULTIVO CELULAR

Células epiteliais alveolares humanas do tipo II (A549) foram semeadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), L-glutamina 4 mM, piruvato 1mM, penicilina e estreptomicina (2 µL), e mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂.

4.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

O efeito do CM sobre a viabilidade das células epiteliais foi determinado através do ensaio de MTT. Para isso, as células (10^4 células/poço) foram semeadas em microplacas de 96 poços e mantidas overnight em estufa de CO₂. Posteriormente, as células foram expostas as diferentes concentrações de cinamato de metila (CM, 0,1; 1; 3; 10 e 30 µM) e apenas meio de cultura (controle). Após 24h, foi adicionado 22,5 µL/poço de MTT ([brometo de (3- (4,5- dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio)]) a 5 mg/mL em PBS. Seguido do período de incubação por 4 h com MTT, e adicionado 150 µL de dimetilsufóxido (DMSO) para solubilizar o formazan produzido. A absorbância de cada poço foi mensurada usando um espectrofotômetro de microplacas e a densidade óptica (DO) medida a 540 nm.

4.3 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR

O efeito do CM sobre a transição epitelial-mesenquimal (TEM) em células epiteliais A549 foi avaliado inicialmente através da análise morfológica. Para isso, as células foram semeadas (2×10^4 células/poço) em placas de 24 poços e mantidas em estufa overnight, após 24h houve o tratamento com CM (1, 3 e 10 µM) na presença ou ausência do estímulo TGF-β1. Em seguida, após 24h do tratamento, as células foram fixadas com metanol por 10 minutos, coradas com cristal violeta e depois observadas sob microscópio invertido de contraste de fase. Fotomicrografias foram capturadas aleatoriamente e avaliadas utilizando o software ImageJ quanto as

características morfológicas circularidade, redondeza e aspecto de proporção relacionadas a TEM.

4.4 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR

O efeito do CM sobre a motilidade de células epiteliais estimuladas por TGF- β 1 foi mensurado utilizando o ensaio de migração horizontal (*scratch-wound healing assay*). Para tanto, as células (3×10^5 células/poço) foram semeadas em placas de 24 poços e mantidas overnight em estufa para a adesão celular e formação de uma monocamada com aproximadamente 80% de confluência. Após este período, foi realizado um risco linear na monocamada de células, utilizando uma ponteira de 200 μ L (p200). Os poços tiveram o meio desprezado e as células lavadas com PBS, tratadas com CM (1, 3 e 10 μ M) e apenas meio de cultura (controle), na presença e ausência do estímulo com TGF- β 1. A migração celular foi avaliada mediante a análise das fotomicrografias nos tempos 0 e 24 horas após o risco, utilizando o software ImageJ, de modo que foi determinada quantitativamente a porcentagem de fechamento da área inicial formada.

4.5 AVALIAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS A TRANSIÇÃO EPITELIAL-MESENQUIMAL

Para a confirmação da TEM foi avaliada a presença da proteína vimentina (marcador mesenquimal), por imunofluorescência indireta. Para isso, as células A549 foram cultivadas em lamínulas de vidro (2×10^4 células/poço) e tratadas como indicado por 24 h. Após o tratamento, as células foram fixadas com metanol por 10 min, seguida de permeabilização com triton X-100 a 0,5%. As ligações inespecíficas foram bloqueadas com gelatina de peixe a 0,5% por 30 minutos e incubadas a 4°C overnight com o anticorpo primário (1:100) anti-vimentina. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas com o anticorpo secundário por 1 h. As fotomicrografias foram adquiridas por microscopia de fluorescência (Nikon DS-Ri1).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados serão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente com o a análise de variância (ANOVA) one-way seguida de pósteste 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 5.

5. RESULTADOS

5.1 Efeito do cinamato de metila sobre a viabilidade celular

Primeiramente, foi realizado o ensaio de viabilidade celular mensurado pelo método MTT após 24 horas. Como é possível perceber na Figura 3 o cinamato não apresentou efeitos citotóxicos nas células epiteliais A549 nas concentrações de 0,1, 1, 3, 10 e 30 μM .

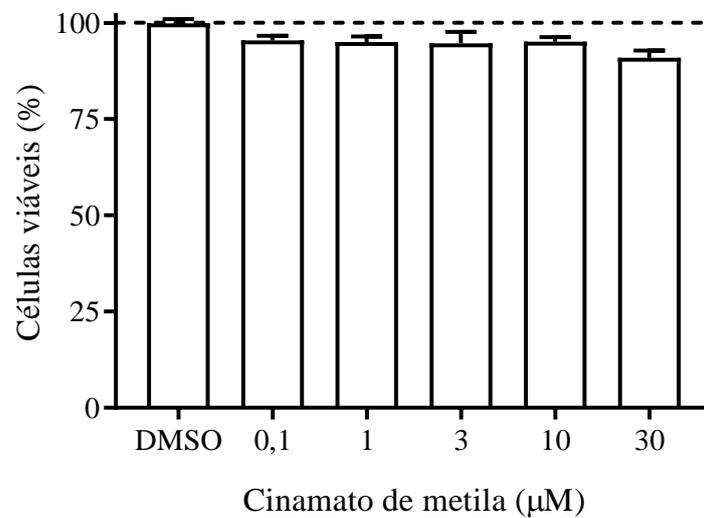


Figura 3. Cinamato de metila não altera a viabilidade em células A549. Células foram expostas a diferentes concentrações de cinamato de metila por 24 h. As barras representam média \pm erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes realizados em triplicatas. A linha tracejada representa células tratadas com meio de cultura (grupo controle). Como veículo foi usado o DMSO.

5.2 Efeito do cinamato de metila sobre a morfologia celular

No ensaio de morfologia foi realizado o tratamento com o CM nas concentrações 1 e 10 μM na presença do estímulo TGF- β 1 sobre as células A549 na tentativa de conter a ação indutora da TEM. Após o tratamento as células foram coradas com cristal violeta e observada em microscópio invertido. Dessa forma, foi possível observar que o CM reduziu mudanças morfológicas provocadas pelo TGF- β 1 nos parâmetros de redondeza (B) e aspecto de proporção (C) na concentração de 1 μM . No entanto, não demonstrou diferença estatística em relação ao grupo TGF- β 1 no parâmetro circularidade (A). Entretanto, na concentração de 10 μM todos os parâmetros morfométricos foram reduzidos de forma expressiva em relação ao grupo estimulado. Figura 5. Ademais, também foi avaliado as alterações morfológicas no citoesqueleto provocadas pelo TGF- β 1. Para isso, foi utilizado o ensaio de imunofluorescência com faloidina para a avaliação dos filamentos de f-actina.

Na Figura 5 pode ser visualizado as alterações geradas pelo TGF- β 1: (1) como a perda da polaridade apical-basal, (2) perda do contato célula-célula, (3) acompanhado do estreitamento do seu citoesqueleto. Além disso, após o tratamento com o cinamato de metila o padrão epitelial semelhante ao controle é retomado.

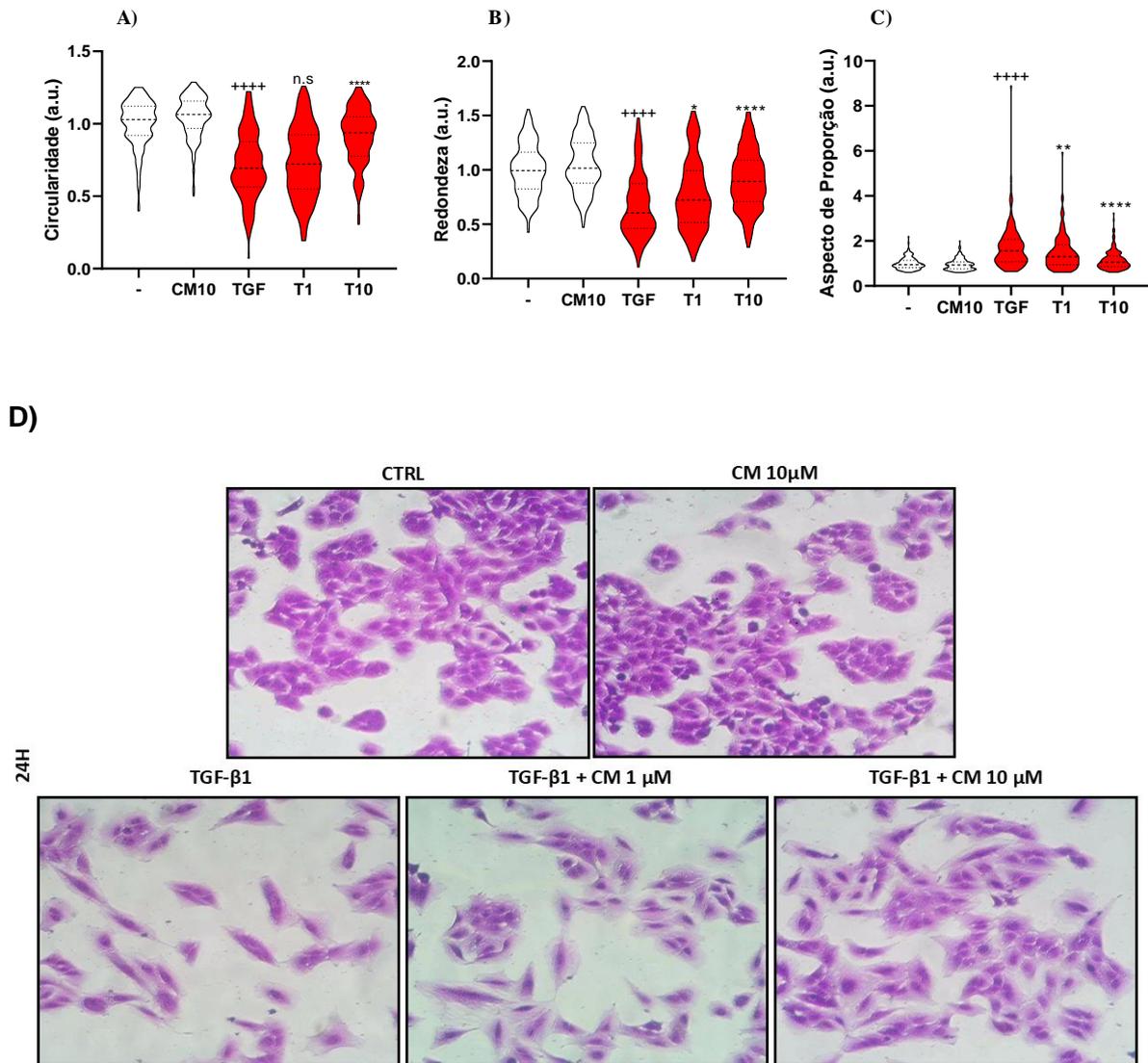


Figura 4. Os gráficos ilustram os parâmetros morfométricos avaliados. Circularidade (A), Roundoneza (B) e Aspecto de proporção (C). As análises morfométricas foram feitas utilizando o software ImageJ. Grupo T1 refere-se à abreviação do grupo TGF-β1 + CM 1 e T10 ao grupo TGF-β1 + CM 10. Valores representam a média ± E.P.M. (++++) $P < 0,0001$ em comparação com as células mantidas unicamente com meio de cultura. (*) $P < 0,05$, (****) $P < 0,0001$ em relação as células estimuladas com TGF-β1. (D) Painel com fotomicrografias das células após 24 horas de tratamento.

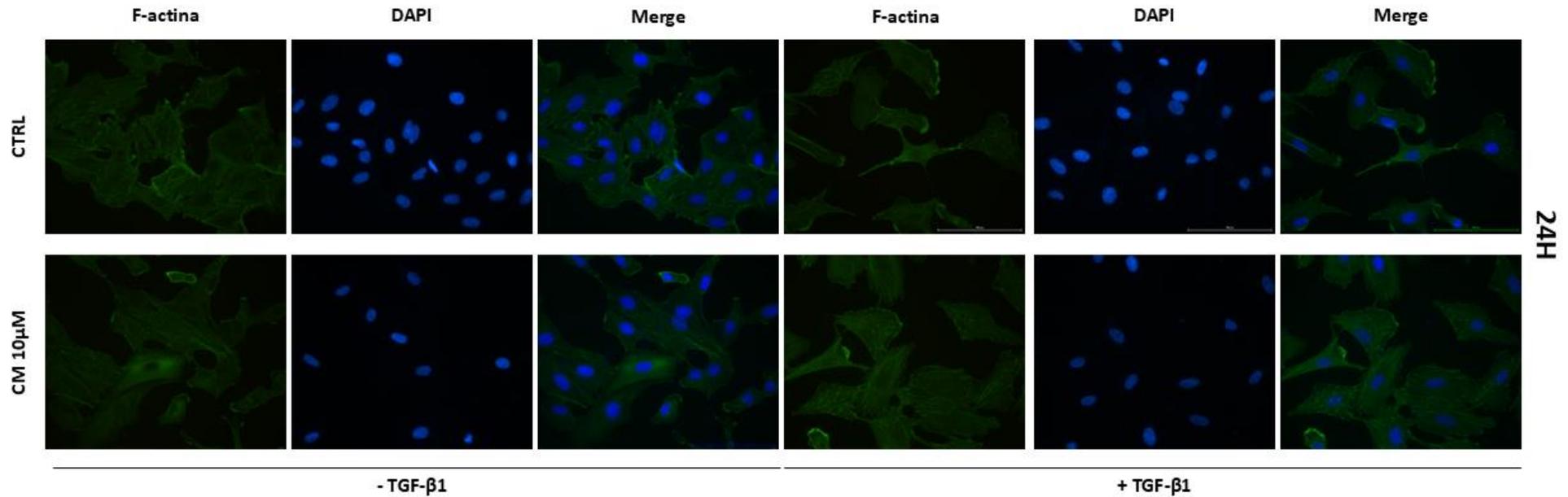


Figura 5. Cinamato de metila atenua mudanças no citoesqueleto de actina provocadas pelo TGF-β1 em células A549. Morfologia de células A549 24 h após exposição ao cinamato de metila e estímulo com TGF-β1. Fotomicrografias foram obtidas após 24 h com auxílio do microscópio de fluorescência (Nikon DS-Ri1), as imagens da parte superior apresentam os grupos sem o tratamento com cinamato de metila, estímulo TGF- β1.

5.3 Efeito do cinamato de metila sobre a migração

Para avaliar a taxa migratória das células epiteliais após o processo de transdiferenciação para mesenquimal, foi realizado o ensaio de migração horizontal. Esse ensaio mostrou que os grupos estimulados com TGF- β 1 (10 ng/mL) apresentaram um aumento significativo de aproximadamente 164% na migração em comparação ao grupo controle. Além disso, o tratamento com cinamato de metila na concentração de 10 μ M conseguiu reduzir a migração de células A549 estimuladas por TGF- β 1 em cerca de 68%, atingindo valores próximos ao grupo controle (tratado apenas com meio de cultura) (Figuras 6 A e B).

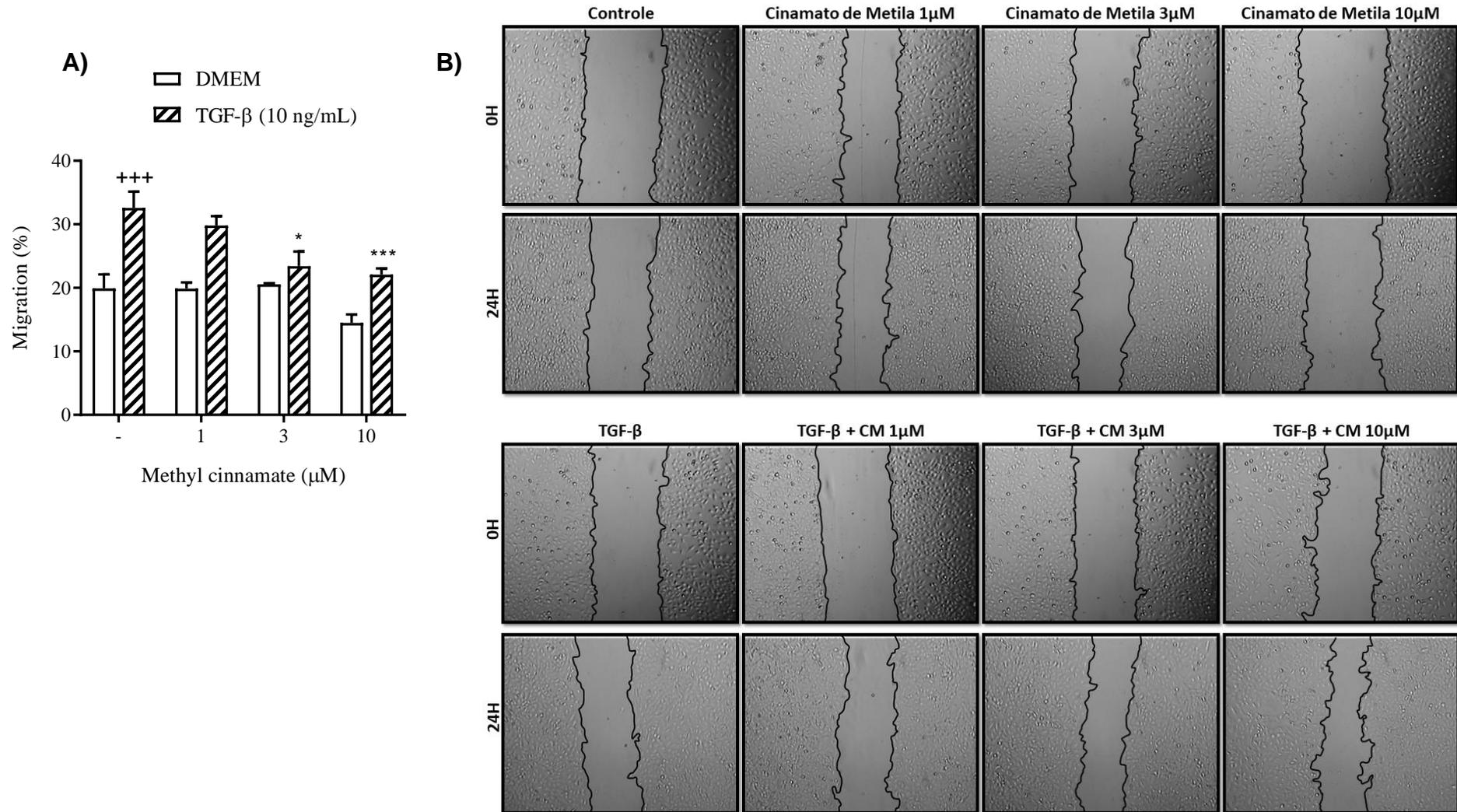


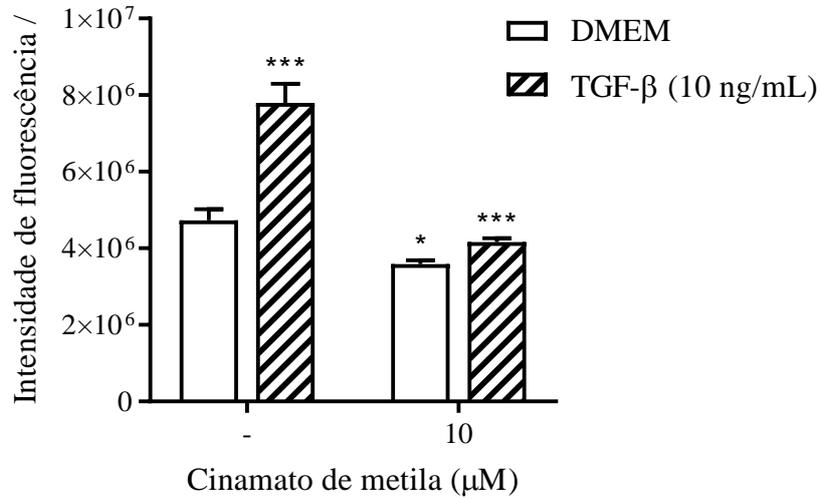
Figura 6. (A) Representação gráfica do efeito do cinamato de metila na presença e ausência do TGF-β1 por 24 horas. O CM reduz a migração de células A549 estimuladas com TGF-β1 de forma significativa. Painel com as fotomicrografias representativas da migração das células nos tempos de 0 e 24 horas após o risco (gap) e tratamento. A análise da taxa de migração utilizou o software ImageJ. (B). As barras representam média ± erro padrão da média (EPM). Os resultados foram submetidos à análise estatística One Way ANOVA utilizando-se o pós-teste de Bonferroni, onde (+++) significa $p < 0,001$ quando comparado ao respectivo grupo controle (sem estímulo) e (**) significa $p < 0,01$ quando comparado o grupo TGF-β1 tratado com meio (DMEM).

5.4 Efeito do cinamato de metila sobre a expressão de vimentina

A literatura demonstra que células epiteliais quando estimuladas por TGF- β 1 adquirem um fenótipo mais mesenquimal, onde a proteína vimentina é expressa em maiores quantidades. Então, para avaliar essa expressão, utilizou-se a técnica de imunofluorescência indireta. As células foram fixadas com metanol por 10 minutos, os sítios inespecíficos foram bloqueados com gelatina de peixe a 0,5% e incubadas com anticorpo monoclonal anti-vimentina por 12 horas. Após 24 horas de estímulo com TGF- β 1 (10 ng/ml), as células A549 exibiram um aumento na quantidade de vimentina, como evidenciado na Figura 7A.

Os resultados quantitativos da análise de imunofluorescência mostraram que as células tratadas com TGF- β 1 exibiram uma fluorescência significativamente mais intensa em comparação com as células dos grupos controle e tratadas com cinamato de metila. O tratamento com cinamato de metila reverteu o fenótipo mesenquimal para epitelial, reduzindo a expressão de vimentina em 53% nas células A549. Essa diminuição foi estatisticamente significativa, com uma redução clara na intensidade da fluorescência em relação ao grupo tratado apenas com TGF- β 1 (Figura 7B).

A)



B)

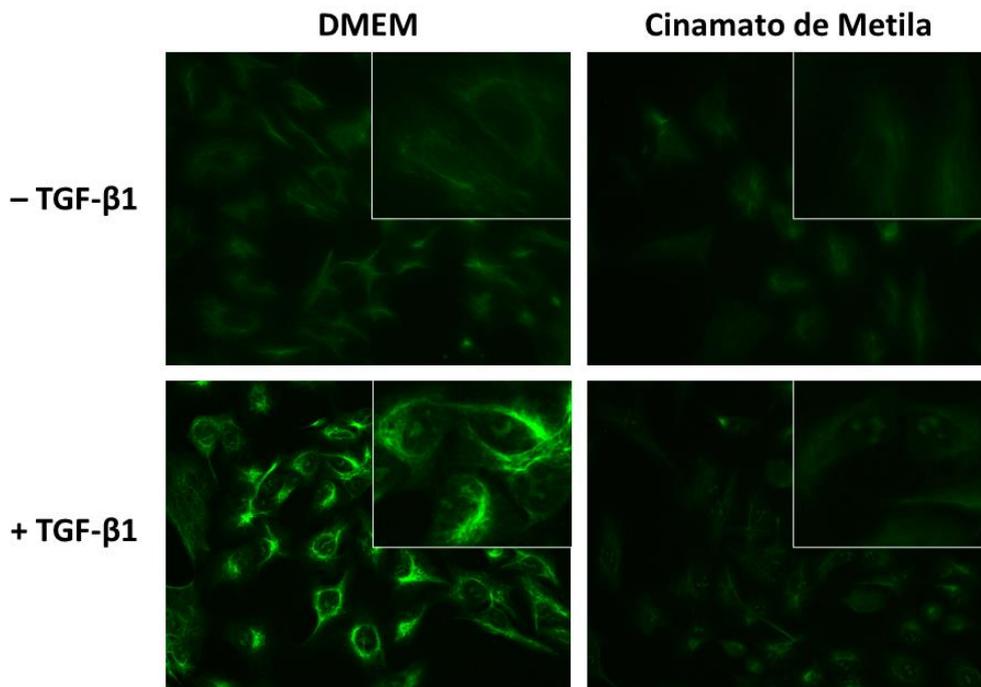


Figura 7. (A) Cinamato de metila reduz a expressão de vimentina em células A549 estimuladas com TGF- β 1 de forma significativa. As células foram expostas ao meio de cultura (DMEM) ou estímulo com a concentração de 10 μ M de cinamato de metila por 24 h. (B) Painel com as fotomicrografias de fluorescência. O cinamato de metila reduz a produção de vimentina de células A549 na presença e na ausência do estímulo TGF- β 1. As fotomicrografias foram adquiridas por microscopia de fluorescência (Nikon DS-Ri1). Insertos na região direita com aumento de 40x.

6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo corroboram com outros achados da literatura que apontam para o potencial terapêutico do cinamato de metila em diversos contextos biológicos. A ausência de citotoxicidade nas concentrações testadas (0,1, 1, 3, 10 e 30 μM) em células epiteliais A549 (Figura 3) é um dado promissor, uma vez que muitos compostos bioativos naturais, apesar de seus efeitos benéficos, podem apresentar toxicidade celular em concentrações mais altas, limitando seu uso terapêutico. Trabalhos anteriores, como o de Fu et al., 2024, demonstraram que o cinamato de metila possui baixa toxicidade em outros tipos celulares, testando diferentes concentrações de 12,5 μM até 800 μM , onde o CM não demonstrou alterar a viabilidade de células hepáticas. Também, no trabalho de Chen et al., 2012 o CM não demonstrou citotoxicidade em linhagens de fibroblastos, o que reforça seu perfil de segurança e amplia suas aplicações potenciais.

Além disso, a capacidade do cinamato de metila de atenuar alterações morfológicas e reduzir a migração celular na concentração de 10 μM vai ao encontro de estudos que investigam compostos naturais com propriedades antimigratórias. Durante a transição epitelial-mesenquimal as células que são induzidas pelo TGF- β a realizar a transição apresentam um aumento considerável da sua capacidade migratória. Portanto, moléculas capazes de apresentar um potencial antimigratório se destacam por demonstrar além da característica antitumoral, também uma característica antifibrótica. No trabalho de (Luo et al., 2018), foi utilizado um produto natural isolado chamado Toosendanin sobre células A549 induzidas por TGF- β 1 à transição epitelial-mesenquimal. O composto interferiu na TEM, inibindo o aumento da migração provocada pelo TGF- β 1 através da possível inibição das vias de sinalização ERK1/2 e Snail.

Em outros estudos, Park e colaboradores (2020) demonstraram que o cinamato de metila pode inibir a migração celular em linhagens tumorais de osteoblastos, o que sugere que o cinamato de metila pode compartilhar mecanismos de ação semelhantes, possivelmente através da modulação de vias de sinalização envolvidas na mobilidade celular que merecem atenção nesse contexto, como a via Smad 2/3 e NF- κB . Em nossos resultados, vimos que o cinamato de metila não apresentou diminuição estatística em relação ao grupo controle quando tratado de forma isolada.

(Figura 6) Porém, foi capaz de inibir o aumento da taxa migratória induzida pelo TGF- β a partir da concentração de 10 μ M, o que vai de acordo com a literatura.

A capacidade do cinamato de metila em conter as alterações morfológicas do citoesqueleto de F-actina também é um achado importante, uma vez que a reorganização do citoesqueleto é um processo crucial para a migração e invasão celular. A F-actina é uma proteína essencial na manutenção da estrutura celular, e sua desestabilização está frequentemente associada à transição epitelial-mesenquimal, onde as células perdem sua aderência e ganham maior mobilidade. (Izdebska et al., 2018; Mondal et al., 2021). Os resultados deste estudo, mostraram que o cinamato de metila foi capaz de conter a reestruturação do citoesqueleto de F-actina provocada pelo TGF- β 1 que facilita a migração celular. Não só isso, mas pode preservar características da estrutura inicial, como o contato célula-célula e formato poliédrico característico do epitélio e que é fundamental para conter a progressão de condições patológicas associadas à TEM.

A concentração de 10 μ M foi definida para os seguintes ensaios após escolhermos a menor dose efetiva. Na análise quantitativa da morfometria (Figura 4A) foi demonstrado que as alterações dos parâmetros relacionadas a circularidade, redondeza e aspecto de proporção provocados pelo TGF- β 1 são diminuídos de forma amena no tratamento com o CM na concentração de 1 μ M. No entanto, o parâmetro de circularidade não apresentou alteração significativa em relação ao grupo TGF, dessa forma foi selecionada a contração de 10 μ M para os seguintes testes. Concentração que se demonstrou efetiva no ensaio de migração horizontal apresentando uma redução de 68% em relação ao grupo estimulado.

Estudos anteriores também revelaram que compostos derivados do ácido cinâmico, como o cinamato de metila, possuem propriedades anti-inflamatórias que podem atuar sinergicamente com sua capacidade de modulação de marcadores associados a transição epitelial-mesenquimal. Esse efeito foi demonstrado por MURAKAMI et al., 2018, que observaram a redução de mediadores inflamatórios em células tratadas com derivados do cinamato, efeito esse que pode contribuir para a atenuação de microambientes tumorais favoráveis à progressão da TEM. Outros compostos naturais com características semelhantes têm sido amplamente estudados, como a curcumina e o resveratrol, que demonstram efeitos similares na modulação da migração e invasão celular (Guo et al., 2021). Estudos como o de Bahrami et al., 2019 confirmam que a migração celular é um processo crucial no

avanço do câncer e que a curcumina, por apresentar capacidade de interferência nessa etapa, pode dificultar a disseminação de células tumorais. Assim, o fato de o cinamato de metila reduzir a migração celular posiciona-o de forma favorável entre esses agentes naturais com potencial para inibir a progressão tumoral, metástase e fibrose.

Outros trabalhos como de Aquino et al., 2021 demonstram que derivados do ácido hidroxicinâmico, incluindo o cinamato de metila, possuem efeito moduladores da ativação dos fibroblastos e com um possível mecanismo envolvendo as vias de sinalização de PKA ou p38-MAPK, vias associadas a proliferação, migração celular e regulação da resposta inflamatória. Esses dados podem contribuir para o entendimento dos derivados do ácido cinâmico como um anti-inflamatório, podendo suprimir a produção de mediadores inflamatórios, como as citocinas pró-inflamatórias. O funcionamento dessas vias de sinalização pode ser interessante para um futuro entendimento do mecanismo de ação do cinamato de metila, outros trabalhos como o de Liang et al., 2023, relata que é possível inibir a transição epitelial mesenquimal a partir da restrição da via de sinalização p38/STAT3.

Outro achado relevante em nossos resultados foi a redução do conteúdo de vimentina, uma proteína conhecida por ser um marcador chave na plasticidade celular do fenótipo mesenquimal, associada ao aumento da motilidade e invasividade celular nas células A549. No contexto da transição epitelial mesenquimal os níveis de vimentina em células epiteliais são regulados positivamente após o estímulo com TGF- β (Satelli; Li, 2011). Em nossos resultados a diminuição da vimentina observada nas células A549 tratadas com 10 μ M de cinamato de metila (Figura 7) sugere que o composto pode interferir na plasticidade celular e inibir processos relacionados à transição epitelial-mesenquimal, o que é corroborado por estudos que associam a inibição da vimentina com a supressão da TEM. Por exemplo, o trabalho de Dong et al., 2016 demonstrou que a redução dos níveis de vimentina está diretamente ligada a contenção da transição epitelial-mesenquimal e à supressão das vias de sinalização JAK/STAT e TGF- β 1/Smad em células A549. Esse é um dado interessante porque reforça a relevância do cinamato de metila como possível modulador dessas vias.

Na expertise da mecanística molecular, o cinamato de metila demonstrou ter efetividade na via de sinalização de MAPK/ERK evitando a colite em camundongos, além disso mostrou-se ser capaz de reduzir p38, e JNK (E et al., 2023). Como a principal via de sinalização canônica relacionada ao TGF é a via de TGF-B/SMAD, um

possível mecanismo de ação do cinamato de metila seria a interferência dele sobre a cascata de sinalização, onde cinamato poderia interferir com o receptor TGF- β R, impedindo a ativação de Smad2 e Smad3 e conseqüentemente a formação do complexo Smad2/3-Smad4. Outro possível mecanismo seria sobre a sinalização vias não canônicas do TGF-B, como sustentado na literatura. Vias de sinalização como p38 MAPK, ERK, JNK, Pi3K/AKT, Rho/ROCK e NF-kB são alvos interessantes para investigação a fim de desvendar os mecanismos moleculares do cinamato de metila. (Dong et al., 2016; Ji et al., 2016; Kyung et al., 2018; Zhao et al., 2015). No trabalho de Yao et al., 2021 já foi demonstrado que o ácido cinâmico tem a capacidade de interferir na sinalização da via do NF-kB impedindo a transcrição de determinados genes.

Outros dados também relevantes para o entendimento do funcionamento do cinamato de metila na modulação da transição epitelial-mesenquimal (EMT) pode ser sua possível relação ao estresse de retículo endoplasmático (ER). O estresse de retículo está intimamente ligado à TEM, já que ele induz respostas celulares que favorecem a perda de características epiteliais e a aquisição de um fenótipo mais mesenquimal, facilitando um perfil fibrótico no tecido. Como descrito no trabalho de Burman et al., 2018 a relação entre o estresse de retículo e a fibrose pulmonar. Estudos indicam que compostos com propriedades antioxidantes e antitumorais capazes de modular o estresse de retículo, conseguem também modular a transição epitelial mesenquimal, reduzindo a ativação de vias pró-inflamatórias e apoptóticas, como JNK, p38 e Akt, que desencadeiam a EMT (Shah et al., 2017).

De acordo com Yu et al., 2023 a modulação estresse de ER induzido por cloreto de níquel em células A549 ocorre através das vias de sinalização p38 MAPK e SMAD2/3. Compostos naturais que podem evitar a ativação de fatores como CHOP, GRP78, BIP e XBP-1s, que estão envolvidos no aumento da plasticidade celular e na promoção de um fenótipo invasivo, podem ser interessantes para a contenção da TEM. Nesse sentido, é válido a investigação se cinamato de metila pode suprimir o estresse de retículo, a fim atenuar os efeitos moleculares que levam à EMT, reforçando sua importância na prevenção da progressão da fibrose e na preservação da homeostase celular.

Portanto, os resultados deste estudo, que indicam a capacidade do cinamato de metila de reduzir a migração celular e diminuir o conteúdo de vimentina em células A549, estão em concordância com a literatura existente sobre o papel de compostos

naturais na regulação de processos biológicos, como a transição epitelial-mesenquimal. Esses achados apontam para o potencial do cinamato de metila como agente terapêutico, especialmente em contextos onde o controle da migração celular para a progressão de doenças, como a fibrose pulmonar, são fundamentais. Mais estudos são necessários para esclarecer os mecanismos moleculares exatos envolvidos e confirmar esses efeitos em modelos in vitro.

7. CONCLUSÃO

Nossos resultados sobre a caracterização do cinamato de metila em células epiteliais A549 mostram que ele além de não apresentar efeito citotóxico, ele foi capaz de conter as alterações morfológicas induzidas pelo TGF- β 1 para um padrão mesenquimal. Além disso, é possível observar o efeito inibitório do CM sobre a capacidade migratória de células estimuladas por TGF- β 1. Também, ao observar os níveis de vimentina - marcador conhecidamente mesenquimal - expresso nas células A549 após o tratamento com o cinamato de metila é perceptível uma redução estatística, o que é um avanço para o conhecimento dos efeitos do cinamato de metila sobre sua caracterização. Embora seja um avanço, estudos futuros ainda são necessários para elucidar a compreensão sobre os mecanismos associados aos aspectos moleculares e aos efeitos do CM sobre a sinalização intracelular e outros marcadores associados ao processo de transição epitelial-mesenquimal.

REFERÊNCIAS

AIMO, A. et al. Pirfenidone for Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Beyond. **Cardiac Failure Review**, v. 8, 14 abr. 2022.

AQUINO, F. L. T. DE et al. trans-Cinnamic acid, but not p-coumaric acid or methyl cinnamate, induces fibroblast migration through PKA- and p38-MAPK signalling pathways. **Journal of Tissue Viability**, v. 30, n. 3, p. 363–371, ago. 2021.

BAHRAMI, A.; MAJEED, M.; SAHEBKAR, A. Curcumin: a potent agent to reverse epithelial-to-mesenchymal transition. **Cellular Oncology**, v. 42, n. 4, p. 405–421, 13 ago. 2019.

BANG, I. J. et al. β -Peltoboykinolic Acid from *Astilbe rubra* Attenuates TGF- β 1-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transitions in Lung Alveolar Epithelial Cells. **Molecules**, v. 24, n. 14, p. 2573, 15 jul. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro **Doenças Respiratórias Crônicas**. Brasília, 2010.

BURMAN, A.; TANJORE, H.; BLACKWELL, T. S. Endoplasmic reticulum stress in pulmonary fibrosis. **Matrix Biology**, v. 68–69, p. 355–365, ago. 2018.

CHEN, Y.-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, 1 fev. 2012.

CUI, Y. et al. β -carboline alkaloids attenuate bleomycin induced pulmonary fibrosis in mice through inhibiting NF- κ B/p65 phosphorylation and epithelial-mesenchymal transition. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 243, p. 112096, out. 2019.

DEBNATH, P. et al. Epithelial–mesenchymal transition and its transcription factors. **Bioscience Reports**, v. 42, n. 1, 28 jan. 2022.

DONG, Z. et al. IL-27 inhibits the TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells. **BMC Cell Biology**, v. 17, n. 1, p. 7, 1 dez. 2016.

E, L. et al. Methyl cinnamate protects against dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by inhibiting the MAPK signaling pathway. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 55, n. 11, p. 1806–1818, 1 nov. 2023a.

E, L. et al. Methyl cinnamate protects against dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by inhibiting the MAPK signaling pathway. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 55, n. 11, p. 1806–1818, 1 nov. 2023b.

FERNANDES, A. et al. A systematic review of natural products for skin applications: Targeting inflammation, wound healing, and photo-aging. **Phytomedicine**, v. 115, p. 154824, jul. 2023.

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**, v. Volume 17, p. 1183–1197, mar. 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, maio 2017.

GUI, Y. et al. Methyl cinnamate alleviated CCI-induced upregulation of spinal AMPA receptors and pain hypersensitivity by targeting AMPK. **European Journal of Pharmacology**, v. 833, p. 183–189, ago. 2018.

GUO, D. et al. *De Novo* Biosynthesis of Methyl Cinnamate in Engineered *Escherichia coli*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, n. 25, p. 7736–7741, 29 jun. 2022.

GUO, K. et al. Resveratrol and Its Analogs: Potent Agents to Reverse Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Tumors. **Frontiers in Oncology**, v. 11, 16 abr. 2021.

HAO, Y.; BAKER, D.; TEN DIJKE, P. TGF- β -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 11, p. 2767, 5 jun. 2019.

HUANG, Q.-S. et al. Inhibitory Effects of Methyl *trans*-Cinnamate on Mushroom Tyrosinase and Its Antimicrobial Activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 6, p. 2565–2569, 25 mar. 2009.

IZDEBSKA, M. et al. The Role of Actin Dynamics and Actin-Binding Proteins Expression in Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Its Association with Cancer Progression and Evaluation of Possible Therapeutic Targets. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1–13, 2018.

JAKWERTH, C. A. et al. Role of Respiratory Epithelial Cells in Allergic Diseases. **Cells**, v. 11, n. 9, p. 1387, 20 abr. 2022.

JI, Y. et al. Paeoniflorin suppresses TGF- β mediated epithelial-mesenchymal transition in pulmonary fibrosis through a Smad-dependent pathway. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 37, n. 6, p. 794–804, 2 jun. 2016.

KARETNIKOVA, E. S. et al. mRNA Levels of Epithelial and Mesenchymal Markers in Lung Epithelial Cell Lines. **Reports of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 12, n. 2, p. 211–219, 1 ago. 2023.

KENDALL, R. T.; FEGHALI-BOSTWICK, C. A. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, 27 maio 2014.

KYUNG, S. Y. et al. Sulforaphane attenuates pulmonary fibrosis by inhibiting the epithelial-mesenchymal transition. **BMC Pharmacology and Toxicology**, v. 19, n. 1, p. 13, 2 dez. 2018.

LAMOUILLE, S.; XU, J.; DERYNCK, R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 3, p. 178–196, 21 mar. 2014.

LARSEN, S. B.; COWLEY, C. J.; FUCHS, E. Epithelial cells: liaisons of immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 62, p. 45–53, fev. 2020.

LI, M. et al. Epithelial-mesenchymal transition: An emerging target in tissue fibrosis. **Experimental Biology and Medicine**, v. 241, n. 1, p. 1–13, 11 jan. 2016.

LIANG, D. et al. Tanshinone I attenuates gastric precancerous lesions by inhibiting epithelial mesenchymal transition through the p38/STAT3 pathway. **International Immunopharmacology**, v. 124, p. 110902, nov. 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, out. 2014.

LUO, W. et al. Toosendanin, a natural product, inhibited TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition through ERK/Snail pathway. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 10, p. 2009–2020, 28 out. 2018.

MA, M. et al. TGF- β promote epithelial-mesenchymal transition via NF- κ B/NOX4/ROS signal pathway in lung cancer cells. **Molecular Biology Reports**, v. 48, n. 3, p. 2365–2375, 1 mar. 2021.

MANFIOLETTI, G.; FEDELE, M. Epithelial–Mesenchymal Transition (EMT). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 14, p. 11386, 13 jul. 2023.

MARCONI, G. D. et al. Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT): The Type-2 EMT in Wound Healing, Tissue Regeneration and Organ Fibrosis. **Cells**, v. 10, n. 7, p. 1587, 23 jun. 2021.

MITTAL, P. et al. Natural Products-based Drugs: Potential Drug Targets Against Neurological Degeneration. **Current Neuropharmacology**, v. 21, n. 4, p. 777–786, abr. 2023.

MONDAL, C.; DI MARTINO, J. S.; BRAVO-CORDERO, J. J. Actin dynamics during tumor cell dissemination. *Em: [s.l: s.n.]*. p. 65–98.

MOUSTAKAS, A.; HELDIN, C.-H. Mechanisms of TGF β -Induced Epithelial–Mesenchymal Transition. **Journal of Clinical Medicine**, v. 5, n. 7, p. 63, 29 jun. 2016.

MURAKAMI, Y. et al. Cytotoxicity and Pro-/Anti-inflammatory Properties of Cinnamates, Acrylates and Methacrylates Against RAW264.7 Cells. **In Vivo**, v. 32, n. 6, p. 1309–1322, 22 out. 2018.

Organização Mundial da Saúde. (2024). **Chronic obstructive pulmonary disease (COPD)**. Recuperado de [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-\(copd\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-(copd))

OTOUPALOVA, E. et al. Oxidative Stress in Pulmonary Fibrosis. Em: **Comprehensive Physiology**. [s.l.] Wiley, 2020. p. 509–547.

PARK, K.-R. 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, 24 maio 2020.

PARK, Y. J. et al. Effects of β -Sitosterol from Corn Silk on TGF- β 1-Induced Epithelial–Mesenchymal Transition in Lung Alveolar Epithelial Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 35, p. 9789–9795, 4 set. 2019.

PENKE, L. R.; PETERS-GOLDEN, M. Molecular determinants of mesenchymal cell activation in fibroproliferative diseases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, n. 21, p. 4179–4201, 28 nov. 2019.

PRAKASH, B. et al. Safety assessment of *Zanthoxylum alatum* Roxb. essential oil, its antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activity and efficacy as antimicrobial in preservation of *Piper nigrum* L. fruits. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, n. 1–2, p. 183–191, fev. 2012.

SALTON, F.; VOLPE, M.; CONFALONIERI, M. Epithelial–Mesenchymal Transition in the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. **Medicina**, v. 55, n. 4, p. 83, 28 mar. 2019.

SATELLI, A.; LI, S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 18, p. 3033–3046, 3 set. 2011.

SHAH, P. P. et al. Common cytotoxic chemotherapeutics induce epithelial-mesenchymal transition (EMT) downstream of ER stress. **Oncotarget**, v. 8, n. 14, p. 22625–22639, 4 abr. 2017.

TEPEDE, A.; YOGARATNAM, D. Nintedanib for Idiopathic Pulmonary Fibrosis. **Journal of Pharmacy Practice**, v. 32, n. 2, p. 199–206, 10 abr. 2019.

VAN ITALLIE, C. M.; ANDERSON, J. M. Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 36, p. 157–165, dez. 2014.

WHITSETT, J. A.; ALENGHAT, T. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. **Nature Immunology**, v. 16, n. 1, p. 27–35, 18 jan. 2015.

WU, Q. et al. miR-138 inhibits epithelial-mesenchymal transition in silica-induced pulmonary fibrosis by regulating ZEB2. **Toxicology**, v. 461, p. 152925, set. 2021.

YAO, Q. et al. Cinnamic acid inhibits cell viability, invasion, and glycolysis in primary endometrial stromal cells by suppressing NF- κ B-induced transcription of PKM2. **Bioscience Reports**, 9 set. 2021.

YU, M. et al. Endoplasmic reticulum stress mediates nickel chloride-induced epithelial-mesenchymal transition and migration of human lung cancer A549 cells through Smad2/3 and p38 MAPK activation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 249, p. 114398, jan. 2023.

ZHANG, Y. et al. Cigarette smoke-inactivated SIRT1 promotes autophagy-dependent senescence of alveolar epithelial type 2 cells to induce pulmonary fibrosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 166, p. 116–127, abr. 2021.

ZHAO, L. et al. Benzydine induces epithelial–mesenchymal transition in human uroepithelial cells through ERK1/2 pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 459, n. 4, p. 643–649, abr. 2015.