



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**EDSON DOS SANTOS JUNIOR**

**A BIOCHANINA A POR VIA TÓPICA PROMOVE EFEITOS ANTI-  
INFLAMATÓRIOS E ANTIOXIDANTES NO EDEMA DE ORELHA EM  
CAMUNDONGOS**

**SÃO CRISTOVÃO – SE 2024**

EDSON DOS SANTOS JUNIOR

**A BIOCHANINA A POR VIA TÓPICA PROMOVE EFEITOS ANTI-  
INFLAMATÓRIOS E ANTIOXIDANTES NO EDEMA DE ORELHA EM  
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Renata Grespan

**SÃO CRISTOVÃO – SE 2024**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S237b Santos Junior, Edson dos  
A Biochanina A por via tópica promove efeitos anti-  
inflamatórios e antioxidantes no edema de orelha em  
camundongos / Edson dos Santos Junior ; orientadora Renata  
Grespan. – São Cristóvão, SE, 2024.  
54 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências Fisiológicas) –  
Universidade Federal de Sergipe, 2024.

1. Inflamação. 2. Isoflavonas. 3. Edema. 4. Produtos naturais.  
I. Grespan, Renata, orient. II. Título.

CDU 612:615

EDSON DOS SANTOS JUNIOR

**A BIOCHANINA A POR VIA TÓPICA PROMOVE EFEITOS ANTI-  
INFLAMATÓRIOS E ANTIOXIDANTES NO EDEMA DE ORELHA EM  
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Renata Grespan

---

**Orientador:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Renata Grespan

---

**Examinador 1:** Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Alan Bruno Silva Vasconcelos

---

**Examinador 2:** Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Franciel Batista Felix

**“Eu sou mais forte do que eu.”**

**Clarice Lispector**

## AGRADECIMENTOS

Iniciarei agradecendo a mim, pela coragem e perseverança, por nunca pensar em desistir, e que nas minhas condições tentei fazer o máximo que consegui, associando as muitas horas sem dormir, com as idas e vindas para a UFS. E mais uma vez me corta o coração por não ter você aqui comigo em vida, porque sei que em espírito está; Vovó consegui subir mais um degrau, que saudade da sua força.

Agradeço a todos que, pela menor contribuição dada, possibilitou que eu pudesse enxergar que as pequenas coisas fazem a diferença. Dessa maneira, mostrando para mim que a ciência não precisa ser competitiva e que todos podem agregar no trabalho e na vida um do outro, seja nas funções cotidianas ou no psicológico afetado. Sendo assim, pontuo nomes de extrema importância como: Prof<sup>o</sup>. Dr. Enilton Camargo que em uma resposta a um post de instagram, possibilitou que eu vivenciasse algo jamais visto por mim, que de forma bondosa e doce me abriu as portas da pesquisa. Agradeço também a pessoa mais maravilhosa que eu poderia encontrar e me fazer parceiro, Ana Carla Nascimento, você não tem noção da sua grandiosidade e generosidade, sou extremamente feliz de hoje poder te chamar de amiga, você é de verdade um ser de luz. Minha querida Ranya, que de uma apresentação de artigo se tornou a mais árdua parceira de experimento, obrigado por tanto, e por cada gargalhada, aqui não poderia faltar Jessica Dantas que chegou ajudando em tudo, suportando todos os meus enjos e com muita paciência passando sua experiência e a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Renata Grespan que mesmo sabendo do quão “verde” eu era, aceitou esse desafio comigo.

Deus não solta minha mão jamais e usa pessoas para me mostrar o caminho, como fez com Isabela Mayara, minha amiga, madrinha, comadre e grande incentivadora. Agradeço também ao meu esposo, de quem me fiz ausente várias vezes, devido a correria cotidiana, obrigado pela paciência e principalmente ao amor em mim depositado. Aos amigos e colegas de laboratório, as coisas são mais leves com todos, cada risada, cada desabafo, cada análise suada, cada faxina, não seria bom se vocês não estivessem lá.

## RESUMO

**A BIOCHANINA A POR VIA TÓPICA PROMOVE EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS E ANTIOXIDANTES NO EDEMA DE ORELHA DE CAMUNDONGOS**, Edson dos Santos Junior, São Cristovão/SE, 2024.

O processo inflamatório envolve uma sucessão de eventos, que acontece no tecido lesionado. Apesar de necessário, se exacerbado, o processo inflamatório pode levar a efeitos deletérios. As condições inflamatórias são tratadas com anti-inflamatórios, que podem desencadear efeitos adversos. Desse modo, os produtos naturais são alternativas para novos compostos com atividade anti-inflamatória. Nesse sentido, a Biochanina A (BCA) é uma isoflavona com efeitos anti-inflamatório e antioxidante, demonstrado em diversos modelos de doenças, contudo, nunca testado por via tópica. Com isso, o objetivo da pesquisa foi avaliar o potencial anti-inflamatório da BCA por via tópica, em modelo de inflamação cutânea aguda. Para tanto, camundongos swiss fêmeas (n=7) foram submetidas ao edema de orelha induzido por TPA (*12-O-tetradecanoilforbol acetato*), e tratados com BCA (0,1, 0,3, 1 e 3mg/orelha) ou dexametasona (DEXA). Foi avaliada a atividade anti-inflamatória através da determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO), citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e análise histopatológica. Além disso, o dano oxidativo foi avaliado pela dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a proteção antioxidante, pelos grupos sufridil (NP-SH). Foi observado que o tratamento com a BCA, na dose de 3mg/orelha, promoveu maior redução do edema dentre as doses testadas, além de reduzir MPO, concentração das citocinas avaliadas e TBARS. Ainda, aumentou os grupos NP-SH, de forma equiparada ao grupo DEXA. Na análise histológica, os grupos BCA e DEXA reduziram o edema intersticial e o infiltrado inflamatório de forma equiparada, comparados ao TPA. Dessa forma, o presente trabalho demonstrou que a BCA possui atividade anti-inflamatória e antioxidante na inflamação aguda da pele, quando administrada por via tópica.

**Palavras-chave:** Inflamação, edema, isoflavona, produtos naturais

## ABSTRACT

**TOPICAL BIOCHANIN PROMOTES ANTI-INFLAMMATORY AND ANTIOXIDANT EFFECTS IN EAR EDEMA IN MICE**, Edson dos Santos Junior, São Cristovão/SE, 2024.

The inflammatory process involves a succession of events that take place in the injured tissue. Although necessary, if exacerbated, the inflammatory process can lead to harmful effects. Inflammatory conditions are treated with anti-inflammatories, which can trigger adverse effects. Therefore, natural products are alternatives to new compounds with anti-inflammatory activity. In this sense, Biochanin A (BCA) is an isoflavone with anti-inflammatory and antioxidant effects, demonstrated in several disease models, however, never tested topically. Therefore, the objective of the research was to evaluate the anti-inflammatory potential of BCA topically, in a model of acute skin inflammation. To this end, female Swiss mice (n=7) were subjected to ear edema induced by TPA (12-O-tetradecanoylphorbol acetate), and treated with BCA (0.1, 0.3, 1 and 3mg/ear) or dexamethasone (DEXA). Anti-inflammatory activity was evaluated by determining the activity of myeloperoxidase (MPO), pro-inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  and histopathological analysis. Furthermore, oxidative damage was evaluated by the dosage of substances reactive to thiobarbituric acid (TBARS) and antioxidant protection, by sulfhydryl groups (NP-SH). It was observed that treatment with BCA, at a dose of 3mg/ear, promoted the greatest reduction in edema among the doses tested, in addition to reducing MPO, concentration of the evaluated cytokines and TBARS. Furthermore, the NP-SH groups increased, equivalent to the DEXA group. In histological analysis, the BCA and DEXA groups reduced interstitial edema and inflammatory infiltrate equally, compared to TPA. Thus, the present work demonstrated that BCA has anti-inflammatory and antioxidant activity in acute skin inflammation, when administered topically.

**Keywords:** Inflammation, edema, isoflavone, natural products

## **RESUMO PARA COMUNIDADE**

**A BIOCHANINA A POR VIA TÓPICA PROMOVE EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS E ANTIOXIDANTES NO EDEMA DE ORELHA DE CAMUNDONGOS**, Edson dos Santos Junior, São Cristovão/SE, 2024.

A inflamação envolve fatores do “sistema de defesa” do corpo e o “tecido lesionado”. Esse processo é necessário para restabelecer o equilíbrio, porém, o descontrole do mesmo pode gerar efeitos maléficos para as funções do corpo. É comum que condições inflamatórias sejam tratadas com anti-inflamatórios, que por sua vez, podem gerar efeitos ruins ao corpo, se usados de forma exagerada. Os produtos naturais (plantas) são alternativas de novas substâncias com atividade anti-inflamatória para tratar diversas condições. Dentre essas plantas, a biochanina A (BCA) uma substância isolada de espécies vegetais, possui efeito anti-inflamatório e antioxidante, já testado em laboratório em várias doenças. Com isso, o objetivo da pesquisa foi avaliar o potencial anti-inflamatório da BCA na inflamação aguda da pele. Para essa investigação, camundongos fêmeas foram submetidas ao inchaço de orelha induzido por uma substância que causa esse inchaço, e tratados com BCA ou com o anti-inflamatório reconhecido e utilizado no dia a dia, afim de comparar o efeito gerado. Após 6 horas das aplicações foi avaliada a atividade anti-inflamatória através da atividade da quantidade de células ligadas ao processo inflamatório, citocinas que produzem efeitos específicos no tecido para possibilitar e desenvolvimento do processo inflamatório, e análise das modificações causadas no tecido estudado. O dano às células envolvidas foi avaliado por reações ao ácido que detecta o dano nas células, enquanto que a proteção das mesmas foi avaliada pelos grupos de tióis. O tratamento com a BCA reduziu a quantidade das células e das citocinas inflamatórias, assim como a lesão das células do tecido envolvido e aumentou a proteção das mesmas pelos grupos tióis, de forma equiparada ao grupo do anti-inflamatório. Em relação as modificações no tecido o grupo BCA e do anti-inflamatório, reduziram o inchaço, acúmulo de células inflamatórias de forma equiparada, comparados ao grupo inflamado. Assim, o presente trabalho demonstrou que a BCA possui atividade anti-inflamatória e antioxidante na inflamação aguda, quando administrada na pele.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Fase inflamatória após injúria cutânea .....	17
<b>Figura 2</b> – Anatomia da pele .....	20
<b>Figura 3</b> – Estrutura química da biochanina A .....	22
<b>Figura 4</b> – Avaliação do edema de orelha pelo peso .....	32
<b>Figura 5</b> – Determinação da atividade de MPO, para avaliação do infiltrado de neutrófilos..	33
<b>Figura 6</b> – Principais características histopatológicas da orelha .....	35
<b>Figura 7</b> – Avaliação da espessura dermoepidérmica média dos espécimes .....	36
<b>Figura 8</b> – Concentração das citocinas na orelha dos camundongos .....	37
<b>Figura 9</b> – Avaliação da peroxidação lipídica, determinada pelo TBARS .....	39
<b>Figura 10</b> – Determinação dos grupos sulfidríla .....	40
<b>Figura 11</b> – Resumo gráfico.....	45

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Descrição dos grupos experimentais.....	26
---	----

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

**AINEs** – Anti-inflamatório não esteroidais;

**ANOVA** – Análise da variância;

**BAX** – Proteína X associada a Bcl-2;

**BCA** – Biochanina A;

**BHT** – Butil-hidroxitolueno;

**CAT** – Catalase;

**CONCEA** – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal;

**COX** – Ciclo-oxigenase;

**DAG** – Diacilglicerol;

**de** – Derme;

**Dexa** – Dexametasona;

**DMBA** – 7,12-Dimetilbenzantraceno;

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico;

**DP** – Desvio padrão;

**DTNB** – Ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico);

**ed** – Edema intersticial;

**EDTA** – Ácido etilenodiamino tetra-acético (ethylenediamine tetraacetic acid);

**ELISA** – Ensaio de imunoabsorção enzimática (enzyme-linked immunosorbent assay);

**ep** – Epiderme;

**EROS** – Espécies reativas de oxigênio (reactive oxygen species);

**ERK** – Proteína quinase regulado por sinal extracelular (Protein kinase regulated by extracellular signal);

**GPx** – Glutathione peroxidase;

**HE** – Hematoxilina-eosina;

**H<sup>2</sup>O<sup>2</sup>** - Peróxido de hidrogênio;

**HTAB** – Hexadeciltrimetilamônio;

**Inf** – Infiltrado inflamatório;

**IL** – Interleucina;

**LOX** – Lipo-oxigenase;

**mab** – Microabscessos;

**MAPK** – Proteína ativada por mitogeno p38 quinase (p38 kinase mitogen-activated protein);

**MDA** – Marcadores de peroxidação lipídica;

**MPO** – Mieloperoxidase;

**MyD88** – Fator de diferenciação mielóide 88 (Myeloid differentiation primary response 88);

**NaCl** – Cloreto de sódio;

**NF- $\kappa$ B** – Fator nuclear kappa B (Nuclear factor kappa B);

**NP-SH** – Grupos sulfidril não proteico;

**Nrf2** – Fator nuclear derivado do eritróide 2 (Erythroid-derived nuclear factor 2);

**PBS** – Tampão fosfato salina (phosphate-buffered saline);

**PH** – Potencial hidrogeniônico;

**PKC** – Proteína quinase C;

**PMSF** – Fluoreto de fenilmetanosulfonil;

**PPAR- $\gamma$**  – Receptor ativado por proliferadores de peroxissomas gama (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma);

**RANTES** – Regulado na ativação, células T normais expressas e secretadas (Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted);

**SOD** – Superoxidodesmutase;

**TBARS** – Substancias reativas ao ácido tiobarbitúrico (substances reactive to thiobarbituric acid);

**TLRs** – Receptores do tipo Toll (toll-like receptors);

**TNF- $\alpha$**  – Fator de Necrose Tumoral Alfa (Tumor Necrosis Factor Alpha);

**TPA** – 12-O-tetradecanoilforbol acetato;

**UFS** – Universidade Federal de Sergipe;

**UV** – Raios ultra violeta;

## SUMÁRIO

1	Introdução.....	16
2	Revisão de literatura.....	17
2.1	O Processo inflamatório.....	17
2.2	Pele: Anatomia e Funções.....	19
2.3	Produtos naturais no tratamento de afecções da pele .....	20
2.4	Biochanina A.....	22
3	Objetivos.....	25
3.1	Objetivo geral.....	25
3.2	Objetivos específicos.....	25
4	Material e Métodos.....	26
4.1	Drogas.....	26
4.2	Animais .....	26
4.3	Procedimentos .....	26
4.3.1	Grupos experimentais.....	26
4.3.2	Edema de orelha induzido por TPA/ delineamento experimental.....	27
4.3.3	Dosagem de atividade de mieloperoxidase (MPO).....	27
4.3.4	Análise histológica das orelhas.....	28
4.3.5	Análise morfológica.....	28
4.3.6	Determinação das concentrações de citocinas em orelhas inflamadas por TPA..	28
4.3.7	Avaliação do estresse oxidativo por dosagem de substancias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e grupo sulfidril.....	29
4.4	Análise Estatística.....	30
5	Resultados.....	31
6	Discussão .....	41
7	Conclusão .....	44
8	Perspetivas futuras.....	44
9	Resumo gráfico .....	45
10	Referência.....	46

## 1 Introdução

O processo inflamatório é caracterizado pelos sinais flogísticos: calor, dor, rubor e o edema (Rodrigues et al., 2019). É desencadeado por agentes físicos (radiação, queimadura, trauma), químicos (substâncias químicas), isquemia e interações antígeno-anticorpo, assim como, por agentes infecciosos (Peralea et al., 2012).

Esse processo é dinâmico, regulado por mecanismos celulares, humorais e moleculares, e é entendido como um mecanismo de defesa do organismo que permite desencadear os processos de reparação, como a cicatrização e a regeneração do tecido afetado. E pode ser dividido em fases, iniciado pela fase aguda, na qual há liberação de quimiocinas para migração de leucócitos, citocinas e fatores de crescimento para ativa-lo, seguindo para fase de reparação, mediada por outras quimiocinas/citocinas para diferenciação celular. Apesar de necessário, determinado processo poderá ser exacerbado em situações de resposta excessiva ou recorrente, levando a efeitos deletérios ao organismo, observados nas doenças inflamatórias crônicas (Medzhitov, 2008; Reinke e Sorg, 2012; Medzhitov, 2021; Nathan, 2022).

Segundo o relatório publicado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2014, com base em dados de 2012, doenças inflamatórias são a terceira maior causa de mortes, responsáveis por cerca de 3,46 milhões de óbitos, 10,8% do total de mortes (WHO, 2012). Para as doenças inflamatórias da pele, atualmente as evidências estão mais voltadas aos estudos da dermatite atópica, psoríase, acne e hidradenite supurativa (Napolitano et al., 2021).

A utilização de fármacos no tratamento da inflamação como os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e esteroidais é acompanhado de efeitos nocivos adversos graves (angioedema, broncoespasmo e hipotensão). Ainda, o tratamento rotineiro da doença inflamatória com esses agentes, além de efeitos adversos, pode causar resposta adaptativa (prurido, irritações, queimação da pele e erupções) (Adil et al., 2010).

Os produtos naturais são alternativas para novos compostos com atividade anti-inflamatória, e uma fonte rica e inesgotável para a busca e desenvolvimento de fármacos curativos para uma gama de condições patológicas, através da ação de novos mediadores de funções biomoleculares, tendo em vista as suas multifunções farmacológicas (anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana e anticancerígena), tais produtos podem ser categorizados de acordo com a sua estrutura. Dentre eles, temos os flavonoides que por sua vez possuem como subclasse as isoflavonas. Essas, são fitoestrógenos com estrutura química semelhantes ao 17- $\beta$ -estradiol. A Biochanina A (BCA) é uma isoflavona isolada de trevo

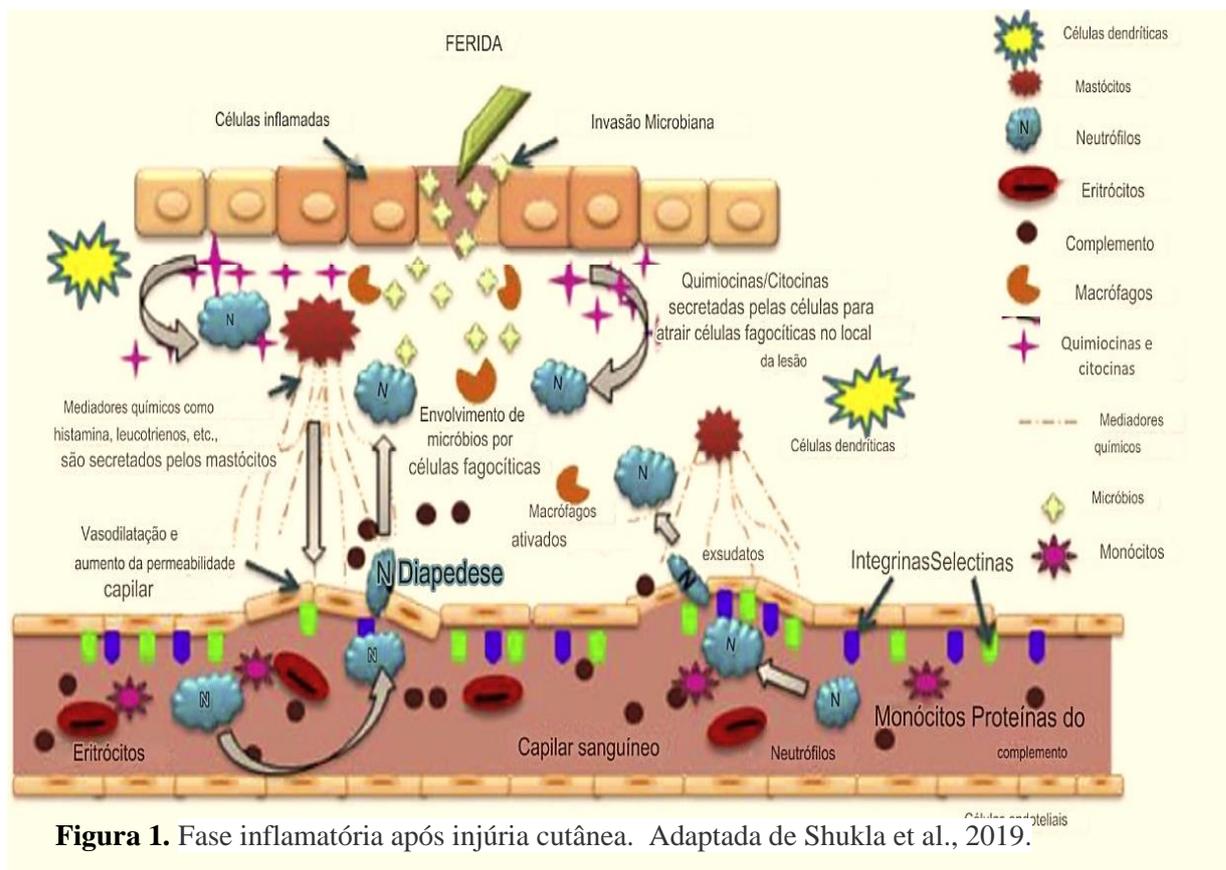
vermelho, soja, grão-de-bico e algumas outras plantas, que tem seus efeitos bem expressos na literatura (Sarfraz et al., 2020). Alguns dos efeitos da BCA, como o anticancerígeno, podem ser descritos por minimizar o crescimento celular e dificultar a metástase, bem como, estimular a morte de células tumorais, já os antioxidantes estão associados a regulação positiva do fator nuclear eritróide 2 (Nrf2) e controle de fatores de transcrição pelo estímulo da ação da enzima superóxido desmutase (SOD), enquanto que os efeitos anti-inflamatório estão associados a regulação negativa da proteína ativada por mitogeno p38 quinase (MAPK) e fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) (Ramachandran et al., 2022). Contudo, ainda não foi investigado esse efeito anti-inflamatório por via tópica, nas afecções da pele.

Nessa perspectiva, hipotetizamos que a biochanina A pode possuir um potencial anti-inflamatório agudo cutâneo por via tópica. A realização deste estudo é justificada pela busca de uma opção natural com atividade anti-inflamatória na pele, por via tópica, para o tratamento de doenças inflamatórias. O desenvolvimento deste estudo soma-se às pesquisas na descoberta de novas terapias medicamentosas para o tratamento de doenças na pele.

## 2 Revisão de literatura

### 2.1 O Processo Inflamatório

Inflamação é uma reação protetora do corpo, que acontece após uma injúria tecidual, nos tecidos circunjacentes. A propensão para estimular uma reação inflamatória é necessária à sobrevivência, ainda que, em algumas situações e doenças, este resultado torne-se exagerado, sem qualquer vantagem conhecida (Gensel 2012; Medzhitov, 2021). Na pele, essa fase inflamatória ocorre com a migração de neutrófilos que liberam espécies reativas de oxigênio (EROS), eicosanóides, proteases e mieloperoxidase (MPO). Além dos monócitos que se diferenciam em macrófagos regulados por quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias e fator de crescimento (Figura 1) (Shukla et al., 2019).



Os sinais cardinais da inflamação são: calor, rubor, dor e edema, induzidos por mediadores químicos, fluxo sanguíneo, permeabilidade vascular e infiltração de leucócitos (Vodovotz et al., 2008). Segundo Silva e colegas (2009), as respostas inflamatórias ocorrem

em três fases mediadas por mecanismos variados.

A fase transitória aguda é caracterizada por vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. A vasodilatação das arteríolas causa a elevação do leito vascular e do fluxo sanguíneo, que leva ao aumento da pressão hidrostática local, com influxo de líquido para a esfera extravascular. Simultaneamente, há aumento da permeabilidade dos vasos da microcirculação decorrente do extravasamento de proteínas e aumento da viscosidade sanguínea, tais características se dão, pela atividade de mediadores inflamatórios, como a histamina, prostaglandinas e leucotrienos, que estimulam a resposta imune de células responsáveis pelo processo inflamatório (Silva, 2009; Muller, 2014);

A fase subaguda ou tardia é determinada pela infiltração dos leucócitos e das células fagocitárias. Com o desdobramento da estase local, há a migração periférica dos leucócitos, especialmente os neutrófilos, pelo endotélio vascular (marginação leucocítica) por migração transendotelial. Esse processo é regulado pela expressão de moléculas de adesão e acontece em fases: inicialmente há o rolamento pela interação dos leucócitos com moléculas de adesão (selectinas e integrinas) do sítio inflamado; seguido da ativação pela liberação de quimiocinas e a adesão pela interação forte entre os leucócitos e o endotélio (pelas moléculas de adesão intercelular endotelial e adesão de célula vascular), orientada por gradiente químico (quimiotaxia), e por fim, há o extravasamento celular (Stoecklin 2006; Silva 2009; Muller 2014; Timmerman, 2016).

Na fase do ciclo proliferativo crônico, tem presença de degeneração tecidual, fibrose e dos mediadores lipídicos derivados dos fosfolípídeos, no qual o precursor é o ácido araquidônico, advindo das membranas celulares, pela ação da fosfolipase A2 (Calder et al., 2006).

O ácido araquidônico pode ser metabolizado por duas vias: via da lipo-oxigenase (LOX), pela ação da 5-lipoxigenase estimulando a síntese de leucotrienos, que por sua vez, estão ligados a permeabilidade vascular, a quimiotaxia, a liberação de enzimas lisossomais e secreção de citocinas. E a via da ciclo-oxigenase (COX), que pode se apresentar de duas isoformas, a COX-1 ou ciclo-oxigenase-1, relacionada à manutenção da homeostase e a COX-2 ou ciclo-oxigenase-2, relacionada ao aumento da produção de prostanoides. Entretanto, as duas isoformas atuam na produção de Tromboxanos e Prostaglandinas (Calder, 2006; Neitzel, 2010).

A hipersensibilidade nos distúrbios inflamatórios da pele são ocasionados por reações do sistema imunológico. Essas reações podem ser desencadeadas por estímulos externos, como microorganismos ou internos, como as respostas autoimunes, via ativação do sistema imunológico

inato e/ou adaptativo. Com o aumento progressivo da produção de citocinas pró-inflamatórias, uma mudança no comportamento dos queratinócitos e fibroblastos, pode acarretar diferentes tipos de inflamação na pele (Mendonça, 2008; Pasparakis. Haase, Nestle, 2014; Shutova e Boehncke, 2022).

As células imunes conhecidas como efetoras nas reações inflamatórias da pele são os neutrófilos e monócitos. Dependendo dos estímulos, essas células são capazes de induzir resposta inflamatória pela ação dos mediadores pró-inflamatórios, ou reduzir, a depender da fase dessa resposta, pela ação dos mediadores pró-resolução, para facilitar o reparo tecidual. Além disso, funcionam na vigilância imunológica, apoiando, dessa maneira, a reconhecimento prévio de ameaças ambientais (Mendonça, 2008; Pasparakis. Haase, Nestle, 2014; Shutova e Boehncke, 2022; Félix, 2022).

As respostas imunes na pele são essenciais para a intervenção e proteção contra micro-organismos patogênicos. Porém, quando essas reações são desreguladas podem produzir doenças inflamatórias crônicas da pele. A interferência extensa entre os distintos componentes celulares e microbianos da pele regula as respostas imunes locais para garantir uma intervenção efetiva para o hospedeiro, a fim de preservar a homeostase e proteger do desenvolvimento de doenças crônicas (DI Meglio; Perera; Nestle et al., 2011).

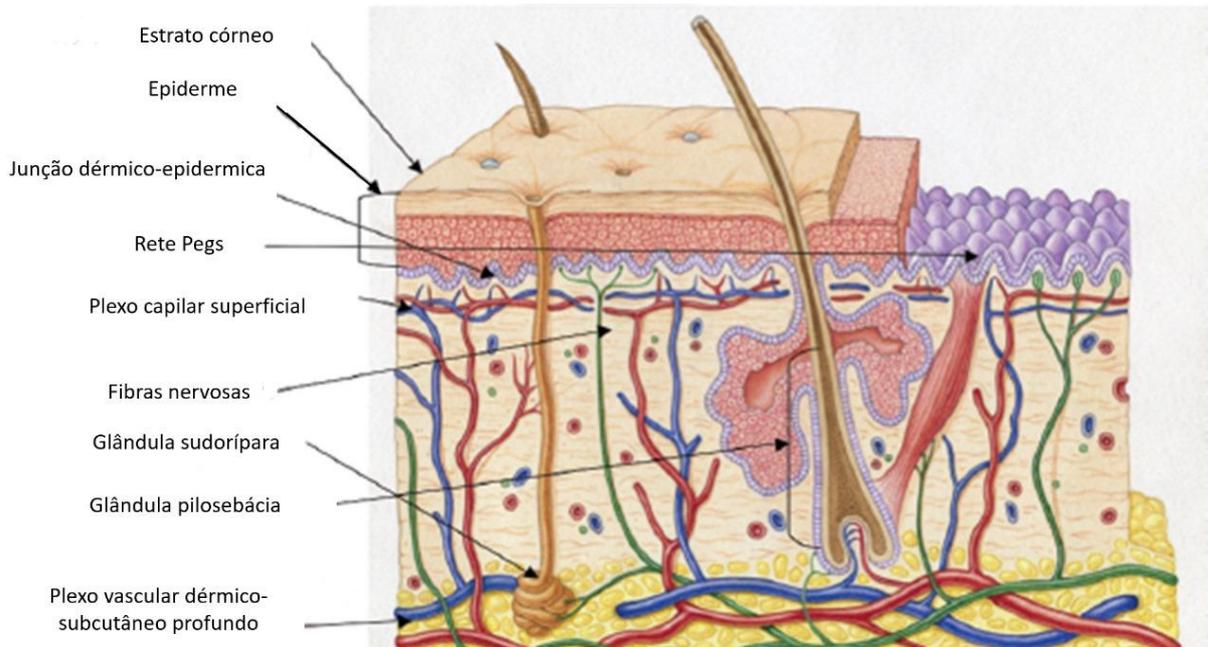
## **2.2 Pele: Anatomia e Funções**

A pele desempenha diversas funções no corpo, tendo como funções primárias de proteção, preservação de fluidos biológicos, prevenção de distúrbios eletrolíticos, e controle da temperatura do corpo (Kanitaks, 2001; Ória, 2003; SBD, 2019).

A pele é constituída por camadas distintas. A epiderme, que é a camada mais externa, formada de epitélio escamoso ligado a membrana basal, é composta em sua maioria por queratinócitos, que exercem funções diferentes nas diversas subcamadas da epiderme. As subcamadas são: o estrato basal (mais profundo), o estrato espinhoso, o estrato granuloso e o estrato córneo (mais superficial). As camadas mais internas constituem tecido proliferativo e de sustentação por parte dos queratinócitos. Por fim, nas subcamadas mais superficiais, as funções dessas células são diferenciação e formação de corneócitos (estrato córneo), que consiste em células compactadas, mortas, queratinizadas em categoria estratificada com conteúdo hídrico minúsculo (Suffredini, 2014; SBD, 2019; Shutova e Boehncke, 2022).

A derme é composta por fibroblastos que produzem uma matriz extracelular, contém colágeno e elastina e é responsável pela estabilidade e elasticidade da pele. Compreende

ainda, células do sistema imunológico, folículos capilares, glândulas e vasos sanguíneos. A camada subcutânea é a mais profunda, composta por tecido conjuntivo e adipócitos, responsável pela proteção de órgão, armazenamento de gordura com a finalidade de isolamento (Suffredini, 2014; SBD, 2019; Shutova e Boehncke, 2022) (Figura 2).



**Figura 2.** Anatomia da pele. Adaptado de Fore et al., 2006.

A esfera dérmica, compreende ainda elementos intrínsecos da pele, que afetam a captação transcutânea. Entre eles, estão: a densidade média da pele; o pH que deve estar entre 5.5 e 7.0; o composto córneo, que é de 40% de proteína (queratina), 40% de água e 20% de lipídeos (triglicerídeos, ácidos graxos livres, colesterol e fosfolipídios) (Angel; Szabowski; Schorpp-Kistner, 2001).

Apesar de função de barreira, a pele é um órgão que pode absorver substâncias localmente. Pesquisas demonstram a possibilidade de certos compostos se difundirem entre as camadas da pele, com rapidez controlada e chegarem aos vasos sanguíneos, ou seja, quando administrado sobre a pele, o fármaco torna-se disponível para a captação na circulação (Barbosa et al., 2009).

### 2.3 Produtos naturais no tratamento de afecções da pele

Desde os primórdios da civilização, há milhares de anos, plantas vêm sendo usadas com fins terapêuticos. A princípio, a aplicação das plantas se deu no formato de tinturas e chás, que

resultou no progresso de desenvolvimento de novos fármacos destinados ao tratamento de diversas patologias (Megraji et al., 2011).

O Brasil detém cerca de 45.000 espécies, equivalendo a 18% da soma mundial, dentre essas, 17.000 são consideradas endêmicas, isto é, ocorrem apenas no Brasil. Atualmente existem diversas técnicas empregadas para a descobrimento de novas substâncias bioativas, inclusive o isolamento de compostos, tanto de plantas, quanto de outras fontes naturais (micro-organismos, organismos marinhos, répteis, insetos, etc.). O desenvolvimento de novos compostos pode ocorrer a partir da semi-síntese química, química combinatória e modelagem molecular (Balunas Ekinghorn et al., 2005).

Os produtos naturais são metabólitos secundários produzidos por organismos em resultado à estímulos externos, tais como: mudanças nutricionais, infecções e competições. Muitos produtos naturais obtidos de plantas, fungos, bactérias, protozoários e insetos evidenciaram terem sido isolados como substâncias biologicamente ativas. Tais substâncias surgiram conforme solução dos organismos às pressões evolutivas. Além disso, são capazes de atuar mutuamente em muitas proteínas e alvos biológicos, com propósitos específicos, originando diversos exemplos de fármacos de sucesso (Koehn; Carter et al., 2005).

Atualmente, várias terapias foram desenvolvidas para tratar condições de pele, desencadeadas por fatores internos e externos ao corpo, especialmente as doenças inflamatórias crônicas. Contudo, as terapias são acompanhadas de entraves relacionados aos efeitos adversos e dificuldade de absorção. Com isso, surge a necessidade de novas terapias para tratar essas condições, com menos efeitos adversos (Majtan et al., 2021).

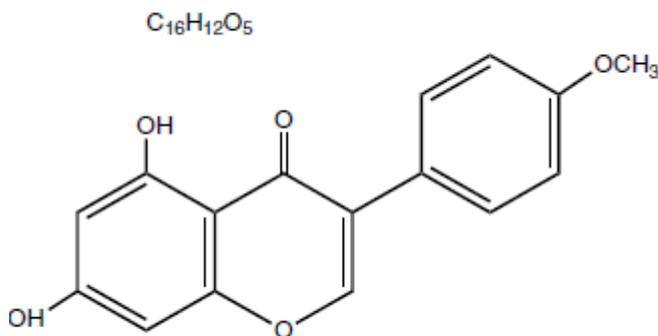
Diversos compostos naturais estão sendo consideradas em algumas condições de pele, como: o ácido desacetilasperulosídico, encontrado na planta medicinal noni (*Morinda citrifolia*), que inibe a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) e quimiocinas (RANTES, MDC) e aumenta a expressão de proteínas envolvidas nas funções de barreira da pele, em células HaCat, HMC-1 e EOL-1, no modelo de dermatite atópica, induzida por 2,4 dinitroclorobenzeno, demonstrado por Oh et al (2021). A piperina encontrada na pimenta longa (*Piper longum*), inibiu a expressão de citocinas pró-inflamatórias e suprimiu as respostas imunes mediadas por linfócitos T auxiliares, pela inibição da fosforilação da STAT6, em um modelo de dermatite atópica induzida por anidrido trimelítico. O extrato etanólico da fruta camu-camu (*Myrciaria dubia*) modulou vias relacionadas à inflamação, regulando negativamente a expressão de citocinas e quimiocinas (CXCL8, MDC, RANTES e TARC) pró-inflamatórias, além de produzir efeitos antioxidantes pela regulação positiva do Nrf2, em modelo de inflamação e estresse oxidativo, induzido por altas taxas de glicose em

queratinócitos (Majtan et al., 2021).

Uma ampla gama de estudos abordam o uso de plantas e compostos isolados para tratamento de diversas afecções na pele. Dentro desse contexto, as isoflavonas promovem saúde e tratam diversas condições patológicas, dentre elas as condições de pele, tendo em vista os vários efeitos bioativos desses compostos (Wright; 2006; Rivera-Yañez; 2021; Sun e Shahrajabian 2023).

#### 2.4 Biochanina A

A Biochanina A (5,7-dihidroxi-4'-metoxi-isoflavona) (BCA) (Figura 3), é uma isoflavona de baixa solubilidade em água e absorção oral. É o precursor metilado da genisteína, isolada de leguminosas da família *Fabaceae*. A BCA está presente principalmente na folha e caule do trevo vermelho (Yu et al., 2019), e pode ser encontrada ainda, em plantas como: soja, alfafa, amendoim, carqueja e grão de bico (Sarfraz et al., 2020).



**Figura 3.** Estrutura química da BCA, Fonte: Felix et al., 2020.

A BCA desempenha várias atividades biológicas, alta depuração, alto volume de distribuição, fraca solubilidade, baixa biodisponibilidade e tem a propriedade de absorção rápida, o que pode estar relacionado a alta permeabilidade, a eliminação biliar e ao aumento metabolismo entero-hepático, quando ligada ao DNA, a algumas proteínas específicas ou agindo como substrato competitivo de enzimas. Essas características farmacocinéticas limitam algumas das possíveis formas de utilização da BCA como agente terapêutico. Contudo, estudos demonstram formas de melhorar algumas dessas características (Moon, 2006; Yu, 2019; Felix, 2022).

As atividades biológicas da BCA incluem, os efeitos anti-inflamatórios devido a ação em várias vias de sinalização inflamatória, antioxidantes, anticancerígeno, neuroprotetores,

hepatoprotetores e anti-infeccioso, bem como, o tratamento de deficiência de estrógeno (Moon, 2006; Yu, 2019).

O potencial anti-inflamatório da Biochanina A foi observado em condrócitos primário de ratos, após indução de inflamação com IL-1 $\beta$ , para mimetizar a degradação da cartilagem na artrite, a BCA mostrou efeito antagonista de catabólicos da óxido nítrico sintase, prostaglandina E2 e citocinas pró-inflamatórias, associado à inibição da fosforilação e translocação do NF- $\kappa$ B para o núcleo das células (Oh et al., 2016). O mesmo efeito da BCA foi demonstrado em um modelo de artrite induzida por zymozan, modulando a sobrevivência e morte de neutrófilos (*in vitro*), e inibindo o acúmulo de neutrófilos, a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , e aumentando a produção das anti-inflamatórias IL-10 e IL-4 (*in vivo*) (Felix et al., 2020). Esse efeito, pode ser demonstrado ainda, no modelo de artrite induzido por albumina sérica bovina metilada, no qual, a BCA reduziu o acúmulo de neutrófilos, os níveis de IL-1 $\beta$  e CXCL1, a disfunção articular e aumentou os eventos de apoptose e eferocitose dos macrófagos, por meio de mecanismos dependente de GPR30 e PKA (Felix et al., 2021).

Em relação ao efeito anticancerígeno, foi demonstrado que o tratamento com BCA inibiu a proliferação das células cancerígenas, além de inibir a atividade de NF- $\kappa$ B, em um modelo de carcinoma de cabeça e pescoço (*in vitro*) (Cho et al., 2017). O efeito neuroprotetor foi demonstrado por Wu e colegas (2018) em um modelo experimental de hemorragia subaracnóidea em ratos Sprague-Dawley, pela redução da apoptose neuronal devido à baixa expressão de BAX, capase-3 e 9, bem como a diminuição da atividade das vias receptores do tipo Toll (TLRs) e NF- $\kappa$ B, reduzindo ainda a porcentagem de micróglias ativadas e das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (Wu et al., 2018).

Para demonstrar o efeito antioxidante, isquemia cerebral induzida em ratos Sprague-Dawley, a BCA reduziu a ativação do NF- $\kappa$ B, produção de ROS, marcadores de peroxidação lipídica (MDA) e promoveu o aumento de enzimas antioxidantes (SOD e GPx), associado ao aumento da atividade de Nrf2 (Guo et al., 2019). Ainda, o efeito hepatoprotetor foi observado por Liu et al (2016), no modelo de lesão hepática aguda induzida por lipopolissacarídeo/D-galactosamina em camundongos, através da regulação positiva de Nrf2, com aumento de enzimas antioxidantes e redução de MDA, além da regulação negativa do inflamassoma NLRP3 e das citocinas pró-inflamatórias.

A Biochanina A possui multifunções bioativas, bem estabelecidas na literatura, tanto *in vivo*, quanto *in vitro*, desse modo, é importante considerar a sua atividade anti-inflamatória e explorá-la, principalmente do uso tópico em afecções cutâneas, tendo em vista, que não

existem evidências neste sentido, de modo a contribuir com novas possibilidades de uso terapêutico desse composto isolado de produto natural.

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar o potencial anti-inflamatório e antioxidante da Biochanina A em modelo murino de inflamação aguda cutânea pela via tópica.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

Investigar o efeito anti-inflamatório tópico da Biochanina A, sobre:

- O edema de orelha;
- Migração de neutrófilos;
- As alterações histopatológicas no tecido;
- Concentração de citocinas pró-inflamatórias no tecido;
- A modulação do estresse oxidativo.

## 4 Material e Métodos

### 4.1 Drogas

Foram utilizados *12-O-tetradecanoilforbol acetato* (TPA) (Sigma-Aldrich®, Darmstadt, Alemanha) diluído em acetona 60% (Avantor®, Espanha), para administração; biochanina A (Sigma-Aldrich®, Darmstadt, Alemanha) diluída em propilenoglicol (Dow Inc®, Midland, Michigan, EUA) e acetona 60%; dexametasona (Decadron®, São Paulo, Brasil) diluído em acetona 60%; isoflurano (BioChimico®, Rio de Janeiro, Brasil).

### 4.2 Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) fêmeas da linhagem Swiss pesando em média 30g, provenientes do biotério do Departamento de Fisiologia. Os animais foram mantidos em sala com temperatura controlada ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e ciclo controlado (claro/escuro, 12h cada), tendo ração e água *ad libitum*.

Todos os procedimentos experimentais seguiram as diretrizes adotadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob o protocolo nº 5279160922 (Anexo 1).

### 4.3 Procedimentos

#### 4.3.1 Grupos experimentais

Neste estudo foi utilizado o modelo de inflamação de orelha induzida por (TPA) para avaliar o potencial terapêutico da BCA. Para tanto, utilizamos os seguintes grupos experimentais de acordo com os detalhes metodológicos descritos a seguir (Tabela 1).

**Tabela 1.** Relação dos grupos experimentais para a avaliação do efeito anti-inflamatório e antioxidante tópicos da biochanina A (BCA) no modelo de edema de orelha induzido por TPA.

<i>Grupos experimentais (n=7)</i>	<b>Indução/Tratamento por Administração Tópica</b>
1. Veículo (acetona)	Acetona (20 µL/orelha) + propilenoglicol 20%
2. TPA	TPA (1 µg/orelha)
3. TPA + BCA 0,1	TPA (1 µg/orelha) + BCA (0,1 mg/ orelha)
4. TPA + BCA 0,3	TPA (1 µg/orelha) + BCA (0,3 mg/ orelha)

5. TPA + BCA 1	TPA (1 µg/orelha) + BCA (1 mg/ orelha)
6. TPA + BCA 3	TPA (1 µg/orelha) + BCA (3 mg/ orelha)
7. TPA + Dexa	TPA (1 µg/orelha) + DEXA (0,05 mg/ orelha)

TPA: 12-*O*-tetradecanoilforbol acetato; BCA: biochanina A; DEXA: dexametasona.

#### 4.3.2 Edema de orelha induzido por TPA/ Delineamento experimental

O edema foi avaliado de acordo com a metodologia de Young et al. (1989), adequada as condições do laboratório por Bomfim et al. (2014). Para tanto, os camundongos (n=7/grupo) foram submetidos a administração por via tópica do agente indutor de inflamação, o TPA (1 µg/orelha dissolvido em 20 µL de acetona 60% + propilenoglicol 20%). Na orelha esquerda de todos os animais foram administrados por via tópica 20µL de acetona + propilenoglicol 20% e cada animal serviu como seu controle.

Cinco minutos após a administração de TPA, as orelhas dos animais dos grupos 3 ao 6 foram tratadas por via tópica com Biochanina A. Como controle positivo foi utilizado 20 µL de dexametasona (0,05 mg/orelha), grupo 7. Os animais foram separados em caixas para evitar que um influenciasse no outro.

Antes da eutanásia, os camundongos foram anestesiados com isoflurano, pela via inalatória, e em seguida foi realizado deslocamento cervical após 6 h da indução da inflamação. Os sítios das orelhas foram recortados circularmente com 8mm de diâmetro com o auxílio de um *punch* em área padronizada, e foi obtido o peso dos sítios das orelhas em gramas. Toda indução e coleta foi realizada por pesquisador experiente.

#### 4.3.3 Dosagem da atividade de mieloperoxidase (MPO)

O recrutamento de neutrófilos foi investigado nos sítios de orelha pela avaliação da atividade da MPO. Após a medida do peso, as amostras de orelha foram cortadas em pedaços pequenos e armazenadas em tubos eppendorfs na presença de tampão fosfato de potássio (50 mmol/L, pH 6,0) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB). Cada amostra foi homogeneizada e centrifugadas durante 2 min a 14.000rpm com temperatura de 4°C. Os sobrenadantes obtidos foram submetidos à análise da atividade da MPO. Brevemente, as amostras foram pipetadas em placa de 96 poços, foi adicionado a solução de di-hidrocloreto de *o*-dianisidina (0,167 mg/mL, preparada em tampão fosfato de potássio 50 mmol/L contendo

0,005% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). As alterações nos valores de absorbância a 460 nm foram registrados durante um período de 5 min e os resultados expressos como unidades de MPO (uMPO/mg de tecido), considerando-se 1 uMPO como a quantidade de enzima que degrada 1 µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 25°C conforme previamente descrito (Bradley et al., 1982).

#### 4.3.4 Análise histológica das orelhas

A análise histológica das orelhas (n=7) foi realizada em tecido cuidadosamente retirado e fixado em solução de etanol (70%) por um período de 24 horas. Após este período, os tecidos foram retirados e conservados em formol (10%) até o momento da realização dos cortes histológicos. Posteriormente, as orelhas foram desidratadas, incluídas em parafina e em seguida seccionadas transversalmente num micrótomo em cortes de 5 µm de espessura. Estes cortes foram fixados em lâminas e corados com hematoxilina e eosina. As lâminas foram visualizadas em microscópio óptico (Nikon, Tóquio, Japão) com aumento de 20x e então fotografadas com o auxílio de uma câmera fotográfica (Nikon, Tóquio, Japão) acoplada ao microscópio por avaliador encoberto. A mensuração da espessura da orelha, em relação ao edema foi realizada no programa ImageJ®, e, para tal, foram selecionadas 5 fotografias representativas de cada grupo experimental, e em cada fotografia foram realizadas 5 medidas da espessura da derme (Chibli et al., 2014).

#### 4.3.5 Análise morfométrica

Para o estudo morfométrico foram utilizadas três secções histológicas de cada espécime, analisadas em magnificação de 100x. Um campo histológico sem artefatos de técnica histológica foi selecionado (*hot spot*) em cada secção, e foram tomadas cinco medidas de comprimento da espessura dermo epidérmica em cada área de *hot spot*.

Todas as medidas morfométricas foram obtidas utilizando o *software Image J* (versão 1.44). Através da ferramenta *Set Scale*, o *software* foi calibrado com a escala de 3,150 pixels equivalendo a 1,0 µm, e em seguida, foi traçada uma reta em três pontos aleatórios equidistantes em cada campo histológico. Para cada animal (espécime) foram obtidas 15 medidas, totalizando 105 medidas/ grupo.

#### **4.3.6 Determinação das concentrações de citocinas em orelhas inflamadas com TPA**

As concentrações de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  foram determinadas em homogenato de orelhas de camundongos usando kits comerciais imunoenzimáticos (ELISA) segundo as instruções do fabricante (Invitrogen®). As amostras das orelhas foram homogeneizadas em tampão de extração de citocinas (PBS contendo coquetel de inibidor de protease, PMSF, NaCl, EDTA e Tween 20) e centrifugadas. Cerca de 50 $\mu$ L do sobrenadante foi adicionado à placa de 96 poços de alta ligação, com o anticorpo de captura previamente aderido e a placa bloqueada. Posteriormente, as amostras foram incubadas (24 horas), lavadas e adicionadas ao anticorpo de detecção. Em seguida, o conjugado foi adicionado à placa e, por fim, acrescentado o substrato. As placas foram analisadas em espectrofotômetro de acordo com o protocolo do fabricante.

#### **4.3.7 Avaliação do estresse oxidativo por dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e grupos sulfidrila**

Após indução da inflamação nas orelhas, o tecido foi submetido a determinação de TBARS como medida da peroxidação lipídica tecidual de acordo com a técnica proposta por BOSE et al. 1989 e adaptada às condições do Laboratório (Oliveira et al., 2017). Resumidamente, o tecido foi homogeneizado em uma solução contendo fosfato de potássio (50 mmol/L, pH 7,4) e butil-hidroxitolueno (BHT, 12,6 mmol/L) e alíquotas do homogenato foram incubadas (90°C, 45 min) com solução contendo ácido tiobarbitúrico (0,37%), ácido tricloroacético (15%) e ácido clorídrico (0,25 mol/L). O homogenato foi centrifugado (5 min, 8000xg) e os sobrenadantes extraídos com n-butanol e solução saturada de NaCl, seguido de outra centrifugação (2 min a 8000xg). Os valores de absorvância (535 nm, com correção a 572 nm) foram mensurados em alíquotas do sobrenadante. Os resultados foram expressos como mmol de MDA por mg de tecido, utilizando-se para o cálculo o coeficiente de extinção molar de  $1,55 \times 10^5$  L/mol/cm (Bose et al., 1989).

Os grupos sulfidril não proteicos (NP-SH) foram determinados por reação de Ellman utilizando ácido 5'5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB), como descrito anteriormente (Sedlak; Lindsay, 1968). Para esta reação, as alíquotas de homogenatos foram pipetadas em microplaca de 96 poços em volume equivalente a 50  $\mu$ g de proteína. A este volume, foi acrescentado PBS

(50 mmol/L, pH 7,0) até o volume de 165  $\mu$ L. Em seguida, foi adicionado 35  $\mu$ L de tampão de reação (ácido bórico à 100 mmol/L acrescido de EDTA à 0,2 mmol/L, pH 8,5) e 10  $\mu$ L do reagente de Ellman (DTNB, 10 mmol/L). Após uma hora de incubação, a absorbância foi medida a 412 nm e os resultados expressos em  $\mu$ g de NP-SH por mg de tecido, considerando-se um coeficiente de extinção molar de 14,15 L.mol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

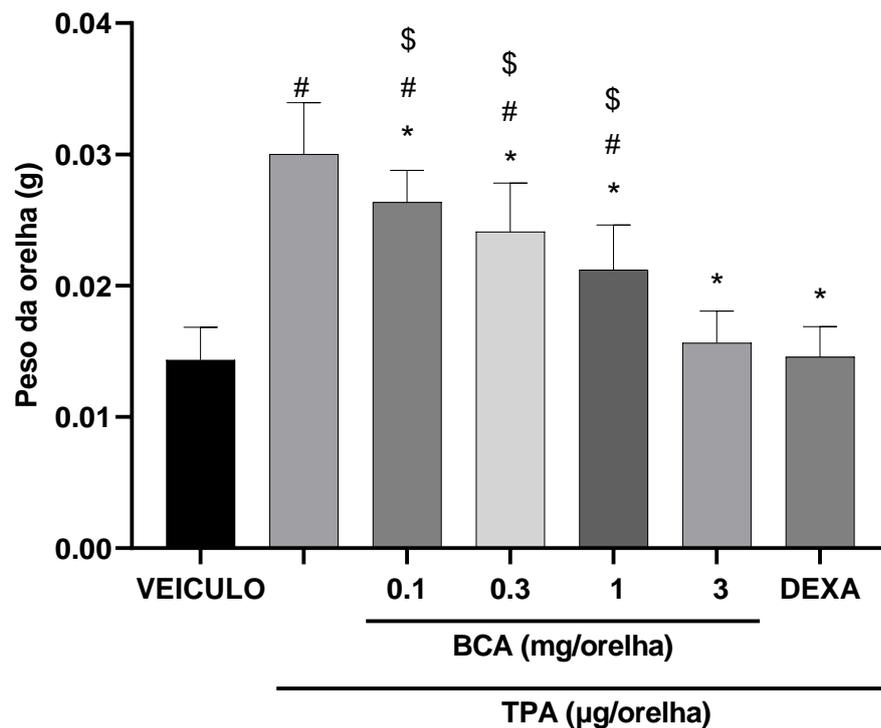
#### **4.4 Análise Estatística**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média e avaliados quanto a normalidade pelos testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. Para distribuição normal, foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. Em todos estes procedimentos foi utilizado o programa estatístico GraphPadPrism (versão 7.0) e os resultados que apresentaram  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## 5 Resultados

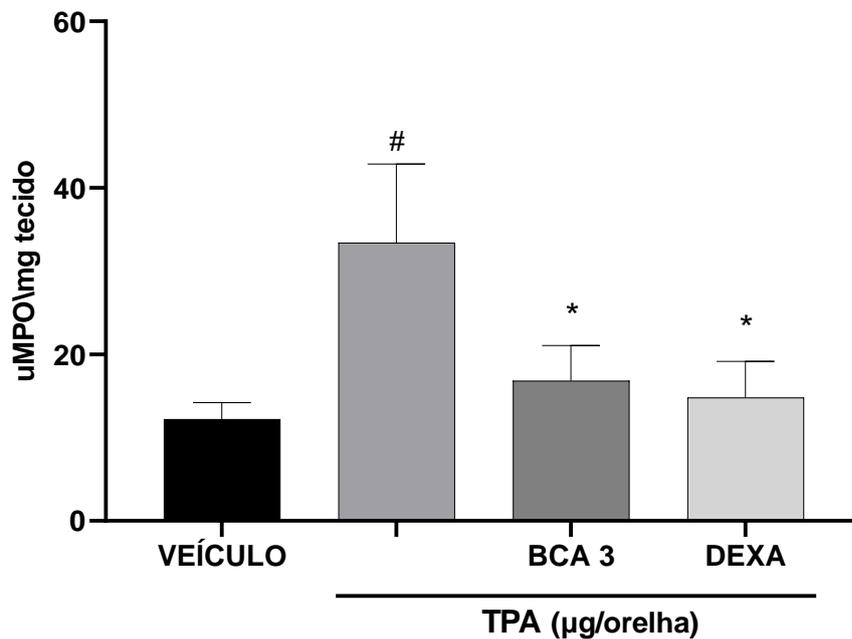
As doses de BCA utilizadas no estudo, foram consideradas a partir de estudo prévio desenvolvido laboratório (Oliveira et al., 2017). Contudo, para determinar a melhor dose da BCA, foram realizados experimentos piloto. A literatura científica dispõe de poucos estudos com a utilização da BCA por via oral, como no modelo de toxicidade via oral em camundongos e diversos estudos por via intraperitoneal, como no modelo de lesão medular induzida por impacto controlado em ratos (Yangzom, 2022; Li, 2023). Todavia, não foi encontrado estudos para a utilização por via tópica em modelos de inflamação da pele.

Como demonstrado na figura 4, após a indução da inflamação e tratamento das orelhas, essas foram coletadas e posteriormente pesadas, evidenciando que o TPA promoveu edema, consequentemente aumento do peso das orelhas, quando comparado ao grupo Veículo (acetona) ( $0,03 \pm 0,004$  vs  $0,014 \pm 0,003$ ;  $p < 0,0001$ ). Quando as orelhas foram tratadas com a BCA nas quatro doses (0,1, 0,3, 1 e 3 mg/orelha), houve redução do peso das orelhas, comparado ao grupo induzido (TPA) ( $0,026 \pm 0,002$ ,  $p < 0,0116$ ;  $0,024 \pm 0,004$ ,  $p < 0,0001$ ;  $0,021 \pm 0,003$ ,  $p < 0,0001$ ;  $0,016 \pm 0,002$ ,  $p < 0,0001$  vs  $0,03 \pm 0,004$ ). Além disso, o tratamento com dexametasona (DEXA) também reduziu o peso das orelhas quando comparado ao grupo TPA ( $0,014 \pm 0,0023$  vs  $0,03 \pm 0,0039$ ,  $p < 0,0001$ ). Entre as doses de BCA 0,1 e 0,3 mg/orelha não foi observada diferença significativa, já a dose de 1 mg/orelha, apresentou diferença significativa quando comparada às menores doses da BCA. Todavia, apenas a dose de 3 mg/orelha, reduziu o edema ao ponto de equiparar-se aos grupos Veículo e DEXA, conforme as comparações entre os grupos BCA 3 e Veículo ( $0,016 \pm 0,002$  vs  $0,015 \pm 0,002$ ,  $p = 0,7403$ ) e os grupos BCA 3 e DEXA ( $0,016 \pm 0,002$  vs  $0,014 \pm 0,002$ ,  $p = 0,8838$ ). Assim, escolhemos a dose de 3 mg/orelha para dar continuidade aos experimentos. Ademais, as doses de 0,1, 0,3 e 1 mg/orelha de BCA apresentaram peso da orelha aumentado quando comparado aos grupos Veículo e DEXA (Figura 4).



**Figura 4. Avaliação do edema de orelha.** O edema foi avaliado a partir da obtenção do peso das orelhas em gramas (g). Foi induzido o edema nos animais com TPA 1 µg/orelha e tratados por via tópica com biochanina A (BCA) 0.1, 0.3, 1, 3 mg/orelha ou com dexametasona (DEXA) 0,05 mg/orelha. Dados estão expressos como média ± DP, analisados pelo ANOVA de uma via com pós teste de Turkey. Os resultados foram considerados significativos quando o  $p < 0,05$ , onde, \* comparações com o grupo TPA e \$ comparação da dose 3mg/orelha de BCA em relação as outras doses de BCA.

Na avaliação do efeito da BCA sobre a atividade da Mieloperoxidase (MPO), os efeitos dos tratamentos entre os grupos se mostraram de forma equiparada ao efeito no peso da orelha. Assim, o TPA levou ao aumento da atividade da MPO, quando comparado ao grupo Veículo ( $33,40 \pm 9,47$  vs  $12,22 \pm 1,98$ ;  $p < 0,0001$ ). Quando as orelhas foram tratadas com a BCA 3 mg/orelha, houve redução desse parâmetro, comparado ao grupo induzido (TPA) ( $16,82 \pm 4,25$  vs  $33,40 \pm 9,47$ ;  $p < 0,0001$ ). Ainda o tratamento com dexametasona (DEXA) também reduziu a MPO ( $14,81 \pm 4,36$  vs  $33,40 \pm 9,47$ ;  $p < 0,0001$ ) (Figura 5).



**Figura 5. Determinação da atividade de MPO nas orelhas, para avaliar infiltrado de neutrófilos.** Foi induzido o edema nos animais com TPA 1 µg/orelha e tratados por via tópica com biochanina A (BCA) 3 mg/orelha ou dexametasona (DEXA) 0,05 mg/orelha. Dados expressos como média ± DP, analisados pela ANOVA de uma via e pós teste de Turkey. Os resultados fixados como significativo em  $p < 0.05$ , onde # refere-se as comparações com o grupo veículo, e \* as comparações com o grupo TPA.

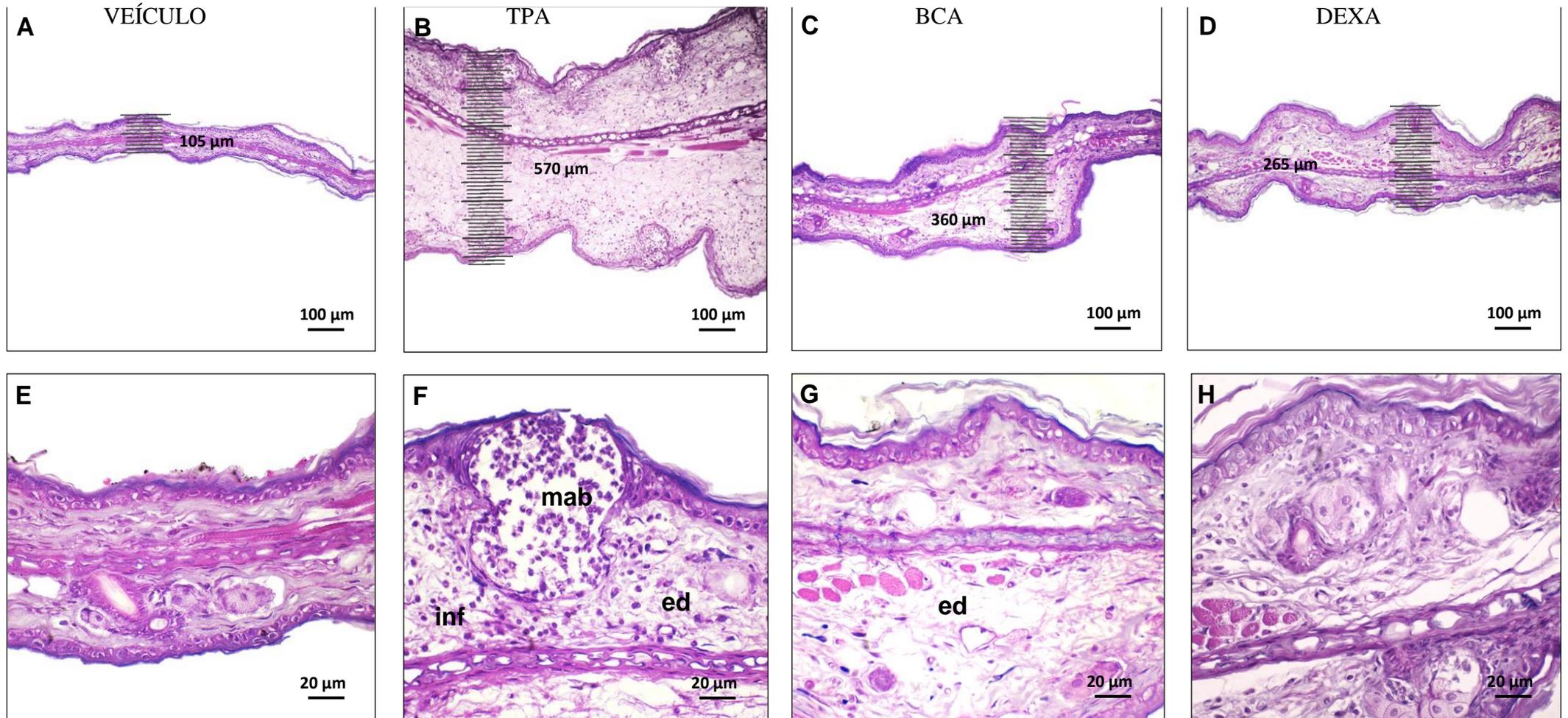
Na análise histológica dos diferentes grupos experimentais (Figura 6), os principais resultados histomorfológicos foram: No grupo veículo (Figura 6E), a epiderme encontrou-se constituída de epitélio pavimentoso estratificado delgado de superfície ortoqueratinizada e camada granulosa pouco evidente. Anexos cutâneos, como glândulas sebáceas, com características morfológicas usuais foram observados. Na derme papilar, onde são vistas as invaginações glandulares representadas pelos anexos cutâneos, evidenciou-se tecido conjuntivo fibroso moderadamente colagenizado, rico em feixes de fibras colágenas depositadas paralelamente à superfície epidérmica. Acompanhando a direção dos feixes colagênicos foram observadas células fusiformes com núcleos bastante alongados e delgados e citoplasma escasso e de limites indistintos, interpretadas como fibroblastos maduros. A derme reticular, mais profunda, apresenta tecido conjuntivo fibroso mais densamente compactado, por vezes entremeado por células adiposas com distribuição irregular e, eventualmente, tecido muscular estriado esquelético.

No grupo TPA (Figura 6F) foi observado tecido epidérmico constituído de epitélio pavimentoso estratificado ortoqueratinizado delgado, com presença de eventuais fâneros cutâneos (folículos pilosos e glândulas sebáceas). Os queratinócitos exibiam grande

degeneração vacuolar hidrópica (edema intracelular) e, em áreas focais, foi observada a formação de microabscessos intraepiteliais contendo grande quantidade de neutrófilos em seu interior. Os fâneros cutâneos, por sua vez, apresentavam-se infiltrados e parcialmente destruídos por células inflamatórias (inflamação intra e perianexial). Na derme, foi visto intenso edema intersticial, expresso por grande perda de eosinofilia do tecido conjuntivo fibroso e aumento importante do espaço interfibrilar (entre as fibrilas de colágeno). Foi observado ainda, a presença de rica rede de vasos sanguíneos hiperemiados (interpretados como capilares, vênulas e eventuais linfáticos) sustentando o tecido conjuntivo. A presença de neutrófilos fazendo marginação leucocitária na parede de vênulas foi um achado frequente. O tecido conjuntivo edemaciado também exibia intenso infiltrado inflamatório, constituído por linfócitos, plasmócitos, histiócitos e também polimorfonucleares, especialmente nas adjacências do tecido epitelial epidérmico.

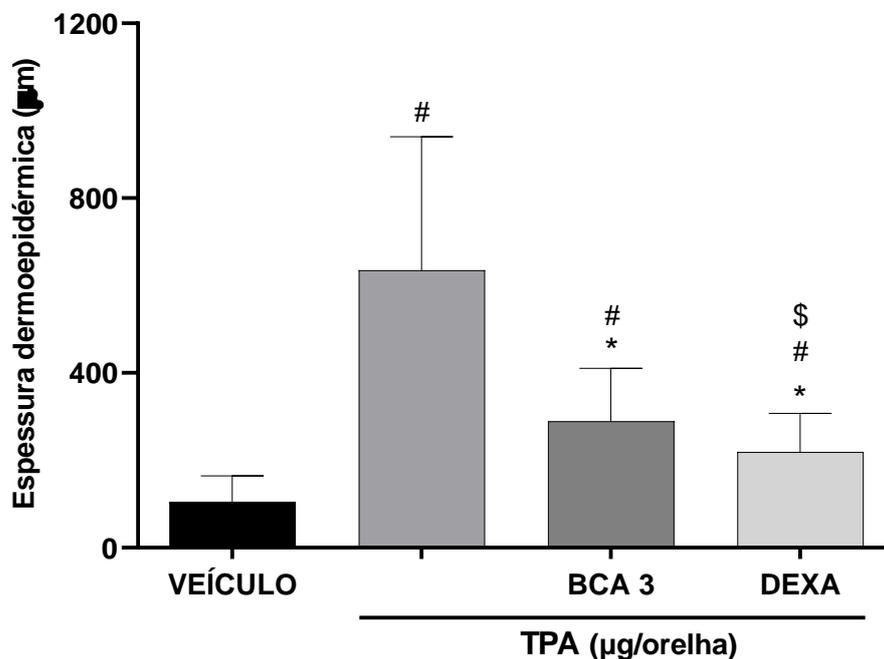
O grupo BCA (Figura 6G) se caracterizou por epiderme formada pelo epitélio pavimentoso estratificado, predominantemente delgada, com discretos focos de espessamento, mas exibindo grande degeneração vacuolar hidrópica (edema intracelular dos queratinócitos). Os anexos cutâneos foram observados, mas não foram evidenciados sinais morfológicos de inflamação intra ou perianexial, bem como, microabscessos intraepidérmicos. Na derme, foi observado edema intersticial de leve intensidade do tecido conjuntivo fibroso, concentrado principalmente na derme profunda e interface com a hipoderme, com pouco ou nenhum extravasamento de fibrina e infiltrado inflamatório se mostrou discreto.

Com relação ao grupo DEXA, foi observado que o tecido epidérmico se apresentou caracteristicamente delgado, com extensa degeneração vacuolar hidrópica. Os anexos cutâneos exibiam aspecto de normalidade. Na derme subjacente evidenciou-se tecido conjuntivo fibroso denso, moderadamente celularizado e exibindo discreto edema intersticial, sustentado por vasos capilares, alguns deles hiperemiados, com infiltrado inflamatório bastante discreto e focal.



**Figura 6. Principais características histopatológicas da orelha.** Foi induzido o edema nos animais com TPA 1  $\mu\text{g}$ /orelha e tratados por via tópica com biochanina A (BCA) 3 mg/orelha ou dexametasona (DEXA) 0,05 mg/orelha. Fotomicrografias de secções histológicas coradas em HE da pele de orelha dos grupos experimentais. (A – D) Visão panorâmica (100 x) representativas das diferenças na espessura média do tecido dermoepidémico entre os grupos. (E – F) Detalhe da epiderme (ep) e derme (de) nos diferentes grupos experimentais (400 x). Notar epiderme delgada típica e derme formada por tecido conjuntivo fibroso denso no grupo Veículo, mas focos de espessamento e formação de microabscessos epidérmicos, assim como intenso edema intersticial e infiltrado inflamatório no grupo TPA. Alterações morfológicas inflamatórias e edematosas substancialmente reduzidas nos grupos BCA e DEXA. **Legendas:** mab – microabscessos intraepidérmicos; inf – infiltrado inflamatório; ed – edema intersticial

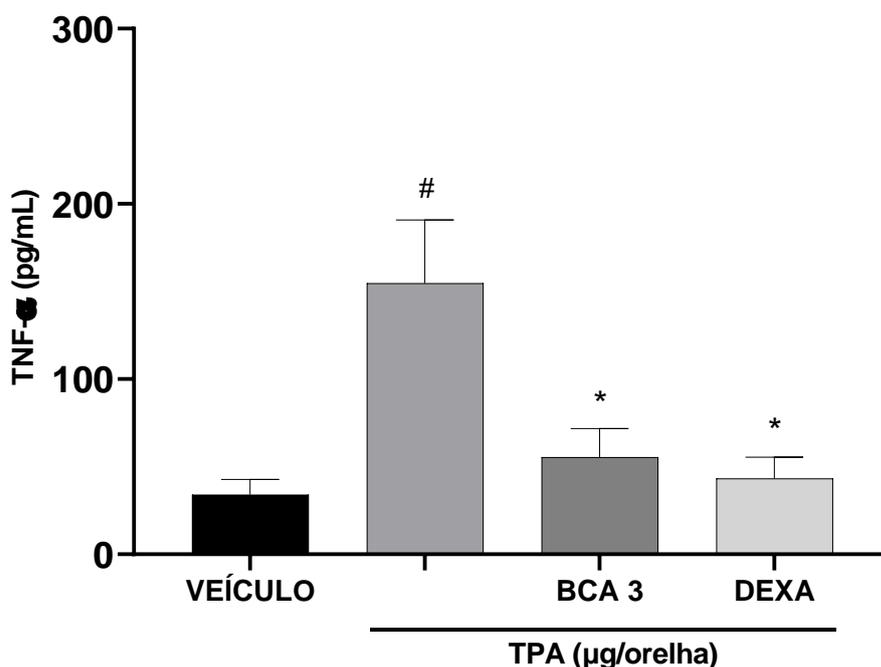
Na análise morfométrica da espessura do tecido dermoepidérmico o grupo induzido por TPA levou ao aumento da espessura, quando comparado ao grupo Veículo ( $634,9 \pm 305,3$  vs  $104,3 \pm 59,8$ ;  $p < 0,0001$ ). Para as orelhas tratadas com a BCA 3 mg/orelha, houve redução do parâmetro, comparado ao grupo TPA ( $289,0 \pm 121,6$  vs  $634,9 \pm 305,3$ ;  $p < 0,0001$ ). O tratamento com DEXA também reduziu a espessura do tecido quando comparado ao grupo TPA ( $219,0 \pm 88,7$  vs  $634,9 \pm 305,3$ ;  $p < 0,0001$ ). Porém, o grupo DEXA promoveu redução ainda mais significativa, exibindo espessura dermoepidérmica média menor que o grupo BCA ( $289,0 \pm 121,6$  vs  $219,0 \pm 88,7$ ;  $p = 0,0184$ ) (Figura 7).



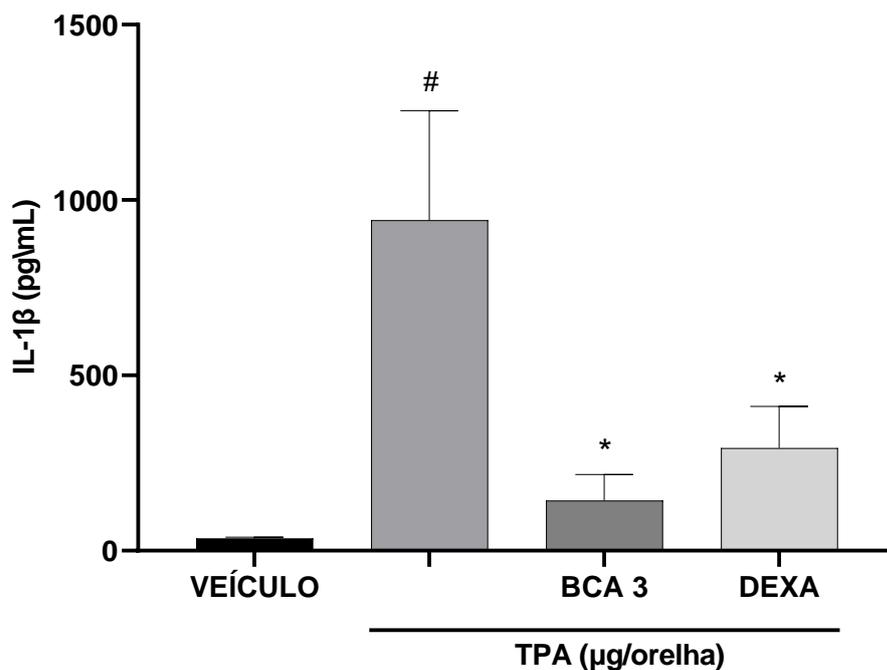
**Figura 7. Avaliação da espessura dermoepidérmica média dos espécimes obtidos.** Foi induzido o edema nos animais com TPA 1 µg/orelha e tratados por via tópica com biochanina A (BCA) 3 mg/orelha ou dexametasona (DEXA) 0,05 mg/orelha. Dados expressos como média ± DP, analisados pela ANOVA de uma via e pós teste de Turkey. Os resultados fixados como significativo em  $p < 0,05$ , onde # refere-se as comparações com o grupo veículo, \* as comparações com o grupo TPA e \$ comparação da BCA.

Para avaliar o efeito da BCA sobre a inflamação promovida pelo TPA, as citocinas pró-inflamatórias, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, foram quantificadas (no tecido). Foi observado um aumento significativo na concentração tecidual de todas citocinas no grupo TPA, quando comparado ao grupo Veículo: TNF- $\alpha$  ( $154,8 \pm 36,1$  vs  $34,1 \pm 8,8$ ;  $p < 0,0001$ ); IL-1 $\beta$  ( $820,2 \pm 431,6$  vs  $44,99 \pm 27,03$ ;  $p < 0,0001$ ); IL-6 ( $995,83 \pm 345,24$  vs  $70,69 \pm 56,09$ ;  $p < 0,0001$ ). Quando as orelhas foram tratadas com a BCA 3 mg/orelha, houve redução desse parâmetro, comparado ao grupo induzido (TPA) na concentração da citocina TNF- $\alpha$  ( $55,4 \pm 16,3$  vs  $154,8 \pm 36,1$ ;  $p < 0,0001$ ), da IL-1 $\beta$  ( $159,5 \pm 81,36$  vs  $820,19 \pm 431,62$ ;  $p < 0,0001$ ), da IL-6 ( $149,48 \pm 97,01$  vs  $995,83 \pm 345,24$ ;  $p < 0,0001$ ). Do mesmo modo, o tratamento com dexametasona (DEXA) reduziu todas as citocinas avaliadas, quando comparado ao grupo TPA: TNF- $\alpha$  ( $43,3 \pm 12,2$  vs  $154,8 \pm 36,1$ ;  $p < 0,0001$ ); IL-1 $\beta$  ( $292,95 \pm 118,55$  vs  $820,19 \pm 431,62$ ;  $p < 0,0001$ ); IL-6 ( $149,62 \pm 65,58$  vs  $995,83 \pm 345,24$ ;  $p < 0,0001$ ) (Figura 8).

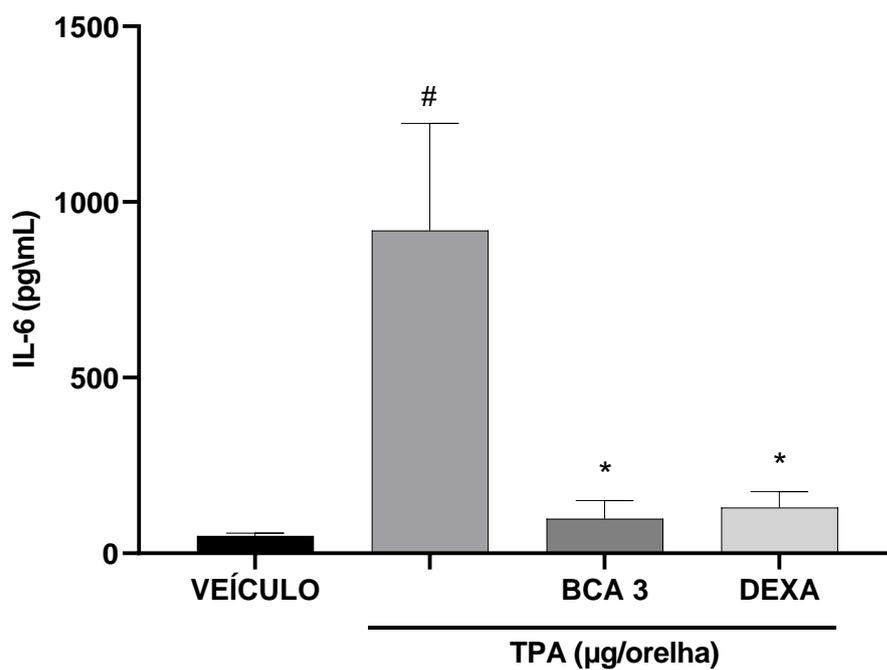
A)



B)



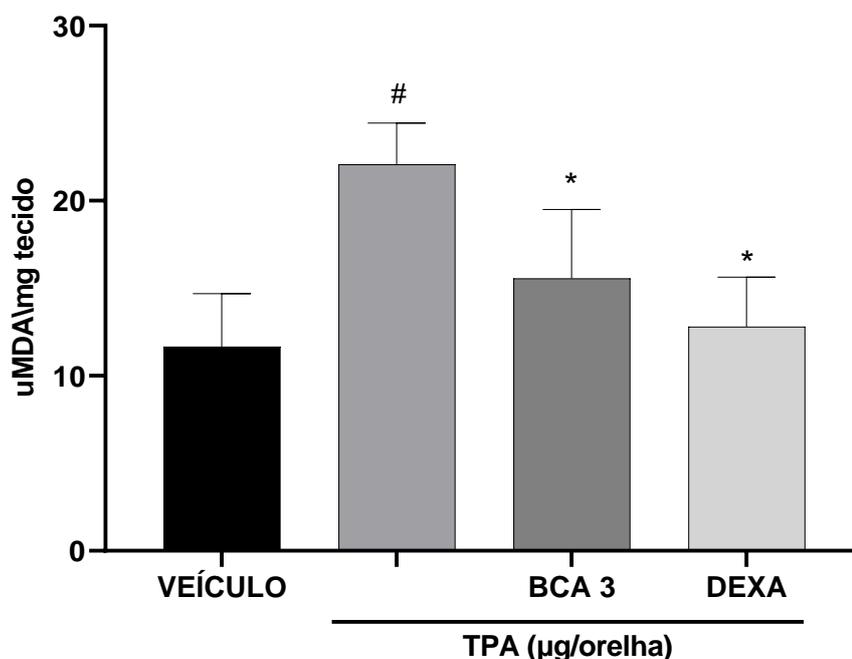
C)



**Figura 8. Concentração de citocinas na orelha.** TNF- $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B) e IL-6 (C). Foi induzido o edema nos animais com TPA 1  $\mu$ g/orelha e tratados por via tópica com biochanina A (BCA) 3 mg/orelha ou dexametasona (DEXA) 0,05 mg/orelha. Dados expressos como média  $\pm$  DP, analisados pela ANOVA de uma via e pós teste de Turkey. Os resultados fixados como significativo em  $p < 0.05$ , onde # refere-se as comparações com o grupo veículo e \* as comparações com o grupo TPA.

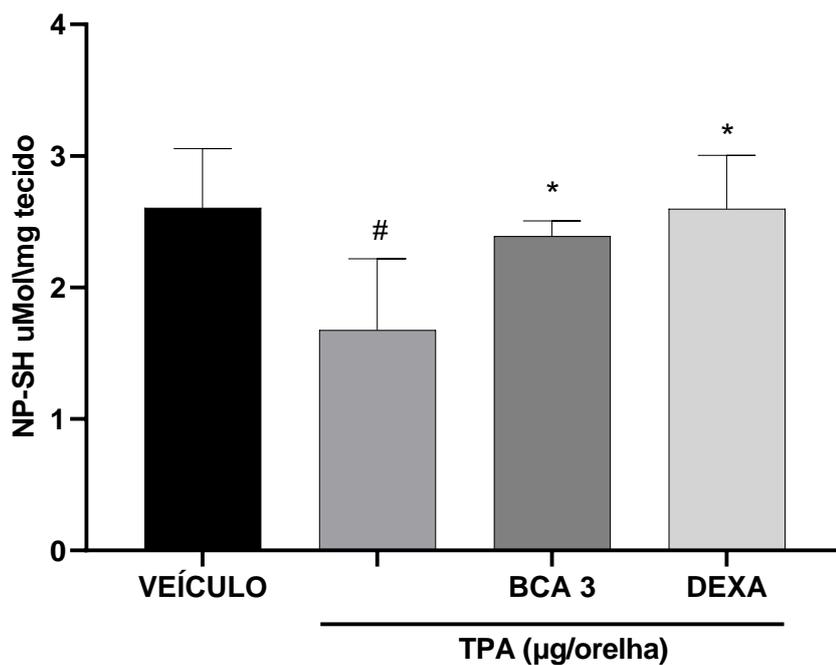
Na análise do estresse oxidativo do tecido, foi observado aumento da peroxidação

lipídica, demonstrada pela quantificação do TBARS para o grupo TPA, quando comparado ao grupo Veículo ( $140,61 \pm 133,86$  vs  $97,40 \pm 104,21$ ;  $p < 0,0001$ ). Quando as orelhas foram tratadas com a BCA 3 mg/orelha, houve redução desse parâmetro, comparado ao grupo induzido (TPA) ( $124,48 \pm 119,47$  vs  $140,61 \pm 133,86$ ;  $p < 0,0108$ ). O tratamento com DEXA reduziu esse parâmetro, quando comparado ao grupo TPA ( $122,76 \pm 123,89$  vs  $140,61 \pm 133,86$ ;  $p < 0,0002$ ) (Figura 9).



**Figura 9. Avaliação da peroxidação lipídica.** Foi induzido o edema nos animais com TPA 1 µg/orelha e tratados por via tópica com biochanina A (BCA) 3 mg/orelha ou dexametasona (DEXA) 0,05 mg/orelha. Dados expressos como média ± DP, analisados pela ANOVA de uma via e pós teste de Turkey. Os resultados fixados como significativo em  $p < 0,05$ , onde # refere-se as comparações com o grupo veículo, e \* as comparações com o grupo TPA.

O potencial antioxidante da BCA foi avaliado pela determinação de grupos sulfidrilas (NP-SH). Assim, observou-se que houve redução desses grupos, para o grupo TPA, quando comparado ao grupo Veículo ( $1,88 \pm 0,72$  vs  $2,39 \pm 0,69$ ;  $p < 0,0044$ ). Quando as orelhas foram tratadas com a BCA 3 mg/orelha, houve aumento desse parâmetro, comparado ao grupo TPA ( $2,46 \pm 0,18$  vs  $1,87 \pm 0,72$ ;  $p < 0,0320$ ). O tratamento com DEXA também aumentou os grupos NP-SH quando comparado com grupo TPA ( $2,40 \pm 0,64$  vs  $1,88 \pm 0,72$ ;  $p < 0,0046$ ). Já o grupo BCA aumentou esse parâmetro de forma que não apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo Veículo ( $2,46 \pm 0,18$  vs  $2,39 \pm 0,69$ ;  $p = 0,8039$ ) (Figura 10).



**Figura 10. Determinação de grupos sulfidrilas (NP-SH).** Foi induzido o edema nos animais com TPA 1  $\mu\text{g}/\text{orelha}$  e tratados por via tópica com biochanina A (BCA) 3  $\text{mg}/\text{orelha}$  ou dexametasona (DEXA) 0,05  $\text{mg}/\text{orelha}$ . Dados expressos como média  $\pm$  DP, analisados pela ANOVA de uma via e pós teste de Turkey. Os resultados fixados como significativo em  $p < 0,05$ , onde # refere-se as comparações com o grupo veículo, e \* as comparações com o grupo TPA.

## 6 Discussão

O presente estudo investigou pela primeira vez, o efeito da administração tópica da biochanina A na inflamação cutânea aguda em orelha de camundongos. Para avaliação de agentes anti-inflamatório tópico ou sistêmico, a literatura evidencia, que o modelo de inflamação induzida por TPA é bem descrito, estabelecido e utilizado, como demonstrado por Wu e colegas (2020) no modelo de inflamação aguda induzido por TPA e tratado com crisoeriol. Hiraganahalli e colaboradores (2021), no modelo de psoríase induzida pelo mesmo agente e tratado com baricitinibe, e Ma e colegas (2013) no modelo de tumorigênese cutânea induzida por DMBA/TPA e tratado com baicaleína.

O TPA é um éster de forbol, pertencente a uma família de agentes inflamatórios/tumorais, que pode estimular ou aprisionar a proliferação celular, a depender do tipo de célula (Isonishi et al., 2000). O processo inflamatório induzido pelo mesmo é iniciado a partir de 2 horas da administração e chega ao pico após 6hs, tal processo acontece, pela sua capacidade de ativar a proteína quinase C (PKC), e assim, induzir resposta inflamatória, em interação com o diacilglicerol (DAG),  $Ca^{2+}$  ou fosfatidilserina (Gorzalczani et al, 2009; Oliveira et al., 2017; Isonishi et al., 2000).

A Biochanina A é uma isoflavona, subclasse de flavonóides, que tem sua atividade anti-inflamatória demonstrada pela redução dos mediadores inflamatórios, que incluem as citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (pela inibição da transcrição gênica induzida por NF- $\kappa$ B) (Zang et al., 2020). Além disso, flavonóides foram descritos como inibidores da PKC e das as vias da ciclo-oxigenase e/ou da 5-lipoxigenase do metabolismo do araquidonato (Gorzalczani et al., 2009; Ramachandram et al., 2022).

No presente estudo, foi demonstrado que a BCA administrada de forma tópica apresentou efeito anti-inflamatório, inibindo tanto o edema, quanto a migração de neutrófilos (evidenciado pela atividade da enzima MPO). Complementarmente, o efeito da BCA, sobre o edema, foi comprovado a partir da análise histopatológica. Esse resultado corrobora os achados de Hur et al. (2010), que mostrou no modelo de edema de orelha de camundongo induzido por irradiação UVB, TPA, ácido araquidônico ou óleo de cróton e tratado com homoisoflavona, uma redução equiparada tanto no peso da orelha, quanto no infiltrado celular. Em consonância com os nossos dados, a análise histológica demonstrou redução da espessura da pele (Hur et al., 2010). No estudo de Li et al. (2018), também foi demonstrado uma redução da espessura da orelha dos camundongos e do infiltrado de células inflamatórias, em um modelo de inflamação semelhante à psoríase, induzido por imiquimode em

camundongos e tratado com extrato de isoflavona (genisteína e daidzeína).

Ainda, sobre a análise histológica, pode-se inferir, consonância com os estudos de Hur et al. (2010) e Chang et al. (2021), que avaliou a infiltração e hiperplasia de células epidérmicas humanas, em um modelo de dermatite atópica induzida por lipossacarídeos e tratado com o fitoestrógeno glabridina, que demonstrou redução do edema intra e extracelular nos queratinócitos NHEK e HaCat, pela regulação negativa da via de sinalização TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B (Chang et al., 2021).

Adicionalmente, a Biochanina A, administrada por via tópica diminuiu a concentração tecidual de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, que desempenham uma série de eventos, mediando tanto a resposta vascular quanto a resposta celular na inflamação (Fan et al., 2021). Esses resultados foram reforçados no trabalho de Zhang et al. (2021), no modelo de eritema induzido por radiação UVB e tratado com o lipossoma de glabridina, que reduziu a concentração de IL-6 e TNF- $\alpha$ .

As citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 são consideradas as primeiras produzidas pelas células epiteliais (Fan et al., 2021). O TNF- $\alpha$  está intimamente ligado à permeabilidade vascular, à indução da expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais, bem como, à indução da expressão de IL-1 $\beta$  e IL-6 (Murakawa et al., 2006; Zhang et al., 2014). A IL-1 $\beta$  está envolvida na estimulação de proteínas de fase aguda, ativação de neutrófilos e proliferação de outras células do sistema imune (Mckenzie e Sauder, 1990; Asahina e Maeda, 2017). Além disso, a elevação nas concentrações teciduais de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 induzidas pela administração tópica de TPA é bem estabelecida na literatura, bem como, é um marcador muito importante para investigação de mecanismos de ação anti-inflamatória de vários compostos (Liu et al., 2015; Zeng et al., 2018).

Além da atividade anti-inflamatória, a Biochanina A possui atividade antioxidante descrita na literatura (Zhou et al., 2021). O desequilíbrio causado por radicais livres, pode gerar riscos importantes ao funcionamento biológico de sistemas corporais, com isso, se faz necessário a redução dos radicais livres e ativação dos sistemas de defesa do corpo. Nesse contexto, a Biochanina A se mostrou capaz de reduzir a lesão oxidativa pela ativação de Nrf2 e regulação positiva das enzimas SOD, CAT e GPX (Sarfranz et al., 2020).

Nesse estudo, a peroxidação lipídica determinada pela concentração de MDA, (TBARS), no qual, os grupos Veículo, DEXA e BCA, apresentaram menor peroxidação lipídica no tecido, comparados ao grupo TPA. Esses resultados, corroboram os achados de Widyarini et al. (2012), que demonstraram a redução significativa da peroxidação lipídica

determinada por TBARS, em um modelo induzido por radiação UV, tratada com a isoflavona equol por via tópica.

Adicionalmente, foi realizada a quantificação de grupos sulfidrila. Tais grupos são referidos como tióis, presentes em peptídeos no organismo, importantes para a função e estrutura de várias proteínas. Essas moléculas são encontradas de forma abundante no corpo e atuam tanto como antioxidante, quanto como desintoxicação celular e na regulação da atividade enzimática antioxidante. Dessa maneira, o dano em proteínas pode ser mensurado através da determinação de tal grupo, de forma inversamente proporcional (Halliwell; Gutteridge, 2015; Li et al., 2017).

Desse modo, os resultados encontrados nos experimentos sugerem que a BCA tem ação por via tópica e apresenta atividade anti-inflamatória e antioxidante, na inflamação aguda induzida por TPA. Contudo, mais estudos devem ser conduzidos para elucidar o mecanismo envolvido, pois trata-se de um modelo inicial para vislumbrar um potencial efeito em afecções de pele.

## **7 Conclusão**

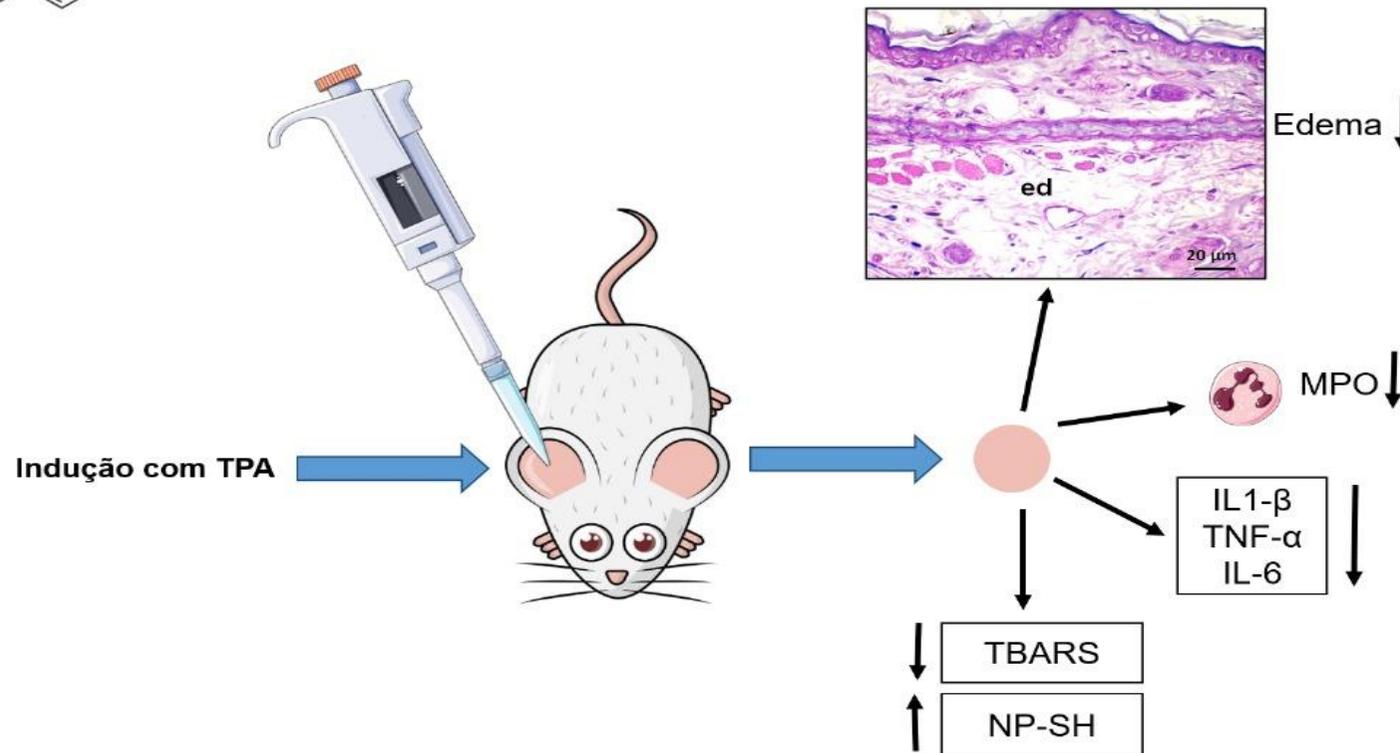
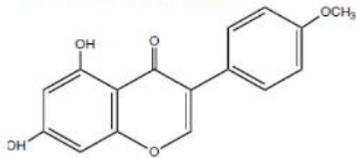
Neste estudo foi demonstrado que a biochanina A (BCA) tem efeito anti-inflamatório e antioxidante tópico em modelo animal de inflamação aguda induzida por TPA na pele, caracterizado pela redução do edema, citocinas inflamatórias, estresse oxidativo demonstrado pela redução de MDA e aumento de NP-SH. Esses resultados, sugerem que a BCA, pode, futuramente, ser uma excelente escolha para investigações sobre o tratamento de afecções inflamatórias na pele.

## **8 Perspetivas futuras**

Espera-se investigar os mecanismos de ação pelos quais a BCA exerce seu efeito anti-inflamatório e antioxidante em modelo de inflamação tópica induzido por TPA. Deve-se ainda, investigar a atividade da Biochanina A através de outras análises antioxidantes, como determinação de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx), bem como, atividade de Nrf2 para auxiliar na comprovação do efeito antioxidante, em processos inflamatórios crônico, afecções de pele mais próximas das reais, formulas farmacêuticas que possam viabilizar o uso do composto e investigar possíveis efeitos adversos.

## 9 Resumo gráfico

### Biochanina A



**Figura 11. Resumo gráfico do estudo.** O edema de orelha foi induzido na orelha direita de cada animal com aplicação tópica do TPA (12-O-tetradecanoilforbol acetato) e tratado com biochanina A (BCA) ou DEXA (dexametosona), na orelha esquerda foi aplicado acetona 60%. Seguido das análises do edema de orelha em gramas, mieloperoxidase (MPO), citocinas pró-inflamatórias: interleucina um beta (IL-1 $\beta$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina seis (IL-6), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e grupos sulfidrilas (NP-SH).

## 10 Referências

- ADIL, M.; AMIN, S. S.; MOHTASHIM, M. N-acetylcysteine in dermatology. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 84, p. 652, 1 nov. 2018.
- ANGEL, P.; SZABOWSKI, A.; SCHORPP-KISTNER, M. Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. **Oncogene**, v. 20, n. 19, p. 2413, 2001.
- ANSEL, J. et al. Cytokine Modulation of Keratinocyte Cytokines. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 94, n. 6, Supplement, p. s101–s107, 1 jun. 1990.
- ASAHINA, R.; MAEDA, S. A review of the roles of keratinocyte-derived cytokines and chemokines in the pathogenesis of atopic dermatitis in humans and dogs. **Veterinary Dermatology**, v. 28, n. 1, p. 16-e5, fev. 2017.
- BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. Douglas. Drug discovery from medicinal plants. **Life sciences**, v. 78, n. 5, p. 431-441, 2005.
- BARBOSA, M. H.; ZUFFI, F. B.; MARUXO, H. B.; JORGE, L. L. R. Therapeutic properties of propolis for treatment of skin lesions. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 22, n. 3, p. 318-322, 2009.
- BLUMBERG, P. M. Protein Kinase C as the Receptor for the Phorbol Ester Tumor Promoters: Sixth Rhoads Memorial Award Lecture. **Cancer Research**, v. 48, n. 1, p. 1–8, 1 jan. 1988.
- BONFIM, R. R.; PAIVA-SOUZA, I. O., MORAES, J. P., PEREIRA, D. S., SANTOS, C. A., SANTANA, D. G., CAMARGO, E. A. Isopropoxy-carvacrol, a derivative obtained from carvacrol, reduces acute inflammation and nociception in rodents. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 115, n. 3, p. 237-243, 2014.
- BOSE. R.; SUTHERLAND, G.R; PINSKY, C. Biological and methodological implications of prostaglandin involvement in mouse brain lipid peroxidation measurements. **Neurochem Res.**, v. 14, n. 3, p. 217–20, 1989.
- BRADLEY, P. P. et al. Measurement of Cutaneous Inflammation: Estimation of Neutrophil Content with an Enzyme Marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, n. 3, p. 206–209, mar. 1982a.

- CALDER, P. C. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 75, n. 3, p. 197–202, set. 2006.
- CHANG, J. et al. Glabridin attenuates atopic dermatitis progression through downregulating the TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway. **Genes & Genomics**, v. 43, n. 8, p. 847–855, ago. 2021.
- CHIBLI, L. A.; RODRIGUES, K. C. M.; GASPARETTO, C. M.; PINTO, N. C.; FABRI, R.L.; SCIO, E.; SOUZA, O. V. Anti-inflammatory effects of Bryophyllum pinnatum (Lam.) Oken ethanol extract in acute and chronic cutaneous inflammation. **Journal of ethnopharmacology**, v. 154, n. 2, p. 330–338, 2014.
- CHO, I. A. et al. Biochanin-A induces apoptosis and suppresses migration in FaDu human pharynx squamous carcinoma cells. **Oncology Reports**, v. 38, n. 5, p. 2985–2992, 2017
- DI MEGLIO, P.; PERERA, G. K.; NESTLE, F.O. O órgão multifareta: informações recentes sobre a função imunológica da pele. **Immunity**, v. 35, p. 857–869, 2011.
- FAN, P. et al. Anti-atopic effect of Viola yedoensis ethanol extract against 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis-like skin dysfunction. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 280, p. 114474, 15 nov. 2021.
- FELIX, F. B. et al. Biochanin A as a modulator of the inflammatory response: An updated overview and therapeutic potential. **Pharmacological Research**, v. 180, p. 106246, 1 jun. 2022.
- FELIX, F. B. et al. Biochanin A attenuates zymosan-induced arthritis in mice similarly to 17- $\beta$  estradiol: an alternative to hormone replacement therapy? **Inflammation Research**, v. 69, n. 12, p. 1245–1256, dez. 2020.
- FELIX, F. B. et al. Biochanin A Regulates Key Steps of Inflammation Resolution in a Model of Antigen-Induced Arthritis via GPR30/PKA-Dependent Mechanism. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, 2021.
- FORTES, T. M. L.; SUFFREDINI, I. B. Avaliação de pele em idoso: revisão da literatura. **J Health Sci Inst.** [Internet], v. 32, n. 1, 2014.
- GAJIĆ, I. et al. Electrospun Poly(lactide) Fibers as Carriers for Controlled Release of Biochanin A. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 3, p. 528, mar. 2022.
- GENÉ, E.; CALVET, X.; MORÓN, A.; IGLESIAS, M.L. Recommendations for the use of

antiinflammatory drugs and indications for gastrointestinal protection in emergency departments. **Emergências**, v. 21, p. 295-300, 2009.

GENSEL, J. C. et al. Topiramate Treatment Is Neuroprotective and Reduces Oligodendrocyte Loss after Cervical Spinal Cord Injury. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. e33519, 13 mar. 2012.

GIODA, C.R.; DE OLIVEIRA BARRETO, T.; PRÍMOLA-GOMES, T.N.; DE LIMA, D.C.; CAMPOS, P. P.; CAPETTINI, L. S. A. Cardiac oxidative stress is involved in heart failure induced by thiamine deprivation in rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 298, n. 6, p. 2039-2045, 2010.

GORZALCZANY, S. et al. Anti-inflammatory activity of *Heterotheca subaxillaris* var. *latifolia* (Buckley) Gandhi & R.D. Thomas, Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 876–879, dez. 2009.

GUO, L. Y.; HUNG, T. M.; BAE, K. H.; SHIN, E. M.; ZHOU, H. Y.; HONG, Y. N.; KIM, Y. S. Anti-inflammatory effects of schisandrin isolated from the fruit of *Schisandra chinensis* Baill. **European journal of pharmacology**, v. 591, n. 1-3, p. 293-299, 2008.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free radicals in Biology and Medicine*. 5th ed. New York: **Oxford University Press**, 2015.

HIRAGANAHALLI BHASKARMURTHY, D.; EVAN PRINCE, S. Effect of Baricitinib on TPA-induced psoriasis like skin inflammation. **Life Sciences**, v. 279, p. 119655, ago. 2021.

HUR, S. et al. Homoisoflavanone inhibits UVB-induced skin inflammation through reduced cyclooxygenase-2 expression and NF-kappaB nuclear localization. **Journal of Dermatological Science**, v. 59, n. 3, p. 163–169, set. 2010.

IANCK, Melissa de Araujo et al. Conhecimento e uso de plantas medicinais por usuários de unidades básicas de saúde na região de Colombo-PR. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v. 11, n. 8, p. 29-30, 2017.

ISONISHI, S. et al. Depletion of protein kinase C (PKC) by 12- O -tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) enhances platinum drug sensitivity in human ovarian carcinoma cells. **British Journal of Cancer**, v. 82, n. 1, p. 34–38, jan. 2000.

JANNAT, A. et al. Expression of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) and interleukin-6 (-174-G/C) polymorphism in atopic conditions. **PloS One**, v. 14, n. 6, p. e0219084, 2019.

- KANITAKIS, J. Indirect immunofluorescence microscopy for the serological diagnosis of autoimmune blistering skin diseases: A review. **Clinics in Dermatology**, v. 19, n. 5, p. 614–621, 1 set. 2001.
- KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature reviews Drug discovery**, v. 4, n. 3, p. 206, 2005.
- LI, C.; FENG, F.; XIONG, X.; LI, R.; CHEN, N. Exercise coupled with dietary restriction reduces oxidative stress in male adolescents with obesity. **Journal of Sports Sciences**, v. 35, n. 7, p. 663–668, 2017.
- LI, H.-J. et al. The Therapeutic Potential and Molecular Mechanism of Isoflavone Extract against Psoriasis. **Scientific Reports**, v. 8, p. 6335, 20 abr. 2018.
- LI, X. et al. Biochanin A attenuates spinal cord injury in rats during early stages by inhibiting oxidative stress and inflammasome activation. **Neural Regeneration Research**, v. 19, n. 9, p. 2050–2056, 1 set. 2024.
- LIU, XINGKAI; WANG, T.; LIU, XUESHIBOJIE; CAI, L.; QI, J.; ZHANG, P.; LI, Y. Biochanin A protects lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute liver injury in mice by activating the Nrf2 pathway and inhibiting NLRP3 inflammasome activation. **International Immunopharmacology**, v. 38, p. 324–331, 2016.
- MA, G.-Z. et al. Baicalein inhibits DMBA/TPA-induced skin tumorigenesis in mice by modulating proliferation, apoptosis, and inflammation. **Inflammation**, v. 36, n. 2, p. 457–467, abr. 2013.
- MADESH, M.; BALASUBRAMANIAN, K. A. Microtiter plate assay for superoxide dismutase using MTT reduction by superoxide. **Indian J Biochem Biophys**, v. 35, n. 3, p. 184–8, 1998.
- MAJTAN, J.; BUCEKOVA, M.; JESENAK, M. Natural Products and Skin Diseases. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 26, n. 15, p. 4489, 25 jul. 2021.
- MCKENZIE, R. C.; SAUDER, D. N. The role of keratinocyte cytokines in inflammation and immunity. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 95, n. 6 Suppl, p. 105S-107S, dez. 1990.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation, **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428–435, jul. 2008.

- MEDZHITOV, R. The spectrum of inflammatory responses. **Science**, v. 374, n. 6571, p. 1070–1075, 26 nov. 2021.
- MENDONÇA, V. A.; COSTA, R. D.; DE MELO, G. E. B. A.; ANTUNES, C. M.; TEIXEIRA, A. L. Imunologia da hanseníase immunology of leprosy. **An Bras Dermatol**, v. 83, n. 4, p. 343–50, 2008.
- MOON, Y. J.; SAGAWA, K.; FREDERICK, K.; ZHANG, S.; MORRIS, M. E. Pharmacokinetics and bioavailability of the isoflavone biochanin A in rats. **AAPS Journal**, v. 8, n. 3, p. 433–442, 2006.
- MULLER, W. A. How endothelial cells regulate transmigration of leukocytes in the inflammatory response. **The American Journal of Pathology**, v. 184, n. 4, p. 886–896, abr. 2014.
- MURAKAWA, M. et al. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, n. 9, p. 1331–1336, 28 abr. 2006.
- NAPOLITANO, M. et al. Role of Aryl Hydrocarbon Receptor Activation in Inflammatory Chronic Skin Diseases. **Cells**, v. 10, n. 12, p. 3559, 16 dez. 2021.
- NATHAN, C. Nonresolving inflammation redux. **Immunity**, v. 55, n. 4, p. 592, 4 abr. 2022.
- NEITZEL, J. J. Fatty Acid Molecules: A Role in Cell Signaling. **Nature Education**, v. 3, n. 9, 2010.
- NELSON, D. P.; KIESOW, L. A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solutions in the UV). **Anal Biochem**, v. 49, n. 2, p. 474–8, 1972.
- OH, J. S. et al. Biochanin-A antagonizes the interleukin-1 $\beta$ -induced catabolic inflammation through the modulation of NF $\kappa$ B cellular signaling in primary rat chondrocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 477, n. 4, p. 723–730, 2016.
- OLIVEIRA, A. S.; CERCATO, L. M.; SOUZA, M. T. S.; MELO, A. J. O.; LIMA, B. D. S.; DUARTE, M. C.; CAMARGO, E. A. The ethanol extract of *Leonurus sibiricus* L. induces antioxidant, antinociceptive and topical anti-inflammatory effects. **J Ethnopharmacol**, v. 206, p. 144–51, 2017.
- PAGLIA, D.E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **J Lab Clin Med**. v. 70, n. 1, p. 158–69,

1967.

PASPARAKIS, Manolis; HAASE, Ingo; NESTLE, Frank O. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. **Nature reviews immunology**, v. 14, n. 5, p. 289, 2014.

PERALEA, G.; ROSSIA, F.; SANTOROA, M.; PEVIANIB, M.; PAPAB, S.; LLUPIB, D.; TORRIANIA, P.; MICOTTIB, E.; PREVIDID, S.; CERVOB, L.; SUNDSTRÖMC, E., BOCCACCINIE, A.R.; MASIA, M.; FORLONIB, G.; VEGLIANESEB, P. Multiple drugdelivery hydrogel system for spinal cord injury repair strategies, **Journal of ControlledRelease**; v.159, n. 2, p. 271–280, 2012.

RAMACHANDRAN, V. et al. Biochanin-A: A Bioactive Natural Product with Versatile Therapeutic Perspectives. **Current Drug Research Reviews**, v. 14, n. 3, p. 225–238, [s.d.].

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound Repair and Regeneration. **European Surgical Research**, v. 49, n. 1, p. 35–43, 11 jul. 2012.

RIVERA-YAÑEZ, C. R. et al. Flavonoids Present in Propolis in the Battle against Photoaging and Psoriasis. **Antioxidants**, v. 10, n. 12, p. 2014, dez. 2021.

RODRIGUES, Luciano Miller Reis et al. Biomarcadores inflamatórios no plasma de pacientes com degeneração do disco intervertebral. **Einstein (São Paulo)**, v. 17, n. 4, 2019.

SARFRAZ, A. et al. Biochanin A: A novel bioactive multifunctional compound from nature. **The Science of the Total Environment**, v. 722, p. 137907, 20 jun. 2020.

SAVOIA, P. et al. Anti-oxidative effects of 17  $\beta$ -estradiol and genistein in human skin fibroblasts and keratinocytes. **Journal of Dermatological Science**, v. 92, n. 1, p. 62–77, 1 out. 2018.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem**, v. 25, n. 1, p. 192–205, 1968.

SHUKLA, S. K. et al. Pharmacological control of inflammation in wound healing. **Journal of Tissue Viability**, v. 28, n. 4, p. 218–222, nov. 2019.

SHUTOVA, M. S.; BOEHNCKE, W.-H. Mechanotransduction in Skin Inflammation. **Cells**, v. 11, n. 13, p. 2026, jan. 2022.

SILVA, A. R. et al. Lipid bodies in oxidized LDL-induced foam cells are leukotriene-synthesizing organelles: a MCP-1/CCL2 regulated phenomenon. **Biochimica et Biophysica**

**Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1791, n. 11, p. 1066–1075, 1 nov. 2009.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA. Conheça a pele. 2018. Disponível em: <http://www.sbd.org.br/cuidado/conheca-a-pele/>. Acessado em 19 de maio de 2019.

STANLEY, Elis F. Single calcium channels on a cholinergic presynaptic nerve terminal. **Neuron**, v. 7, n. 4, p. 585-591, 1991.

STOECKLIN, G.; ANDERSON, P. Posttranscriptional Mechanisms Regulating the Inflammatory Response. Em: **Advances in Immunology**. [s.l.] Elsevier, 2006. v. 89p. 1–37.

SUN, W.; SHAHRAJABIAN, M. H. Therapeutic Potential of Phenolic Compounds in Medicinal Plants—Natural Health Products for Human Health. **Molecules**, v. 28, n. 4, p. 1845, jan. 2023.

TIMMERMAN, I. et al. Leukocytes Crossing the Endothelium: A Matter of Communication. In: **International Review of Cell and Molecular Biology**. [s.l.] Elsevier, 2016. v. 322p. 281–329.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, jan. 2007.

VODOVOTZ, Y. et al. Translational Systems Biology of Inflammation. **PLoS Computational Biology**, v. 4, n. 4, p. e1000014, 25 abr. 2008.

WANG, Q. et al. Naturally derived anti-inflammatory compounds from Chinese medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, n. 1, p. 9-39, 2013.

WIDYARINI, S. et al. Photoimmune protective effect of the phytoestrogenic isoflavonoid equol is partially due to its antioxidant activities. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 11, n. 7, p. 1186–1192, 1 jul. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World health statistics 2012. **Statistiques sanitaires mondiales 2012**, p. 176, 2012.

WRIGHT, T. I.; SPENCER, J. M.; FLOWERS, F. P. Chemoprevention of nonmelanoma skin cancer. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 54, n. 6, p. 933–946, 1 jun. 2006.

WU, J.-Y. et al. Chrysoeriol ameliorates TPA-induced acute skin inflammation in mice and

inhibits NF- $\kappa$ B and STAT3 pathways. **Phytomedicine**, v. 68, p. 153173, mar. 2020.

WU, L. et al. Biochanin A Reduces Inflammatory Injury and Neuronal Apoptosis following Subarachnoid Hemorrhage via Suppression of the TLRs/TIRAP/MyD88/NF- $\kappa$ B Pathway. **Behavioural Neurology**, v. 2018, p. 1960106, 3 jun. 2018.

YANGZOM, P. et al. Subacute 28 days oral toxicity study of kaempferol and biochanin-A in the mouse model. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 36, n. 8, p. e23090, ago. 2022.

YOUNG, J. M.; WAGNER, B. M.; SPIRES, D. A. Tachyphylaxis in 12-0-tetradecanoylphorbol acetate- and arachidonic acid-induced ear edema. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 80, n. 1, p. 48–52, jan. 1983.

YU, C.; ZHANG, P.; LOU, L.; WANG, Y. Perspectives Regarding the Role of Biochanin A in Humans. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. July, p. 1–11, 2019.

ZENG, W.-J. et al. Topical delivery of l -theanine ameliorates TPA-induced acute skin inflammation via downregulating endothelial PECAM-1 and neutrophil infiltration and activation. **Chemico-Biological Interactions**, v. 284, p. 69–79, mar. 2018.

ZHANG, C. et al. Glabridin Liposome Ameliorating UVB-Induced Erythema and Lethery Skin by Suppressing Inflammatory Cytokine Production. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 4, p. 630–636, 28 abr. 2021.

ZHANG, M. et al. Caffeic Acid Reduces Cutaneous Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ), IL-6 and IL-1 $\beta$  Levels and Ameliorates Skin Edema in Acute and Chronic Model of Cutaneous Inflammation in Mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, n. 3, p. 347–354, 1 mar. 2014.

ZHANG, S. et al. Biochanin A alleviates gingival inflammation and alveolar bone loss in rats with experimental periodontitis. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 20, n. 6, dez. 2020.

ZHANG, Y.; CHEN, W.-A. Biochanin A inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokines and mediators production in BV2 microglia. **Neurochemical Research**, v. 40, n. 1, p. 165–171, jan. 2015.

ZHOU, Y. et al. Biochanin A Attenuates Ovariectomy-Induced Cognition Deficit via Antioxidant Effects in Female Rats. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 603316, 2021.



## ANEXO A



Universidade  
Federal de  
Sergipe

Comissão de Ética no  
Uso de Animais

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA AGUDA TÓPICA DA BIOCHIANINA NO EDEMA DE ORELHA DE CAMUNDONGOS", protocolada sob o CEUA nº 5279160922 (ID 000757), sob a responsabilidade de **Renata Grespan** e equipe; *Edson dos Santos Junior; Ana Carla Silva Nascimento* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Sergipe (CEUA/UFS) na reunião de 18/09/2023.

We certify that the proposal "RESEARCH OF THE ACUTE TOPICAL ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF BIOCHIANIN IN MICE EAR EDEMA", utilizing 300 Heterogenics mice (300 females), protocol number CEUA 5279160922 (ID 000757), under the responsibility of **Renata Grespan** and team; *Edson dos Santos Junior; Ana Carla Silva Nascimento* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sergipe (CEUA/UFS) in the meeting of 09/18/2023.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [09/2023](#) a [03/2024](#)      Área: [Farmacologia](#)

Origem: [Biotério da Universidade Federal de Sergipe](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)      sexo: [Fêmeas](#)      idade: [8 a 12 semanas](#)      N: [300](#)

Linhagem: [Swiss](#)      Peso: [20 a 30 g](#)

Local do experimento: Biotério do Laboratório de Farmacologia do Processo Inflamatório (LAFAPI), no Departamento de Fisiologia.

São Cristóvão, 09 de janeiro de 2024

Prof. Dr. Josemar Sena Batista  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Sergipe

Prof. Dr. Anderson Carlos Marçal  
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Sergipe