



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**FITOESTRÓGENOS NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS: REVISÃO SISTEMÁTICA
E ESTUDO EXPERIMENTAL COM A BIOCHANINA A**

WEMERSON DE SANTANA NERES

**SÃO CRISTÓVÃO
2025**

| | |
|--|--|
| | <p>WEMERSON DE SANTANA NERES</p> <p>FITOESTRÓGENOS NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS: REVISÃO SISTEMÁTICA E ESTUDO EXPERIMENTAL COM A BIOCHANINA A</p> <p>2025</p> |
|--|--|

WEMERSON DE SANTANA NERES

**FITOESTRÓGENOS NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS: REVISÃO SISTEMÁTICA
E ESTUDO EXPERIMENTAL COM A BIOCHANINA A**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Grespan

**SÃO CRISTÓVÃO-SE
2025**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

N444f Neres, Wemerson de Santana
Fitoestrógenos na cicatrização de feridas : revisão sistemática e estudo experimental com a Biochanina A / Wemerson de Santana Neres ; orientadora Renata Grespan. – São Cristóvão, SE, 2025.

106 f. : il.

Tese (doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de Sergipe, 2025.

1. Inflamação. 2. Isoflavonas. 3. Estrógenos. 4. Cicatrização de ferimentos. 5. Pele. 6. Fitoestrogênios. I. Grespan, Renata, orient. II. Título.

CDU 612.621.31

WEMERSON DE SANTANA NERES

FITOESTRÓGENOS NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS: REVISÃO SISTEMÁTICA E ESTUDO EXPERIMENTAL COM A BIOCHANINA A

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

Presidente: Prof^a. Dr^a. RENATA GRESPAN

Examinador 1: Prof^a. Dr^a. ROSANA DE SOUZA SIQUEIRA BARRETO

Examinador 2: Prof^a. Dr^a. TATIANA RODRIGUES DE MOURA

Examinador 3: Prof^a. Dr^a. CLAUDIA ROCHA CARVALHO

Examinador 4: Prof. Dr. FRANCIEL BATISTA FÉLIX

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por todas as oportunidades que tem colocado em meu caminho.
A minha família, especialmente minha mãe Luciene, irmã Wêmilla, esposa Taislane e filho Pedro, que sempre me apoiaram e dão sentido à vida.

A meus queridos filhos pets Miro e Biloca, e sobrinha pet Lua, animais e companheiros que tornam o meu cotidiano mais cheio de vida.

A meu professor do ensino médio, Carlos Alexandre, pelo incentivo que me deu ao desenvolvimento profissional.

A minha orientadora, professora Renata, que sempre demonstrou credence na minha capacidade e, sobretudo, não me deixou desistir.

A Jéssica e Ana Carla, pessoas e profissionais incomparáveis, que sempre contribuíram fielmente em tudo.

A Luiz Felipe, Marciel, Gil, Daniel e Thaisa que contribuíram no desenvolvimento de todo o trabalho.

Aos professores Enilton Aparecido, Cristiane Bani e José Ronaldo, que contribuíram diretamente para a conclusão dessa tese com suas sugestões.

A banca examinadora por ter aceitado participar e por toda contribuição na realização desse trabalho.

A todos que compõem o Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas por todo apoio.

Aos servidores e funcionários do Hospital Veterinário e do Departamento de Medicina Veterinária da UFS.

A todos os colegas e amigos do Hospital Veterinário da Universidade Federal da Paraíba.

Por fim, sinto-me eternamente grato a todos!

**“Nunca desista de algo que você não
pode passar um dia sem pensar...”**

Winston Churchill

RESUMO

FITOESTRÓGENOS NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS: REVISÃO SISTEMÁTICA E ESTUDO EXPERIMENTAL COM A BIOCHANINA A, Wemerson de Santana Neres, São Cristóvão, 2025.

A cicatrização de feridas pode ser prejudicada devido à inflamação exacerbada e consequente formação de feridas crônicas. Na menopausa, a deficiência de estrógeno é um fator que predispõe a esse tipo de lesão cutânea, enquanto a reposição hormonal pode reverter essas feridas. Os fitoestrógenos são alternativas promissoras na cicatrização de feridas em virtude dos efeitos semelhantes ao estrógeno. No entanto, os mecanismos de ação dessas moléculas no reparo tecidual ainda permanecem pouco explorados, sobretudo da Biochanina A (BCA), que não tem seu efeito cicatrizante ainda bem caracterizado em lesões cutâneas hipoestrogênicas. Objetivou-se realizar uma revisão sistemática com ênfase no mecanismo de ação cicatrizante dos fitoestrógenos em modelos pré-clínicos, bem como um estudo experimental do efeito da BCA em camundongas ovariectomizadas. Para a revisão sistemática foi realizada a busca nas bases de dados LILACS, EMBASE, PUBMED, Scopus e Web of Science, seguida da inclusão dos estudos, extração e análise dos dados. Para avaliar o efeito cicatrizante da BCA, feridas induzidas em camundongas ovariectomizadas ou simuladas foram tratadas topicamente com veículo, BCA 0,03mg, 0,09mg, 0,27mg ou 17 β - Estradiol. Nos dias 0, 3, 7 e/ou 14 foram realizadas análises de tamanho da ferida, atividade de mieloperoxidase, quantificação de TNF- α , IL-1 β e IL-10 e análise histológica das lesões. Foram incluídos 19 estudos na revisão sistemática, dos quais a genisteína foi o fitoestrógeno mais estudado. Foi observado que os fitoestrógenos agem como cicatrizante, anti-inflamatório, antioxidante, reepitelizante, angiogênico e fibroplásico, principalmente. Os mecanismos de ação de destaque foram a via clássica mediada pelos receptores estrogênicos e as vias alternativas envolvendo o TNF- α /NF- κ B, Nrf2, PI3K/AKT e ERK. No estudo experimental, observou-se que a BCA reduziu a área da ferida durante a fase inflamatória, bem como a atividade de mieloperoxidase (infiltrado de neutrófilos) e a citocina pró-inflamatória TNF- α . Além disso, aumentou a quantidade de citocina anti-inflamatória IL-10 e favoreceu a reepitelização e a deposição de colágeno nas lesões. Os fitoestrógenos possuem mecanismos de ação distintos responsáveis pelos seus efeitos no reparo de feridas em modelos pré-clínicos, seja mediante a sinalização estrogênica ou por meio de vias independentes. O fitoestrógeno BCA, particularmente, possui efeito no reparo das lesões hipoestrogênicas com ênfase na fase inflamatória, mas novos estudos devem explorar melhor os mecanismos desse fitoestrógeno no reparo cutâneo.

Palavras-chave: Pele; Isoflavonas; Estrógeno; Inflamação; Cicatrização de feridas.

ABSTRACT

PHYTOESTROGENS IN WOUND HEALING: SYSTEMATIC REVIEW AND EXPERIMENTAL STUDY WITH BIOCHANIN A, Wemerson de Santana Neres, São Cristóvão, 2025.

Wound healing can be impaired due to exacerbated inflammation and the consequent development of chronic wounds. In menopausal women, estrogen deficiency is a predisposing factor for this type of skin injury, while hormone replacement therapy may reverse the condition. Phytoestrogens are promising alternatives for wound healing because of their estrogen-like effects. However, the action mechanisms of these compounds in tissue repair remain poorly understood. Particularly for Biochanin A (BCA), whose healing effect in hypoestrogenic skin lesions is not yet well characterized. This study aimed to perform a systematic review emphasizing the wound healing mechanisms of phytoestrogens in preclinical models, as well as an experimental study of the effect of BCA in ovariectomized female mice. For the systematic review, searches were conducted in the LILACS, EMBASE, PUBMED, Scopus, and Web of Science databases, followed by study inclusion, data extraction, and analysis. To evaluate the healing effect of BCA, wounds inflicted on ovariectomized or sham-operated mice were topically treated with vehicle, BCA (0.03 mg, 0.09 mg, and 0.27 mg), or 17 β -estradiol. On days 0, 3, 7, and/or 14, analyses were performed on wound size, myeloperoxidase activity, TNF- α , IL-1 β , and IL-10 quantification, and histological assessment of lesions. Nineteen studies were included in the systematic review, with genistein being the most studied phytoestrogen. Phytoestrogens demonstrated healing, anti-inflammatory, antioxidant, reepithelializing, angiogenic, and fibroplastic effects. The main mechanisms of action identified were the classical estrogen receptor-mediated pathway and alternative pathways involving TNF- α /NF- κ B, Nrf2, PI3K/AKT and ERK. In the experimental study, BCA reduced wound area during the inflammatory phase, as well as myeloperoxidase activity (neutrophil infiltration) and the pro-inflammatory cytokine TNF- α . It also increased levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 and promoted reepithelialization and collagen deposition in lesions. Phytoestrogens exhibit distinct mechanisms of action responsible for their effects on wound repair in preclinical models, either through estrogenic signaling or via independent pathways. BCA, in particular, demonstrated reparative effects on hypoestrogenic lesions, especially during the inflammatory phase, although further studies are needed to better explore its mechanisms in skin repair.

Keywords: Skin; Isoflavones; Estrogen; Inflammation; Wound Healing.

RESUMO PARA A SOCIEDADE

FITOESTRÓGENOS NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS: REVISÃO SISTEMÁTICA E ESTUDO EXPERIMENTAL COM A BIOCHANINA A, Wemerson de Santana Neres, São Cristóvão, 2025.

A inflamação das feridas de pele é a principal causa de cicatrização retardada, levando à formação das feridas crônicas. Isso pode ser observado em mulheres na menopausa, onde a redução natural do hormônio feminino estrogênio é acompanhada de problemas na cicatrização de feridas. Uma alternativa de tratamento é a reposição hormonal que, embora seja eficaz, pode causar efeitos indesejáveis a longo prazo como derrame cerebral, doença coronariana, trombose e câncer de endométrio, mamas e ovários. Dessa forma, alternativas no tratamento de feridas cutâneas em mulheres na menopausa merecem ser estudadas. Os fitoestrógenos são promissores compostos de origem vegetal que apresentam ação semelhante ao estrogênio. No entanto, os mecanismos de ação responsáveis pelos efeitos desses compostos na cicatrização de feridas permanecem pouco explorados. Além disso, o fitoestrógeno Biochanina A não tem seu efeito cicatrizante bem estabelecido em feridas deficientes de estrogênio. Dessa forma, objetivamos realizar uma revisão sistemática com ênfase no mecanismo de ação cicatrizante dos fitoestrógenos e estudar o efeito cicatrizante da Biochanina A em camundongas com deficiência de estrogênio. Para isso, foi realizada uma busca e extração de dados de estudos sobre fitoestrógenos na cicatrização. Como resultados, observamos que os fitoestrógenos apresentaram diversos efeitos, com destaque ao cicatrizante, anti-inflamatório e antioxidante, seja através do mecanismo associado ao estrogênio ou através de mecanismos independentes. Para avaliar o efeito cicatrizante da Biochanina A, feridas de pele de camundongas que tiveram a retirada cirúrgica dos ovários foram tratadas com o composto e foi observado o efeito cicatrizante com ênfase na ação anti-inflamatória. Diante disso, pode-se considerar que os fitoestrógenos, inclusive a Biochanina A, são uma alternativa promissora para o tratamento de feridas de pele, sobretudo em mulheres na menopausa.

Palavras-chave: Pele; Isoflavonas; Estrogênio; Inflamação; Cicatrização de feridas.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Divisão da pele em epiderme, derme, hipoderme e anexos..... | 23 |
| Figura 2 - Fases do processo de cicatrização de feridas. | 25 |
| Figura 3 - Processo de polarização de macrófagos..... | 27 |
| Figura 4 - Efeitos do estrógeno na cicatrização de feridas. | 31 |
| Figura 5 - Estrutura molecular do estrógeno e dos fitoestrógenos..... | 33 |
| Figura 6 - Propriedades farmacológicas da Biochanina A. | 35 |
| Figura 7 - Fluxograma do processo de seleção dos estudos. | 40 |
| Figura 8 - Frequência dos fitoestrógenos nos estudos selecionados. | 42 |
| Figura 9 - Propriedades terapêuticas dos fitoestrógenos no reparo cutâneo. ... | 50 |
| Figura 10 - Papel modulador dos fitoestrógenos nas vias de sinalização inflamatória e no estresse oxidativo durante os estágios iniciais da cicatrização de feridas cutâneas. | 57 |
| Figura 11 - Ação dos fitoestrógenos na indução de fatores de crescimento e ativação de vias proliferativas durante a cicatrização de feridas cutâneas..... | 58 |
| Figura 12 - Análise do risco de viés dos estudos <i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i> incluídos... | 59 |
| Figura 13 - Análise do risco de viés dos estudos <i>in vivo</i> incluídos. | 60 |
| Figura 14 - Delineamento experimental..... | 73 |
| Figura 15 - Peso uterino..... | 76 |
| Figura 16 - Representação uterina..... | 77 |
| Figura 17 – Área de ferida residual..... | 78 |
| Figura 18 - Representação do grau de fechamento das feridas. | 78 |
| Figura 19 - Efeito da BCA sobre a atividade de MPO nas lesões..... | 79 |
| Figura 20 - Efeito da BCA sobre a quantificação de TNF- α , IL-1 β e IL-10 nas lesões. | 80 |
| Figura 21 - Fotomicrografias de cortes histológicos em hematoxilina e eosina (ampliação: 40x). | 81 |
| Figura 22 - Fotomicrografias de cortes histológicos em hematoxilina e eosina (ampliação: 100x). | 82 |
| Figura 23 - Fotomicrografias de secções histológicas em picrossirius red, analisadas sob luz polarizada (ampliação: 100 x). | 83 |
| Figura 24 - Efeito cicatrizante da Biochanina A nas vias estrogênicas e não estrogênicas. | 91 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Artigos de acordo com o tipo de estudo pré-clínico. | 41 |
| Tabela 2 - Características dos estudos <i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i> | 43 |
| Tabela 3 - Características dos estudos <i>in vivo</i> | 45 |
| Tabela 4 - Efeitos dos fitoestrógenos na cicatrização de feridas <i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i> | 47 |
| Tabela 5 - Efeitos dos fitoestrógenos na cicatrização de feridas <i>in vivo</i> | 48 |
| Tabela 6 - Frequência de biomarcadores moleculares utilizados nos estudos de fitoestrógenos na cicatrização. | 52 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------------|--|
| ABCG4 | <i>ATP Binding Cassette Subfamily G Member 4</i> |
| AREs | <i>Antioxidant Response Elements</i> |
| ANOVA | Análise de Variância |
| ACTH | <i>Adrenocorticotrofic Hormone</i> |
| AHR | <i>Aryl Hydrocarbon Receptor</i> |
| AKT | <i>Protein AKT</i> |
| ASC | <i>Apoptosis-associated Speck-like Protein Containing a CARD</i> |
| BAX | <i>Bcl2-associated X Protein</i> |
| BCL-2 | <i>B-cell Lymphoma 2 Protein</i> |
| bFGF | <i>Basic Fibroblast Growth Factor</i> |
| CAT | Catalase |
| CD163 | <i>Cluster of Differentiation 163</i> |
| CD31 | <i>Cluster of Differentiation 31</i> |
| CD34 | <i>Cluster of Differentiation 34</i> |
| CD36 | <i>Cluster of Differentiation 36</i> |
| CD45 | <i>Cluster of Differentiation 45</i> |
| CD68 | <i>Cluster of Differentiation 68</i> |
| CD74 | <i>Cluster of Differentiation 74</i> |
| CEPA | Comitê de Ética em Pesquisa Animal |
| cNOS | <i>Constitutive Nitric Oxide Synthase</i> |
| COL18A1 | <i>Collagen type XVIII alpha 1</i> |
| COX-2 | <i>Cyclooxygenase-2</i> |
| CTGF | <i>Connective Tissue Growth Factor</i> |
| Cu | Cobre |
| CuZnSOD | Cobre-zinco-superóxido Dismutase |
| CXCL10 | <i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 10</i> |
| CXCL5 | <i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 5</i> |
| D | Derme |
| DAMP | <i>Damage-Associated Molecular Pattern</i> |
| DMKN | <i>Dermcidin</i> |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |

| | |
|---------------------------------|---|
| DNA | <i>Deoxyribonucleic Acid</i> |
| DUOX1 | <i>Dual oxidase 1</i> |
| E | <i>Epiderme</i> |
| EDTA | <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> |
| EFNA3 | <i>Ephrin-A3</i> |
| EFT-400 | <i>Full-thickness Human Epidermal Skin</i> |
| EGF | <i>Epidermal Growth Factor</i> |
| EGLN3 | <i>Egl-9 Family Hypoxia-inducible Factor</i> |
| Egr-1 | <i>Early Growth Response Protein 1</i> |
| EPCs | <i>Endothelial Progenitor Cells</i> |
| EPM | <i>Erro Padrão da Média</i> |
| ERK | <i>Extracellular Signal-regulated Kinase</i> |
| ERs | <i>Estrogen Receptors</i> |
| EREs | <i>Estrogen Response Elements</i> |
| ERα | <i>Estrogen Receptor Alpha</i> |
| ERβ | <i>Estrogen Receptor Beta</i> |
| FAF2 | <i>Fibroblast Growth Factor 2</i> |
| FETUB | <i>Fetuin-B</i> |
| FC | <i>Folículo Capilar</i> |
| Fd | <i>Ferida Diária</i> |
| FGF | <i>Fibroblast Growth Factor</i> |
| Flk-1 | <i>Fibroblast Growth Factor Receptor VEGF-2</i> |
| FoxO1 | <i>Forkhead Box Protein O1</i> |
| F3 | <i>Tissue Factor 3</i> |
| GPR30 | <i>G Protein-coupled Receptor 30</i> |
| GPx | <i>Glutathione Peroxidase</i> |
| GSH | <i>Glutathione</i> |
| GTFs | <i>Granulation Tissue Fibroblasts</i> |
| H2O2 | <i>Peróxido de Hidrogênio</i> |
| HaCat | <i>Human Keratinocyte Cell Line</i> |
| HAL | <i>Histidine Ammonia-lyase</i> |
| HBEGF | <i>Heparin-binding EGF-like Growth Factor</i> |
| HIF-1α | <i>Hypoxia-inducible Factor 1-alpha</i> |

| | |
|---------------------------------|---|
| HMVEC-D | <i>Human Dermal Microvascular Endothelial Cells</i> |
| HO-1 | <i>Heme Oxygenase-1</i> |
| HSFBs | <i>Hypertrophic Scar Fibroblasts</i> |
| HTAB | <i>Hexadecyltrimethylammonium Bromide</i> |
| HUVECs | <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i> |
| i.p. | <i>Intraperitoneal</i> |
| ICR | <i>High-affinity Estrogen Receptor Antagonist</i> |
| IFN-1α | <i>Interferon-1 Alpha</i> |
| IFN-γ | <i>Interferon gamma</i> |
| IGF-1 | <i>Insulin-like Growth Factor 1</i> |
| IL-10 | <i>Interleukin-10</i> |
| IL-13 | <i>Interleukin-13</i> |
| IL-17 | <i>Interleukin-17</i> |
| IL-18 | <i>Interleukin-18</i> |
| IL-1β | <i>Interleukin-1β</i> |
| IL20Rα | <i>Interleukin-20 Receptor Alpha</i> |
| IL20Rβ | <i>Interleukin-20 Receptor Beta</i> |
| IL-23α | <i>Interleukin-23α</i> |
| IL-24 | <i>Interleukin-24</i> |
| IL-37 | <i>Interleukin-37</i> |
| IL-4 | <i>Interleukin-4</i> |
| IL-6 | <i>Interleukin-6</i> |
| IL-8 | <i>Interleukin-8</i> |
| iNOS | <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i> |
| IRF1 | <i>Interferon Regulatory Factor 1</i> |
| ITGβ3 | <i>Integrin β3 subunit</i> |
| IκB | <i>Nuclear Factor Kappa Inhibitory Light Polypeptide Gene</i> |
| JB3 | <i>IGF1 Receptor Antagonist</i> |
| JNK | <i>C-Jun N-terminal Kinase</i> |
| KEAP1 | <i>Kelch-like ECH-Associated Protein 1</i> |
| KITLG | <i>KIT ligand</i> |
| K16 | <i>Keratin 16</i> |
| K17 | <i>Keratin 17</i> |

| | |
|----------------|---|
| KEL FIB | <i>Keloid Fibroblast Cell Line</i> |
| Ki67 | <i>Cell Proliferation Marker</i> |
| L929 | <i>Mouse Skin Fibroblasts</i> |
| LEP | <i>Leptin</i> |
| LC3 | <i>Light Chain Protein 3</i> |
| LC3BII | <i>Light Chain Protein 3BII</i> |
| M1 | Macrófagos de Ativação Clássica |
| M2 | Macrófagos de Ativação Alternativa |
| MAPK | <i>Mitogen-activated Protein Kinase</i> |
| MEC | Matriz Extracelular |
| MIF | <i>Macrophage Migration Inhibitory Factor</i> |
| MMP | <i>Matrix Metalloproteinase</i> |
| MMP-14 | <i>Matrix Metalloproteinase-14</i> |
| MMP-9 | <i>Matrix metalloproteinase-9</i> |
| Mn | Manganês |
| MnSOD | Manganês Superóxido Dismutase |
| MPO | Mieloperoxidase |
| MT1A | <i>Metallothionein 1^a</i> |
| MT1F | <i>Metallothionein 1F</i> |
| MT1G | <i>Metallothionein 1G</i> |
| MyD88 | <i>Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88</i> |
| NaCl | Cloreto de Sódio |
| NETs | <i>Neutrophil Extracellular Traps</i> |
| NFE2L3 | <i>Nuclear Factor Rrythroid 3</i> |
| NF-κB | <i>Nuclear Factor Kappa B</i> |
| NHDF | <i>Normal Human Dermal Fibroblast Cell Line</i> |
| NHSF | <i>Human Skin Fibroblasts</i> |
| NLRP3 | <i>NOD-like Receptor Family Member 3</i> |
| NO | <i>Nitric Oxide</i> |
| Nox2 | <i>NADPH oxidase 2</i> |
| Nox4 | <i>NADPH oxidase 4</i> |
| NRG1 | <i>Neuregulin 1</i> |
| Nrf2 | <i>Nuclear Factor Erythroid 2</i> |

| | |
|-------------------------------------|--|
| OD | <i>Optical Density</i> |
| p | <i>Phosphorylated</i> |
| p21 | <i>p21 protein</i> |
| P38 | <i>P38 protein</i> |
| p53 | <i>P53 protein</i> |
| p62 | <i>P62 protein</i> |
| PAMP | <i>Pathogen-associated Molecular Pattern</i> |
| PARβ/δ | <i>Peroxisome Proliferator-activated Receptor beta/delta</i> |
| PBS | <i>Phosphate Buffer Sodium</i> |
| PCNA | <i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i> |
| PDGF | <i>Platelet-derived Growth Factor</i> |
| PEG | <i>Propyleneglycol</i> |
| PI3K | <i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i> |
| PKA | <i>Protein Kinase A</i> |
| PKP1 | <i>Plakophilin 1</i> |
| PLA | <i>Electrospun Polylactic Acid Fibers</i> |
| PLAU | <i>Plasminogen Activator Urokinase-type</i> |
| PMSF | <i>Phenylmethylsulfonyl Fluoride</i> |
| PPAR-γ | <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma</i> |
| Pro-IL-1β | <i>Pro-interleukin-1 Beta</i> |
| Q | <i>Queratina</i> |
| Raf | <i>Serine/threonine-specific Kinase</i> |
| ROS | <i>Reactive Oxygen Species</i> |
| rpm | <i>Rotações por Minuto</i> |
| Sca-1 | <i>Stromal Cell-derived Factor 1-alpha</i> |
| SDF-1α | <i>Fator Derivado do Estroma-1α</i> |
| SF/PVP | <i>Silk Protein/Synthetic Polymer</i> |
| SIRT-1 | <i>Sirtuin-1</i> |
| SLC30A1 | <i>Solute Carrier Family 30 Member 1</i> |
| SOD | <i>Superóxido Dismutase</i> |
| SPINK5 | <i>Serine Protease Inhibitor Kazal-type 5</i> |
| ST14 | <i>Suppression of tumorigenicity 14</i> |
| STZ | <i>Streptozotocin</i> |

| | |
|--------------------------------|---|
| TBARS | <i>Thiobarbituric Acid Reactive Species</i> |
| TG2 | <i>Tissue Transglutaminase</i> |
| TGF-β | <i>Transforming Growth Factor-beta</i> |
| TGF-β1 | <i>Transforming Growth Factor-beta 1</i> |
| TGF-β2 | <i>Transforming Growth Factor-beta 2</i> |
| TGF-β3 | <i>Transforming Growth Factor-beta 3</i> |
| TIAM1 | <i>Tumor Invasion and Metastasis-inducing Protein 1</i> |
| TIMP-2 | <i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2</i> |
| TIMP-3 | <i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3</i> |
| TLR | <i>Toll-like receptor</i> |
| TLR2 | <i>Toll-like receptor 2</i> |
| TLR4 | <i>Toll-like receptor 4</i> |
| TNFR1 | <i>Tumor Necrosis Factor Receptor 1</i> |
| TNFR2 | <i>Tumor Necrosis Factor Receptor 2</i> |
| TNF10 | <i>Tumor Necrosis Factor 10</i> |
| TNF-α | <i>Tumor Necrosis Factor Alfa</i> |
| TPK | <i>Tyrosine Kinase Protein</i> |
| TXNRD1 | <i>Thioredoxin Reductase 1</i> |
| UFS | <i>Universidade Federal de Sergipe</i> |
| VEGF | <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> |
| VEGFA | <i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i> |
| VEGFR2 | <i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2</i> |
| WFDC5 | <i>Whey Acidic Protein Four-disulfide Core Domain Protein 5</i> |
| Zn | <i>Zinco</i> |
| α-SMA | <i>Alpha-smooth Muscle Actin</i> |

SUMÁRIO

| | | |
|------|--|-----------|
| 1. | INTRODUÇÃO | 21 |
| 2. | REVISÃO DE LITERATURA..... | 23 |
| 2.1. | Cicatrização de feridas | 23 |
| a) | Hemostasia | 26 |
| b) | Inflamação | 26 |
| c) | Proliferação | 28 |
| d) | Remodelamento | 28 |
| 2.2. | Modelos experimentais na cicatrização de feridas | 29 |
| 2.3. | Papel do estrógeno no reparo tecidual | 30 |
| 2.4. | Fitoestrógenos na cicatrização de feridas | 32 |
| 2.5. | Biochanina A | 34 |
| | CAPÍTULO 1- FITOESTRÓGENOS NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS: REVISÃO SISTEMÁTICA..... | 37 |
| 3. | OBJETIVOS | 37 |
| 3.1. | Geral | 37 |
| 3.2. | Específicos | 37 |
| 4. | METODOLOGIA | 38 |
| 4.1. | Estratégia de Pesquisa | 38 |
| 4.2. | Seleção dos estudos..... | 38 |
| 4.3. | Extração e síntese dos dados..... | 39 |
| 4.4. | Análise do risco de viés | 39 |
| 4.5. | Análise de dados..... | 39 |
| 5. | RESULTADOS..... | 40 |
| 5.1. | Seleção de estudos..... | 40 |
| 5.2. | Características dos estudos selecionados..... | 41 |
| 5.3. | Efeito dos fitoestrógenos sobre a cicatrização de feridas | 46 |
| 5.4. | Frequência de moléculas biomarcadoras da cicatrização nos estudos..... | 51 |
| 5.5. | Risco de viés | 59 |
| 6. | DISCUSSÃO | 61 |
| 7. | PONTOS FORTES E LIMITAÇÕES | 69 |
| 8. | CONCLUSÃO | 70 |

| | |
|--|------------|
| CAPÍTULO 2- FITOESTRÓGENOS NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS: ESTUDO EXPERIMENTAL COM A BIOCHANINA A | 71 |
| 9. OBJETIVOS | 71 |
| 9.1. Geral | 71 |
| 9.2. Específicos | 71 |
| 10. METODOLOGIA | 72 |
| 10.1. Animais | 72 |
| 10.2. Ovariectomia | 72 |
| 10.3. Indução das feridas | 72 |
| 10.4. Tratamento das feridas..... | 73 |
| 10.5. Coleta de amostras | 73 |
| 10.6. Determinação do peso uterino | 74 |
| 10.7. Avaliação do fechamento das lesões..... | 74 |
| 10.8. Ensaio da atividade de Mieloperoxidase | 74 |
| 10.9. Quantificação de citocinas..... | 74 |
| 10.10. Avaliação histológica | 75 |
| 10.11. Análise estatística..... | 75 |
| 11. RESULTADOS | 76 |
| 11.1. Efeito da BCA tópica sobre o peso uterino | 76 |
| 11.2. Efeito da BCA sobre o fechamento das feridas | 77 |
| 11.3. Efeito da BCA sobre a atividade da MPO..... | 79 |
| 11.4. Efeito da BCA sobre a quantificação de citocinas..... | 79 |
| 11.5. Efeito da BCA sobre os parâmetros histológicos das lesões | 80 |
| 12. DISCUSSÃO | 84 |
| 13. CONCLUSÃO | 92 |
| 14. PERSPECTIVAS FUTURAS..... | 93 |
| 15. REFERÊNCIAS..... | 94 |
| APÊNDICE I..... | 103 |
| APÊNDICE II..... | 105 |
| ANEXO I..... | 106 |

1. INTRODUÇÃO

As feridas crônicas representam grande custo para a saúde e a economia em todo o mundo, com prevalência de 1% a 2% na população em geral de países desenvolvidos (GUEST et al., 2015; HEYER et al., 2016). Estima-se que os custos anuais com o tratamento dessas lesões é de pelo menos US\$ 25 bilhões (KORTING et al., 2011). No entanto, as complicações ultrapassam as condições econômicas, pois as feridas crônicas tendem a se manter na fase inflamatória da cicatrização devido à resposta imune exacerbada e contínua (MOHTADI et al., 2021), resultando em dor, cicatrizes hipertróficas, queloides, infecções, amputações, sepse e, até mesmo, morte (DWIVEDI et al., 2017; LAROUCHE et al., 2018).

O avanço da medicina tem garantido o aumento da população idosa e, por consequência, as condições associadas à idade têm ganhado mais atenção. As mulheres passam um terço da vida na menopausa, onde o declínio de estrógeno é fator responsável por condições patológicas como a deficiência na cicatrização de feridas (HALL; PHILLIPS, 2005). Para lesões cutâneas associadas ao hipoestrogenismo a Terapia de Reposição Hormonal (TRH) tópica com o estrógeno pode ser requerida. O estrógeno atua reduzindo o processo inflamatório, diminuindo o infiltrado de neutrófilos e aumentando a deposição de colágeno em lesões agudas de idosos (ASHCROFT et al., 1999). Além disso, foi demonstrado que o estrógeno reduz a expressão da citocina pró-inflamatória *Tumor Necrosis Factor Alfa* (TNF- α) e promove a polarização benéfica de Macrófagos de Ativação Clássica (M1) para Macrófagos de Ativação Alternativa (M2) (ROUTLEY; ASHCROFT, 2009).

Embora a TRH seja benéfica no reparo de feridas, os tratamentos a base de estrógeno para a cicatrização ainda são incomuns devido aos efeitos indesejados de aumento do risco de afecções como câncer de mama, ovários e endométrio, acidente vascular cerebral e doença coronariana (ANDERSON et al., 2004; MOHTADI et al., 2021). O declínio na utilização da TRH abre espaço para a necessidade em entender as vias de sinalização que podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas e seletivas, evitando as complicações a longo prazo (MOHTADI et al., 2021). Portanto, é fundamental a busca por alternativas terapêuticas eficazes e com menos efeitos adversos. Nesse sentido, os fitoestrógenos, moléculas naturais com ações estrogênicas, parecem promissoras (RENDA et al., 2013; ATIQ-UR-REHMAN, 2019; MANZOUREH; FARAHPOUR, 2020).

Os fitoestrógenos são compostos de origem vegetal que atuam classicamente em vias estrogênicas sobre o *Estrogen Receptor Alpha* (ER α) e *Estrogen Receptor Beta* (ER β) (CAMPBELL et al., 2010). Em virtude dessa interação, os efeitos dos fitoestrógenos como a formononetina (HUH et al., 2011), a daidzeína (MUKAI et al., 2012), a Biochanina A (BCA) (GAJIC et al., 2022), o equol (LEPHART, 2023), a gliciteína (CHO et al., 2014), a puerarina (SUN ET AL., 2022) e, principalmente, a genisteína (EMMERSON et al., 2010; PENG et al., 2023; HU et al., 2024), têm sido amplamente investigados na cicatrização de feridas em modelos pré-clínicos.

A BCA, particularmente, é um dos fitoestrógenos com efeitos e mecanismos de ação pouco explorados no processo de cicatrização de feridas. Essa isoflavona pode ser encontrada em inúmeros vegetais, mas é observada especialmente em espécies de *Trifolium*, um vegetal amplamente utilizado na medicina tradicional para fins terapêuticos (ATIQU-UR-REHMAN, 2019). A grande maioria das propriedades terapêuticas atribuídas à BCA estão associadas à interação com o ER β . No entanto, seus efeitos antioxidante, antimicrobiano, anti-inflamatório e dentre outros, podem ser atribuídos também à interação com vias independentes da via de sinalização do estrógeno, como o *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma* (PPAR- γ), o *Nuclear Factor Kappa B* (NF- κ B) e a *Mitogen-activated Protein Kinase* (MAPK) (KOLE et al., 2011; SUNDARESAN et al., 2018; YU et al., 2019; SARFRAZ et al., 2020).

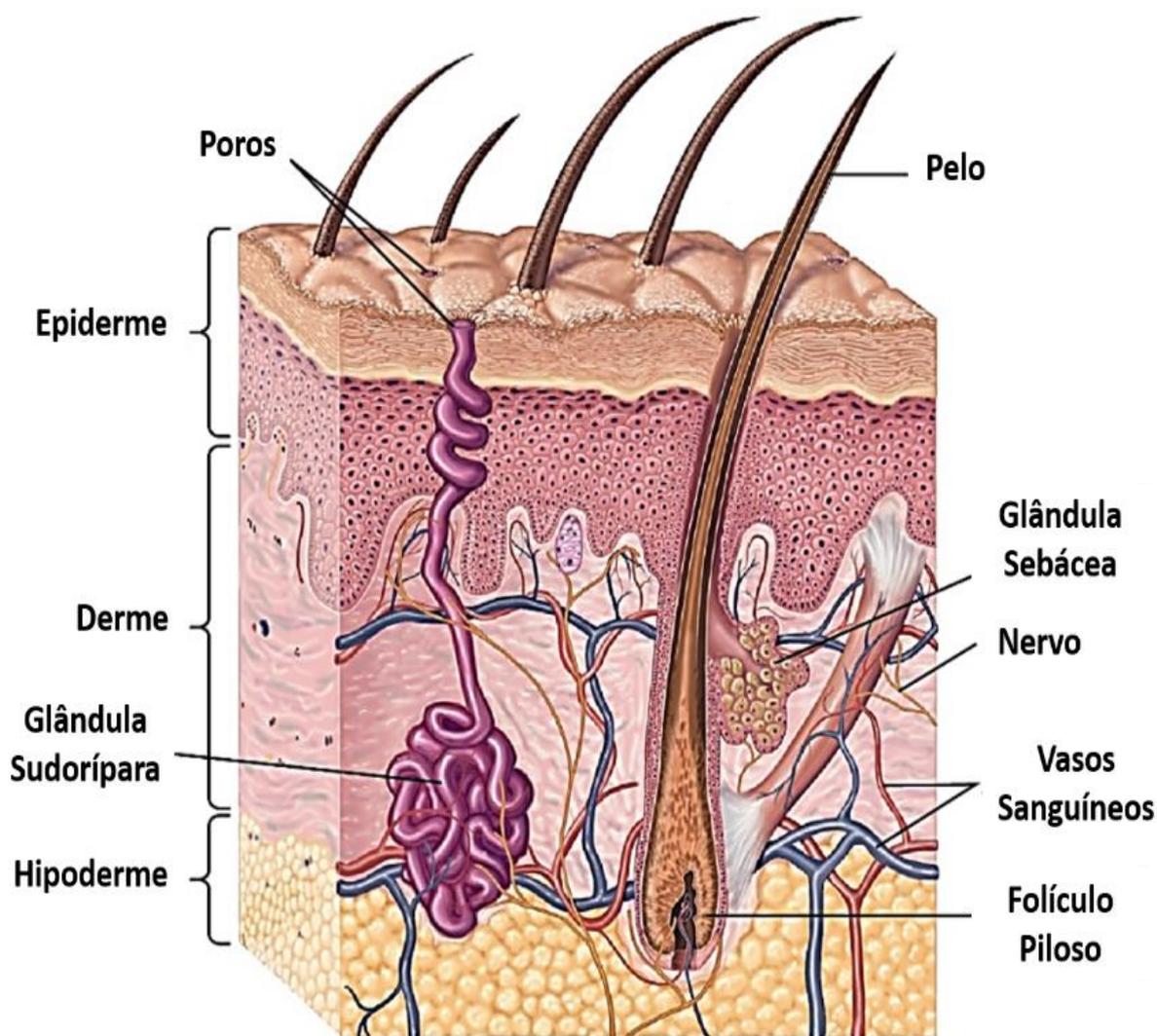
Os fitoestrógenos parecem ter um papel central no tratamento de feridas em mulheres na menopausa. No entanto, embora muitos estudos tenham sido publicados de forma isolada, não existe um compilado sobre os mecanismos de ação dos fitoestrógenos na cicatrização de feridas. Além disso, por mimetizar a atividade do estrógeno e modular processos inflamatórios mediante outras vias de sinalização, acredita-se que a BCA possa favorecer a cicatrização de feridas na deficiência do estrógeno. Dessa forma, para melhor compreensão, o presente trabalho foi dividido em dois capítulos: no primeiro foram reunidos estudos pré-clínicos para determinar os mecanismos dos fitoestrógenos na cicatrização de feridas; no segundo, foi realizado um estudo experimental com ênfase no efeito da BCA na cicatrização de feridas cutâneas em um modelo murino de lesão excisional hipoestrogênica por ovariectomia.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cicatrização de feridas

A pele é o maior órgão do corpo e possui grande importância para a proteção do organismo. Este órgão pode ser dividido estruturalmente em epiderme, derme, hipoderme e anexos (Figura 1) (GANTWERKER; HOM, 2011). Em conjunto, tais estruturas promovem funções fisiológicas de controle da temperatura e umidade, recepção e transmissão de sinais e, particularmente, de proteção do organismo contra agentes agressores físicos, químicos e biológicos (DELAVERY et al., 2011; PHILLIPSON; KUBES, 2019).

Figura 1 - Divisão da pele em epiderme, derme, hipoderme e anexos.



A pele é estruturalmente dividida em epiderme (superficial), derme (intermediária) e hipoderme (profunda). Para garantir a homeostasia do organismo a pele ainda conta com diversos anexos como glândulas sebáceas e sudoríparas, folículos pilosos e pelo, poros, nervos e vasos sanguíneos. **Fonte:** Adaptado de Encyclopedia Britannica, 2013. Disponível em: <https://www.britannica.com/science/human-skin>.

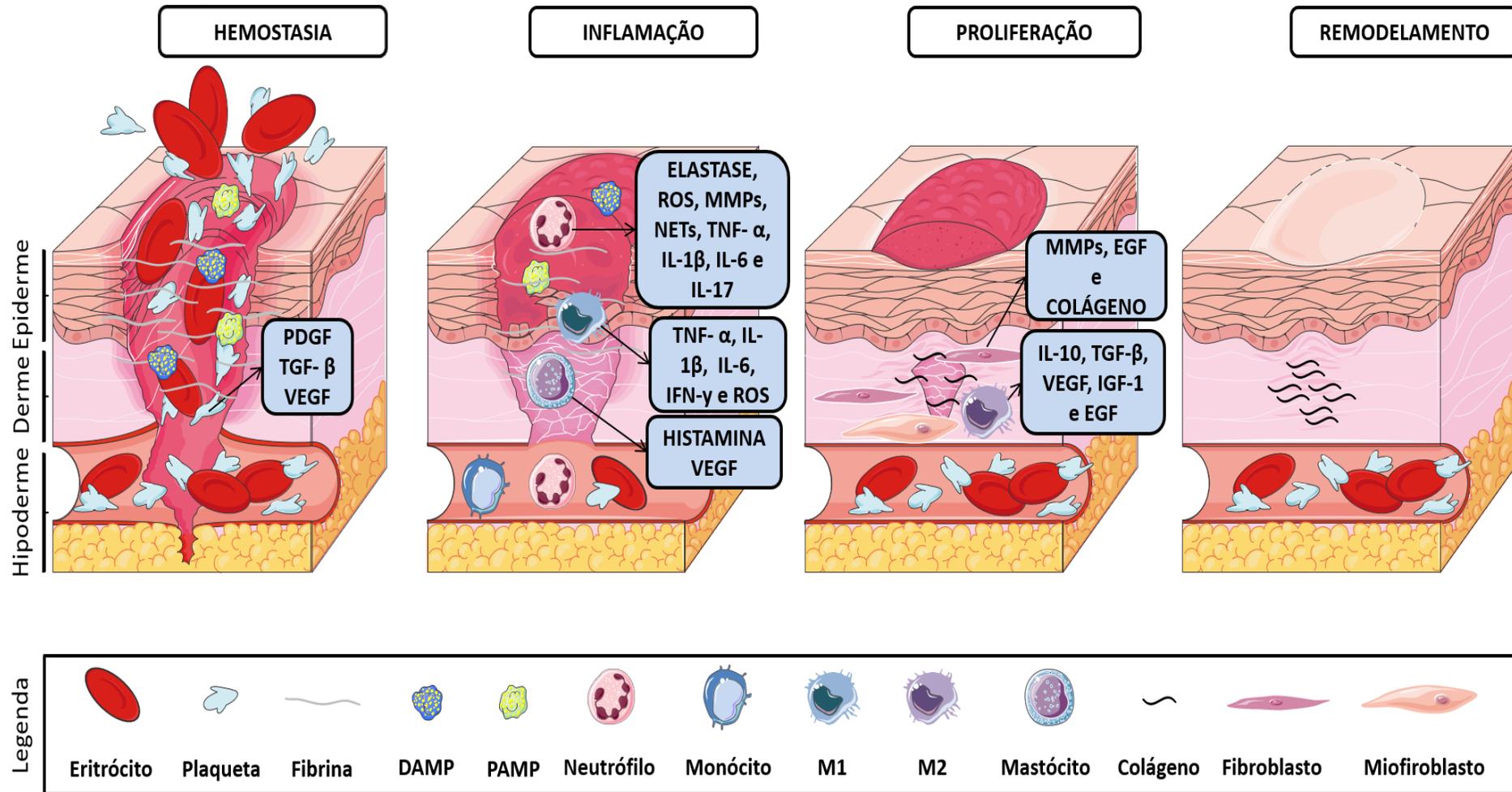
Quando danificada, a pele pode se restabelecer mediante um processo de reparo tecidual complexo conhecido como cicatrização (XU LANDÉN et al., 2016). Para que a cicatrização de feridas ocorra é fundamental a interação coordenada de inúmeras células, como neutrófilos, macrófagos, mastócitos, linfócitos, queratinócitos, fibroblastos e endoteliócitos, e diversas moléculas, como o *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF), TNF- α , *Interleukin-1 β* (IL-1 β), *Interleukin-4* (IL-4) e *Interleukin-10* (IL-10) (GURTNER et al., 2008; WANG et al., 2014; MIRZA; KOH, 2015).

Contudo, a modulação desordenada de células e moléculas durante a cicatrização de feridas tem sido fator limitante no reparo, resultando na formação de feridas crônicas (GURTNER et al., 2008; WANG et al., 2014; MIRZA; KOH, 2015; MOHTADI et al., 2021). Tais tipos de feridas estão comumente associadas a resposta inflamatória exacerbada durante o reparo tecidual, o que é prejudicial ao organismo e resulta em complicações como dor, cicatrizes hipertróficas, queloides, infecções, amputações, sepse e morte (DWIVEDI et al., 2017; LAROUCHE et al., 2018).

Dessa forma, é fundamental que a resposta inflamatória aguda durante a cicatrização de feridas ocorra e seja finalizada o mais breve possível, sem deixar sequelas significativas (XU LANDÉN et al., 2016). No entanto, as feridas crônicas demandam maior tempo para que ocorra o reparo efetivo e tais lesões comumente são passíveis de complicações que prolongam as fases de hemostasia, inflamação, proliferação e/ou remodelamento, estando associadas a comorbidades como a infecção da ferida (VELNAR et al., 2009).

Em virtude da alta complexidade do mecanismo de reparo da pele, geralmente o processo de cicatrização de feridas é dividido em quatro fases: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelamento (Figura 2) (VEITH et al., 2019). No entanto, é fundamental ressaltar que essas fases se sobrepõem em espaço e tempo, além de apresentar características distintas que são essenciais para o reparo efetivo (GURTNER et al., 2008; PHILLIPSON; KUBES, 2019).

Figura 2 - Fases do processo de cicatrização de feridas.



A cicatrização de feridas ocorre mediante às fases de hemostasia, inflamação, proliferação e remodelamento. Durante o processo, inúmeras células e moléculas são ativadas e garantem o reparo adequado. DAMP: *Damage-Associated Molecular Pattern*; PAMP: *Pathogen-Associated Molecular Pattern*; PDGF: *Platelet-Derived Growth Factor*; TGF-β: *Transforming Growth Factor-β*; VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*; M1: Macrófagos de Ativação Clássica; M2: Macrófagos de Ativação Alternativa; ROS: *Reactive Oxygen Species*; MMPs: *Matrix Metalloproteinases*; NETs: *Neutrophil Extracellular Traps*; TNF-α: *Tumor Necrosis Factor Alpha*; IL-1β: *Interleukin-1β*; IL-6: *Interleukin-6*; IL-17: *Interleukin-17*; IFN-γ: *Interferon-γ*; IL-10: *Interleukin-10*; FGF: *Fibroblast Growth Factor*; EGF: *Epidermal Growth Factor*; IGF-1: *Insulin-Like Growth Factor-1*; TGF-β: *Transforming Growth Factor-β*. **Fonte:** próprio autor criado no Microsoft PowerPoint® com material do <https://smart.servier.com>.

a) Hemostasia

A fase de hemostasia tem início com o dano tecidual, induzindo vasoconstrição em resposta à liberação de moléculas vasoativas como catecolaminas e serotonina, com intuito de minimizar a perda de fluidos (GANTWERKER; HOM, 2011). Em virtude da lesão tissular, o colágeno subendotelial é exposto e estimula o início da cascata de coagulação, marcada por ativação e aderência de plaquetas ao endotélio (CHILDS; MURTHY, 2017).

O coágulo, formado por plaquetas, hemácias e leucócitos, e moléculas como fibrina, fibronectina, vitronectina e trombospondina, impede a perda de líquidos e protege o ambiente da ferida contra a invasão de microrganismos. Além disso, tais moléculas atuam como Matriz Extracelular (MEC) provisória, que é fundamental para a migração de inúmeros tipos celulares para o sítio inflamatório, como neutrófilos, macrófagos, fibroblastos, endoteliócitos, queratinócitos, entre outros (DELAVARY et al., 2011).

Além de participar do processo de hemostasia, as plaquetas permitem a conexão com a fase inflamatória. Quando ativados, esses fragmentos celulares passam a liberar de seus grânulos moléculas como o PDGF, *Transforming Growth Factor-beta* (TGF- β) e *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), potencialmente quimiotáticos para neutrófilos, monócitos e fibroblastos (QING, 2017; MAMUN et al., 2024).

b) Inflamação

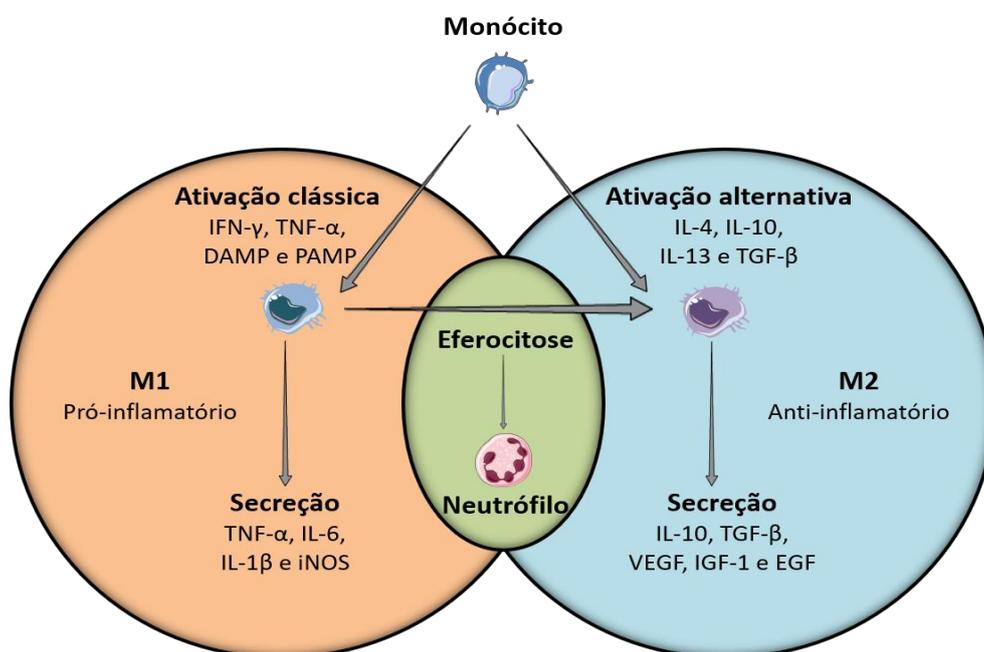
Durante a fase inflamatória, os neutrófilos são recrutados a partir de mediadores como o *Pathogen-associated Molecular Pattern* (PAMP), *Damage-Associated Molecular Pattern* (DAMP) e PDGF (HESKETH et al., 2017). Esses fagócitos destroem microrganismos através da liberação de *Reactive Oxygen Species* (ROS), elastase e *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) e liberam moléculas como *Matrix Metalloproteinase* (MMP), TNF- α , IL-1 β , IL-6 e *Interleukin-17* (IL-17) que intensificam a inflamação (LAROUCHE et al., 2018; PHILLIPSON; KUBES, 2019; MAMUN et al., 2024).

Posteriormente, inúmeros monócitos circulantes são mobilizados para o sítio inflamatório e se diferenciam em macrófagos (DELAVARY et al., 2011). Em virtude do ambiente rico inicialmente em PAMP, DAMP, *Interferon gamma* (IFN- γ) e TNF- α , os monócitos se diferenciam em macrófagos ativados classicamente, conhecidos como M1 (WANG et al., 2014; QING, 2017). Esses macrófagos realizam a fagocitose de microrganismos e de células mortas, inclusive dos neutrófilos. Além disso, os M1 liberam diversos mediadores pró-inflamatórios como IL-1 β , IL-6, TNF- α e ROS (WANG et al., 2014; HESKETH et al., 2017).

Por outro lado, a *Interleukin-4* (IL-4), *Interleukin-10* (IL-10), *Interleukin-13* (IL-13) e o TGF- β levam à formação de macrófagos de perfil alternativo, conhecidos como M2. Os macrófagos M2 apresentam atividade tipicamente anti-inflamatória como a produção de IL-10, TGF- β , VEGF e *Insulin-like Growth Factor 1* (IGF-1). Dessa forma, os macrófagos M2 promovem atividades pró-resolutivas como a proliferação de fibroblastos e diferenciação em miofibroblastos e a proliferação de queratinócitos e endoteliócitos (WANG et al., 2014; HESKETH et al., 2017; PHILLIPSON; KUBES, 2019; MAMUN et al., 2024).

Embora ambos os fenótipos M1 e M2 estejam presentes durante o processo de cicatrização de feridas, é sabido que suas proporções sofrem mudanças em função do tempo de evolução das lesões (XU LANDÉN et al., 2016; HESKETH et al., 2017). A polarização de macrófagos M2 é uma etapa fundamental para a resolução do processo inflamatório. Dessa forma, a fagocitose de neutrófilos apoptóticos, conhecida como eferocitose (Figura 3), consiste em outra possibilidade para a ativação do perfil M2, benéfico à cicatrização (HESKETH et al., 2017).

Figura 3 - Processo de polarização de macrófagos.



Os macrófagos são classicamente (M1) ou alternativamente (M2) ativados de acordo com os fatores presentes e suas ações serão assim moduladas. A eferocitose (fagocitose de neutrófilos) é uma via alternativa para a ativação do fenótipo M2. DAMP: *Damage-Associated Molecular Pattern*; EGF: *Epidermal Growth Factor*; IFN- γ : *Interferon gamma*; IGF-1: *Insulin-Like Growth Factor-1*; IL-1 β : *Interleukin-1 beta*; IL-10: *Interleukin-10*; IL-13: *Interleukin-13*; IL-4: *Interleukin-4*; IL-6: *Interleukin-6*; iNOS: *Inducible Nitric Oxide Synthase*; M1: Macrófago Classicamente Ativado; M2: Macrófago Alternativamente Ativado; PAMP: *Pathogen-Associated Molecular Pattern*; TGF- β : *Transforming Growth Factor-beta*; TNF- α : *Tumor Necrosis Factor-alpha*; VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*. **Fonte:** próprio autor criado no Microsoft PowerPoint® com material do <https://smart.servier.com>.

O perfil M1 prevalece em estágios iniciais da inflamação e é responsável pelo ambiente pró-inflamatório. À medida em que o processo de reparo progride, o perfil M2 passa a prevalecer na ferida, sendo responsável pelo processo resolutivo. Nesse sentido, a polarização de macrófagos durante a cicatrização de feridas é fundamental para a transição entre inflamação e resolução, evitando a persistência da fase inflamatória e, conseqüentemente, atividade exacerbada de neutrófilos e macrófagos potencialmente pró-inflamatórios (HESKETH et al., 2017).

c) Proliferação

Na fase proliferativa ocorrem três eventos principais, a fibroplasia, a angiogênese e a reepitelização (GURTNER et al., 2008). Na fibroplasia, os fibroblastos migram através da MEC, proliferando e produzindo MMP, colágeno, proteoglicanos, ácido hialurônico, glicosaminoglicanos e fibronectina (SERRA et al., 2017). Posteriormente, os fibroblastos se diferenciam fenotipicamente em miofibroblastos, células com atividade de músculo liso contrátil que favorecem a contração da ferida por estímulo principal do TGF- β (BARBOSA et al., 2010).

A hipóxia local resulta na ativação do *Hypoxia-inducible Factor 1-alpha* (HIF-1 α), que promove a angiogênese com auxílio do VEGF e do *Fibroblast Growth Factor* (FGF), formando novos vasos sanguíneos para fornecer a nutrição tecidual (GURTNER et al., 2008; VEITH et al., 2019). Para a reepitelização, tanto os macrófagos como os próprios queratinócitos secretam TGF- β e *Epidermal Growth Factor* (EGF), que modulam a migração e a proliferação de queratinócitos. Ademais, os fibroblastos também secretam o EGF, contribuindo ainda mais com a reepitelização (MAMUN et al., 2024).

d) Remodelamento

A fase de remodelamento é uma etapa tardia do reparo, podendo durar até anos. Nesse estágio, o colágeno do tipo III é substituído por colágeno tipo I, que possui maior resistência. Ainda, ocorre a apoptose de inúmeros tipos celulares como macrófagos, endoteliócitos, fibroblastos e miofibroblastos, além de reorientação das fibras colágenas para promover resistência gradativa à ferida (GANTWERKER; HOM, 2011; GURTNER et al., 2008). Ao final, uma barreira funcional é formada, sendo caracterizada por um tecido cicatricial, rico em MEC, porém menos celular e resistente do que a pele intacta (GURTNER et al., 2008; MAMUN et al., 2024).

2.2. Modelos experimentais na cicatrização de feridas

Inúmeros modelos experimentais foram utilizados ao longo dos anos para mimetizar e compreender o processo de cicatrização de feridas. De uma forma geral, todos os modelos apresentam vantagens e desvantagens que devem ser consideradas de acordo com o objetivo do estudo. Assim, podem ser classificados em *in silico*, *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. No entanto, embora todos os modelos tenham importante papel para a busca de alternativas terapêuticas para a cicatrização, sabe-se que os modelos *in vivo* são fundamentais para o avanço dos ensaios clínicos em humanos (SAMI et al., 2019).

Os modelos *in silico* estão longe de ser a forma mais usual de avaliar o reparo de feridas. Nesse tipo de experimento são utilizadas ferramentas computacionais que contribuem, principalmente, para o entendimento das fases da cicatrização de feridas. Além disso, esses modelos computacionais são eficazes para projetar tecidos substitutos no reparo das feridas (SAMI et al., 2019). Estudos com modelos computacionais também têm sido bastante utilizados para investigar a migração celular, formação de cicatrizes, reepitelização, fibroplasia e neoangiogênese (BAKAR et al., 2024).

Os modelos *in vitro* são amplamente utilizados em pesquisas de cicatrização, sobretudo quando se trata de testes iniciais de substâncias potencialmente terapêuticas, para mimetizar feridas crônicas, cicatrizes hipertróficas ou quelóides e quando o objetivo envolve a determinação dos mecanismos de ação (GRAMBOW et al., 2021; HOFMANN et al., 2023). Nesse tipo de experimento são utilizadas comumente células como fibroblastos, queratinócitos e/ou endoteliócitos. O ensaio de raspagem, ou “arranhão”, é o método mais utilizado em experimentos *in vitro*. Nesse modelo, uma monocamada do tipo celular de interesse é raspada por meio de uma ponta de pipeta e o processo de migração para o fechamento do defeito é quantificado após a administração do tratamento (HOFMANN et al., 2023).

Para tornar a experimentação ainda mais fiel ao que ocorre *in vivo* podem ser utilizados os modelos *ex vivo*. Um explante, geralmente de pele, é cultivado em condições artificiais e submetido a diferentes terapias experimentais. Contudo, esse modelo ainda não pode substituir todos os experimentos com animais na pesquisa (GRAMBOW et al., 2021). Embora sejam pouco utilizados, os modelos *ex vivo* apresentam vantagens quando comparados aos estudos *in vivo*, como condições experimentais controladas e menor conflito ético na utilização de animais (ANDERSSON et al., 2021).

Os experimentos *in vivo* são os mais amplamente utilizados, eficientes e relevantes para os estudos de cicatrização de feridas. Nesses modelos são utilizados principalmente roedores para observar o processo de reparo da pele em tempo real, sendo fundamentais na investigação de novas terapias que antecedem a realização dos ensaios clínicos (MASSON-MEYERS et al., 2020). A partir desses animais, inúmeros modelos de feridas podem ser utilizados, como as feridas excisionais, incisionais ou por queimadura, que por vezes são associadas a condições que prejudicam o reparo tecidual, como o diabetes, a isquemia e o hipoestrogenismo (MUKAI et al., 2016; GRADA et al., 2018; MASSON-MEYERS et al., 2020).

Segundo SAMI et al (2019), embora a pele não se assemelhe a humanos, os roedores são os melhores modelos animais para a testagem farmacológica que antecede os ensaios em humanos. Nesses animais, a presença do músculo panículo carnoso promove uma rápida contração da lesão, que difere dos humanos onde a ausência desse músculo permite o reparo predominantemente por reepitelização. Então, apesar das vantagens elencadas para estudos com animais, essa característica deve ser sempre considerada do ponto de vista translacional (ABDULLAHI et al., 2014).

2.3. Papel do estrógeno no reparo tecidual

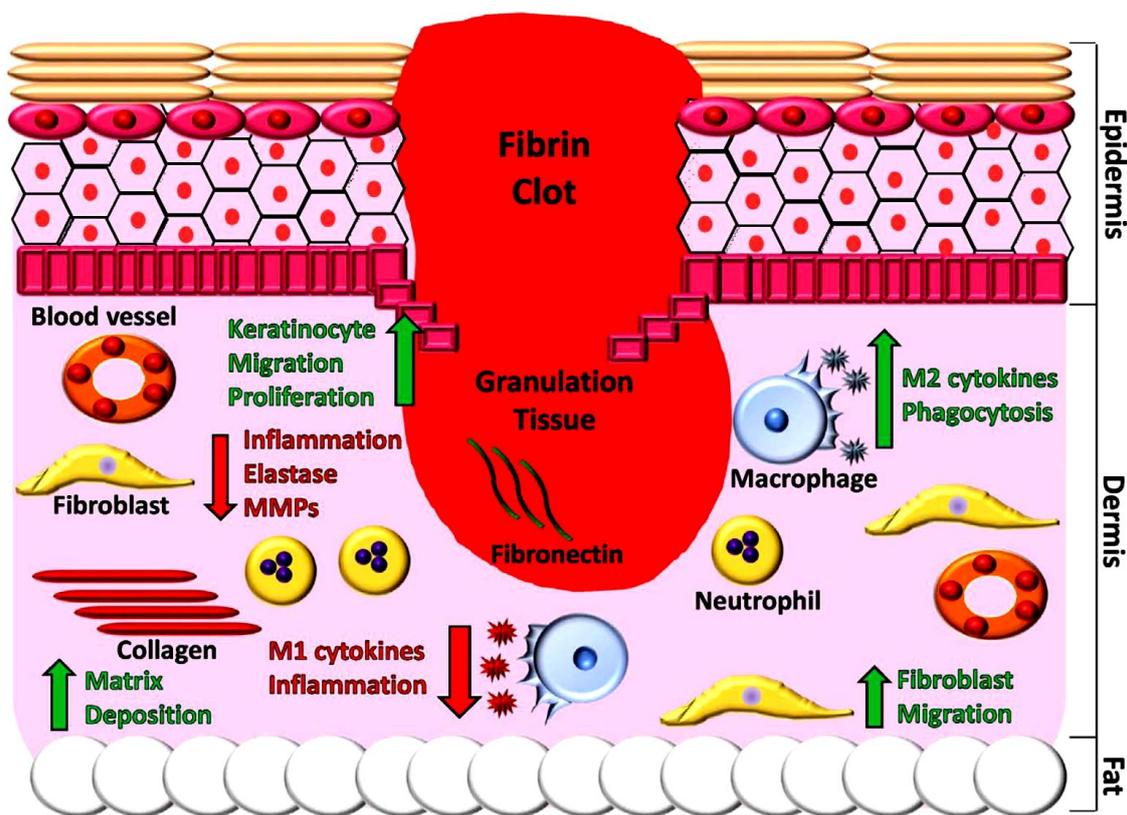
A população idosa tem crescido muito nos últimos anos e esse aumento na longevidade tem evidenciado alterações fisiológicas associadas à idade. Na pele, as consequências podem ser identificadas pelo aumento na susceptibilidade a infecções e problemas na cicatrização de feridas (KENYON, 2010; ASHCROFT et al., 1997).

Em mulheres na menopausa, particularmente, observa-se a redução drástica da circulação de estrógeno, responsável pela manutenção e renovação da pele. E, de fato, isso ocorre a ponto de resultar em processos inflamatórios exacerbados e, por consequência, na formação de feridas crônicas não cicatrizantes (ASHCROFT et al., 1997).

O estrógeno atua sobre dois receptores hormonais nucleares com características distintas, o ER α e o ER β (CAMPBELL et al., 2010). Aliado a isso, sabe-se que monócitos, macrófagos, neutrófilos, linfócitos e mastócitos possuem receptores para estrógeno, o que também parece influenciar na produção e liberação de citocinas e fatores de crescimento que modulam o reparo tecidual (HORNG et al., 2017).

O estrogênio inibe o recrutamento de neutrófilos via redução da molécula de adesão L-selectina, que impede sua chegada ao sítio inflamatório (MUKAI et al., 2016). Além disso, o estrogênio tem papel crucial na polarização de macrófagos, favorecendo os do tipo M2 sobre os M1, o que tem grande potencial anti-inflamatório (Figura 4) (WILKINSON; HARDMAN, 2017).

Figura 4 - Efeitos do estrogênio na cicatrização de feridas.



O estrogênio contribui na migração e proliferação dos queratinócitos e na migração dos fibroblastos, induz a deposição de matriz extracelular e promove atividade anti-inflamatória por ação de M2 (setas verdes). Além disso, o estrogênio reduz a atividade inflamatória por diminuir os M1, bem como as citocinas pró-inflamatórias, elastase e MMP (setas vermelhas). **Fonte:** Wilkinson; Hardman (2017).

Diversos estudos têm demonstrado que roedores fêmeas jovens submetidas a ovariectomia apresentam cicatrização de ferida cutânea retardada pelo hipostrogenismo sistêmico. Contudo, quando tratados com estrogênio exógeno, ocorre reversão do atraso no fechamento das feridas. Esse efeito foi observado em associação à redução de neutrófilos, macrófagos e $TNF-\alpha$. Ademais, o estrogênio promoveu adequada reepitelização e deposição de colágeno nas lesões, bem como polarização benéfica de macrófagos de M1 para M2 (ASHCROFT et al., 1997; ASHCROFT et al., 2003; EMMERSON et al., 2010; HARDMAN et al., 2008; ROUTLEY; ASHCROFT, 2009; BRUFANI et al., 2009; EMMERSON et al., 2009; CAMPBELL et al., 2010; GILLIVER et al., 2008; EMMERSON et al., 2013; MUKAI et al., 2014).

A TRH restabelece de forma eficaz o processo de reparo da pele e isso pode ser observado mediante dois mecanismos, a regulação negativa da expressão do *Macrophage Migration Inhibitory Factor* (MIF) e o aumento da produção do *Transforming Growth Factor-beta 1* (TGF- β 1) pelos fibroblastos (ASHCROFT et al., 1997; ASHCROFT et al., 2003).

No entanto, embora o estrógeno exógeno seja eficaz no tratamento de afecções causadas pelo hipoestrogenismo, o potencial efeito maléfico da TRH de longo prazo deve ser considerado. Condições como câncer de ovário, endométrio e mama, bem como acidente vascular cerebral, doença coronariana, trombose vascular e supressão da libido têm sido relacionadas ao uso prolongado do estrogênio em mulheres na menopausa (ANDERSON et al., 2004; HALL; PHILLIPS, 2005; STEVENSON; THORNTON, 2007).

Os efeitos negativos estão principalmente relacionados aos efeitos sistêmicos sobre o ER α (AHN et al., 2020). Em virtude disso, tem havido um declínio significativo na prescrição da TRH e isso tem estimulado a pesquisa por novas terapias seletivas, com efeitos semelhantes ao estrógeno, mas sem reações adversas a longo prazo (MOHTADI et al., 2021).

O tamoxifeno e o raloxifeno são moléculas que já demonstraram efeito no fechamento precoce de feridas em camundongas ovariectomizadas (HARDMAN et al., 2008). Ambas as moléculas são consideradas moduladoras seletivas dos receptores estrogênicos e podem atuar em receptores estrogênicos inibindo ou estimulando a sua atividade. Embora ambos tenham demonstrado efeitos no fechamento de feridas, o conhecimento sobre sua atividade na pele ainda é limitado (ZOMER; COOKE, 2023).

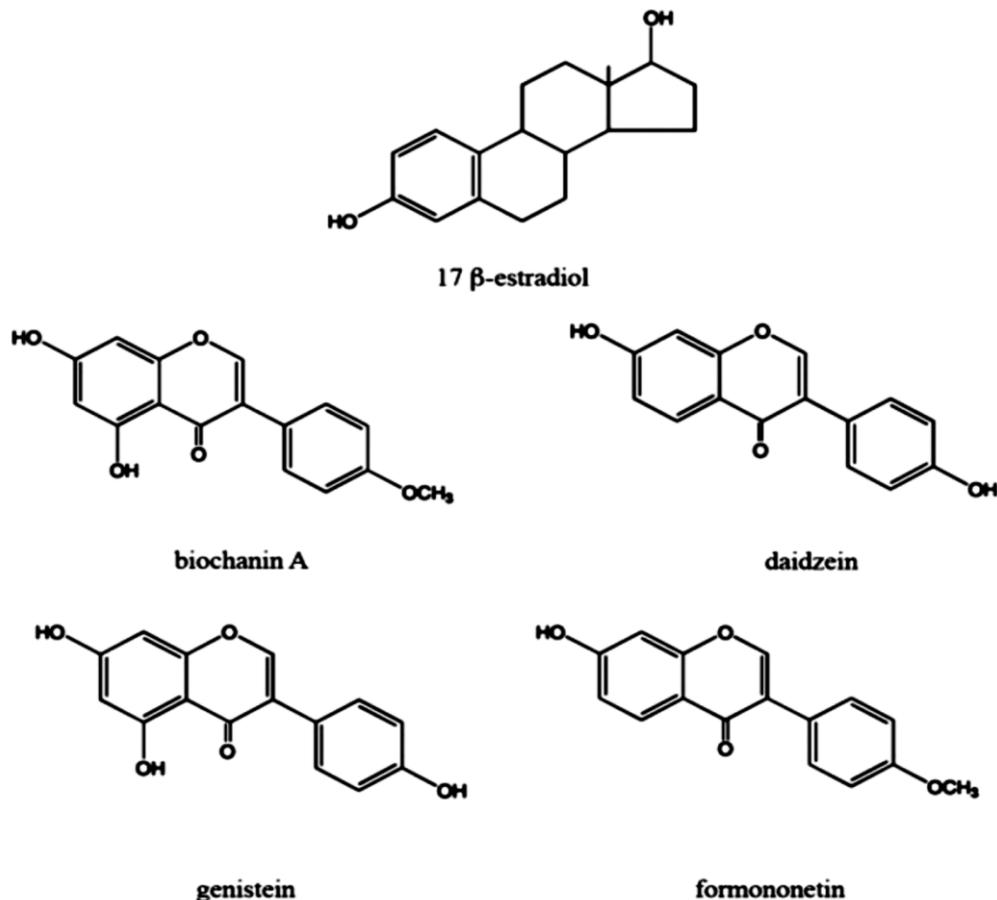
2.4. Fitoestrógenos na cicatrização de feridas

Os fitoestrógenos são assim conhecidos devido à sua origem vegetal, estrutura e função semelhantes ao estrógeno. São compostos não-esteroidais representados pelos grupos flavonoides, que incluem as isoflavonas, cumestanos e prenilflavonoides, e não flavonoides, que incluem as lignanas (KRÍŽOVÁ et al., 2019). Nas isoflavonas, particularmente, a presença do anel fenólico e sua semelhança química com a molécula de estrógeno (Figura 5) garantem a interação com o ER α e o ER β (ATIQU-UR-REHMAN, 2019).

Os fitoestrógenos possuem atividade tanto sobre ER α como sobre ER β , embora exibam maior afinidade pelo ER β . No entanto, seus efeitos biológicos normalmente não se restringem à via de sinalização estrogênica, ou seja, suas propriedades farmacológicas também ocorrem por outros mecanismos independentes (SARFRAZ et al., 2020).

Os fitoestrógenos podem ser encontradas em inúmeros vegetais como o amendoim, grão de bico e, principalmente, o trevo vermelho (*Trifolium pratense*). As plantas desse gênero são amplamente utilizadas na medicina popular e investigadas no tratamento de inúmeras afecções, sejam relacionadas ao hipoestrogenismo ou não. Tais vegetais são ricos nos principais fitoestrógenos, formononetina, daidzeína, genisteína e BCA (ATIQU-UR-REHMAN, 2019; MANZOUREH; FARAHPOUR, 2020). No entanto, outros fitoestrógenos, como equol, gliciteína e puerarina, também são reportados como cicatrizantes (CHO et al., 2014; SUN ET AL., 2022; LEPHART, 2023).

Figura 5 - Estrutura molecular do estrógeno e dos fitoestrógenos.



O 17β-estradiol possui um núcleo esteroidal com quatro anéis e um grupo hidroxila no anel. Os fitoestrógenos também possuem grupos fenólicos e uma estrutura que permite a ligação com os receptores estrogênicos. **Fonte:** Atiq-Ur-Rehman (2019).

Em 2002, Bayerl e Keil avaliaram o efeito de um creme contendo isoflavona em 234 mulheres com idade máxima de 65 anos e com no mínimo três anos na menopausa. O creme foi administrado topicamente na pele e não foi realizada TRH. Os autores observaram que a hidratação e a textura da pele foram significativamente melhores nas áreas tratadas e ainda houve redução das rugas faciais e da flacidez da pele.

No reparo de feridas em roedores, Renda et al. (2013) observaram efeito cicatrizante do extrato metanólico de diferentes espécies de *Trifolium* em modelo murino de feridas e atribuíram a eficácia observada ao efeito combinado dos fitoestrógenos formononetina, daidzeína, genisteína e BCA. Em trabalho recente, Manzoureh e Farahpour (2020) verificaram que o extrato hidroetanólico de *T. pratense* aumentou a taxa de contração e melhorou a angiogênese, reepitelização e deposição de colágeno em feridas de roedores.

A genisteína tem sido um dos fitoestrógenos mais investigados para a cicatrização de feridas (BORAWSKA et al., 2009; EMMERSON et al., 2010; JURZAK et al., 2014; FÁBER et al., 2018; HU et al., 2024). A genisteína tópica melhorou a vascularização e a proliferação dérmica na menopausa em mulheres (MORAES et al., 2009). Em modelo murino, a genisteína apresenta atividade no fechamento da ferida (EO et al., 2016; HU et al., 2024), bem como na reepitelização, fibroplasia e angiogênese (MARINI et al., 2010).

O fitoestrógeno glicitina apresentou efeito protetor contra o fotoenvelhecimento da pele, aumentando a síntese de colágeno tipo I e a viabilidade em fibroblastos dérmicos humanos irradiados com radiação ultravioleta (SEO et al., 2014). Outros fitoestrógenos, como a formononetina e a daidzeína demonstraram efeito no fechamento de feridas cutâneas em camundongos durante o processo de cicatrização nos estudos de Huh et al. (2011) e Mukai et al. (2012), respectivamente.

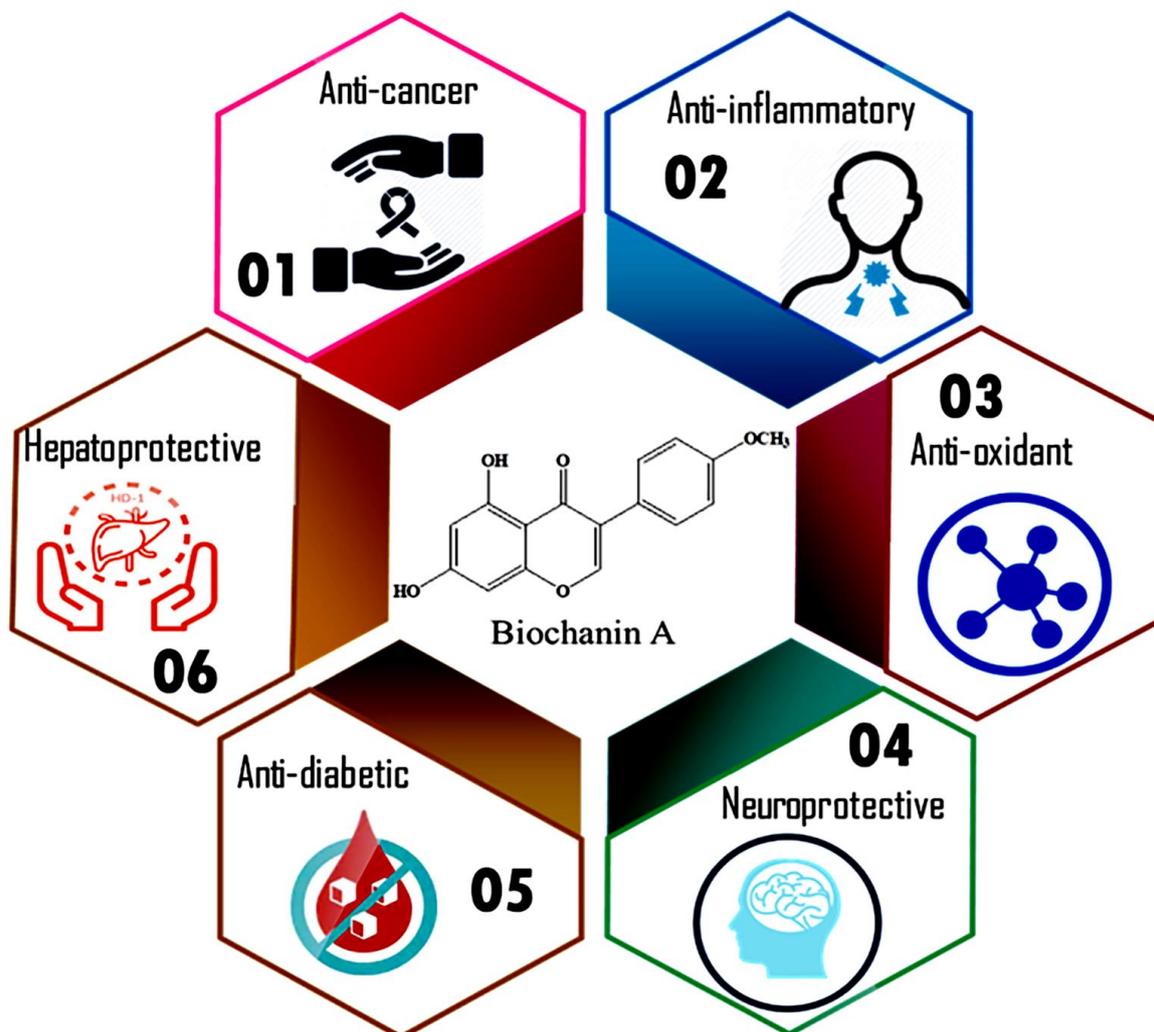
2.5. Biochanina A

A BCA, 4'-metoxi-5, 7-dihidroxi isoflavona (C₁₆H₁₂O₅), é uma isoflavona natural presente em inúmeros vegetais, especialmente em espécies de trevo (*Trifolium*). Pode ser encontrada também na soja, alfafa, amendoim e grão de bico (BREIKAA, 2013). Essa molécula possui semelhança estrutural com o 17- β -estradiol que permite sua interação com o ER α e com o ER β (OSEN et al., 2008; VITALE et al., 2013; TANWAR et al., 2021). No entanto, as propriedades terapêuticas da BCA são atribuídas sobretudo à sua seletividade ao ER β (KUIPER et al., 1998). Além dos receptores nucleares, os efeitos da BCA podem ser mediados pela ação em receptor estrogênico ligado à membrana, o *G Protein-coupled Receptor 30* (GPR30) (MOLINA et al., 2018).

Além das atividades como fitoestrógeno, a BCA possui mecanismos não dependentes dos receptores estrogênicos. Existem propriedades farmacológicas que são efetivadas pela ligação a outros receptores, como o PPAR- γ , ou pela modificação de outras vias de sinalização, como a do NF- κ B e da MAPK (KOLE et al., 2011; YU et al., 2019; SARFRAZ et al., 2020).

A BCA pode ser considerada um pró-fármaco, pois é convertida em genisteína através da desmetilação. Seus efeitos biológicos não são idênticos (SUNDARESAN et al., 2018), mas assim como a genisteína estão muito relacionados aos efeitos fitoestrogênicos. Dentre tais atividades da BCA, podem ser elencadas a antioxidante, anti-inflamatória, anticâncer, antidiabética, hepatoprotetora, neuroprotetora (Figura 6) (SARFRAZ et al., 2020), antibacteriana, antiobesidade e cardioprotetora (YAN et al., 2021).

Figura 6 - Propriedades farmacológicas da Biochanina A.



A Biochanina A possui, dentre outras atividades, a anti-inflamatória, antioxidante, neuroprotetora, antidiabética e hepatoprotetora que enfatizam sua importância para a saúde. **Fonte:** Sarfraz et al. (2020).

Felix et al. (2020) demonstraram que a BCA induz redução da inflamação em artrite induzida por zimosan em camundongos. No estudo, observaram que a BCA reduziu o infiltrado de neutrófilos, o edema de pata e os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α

e IFN- γ . A BCA também favoreceu ambiente anti-inflamatório, aumentando os níveis de IL-10 e IL-4. Além disso, os autores verificaram a redução de NETs *in vitro*.

Quando utilizada topicamente, a BCA reduziu a inflamação induzida por raios ultravioleta em queratinócitos humanos e, portanto, preveniu o fotoenvelhecimento e facilitou a cicatrização de feridas (LIM et al., 2013; HOLLMERUS et al., 2018). Seu efeito tópico também parece ser benéfico para afecções como aftas, pois atua reduzindo a secreção de IL-8, IL-6 e VEGF (KALAYCIYAN et al., 2007).

Em pesquisa recente, Gajic et al. (2022) investigaram a utilização de fibras de polilactídeo eletrofiado como carreador de BCA. Nesse estudo, os autores ressaltaram o potencial da referida formulação com a BCA para a cicatrização de feridas, pois a atividade dependente da concentração foi observada na proliferação e migração de fibroblastos L929 *in vitro*. Além disso, os autores destacaram a importância da realização de estudos com experimentação em animais para a complementação dessa investigação.

Galal et al. (2018) avaliaram o papel benéfico da BCA intraperitoneal na proteção da pele de ratas ovariectomizadas. Os autores observaram, dentre outros efeitos, regulação negativa da expressão de TNF- α e *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS), bem como regulação positiva da expressão de TGF- β . Por fim, sugeriram que a BCA pode ser uma terapia alternativa útil para alterações cutâneas observadas em mulheres na menopausa.

Os efeitos da BCA no reparo de feridas ainda permanecem pouco explorados. Os estudos em cicatrização de feridas são escassos e, até o presente momento, pouco se sabe sobre os mecanismos celulares e moleculares da BCA na cicatrização de feridas. Dessa forma, por mimetizar a atividade do estrógeno e modular processos inflamatórios, acredita-se que a BCA possa ter efeito tópico na cicatrização de feridas, especialmente na deficiência do estrógeno. Assim, torna-se fundamental investigar o efeito da BCA na cicatrização de feridas cutâneas em um modelo murino de lesão excisional hipoestrogênica por ovariectomia.

CAPÍTULO 1- FITOESTRÓGENOS NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS: REVISÃO SISTEMÁTICA

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Explorar os mecanismos de ação responsáveis pelos efeitos dos fitoestrógenos na cicatrização de feridas cutâneas em modelos pré-clínicos.

3.2. Específicos

- Descrever os principais mecanismos associados aos efeitos dos fitoestrógenos na cicatrização de feridas; e
- Identificar os tipos de fitoestrógenos, bem como os biomarcadores e os modelos pré-clínicos utilizados.

4. METODOLOGIA

4.1. Estratégia de Pesquisa

A revisão sistemática foi submetida para análise no Registro Prospectivo Internacional de Revisões Sistemáticas (PROSPERO), sendo aprovada sob o protocolo CRD42024508919 com o título “*Healing effect of phytoestrogens in preclinical models: systematic review*”.

A presente revisão teve o intuito de responder à seguinte questão: “Quais os mecanismos de ação responsáveis pelos efeitos dos fitoestrógenos no processo de cicatrização de feridas em modelos pré-clínicos?”. Foram utilizados estudos das seguintes bases de dados: Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), Excerpta Medica Database (EMBASE), PUBMED, Scopus e Web of Science mediante descritores previamente selecionados ("Polyphenols" OR "Phytoestrogens" OR "Isoflavonoids" OR "Isoflavones" OR "Non-steroidal estrogens") AND ("Tissue repair" OR "Skin repair" OR "Re-epithelialization" OR "Wound scar" OR "Regeneration").

4.2. Seleção dos estudos

O processo de seleção dos artigos foi realizado em quatro etapas: busca, triagem, elegibilidade e inclusão. A busca dos artigos nas bases de dados foi realizada por um avaliador (ACNS). Posteriormente, o mesmo avaliador excluiu todos os estudos que foram encontrados em mais de uma base de dados (duplicatas). Em seguida, para a triagem, dois avaliadores independentes (WSN e JMDAA) realizaram a leitura dos títulos e resumos dos artigos, considerando os critérios de seleção pré-estabelecidos e, em caso de conflito, um terceiro avaliador foi considerado (ACNS). Para a elegibilidade, os artigos foram examinados na íntegra por dois avaliadores independentes (WSN e JMDAA) e os conflitos foram novamente resolvidos pelo terceiro avaliador (ACNS). Por fim, a busca por referências cruzadas dentre os estudos selecionados foi realizada por dois avaliadores independentes (WSN e JMDAA) para garantir a completude na busca.

Foram incluídos estudos pré-clínicos (*in vivo*, *in vitro* e *ex vivo*) relacionados à cicatrização de feridas utilizando fitoestrógenos, publicados em qualquer idioma e a qualquer tempo. Foram excluídos ensaios clínicos, revisões, resumos e outras publicações que não fossem pesquisas. Estudos de tratamento com extrato bruto ou frações de espécies vegetais ricas em fitoestrógenos ou combinações foram excluídos, bem como os estudos sem comparação da intervenção com controle.

4.3. Extração e síntese dos dados

Para a coleta dos dados foi utilizado um formulário destacando as seguintes características dos estudos: referência (autor e ano), fitoestrógeno, veículo, dose ou concentração, via de administração, controle, tipo celular/tecidual ou modelo experimental e resultados.

4.4. Análise do risco de viés

O risco de viés foi avaliado usando a ferramenta do Centro de Revisão Sistemática de Experimentação Animal de Laboratório (SYRCLE) (HOOIJMANS et al, 2014), que foi adaptada para os estudos *in vitro* e *ex vivo* (CHAN et al., 2017). O risco de viés foi conduzido por dois avaliadores independentes (ACNS e TSCB) e, em caso de discordância, um terceiro avaliador foi considerado (WSN).

O risco foi avaliado mediante à resposta aos seguintes critérios de qualidade: **1. Geração de sequência (viés de seleção):** a sequência de alocação foi gerada e aplicada adequadamente?; **2. Características de base (viés de seleção):** os grupos foram semelhantes?; **3. Alocação encoberta (viés de seleção):** a alocação foi adequadamente encoberta?; **4. Randomização de habitação (viés de desempenho):** os animais foram alocados aleatoriamente? (domínio não aplicado aos estudos *in vitro* e *ex vivo*); **5. Intervenção encoberta (viés de desempenho):** os investigadores foram encobertos sobre a intervenção que cada grupo recebeu?; **6. Avaliação randomizada do desfecho (viés de detecção):** os dados foram selecionados aleatoriamente para a avaliação dos resultados?; **7. Cegamento do avaliador dos desfechos (viés de detecção):** o avaliador dos resultados estava encoberto?; **8. Desfechos com dados incompletos (viés de atrito):** os dados com resultados incompletos foram adequadamente abordados?; **9. Relatório seletivo de desfechos (viés de relato):** os resultados foram livremente reportados?; **10. Outras fontes de viés (viés de relato):** existe conflito de interesse?.

O risco foi classificado em baixo (resposta sim), incerto (resposta não clara) ou alto (resposta não). Todas as análises foram realizadas e exportadas para a ferramenta Review Manager para a representação em imagens.

4.5. Análise de dados

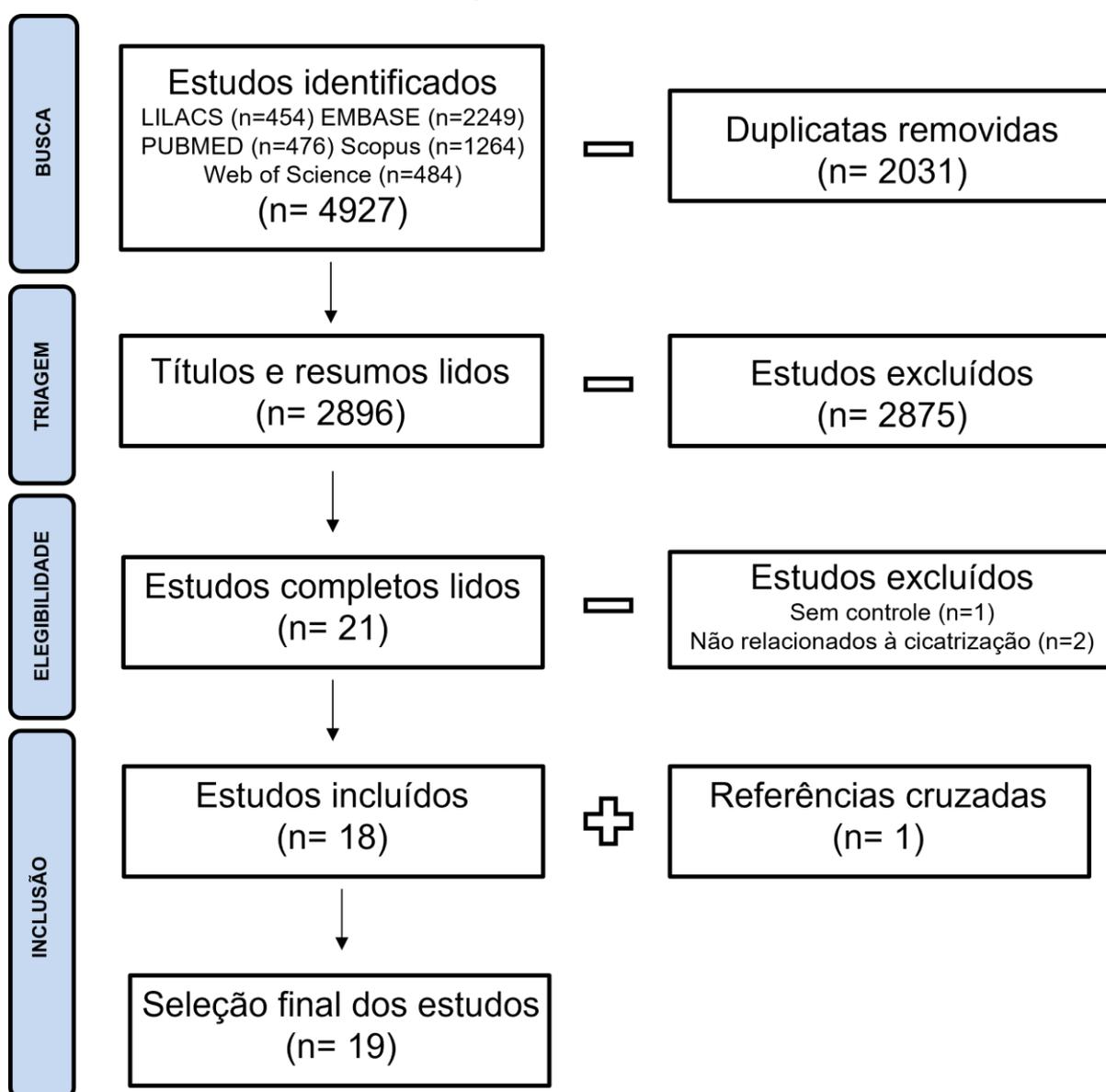
O programa estatístico PRISM versão 8.0 foi utilizado para calcular o índice Kappa para verificar a concordância na seleção dos estudos incluídos. Os demais dados foram analisados de forma descritiva.

5. RESULTADOS

5.1. Seleção de estudos

Foram identificados 4927 estudos mediante a estratégia de busca e, após a exclusão das duplicatas, foram pré-selecionados 2896 artigos. Após a leitura de títulos e resumos, 21 estudos foram selecionados para a leitura integral. Posteriormente à leitura na íntegra, 18 estudos foram selecionados e foi realizada a busca por referências cruzadas, incluindo mais um estudo e totalizando 19 trabalhos incluídos na revisão sistemática (Figura 7). Houve um alto nível de concordância em relação à inclusão ou exclusão entre os dois pesquisadores que examinaram os estudos (Kappa= 0.9815).

Figura 7 - Fluxograma do processo de seleção dos estudos.



O processo de seleção dos estudos sobre fitoestrógenos na cicatrização de feridas foi realizado em quatro etapas: busca, triagem, elegibilidade e inclusão. **Fonte:** próprio autor criado no Microsoft PowerPoint®.

5.2. Características dos estudos selecionados

Todos os estudos foram publicados em inglês e entre os anos de 2009 e 2024. Dentre os 19 estudos selecionados, 13 realizaram análises dos efeitos dos fitoestrógenos *in vivo*, 11 avaliaram *in vitro* e dois *ex vivo*. Um dos trabalhos avaliou simultaneamente *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo* e cinco avaliaram tanto *in vivo* como *in vitro* (Tabela 1). Embora Emmerson et al. (2010) tenham avaliado o efeito da genisteína *in vivo* e *in vitro*, não incluímos os dados *in vitro* nesta revisão, pois não foi descrito o controle utilizado no estudo.

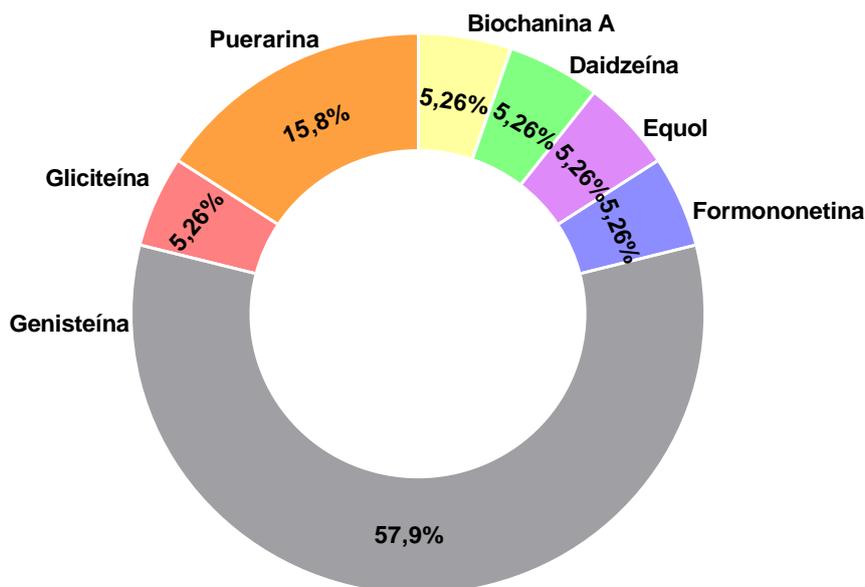
Tabela 1 - Artigos de acordo com o tipo de estudo pré-clínico.

| Referência | Fitoestrógeno | Modelo de estudo | | |
|-----------------------|---------------|------------------|-----------------|----------------|
| | | <i>in vivo</i> | <i>in vitro</i> | <i>ex vivo</i> |
| Borawska et al., 2009 | Genisteína | | X | |
| Cao et al., 2009 | Genisteína | | X | |
| Emmerson et al., 2010 | Genisteína | X | | |
| Marini et al., 2010 | Genisteína | X | | |
| Huh et al., 2011 | Formononetina | X | X | X |
| Park et al., 2011 | Genisteína | X | | |
| Mukai et al., 2012 | Daidzeína | X | | |
| Cho et al., 2014 | Gliciteína | | X | |
| Tie et al., 2013 | Genisteína | X | X | |
| Jurzak et al., 2014 | Genisteína | | X | |
| Eo et al., 2016 | Genisteína | X | | |
| Fáber et al., 2018 | Genisteína | X | X | |
| Turer; Onger, 2018 | Puerarina | X | | |
| Nguyen et al., 2021 | Puerarina | X | X | |
| Gajic et al., 2022 | Biochanina A | | X | |
| Sun et al., 2022 | Puerarina | X | X | |
| Lephart, 2023 | Equol | | | X |
| Peng et al., 2023 | Genisteína | X | X | |
| Hu et al., 2024 | Genisteína | X | | |

Foram avaliados estudos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* dentre os 19 selecionados. **Fonte:** próprio autor criado no Microsoft Word®.

A genisteína foi o fitoestrógeno mais estudado com 11 (57,9%) trabalhos selecionados. Em seguida, foi a puerarina com três (15,8%) e as demais moléculas, BCA, daidzeína, formononetina, equol e gliciteína, com um (5,26%) estudo cada (Figura 8).

Figura 8 - Frequência dos fitoestrógenos nos estudos selecionados.



Foram identificados nos estudos selecionados sete diferentes fitoestrógenos. **Fonte:** próprio autor criado no programa estatístico PRISM®.

Dentre os estudos *in vitro* e *ex vivo*, foi observada a maior utilização do Dimetilsulfóxido (DMSO) como veículo. Em três estudos não foi descrito o veículo e houve alta heterogeneidade na concentração do fitoestrógeno (Tabela 2). Dois estudos utilizaram biotecnologias para veicular o fitoestrógeno. Gajic et al. (2022) utilizaram fibras de polilactídeo eletrofiadas para o tratamento com BCA e Sun et al. (2022) utilizaram proteína da seda com polímero sintético de polivinilpirrolidona para o tratamento com puerarina.

O controle mais utilizado foi o tratamento com veículo em quatro estudos (33,4%). Não tratado foi observado em dois (16,7%) e a salina em um (8,3%), enquanto três (25%) estudos utilizaram simultaneamente o veículo e o não tratamento (CHO et al., 2014; GAJIC et al., 2022; LEPHART, 2023) e um (8,3%) a salina e o veículo (SUN et al., 2022). Tie et al. (2013) utilizaram como controle a baixa concentração de glicose (8,3%) em comparação com endoteliócitos em alta concentração de glicose tratados com genisteína.

Os tipos celulares mais utilizados nos estudos foram fibroblastos, queratinócitos e endoteliócitos. É importante ressaltar que os fibroblastos foram destaque nos estudos, pois foram utilizadas linhagens normais (BORAWSKA et al., 2009; CAO et al., 2009; JURZAK et al., 2014), originárias de camundongos (GAJIC et al., 2022), hipertróficas (CAO et al., 2009), quelóides (JURZAK et al., 2014) ou ainda de granulação (BORAWSKA et al., 2009). Dentre os dois estudos *ex vivo*, um utilizou modelo tecidual de cultura de explante de músculo esquelético e o outro de culturas de pele humana.

Tabela 2 - Características dos estudos *in vitro* e *ex vivo*.

| Referência | Fitoestrógeno | Veículo (concentração) | Controle | Tipo celular/tecidual |
|-----------------------|---------------|--|-----------------------|--|
| Borawska et al., 2009 | Genisteína | DMSO (1, 5, 10, 25 e 50 µM) | Veículo | NHSF e GTFs |
| Cao et al., 2009 | Genisteína | DMSO 1% (25, 50 e 100 mmol/L) | Veículo | HSFBs e normais |
| Huh et al., 2011 | Formononetina | Salina (0,1, 1, 10, 50, 100µM) | Veículo | HUVECs e Cultura de explante de músculo esquelético* |
| Cho et al., 2014 | Gliciteína | DMSO (20µM) | Não tratado e veículo | HaCat |
| Tie et al., 2013 | Genisteína | Não descrito (1 µM e 0,1 µM) | 5.5 mM glicose | HUVECs |
| Jurzak et al., 2014 | Genisteína | DMSO (370, 185, 92.5, 37, 18.5, 3.7, 1.85, 0.37 e 0µM) | Veículo | NHDF e KEL FIB |
| Fáber et al., 2018 | Genisteína | Salina (1, 10, 100 e 1000 nM) | Salina | HUVECs ou HMVEC-D |
| Nguyen et al., 2021 | Puerarina | Não descrito (1 ou 10 µM) | Não tratado | HaCaT tratadas com dexametasona |
| Gajic et al., 2022 | Biochanina A | PLA (2% e 5%) | Não tratado e veículo | Fibroblastos L929 |
| Sun et al., 2022 | Puerarina | SF/PVP (não descrito) | Salina e veículo | HaCaT |
| Lephart, 2023 | Equol | Transcutol (0,50%) | Não tratado e veículo | EFT-400* |
| Peng et al., 2023 | Genisteína | Não descrito (1 e 10 µg/mL) | Não tratado | EPCs |

As características dos estudos *in vitro* e *ex vivo* foram classificadas de acordo com a referência, fitoestrógenos, veículo e concentração, controle e tipo celular/tecidual. **ex vivo*. DMSO: Dimetilsulfóxido; EFT-400: *Full-Thickness Epidermal Human Skin*; EPCs: *Endothelial Progenitor Cells*; GTFs: *Granulation Tissue Fibroblasts*; HaCat: *Human Keratinocyte Cell Line*; HMVEC-D: *Human Dermal Microvascular Endothelial Cells*; HSFBs: *Hypertrophic Scar Fibroblasts*; HUVECs: *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*; KEL FIB: *Keloid Fibroblast Cell Line*; L929: *Mouse Skin Fibroblasts*; NHDF: *Normal Human Dermal Fibroblast Cell Line*; NHSF: *Normal Human Skin Fibroblasts*; PLA: *Electrospun Polylactic Acid Fibers*; SF/PVP: *Silk Fibroin/Synthetic Polymer Polyvinylpyrrolidone*. **Fonte:** próprio autor criado no Microsoft Word®.

Para os estudos *in vivo*, os principais veículos utilizados foram a dieta e o DMSO (isolado ou associado) ambos com três (23%) artigos, seguidos pela salina com dois (15,3%). Ainda sobre esses estudos, observou-se alta heterogeneidade na dose/concentração e no tempo de tratamento. A via de administração também variou bastante, sendo a via oral mais utilizada com cinco (38,4%) estudos, seguida da via subcutânea com três (23%) e tópica com dois (15,3%) (Tabela 3).

O controle dos estudos se deu principalmente com animais tratados com veículo (30%), dieta ou salina (23%). Uma biotecnologia com nanofibras de *Silk Protein/Synthetic Polymer* (SF/PVP) foi utilizada em um (7,69%) estudo. Os modelos experimentais apresentaram em comum a majoritária utilização da ferida excisional de espessura total, geralmente com feridas bilaterais de 4mm de diâmetro. Na maioria dos estudos foram utilizadas feridas crônicas devido a fatores como diabetes (TIE et al., 2013; EO et al., 2016; TURER; ONGER, 2018), ovariectomia (EMMERSON et al., 2010; MARINI et al., 2010; MUKAI et al., 2012; FÁBER et al., 2018), dexametasona (NGUYEN et al., 2021) ou choque hemorrágico (PENG et al., 2023).

Outro ponto importante sobre os modelos experimentais é que não existe padronização em comum para a espécie ou idade animal, embora todos tenham sido roedores, sendo mais comum a utilização de camundongos jovens. Quanto ao sexo, foi observada a utilização semelhante entre machos e fêmeas. No entanto, vale a pena destacar que os estudos com fêmeas foram relacionados com o modelo experimental de ovariectomia para mimetizar a deficiência de estrógeno (EMMERSON et al., 2010; MARINI et al., 2010; MUKAI et al., 2012; FÁBER et al., 2018).

Tabela 3 - Características dos estudos *in vivo*.

| Referência | Fitoestrógeno | Veículo (dose/concentração) | Posologia | Controle | Modelo experimental |
|------------------------------|---------------|--|--|--|---|
| Emmerson et al., 2010 | Genisteína | 5% DMSO e 95% de óleo de milho (50 mg/kg/dia) | Subcutânea (diária por 3 dias) | Veículo | Duas feridas excisionais (1cm) em camundongos fêmeas C57BL/6 de 10 semanas de idade ovariectomizadas ou simuladas |
| Marini et al., 2010 | Genisteína | DMSO e NaCl 0.9% (1 e 10 mg·kg-1) | Subcutânea (diária por 12 dias) | Não tratado | Duas incisões longitudinais (4 cm) suturadas em ratos sprague-dawley de 12 semanas de idade ovariectomizados ou simulados |
| Huh et al., 2011 | Formononetina | Salina (50µM) | Intradérmica perilesional (diária por 7 dias) | Salina | Ferida incisional (0,5 cm de diâmetro, 3 cm de espessura) em camundongos atímicos machos de 6–8 semanas de idade |
| Park et al., 2011 | Genisteína | Dieta (0.025% e 0.1%) | Oral (diária <i>ad libitum</i> por 2 semanas) | Dieta sem genisteína | Feridas bilaterais (4 mm) em camundongos ICR fêmeas de 4 semanas de idade |
| Mukai et al., 2012 | Daidzeína | Dieta (0,03 mg/dia) | Oral (<i>ad libitum</i> após a ovariectomia por duas semanas) | Dieta sem daidzeína | Duas feridas excisionais (4mm) em camundongos C57BL/6 fêmeas de 8 semanas de idade ovariectomizadas |
| Tie et al., 2013 | Genisteína | 5% DMSO e 95% PEG-400 (0, 2, 1 ou 5 mg/kg/dia) | Subcutânea (diária por 14 dias) | Veículo | Feridas (4 mm) em camundongos machos C57BL/6 de 10–12 semanas de idade normais ou diabéticos induzidos por STZ |
| Eo et al., 2016 | Genisteína | Dieta (0.025 e 0.1%) | Oral (diária <i>ad libitum</i> por 2 semanas) | Dieta sem genisteína | Feridas excisionais (4mm) em camundongos fêmeas não-diabéticos e diabéticos de 4 semanas de idade |
| Turer; Onger, 2018 | Puerarina | Água destilada (200mg/animal) | Oral (diária por 7 dias) | Veículo | Ferida incisional de espessura total em ratos de 6-8 semanas de idade normais ou diabéticos induzidos por SZT |
| Fáber et al., 2018 | Genisteína | Salina (1mg/kg) | Intramuscular (diária por uma semana) | Salina | Flap de 2cm x 8cm suturado em ratas Sprague-Dawley fêmeas de 6 meses de idade ovariectomizadas e simuladas |
| Nguyen et al., 2021 | Puerarina | Vaselina (0,1 e 1%) | Tópica (diária por 14 dias) | Não tratado | Feridas (5 mm) em camundongos BALB/c machos de 5 semanas de idade tratados com dexametasona |
| Sun et al., 2022 | Puerarina | Nanofibras SF/PVP (dose/concentração não informada) | Tópica (aplicação única) | Salina ou nanofibras de SF/PVP sem puerarina | Feridas excisionais (1 cm de diâmetro) em camundongos ICR machos * |
| Peng et al., 2023 | Genisteína | 0,6% de carboximetilcelulose sódica (100, 400 ou 600 mgkg-1) | Oral (diária por 3 dias) | Veículo | Feridas incisionais (2 cm de diâmetro) em ratos sprague-dawley após choque hemorrágico ou normais * # |
| Hu et al., 2024 | Genisteína | Salina (160 mg·kg-1·d-1) | Intragástrica (diária por 14 dias) | Salina | Feridas bilaterais (4 mm) em camundongos machos C57/BL6 do tipo selvagem de 8 semanas de idade |

As características dos estudos *in vivo* foram classificadas de acordo com a referência, fitoestrógenos, veículo e dose ou concentração, posologia, controle e modelo experimental. *idade dos animais não mencionada; # sexo dos animais não mencionado. DMSO: Dimetilsulfóxido; ICR: *High-affinity Estrogen Receptor Antagonist*; SF/PVP: *Silk Fibroin/Synthetic Polymer Polyvinylpyrrolidone*; STZ: *Streptozotocin*. **Fonte:** próprio autor criado no Microsoft Word®.

5.3. Efeito dos fitoestrógenos sobre a cicatrização de feridas

Foi observada alta heterogeneidade dos estudos em relação aos efeitos dos fitoestrógenos (Tabelas 4 e 5). O efeito cicatrizante, propriedade intimamente relacionada ao reparo de lesões cutâneas, foi observado em 12 (63,15%) estudos. Um dos estudos *in vivo* avaliou o efeito cicatrizante *in vitro* simultaneamente (NGUYEN et al., 2021). Dez avaliaram somente *in vivo*, enquanto um avaliou somente *in vitro* (FÁBER et al., 2018) e um somente *ex vivo* (LEPHART, 2023). As avaliações de cicatrização *in vitro* foram realizadas mediante ensaios de migração celular, enquanto a avaliação *ex vivo* se deu por análise genética. Para a cicatrização *in vivo*, experimentos clássicos de fechamento de lesões cutâneas em animais foram realizados.

O efeito dos fitoestrógenos sobre a fibroplasia foi bastante reportado, sobretudo com a modulação do TGF- β e isoformas (MARINI et al., 2010; HUH et al., 2011; JURZAK et al., 2014; NGUYEN et al., 2021; PENG et al., 2023), bem como a deposição de colágeno (CAO et al., 2009; MARINI et al., 2010; NGUYEN et al., 2021; SUN et al., 2022). A atividade antiproliferativa da genisteína foi observada em fibroblastos hipertróficos no estudo de Cao et al. (2009). Em fibroblastos quelóides, Jurzak et al. (2014) observaram que a genisteína atua diminuindo marcadores da fibroplasia, como o TGF- β 1, β 2, β 3 e *Connective Tissue Growth Factor* (CTGF), bem como modulando marcadores de apoptose (razão *Bcl2-associated X Protein* (BAX)/ *B-cell Lymphoma 2 Protein* (BCL-2)), sugerindo assim um efeito antifibrótico. Em contrapartida, no trabalho de Borawska et al. (2009), foi observado aumento da viabilidade de fibroblatos normais e do tecido de granulação com o uso da genisteína. Ademais, segundo Gajic et al. (2022), a proliferação e a migração de fibroblastos L929 também foi promovida pela BCA.

Do ponto de vista do efeito anti-inflamatório, o TNF- α (EMMERSON et al., 2010; PARK et al., 2011; EO et al., 2016; SUN et al., 2022) e a IL-6 (EMMERSON et al., 2010; FÁBER et al., 2018; SUN et al., 2022) foram destaque. Além disso, a Catalase (CAT) (PARK et al., 2011; EO et al., 2016; FÁBER et al., 2018; LEPHART, 2023) e a Superóxido Dismutase (SOD) (PARK et al., 2011; TIE et al., 2013; FÁBER et al., 2018) foram os marcadores mais utilizados para destacar o efeito antioxidante dos fitoestrógenos. Foram observados efeitos dos fitoestrógenos também na reepitelização (EMMERSON et al., 2010; MARINI et al., 2010; MUKAI et al., 2012; CHO et al., 2014; FÁBER et al., 2018; TURER; ONGER, 2018; NGUYEN et al., 2021; SUN et al., 2022; HU et al., 2024) e angiogênese (MARINI et al., 2010; HUH et al., 2011; FÁBER et al., 2018; TURER; ONGER, 2018).

Tabela 4 - Efeitos dos fitoestrógenos na cicatrização de feridas *in vitro* e *ex vivo*.

| Referências | Fitoestrógeno | Efeitos |
|------------------------------|---------------|---|
| Borawska et al., 2009 | Genisteína | Aumenta a viabilidade de fibroblatos normais e do tecido de granulação |
| Cao et al., 2009 | Genisteína | Inibe a proliferação e a função de fibroblastos hipertróficos, mas não os fibroblastos normais, reduzindo hidroxiprolina e a expressão de colágeno I e III, bem como a atividade de TPK e a transdução do sinal RAS-RAF-MEK-ERK |
| Huh et al., 2011 | Formononetina | Aumenta a área/densidade de germinação capilar que promove angiogênese; aumenta TGF- β 1, VEGF, PDGF e bFGF; aumenta a expressão de bFGF e VEGF, a proteína e a expressão do Egr-1 através da via MAPK; induz a fosforilação (inibe atividade) da ERK e inibe ligeiramente a fosforilação (aumenta atividade) da MAPK |
| Cho et al., 2014 | Gliciteína | Promove a migração de queratinócitos via sinalização AKT e ERK e aumenta a geração de ROS via Nox2 (principal isoforma dos neutrófilos), aumentando o oxigênio que contribui para o crescimento de queratinócitos |
| Tie et al., 2013 | Genisteína | Previne a perda da rede tubular, contribuindo na formação de tubos capilares na alta concentração de glicose |
| Jurzak et al., 2014 | Genisteína | Diminui a expressão gênica de TGF- β 1, β 2, β 3 e CTGF, a quantidade de proteína CTGF de maneira dependente da concentração e a expressão dos genes p53 e p21, bem como a razão BAX/BCL-2 em fibroblastos quelóides |
| Fáber et al., 2018 | Genisteína | Aumenta a porcentagem de fechamento de feridas e os níveis de BCL-2 na ausência de VEGF; aumenta a atividade da SOD com e sem H ₂ O ₂ ; regula positivamente os genes associados à angiogênese e inflamação (CTGF, CXCL5, IL-6, ITGB3, MMP-14 e VEGF-A) e regula negativamente os genes que inibem a angiogênese (COL18A1, TIMP-2 e TIMP-3) |
| Nguyen et al., 2021 | Puerarina | Aumenta o número de células Ki67(+) e a expressão de marcadores de proliferação como K16 e K17 em células HaCaT; diminui o número de células na fase G0/G1 e aumenta a proporção de células nas fases S e G2/M; aumenta a taxa de fechamento de feridas em 24 horas em células HaCaT; aumenta os níveis de p-AKT e p-ERK |
| Gajic et al., 2022 | Biochanina A | Favorece a proliferação e a migração de fibroblastos L929 |
| Sun et al., 2022 | Puerarina | Reduz a expressão de IL-6, COX-2 e iNOS e aumenta IL-10 em queratinócitos |
| Lephart, 2023 | Equol | Favorece a viabilidade da epiderme, derme e pele de espessura total; além disso, estimula e/ou inibe genes que modulam diversos processos fisiológicos, gerando efeitos benéficos para a pele, como antiacne, antienvelhecimento, anti-inflamatório (dor), antioxidante, regulador do ritmo circadiano, na pigmentação, hidratação dérmica, integridade do tecido e cicatrização de feridas propriamente dita |
| Peng et al., 2023 | Genisteína | Melhora a viabilidade de EPCs hipóxicas e promove angiogênese após hipóxia |

Os principais resultados foram resumidos para cada fitoestrógeno estudado *in vitro/ex vivo*. AKT: *AKT Protein*; BAX: *BCL2-Associated X Protein*; BCL-2: *B-Cell Lymphoma 2 Protein*; bFGF: *Basic Fibroblast Growth Factor*; COL:18A1: *Collagen type XVIII alpha 1*; COX-2: *Cyclooxygenase-2*; CTGF: *Connective Tissue Growth Factor*; CXCL5: *C-X-C Motif Chemokine Ligand 5*; Egr-1: *Early Growth Response Protein 1*; EPCs: *Endothelial Progenitor Cells*; ERK: *Extracellular Signal-Regulated Kinase*; H₂O₂: Peóxido de hidrogênio; IL-6: *Interleukin-6*; IL-10: *Interleukin-10*; ITGB3: *Integrin Subunit Beta 3*; iNOS: *Inducible Nitric Oxide Synthase*; K16: *Keratin 16*; K17: *Keratin 17*; Ki-67: *Cell Proliferation Marker Ki-67*; L929: *Mouse Skin Fibroblasts*; MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinase*; MMP-14: *Matrix Metalloproteinase-14*; Nox2: *NADPH Oxidase 2*; p21: *p21 Protein*; p38: *p38 Protein*; p53: *p53 Protein*; PDGF: *Platelet-Derived Growth Factor*; ROS: *Reactive Oxygen Species*; TGF- β 1: *Transforming Growth Factor- β 1*; TGF- β 2: *Transforming Growth Factor- β 2*; TGF- β 3: *Transforming Growth Factor- β 3*; TIMP-2: *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-2*; TIMP-3: *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-3*; TPK: *Tyrosine-Protein Kinase*; VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*; VEGF-A: *Vascular Endothelial Growth Factor A*; α -SMA: *Alpha-Smooth Muscle Actin*. **Fonte:** próprio autor criado no Microsoft Word®.

Tabela 5 - Efeitos dos fitoestrógenos na cicatrização de feridas *in vivo*.

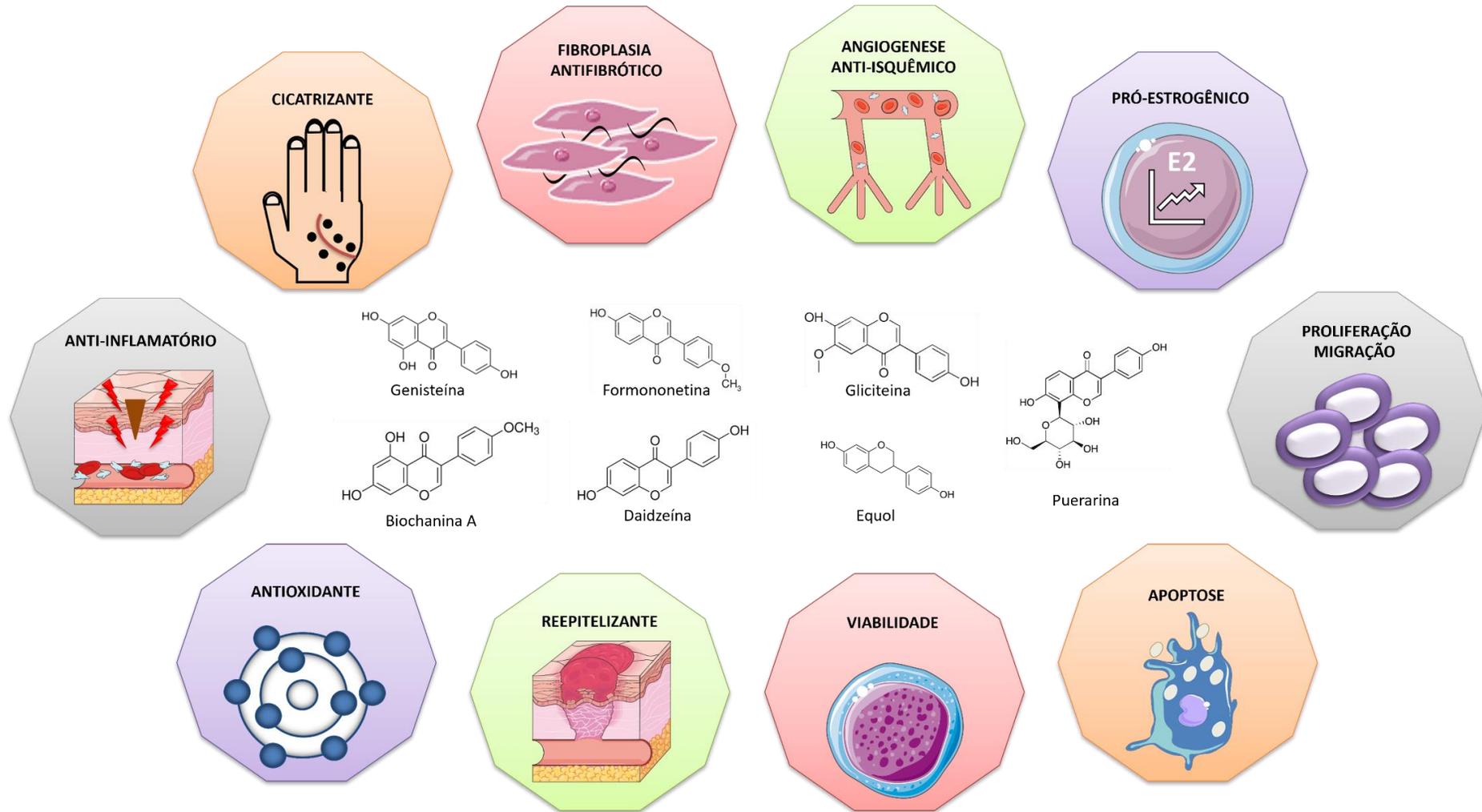
| Referências | Fitoestrógeno | Efeitos |
|-----------------------|---------------|---|
| Emmerson et al., 2010 | Genisteína | Reduz a área da ferida, aumenta a porcentagem de reepitelização, reduz neutrófilos e a proteína MIF, bem como macrófagos CD163 e a expressão de IL-6, MIF e TNF- α em macrófagos; além disso, aumenta o número de células que expressam o ER β na derme e na epiderme |
| Marini et al., 2010 | Genisteína | Aumenta TGF- β 1, TG2, VEGF e a deposição de colágeno; além disso, melhora a resistência à tração da ferida e favorece a reepitelização |
| Huh et al., 2011 | Formononetina | Acelera o fechamento da ferida em cicatrização |
| Park et al., 2011 | Genisteína | Aumenta a taxa de fechamento de feridas durante o estágio inicial da cicatrização, reduz a expressão de Cu-Zn-SOD e Mn-SOD no tecido da pele da ferida, reduz a peroxidação lipídica hepática e aumenta a atividade das enzimas antioxidantes hepáticas (SOD, CAT e GPx); ainda, diminui os níveis de I κ B fosforilado e reduz a expressão de TNF- α e SOD na lesão |
| Mukai et al., 2012 | Daidzeína | Não apresenta diferença para a área da ferida, nova epiderme, novos vasos sanguíneos, miofibroblastos ou fibras de colágeno, mas reduz a área da ferida durante a fase inflamatória e promove a reepitelização |
| Tie et al., 2013 | Genisteína | Aumenta a taxa de cicatrização e a taxa média de perfusão de feridas diabéticas; normaliza a produção elevada de O $_2$ ⁻ (superóxido) e a formação de nitrorosina; reverte os níveis reduzidos de nitrito e previne o aumento da atividade de iNOS; regula a diferenciação, a proliferação e a apoptose celular, atenuando os níveis do SIRT1 e do FoxO1 no tecido da pele diabética, ao mesmo tempo em que aumentou o ac-FoxO1 |
| Eo et al., 2016 | Genisteína | Aumenta a taxa de fechamento de feridas, suprime a inflamação via TNF- α , iNOS, COX2 e NF- κ B e o inflamossomo NLRP3 (NLRP3, ASC e caspase-1) no nível basal, além de reduzir a oxidação via Nrf2, HO-1, GPx e CAT |
| Fáber et al., 2018 | Genisteína | Melhora a viabilidade do retalho, sugerindo efeito protetor contra a isquemia tecidual |
| Turer; Onger, 2018 | Puerarina | Favorece a reepitelização e angiogênese |
| Nguyen et al., 2021 | Puerarina | Aumenta a taxa de fechamento de feridas, aumenta a deposição capilar e de colágeno e a expressão de TGF- β |
| Sun et al., 2022 | Puerarina | Aumenta a taxa de fechamento da ferida, a reepitelização, a deposição de colágeno, a expressão de CD31 e promove melhor neovascularização; além disso, aumenta a expressão do PCNA e inibe a expressão de CD68, sugerindo redução de macrófagos, bem como diminui a expressão de TLR4, MyD88, I κ B- α e p-I κ B- α , NF- κ B e p-NF- κ B, IL-1 β , TNF- α , PI3K, p-PI3K, AKT e p-AKT; reduz a expressão de α -SMA, sugerindo a redução de miofibroblastos |
| Peng et al., 2023 | Genisteína | Aumenta a taxa de fechamento da ferida, o fluxo sanguíneo e a atividade da ATPase, bem como a mobilização e o direcionamento de EPCs do sangue periférico para a ferida; além disso, aumenta os níveis de TGF- β , SDF-1 α e angiotensina II no sangue periférico e o relaxamento vascular em resposta à acetilcolina na artéria mesentérica superior |
| Hu et al., 2024 | Genisteína | Aumenta o fechamento da ferida e acelera a regeneração folicular e o crescimento capilar; aumenta os sinais positivos de Ki-67 na epiderme e reduz os sinais TUNEL tanto na epiderme quanto na derme, indicando que aumenta a proliferação celular e diminui/previne a apoptose celular em feridas |

Os principais resultados foram resumidos para cada fitoestrógeno estudado *in vivo*. AKT: *AKT Protein*; ASC: *Apoptosis-Associated Speck-like Protein Containing a CARD*; CD163: *Cluster of Differentiation 163*; CD31: *Cluster of Differentiation 31*; CD68: *Cluster of Differentiation 68*; COX-2: *Cyclooxygenase-2*; CuZnSOD: *Cobre-Zinco Superóxido Dismutase*; EPCs: *Endothelial Progenitor Cells*; ER β : *Estrogen Receptor Beta*; FoxO1: *Forkhead Box Protein O1*; GPx: *Glutathione Peroxidase*; HO-1: *Heme Oxygenase-1*; IL-1 β : *Interleukin-1 Beta*; IL-6: *Interleukin-6*; I κ B: *Inhibitor of Nuclear Factor Kappa B*; iNOS: *Inducible Nitric Oxide Synthase*; Ki-67: *Cell Proliferation Marker Ki-67*; MIF: *Macrophage Migration Inhibitory Factor*; MnSOD: *Manganês Superóxido Dismutase*; MyD88: *Myeloid Differentiation Primary Response 88*; NF- κ B: *Nuclear Factor Kappa B*; NLRP3: *NOD-Like Receptor Family Pyrin Domain Containing 3*; Nrf2: *Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2*; p: *Phosphorylated*; PCNA: *Proliferating Cell Nuclear Antigen*; PI3K: *Phosphoinositide 3-Kinase*; SDF-1 α : *Stromal Cell-Derived Factor-1 α* ; SIRT1: *Sirtuin-1*; SOD: *Superóxido Dismutase*; TG2: *Tissue Transglutaminase*; TGF- β : *Transforming Growth Factor- β* ; TGF- β 1: *Transforming Growth Factor- β 1*; TLR4: *Toll-Like Receptor 4*; TNF- α : *Tumor Necrosis Factor- α* ; VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*; α -SMA: *Alpha-Smooth Muscle Actin*. **Fonte:** próprio autor criado no Microsoft Word®.

Em síntese, de acordo com os estudos selecionados, os fitoestrógenos possuem efeito cicatrizante, anti-inflamatório, antioxidante, reepitelizante, angiogênico e fibroplásico. Além disso, aumenta a viabilidade celular, modula a apoptose e favorece a proliferação e a migração celular. Ainda, os diferentes modelos empregados e os seus desafios demonstraram que os fitoestrógenos podem ter efeito pró-estrogênico, anti-isquêmico e antifibrótico (Figura 9).

Além dos efeitos reportados, vale a pena ressaltar que outras propriedades foram sugeridas para o equol mediante exclusivamente a análise genética realizada por Lephart (2023). Segundo o autor, o equol pode contribuir para a saúde da pele por seus efeitos antienvhecimento, anti-inflamatório, antioxidante, hidratante, na pigmentação, na integridade do tecido e na cicatrização de feridas propriamente dita.

Figura 9 - Propriedades terapêuticas dos fitoestrógenos no reparo cutâneo.



Em síntese, as propriedades medicinais reportadas para os fitoestrógenos no reparo tecidual foram de cicatrizante, fibroplasia ou antifibrótico, angiogênese e anti-isquêmico, pró-estrogênico, proliferação, migração, apoptose e viabilidade celular, reepitelizante, antioxidante e anti-inflamatório. **Fonte:** próprio autor criado no Microsoft PowerPoint® com material do <https://smart.servier.com>.

5.4. Frequência de moléculas biomarcadoras da cicatrização nos estudos

A maioria dos estudos avaliou diferentes marcadores para o reparo tecidual, que, após análise, resultou em dados bastante heterogêneos, impossibilitando a realização de uma meta-análise. Dessa forma, com intuito de aprimorar a análise dos dados, foi confeccionada uma tabela destacando a frequência dos biomarcadores moleculares analisados nos estudos selecionados (Tabela 6).

Foi observado que nos estudos selecionados de cicatrização de feridas com fitoestrógenos foram utilizados inúmeros biomarcadores diferentes (129 moléculas). Destes, a *Extracellular Signal-regulated Kinase* (ERK) foi a molécula mais citada, seguida pela CAT e TNF- α , que foram utilizadas como biomarcadores da cicatrização em cinco e quatro estudos, respectivamente. Em seguida, foram mencionadas em três estudos *Protein AKT* (AKT), IL-6, *Nuclear Factor Kappa Inhibitory Light Polypeptide Gene* (I κ B), iNOS, *P38 protein* (p38), SOD e TGF- β ; e foram mencionadas em dois estudos 18 diferentes moléculas, enquanto os demais biomarcadores (101) foram citados apenas uma vez.

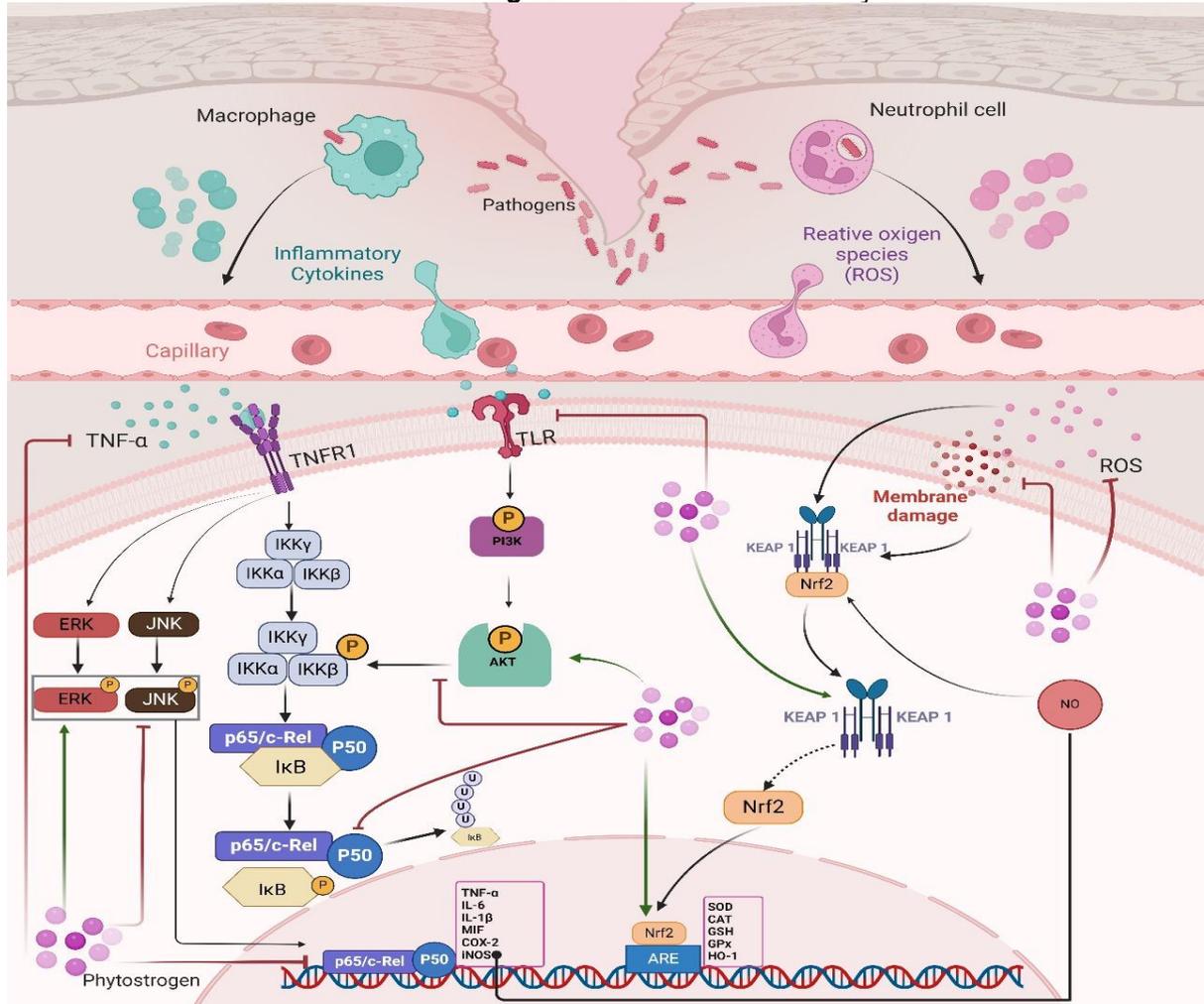
É importante ressaltar que, assim como a cicatrização ocorre mediante um processo bastante complexo, estabelecer os mecanismos pelos quais os fitoestrógenos podem favorecer o reparo cutâneo pode ser uma tarefa bastante desafiadora, sobretudo devido às informações ainda desconhecidas e, por vezes, incompletas ou controversas. No entanto, com base nos biomarcadores mencionados e nos mecanismos já reportados nos estudos de cicatrização com fitoestrógenos, é possível sugerir possíveis mecanismos de ação que contribuem para o reparo cutâneo (Figuras 10 e 11).

Tabela 6 - Frequência de biomarcadores moleculares utilizados nos estudos de fitoestrógenos na cicatrização.

| Referência | Borawska et al. (2009)* | Gao et al. (2009) | Emmerson et al. (2010) | Marini et al. (2010) | Huh et al. (2011) | Park et al. (2011) | Mukai et al. (2012) | Cho et al. (2013) | Tie et al. (2013) | Jurzak et al. (2014) | Eo et al. (2016) | Fáber et al. (2018) | Turer; Onger, 2018* | Nguyen et al. (2021) | Gajic et al. (2022)* | Sun et al. (2022) | Lephart (2023)# | Peng et al. (2023) | Hu et al. (2024) |
|-------------------|-------------------------|-------------------|------------------------|----------------------|-------------------|--------------------|---------------------|-------------------|-------------------|----------------------|------------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|-------------------|-----------------|--------------------|------------------|
| ABCG4 | | | | | | | | | | | | | | | | | + | | |
| ACTH | | | | | | | | | | | | | | | | | | | + |
| AHR | | | | | | | | | | | | | | | | | | + | |
| AKT | | | | | | | | + | | | | | | | | | + | | |
| Angiotensina I | | | | | | | | | | | | | | | | | | | + |
| Angiotensina II | | | | | | | | | | | | | | | | | | | + |
| Anexina A9 | | | | | | | | | | | | | | | | | | + | |
| Apolipoproteína B | | | | | | | | | | | | | | | | | | + | |
| Arginase 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | + | |
| ASC | | | | | | | | | | | + | | | | | | | | |
| ATPase | | | | | | | | | | | | | | | | | | | + |
| BAX | | | | | | | | | | + | | | | | | | | | |
| BCL-2 | | | | | | | | | | + | | + | | | | | | | |
| bFGF | | | | | + | | | | | | | | | | | | | | |
| Caspase 14 | | | | | | | | | | | | | | | | | | + | |
| Caspase 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | + | |
| CAT | | | | | | + | | | | | + | + | | | | | | + | |
| CD133 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | + |
| CD163 | | | + | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CD31 | | | | | | | + | | | | | | | | | | + | | |
| CD34 | | | | | | | | | + | | | | | | | | | | + |
| CD36 | | | | | | | | | | | | | | | | | + | | |
| CD45 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | + |
| CD68 | | | | | | | | | | | | | | | | | + | | |
| CD74 | | | + | | | | | | | | | | | | | | | | |
| cNOS | | | | | | | | | + | | | | | | | | | | |

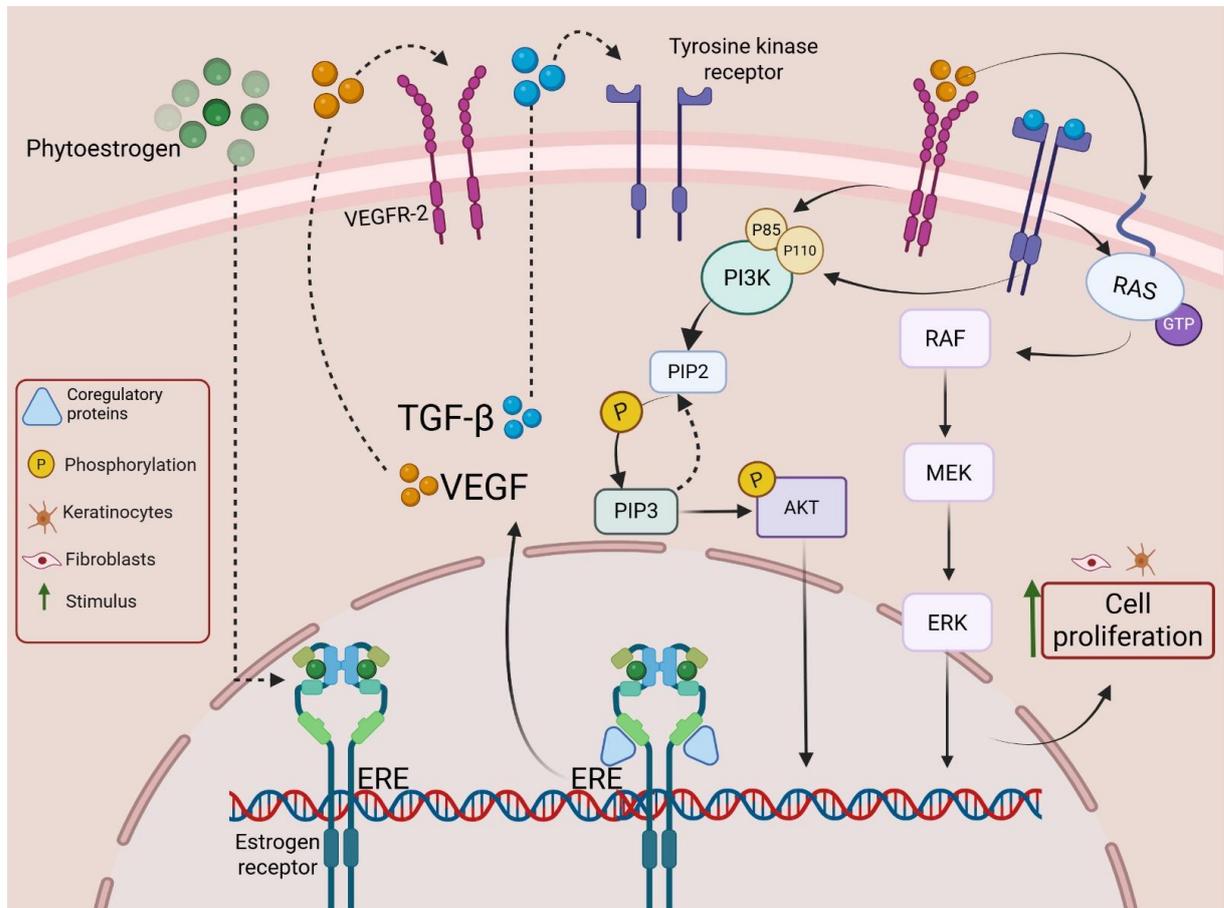
CD74: Cluster of Differentiation 74; cNOS: Constitutive Nitric Oxide Synthase; COL18A1: Collagen Type XVIII Alpha 1 Chain; COX-2: Cyclooxygenase-2; CSF2: Colony Stimulating Factor 2; CTGF: Connective Tissue Growth Factor; CuZnSOD: Copper-Zinc Superoxide Dismutase; CXCL10: C-X-C Motif Chemokine Ligand 10; CXCL5: C-X-C Motif Chemokine Ligand 5; DMKN: Dermokine; DUOX1: Dual Oxidase 1; EFNA3: Ephrin-A3; EGLN3: Egl-9 Family Hypoxia-Inducible Factor 3; Egr-1: Early Growth Response Protein 1; ERK: Extracellular Signal-Regulated Kinase; ER α : Estrogen Receptor Alpha; ER β : Estrogen Receptor Beta; FAF2: Fibroblast Growth Factor 2; FETUB: Fetuin B; Flk-1: VEGF Receptor 2; FoxO1: Forkhead Box O1 Transcription Factor; F3: Coagulation Factor III (Tissue Factor); GPx: Glutathione Peroxidase; HBEGF: Heparin-Binding EGF-Like Growth Factor; HAL: Histidine Ammonia-Lyase; HO-1: Heme Oxygenase-1; IFN-1 α : Interferon Alpha-1; IL-1 β : Interleukin-1 Beta; IL-6: Interleukin-6; IL-10: Interleukin-10; IL-18: Interleukin-18; IL20R α : Interleukin 20 Receptor Alpha; IL20R β : Interleukin 20 Receptor Beta; IL-23 α : Interleukin-23 Alpha; IL-24: Interleukin-24; IL-37: Interleukin-37; I κ B: Inhibitor of Nuclear Factor Kappa B; IRF1: Interferon Regulatory Factor 1; ITG β 3: Integrin Subunit Beta 3; JNK: c-Jun N-terminal Kinase; KITLG: KIT Ligand; K16: Keratin 16; K17: Keratin 17; Ki-67: Cell Proliferation Marker Ki-67; LEP: Leptin; MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase; MIF: Macrophage Migration Inhibitory Factor; MMP-9: Matrix Metalloproteinase-9; MMP-14: Matrix Metalloproteinase-14; MnSOD: Manganés Superóxido Dismutase; MT1A: Metallothionein 1A; MT1F: Metallothionein 1F; MT1G: Metallothionein 1G; MyD88: Myeloid Differentiation Primary Response 88; NFE2L3: Nuclear Factor Erythroid 2 Like 3; NF- κ B: Nuclear Factor Kappa B; NLRP3: NOD-Like Receptor Family Pyrin Domain Containing 3; NRG1: Neuregulin 1; Nox2: NADPH Oxidase 2; Nox4: NADPH Oxidase 4; Nrf2: Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2; p21: Protein p21; p38: Protein p38; p53: Protein p53; PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen; PDGF: Platelet-Derived Growth Factor; PI3K: Phosphoinositide 3-Kinase; PKP1: Plakophilin-1; PLAU: Urokinase-Type Plasminogen Activator; Raf: Ser/Thr-Specific Protein Kinase Raf; Sca-1: Stem Cell Antigen-1; SDF-1 α : Stromal Cell-Derived Factor-1 Alpha; SIRT1: Sirtuin-1; SLC30A1: Solute Carrier Family 30 Member 1; SOD: Superóxido Dismutase; SPINK5: Serine Protease Inhibitor Kazal-Type 5; ST14: Suppression of Tumorigenicity 14; TG2: Tissue Transglutaminase; TGF- β : Transforming Growth Factor Beta; TGF- β 1: Transforming Growth Factor Beta 1; TGF- β 2: Transforming Growth Factor Beta 2; TGF- β 3: Transforming Growth Factor Beta 3; TIAM1: T-Cell Lymphoma Invasion and Metastasis-Inducing Protein 1; TIMP-2: Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-2; TIMP-3: Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-3; TLR2: Toll-Like Receptor 2; TLR4: Toll-Like Receptor 4; TNF10: Tumor Necrosis Factor 10; TNF- α : Tumor Necrosis Factor Alpha; TPK: Tyrosine-Protein Kinase; TXNRD1: Thioredoxin Reductase 1; VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF-A: Vascular Endothelial Growth Factor A; WFDC5: WAP Four-Disulfide Core Domain Protein 5; α -SMA: Alpha-Smooth Muscle Actin. **Fonte:** próprio autor criado no Microsoft Word®.

Figura 10 - Papel modulador dos fitoestrógenos nas vias de sinalização inflamatória e no estresse oxidativo durante os estágios iniciais da cicatrização de feridas cutâneas.



Após a lesão cutânea, macrófagos e neutrófilos infiltram no local da ferida. Ambos liberam citocinas pró-inflamatórias (ex. TNF- α) e ROS para eliminar patógenos invasores. No entanto, a liberação excessiva desses mediadores contribui para danos teciduais secundários e retarda o processo de cicatrização. O TNF- α se liga ao *Tumor Necrosis Factor Receptor 1* (TNFR1) e ao *Toll-like receptor 1* (TLR), iniciando uma cascata de sinalização envolvendo a ativação do complexo IKK (IKK α , IKK β , IKK γ). Isso leva à fosforilação e subsequente degradação de I κ B, permitindo a translocação nuclear de dímeros de NF- κ B (p65/c-Rel e p50), que promovem a transcrição de genes inflamatórios como TNF- α , IL-1 β , IL-6, *Macrophage Migration Inhibitory Factor* (MIF), COX-2 e iNOS. Esses receptores também estimulam a via de sinalização MAPK (ERK e *C-Jun N-terminal Kinase* (JNK)), o que amplifica ainda mais a expressão gênica inflamatória. Além disso, o TLR ativa o eixo de sinalização *Phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K)/AKT, que por sua vez pode regular positivamente o NF- κ B. As ROS, que se acumulam em resposta à ativação de neutrófilos e macrófagos e danos à membrana, dissociam o *Nuclear Factor Erythroid 2* (Nrf2) de seu inibidor citoplasmático *Kelch-like ECH-Associated Protein 1* (KEAP1). O Nrf2 livre é translocado para o núcleo e se liga a *Antioxidant Response Elements* (AREs), promovendo a transcrição de enzimas desintoxicantes e antioxidantes, como SOD, CAT, *Glutathione Peroxidase* (GPx), *Glutathione* (GSH) e *Heme Oxygenase-1* (HO-1). Os fitoestrógenos exercem potentes efeitos anti-inflamatórios nesse contexto, pois inibem a ativação do complexo IKK, prevenindo a degradação de I κ B e, portanto, bloqueando a translocação nuclear de NF- κ B. Paralelamente, eles suprimem a ativação de JNK, limitando ainda mais a resposta inflamatória. Ainda, inibe a ativação de PI3K/AKT, suprimindo sua sinalização a jusante para o NF- κ B, reduzindo assim a transcrição de mediadores pró-inflamatórios. Além disso, eles aumentam a ativação do Nrf2, seja promovendo sua liberação de KEAP1 ou aumentando sua estabilidade nuclear, fortalecendo assim as defesas antioxidantes e reduzindo o dano oxidativo. Juntos, esses efeitos moduladores dos fitoestrógenos contribuem para a atenuação da inflamação e do estresse oxidativo no microambiente da ferida, facilitando a transição para a fase proliferativa do reparo da pele. **Fonte:** próprio autor criada no BioRender.com.

Figura 11 - Ação dos fitoestrógenos na indução de fatores de crescimento e ativação de vias proliferativas durante a cicatrização de feridas cutâneas.

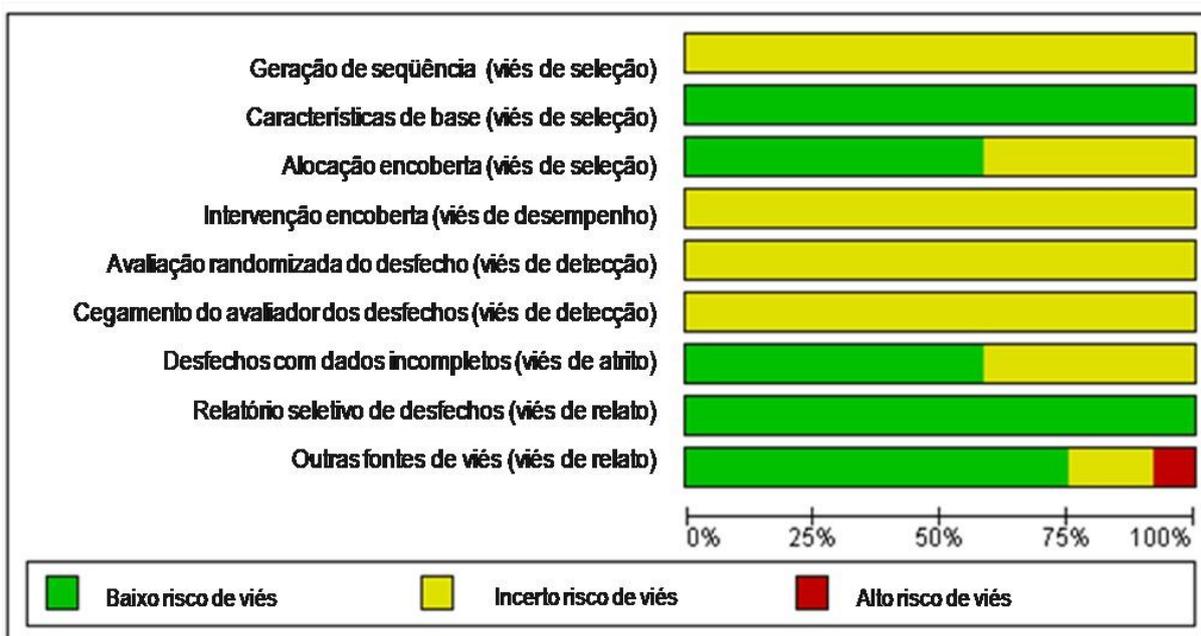


Esta figura ilustra os mecanismos moleculares pelos quais os fitoestrógenos modulam o reparo tecidual mediante a ativação de receptores nucleares de estrogênio. Uma vez internalizados, os fitoestrógenos se ligam aos receptores, promovendo a sua dimerização e o recrutamento de proteínas coregulatórias, que facilitam a interação do complexo hormônio-receptor com os Elementos de Resposta ao Estrogênio (EREs) no DNA. Esse processo leva à transcrição de genes que codificam fatores de crescimento, como o VEGF e o TGF- β . Uma vez secretados, esses fatores se ligam aos seus respectivos receptores de tirosina quinase na membrana celular, desencadeando cascatas de sinalização intracelular que convergem em vias comuns. O VEGF e o TGF- β podem ativar as vias PI3K/AKT e RAS/RAF/MEK/ERK, respectivamente, essenciais na regulação da proliferação e migração celular. A via PI3K/AKT é iniciada pela ativação da PI3K, que catalisa a conversão de PIP2 em PIP3, levando ao recrutamento e à fosforilação da AKT. A AKT fosforilada promove a sobrevivência celular, a síntese proteica e a angiogênese, criando um microambiente favorável à regeneração tecidual. Simultaneamente, a via RAS/RAF/MEK/ERK é ativada por meio do recrutamento de proteínas adaptadoras, como Grb2 e SOS, resultando na ativação de RAS, seguida pela fosforilação sequencial de RAF, MEK e ERK. A ERK ativada é translocada para o núcleo, regulando a transcrição de genes envolvidos na proliferação, diferenciação e remodelação da matriz extracelular. Essas vias de sinalização convergentes, em conjunto, potencializam a proliferação e a migração de queratinócitos e fibroblastos, células envolvidas na reepitelização e na deposição de matriz extracelular durante a cicatrização de feridas. Portanto, ao induzir a expressão do fator trófico e ativar cascatas de sinalização intracelular importantes, os fitoestrógenos desempenham um papel central na orquestração de respostas celulares que promovem o reparo eficiente da pele. **Fonte:** próprio autor criada no BioRender.com.

5.5. Risco de viés

Todos os estudos *in vitro* e *ex vivo* incluídos foram avaliados com incerto risco de viés para geração de sequência, randomização de habitação, intervenção encoberta e avaliação randomizada do desfecho. Por outro lado, todos os estudos selecionados foram avaliados com baixo risco de viés para características de base e relatório seletivo de desfechos. Alto risco de viés foi observado em um estudo (8,3%) para o domínio de outras fontes de viés, enquanto para esse domínio 75% foram avaliados para baixo risco e 16,7% para incerto risco de viés. Para alocação encoberta e desfechos com dados incompletos foram avaliados em 33,4% e 58,4% para baixo e 66,6% e 41,6% para incerto risco de viés, respectivamente (Figura 12).

Figura 12 - Análise do risco de viés dos estudos *in vitro* e *ex vivo* incluídos.

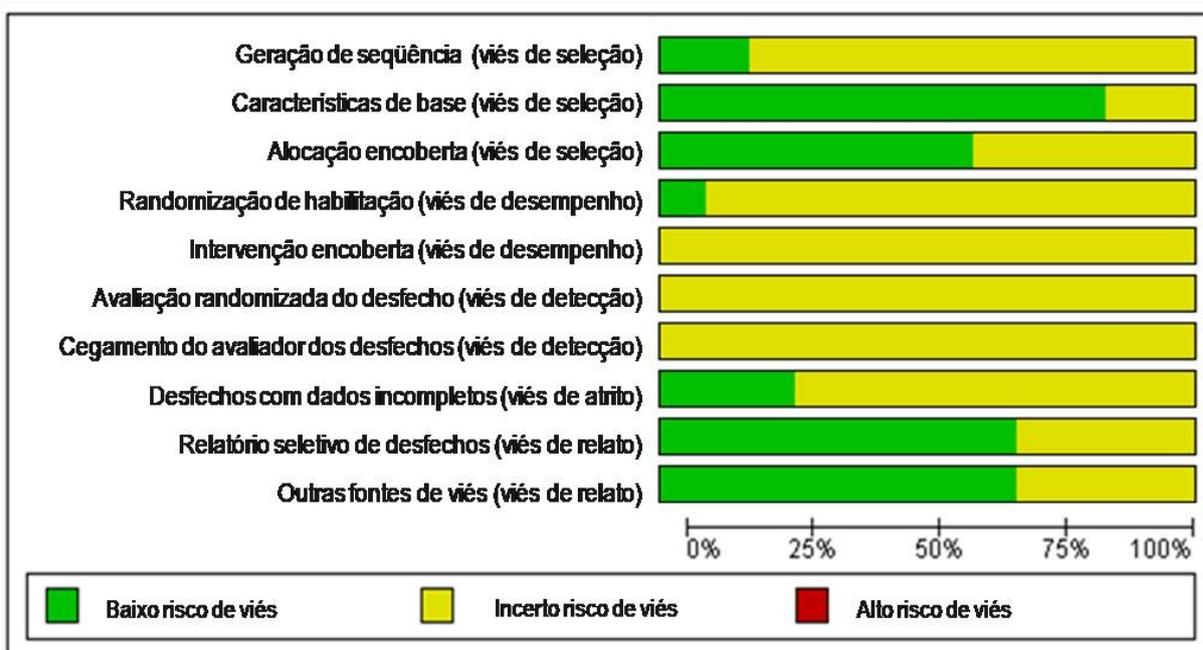


O risco de viés foi determinado em baixo, incerto e alto nos estudos *in vitro* e *ex vivo*. **Fonte:** próprio autor criada no Review Manager.

Todos os estudos *in vivo* incluídos foram avaliados com risco de viés incerto para intervenção encoberta, avaliação randomizada do desfecho e cegamento do avaliador dos desfechos. Para a geração de sequência foram avaliados 15,3% como baixo e 84,7% como incerto, enquanto para características de base foram 84,7% como baixo e 15,3% como incerto. Para alocação encoberta foram 33,4% como baixo e 66,6% como incerto, para randomização de habitação foram 7,6% como baixo e 92,4% como incerto e desfechos com dados incompletos foram 30,7% como baixo e 69,3% como incerto. Para relatório seletivo de desfechos e outras fontes de

viés foram 69,3% como baixo e 30,7% como incerto em ambos os domínios. Nenhum dos estudos foi avaliado com domínio apresentando alto risco de viés (Figura 13).

Figura 13 - Análise do risco de viés dos estudos *in vivo* incluídos.



O risco de viés foi determinado em baixo, incerto e alto nos estudos *in vivo*. **Fonte:** próprio autor criada no Review Manager.

6. DISCUSSÃO

Nesta revisão sistemática de estudos pré-clínicos foram avaliadas publicações que abordaram sete diferentes fitoestrógenos no tratamento de feridas cutâneas: genisteína, puerarina, BCA, daidzeína, formononetina, equol e gliciteína. Todos os fitoestrógenos foram melhores que os controles em pelo menos uma variável analisada pelo estudo. No entanto, a falta de resultados negativos provavelmente retrata a tendência de haver publicações com resultados que comprovem as hipóteses, com os achados negativos negligenciados. Isso ocorre principalmente pela tradição das revistas em aceitar melhor resultados positivos (SILVA, 2015).

Os fitoestrógenos são assim conhecidos por serem moléculas de origem natural que interagem com os receptores estrogênicos, mimetizando os seus efeitos endógenos. No entanto, além de atuar sobre a via estrogênica, os fitoestrógenos possuem efeitos independentes que, por sua vez, os tornam cada vez mais promissores para a utilização medicinal (ATIQ-UR-REHMAN, 2019; SARFRAZ et al., 2020). Na cicatrização de feridas os fitoestrógenos têm sido amplamente estudados, mas este é o primeiro estudo que compila as informações da literatura com intuito de evidenciar os mecanismos e efeitos esperados no reparo cutâneo.

Embora tenha havido alta heterogeneidade nos estudos, alguns pontos são importantes de serem ressaltados. Nenhum dos estudos realizou avaliação *in silico* e apenas um avaliou simultaneamente *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, enquanto cinco avaliaram tanto *in vitro* como *in vivo*. Até o momento, os modelos *in silico*, *in vitro* e *ex vivo* não podem substituir os experimentos com animais na pesquisa. Na verdade, eles devem ser complementares nos estudos de cicatrização de feridas (GRAMBOW et al., 2021), pois os modelos *in vivo* são fundamentais na investigação de novas terapias e antecedem a realização dos ensaios clínicos (SAMI et al., 2019).

Para os estudos *in vitro*, foi observada principalmente a utilização de veículos clássicos como o DMSO. No entanto, a inclusão de duas biotecnologias como carreadoras do fitoestrógeno indicam um aperfeiçoamento na forma de utilização desses princípios ativos. As fibras de polilactídeo eletrofiadas, utilizadas por Gajic et al. (2022), foram adequadas para a formulação potencial na cicatrização de feridas com a BCA. Já a proteína da seda com polímero sintético de polivinilpirrolidona foi utilizada por Sun et al. (2022) e se mostrou um veículo eficaz para a puerarina que parece auxiliar a cicatrização de feridas reduzindo a inflamação.

Ainda nas análises *in vitro*, os fibroblastos com distintas características foram destaque para os tipos celulares. Alguns estudos simularam fibroblastos normais (BORAWSKA et al., 2009; CAO et al., 2009; JURZAK et al., 2014; GAJIC et al., 2022) ou de granulação (BORAWSKA et al., 2009), enquanto outros mimetizaram fibroblastos alterados, sejam hipertróficos (CAO et al., 2009) ou quelóides (JURZAK et al., 2014). Os fibroblastos estão intimamente relacionados à fase de proliferação, sendo responsáveis pela produção de MEC, sobretudo o colágeno. Contudo, uma resposta exacerbada tem sido relacionada a complicações como cicatrizes hipertróficas e quelóides. Assim, adequada modulação do efeito dos fibroblastos pelos fitoestrógenos é fundamental para o reparo (JURZAK et al., 2014).

Nos estudos *in vivo* a dieta foi destaque como veículo e controle. Além disso, a via oral foi a principal para a administração dos agentes. Os fitoestrógenos são assim conhecidos em virtude de sua origem vegetal associada à semelhança molecular com o estrógeno e, conseqüentemente, interação com os receptores estrogênicos. O fato do fitoestrógeno ser um composto de origem vegetal pode explicar a utilização da dieta como veículo e sua conseqüente administração por via oral, mimetizando a forma mais natural de obtenção desses compostos (PARK et al., 2011; MUKAI et al., 2012; EO et al., 2016; PENG et al., 2023). No entanto, vale a pena ressaltar que a via oral tem limitações importantes, pois é dependente da ingestão dos animais e, assim, não existe garantia da dose exata utilizada nos estudos. Além disso, embora tenha sido pouco utilizada, a via tópica pode ser preferível em lesões cutâneas, aumentando principalmente a disponibilidade cutânea do composto.

Na maioria dos estudos *in vivo* foram utilizadas feridas crônicas ocasionadas por ovariectomia (EMMERSON et al., 2010; MARINI et al., 2010; MUKAI et al., 2012; FÁBER et al., 2018), diabetes (TIE et al., 2013; EO et al., 2016; TURER; ONGER, 2018), dexametasona (NGUYEN et al., 2021) ou choque hemorrágico (PENG et al., 2023). Tais modelos de lesão cutânea, diferentemente da aguda, são complexos e estão associados a resposta inflamatória exacerbada que normalmente ocasiona complicações no reparo (GURTNER et al., 2008; VELNAR et al., 2009).

No diabetes a ferida é prejudicada devido à resposta inflamatória exagerada e pela inibição da angiogênese (BREM; TOMIC-CANIC, et al., 2007). No modelo de choque hemorrágico a hipoperfusão é o fator crucial que compromete o reparo de lesões cutâneas (NGUYEN et al., 2021). Já no modelo de ovariectomia, a ferida é

prejudicada em virtude da inflamação intensa ocasionada pelo hipoestrogenismo que mimetiza a menopausa em mulheres (EMMERSON et al., 2010). No modelo de desafio com dexametasona a ferida é prejudicada devido à inibição da proliferação e migração de queratinócitos (SLOMINSKI; ZMIJEWSKI, 2017), bem como a redução na biossíntese de colágeno (OISHI et al., 2002).

Um ponto importante sobre os modelos experimentais *in vivo* é que todos utilizaram roedores e, principalmente, camundongos. A utilização de animais, independentemente da espécie, não reflete totalmente o processo de reparo cutâneo que ocorre em humanos. Em camundongos, por exemplo, as feridas cicatrizam principalmente por contração e, ainda, as respostas genômicas, imunes e inflamatórias diferem significativamente das humanas após a lesão. No entanto, o conhecimento sobre a espécie e as vantagens de custo, tamanho, diferentes linhagens e reagentes disponíveis para análises são vantagens que justificam o uso desses animais (GRADA et al., 2018).

Foi observado que os estudos com fêmeas tiveram relação com o modelo experimental de ovariectomia para mimetizar a deficiência de estrógeno em mulheres na menopausa (EMMERSON et al., 2010; MARINI et al., 2010; MUKAI et al., 2012; FÁBER et al., 2018). Sabe-se que o hipoestrogenismo acarreta inúmeros prejuízos à pele, pois induz à formação de feridas crônicas. Já a reposição com estrógeno tende a inibir o recrutamento de neutrófilos (MUKAI et al., 2016), favorecer a polarização de macrófagos anti-inflamatórios (WILKINSON; HARDMAN, 2017), reduzir a inflamação via TNF- α e promover adequada reepitelização e deposição de colágeno nas lesões (EMMERSON et al., 2009; EMMERSON et al., 2013). Sabendo então que os fitoestrógenos mimetizam o estrógeno endógeno, é justificável que esse modelo tenha sido comum entre os estudos (SARFRAZ et al., 2020).

A genisteína foi o fitoestrógeno mais estudado dentre os trabalhos selecionados e, por isso, merece destaque. Essa molécula de origem natural é bastante conhecida por sua modulação em receptores para o estrógeno. Assim, é considerado um fitoestrógeno amplamente investigado devido seus efeitos benéficos para a saúde humana, sobretudo no tratamento de lesões cutâneas (EMMERSON et al., 2010). De acordo com os estudos selecionados, esse fitoestrógeno é um promissor cicatrizante pois atua favorecendo o fechamento das lesões cutâneas (EMMERSON et al., 2010; PARK et al., 2011; TIE et al., 2013; FÁBER et al., 2018;

PENG et al., 2023; HU et al., 2024), na modulação da fibroplasia (BORAWSKA et al., 2009; CAO et al., 2009; MARINI et al., 2010; JURZAK et al., 2014; GAJIC et al., 2022), como anti-inflamatório e antioxidante (PARK et al., 2011; EO et al., 2016; FÁBER et al., 2018), reepitelizante (EMMERSON et al., 2010; MARINI et al., 2010), angiogênico (TIE et al., 2013; FÁBER et al., 2018; HU et al., 2024), anti-isquêmico (FÁBER et al., 2018; PENG et al., 2023) e pró-estrogênico (EMMERSON et al., 2010).

O efeito de compostos sobre o fechamento da ferida é uma das formas mais clássicas de determinar a ação cicatrizante. Nos estudos selecionados o efeito sobre o fechamento de lesões foi avaliado *in vitro* mediante os ensaios de migração celular, também conhecidos como “arranhão” (FÁBER et al., 2018; NGUYEN et al., 2021), *ex vivo*, por análise genética (LEPHART, 2023), e *in vivo*, em lesões cutâneas em animais (EMMERSON et al., 2010; HUH et al., 2011; PARK et al., 2011; MUKAI et al., 2012; TIE et al., 2013; EO et al., 2016; SUN et al., 2022; PENG et al., 2023; HU et al., 2024; NGUYEN et al., 2021). Esse foi o efeito mais reportado nos estudos selecionados com fitoestrógenos. No entanto, o fechamento da lesão, por si só, não determina a eficácia cicatrizante de um princípio ativo. Então, demais efeitos relacionados ao processo de reparo cutâneo também foram reportados como fibroplasia, inflamação, oxidação, reepitelização, angiogênese e entre outros.

Os fibroblastos foram destaque nos estudos de cicatrização *in vitro* e suas diferentes linhagens foram utilizadas para mimetizar distintos tipos de lesões cutâneas. Os modelos utilizados em fibroblastos no estudos selecionados apresentaram diferentes formas de modulação, aumentando ou diminuindo a atividade celular e/ou molecular. Em geral, o estímulo de fibroblastos normais causado pelos fitoestrógenos foi considerado benéfico ao reparo das lesões por favorecer a fibroplasia, como observado por Borawska et al. (2009), Cao et al. (2009), Jurzak et al. (2014) e Gajic et al. (2022). Em contrapartida, em se tratado de fibroblastos hipertróficos (CAO et al., 2009) ou quelóides (JURZAK et al., 2014), em que há um excesso de atividade fibroblástica, o efeito antiproliferativo e/ou apoptótico dos fitoestrógenos foi fundamental no controle da produção exacerbada de colágeno. Isso pode ser traduzido em atividade antifibrótica que tende a melhorar a formação de cicatrizes hipertróficas e quelóides.

Nos estudos selecionados foram utilizadas 129 diferentes moléculas como biomarcadores do reparo. Todas as moléculas citadas apresentam relação com os

efeitos reportados nos estudos e algumas permitem entender os possíveis mecanismos de ação dos fitoestrógenos. Assim, associadas ao efeito anti-inflamatório foram mencionadas com maior frequência TNF- α , seguida de IL-6, I κ B, iNOS e p38 e, posteriormente, COX-2, IL-10, IL-1 β e NF- κ B. Envolvidas com o efeito antioxidante foram mencionadas a CAT, seguida de SOD e, posteriormente, CuZnSOD, GPx, HO-1 e MnSOD. E, para a fibroplasia e reepitelização, a ERK foi a mais mencionada, seguida de AKT e TGF- β e, posteriormente, COL18A1, CTGF, SERPINA1 e TGF- β 1.

Durante o processo de reparo cutâneo a inflamação tem papel crucial e o efeito anti-inflamatório dos fitoestrógenos é obviamente uma das propriedades mais reportada. O TNF- α foi destaque entre os estudos selecionados (EMMERSON et al., 2010; PARK et al., 2011; EO et al., 2016; SUN et al., 2022). Essa potente citocina pró-inflamatória interage com dois receptores distintos, o TNFR1 e o TNFR2, e ativa o NF- κ B, um fator de transcrição nuclear que promove a produção de fatores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-6, IL-1 β , COX-2 e iNOS. A ativação do NF- κ B também pode ocorrer pela ação direta da p38, enquanto o I κ B tem papel fundamental na inibição (PARK et al., 2011; EO et al., 2016; NOSENKO et al., 2019).

A CAT foi outra molécula bastante mencionada nos estudos (PARK et al., 2011; EO et al., 2016; FÁBER et al., 2018; LEPHART, 2023). Essa enzima tem grande importância como agente antioxidante, bem como a SOD e a GPx, atuando na remoção de ROS que comumente induzem o estresse oxidativo e exacerbam a inflamação a ponto de retardar o processo de reparo tecidual (PARK et al., 2011). Segundo Park et al. (2011), o efeito antioxidante observado para o fitoestrógeno genisteína contribuiu para a inativação do NF- κ B e a redução da expressão do TNF- α , demonstrando a importante relação entre os efeitos antioxidante e anti-inflamatório dos fitoestrógenos.

A ERK foi uma das moléculas mais utilizadas como biomarcador do reparo cutâneo (CAO et al., 2009; HUH et al., 2011; PARK et al., 2011; NGUYEN et al., 2021). Essa cinase tem papel fundamental na proliferação e migração de fibroblastos mediada pelo TGF- β (LUCKETT-CHASTAIN; GALLUCCI, 2009), bem como de queratinócitos (SATO et al., 2009). No entanto, além da via de sinalização ERK, a AKT também tem papel importante para a proliferação e a migração de queratinócitos (ZHOU et al., 2016). No estudo de Nguyen et al. (2021), foi possível observar que o aumento da proliferação e migração de queratinócitos foi restaurado

pelo fitoestrógeno puerarina através das vias AKT e ERK após a atividade prejudicial da dexametasona.

Embora algumas moléculas diretamente relacionadas à angiogênese tenham sido pouco mencionadas, como o VEGF (MARINI et al., 2010; HUH et al., 2011) e o VEGFA (FÁBER et al., 2018), outros estudos selecionados avaliaram o efeito dos fitoestrógenos sobre a angiogênese e a isquemia tecidual (TIE et al., 2013; NGUYEN et al., 2021; SUN et al., 2022; PENG et al., 2023; HU et al., 2024). Fáber et al. (2018) verificaram que a genisteína melhora a viabilidade de retalhos cutâneos, sugerindo um efeito anti-isquêmico e angiogênico, pois o fitoestrógeno regulou positivamente genes associados à angiogênese e inflamação (CTGF, CXCL5, IL-6, ITGB3, MMP-14 e VEGF-A) e negativamente os genes que inibem (COL18A1, TIMP-2 e TIMP-3).

Vale a pena ressaltar que os mecanismos celulares e moleculares do processo de cicatrização são extremamente complexos, gerando inúmeros questionamentos sobre quando podem ser considerados benéficos ou prejudiciais ao reparo. A IL-6, por exemplo, uma citocina tipicamente pró-inflamatória, já foi associada à fibroplasia por induzir a expressão do TGF- β mediada pela cascata de sinalização envolvendo a ERK em fibroblastos (LUCKETT-CHASTAIN; GALLUCCI, 2009). Em outro exemplo, o próprio TGF- β , produzido expressivamente pelos fibroblastos e estimulante da produção de colágeno, pode ser considerado fundamental ao reparo de feridas agudas simples, mas é prejudicial quando produzido em alta quantidade em feridas hipertróficas e quelóides (CAO et al., 2009; JURZAK et al., 2014). Dessa forma, é fundamental considerar todos os aspectos envolvidos no processo de cicatrização, sobretudo os mecanismos celulares e moleculares associados ao tipo de lesão.

Os receptores estrogênicos são a via clássica de atuação dos fitoestrógenos, mas estão longe de ser a única via (EMMERSON et al., 2010). O fitoestrógeno genisteína atua por essa via para reduzir proteases e aumentar a reepitelização (EMMERSON et al., 2010). Segundo os autores, a genisteína ainda pode aumentar o número de células que expressam o ER β na derme e na epiderme, promovendo efeito pró-estrogênico. Por essa via, o fitoestrógeno genisteína também aumenta o TG2, TGF- β e VEGF, melhorando a fibroplasia, angiogênese e reepitelização (MARINI et al., 2010).

Segundo Tie et al. (2013), o ER β pode estar envolvido no efeito antioxidante da genisteína em feridas diabéticas ao prevenir o aumento de iNOS por suprimir os níveis do FoxO1 e da SIRT1. No entanto, segundo os autores, as relações dessa via ainda é controversa. Peng et al. (2013) avaliaram lesões após choque hemorrágico tratadas com genisteína. O fitoestrógeno atuou relaxando o endotélio via acetilcolina, aumentando o fluxo sanguíneo e a atividade da ATPase, bem como a mobilização de EPCs via angiotensina II, SDF-1 α e TGF- β . Por fim, sugeriram provável envolvimento da via estrogênica na prevenção da isquemia e na angiogênese durante o reparo tecidual.

A via TNF- α /NF- κ B é uma rota intimamente associada ao processo inflamatório e tem sido alvo de estudos para agentes cicatrizantes (NOSENKO et al., 2019). O fitoestrógeno genisteína inibe tanto o TNF- α como o NF- κ B e a inibição dessa via atua reduzindo a inflamação (TNF- α , IL-6 e IL-1 β) e a oxidação (SOD, CAT e GPx) dos tecidos em reparo, resultando na cicatrização das feridas (CAO et al., 2009; EMMERSON et al., 2010; PARK et al., 2011; EO et al., 2016). Ainda, tanto a genisteína (PARK et al., 2011) como a puerarina (SUN et al., 2022) podem ativar o I κ B, que atua inibindo o NF- κ B. Ademais, SUN et al. (2022) sugeriram que a puerarina inibe o TLR4, bem como a molécula de interação MyD88, inibindo a ativação do NF- κ B. Além disso, o TLR4 deixaria de interagir com a via PI3K/AKT, impedindo a ativação do NF- κ B.

Fáber et al. (2018) propuseram a possibilidade do fitoestrógeno genisteína agir mediante a via NF- κ B para aumentar a BCL2 e provavelmente a relação BAX/BCL2, melhorando a sobrevivência celular por efeito antiapoptótico e favorecendo o reparo de feridas de retalhos cutâneos. Esse efeito também foi observado por Juzark et al. (2014), mas de forma controversa, pois o fitoestrógeno genisteína aumentou a BCL2 e diminuiu a BAX, melhorando a viabilidade de fibroblastos quelóides e, supostamente, prejudicando o reparo nesse tipo de lesão. No entanto, segundo os autores, o efeito antifibrótico foi associado à inibição das isoformas TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3, diminuindo o CTGF e, conseqüentemente, a produção exacerbada de colágeno.

Uma via de sinalização reportada para os fitoestrógenos, sobretudo a genisteína, é a da TPK (CAO et al., 2009). De acordo com Cao et al. (2009), o fitoestrógeno genisteína inibe a TPK, prejudicando a sinalização por inibição da ativação do mecanismo RAS-RAF-MEK-ERK. A inibição da translocação de ERK até

o núcleo inibe a transcrição de fatores que impedem a proliferação e diferenciação celular, gerando efeitos anti-fibróticos em fibroblastos hipertróficos que passam a reduzir a produção de colágeno I e II na lesão. O modelo mimetiza o que ocorre em feridas hipertróficas em humanos e o fitoestrógeno apresentaria um efeito antifibrótico.

Ainda relacionado a vias semelhantes, o fitoestrógeno gliciteína pode diminuir a fosforilação de ERK e JNK, bem como aumentar a fosforilação de AKT e p38, estimulando a migração de queratinócitos (CHO et al., 2014); enquanto em feridas prejudicadas pela dexametasona outros autores observaram que, via ERK e AKT, a puerarina aumenta a proliferação e a migração de queratinócitos (NGUYEN et al., 2022). Tais resultados indicam que os fitoestrógenos atuam principalmente via ERK e AKT para estimular a reepitelização de feridas.

Mediante a via de inibição da ERK, bem como ativação da via p38/MAPK, Huh et al. (2011) sugeriram que a formononetina aumenta Egr-1, estimulando a proliferação, migração e diferenciação de endoteliócitos e a produção de TGF- β 1, VEGF, PDGF e bFGF, e favorecendo a cicatrização por estimular principalmente a angiogênese. De acordo com Emmerson et al. (2010), a genisteína pode ainda atuar via MAPK para inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias de macrófagos (MIF, IL-6 e TNF- α). Ainda, segundo os autores, a migração de queratinócitos e consequente ação reepitelizante da genisteína pode estar associada à via de sinalização do IGF-1. Outra suposta via para os fitoestrógenos seria a do NRF2, reportada em feridas diabéticas por Eo et al. (2016), onde a genisteína apresentou importante ação antioxidante via HO-1, GPx, CAT e SOD.

Avaliando a qualidade metodológica, apenas um dos estudos *in vitro* apresentou alto risco de viés no domínio de outras fontes de viés, pois apresentava conflito de interesse. Por outro lado, é importante destacar que muitos domínios foram classificados parcial ou totalmente com risco de viés incerto em todos os estudos devido à falta de clareza nas informações. Sendo assim, tais resultados afetam diretamente a qualidade dos estudos, comprometendo a confiabilidade dos resultados (BELLO et al., 2014).

7. PONTOS FORTES E LIMITAÇÕES

O presente estudo é uma execução inédita do compilado de mecanismos de ação dos fitoestrógenos na cicatrização de feridas. Além disso, apresenta dados importantes para novos estudos em reparo tecidual, como os efeitos observados, os modelos experimentais e os biomarcadores empregados em cicatrização. A busca extensa em bases de dados sem limitação de tempo ou de idioma foram importantes para encontrar estudos relevantes de cicatrização com fitoestrógenos. Além disso, não foi necessário contato com autores para resgatar dados das publicações.

A não inclusão de “Wound healing” na busca pode ser justificada por ser um termo bastante amplo, gerando inúmeros trabalhos e inviabilizando o processo de triagem. A alta heterogeneidade dos dados impossibilitou uma análise mais aprofundada mediante metanálise. Além disso, a ausência do detalhamento de informações foi comum entre os estudos, o que prejudica a extração de dados e a qualidade metodológica. Essa deficiência tem sido rotineira em muitos estudos pré-clínicos, sobretudo entre pesquisadores que pouco conhecem sobre as ferramentas para a redução dos riscos de viés (MA et al., 2017).

8. CONCLUSÃO

Os fitoestrógenos apresentam distintos mecanismos de ação responsáveis pelos efeitos cicatrizantes em modelos pré-clínicos, envolvendo tanto a via clássica dos estrógenos como vias independentes. A presente revisão foi fundamental para reportar os principais fitoestrógenos, os modelos pré-clínicos e os biomarcadores moleculares utilizados para estudar a cicatrização de feridas. Ainda, foi fundamental para demonstrar que são necessários mais estudos para explorar os mecanismos de ação dos fitoestrógenos e suas interações no reparo tecidual.

CAPÍTULO 2- FITOESTRÓGENOS NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS: ESTUDO EXPERIMENTAL COM A BIOCHANINA A

9. OBJETIVOS

9.1. Geral

Investigar os efeitos da Biochanina A em feridas cutâneas induzidas em camundongas ovariectomizadas.

9.2. Específicos

- Determinar o efeito tópico da BCA sobre:
 - O útero dos animais ovariectomizados;
 - O grau de redução da área das feridas;
 - O perfil inflamatório das lesões em reparo;
 - O processo proliferativo das feridas cutâneas.

10. METODOLOGIA

10.1. Animais

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPA) da Universidade Federal de Sergipe (UFS) sob o nº5731050520. Foram utilizadas camundongas Swiss albinos (*Mus musculus*), fêmeas, não prenhes, híginas, pesando entre 25-30g e com 8-12 semanas de idade. Os animais foram obtidos do Biotério Central e mantidos no Laboratório de Farmacologia do Processo Inflamatório (LAFAPI), ambos da UFS. Para a manutenção, as camundongas permaneceram em gaiolas de polipropileno, com suprimento de ração e água *ad libitum*, 21 ± 2 °C de temperatura, $60 \pm 5\%$ de umidade e ciclo de 12 horas claro/escuro.

10.2. Ovariectomia

Os animais foram submetidos a anestesia com xilazina (10 mg/kg i.p) e quetamina (100 mg/kg i.p) e, logo após, foi realizada de forma aleatória a ovariectomia (OVX) bilateral, conforme já descrito por YAMASAKI et al. (2001), ou cirurgia simulada (SHAM), que difere dos OVX por realizar apenas a visualização dos cornos uterinos e ovários e devolução à cavidade abdominal. Todos os animais permaneceram durante 30 dias em observação para aclimação e recuperação pós-cirúrgica, garantindo ainda a cessação da produção e a degradação do estrógeno endógeno.

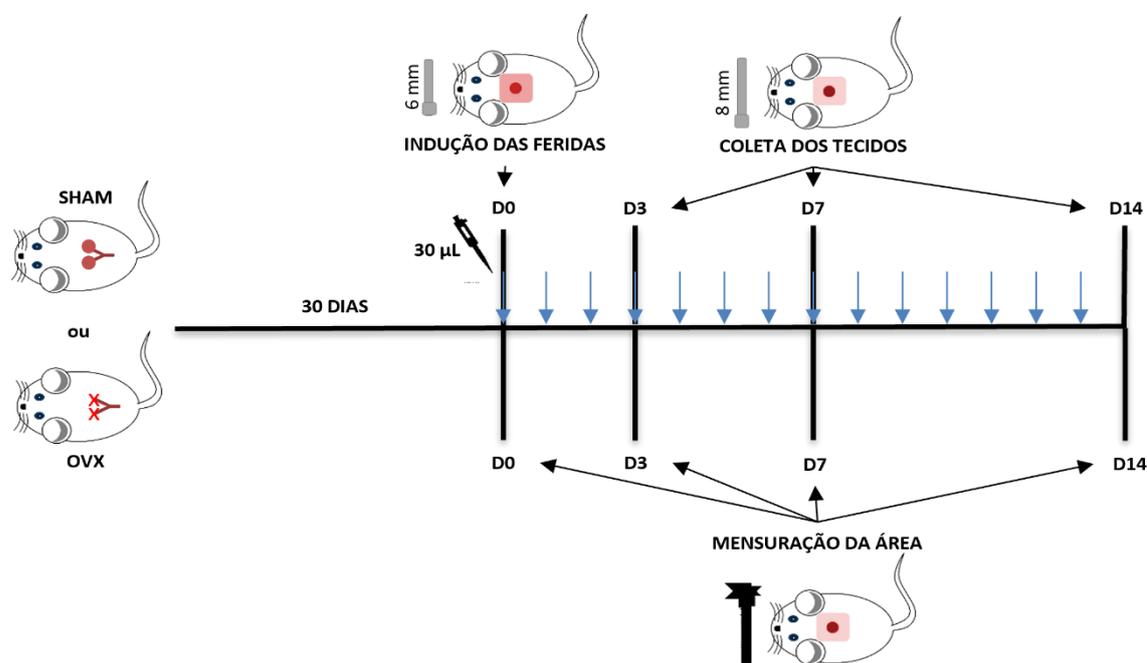
10.3. Indução das feridas

Antes da indução das lesões, os animais passaram por um período de 7 dias de ambientação em local isolado. Posteriormente, os animais foram anestesiados conforme mencionado anteriormente, tricotomizados na região dorsotorácica e foi realizada antissepsia com clorexidina alcoólica a 0,5%. A excisão cutânea foi realizada com *punch* metálico de 6 mm e cada animal foi novamente alojado em ambiente individual.

10.4. Tratamento das feridas

Os animais foram distribuídos em 6 grupos para o tratamento tópico das feridas: SHAM (tratado com veículo), OVX (tratado com veículo), OVX-BCA 0,03mg/animal (1mg/mL), OVX-BCA 0,09mg/animal (3mg/mL), OVX-BCA 0,27mg/animal (9mg/mL) e OVX-E2 (0,009mg/animal de 17 β - Estradiol). Foi utilizado como veículo uma solução contendo salina a 0,9% (80%), dimetilsulfóxido (10%) e propilenoglicol (10%). Tanto a BCA como o 17 β - Estradiol foram obtidos da Sigma® e a administração tópica foi realizada imediatamente após a indução da lesão com 30 μ L do respectivo tratamento, a cada 24 horas e durante 14 dias (Figura 14).

Figura 14 - Delineamento experimental.



Os animais foram submetidos à ovariectomia (OVX) ou cirurgia simulada (SHAM). Após 30 dias, foi realizada a excisão cutânea de 6mm e o tratamento com 30 μ L, a cada 24 horas e durante 14 dias (setas azuis). Nos dias (D) 0, 3, 7 e 14 as feridas foram mensuradas e nos dias 3, 7 e 14 foram coletados os tecidos com *punch* de 8mm para as análises. **Fonte:** próprio autor criada no Microsoft PowerPoint®.

10.5. Coleta de amostras

Para a coleta de tecido foi realizada a eutanásia com sobredose de quetamina (300 mg/kg, i.p.) e xilazina (30 mg/kg, i.p.) nos dias 3, 7 e/ou 14 (n=5-7/tempo/grupo). As feridas foram coletadas com auxílio de *punch* para biópsia de 8mm, pesadas e mantidas a -80°C até as análises. Para a avaliação histológica (n=3/grupo ao 14º dia), o fragmento da ferida foi retirado e acondicionado em coletor universal contendo formaldeído a 10%.

10.6. Determinação do peso uterino

A pesagem do útero foi realizada com o intuito de verificar se a ovariectomia foi bem sucedida e se os tratamentos apresentaram efeitos sistêmicos sobre o peso uterino. Após eutanásia o útero foi excisado através de celiotomia mediana, pesado e normalizado pelo peso corporal dos animais (g/100g).

10.7. Avaliação do fechamento das lesões

As feridas foram mensuradas nos dias 0, 3, 7 e 14 através de paquímetro digital. A área foi calculada de acordo com a equação: $\text{Área} = \pi \cdot R \cdot r$, onde "R" raio craniocaudal e "r" raio laterolateral. Posteriormente, o cálculo de fechamento da ferida foi expresso em porcentagem, conforme a equação: $\text{Cicatrização (\%)} = [(Wi - Wd)/Wi] \times 100$, onde "Wi" área da ferida inicial (0) e "Wd" área da ferida no dia mensurado (RAMSEY et al., 1995). Todas as lesões foram fotografadas nos tempos supracitados, com câmera fixada à distância padrão de 10 cm.

10.8. Ensaio da atividade de Mieloperoxidase

A quantificação da atividade de Mieloperoxidase (MPO), presente nos neutrófilos, foi realizada para a avaliação indireta do infiltrado desse tipo celular na ferida nos dias 3 e 7 de reparo. Os tecidos foram homogeneizados em Tampão Fostato de Sódio (PBS) e Brometo de Hexadeciltrimetilamonio (HTAB) a 0,5%, na proporção de 1mL/100mg de tecido. Após isso, as amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 14000 rpm. Foram utilizados 20 μL de sobrenadante com 200 μL da solução de O-dianisidina e, por fim, a absorbância das amostras foi determinada em 460 nm através de um espectrofotômetro (BRADLEY et al., 1982).

10.9. Quantificação de citocinas

As citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β e anti-inflamatória IL-10 foram quantificadas do sobrenadante do homogenato da ferida no 3^o dia de reparo. Todos os ensaios foram realizados através do ELISA, com anticorpos obtidos comercialmente e os procedimentos realizados de acordo com o protocolo do fabricante (PeproTech®).

10.10. Avaliação histológica

As amostras foram desidratadas em álcool e diafanizadas em xilol e, por fim, impregnadas em parafina (60°C) na forma de blocos. Posteriormente, os blocos de parafina foram submetidos a cortes seriados de 5µm de espessura e fixados em lâminas de vidro gelatinizadas. Para cada amostra foram confeccionadas duas lâminas com três cortes histológicos. Uma lâmina foi submetida à coloração com hematoxilina e eosina e outra à coloração com picrossirius red. Os cortes foram analisados por um patologista experiente, de forma descritiva e cega, e os achados histológicos foram comparados entre os grupos.

A reepitelização da superfície da ferida e a formação de cicatriz fibrosa na derme foram avaliadas nas lâminas coradas por hematoxilina e eosina, observadas em 10 campos diferentes, com aumentos de 40x e 1000x e utilizando microscópio óptico (Euromex, iScope®, modelo IS .1152-PLi). Por fim, as imagens foram captadas por câmera (Euromex CMEX-2f) e avaliadas descritivamente.

A coloração de picrossirius red foi utilizada para análise da deposição de fibras de colágeno sob luz polarizada. As imagens foram captadas por câmera (Euromex CMEX-2f) acoplada ao microscópio de polarização (Euromex, iScope® Polarización, modelo IS.1053-PLPOLRi) e avaliadas descritivamente.

10.11. Análise estatística

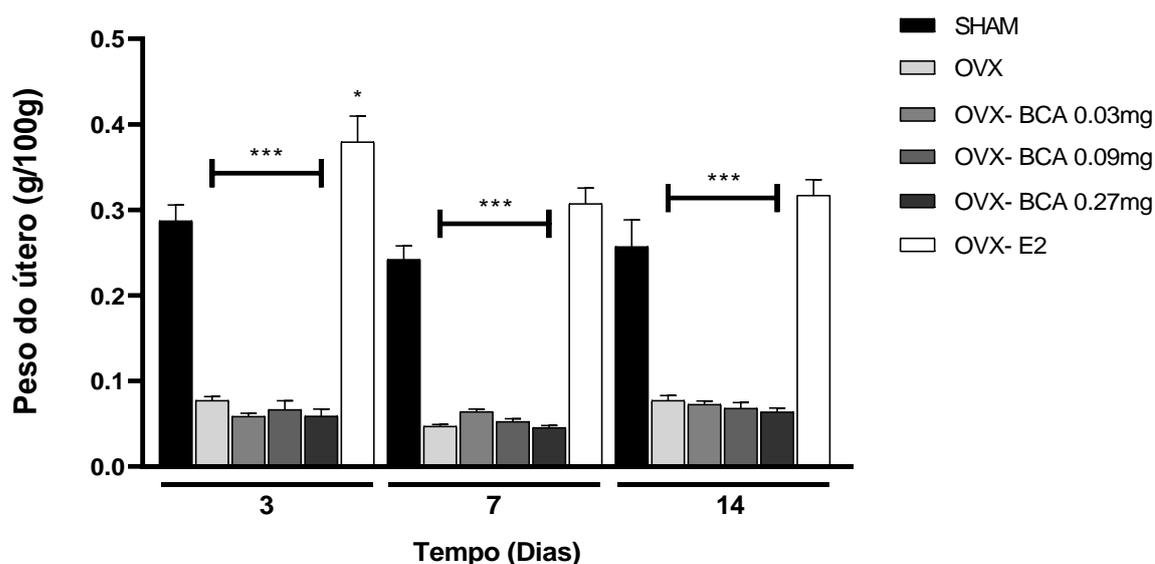
Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e analisados através da ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey. O software utilizado foi o GraphPad Prism 8 e os resultados foram apresentados como \pm o Erro Padrão da Média (\pm EPM). Para os parâmetros histológicos foi realizada a análise descritiva dos dados.

11. RESULTADOS

11.1. Efeito da BCA tópica sobre o peso uterino

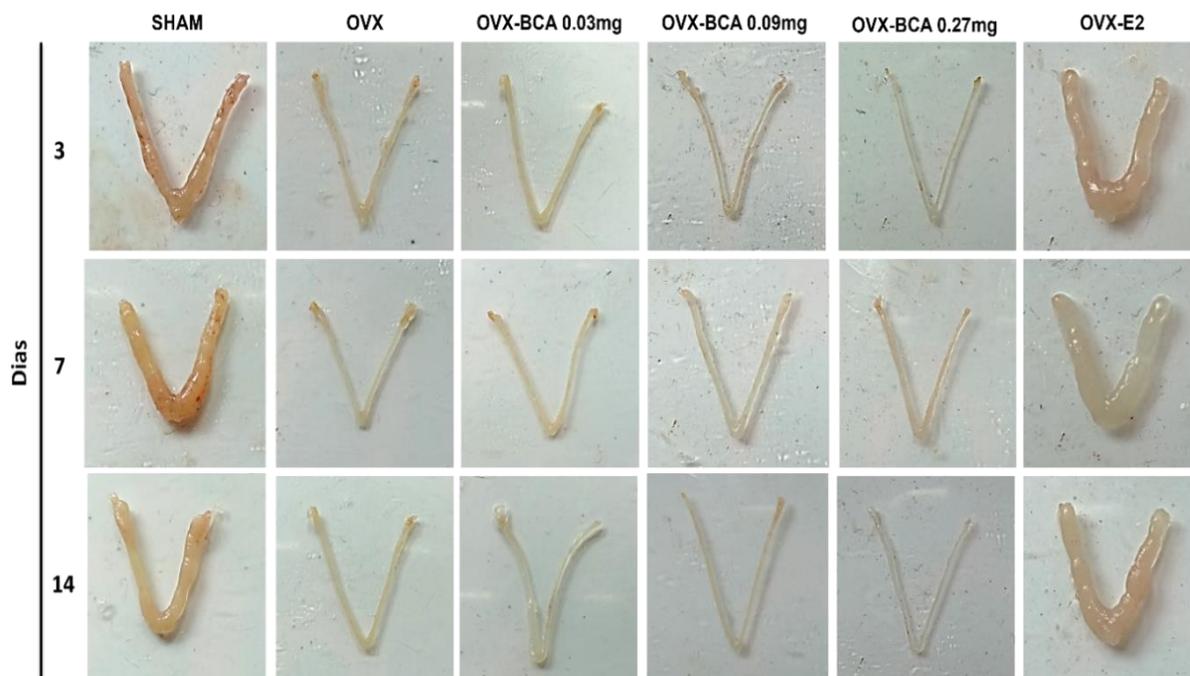
As Figuras 15 e 16 demonstram que o peso do útero do grupo OVX e dos grupos OVX-BCA foi significativamente menor ($p < 0,001$) em comparação com os animais do grupo SHAM e OVX-E2. Interessantemente, foi observado também maior peso uterino no grupo OVX-E2 ao 3º dia, quando comparado ao SHAM ($p < 0,05$).

Figura 15 - Peso uterino.



O útero foi pesado e normalizado pelo peso corporal dos animais nos dias 3, 7 e 14 de cicatrização, dos grupos SHAM (cirurgia simulada), OVX (ovariectomia), OVX-BCA (ovariectomia + BCA) 0.03mg, 0.09mg e 0.27mg e OVX-E2 (ovariectomia + 17 β - estradiol) ($n = 5-7$ por grupo/tempo), sendo expressado em g/100g. Resultados expressos como média \pm EPM, analisados pela ANOVA de duas vias e pós-teste de Tukey. Dados com * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ são considerados significativos quando comparados ao grupo SHAM. **Fonte:** próprio autor criada no GraphPad Prism 8®.

Figura 16 - Representação uterina.

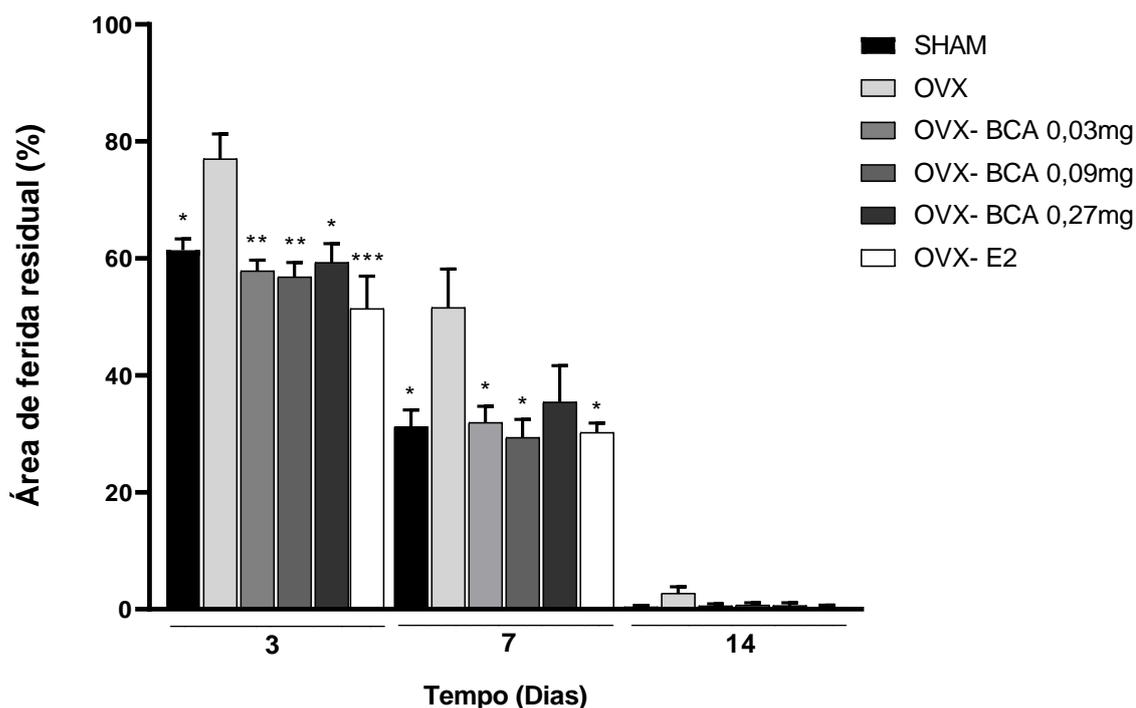


O útero está representado para os dias 3, 7 e 14 de cicatrização dos grupos SHAM (cirurgia simulada), OVX (ovariectomia), OVX-BCA (ovariectomia + BCA) 0.03mg, 0.09mg e 0.27mg e OVX-E2 (ovariectomia + 17β - estradiol). **Fonte:** próprio autor criada no Microsoft PowerPoint®.

11.2. Efeito da BCA sobre o fechamento das feridas

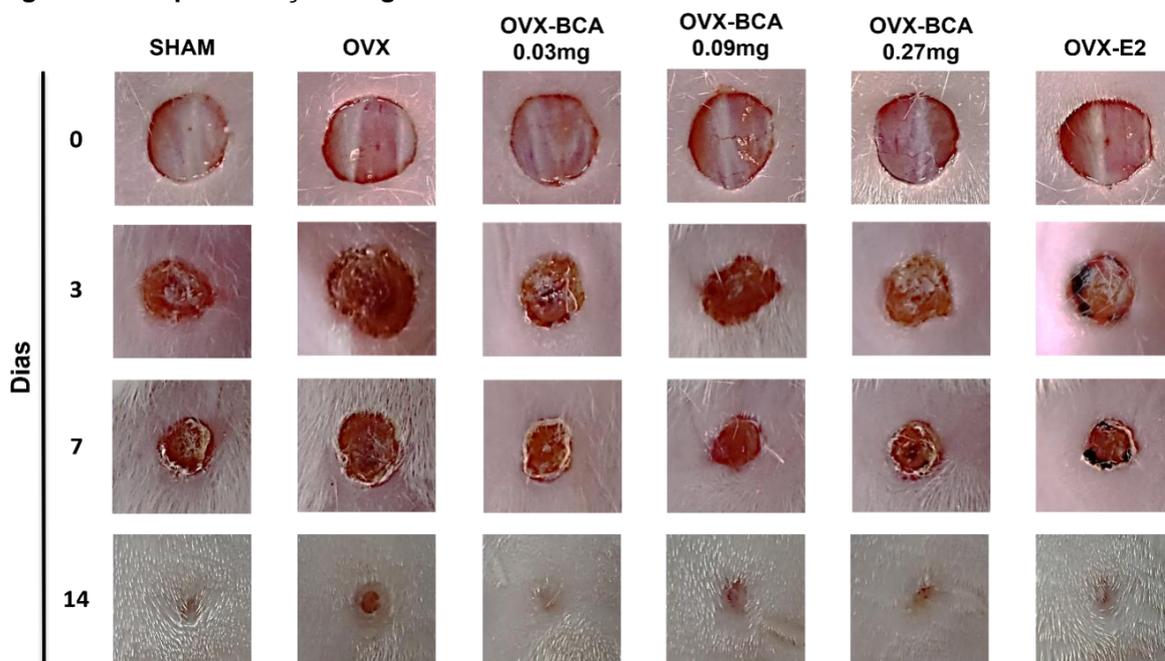
Nas Figuras 17 e 18 pode ser observada redução significativa da área da ferida nos dias 3 e 7 de cicatrização de todos os grupos (exceto OVX-BCA 0.27mg ao 7º dia) quando comparados ao OVX. No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos ao final do experimento (14º dia de cicatrização).

Figura 17 – Área de ferida residual.



A área das feridas foi determinada mediante a equação Área da ferida (mm²) = π.R.r e expressa em porcentagem de fechamento dos dias 3, 7 e 14 de cicatrização, dos grupos SHAM (cirurgia simulada), OVX (ovariectomia), OVX-BCA (ovariectomia + BCA) 0.03mg, 0.09mg e 0.27mg e OVX-E2 (ovariectomia + 17β- estradiol) (n= 5-7 por grupo). Resultados expressos como média ± EPM, analisados pela ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey. Dados com ***p<0,001, **p<0,01 e *p<0,05 são considerados significativos quando comparados ao grupo OVX. **Fonte:** próprio autor criada no GraphPad Prism 8®.

Figura 18 - Representação do grau de fechamento das feridas.



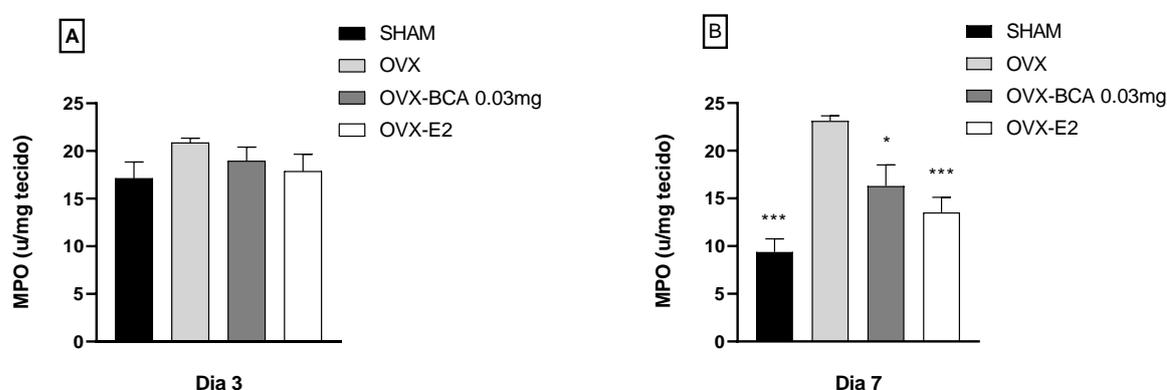
A área das feridas está representada para os dias 0, 3, 7 e 14 de cicatrização dos grupos SHAM (cirurgia simulada), OVX (ovariectomia), OVX-BCA (ovariectomia + BCA) 0.03mg, 0.09mg e 0.27mg e OVX-E2 (ovariectomia + 17β- estradiol). **Fonte:** próprio autor criada no Microsoft PowerPoint®.

Considerando que o efeito da BCA foi similar no fechamento das feridas para as três doses e não houve diferença significativa entre os diferentes grupos tratados (efeito dose-dependente), optou-se por continuar com a menor dose (BCA 0,03mg), com intuito de reduzir o número de animais utilizados para as demais análises.

11.3. Efeito da BCA sobre a atividade da MPO

Na Figura 19, observa-se que não houve diferença entre os grupos para a atividade de MPO no 3º dia, mas houve redução significativa nos grupos SHAM, OVX-BCA 0,03mg e OVX-E2 quando comparados ao OVX no 7º dia.

Figura 19 - Efeito da BCA sobre a atividade de MPO nas lesões.

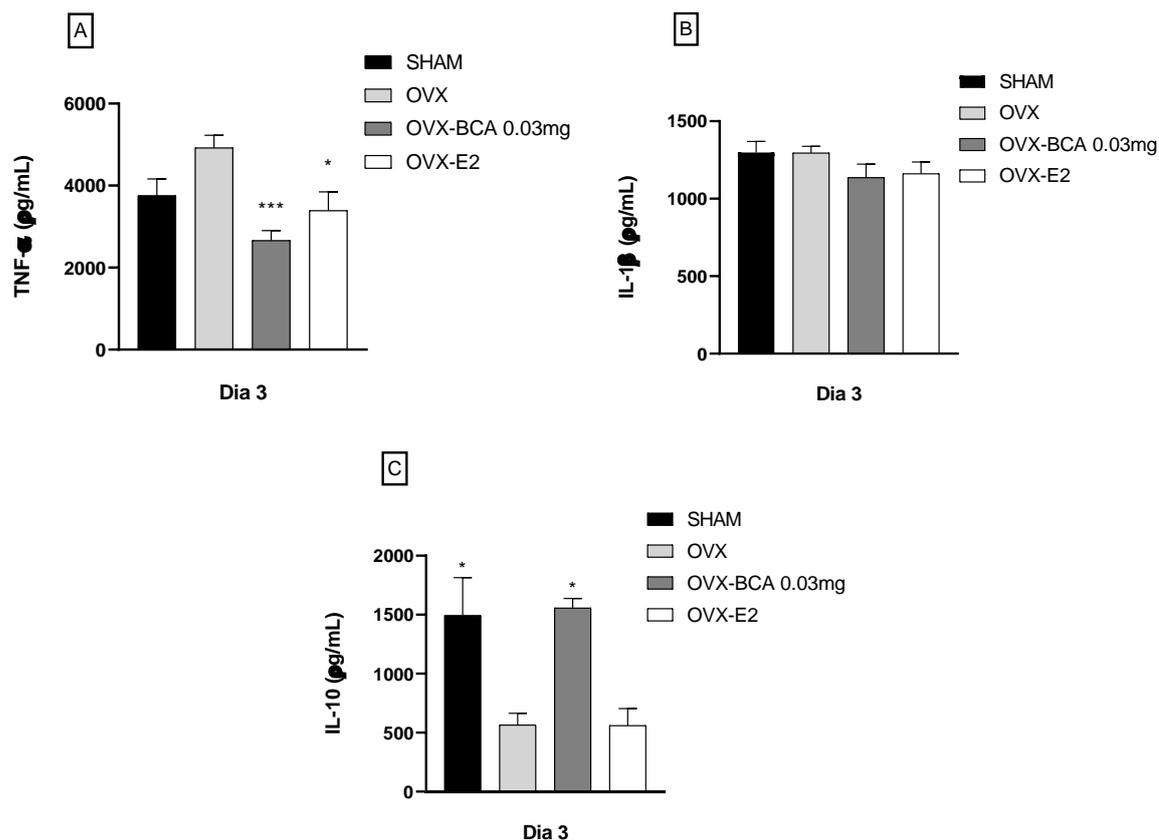


A atividade de MPO está expressa em uMPO/mg de tecido para os grupos SHAM (cirurgia simulada), OVX (ovariectomia), OVX-BCA (ovariectomia + BCA) 0.03mg e OVX-E2 (ovariectomia + 17 β -estradiol), nos dias 3 (A) e 7 (B) de cicatrização (n= 5-7 por grupo). Resultados expressos como média \pm EPM, analisados pela ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey. Dados com * $p < 0,05$ ou *** $p < 0,001$ são considerados significativos quando comparados ao grupo OVX. **Fonte:** próprio autor criada no GraphPad Prism 8®.

11.4. Efeito da BCA sobre a quantificação de citocinas

Na Figura 20, observa-se redução da quantidade da citocina pró-inflamatória TNF- α para o grupo OVX-BCA 0,03mg e OVX-E2, quando comparados ao grupo OVX ($p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente). Para a citocina anti-inflamatória IL-10, tanto no grupo SHAM como no OVX-BCA 0,03mg, mas não OVX-E2, foi observada maior quantidade quando comparada ao grupo OVX ($p < 0,05$). Por outro lado, não houve diferença significativa entre os grupos para a quantidade de IL-1 β .

Figura 20 - Efeito da BCA sobre a quantificação de TNF- α , IL-1 β e IL-10 nas lesões.

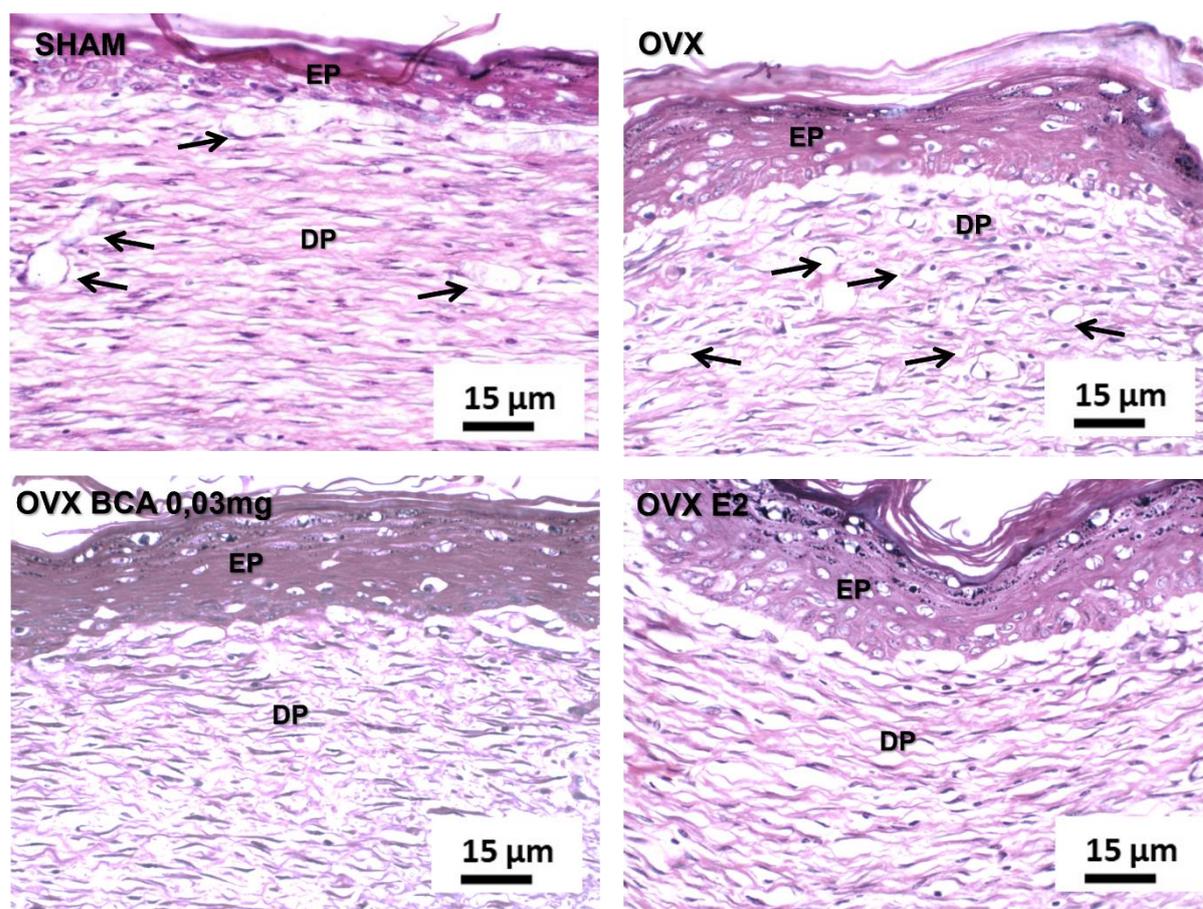


A quantidade das citocinas TNF- α (A), IL-1 β (B) e IL-10 (C) estão expressas em pg/mL do homogenato das lesões para os grupos SHAM (cirurgia simulada), OVX (ovariectomia), OVX-BCA (ovariectomia + BCA) 0.03mg e OVX-E2 (ovariectomia + 17 β - estradiol), ao 3^o dia de cicatrização (n= 5-7 por grupo). Resultados expressos como média \pm EPM, analisados pela ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey. Dados com *p<0,05 ou ***p<0,001 são considerados significativos quando comparados ao grupo OVX. **Fonte:** próprio autor criada no GraphPad Prism 8[®].

11.5. Efeito da BCA sobre os parâmetros histológicos das lesões

Na figura 21, pode ser observado que os grupos SHAM e OVX exibem maior evidência de vasos capilares residuais, que sugere uma cicatriz imatura em comparação aos demais grupos (BCA e E2).

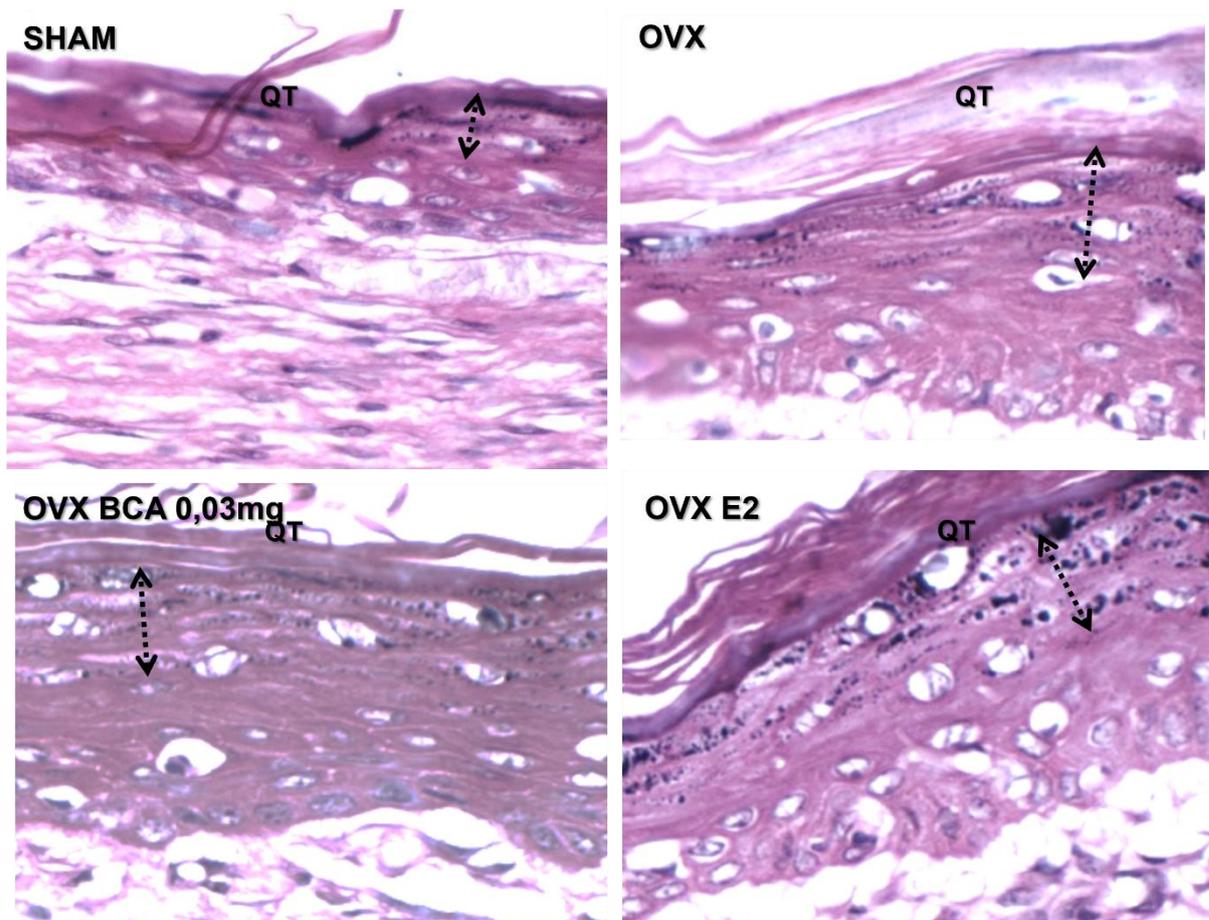
Figura 21 - Fotomicrografias de cortes histológicos em hematoxilina e eosina (ampliação: 400x).



Área reparada mostrando a cicatriz dos diferentes grupos experimentais SHAM (cirurgia simulada), OVX (ovariectomia), OVX-BCA (ovariectomia + BCA) 0,03mg e OVX-E2 (ovariectomia + 17β -estradiol). EP - Epiderme; DP - Derme Papilar; Seta - vasos capilares residuais. **Fonte:** próprio autor.

Na figura 22, demonstra-se que o grupo SHAM exibe uma epiderme delgada com discretas camadas granulosa e de d-ortoqueratina. Por outro lado, os grupos OVX e OVX-E2 possuem espessa epiderme e camada granulosa e, ainda, hiperortoceratose. A epiderme e a camada granulosa do grupo OVX-BCA 0,03mg foi semelhante ao grupo OVX, mas a hiperortoceratose foi menos intensa nos animais tratados com a BCA.

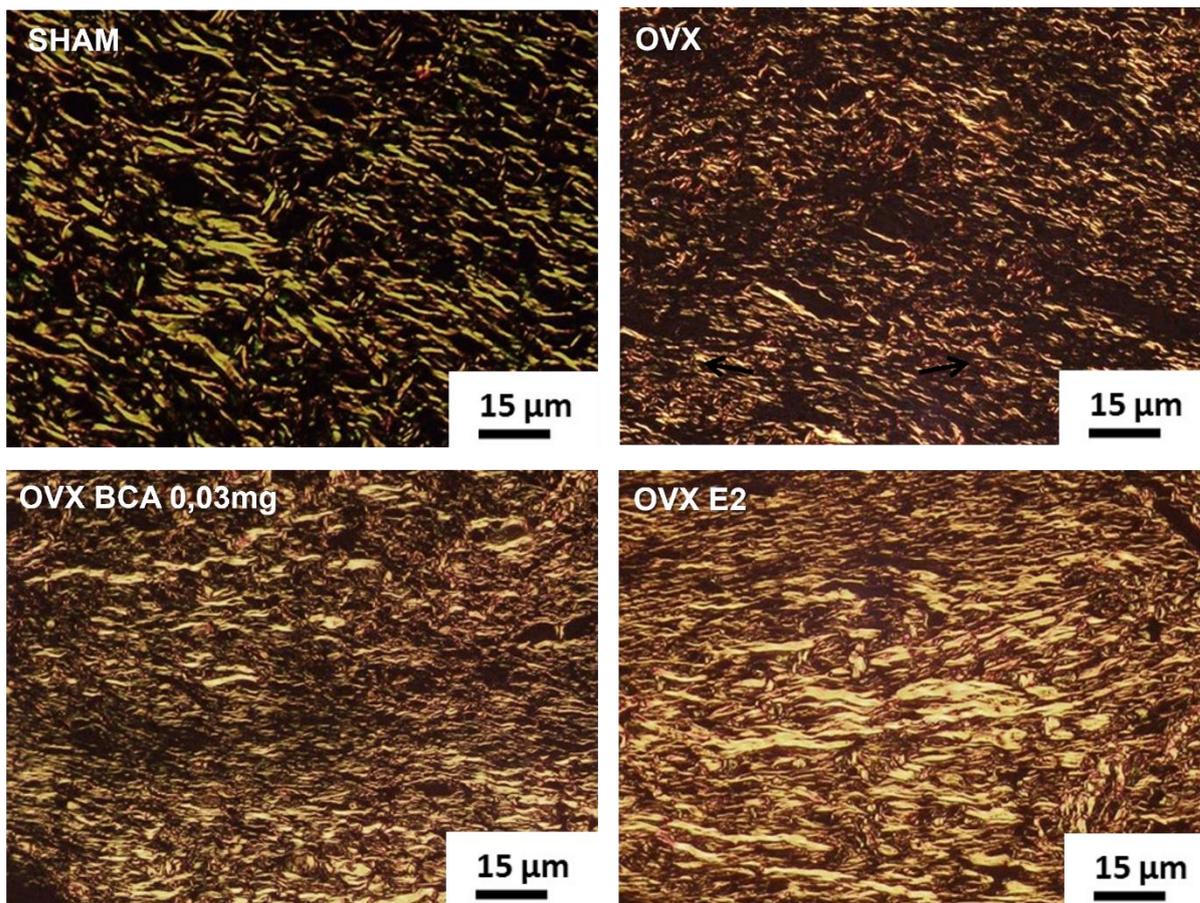
Figura 22 - Fotomicrografias de cortes histológicos em hematoxilina e eosina (ampliação: 40x).



Destaca-se o tecido epidérmico dos diferentes grupos experimentais SHAM (cirurgia simulada), OVX (ovariectomia), OVX-BCA (ovariectomia + BCA) 0.03mg e OVX-E2 (ovariectomia + 17β - estradiol). Queratina- QT; DP - Derme Papilar; Setas duplas indicam a espessura da epiderme. **Fonte:** Próprio autor.

Quando corados em picrossirius red (Figura 23), para avaliação específica da deposição de colágeno nas lesões, pode-se observar que no grupo SHAM as fibras de colágeno foram espessas e depositadas de forma paralela. Já o grupo OVX apresentou fibras colágenas mais curtas, delgadas e menos compactadas, enquanto o OVX-BCA 0.03mg apresentou fibras de colágeno discretamente espessas e compactas. O grupo OVX-E2 apresentou fibras acentuadamente espessas e bem compactas, com arranjo paralelo.

Figura 23 - Fotomicrografias de secções histológicas em picrosirius red, analisadas sob luz polarizada (ampliação: 400 x).



Destaca-se o colágeno para os grupos SHAM (cirurgia simulada), OVX (ovariectomia), OVX-BCA (ovariectomia + BCA) 0.03mg e OVX-E2 (ovariectomia + 17 β - estradiol). **Fonte:** próprio autor.

12. DISCUSSÃO

O interesse humano em intervir no processo de cicatrização de feridas tem sido observado desde os tempos antigos com a utilização de recursos naturais como argila, mel e ervas medicinais (SHAH, 2011). Os fitoestrógenos são moléculas de origem vegetal com grande potencial para a cicatrização de feridas. A BCA, particularmente, é uma alternativa promissora no tratamento de feridas cutâneas em mulheres na menopausa, pois além de ser uma molécula de origem vegetal, apresenta seletividade para o ER β (KUIPER et al., 1998; MOHTADI et al., 2021).

Os efeitos negativos com a TRH a longo prazo estão geralmente relacionados à ativação sistêmica do ER α (AHN et al., 2020). Dessa forma, pesquisas recentes têm buscado estratégias focadas na ação local e na seletividade para o ER β , garantindo eficácia e segurança na cicatrização de feridas hipoestrogênicas (ZOMER; COOKE, 2023). Além disso, o retardo na cicatrização de feridas em camundongas ovariectomizadas foi revertido mediante ativação do ER β , mas não do ER α , quando estimulados de forma isolada (CAMPBELL et al., 2010).

Foi demonstrado anteriormente que a cicatrização de feridas ocorre de forma atrasada em camundongas ovariectomizadas tratadas com estrógeno exógeno mas *knockout* para o ER β . Dessa forma, foi possível sugerir que os efeitos da TRH são mediados pelo ER β epidérmico (CAMPBELL et al., 2010; KRAHN-BERTIL et al., 2010). No entanto, tudo isso ainda permanece controverso, pois segundo Perzelova et al. (2016), tanto ER α quanto ER β apresentam impacto direto na cicatrização de feridas, sobretudo na modulação da proliferação e diferenciação dos queratinócitos.

No presente estudo, avaliou-se o efeito cicatrizante da BCA em modelo murino de feridas cutâneas hipoestrogênicas com intuito de mimetizar a menopausa em mulheres. Foi dada ênfase ao peso uterino (efeito sobre o útero), fechamento das lesões (cicatrização), atividade de MPO (neutrófilos) e quantidade de citocinas (inflamação) e características histológicas das lesões, com ênfase na angiogênese, fibroplasia e reepitelização (resolução).

Previamente, observamos que a BCA não aumentou o peso uterino, independentemente das doses utilizadas. Isso ocorreu devido às propriedades terapêuticas da BCA seletivas para o ER β , pois não apresenta efeito evidente em tecidos ricos em ER α como o útero (KUIPER et al., 1998). Por outro lado, deve-se destacar que a reposição bem sucedida do estrógeno foi confirmada pelo aumento

do peso uterino no grupo OVX-E2, pois possui seletividade semelhante aos receptores (CAMPBELL et al., 2010).

Mukai et al. (2014) reportaram que o peso uterino e os níveis de 17β -estradiol em animais ovariectomizados tratados com 17β -estradiol foram significativamente maiores do que animais sem reposição hormonal, mas não houve diferenças quando comparado ao grupo não ovariectomizado (SHAM). Os autores sugeriram que o 17β -estradiol percutâneo foi suficientemente absorvido, semelhante ao observado no presente estudo para o peso uterino.

No presente estudo foi observado maior grau de fechamento da ferida ao 3º e 7º dias de reparo nos animais tratados com a BCA quando comparados aos OVX. Acredita-se que a BCA atua no fechamento da ferida com ênfase na fase inflamatória. De forma semelhante, Mukai et al. (2012) não observaram diferença para a área da ferida final em animais ovariectomizados tratados com daidzeína, mas verificaram redução na área da ferida durante a fase inflamatória.

Favorecer o fechamento de feridas durante a fase inflamatória é fundamental para garantir adequado reparo nas próximas fases, pois a inflamação exacerbada é fator chave para complicações, como dor, cicatrizes hipertróficas e quelóides (DWIVEDI et al., 2017; LAROUCHE et al., 2018). Park et al. (2011) e Eo et al. (2016) observaram que a suplementação com genisteína na dieta de animais normais ou diabéticos, respectivamente, aumentou a taxa de fechamento da ferida mediante os efeitos anti-inflamatório e antioxidante.

A deficiência de estrógeno é responsável pelo aumento do estresse oxidativo e cicatrização de feridas prejudicada. A BCA tem efeito antioxidante no hipoestrogenismo e, indiretamente, atenua o processo inflamatório (GALAL et al., 2018). Assim, sugere-se que o fechamento das feridas no presente estudo durante a fase inflamatória ocorreu, em parte, devido aos efeitos antioxidantes da BCA. A genisteína possui ação antioxidante via NFR2 e produção de HO-1, GPx, CAT e SOD em feridas diabéticas (EO et al., 2016). No entanto, novos estudos sobre os mecanismos antioxidantes da BCA na cicatrização devem ser explorados.

A contração da ferida, mais evidente na cicatrização em camundongos que em humanos, é fundamental para o fechamento da lesão. Esse processo ocorre devido à conversão de fibroblastos em miofibroblastos que expressam α -SMA e possuem atividade contrátil (BARBOSA et al., 2010). Ainda que o fechamento tenha sido evidente na fase inflamatória, o efeito da BCA sobre os miofibroblastos e sua

contribuição para o fechamento deve ser considerada, visto que esse fitoestrógeno estimula a proliferação e a migração de fibroblastos (GAJIC et al., 2022).

O fechamento da ferida é um método amplamente utilizado em modelos experimentais de reparo cutâneo, mas esse marcador não determina isoladamente o efeito cicatrizante (MASSON-MEYERS, 2020). Sendo assim, considerando o efeito da BCA no fechamento durante o período inflamatório do reparo, decidimos avaliar a atividade anti-inflamatória mediante análise do infiltrado de neutrófilos (MPO) e da quantidade de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) e anti-inflamatória (IL-10) nas lesões.

O processo inflamatório é um ponto crítico para a cura de feridas, visto que é fundamental para a eliminação de microrganismos e o preparo do ambiente para as demais fases do reparo (HESKETH et al., 2017). Portanto, o efeito anti-inflamatório da BCA na redução da atividade de MPO e da quantidade de TNF- α , bem como o aumento de IL-10, foram fundamentais para o reparo tissular e podem justificar, em parte, a redução da área das feridas quando comparada ao grupo ovariectomizado.

A atividade da MPO é um biomarcador indireto para o infiltrado de neutrófilos no sítio inflamatório (BRADLEY et al., 1982). Em um modelo inflamatório de lesão pulmonar aguda a BCA inibiu a atividade da MPO do tecido pulmonar, reduzindo o infiltrado de neutrófilos. Reduziu, ainda, as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6, bem como inibiu a ativação da via de sinalização TLR4/NF- κ B (HU et al., 2020).

Os neutrófilos são considerados tipos celulares dispensáveis ao reparo e o aumento do mesmo pode culminar na formação de feridas crônicas (DOVI et al., 2003). Já foi demonstrado que, tanto em homens quanto em mulheres, o estrogênio tóxico favorece o reparo de feridas devido à redução no recrutamento de neutrófilos e da secreção de elastase (ASHCROFT et al., 1999).

Coskun et al. (2014) demonstraram que a atividade de MPO foi maior em retalhos cutâneos de ratas ovariectomizadas, sugerindo infiltração abundante de neutrófilos nesses animais. Além disso, a viabilidade do retalho cutâneo foi pior nos animais ovariectomizados. Dessa forma, os autores alertaram para a necessidade de TRH prévia em mulheres na menopausa que realizarão cirurgias de retalho cutâneo.

Mukai et al. (2014) observaram redução da quantidade de neutrófilos e macrófagos no grupo ovariectomizado tratado com 17 β -estradiol quando comparado ao ovariectomizado sem reposição hormonal. Além disso, a reepitelização, a

deposição de colágeno e a quantidade de miofibroblastos no grupo ovariectomizado tratado com 17β -estradiol foram significativamente maiores em comparação com o grupo ovariectomizado sem reposição com 17β -estradiol.

Durante o reparo de feridas uma grande proporção de neutrófilos é eliminada via eferocitose (MOHTADI et al., 2021), o que favorece a ativação do perfil M2 (HESKETH et al., 2017). Nesse sentido, a redução de neutrófilos, identificada subjetivamente nesse estudo pela redução da atividade de MPO nas lesões, pode ser um efeito importante para garantir maiores proporções de macrófagos de perfil resolutivo (FELIX et al., 2021).

Já foi demonstrado que a BCA pode reduzir neutrófilos via apoptose (FÉLIX et al., 2020) e aumentar a sua eliminação por macrófagos (eferocitose) tanto *in vitro* quanto na cavidade articular de camundongos artríticos (FÉLIX et al., 2021). Félix et al. (2021) demonstraram que esse efeito é dependente de um receptor diferente dos nucleares $ER\alpha$ e $ER\beta$, o GPR30. Quando a BCA ativa o GPR30, presente na membrana celular, ocorre a estimulação da adenililcilase e elevação do monofosfato de adenosina cíclico que estimula a *Protein Kinase A* (PKA), responsável por regular o acúmulo de neutrófilos por apoptose e eferocitose, favorecendo assim a polarização M2 de caráter pró-resolutivo (FÉLIX et al., 2022).

Diversos compostos naturais apresentam atividade anti-inflamatória que beneficiam a cicatrização de forma semelhante, seja por inibição de fatores pró-inflamatórios, como o $TNF-\alpha$, ou por estimulação de mediadores anti-inflamatórios, como a IL-10 (RIBEIRO et al., 2018). No presente estudo, além de redução da quantidade de $TNF-\alpha$, houve aumento da IL-10. Esses efeitos também foram observados anteriormente para a BCA em modelo experimental de artrite (FELIX et al., 2020).

O $TNF-\alpha$ é uma citocina chave no processo inflamatório que atua sobre o TNFR1 e o TNFR2. A ativação desses receptores estimula a translocação do NF- κ B, um fator de transcrição nuclear que promove a produção de inúmeros mediadores pró-inflamatórios potencialmente danosos para os tecidos, como a IL-1 β , IL-6 e o próprio $TNF-\alpha$ (NOSENKO et al., 2019).

Galal et al. (2018) observaram regulação negativa da citocina pró-inflamatória $TNF-\alpha$ e positiva da citocina anti-inflamatória IL-4 em lesões cutâneas de ratas ovariectomizadas. A BCA também demonstrou efeitos anti-inflamatórios via inibição

do NF- κ B e MAPK, bem como de mediadores inflamatórios como o TNF- α , IL-1 β , iNOS, Óxido Nítrico (NO) e Prostaglandina E2 (PGE2) (ZHANG; CHEN, 2015).

Em estudos anteriores, utilizando modelos de inflamação, a BCA demonstrou efeito anti-inflamatório reduzindo TNF- α , IL-1 β e ROS na periodontite em ratos (ZHANG et al., 2020) e inibindo a sinalização TLR4/NF- κ B na pancreatite aguda (PAN et al., 2022). Um outro mecanismo anti-inflamatório já reportado foi a regulação positiva do PPAR- γ , que por consequência reduz a ativação do NF- κ B e a expressão do TNF- α , IL-8, Proteína de Adesão Celular Vascular- 1 (VCAM-1) e Molécula de Adesão Intercelular- 1 (ICAM-1) (MING et al., 2015).

Yu et al. (2019) destacaram que a BCA modula a inflamação regulando vias de sinalização independentes dos receptores estrogênicos. Em resumo, a BCA pode estimular o PPAR γ ou inibir as vias RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT, TLR/MyD88, ROS e TNF- α /NF κ B. Como resultado final em comum, ocorre a inibição do NF κ B que impeda a transcrição de genes para a produção de fatores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-1 β , IL-6, iNOS, COX-2 e MMPs.

A genisteína é o fitoestrógeno mais estudado e resulta da metabolização intestinal da BCA. Semelhante à BCA, a genisteína tem afinidade maior pelo ER β , mas a via estrógenica não é seu único mecanismo de atuação. A genisteína também modula a inflamação por inibir tanto o TNF- α como o NF- κ B (PARK et al., 2011). Ainda sobre essa via, o fitoestrógeno puerarina acelerou a cicatrização de feridas diabéticas em ratos reduzindo TNF- α e modulando NF- κ B e MAPK, bem como favorecendo a polarização de macrófagos M2 (LI et al., 2022).

A citocina IL-10 é uma molécula tipicamente pró-resolutiva, com perfil sabidamente anti-inflamatório. Ao se ligar ao IL10R, composto pelas subunidades IL10R α e IL10R β , ocorre sua dimerização e, após isso, JAK1 ativa o *Signal Transducers and Activators of Transcription 3* (STAT3), que promove a transcrição nuclear responsável pela proliferação e sobrevivência celular e suprime a expressão de genes pró-inflamatórios (HUTCHINS et al., 2013; SAXTON et al., 2021).

Na cicatrização de feridas ocorre um processo de fibrose e formação de uma cicatriz, enquanto na regeneração ocorre a substituição total do tecido lesionado (BELDON et al., 2010). A IL-10 tem sido relacionada ao processo regenerativo da pele que ocorre na vida fetal (LIECHTY et al., 2000), sendo uma citocina de perfil anti-inflamatório que, além de reduzir a inflamação, promove um ambiente propício à polarização de macrófagos M2 (PERANTEAU et al., 2008).

O efeito da BCA sobre a IL-10 é um achado inédito para a cicatrização de feridas. Já foi demonstrado que o fitoestrógeno puerarina pode aumentar a quantidade de IL-10 em queratinócitos e favorecer o reparo tecidual (SUN et al., 2022). A deficiência de IL-10 também foi associada ao aumento da infiltração de células inflamatórias e da formação de cicatrizes (SHORT et al., 2023). Segundo os autores, a IL-10 pode favorecer a cicatrização de feridas cutâneas estimulando a neovascularização por atuar sobre EPCs mediante o aumento do VEGF e da CXCL12 via STAT3.

Não foi observado efeito do estrógeno sobre a IL-10 quando comparado a animais ovariectomizados tratados com veículo. Esse resultado foi conflitante, pois já foi demonstrado que o estrógeno favorece a cicatrização de feridas por mecanismos que modulam a resposta inflamatória na pele, suprimindo IL-1 e TNF α , e estimulando IL-4 e IL-10 (ROUTLEY; ASHCROFT, 2009; THORNTON, 2013). No entanto, já observamos em nosso grupo que também não houve aumento de IL-10 na artrite em camundongas ovariectomizadas ou simuladas, enquanto houve aumento da IL-10 quando tratadas com a BCA (FÉLIX et al., 2020).

Zomer e Cooke (2023) realizaram uma revisão da literatura e destacaram o ER α como o receptor relacionado ao reparo de feridas em macrófagos. Nos macrófagos, o principal efeito foi favorecer a polarização para M2 com aumento de IL10 e arginase 1 e diminuição de iNOS e TNF α . Além disso, a via de sinalização STAT3 pode ser ativada mediante receptores estrogênicos, resultando no aumento da produção de IL-10 (HUTCHINS et al., 2013; SIERSBAEK et al., 2020). De qualquer forma, novos estudos devem ser realizados para esclarecer os mecanismos envolvidos no aumento da quantidade de IL-10 mediado pelo estrógeno na cicatrização de feridas.

No presente estudo foi observada maior evidência de vasos capilares residuais nos animais ovariectomizados tratados com veículo. Além disso, outros achados que justificam uma cicatrização prejudicada nesses animais foram a epiderme e a camada granulosa mais espessas, bem como as fibras de colágeno tipo I mais curtas, delgadas e menos compactadas. Tais resultados sugerem uma cicatriz imatura para o tempo de reparo quando comparada aos animais simulados e tratados com BCA ou E2.

Durante o processo de cicatrização, sobretudo nas fases mais tardias como a de remodelamento, ocorre a apoptose de inúmeras células, entre elas os

endoteliócitos que garantem a formação dos novos vasos sanguíneos em fases precoces (GURTNER et al., 2008; GANTWERKER; HOM, 2011). Sendo assim, a presença de alta densidade de vasos capilares residuais em fase tardia como a de remodelamento indica a imaturidade da cicatriz, sugerindo um retardo no processo de reparo em animais ovariectomizados não tratados.

A reepitelização ocorre quando os queratinócitos se proliferam e migram em direção ao defeito cutâneo. A menor hiperortoceratose em animais tratados com BCA quando comparados aos ovariectomizados sugere que esse fitoestrógeno tem efeito na reepitelização. Esse efeito pode estar associado à ação direta sobre os queratinócitos, pois são células ricas em receptores ER β (ZOMER; COOKE, 2023). Recentemente, Walvekar et al. (2025) demonstraram que a BCA reduziu a inflamação da psoríase por meio da modulação de queratinócitos via sinalização NF- κ B e MAPK.

O efeito reepitelizante também foi observado no tratamento com fitoestrógenos como a puerarina em queratinócitos *in vitro* e em feridas agudas em camundongos (SUN et al., 2022) e a genisteína em feridas crônicas de animais ovariectomizados (EMMERSON et al., 2010). Cho et al. (2013) utilizaram a gliciteína em queratinócitos humanos e observaram efeito na migração e proliferação, sugerindo então um potencial efeito reepitelizante para esse fitoestrógeno.

O ER β é bastante expresso também em fibroblastos dérmicos e vasos sanguíneos, sendo os principais mediadores da ação do estrogênio (CAMPBELL et al., 2010; THORNTON et al., 2013). Nesse sentido, sugere-se que a BCA, devido sua seletividade pelo ER β , modulou o processo de neoangiogênese e fibroblasia, respectivamente, favorecendo a formação de uma cicatriz madura e resistente em relação aos animais ovariectomizados não tratados.

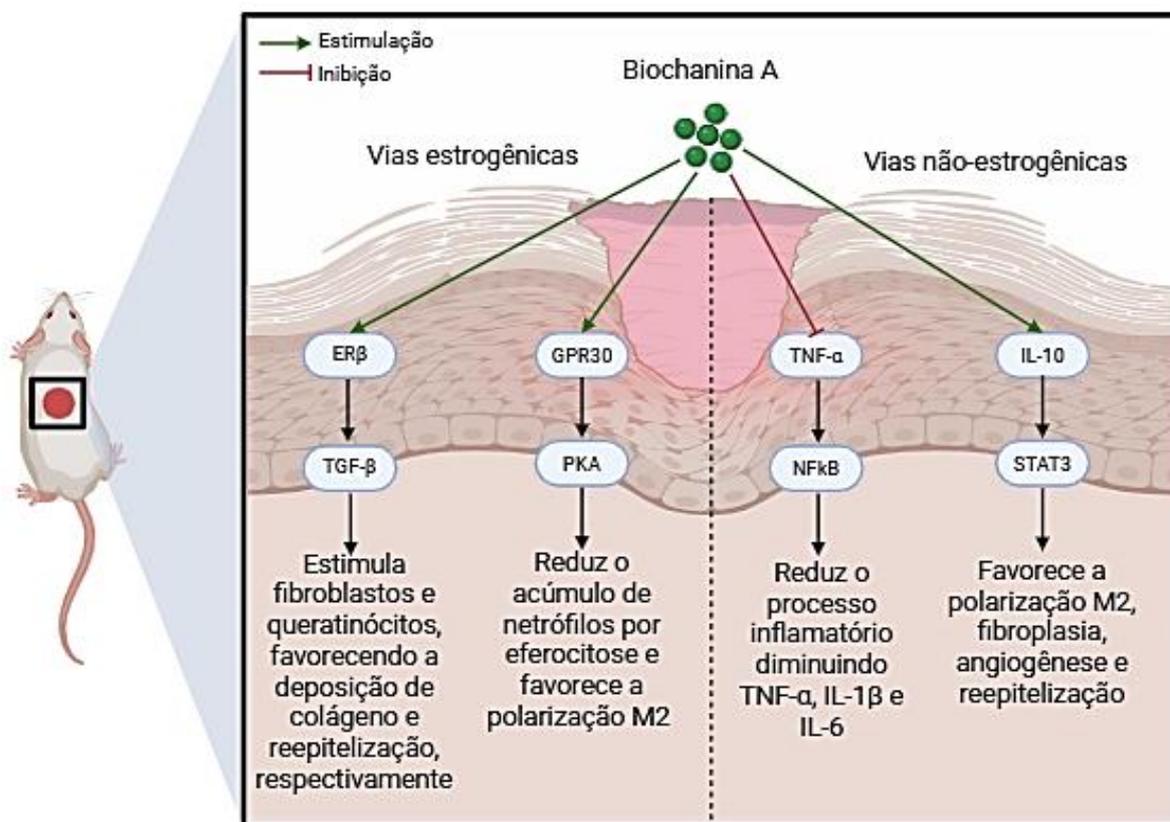
Segundo Gajic et al. (2022), a BCA possui efeito na proliferação e migração de fibroblastos. Com base nisso, sugere-se que a estimulação da BCA sobre os fibroblastos favoreceu a deposição de MEC em quantidade e qualidade, sobretudo o colágeno tipo I, quando comparado aos animais ovariectomizados.

Outros fitoestrógenos também demonstraram efeito na deposição de colágeno em feridas, como a genisteína em animais ovariectomizados (MARINI et al., 2010) ou a puerarina em animais desafiados com dexametasona (NGUYEN et al., 2021). Em contrapartida, a expressão de colágeno I e III foi reduzida em fibroblastos hipertróficos tratados com genisteína. Esse efeito foi atribuído à redução

da atividade da TPK e da via RAS-RAF-MEK-ERK, demonstrando importante efeito modulador dos fitoestrógenos sobre os fibroblastos (CAO et al., 2009).

Embora os fitoestrógenos possuam ação sobre os receptores estrogênicos, os efeitos observados em feridas podem estar relacionados também a mecanismos totalmente independentes dessa via de sinalização (EMMERSON et al. (2010). Diante disso, deve-se considerar que a BCA pode atuar também mediante mecanismos independentes da via estrogênica na cicatrização de feridas. Embora estudos mais aprofundados de mecanismos de ação devam ser realizados, sugerimos aqui possíveis mecanismos de ação da BCA na cicatrização de feridas com base nos resultados observados em nosso estudo, associados ao dados da literatura atual (Resumo na Figura 24).

Figura 24 - Efeito cicatrizante da Biochanina A nas vias estrogênicas e não estrogênicas.



A BCA pode agir em vias não estrogênicas mediante inibição de TNF-α ou estimulação de IL-10. A BCA pode reduzir TNF-α, inibindo a translocação do NF-κB e reduzindo a produção de mediadores como a IL-1β, IL-6 e o próprio TNF-α; ou aumentar a IL-10, que ativa o STAT3 e promove ambiente para M2, favorecendo a fibroplasia, reepitelização e angiogênese. Mediante vias estrogênicas, a BCA pode atuar no ERβ estimulando o TGF-β e a TPK, da via RAS-RAF-MEK-ERK (não demonstrado na figura), modulando os fibroblastos e os queratinócitos, favorecendo a deposição de colágeno e a reepitelização, respectivamente. Além disso, a BCA pode aumentar a eferocitose de neutrófilos apoptóticos via GPR30/PKA, favorecendo a polarização M2 de caráter pró-resolutivo. **Fonte:** próprio autor criada no BioRender.com.

13. CONCLUSÃO

O fitoestrógeno Biochanina A possui efeito sobre o fechamento das lesões hipoestrogênicas com ênfase na fase inflamatória, reduzindo o infiltrado de neutrófilos e a quantidade de citocina pró-inflamatória TNF- α , mas aumentando a quantidade de citocina anti-inflamatória IL-10. Ainda, a Biochanina A parece favorecer a reepitelização e a deposição de colágeno nas lesões. Embora a BCA apresente importantes efeitos na cicatrização de feridas hipoestrogênicas, novos estudos devem ser realizados para explorar de forma detalhada os mecanismos envolvidos no reparo cutâneo, sobretudo das vias independentes dos receptores estrogênicos.

14. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados encontrados no presente estudo para os efeitos cicatrizantes da Biochanina A em feridas cutâneas de camundongas ovariectomizadas são promissores. Novos estudos serão conduzidos em nosso grupo, a fim de aprofundar os conhecimentos sobre o papel da BCA no reparo tecidual em modelos experimentais. Particularmente, investigando os mecanismos de ação e incluindo novas tecnologias que maximizem seus efeitos, como as biomembranas.

De imediato, iremos investigar o papel da BCA na polarização de macrófagos (Arginase 1, MRC1, Nos 2 e CD86) e sobre os fatores de crescimento envolvidos na angiogênese (VEGF) e fibroplasia (TGF- β). Os processos de angiogênese, fibroplasia e reepitelização também merecem ser investigados em fases mais precoces, como ao 7º dia de reparo. Além disso, as vias de sinalização NF- κ B, PPAR γ e MAPK devem ser exploradas. Espera-se que esses resultados sejam utilizados como base para o avanço em estudos clínicos e, por fim, que a BCA seja considerada como alternativa terapêutica para feridas cutâneas em mulheres na menopausa.

15. REFERÊNCIAS

ABDULLAHI, A. et al. Animal models in burn research. **Cell Mol Life Sci.**, v.71, p.3241-3255, 2024.

AHN, S. et al. Biomimetic and estrogenic fibers promote tissue repair in mice and human skin via estrogen receptor β . **Biomaterials**, v.255, p.1-26, 2020.

ANDERSON, G.L. et al.. Effects of conjugated equine estrogen on postmenopausal women with hysterectomy. **JAMA**, v.291, p.1701–1712, 2004.

ANDERSSON, M.Å. et al. Development of an Experimental Ex Vivo Wound Model to Evaluate Antimicrobial Efficacy of Topical Formulations. **Int. J. Mol. Sci.**, v.22, p.1-16, 2021.

ASHCROFT, G.S. et al. Estrogen accelerates cutaneous wound healing associated with an increase in TGF- β 1 levels. **Nature**, v.3, p.1209-1215, 1997.

ASHCROFT, G.S. et al. Estrogenmodulates cutaneous wound healing by downregulating macrophage migration inhibitory fator. **The Journal of Clinical Investigation**, v.111, n. 9, p. 1309-1318, 2003.

ASHCROFT, G.S. et al. Topical estrogen accelerates cutaneous wound healing in aged humans associated with an altered inflammatory response. **Am. J. Pathol**, v. 155, p. 1137–1146, 1999.

ATIQU-UR-REHMAN. Biological Activities of Trifolium Pratense: A Review. **Acta Scientific Pharmaceutical Sciences**, v.3, n.9, p.36-42, 2019.

BAKAR, N. A. et al. Understanding the ideal wound healing mechanistic behavior using in silico modelling perspectives: A review. **J Tissue Viability.**, v.33, p.104-115, 2024.

BARBOSA, F.L. et al. Corneal myofibroblast generation from bone marrow-derived cells. **Exp Eye Res.**, v.91, p.92–96, 2010.

BAYERL, C.; KEIL, D. Isoflavonoids in the Treatment of Skin Aging in Postmenopausal Women. Isoflavonoide der Behandlung der Hautalterung postmenopausaler Frauen. **Aktuelle Derm.**, v.28, n.1, p.14-8, 2002.

BELDON, P. Basic science of wound healing. **Surgery**, v.28, p.409–412, 2010.

BELLO, S. et al. Lack of blinding of outcome assessors in animal model experiments implies risk of observer bias. **Journal of Clinical Epidemiology**, Oxford, v. 67, n.9, p. 973–983, 2014.

BORAWSKA, M.H. et al. Cell Viability of Normal Human Skin Fibroblast and Fibroblasts Derived from Granulation Tissue: Effects of Nutraceuticals. **Journal of Medicinal Food**, v.12, n. 2, p. 429–434, 2009.

- BRADLEY, P.P. et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **The Journal of Investigative Dermatology**, v.78, p.206-209, 1982.
- BREIKAA, R.M. et al. Multimechanistic antifibrotic effect of biochanin a in rats: implications of proinflammatory and profibrogenic mediators. **PLoS One**, v.8, n.7, 2013.
- BREM H.; TOMIC-CANIC, M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. **J Clin Invest.**, v.17, p.1219–22, 2007.
- BRUFANI, M.; et al. Novel locally active estrogens accelerate cutaneous wound healing. A preliminar study. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n.2, p. 543–556, 2009.
- CAMPBELL, L. et al. Estrogen promotes cutaneous wound healing via estrogen receptor β independent of its antiinflammatory activities. **Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 9, p. 1825–1833, 2010.
- CAO, C. et al. Genistein inhibits proliferation and functions of hypertrophic scar fibroblastos. **Burns**, v. 35, p.89 – 97, 2009.
- CHAN, H. et al. Potential and use of bacterial small RNAs to combat drug resistance: a systematic review. **Infect. Drug Resist.**, v.10, p.521-532, 2017.
- CHILDS, D.R.; MURTHY, A.S. Overview of wound healing and management. **Surgical Clinics of North America**, v.97, p.189-207, 2017.
- CHO, M. et al. Flavonoids promoting HaCaT migration: I. Hologram quantitative structure–activity relationships. **Phytomedicine**, v.21, p.560–569, 2014.
- COSKUN, A. et al. The effect of ovariectomy on the skin flap viability and myeloperoxidase levels. **Experimental Study**, v.115, n., 12, p.766 – 770, 2014.
- DELAVARY, B.M. et al. Macrophages in skin injury and repair. **Immunobiology**, v.216, n.7, p.753-762, 2011.
- DOVI, J.V. et al. Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. **Journal of Leukocyte Biology**, v.73, n.4, p.448-455, 2003.
- DWIVEDI, D. et al. Evaluation of wound healing, anti-microbial and potential of *Pongamia pinnata* in wistar rats. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v.7, 79-85, 2017.
- EMMERSON, E et al. Unique and synergistic roles for 17β -estradiol and macrophage migration inhibitory factor during cutaneous wound closure are cell type specific. **Endocrinology**, v. 150, n. 6, p. 2749–2757, 2009.
- EMMERSON, E. et al. Estrogen receptor-mediated signalling in female mice is locally activated in response to wounding. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 375, n. 1-2, p. 149–156, 2013.

EMMERSON, E. et al. The phytoestrogen genistein promotes wound healing by multiple independent mechanisms. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 321, n. 2, p. 184–193, 2010.

EO, H.H. et al. Effect of dietary genistein on diabetes induced hyper-inflammation and oxidative stress during early stage of wound healing in alloxan induced diabetic mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.478, p.1021-1027, 2016.

FÁBER, L. et al. Genistein Improves Skin Flap Viability in Rats: A Preliminary In Vivo and In Vitro Investigation. **Molecules**, v.23, n.1637, p.1-17, 2018.

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.1-15, 2022.

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, p.1-17, 2021.

FELIX, F.B. et al. Biochanin A attenuates zymosan-induced arthritis in mice similarly to 17- β estradiol: an alternative to hormone replacement therapy?. **Inflammation Research**, v.69, n.12, p.1245-1256, 2020.

GAJIC, I. et al. Electrospun Poly(lactide) Fibers as Carriers for Controlled Release of Biochanin A. **Pharmaceutics**, v.14, n.528, p.1-19, 2022.

GALAL, A.A.A. et al. Beneficial role of biochanin A on cutaneous and renal tissues of ovariectomized rats treated with anastrozole. **Life Sciences**, v.201, p.9–16, 2018.

GANTWERKER, E.A.; HOM, D.B. Skin: histology and physiology of wound healing. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v.19, p.441-453, 2011.

GILLIVER, S.C. et al. Sex dimorphism in wound healing: the roles of sex steroids and macrophage migration inhibitory factor. **Endocrinology**, v. 149, n. 11, p. 5747–5757, 2008.

GRADA, A. et al. Research Techniques Made Simple: Animal Models of Wound Healing. **Journal of Investigative Dermatology**, v.138, p.2095-2105, 2018.

GRAMBOW, E. et al. Experimental Models to Study Skin Wound Healing with a Focus on Angiogenesis. *Medical Sciences*, v.9, n.55, p. 1-19, 2021.

GUEST, J.F. et al. Health economic burden that wounds impose on the National Health Service in the UK. **BMJ Open**, v.5, 2015.

GURTNER, G.C. et al. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. 15, p. 314-321, 2008.

- HALL, G.; PHILLIPS, T.J. Estrogen and skin: The effects of estrogen, menopause, and hormone replacement therapy on the skin. **J. Am. Acad. Derm.**, v.53, p.555-568, 2005.
- HARDMAN, M. J. et al. Selective estrogen receptor modulators accelerate cutaneous wound healing in ovariectomized female mice. **Endocrinology**, v. 149, n. 2, p. 551–557, 2008.
- HESKETH, M. et al. Macrophage phenotypes regulate scar formation and chronic wound healing. **International Journal of Molecular Sciences**, v.18, p. 1-10, 2017.
- HEYER, K. et al. Epidemiology of chronic wounds in Germany: Analysis of statutory health insurance data. **Wound Repair Regen.**, v.24, p.434–442, 2016.
- HOFMANN, E. et al. Human In Vitro Skin Models for Wound Healing and Wound Healing Disorders. **Biomedicines**, v.11, p.1-19, 2023.
- HOLLMERUS, S. et al. Isoflavones-Based Liposome Formulations as Anti-Aging for Skincare. **Nov. Approaches Drug Des. Dev.**, v.3, p.555-615, 2018.
- HOOIJMANS, C. R. et al. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. **BMC Med Res Methodol**, v. 14, p. 43, 2014.
- HORNG, H.C. et al. Estrogen Effects on Wound Healing. **International Journal of Molecular Sciences**, v.18, p.1-14, 2017.
- HU, X. et al. Effects of four polyphenols on mouse wound healing and the gene expression profile of resveratrol action. **Histol. Histopathol.**, v.39, p.105-116, 2024.
- HU, X.S. et al. Biochanin A protect against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by regulating TLR4/NF-kappa B and PPAR-gamma pathway. **Microb. Pathog.**, v.138, 2020.
- HUH, J.E. et al. Formononetin accelerates wound repair by the regulation of early growth response factor-1 transcription factor through the phosphorylation of the ERK and p38 MAPK pathways. **International Immunopharmacology**, v.11, p.46–54, 2011.
- HUTCHINS, A.P. et al. The IL-10/STAT3 -mediated anti-inflammatory response: recent developments and future challenges. **Briefings in Functional Genomics**, v.12, p. 489-498, 2013.
- JURZAK, M. et al. Evaluation of genistein ability to modulate CTGF mRNA/protein expression, genes expression of TGF- β isoforms and expression of selected genes regulating cell cycle in keloid fibroblasts *in vitro*. **Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research**, v.71, n.6 p.972-986, 2014.
- KALAYCIYAN, A. et al. Nicotine and biochanin A, but not cigarette smoke, induce anti-inflammatory effects on keratinocytes and endothelial cells in patients with Behcet's disease. **J. Investig. Dermatol.**, v.127, p.81–89, 2007.

- KENYON, C.J. The genetics of ageing. **Nature**, v.464, p.504–512, 2010.
- KOLE, L. et al. Biochanin-A, an isoflavon, showed anti-proliferative and anti-inflammatory activities through the inhibition of iNOS expression, p38-MAPK and ATF-2 phosphorylation and blocking NFκB nuclear translocation. **European journal of pharmacology**, v.653, n.3, p.8-15, 2011.
- KORTING, H.C. et al. Management of minor acute cutaneous wounds: Importance of wound healing in a moist environment. **J Eur Acad Dermatol Venereol.**, v.25, p.130–137, 2011.
- KRAHN-BERTIL, E. et al. Expression of estrogen-related receptor beta (ERRβ) in human skin. **Eur J Dermatol**, v.20, p.719-723, 2010.
- KŘÍŽOVÁ, L. et al. Isoflavones. **Molecules**, v.24, p.1-28, 2019.
- KUIPER, G.G.J.M. et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β. **Endocrinology**, v.139, p.4252–63, 1998.
- LAROUCHE, J. et al. Immune Regulation of Skin Wound Healing: Mechanisms and Novel Therapeutic Targets. **Advances in wound care**, v.7, n.7, p.209-231, 2018.
- LEPHART, E.D. Cannabidiol (CBD) with 4',7-Isoflavandiol (Equol) Efficacy is Greater than CBD or Equol Treatment Alone via Human Skin Gene Expression Analysis. **Front. Biosci.**, v.28, n.7, p.1-13, 2023.
- LI, S. et al. Puerarin improves diabetic wound healing via regulation of macrophage M2 polarization phenotype. **Burns Trauma**, v.22, 2022.
- LIECHTY, K.W. et al. Fetal wound repair results in scar formation in interleukin-10-deficient mice in a syngeneic murine model of scarless fetal wound repair. **Journal of Pediatric Surgery**, v.35, n.6, p.866-872, 2000.
- LIM, T.G. et al. MLK3 is a direct target of biochanin A, which plays a role in solar UV-induced COX-2 expression in human keratinocytes. **Biochem. Pharmacol.**, v.86, p.896–903, 2013.
- LUCKETT-CHASTAIN, L.R.; GALLUCCI, R.M. Interleukin (IL)-6 modulates transforming growth factor-β expression in skin and dermal fibroblasts from IL-6-deficient mice. **Br. J. Dermatol.**, v. 161, p.237–248, 2009.
- MAMUN, A.A. et al. Recent advances in molecular mechanisms of skin wound healing and its treatments. **Front Immunol.**, v.15, p.1-29, 2024.
- MANZOUREH, R.; FARAHPOUR, M.R. Topical administration of hydroethanolic extract of *Trifolium pratense* (red clover) accelerates wound healing by apoptosis and re-epithelialization, **Biotechnic & Histochemistry**, p.1-11, 2020.
- MARINI, H. et al. A. Genistein aglycone improves skin repair in a incisional model of wound healing: a comparison with raloxifene and oestradiol in ovariectomized rats. **British Journal of Pharmacology**, v.160, p.1185–1194, 2010.

- MASSON-MEYERS, D.S. et al. Experimental models and methods for cutaneous wound healing assessment. **Int J Exp Pathol.**, v.101, p.21-37, 2010.
- MING, X. et al. Biochanin A inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in human umbilical vein endothelial cells. **Life Sci.**, v.136, p.36–41, 2015.
- MIRZA, R.E.; KOH, T.J. Contributions of cell subsets to cytokine production during normal and impaired wound healing. **Cytokine**, v. 71, p. 409-412, 2015.
- MOHTADI M. E. et al. Estrogen deficiency - a central paradigm in age-related impaired healing?. **EXCLI J.**, v.20, p.99-116, 2021.
- MOLINA, L. et al. Possible role of phytoestrogens in breast cancer via GPER-1/GPR30 signaling. **Clin. Sci.**, v.132, p.2583–2598, 2018.
- MORAES, A.B. et al. The effects of topical isoflavones on postmenopausal skin: double-blind and randomized clinical trial of efficacy. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v.146, n.2, p.188-192, 2009.
- MUKAI, K. et al. 17 β -Estradiol administration promotes delayed cutaneous wound healing in 40-week ovariectomized female mice. **International Wound Journal**, p. 1-9, 2014.
- MUKAI, K. et al. Evaluation of effects of topical estradiol benzoate application on cutaneous wound healing in ovariectomized female mice. **PLoS ONE**, v.11, 2016.
- MUKAI, K. et al. The effect of isoflavone-daidzein oral medication on cutaneous wound healing in female ovariectomized mice. **J-stage**, v.10, n.2, 2012.
- NGUYEN, L.T.H. et al. Puerarin Improves Dexamethasone-Impaired Wound Healing *In Vitro* and *In Vivo* by Enhancing Keratinocyte Proliferation and Migration. **Appl. Sci.**, v.11, n.9343, p.1-15, 2021.
- NOSENKO, M.A. et al. Proinflammatory cytokines and skin wound healing in mice. **Molecular Biology**, v.53, n.5, p.653-664, 2019.
- OISHI, Y. et al. Molecular basis of the alteration in skin collagen metabolism in response to in vivo dexamethasone treatment: effects on the synthesis of collagen type I and III, collagenase, and tissue inhibitors of metalloproteinases. **British Journal of Dermatology**, v.147, p. 859–868, 2002.
- OSENI, T. et al. Selective estrogen receptor modulators and phytoestrogens. **Planta Med.**, v.74, p.1656–1665, 2008.
- PAN, X. et al. Biochanin A ameliorates caerulein-induced acute pancreatitis and associated intestinal injury in mice by inhibiting TLR4 signaling. **J. Nutr. Biochem.**, v.113, 2022.
- PARK, E. et al. Effects of genistein on early-stage cutaneous wound healing. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.410, p.514–519, 2011.

PENG, X. et al. Genistein, a Soybean Isoflavone, Promotes Wound Healing by Enhancing Endothelial Progenitor Cell Mobilization in Rats with Hemorrhagic Shock. **Adv. Biology**, v. 7, p.1-12, 2023.

PERANTEAU, W.H. et al. IL-10 overexpression decreases inflammatory mediators and promotes regenerative healing in an adult model of scar formation. **Journal of Investigative Dermatology**, v.128, n.7, p.1852-1860, 2008.

PERŽELOVÁ, V. et al. Pharmacological activation of estrogen receptors- α and - β differentially modulates keratinocyte differentiation with functional impact on wound healing. **International Journal of Molecular Medicine**, v.37, p.21-28, 2016.

PHILLIPSON, M.; KUBES, P. The healing power of neutrophils. **Trends in Immunology**, v.40, n.7, p.635-647, 2019.

QING, C. The molecular biology in wound healing & non-healing wound. **Chinese Journal of Traumatology**, v.20, p.189-193, 2017.

RAMSEY, D.T. et al. Effects of three occlusive dressing materials on healing of full-thickness skin wound in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n.7, p. 941-949, 1995.

RENDA, G. et al. Comparative assessment of dermal wound healing potentials of various *Trifolium L.* extracts and determination of their isoflavone contents as potential active ingredients. **Journal of Ethnopharmacology**, v.148, p.423-432, 2013.

RIBEIRO, V.P. et al. Brazilian medicinal plants with corroborated antiinflammatory activities: a review. **Pharmaceutical Biology**, v.56, n.1, p.253-268, 2018.

ROUTLEY, C.E.; ASHCROFT, G.S. Effect of estrogen and progesterone on macrophage activation during wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v.17, n. 1, p. 42–50, 2009.

SAMI, D.G. et al. Wound healing models: A systematic review of animal and non-animal models. **Wound Medicine**, v.24, p.8–17, 2019.

SARFRAZ, A. et al. Biochanin A: A novel bioactive multifunctional compound from nature. Elsevier B.V. **Science of the Total Environment**, p. 1-12, 2020.

SATOH, Y. et al. ERK2 dependent signaling contributes to wound healing after a partial-thickness burn. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.381, p.118–122, 2009.

SAXTON, R.A. et al. Structure-based decoupling of the pro- and anti-inflammatory functions of interleukin-10. **Science**, v.19, p.1-22, 2021.

SEO, G.Y. et al. The Protective Effect of Glycitin on UV-induced Skin Photoaging in Human Primary Dermal Fibroblast. **J Korean Soc Appl Biol Chem**, v.57, n.4, p.463–468, 2014.

SERRA, M.B. et al. From inflammation to current and alternative therapies involved in wound healing. **International Journal of Inflammation**, v. 2017, p.1-17, 2017.

SHAH, J.B. The history of wound care. **Journal of the American College of Certified Wound Specialists**, v.3, n.3, p.65-66, 2011.

SHORT, W.D. et al. Endogenous Interleukin-10 Contributes to Wound Healing and Regulates Tissue Repair. **J Surg Res.**, v.85, p.26-34, 2023.

SIERSBAEK, R. et al. IL6/STAT3 Signaling Hijacks Estrogen Receptor α Enhancers to Drive Breast Cancer Metastasis. **Cancer Cell.**, v.38, p.412-423, 2020.

SILVA, J.A.T. Negative results: negative perceptions limit their potential for increasing reproducibility. **Journal of Negative Results in BioMedicine**, v. 14, n. 12, 2015.

SLOMINSKI, A.T.; ZMIJEWSKI, M.A. Glucocorticoids Inhibit Wound Healing: Novel Mechanism of Action. **J. Investig. Dermatol.**, v.137, p.1012–1014, 2017.

STEVENSON, S.; THORNTON, J. Effect of estrogens on skin aging and the potential role of SERMs. **Clin. Interv. Aging**, v.2, p.283–297, 2007.

SUN, S. et al. Silk protein/polyvinylpyrrolidone nanofiber membranes loaded with puerarin accelerate wound healing in mice by reducing the inflammatory response. **Biomaterials Advances**, v.135, p.1-13, 2022.

SUNDARESAN, A. et al. Biological Activity of Biochanin A: A Review. **Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.4, n.1, p.1-5, 2018.

TANWAR, A.K. et al. Engagement of phytoestrogens in breast cancer suppression: Structural classification and mechanistic approach. **Eur. J. Med. Chem.**, v.213, p.1130-1037, 2021.

THORNTON, M. J. et al. Estrogens and aging skin. **Dermato-Endocrinology**, v.5, p.264–270, 2013.

TIE, L. et al. Genistein accelerates refractory wound healing by suppressing superoxide and FoxO1/iNOS pathway in type 1 diabetes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.24, p.88–96, 2013.

TURER, A.; ONGER, M.E. The effect of oral puerarin administration on wound healing in diabetic rat model. **Annals of Medical Research**, v.25, p.536-539, 2018.

VEITH, A.P.; HENDERSON, K.; SPENCER, A.; SLIAR, A.D.; BAKER, A.B. Therapeutic strategies for enhancing angiogenesis in wound healing. **Advanced Drug Delivery Reviews**, p.1-28, 2019.

VELNAR, T. et al. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. **Journal of International Medical Research**, v.37, n.5, p. 1528–1542, 2009.

VITALE, D.C. et al. Isoflavones: Estrogenic activity, biological effect and bioavailability. **Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.**, v.38, p.15–25, 2013.

WALVEKAR, K.P. et al. Biochanin A Ameliorates Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice by Modulating the NF- κ B and MAPK Signaling Pathways. **Inflammation**, v.48, p.1125-1142, 2025.

WANG, N. et al. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1–M2 polarization balance. **Frontiers in Immunology**, v.5, n.614, p.1-9, 2014.

WILKINSON, H.N.; HARDMAN, M.J. The role of estrogen in cutaneous ageing and repair. **Maturitas**, v.103, p.60-64, 2017.

XU LANDÉN, N. et al. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.73, p.3861-3885, 2016.

YAMASAKI, D. et al. Effects of ovariectomy and estrogen replacement therapy on arthritis and bone mineral density in rats with collagen-induced arthritis. **Bone**, v.28, p.634-640, 2001.

YAN, J. et al. Biochanin A from Chinese Medicine: An Isoflavone with Diverse Pharmacological Properties. **Am J Chin Med.**, v.49, p.1623-1643, 2021.

YU, C. et al. Perspectives regarding the role of biochanin A in humans. **Front. Pharmacol.**, v.10, p.793, 2019.

ZHANG, S. et al. Biochanin A alleviates gingival inflammation and alveolar bone loss in rats with experimental periodontitis. **Exp. Ther. Med.**, v.20, p.1-9, 2020.

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

ZHOU, T. et al. Estrogen accelerates cutaneous wound healing by promoting proliferation of epidermal keratinocytes via Erk/Akt signaling pathway. **Cell. Physiol. Biochem.** V.38, p.959–968, 2016.

ZOMER, H.D.; COOKE, P.S. Targeting estrogen signaling and biosynthesis for aged skin repair. **Front Physiol.**, v.31, 2023.

APÊNDICE I



PROCFIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Título do trabalho:



FITOSTRÓGENOS NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS: REVISÃO SISTEMÁTICA E ESTUDO EXPERIMENTAL COM A BIOCHANINA A

Discente: Wermerson de Santana Neres
Orientador: Profª. Drª. Renata Grespan

<http://www.ufs.br/procfis>

OBJETIVOS

Realizar uma revisão sistemática com ênfase no mecanismo de ação cicatrizante dos fitoestrógenos em modelos pré-clínicos, bem como um estudo experimental do efeito da BCA em camundongas ovariectomizadas.

<http://www.ufs.br/procfis>

INTRODUÇÃO

A cicatrização de feridas pode ser prejudicada devido à inflamação exacerbada. Nesse sentido, os fitoestrógenos são alternativas promissoras em virtude dos efeitos cicatrizantes. No entanto, não existem evidências científicas compiladas dos mecanismos de ação dos fitoestrógenos no reparo tecidual. Ademais, o fitoestrógeno Biochanina A (BCA) não tem seu efeito cicatrizante ainda bem caracterizado em lesões hipoestrogênicas.

<http://www.ufs.br/procfis>

METODOLOGIA

Para a revisão sistemática foi realizada a busca, triagem, elegibilidade e inclusão de estudos, seguida da extração e análise dos dados.

Para avaliar o efeito cicatrizante da BCA, feridas induzidas em camundongas ovariectomizadas ou simuladas foram tratadas com salina e estrógeno (controles) ou BCA 0,03mg, 0,09mg e 0,27mg. Foram analisados o tamanho da ferida, a atividade de mieloperoxidase, a quantidade de citocinas e os parâmetros histológicos das lesões.

<http://www.ufs.br/procfis>

RESULTADOS

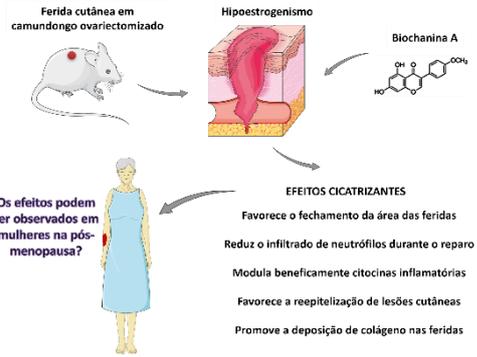


Os mecanismos de ação de destaque foram a via clássica mediada pelos receptores estrogênicos e as vias alternativas envolvendo o TNF- α /NF- κ B, Nrf2, PI3K/AKT e ERK

<http://www.ufs.br/procfis>

RESULTADOS

Efeito da Biochanina A na cicatrização de feridas cutâneas hipoestrogênicas



<http://www.ufs.br/procfis>



PROCFIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS



CONCLUSÃO

Os fitoestrógenos podem atuar no reparo de feridas em modelos pré-clínicos mediante a sinalização estrogênica ou por meio de vias independentes. O fitoestrógeno BCA possui efeito no reparo das lesões hipoestrogênicas com ênfase na fase inflamatória

<http://www.ufs.br/procfis>

APÊNDICE II

| Número | Referências dos estudos selecionados para a revisão sistemática |
|--------|---|
| 1 | BORAWSKA, M.H. et al. Cell Viability of Normal Human Skin Fibroblast and Fibroblasts Derived from Granulation Tissue: Effects of Nutraceuticals. Journal of Medicinal Food , v.12, n. 2, p. 429–434, 2009. |
| 2 | CAO, C. et al. Genistein inhibits proliferation and functions of hypertrophic scar fibroblasts. Burns , v. 35, p.89 – 97, 2009. |
| 3 | EMMERSON, E. et al. The phytoestrogen genistein promotes wound healing by multiple independent mechanisms. Molecular and Cellular Endocrinology , v. 321, n. 2, p. 184–193, 2010. |
| 4 | MARINI, H. et al. Genistein aglycone improves skin repair in a incisional model of wound healing: a comparison with raloxifene and oestradiol in ovariectomized rats. British Journal of Pharmacology , v.160, p.1185–1194, 2010. |
| 5 | HUH, J.E. et al. Formononetin accelerates wound repair by the regulation of early growth response factor-1 transcription factor through the phosphorylation of the ERK and p38 MAPK pathways. International Immunopharmacology , v.11, p.46–54, 2011. |
| 6 | PARK, E. et al. Effects of genistein on early-stage cutaneous wound healing. Biochemical and Biophysical Research Communications , v.410, p.514–519, 2011. |
| 7 | MUKAI, K. et al. The effect of isoflavone-daidzein oral medication on cutaneous wound healing in female ovariectomized mice. J-stage , v.10, n.2, 2012. |
| 8 | CHO, M. et al. Flavonoids promoting HaCaT migration: I. Hologram quantitative structure–activity relationships. Phytomedicine , v.21, p.560–569, 2014. |
| 9 | TIE, L. et al. Genistein accelerates refractory wound healing by suppressing superoxide and FoxO1/iNOS pathway in type 1 diabetes. Journal of Nutritional Biochemistry , v.24, p.88–96, 2013. |
| 10 | JURZAK, M. et al. Evaluation of genistein ability to modulate CTGF mRNA/protein expression, genes expression of TGF- β isoforms and expression of selected genes regulating cell cycle in keloid fibroblasts <i>in vitro</i> . Acta Poloniae Pharmaceutica- Drug Research , v.71, n.6 p.972-986, 2014. |
| 11 | EO, H.H. et al. Effect of dietary genistein on diabetes induced hyper-inflammation and oxidative stress during early stage of wound healing in alloxan induced diabetic mice. Biochemical and Biophysical Research Communications , v.478, p.1021-1027, 2016. |
| 12 | FÁBER, L. et al. Genistein Improves Skin Flap Viability in Rats: A Preliminary In Vivo and In Vitro Investigation. Molecules , v.23, n.1637, p.1-17, 2018. |
| 13 | TURER, A.; ONGER, M.E. The effect of oral puerarin administration on wound healing in diabetic rat model. Annals of Medical Research , v.25, p.536-539, 2018. |
| 14 | NGUYEN, L.T.H. et al. Puerarin Improves Dexamethasone-Impaired Wound Healing <i>In Vitro</i> and <i>In Vivo</i> by Enhancing Keratinocyte Proliferation and Migration. Appl. Sci. , v.11, n.9343, p.1-15, 2021. |
| 15 | GAJIC, I. et al. Electrospun Poly(lactide) Fibers as Carriers for Controlled Release of Biochanin A. Pharmaceutics , v.14, n.528, p.1-19, 2022. |
| 16 | SUN, S. et al. Silk protein/polyvinylpyrrolidone nanofiber membranes loaded with puerarin accelerate wound healing in mice by reducing the inflammatory response. Biomaterials Advances , v.135, p.1-13, 2022. |
| 17 | LEPHART, E.D. Cannabidiol (CBD) with 4',7-Isoflavandiol (Equol) Efficacy is Greater than CBD or Equol Treatment Alone via Human Skin Gene Expression Analysis. Front. Biosci. , v.28, n.7, p.1-13, 2023. |
| 18 | PENG, X. et al. Genistein, a Soybean Isoflavone, Promotes Wound Healing by Enhancing Endothelial Progenitor Cell Mobilization in Rats with Hemorrhagic Shock. Adv. Biology , v. 7, p.1-12, 2023. |
| 19 | HU, X. et al. Effects of four polyphenols on mouse wound healing and the gene expression profile of resveratrol action. Histol. Histopathol. , v.39, p.105-116, 2024. |

ANEXO I



Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITO DA BIOCHANINA A NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EXCISIONAIS EM CAMUNDONGOS OVARIECTOMIZADOS", protocolada sob o CEUA nº 5731050520 (00 000315), sob a responsabilidade de **Renata Grespan** e equipe: **Wemerson de Santana Neres ; Jéssica Maria Dantas Araujo; Enilton Aparecido Camargo; Luiz Felipe Lobo Mascarenhas Fratel de Araújo; Marcel Rosa de Sales; Gabriela Oliveira Reis** - 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 13/05/2021.

We certify that the proposal "Effect of Biochanin on the healing of excisional wounds in ovariectomized mice", utilizing 405 Heterogenics mice (405 females), protocol number CEUA 5731050520 (00 000315), under the responsibility of **Renata Grespan** and team; **Wemerson de Santana Neres ; Jéssica Maria Dantas Araujo; Enilton Aparecido Camargo; Luiz Felipe Lobo Mascarenhas Fratel de Araújo; Marcel Rosa de Sales; Gabriela Oliveira Reis** - 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 05/13/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **08/2020** a **08/2021** Área: **Farmacologia**

Origem: **Biotério da Universidade Federal de Sergipe**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Fêmeas**

Idade: **8 a 12 semanas**

N: **405**

Linhagem: **Swiss albino**

Peso: **25 a 30 g**

Local do experimento: **Laboratório de Farmacologia do Processo Inflamatório**

São Cristóvão, 01 de junho de 2021

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

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