

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

EFEITOS DO MENTOL NO TECIDO HEPÁTICO DE RATOS
WISTAR COM DIABETES DO TIPO 1, INDUZIDO POR
ESTREPTOZOTOCINA

ANA JÚLIA VIEIRA

PROFA. DRA. ARIANE LEITE ROZZA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, como
requisito para obtenção do título de Doutora
no Programa de Pós-Graduação em Biologia
Geral e Aplicada, Área de concentração
Biomoléculas: Estrutura e Função.

Orientadora: Arianne Leite Rozza

BOTUCATU – SP
2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA ANDRADE CRUZ E SANTOS-CRB

Vieira, Ana Júlia.

Efeitos do mentol no tecido hepático de ratos Wistar com diabetes do tipo 1 induzido por estreptozotocina / Ana Júlia Vieira. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Ariane Leite Rozza

Capes: 20100000

1. Diabetes Mellitus Tipo 1. 2. Estresse oxidativo. 3. Fígado. 4. Inflamação. 5. Mentol.

Palavras-chave: Diabetes tipo 1; Estresse oxidativo; Fígado; Inflamação; Mentol.

EPÍGRAFE

*From sprinkler splashes to fireplace ashes
I gave my blood, sweat, and tears for this
I hosted parties and starved my body
Like I'd be saved by a perfect kiss
The jokes weren't funny, I took the money
My friends from home don't know what to say
I looked around in a blood-soaked gown
And I saw something they can't take away
'Cause there were pages turned with the bridges burned
Everything you lose is a step you take
So make the friendship bracelets
Take the moment and taste it
You've got no reason to be afraid*

Taylor Swift – You're on Your Own, Kid

DEDICATÓRIA

Essa tese de doutorado é dedicada aos meus pais, Ana e Gilberto, ao meu irmão, Juninho, à minha tia Creusa e à minha vó Maria, que tinha dó dos ratinhos e nos deixou em 2021.

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo aos meus pais, Ana e Gilberto, ao meu irmão, Juninho, a minha tia Creusa e a minha prima Monize, que durante todo o período conturbado do doutorado estavam sempre me apoiando e servindo de alicerce quando tudo desmoronava e quando aconteciam as pequenas vitórias, estavam comemorando muito,

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Arianne Leite Rozza, que desde que a conheço exerce um papel de inspiração para várias pessoas, inclusive a mim, e é um exemplo de pessoa cuidadosa, carinhosa e de atenção. Nós sabemos o que passamos e eu sempre serei muito grata a você por tudo, principalmente por sua amizade e sua família,

Aos membros da banca do exame de qualificação Dr. Luis Fernando Barbisan, Dr. José Roberto Bosqueiro, Dra. Cibele dos Santos Borges, Dra. Maeli Dal Pai e Dr. Carlos Alan Candido Dias Junior pela disponibilidade e pelas contribuições valiosas,

Aos membros suplentes e titulares da banca da defesa da tese de doutorado Dra. Adriana Camargo Ferrasi, Dra. Clelia Akiko Hiruma Lima, Dr. Luis Fernando Barbisan, Dr. Ricardo de Lima Zollner, Dra. Ana Carolina Inhasz Kiss, Dr. Everardo Magalhães Carneiro e Dra. Heloisa Aparecida Barbosa da Silva Pereira por aceitarem a contribuir com este trabalho,

Ao professor Dr. José Roberto Bosqueiro por disponibilizar seu laboratório para realizar os ensaios de glicogênio hepático, e ao seu aluno Dr. Aislan Quintiliano Delgado, que é o melhor amigo da área acadêmica que eu poderia ter,

A professora Dra. Clelia Akiko Hiruma Lima e seu aluno Felipe Fagundes por nos disponibilizar tempo e o laboratório para os ensaios de MPO e MDA,

Um agradecimento especial ao meu psiquiatra, Dr. Jansen Micheletto Furlan e a minha psicóloga, Audrey de Assis, pois sem eles esse doutorado não seria possível,

Ao grupinho mais improvável de amigas, Mayzinha, Xovana, Sil e Naná, a amizade e o amor de vocês significam muito para mim,

Aos meus amigos de perto Sabor, Limão, Angie, Canarinho, Ricardo, Cuíca, Matinho, Yara, Bárbara, Sarah, Pablo, Paulo, Welen, Carol, que fazem da vida melhor e mais divertida,

As minhas amigas de quase 10 anos que moram longe, Gabi, Isa e Kah, que mesmo à distância, sempre estão presentes nos melhores e piores momentos, dividindo angústias, comemorando conquistas, propiciando entretenimento de qualidade,

Aos colegas de laboratório que fizeram muito para esse doutorado acontecer,

Aos professores, alunos e funcionários do Setor da Morfologia, em especial ao Ricardo, por sempre estarem dispostos a ajudar,

A CAPES, pelo suporte financeiro durante todo período do doutorado,

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada,

E ao Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, é uma honra fazer parte dessa universidade!

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 PÂNCREAS	12
1.2 INSULINA	12
1.3 FÍGADO	14
14. <i>DIABETES MELLITUS</i>	15
1.5 MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES DO TIPO 1 COM ESTREPTOZOTOCINA	17
1.6 TRATAMENTOS CONVENCIONAIS	18
1.7 MENTOL.....	19
 2. OBJETIVOS	 22
 3. MATERIAL E MÉTODOS.....	 23
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	23
3.2 INDUÇÃO DO DIABETES.....	23
3.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	23
3.4 TRATAMENTO ORAL.....	24
3.5 TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA A GLICOSE (OGTT)	24
3.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA	24
3.7 NÍVEIS DE GLICOGÊNIO HEPÁTICO	25
3.8 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....	25
3.9 ESTRESSE OXIDATIVO.....	25
3.9.1 NÍVEIS DE MALONDIALDEIDO (MDA)	26
3.9.2 ATIVIDADE DA MELOPEROXIDASE (MPO).....	26
3.9.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	26
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
 4. RESULTADOS	 28
4.1 MASSA CORPORAL, CONSUMO DE ÁGUA E RAÇÃO.....	28
4.2 GLICEMIA EM DESJEJUM.....	29
4.3 OGTT.....	30
4.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA	33
4.5 GLICOGÊNIO HEPÁTICO.....	36
4.6 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....	37
4.7 ESTRESSE OXIDATIVO.....	38
4.7.1 NÍVEIS DE MDA	38
4.7.2 ATIVIDADE DA MPO	39
4.7.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	40
 5. DISCUSSÃO	 42
 6. CONCLUSÃO.....	 46
 7. RESUMO GRÁFICO.....	 47

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
9. APÊNDICES	57

RESUMO

O diabetes mellitus é uma doença crônica caracterizada pela hiperglicemia, a qual pode ser resultante de falhas na produção da insulina ou resistência a esse hormônio, ou ambos. Produtos naturais, com atividade hipoglicemiante, são alvos de estudos para o tratamento do diabetes. O mentol possui efeitos biológicos como, gastroprotetor, cicatrizante e antidiabetogênico em modelo de diabetes tipo 2 já descritos na literatura. O objetivo deste trabalho foi avaliar se o tratamento com o mentol após 28 dias exerceria efeito hipoglicemiante em ratos com diabetes tipo 1, induzido por estreptozotocina e seus efeitos no tecido hepático, por meio de ensaios de histológicos e bioquímicos. O diabetes foi induzido através de injeção intraperitoneal de estreptozotocina (45 mg/kg) em ratos Wistar machos (250 – 300 g). A glicemia foi aferida em amostras de sangue da veia caudal dos ratos utilizando glicosímetro, aqueles que tiveram a glicemia acima de 200 mg/dL foram considerados diabéticos e divididos em três grupos (n=10): normoglicêmico + veículo, hiperglicêmico + veículo, hiperglicêmico + mentol (50 mg/kg). Os tratamentos foram administrados diariamente via gavagem por 28 dias. Nesse período, os animais tiveram a massa corporal, glicemia, consumo de ração e água monitorados. Os animais também foram submetidos ao OGTT. Após 28 dias, os animais foram eutanasiados por meio de aprofundamento anestésico e amostras de fígado e pâncreas foram coletadas para análises de histologia, quantificação de glicogênio hepático, atividade anti-inflamatória e estresse oxidativo. O tratamento com mentol não reestabeleceu os parâmetros de consumo de água e ração, nem diminuiu a glicemia de forma significativa durante 28 dias. No entanto, no tecido hepático, o tratamento com mentol diminuiu os níveis das citocinas inflamatórias TNF- α e IL-6 e aumentou os níveis de IL-10, uma citocina anti-inflamatória. Também aumentou a atividade das enzimas antioxidantes, SOD e CAT, aumentou a quantidade de GSH, que é uma proteína antioxidante, diminuiu a atividade da MPO, enzima inflamatória e oxidante e quantidade de MDA, que é um marcador de peroxidação lipídica. O mentol não possui efeito hipoglicemiante no modelo de diabetes tipo 1, induzido por estreptozotocina. Contudo, o mentol surtiu efeito antioxidante e anti-inflamatório no tecido hepático, que evidenciam seu efeito hepatoprotetor no modelo de diabetes tipo 1.

Palavras-chave: diabetes tipo 1, mentol, fígado, estresse oxidativo, inflamação.

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a chronic disease characterized by hyperglycemia, which may result from failures in insulin production or resistance to this hormone, or both. Natural products with hypoglycemic activity are targets of studies for the treatment of diabetes. Menthol has biological effects such as gastroprotective, skin wound healing and antidiabetogenic in a type 2 diabetes model already described in the literature. The aim of this work was to evaluate whether treatment with menthol after 28 days would have a hypoglycemic effect in rats with type 1 diabetes, induced by streptozotocin and its effects on hepatic tissue, through histological and biochemical assays. Diabetes was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (45 mg/kg) in male Wistar rats (250 – 300 g). Glycemia was measured in blood samples from the tail vein of the rats using a glucometer, those who had glycemia above 200 mg/dL were considered diabetic and divided into three groups (n=10): normoglycemic + vehicle, hyperglycemic + vehicle, hyperglycemic + menthol (50 mg/kg). Treatments were administered daily via gavage for 28 days. During this period, the animals had their body mass, blood glucose, food and water intake monitored. The animals were also submitted to OGTT. After 28 days, the animals were euthanized through anesthetic deepening and liver and pancreas samples were collected for histology analyses, quantification of hepatic glycogen, anti-inflammatory activity and oxidative stress. Treatment with menthol did not reestablish parameters of water and food intake, nor did it significantly decrease blood glucose during 28 days. However, in liver tissue, menthol treatment decreased levels of the inflammatory cytokines TNF- α and IL-6 and increased levels of IL-10, an anti-inflammatory cytokine. It also increased the activity of the antioxidant enzymes, SOD and CAT, increased the amount of GSH, which is an antioxidant protein, decreased the activity of MPO, an inflammatory and oxidant enzyme, and the amount of MDA, which is a marker of lipid peroxidation. Menthol has no hypoglycemic effect in the model of type 1 diabetes, induced by streptozotocin. However, menthol had an antioxidant and anti-inflammatory effect on liver tissue, which demonstrate its hepatoprotective effect in the model of type 1 diabetes.

Keywords: type 1 diabetes, menthol, liver, oxidative stress, inflammation.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

1.1. PÂNCREAS

O pâncreas é uma glândula localizada no abdômen que desempenha um papel crucial na digestão e regulação da glicemia. Ele é dividido em duas partes: exócrina e endócrina (Figura 1). Sendo que as células exócrinas, denominadas células acinosas, produzem enzimas digestivas (i.e., tripsina, lipase e amilase) que são liberadas no duodeno pelo duto pancreático, que vão auxiliar na digestão de alimentos (Atkinson et al., 2020). Enquanto a parte endócrina é composta pelas ilhotas pancreáticas, que possui as células α , produtoras de glucagon, as células δ , secretoras de somatostatina, células PP, secretoras do polipeptídeo pancreático, células ϵ , que secretam a grelina, e as células β , produtoras de insulina, que estão presentes em maior quantidade (revisado por Soetedjo et al., 2021).

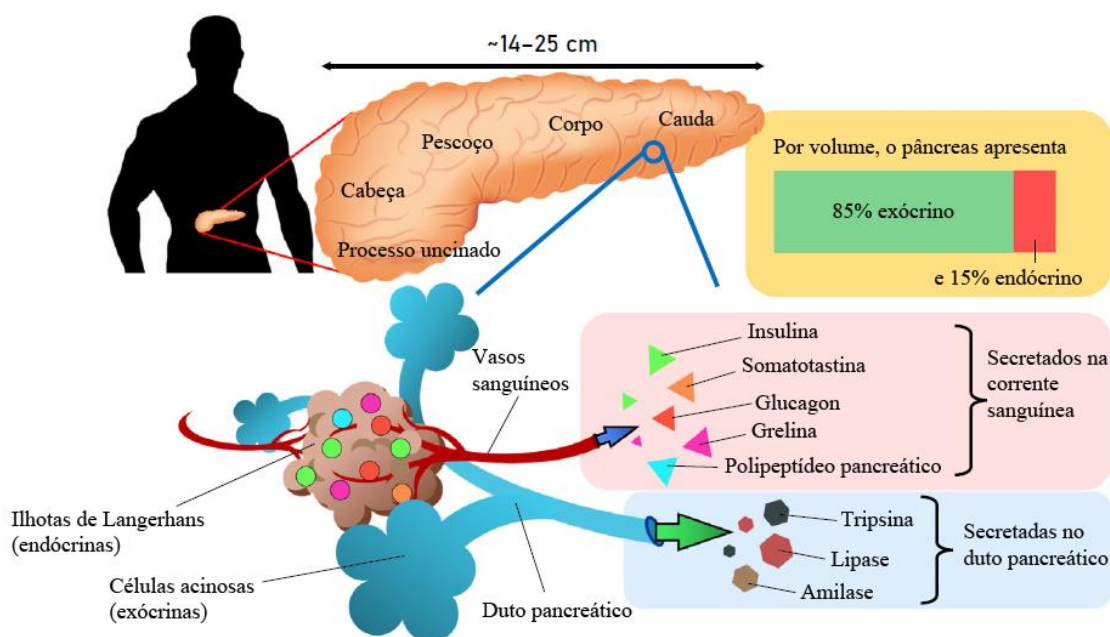


Figura 1: Ilustração esquemática do pâncreas (adaptado de Soetedjo et al., 2021)

1.2. INSULINA

A insulina, um hormônio proteico composto por 51 aminoácidos, é responsável pelo metabolismo da glicose no organismo. A descoberta da insulina aconteceu há cerca de 100 anos, realizada por Frederik G. Banting, Charles H. Best, John J. R. Macleod e James B. Collip, sendo um marco científico do século XX e rendendo em 1923 o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia para Banting e Macleod. O trabalho realizado por esses pesquisadores possibilitou que a insulina fosse purificada, isolada, caracterizada estruturalmente e sequenciada geneticamente, aprimorando continuamente o uso terapêutico da insulina (revisado por Lewis & Brubaker, 2021).

A secreção da insulina é um processo ordenado, para o qual a alta concentração de glicose extracelular é o principal estímulo (Fu et al., 2013). A glicose é transportada para o meio intracelular das células β -pancreáticas através do transportadores de membrana GLUT2, e então é metabolizada através da glicólise, que resulta na formação de ATP. Esta alta concentração intracelular de ATP inibe os canais de potássio sensíveis a ATP, causando a despolarização da membrana plasmática e a abertura de canais de cálcio. O influxo de cálcio estimula a exocitose das vesículas contendo insulina para a corrente sanguínea, onde serão direcionadas aos seus tecidos alvos: muscular, hepático e adiposo (Figura 2) (Newsholme & Krause, 2012).

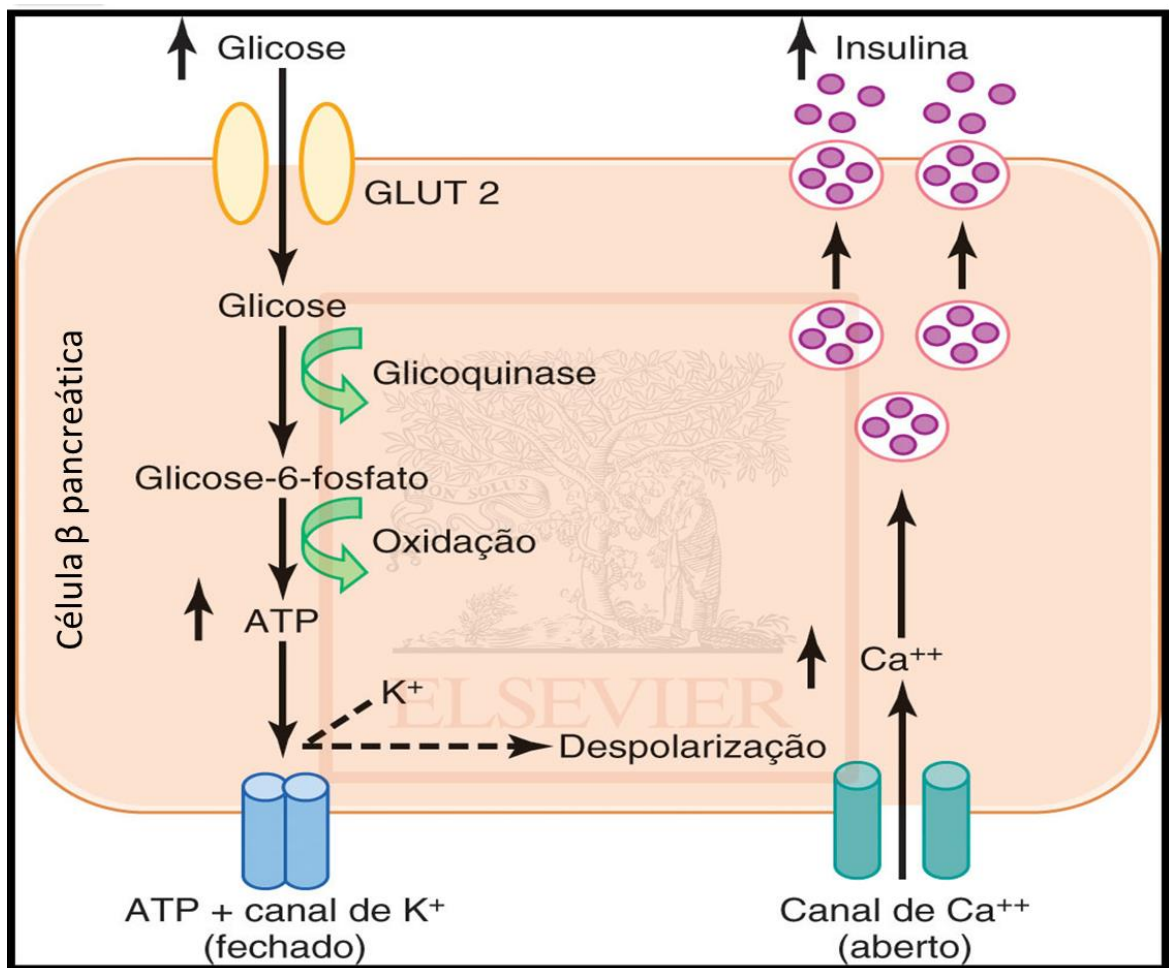


Figura 2: Mecanismo de secreção da insulina nas células β (retirada de Guyton, 1985).

1.3. FÍGADO

O fígado é o maior órgão glandular do corpo humano, localizado no quadrante superior direito da cavidade abdominal. É composto por quatro lobos: direito, esquerdo, caudado e quadrado. A organização anatômica do fígado é governada pela tríade hepática, que consiste na artéria hepática, veia porta e ducto biliar. Essas estruturas são essenciais para manter o extenso suprimento vascular do fígado e o processo de excreção da bile (Trefts et al., 2017, Standring, 2016).

O fígado recebe um suprimento sanguíneo duplo: a artéria hepática, que fornece sangue oxigenado, e a veia porta, que fornece sangue rico em nutrientes do trato gastrointestinal. Os capilares sinusóides hepáticos, com o seu endotélio

fenestrado, desempenham um papel vital na filtração e processamento desse sangue, permitindo que o fígado desempenhe suas funções metabólicas com eficiência (Trefts et al., 2017).

A unidade funcional do fígado é o lóbulo hepático, uma estrutura hexagonal composta por hepatócitos dispostos em torno de uma veia central. O lóbulo clássico e o lóbulo portal são dois modelos arquitetônicos principais que auxiliam na compreensão da complexa organização do fígado. A distribuição dos sinusóides hepáticos e tríades portais dentro desses lóbulos contribui para a microcirculação altamente organizada do fígado. Os hepatócitos desempenham diversas funções metabólicas, como armazenamento de glicogênio, gliconeogênese e metabolismo lipídico. Além dos hepatócitos, outros tipos importantes de células hepáticas incluem células de Kupffer, células estreladas e células endoteliais, cada uma contribuindo para funções e homeostase específicas do fígado (Trefts et al., 2017).

O fígado desempenha um papel crucial na manutenção do equilíbrio metabólico. É responsável pelo metabolismo dos carboidratos, incluindo o armazenamento de glicogênio e gliconeogênese, e pelo metabolismo lipídico, englobando a lipogênese e a lipólise. O metabolismo de proteínas, como o metabolismo de aminoácidos e a síntese de ureia, também é orquestrado principalmente pelo fígado (Hijmans et al., 2014, Rui, 2014).

1.4. DIABETES MELLITUS

O *diabetes mellitus* é uma doença crônica, que está compreendida numa série de doenças metabólicas, como hipertensão, resistência insulínica, obesidade, dislipidemia (Xu et al., 2021). O diabetes é caracterizado pelo estado hiperglicêmico crônico, que pode ser resultante da ausência parcial ou total da produção e secreção de insulina pelas células β pancreáticas e/ou resistência do organismo na ação desse hormônio.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2022), houve aumento considerável no número de pessoas com diabetes dos anos 1980 até 2014, de 108 milhões de pessoas para 422 milhões de pessoas. Sendo que a sua prevalência tem crescido mais rapidamente em países de baixa e média renda do que em países

ricos. Além disso, a mortalidade por idade, causada pelo diabetes, aumentou 3% entre os anos 2000 e 2019.

A Federação Internacional do Diabetes estima que, atualmente, 537 milhões de indivíduos adultos convivam com o diabetes e projeta que em 2045 mais de 780 milhões de pessoas serão acometidas pelo diabetes mellitus. Dados de 2021 revelaram que o Brasil é o sexto país com maior número de pessoas diabéticas no mundo, com cerca de 15 milhões de pessoas. Sendo os três países com mais pessoas diabéticas são a China, a Índia e o Paquistão (IDF Diabetes Atlas, 2021).

O *diabetes mellitus* é usualmente dividido em dois tipos, 1 e 2. O diabetes tipo 1 ocorre em consequência do ataque das células T do sistema imunológico às células β pancreáticas, que produzem e secretam a insulina. As células T se infiltram nas ilhotas pancreáticas, que compreendem a parte endócrina do pâncreas e levam as células β à apoptose, resultando na ausência da produção e secreção de insulina e, conseqüentemente, na hiperglicemia (Henriksson et al., 2016). Atualmente, cerca de 9 milhões de pessoas são portadoras diabetes tipo 1 no mundo (IDF Atlas Reports, 2022). Os sintomas comuns do diabetes tipo 1 são polidipsia, que é a sede excessiva, poliúria, que é aumento na quantidade de urina, e perda de peso, que podem ser diagnosticados tardiamente ou até mesmo passarem despercebidos. O tratamento consiste na aplicação diária de insulina, monitoramento dos níveis glicêmicos e educação acerca da doença, que podem protelar e prevenir as complicações que o diabetes causa (IDF Diabetes Atlas, 2021).

O diabetes tipo 2 é caracterizado pela falha das células β na produção e secreção da insulina acompanhada da resistência a este hormônio nos tecidos alvos, o que impedem que a glicose seja metabolizada de forma adequada pelo organismo, resultando na hiperglicemia. Os fatores de risco para o desenvolvimento do diabetes tipo 2 são: idade, histórico familiar, condição genética. Além disso, o estilo de vida não saudável, como alimentação inadequada, sedentarismo, tabagismo e obesidade aumentam os fatores de risco, uma vez que o acúmulo de gordura nos tecidos hepático e muscular prejudicam a captação de glicose mediada pela insulina. Portadores do tipo 2 normalmente precisam da

administração de medicamentos hipoglicemiantes para controlarem seus níveis glicêmicos e, devido à progressão da doença, o uso de insulina também se faz necessário em alguns casos (DeFronzo, 2004, Thomas & Philipson, 2015, Volpe et al., 2018).

1.5. MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES TIPO 1 COM ESTREPTOZOTOCINA

Os modelos animais desempenham um papel crucial na pesquisa pré-clínica quando o acesso direto ao objeto de estudo não é viável. Esses organismos vivos, que se assemelham a certos aspectos dos humanos, permitem que os pesquisadores investiguem fenômenos que não podem ser estudados diretamente nos humanos. Embora os modelos animais ofereçam informações valiosas sobre doenças, sua capacidade de prever com precisão os resultados humanos permanece limitada. Uma porcentagem significativa de novos medicamentos que passam nos estudos pré-clínicos falha nas fases clínicas, questionando a eficácia desses modelos como substitutos diretos para testes em humanos. No entanto, estudos em animais servem como ferramentas indispensáveis para gerar hipóteses que podem ser posteriormente testadas em seres humanos (Gashemi & Jeddi, 2023).

Ratos e camundongos têm sido utilizados como modelo de estudo em ensaios pré-clínicos com o objetivo de elucidar os mecanismos que envolvem o diabetes, devido à sua fácil disponibilidade, intervalo de geração curto e semelhança ao diabetes humano. Existem animais que desenvolvem diabetes tipo 1 espontaneamente, como camundongos NOD e ratos BB, mas esses animais têm altos custos de manutenção (Pearson et al., 2016, Bortell & Yang, 2012). Uma alternativa mais acessível para mimetizar o diabetes tipo 1 em animais de experimentação é o uso de fármacos que promovem a necrose das células β pancreáticas, ocasionando na ausência de produção e secreção de insulina, que resulta no estado hiperglicêmico, como é o caso da estreptozotocina, que é sintetizada a partir da bactéria *Streptomyces achromogenes* e também utilizada no tratamento de tumores pancreáticos (Capdevila et al., 2022)

O modelo de diabetes tipo 1 induzido por estreptozotocina é amplamente utilizado para estudar possíveis fármacos com atividade hipoglicemiante (Sorour et al., 2023, Ahmad et al., 2022, Lei et al., 2022, Valderrama et al., 2022). A vantagem desse modelo é a facilidade de aplicação, varia de uma dose alta de estreptozotocina a doses baixas injetadas por alguns dias em animais de experimentação. Apesar de seu alto custo, a estreptozotocina possui uma taxa menor de mortalidade quando comparado ao modelo de diabetes tipo 1 induzido por alloxan (Mostafavinia et al., 2016)

O mecanismo de ação da estreptozotocina (Figura 3) é penetrar na célula β pancreática através de um transportador de glicose GLUT2 e causar a alquilação do DNA. Esse dano ao DNA induz a ativação da poli ADP-ribose, que é um processo essencial para o desenvolvimento do estado diabético. A ativação da poli ADP-ribose causa a depleção de NAD⁺ e ATP na célula β pancreática, o que gera a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que, por fim, causa a necrose das células β pancreáticas (Szkudelski, 2001).

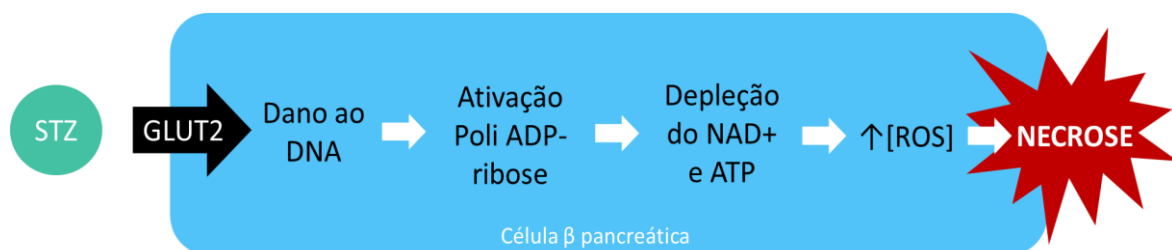


Figura 3: Mecanismo de ação da estreptozotocina (STZ) na célula β pancreática.

1.6. TRATAMENTOS CONVENCIONAIS

Como o diabetes é uma condição crônica, medidas educativas devem ser tomadas para que não haja progressão do diabetes. É indicado que portadores de ambos os tipos tenham uma dieta balanceada, pratiquem exercícios físicos e saibam dos riscos que correm caso o diabetes se agrave (Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2017).

Segundo a Diretriz da Sociedade Brasileira de Diabetes, para o tratamento da diabetes tipo 1, a insulina exógena é o medicamento mais usado. Já para o diabetes tipo 2, a metformina é utilizada como medicamento de primeira linha, devido à sua eficácia, baixa incidência de hipoglicemia e ao seu baixo custo. Porém, atualmente também são usados agonistas de receptor do GLP-1, como liraglutina, duoglutida e semaglutida injetável ou oral, que atuam no aumento da secreção de insulina dependente de glicose, diminuição da secreção de glucagon, retardo do esvaziamento gástrico e aumento da saciedade. Outras classes de medicamentos também são utilizadas no tratamento do diabetes tipo 2 como inibidores de SGLT2, que estimulam a glicosúria, a pioglitazona, que aumenta a sensibilidade insulínica nos tecidos muscular, hepático e adiposo, as sulfonilureias, como a glibenclamida, que atua estimulando a secreção de insulina pelas células β , por meio de bloqueio dos canais de potássio que resultarão na despolarização da membrana, que causa o aumento de influxo de cálcio, resultando na exocitose das vesículas de insulina (Siva Filho et al., 2022, Proks et al., 2002).

Produtos naturais, como plantas e seus compostos, são popularmente utilizados para o tratamento de diversas doenças, sendo o diabetes um exemplo. A metformina foi sintetizada a partir da guanidina, presente na planta *Galega officinalis*, popularmente conhecida como galega. Seu mecanismo de ação consiste em não permitir que haja aumento da glicemia, por meio da redução na produção de glicose pelo tecido hepático (Witters, 2001). A metformina continua a ser alvo de estudos em experimentos no modelo de diabetes tipo 1 devido às suas atividades biológicas como, por exemplo, atenuando os efeitos nocivos no sistema urinário (Xu et al., 2020), no trato reprodutor masculino (Liu et al., 2019, Nna et al., 2019) e também diminui o estresse oxidativo, causado pelo diabetes (Ren et al., 2020).

1.7. MENTOL

O mentol é um monoterpeno monocíclico, de fórmula $C_{10}H_{20}O$ (figura 4), encontrado das plantas do gênero *Mentha*, pertencentes à família Lamiaceae. O alemão Hieronymus David Gaubius foi o primeiro indivíduo a isolar a molécula

do mentol em 1771 e em 1861, F. L. Alphons Oppenheim nomeou o composto isolado como mentol (revisado por Cheng & An, 2022). O mentol é considerado um composto seguro pela Food and Drug Administration (Vaddi et al., 2002) e amplamente utilizado pelas indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética (Kamatou et al., 2013).

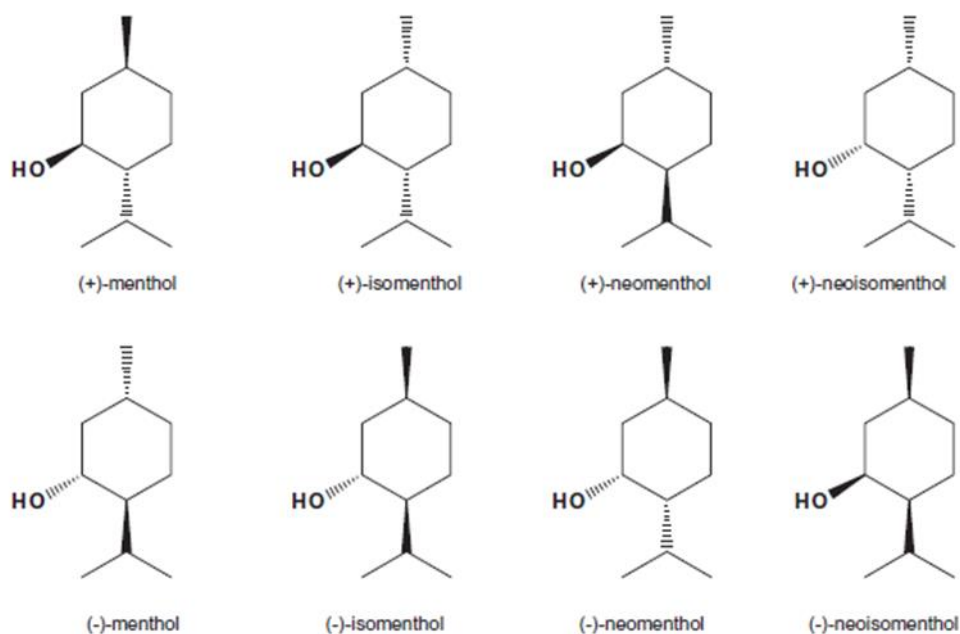


Figura 4: Estrutura química e formas isômeras do mentol (Kamatou et al., 2013).

Algumas atividades biológicas do mentol já estão descritas na literatura, seu efeito analgésico e anestésico é bem conhecido (Galeotti et al., 2002, Galeotti et al., 2001), há também trabalhos publicados que descrevem os efeitos antibacteriano (Shelz et al., 2006) e antifúngico (Zore et al., 2022). O nosso grupo de pesquisa estudou o efeito gastroprotetor do mentol (Rozza et al, 2013, Rozza et al., 2014), e também seu efeito cicatrizante em feridas cutâneas em ratos normoglicêmicos (Rozza et al., 2022) e em ratos hiperglicêmicos (Vieira et al., trabalho no prelo).

Muruganathan e colaboradores (2017) descreveu o efeito antidiabetogênico do mentol em ratos machos Wistar com diabetes induzido por estreptozotocina e niacinamida. O modelo de diabetes utilizado mimetiza o diabetes tipo 2 (revisado por Szkudelski, 2012). Os animais hiperglicêmicos foram tratados oralmente com

três concentrações diferentes de mentol (25, 50 e 100 mg/kg), glibenclamida (0,6 mg/kg) e veículo por 45 dias. Os resultados deste ensaio demonstraram que o mentol atuou no controle glicêmico dos animais, aumentando os níveis de insulina, restaurou a atividade das enzimas metabólicas hepáticas e regenerou as células β .

Um trabalho mais recente (Khare et al., 2018) avaliou se o mentol poderia induzir o gasto de energia mediado pelo glucagon para prevenir o ganho de peso e complicações relacionadas. Neste estudo é descrito a importância dos canais receptores de potencial transitório da subfamília Melastatina-8 (TRPM8), que são receptores de frio e são altamente expressos em terminações nervosas sensoriais que inervam a pele e o intestino no gasto de energia e são mediados pelo mentol, que atua como antagonista dos canais de TRPM8 (Dhaka et al., 2008; Harrington et al., 2011; Bidaux et al., 2015; De Jong et al., 2015, Xu et al., 2020). Em um dos experimentos conduzidos, camundongos machos da linhagem Swiss receberam oralmente e topicamente uma dose de mentol (200 mg/kg) e foram pré-tratados com cloridrato de benzidamina, que é um bloqueador dos TRPM8. Os resultados desse experimento demonstraram que o mentol aumentou os níveis de glucagon séricos e que também esse aumento foi prevenido pelo cloridrato de benzidamina. Num segundo experimento, os camundongos foram alimentados com dieta hipercalórica e foram tratados oralmente por 12 semanas, diariamente, com mentol (50 ou 100 mg/kg), que preveniu o ganho de peso, resistência insulínica, hipertrofia do tecido adiposo e a deposição de triacilglicerol no fígado. Esses resultados também foram observados no uso tópico do mentol (10% peso/volume). O tratamento com mentol também alterou marcadores metabólicos nos tecidos hepático e adiposo, que refletem os efeitos do glucagon, tais como aumento da glicogenólise e gliconeogênese no fígado e, aumento da atividade termogênica dos tecidos adiposos unilocular e multilocular.

2. OBJETIVOS

- Geral:

Avaliar se o tratamento com mentol (50 mg/kg) após 28 dias de tratamento exerceria efeito hipoglicemiante em ratos com diabetes, induzido por estreptozotocina e seus efeitos no tecido hepático a fim de determinar possíveis efeitos anti-inflamatório e antioxidante.

- Específicos:

Avaliar o possível efeito hipoglicemiante por meio de monitoramento da glicemia e consumo de água e ração durante os 28 dias de tratamento e após o período, por meio do teste oral de tolerância à glicose e análises histológicas do tecido pancreático;

Realizar ensaios de histologia para a avaliação da estrutura morfológica do tecido hepático e a presença ou não de glicogênio nesse tecido;

Quantificar o glicogênio hepático após o período de tratamento;

Quantificar os níveis das citocinas inflamatórias, TNF- α e IL-6, e da citocina anti-inflamatória, IL-10 a fim de determinar se o mentol possui atividade anti-inflamatória no tecido hepático após 28 dias de tratamento;

Avaliar se o mentol possui efeito antioxidante no tecido hepático após 28 dias de tratamento por meio de ensaios para verificação da atividade das enzimas SOD, CAT e MPO e a quantidade de MDA e GSH, que são agentes envolvidos no estresse oxidativo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados ratos machos albinos de linhagem Wistar com peso entre 250 – 300 g provenientes do Biotério Central da UNESP. Esses animais foram aclimatados no biotério departamental por no mínimo uma semana antes da manipulação experimental. Foram acondicionados em estantes ventiladas (Alesco, Monte Mor, Brasil), sob temperatura ($23 \pm 2^\circ \text{C}$) e ciclo claro-escuro (12 horas) controlados. Os animais foram alimentados com ração e água à vontade. Todas as práticas experimentais foram executadas de acordo com o protocolo experimental CEUA nº 9816221021 aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual Paulista (IBB/UNESP).

3.2. INDUÇÃO DO DIABETES

Após o período de aclimação, os ratos foram submetidos à dosagem glicêmica para determinação dos níveis normais de glicemia. Os parâmetros de glicemia foram definidos pelo método enzimático glicose-oxidase usando amostras de sangue coletadas da cauda do animal, com o auxílio de glicosímetro Accu-Chek Active (Roche Diagnostics, São Paulo, Brasil). Após essa fase, os ratos receberam única dose de estreptozotocina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) 45 mg/kg, diluída em solução tampão de citrato 0,1 M, pH 4,5 via injeção intraperitoneal (Romana-Souza et al., 2009). Decorridos dois dias, os ratos com níveis de glicemia maior ou igual a 200 mg/dL foram definidos como diabéticos.

3.3. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Após a indução da hiperglicemia, os ratos foram divididos aleatoriamente nos três grupos, cada grupo contou com 10 animais: grupo N – normoglicêmico, que foi tratado com o veículo, grupo H – hiperglicêmico, tratado com o veículo e

o grupo M – mentol, tratado mentol a 50 mg/kg. Os ratos normoglicêmicos serviram como parâmetro de normalidade. O mentol foi adquirido da Sigma-Aldrich (Alemanha) e diluído no veículo, em solução de DMSO 1%.

3.4. TRATAMENTO ORAL

Diariamente durante 28 dias, os animais receberam o tratamento oral via gavagem e foi realizado o controle da massa corpórea, consumo de água e ração. A glicemia dos animais alimentados foi aferida nos dias 1, 9, 18 e 28 do tratamento. Ao final do período de 28 dias de tratamento, os ratos foram eutanasiados por aprofundamento anestésico, utilizando quetamina (160 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg) e amostras de fígado e pâncreas foram destinados às análises descritas a seguir.

3.5. TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA A GLICOSE (OGTT)

Após 28 dias de tratamento, os ratos foram submetidos ao OGTT após um jejum noturno de 12h. Os animais foram tratados com seus respectivos tratamentos 30 minutos antes da administração oral de glicose (2,0 g/kg). As amostras de sangue foram coletadas de cada grupo imediatamente antes da administração de glicose (0 min) e aos 30, 60, 90 e 120 min após a administração de glicose. As amostras de sangue foram obtidas por punção da veia caudal e a glicemia foi quantificada pelo Accu-Chek Glucometer (Roche Diagnostic, Alemanha). Os níveis de glicose no sangue foram expressos em termos de mg/dL (adaptado de Muruganathan et al., 2017).

3.6. ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Amostras de fígado e pâncreas (n=4 por grupo) foram imersas em solução fixadora (85% álcool 80, 10% formalina e 5% ácido acético), embebidas em

parafina, cortadas na espessura de 5 µm e coradas com HE (hematoxilina e eosina) para avaliação histológica, na qual foi quantificada a quantidade de ilhotas pancreáticas no tecido pancreático e células de Kupffer no tecido hepático.

Para avaliarmos a presença ou não de glicogênio nos hepatócitos, as lâminas de fígado foram coradas com PAS (ácido periódico e reagente de Schiff).

3.7. NÍVEIS DE GLICOGÊNIO HEPÁTICO

Foram coletadas cerca de 300 a 500mg de amostras de fígado dos animais e digeridos em 2 ml de solução de KOH 30% em tubos Falcon em banho Maria fervente por 1 hora. Após esta fase, foi acrescentado 0,2 ml de Na₂SO₄ e o material foi agitado. Em seguida, foram acrescentados 6,0 ml de etanol, agitado novamente e levado ao banho Maria por cerca de 15 segundos. Em seguida, o material foi centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos a 22°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 2 ml de água destilada à 60°C. Posteriormente, foram acrescentados 6,0ml de etanol e o material foi agitado e aquecido em banho maria e novamente centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos a 22°C. O precipitado foi diluído em 15 µl de solução fenol e 2 ml de ácido sulfúrico. Após diluição do precipitado o conteúdo de glicogênio foi levado ao banho fervente por 15 minutos e então foi quantificado por espectrofotometria a 490nm (Rafacho et al., 2008).

3.8. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

As amostras de fígado e foram descongeladas, centrifugadas e o sobrenadante processado para determinar os níveis dos mediadores inflamatórios TNF-α e IL-6, e da citocina anti-inflamatória IL-10 através do método de ELISA sanduíche, usando kits comerciais (R&D Systems, Minneapolis, USA).

3.9. ESTRESSE OXIDATIVO

3.9.1. NÍVEIS DE MALONDIALDEÍDO (MDA)

Amostras de tecido hepático foram homogeneizadas empregando-se cloreto de potássio (KCl 1.15%) na proporção de 1:5 (massa/volume). Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 4°C 7.690g. Em tubos de ensaio adicionou-se 1500 µL ácido acético a 20% pH 3.5, 400 µL água destilada, 1500 µL ácido tiobarbitúrico (TBA) 0.8% diluído em ácido acético à 20%, 400 µL de sobrenadante e 200 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 8.1%. Preparou-se tubos para a curva padrão contendo 100 µL de concentrações conhecidas de MDA e acrescentou-se os reagentes descritos acima. Todos os tubos foram incubados por 1h a 95°C em banho maria e depois centrifugados por 10 minutos a 1.520g. Por fim, pipetou-se 200 µL de alíquota de cada amostra e leu-se a absorbância em 532 nm em leitor de microplacas Eon (Biotek, VA, Estados Unidos). Os resultados foram multiplicados por 50 e expressos em nmol MDA/g tecido (Ohkawa et al., 1979).

3.9.2. ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO)

Amostras de fígado foram diluídas em tampão HTAB (brometo de hexadeciltrimetilamônio) 0.5% na proporção 1:20 (massa/volume) e homogeneizadas usando equipamento Polytron por 15 segundos. As alíquotas foram então centrifugadas a 6.540g por 20 minutos 4°C. Numa placa de 96 poços, adicionou-se 50 µL de sobrenadante e 150 µL de tampão de reação contendo o-dianisidina dihidroclórica e peróxido de hidrogênio. A absorbância foi determinada em 450 nm empregando leitor de microplacas Eon (Biotek, VA, Estados Unidos). Os resultados foram expressos em U de MPO/g de tecido (Krawisz et al., 1984)

3.9.3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

As análises de atividade antioxidante foram realizadas nas amostras de fígado. As amostras foram descongeladas e homogeneizadas em tampão fosfato

(0.1 M, pH 7.4). A concentração de proteínas das amostras foi determinada pelo método de Bradford. Foram desenvolvidas as análises descritas a seguir:

ATIVIDADE DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A atividade da SOD foi analisada através da redução de NBT (nitroblue tetrazolium) usando o sistema hipoxantina-xantina oxidase, que gera superóxido (Winterbourn et al., 1975). A absorbância foi determinada a 560 nm no intervalo de 1-10 minutos. Os resultados foram expressos em unidades de SOD/mg de proteína.

ATIVIDADE DA ENZIMA CATALASE (CAT)

A atividade da enzima catalase foi determinada por meio do Kit Catalase Assay (Cayman Chemical, Estados Unidos), seguindo o protocolo do fabricante.

NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)

O nível de GSH foi determinado baseando-se na oxidação da glutatona reduzida (GSH) presente na amostra, à sua forma oxidada (GSSG), mediante incubação da amostra com o ácido 5,5'-ditiobisnitrobenzoico (DTNB) (Faure & Lafond, 1995). A intensidade da coloração foi lida em espectrofotômetro a 412 nm. A quantidade de GSH foi calculada por interpolação na curva padrão de GSH e os resultados foram expressos como nmol de GSH/mmol/g de proteína.

3.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados paramétricos foram expressos na forma de média $\pm$ erro padrão da média e submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida pelo teste de Tukey. As análises foram feitas pelo software GraphPad Prism 8 (GraphPad Softwares, La Jolla, EUA) com nível de significância mínimo de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. MASSA CORPORAL, CONSUMO DE RAÇÃO E ÁGUA

A figura 5A apresenta a porcentagem de ganho de massa corporal dos animais tratados com veículo nos grupos normoglicêmico e hiperglicêmico, ou mentol durante 28 dias. O grupo normoglicêmico apresentou ganho de massa corporal de cerca de 27%, enquanto o grupo hiperglicêmico apresentou ganho em torno de 11% e o grupo tratado com mentol apresentou aproximadamente 17% no ganho de massa corporal ($p < 0,01$ $p < 0,05$ em relação ao grupo normoglicêmico, respectivamente) após os 28 dias de tratamento.

Nas figuras 5B e 5C são mostrados os consumos médios de ração e água, respectivamente, nas quais observa-se que o grupo normoglicêmico apresentou menor consumo de ração e água em comparação aos demais grupos ($p < 0,0001$).

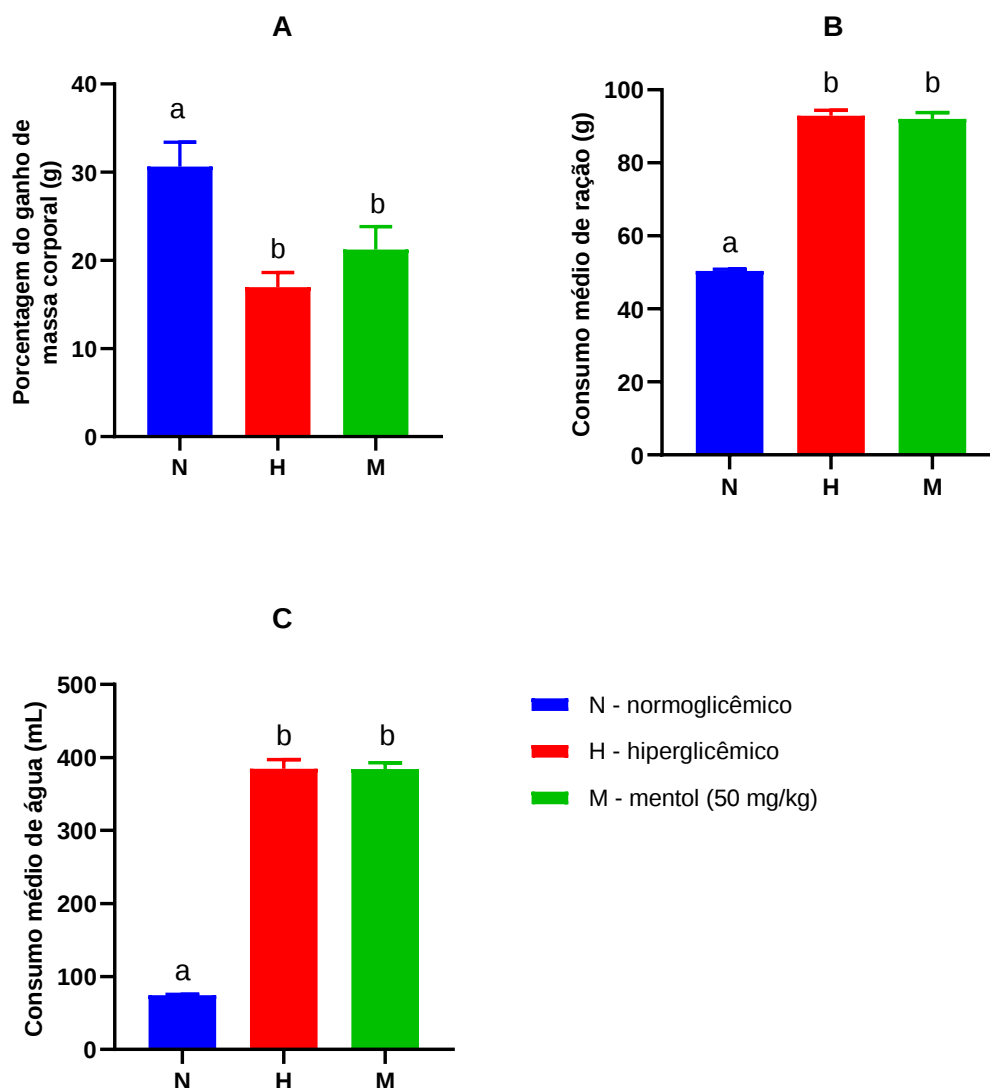


Figura 5: (A) Porcentagem de ganho de massa corporal dos animais após os 28 dias de tratamento oral com veículo nos grupos normoglicêmico e hiperglicêmico ou mentol (50 mg/kg). Consumo médio de ração (B) e água (C) após 28 dias de tratamento oral com veículo nos grupos normoglicêmico e hiperglicêmico ou mentol (50 mg/kg). Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média, $n=10$. Letras diferentes indicam diferença significativa; ANOVA de uma via, seguido de teste de Tukey, $p<0,05$.

4.2. GLICEMIA EM DESJEJUM

A figura 6 mostra a glicemia dos animais alimentados e em tratamento nos dias 1, 9, 18 e 28. No dia 1 do tratamento, o grupo normoglicêmico apresenta glicemia em parâmetros normais, ou seja, abaixo dos níveis glicêmicos dos animais hiperglicêmicos ($p < 0,001$ em relação do grupo hiperglicêmico; $p < 0,01$ em relação grupo tratado com mentol). No dia 9 de tratamento, a glicemia aferida após o tratamento, apontou que o grupo normoglicêmico manteve a glicemia normal e menor em relação ao grupos hiperglicêmico e mentol ($p < 0,01$ em relação ao grupo normoglicêmico; $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com mentol). Nos dias 18 e 28, não houve diferença estatística entre o grupo normoglicêmico e o grupo tratado com mentol.

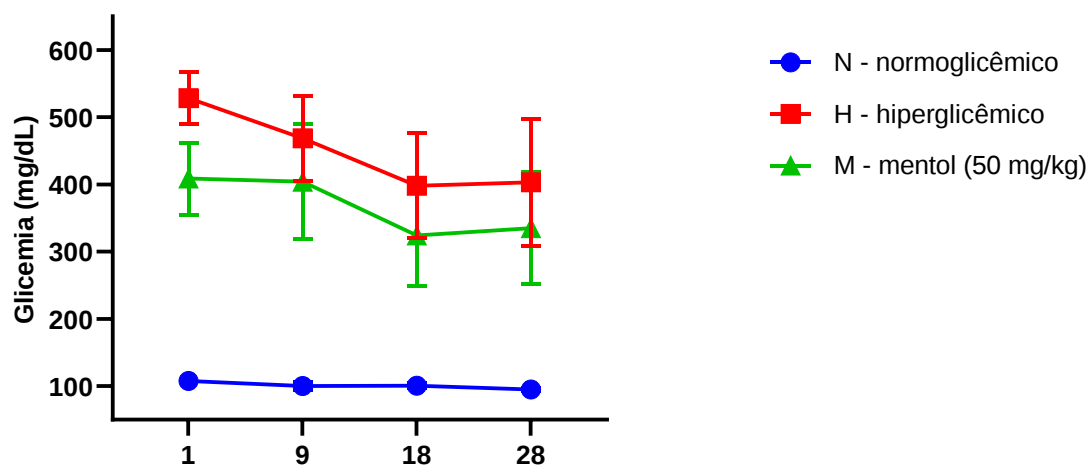


Figura 6: Glicemia aferida nos dias 1, 9, 18, 28 de tratamento nos animais tratados com veículo, normoglicêmicos e hiperglicêmicos, ou mentol (50 mg/kg). Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média, $n=10$. ANOVA de uma via, seguido de teste de Tukey, $p < 0,05$.

4.3. OGTT

O OGTT tem como objetivo avaliar a intolerância à glicose, após administração de uma dose alta de glicose ao longo do tempo, definido pelo protocolo experimental. O grupo normoglicêmico apresentou glicemia inferior aos

grupos hiperglicêmicos ($p < 0,0001$) em todos os intervalos de tempo, com pico de glicemia no tempo 60, que foi normalizado após 120 minutos da administração da alta dose de glicose (figura 7^a). No tempo de 60 minutos também se observou que houve diferença entre o grupo hiperglicêmico e mentol ($p < 0,05$), no entanto, nos tempos 90 e 120 minutos não houve diferença entre esses grupos. Na imagem 7B é mostrada área sob a curva do OGTT, o grupo mentol apresentou maior área em relação aos demais grupos ($p < 0,05$ em relação ao grupo normoglicêmico e ao grupo hiperglicêmico. Contudo, os dois grupos hiperglicêmicos apresentaram glicemia acima de 300 mg/dL, o que configura que esses animais estavam diabéticos e intolerantes à glicose.

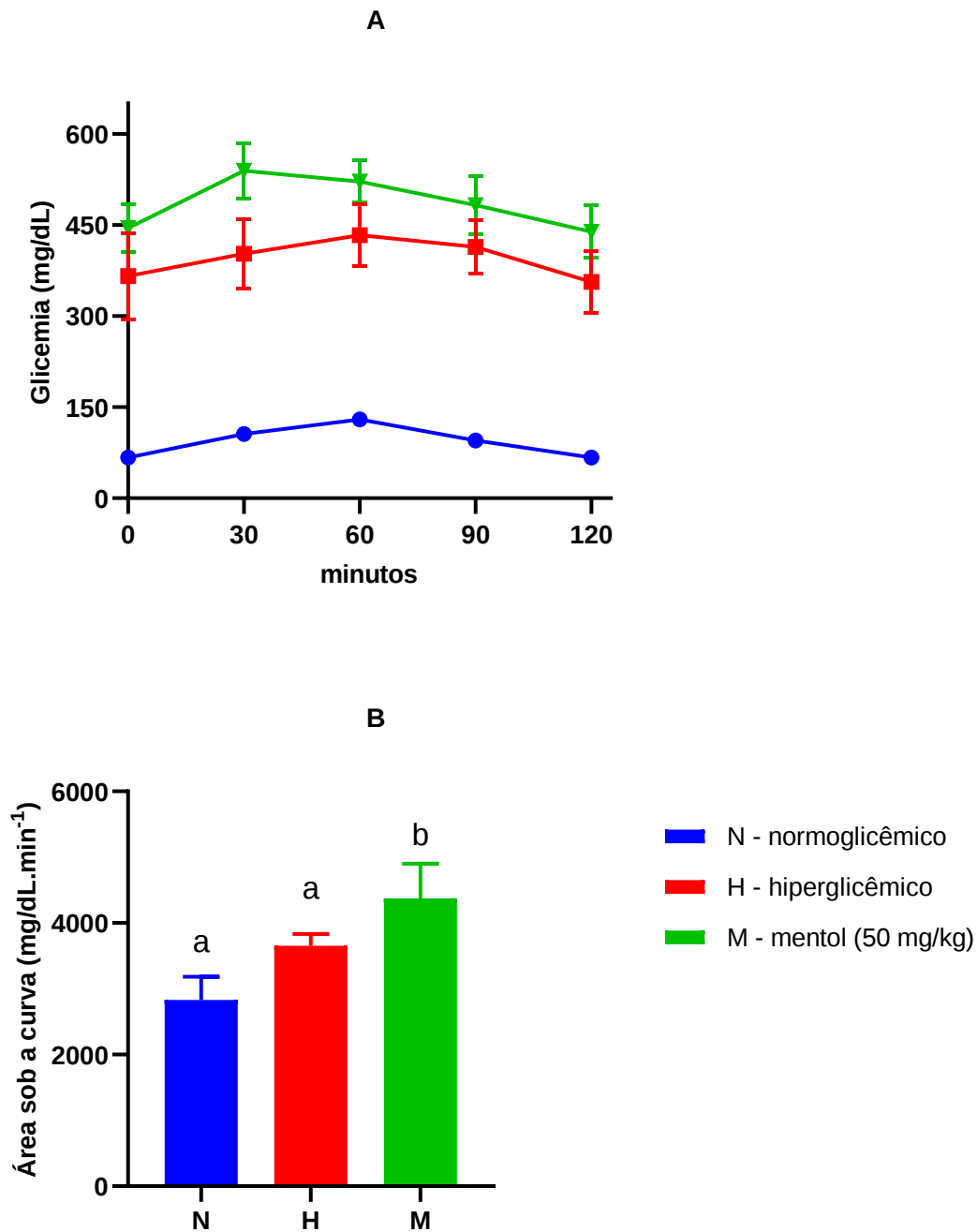


Figura 7: (A) OGTT, no qual foram quantificados os níveis glicêmicos nos tempos 0, 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos e 120 minutos, após 28 dias de tratamento oral com veículo nos grupos normoglicêmico e hiperglicêmico ou mentol (50 mg/kg). Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média, $n=10$. ANOVA de uma via, seguido de teste de Tukey, $p<0,05$.

(B) Área sob a curva do OGTT. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média, $n=10$. Letras diferentes indicam diferença significativa; ANOVA de uma via, seguido de teste de Tukey, $p<0,05$.

4.4. ANÁLISE HISTOLÓGICA

As imagens histológicas do pâncreas (figura 8), coradas com HE mostraram que mesmo com a aplicação da estreptozocina, os animais hiperglicêmicos ainda continham algumas ilhotas pancreáticas, apontadas em círculos tracejados em amarelo. É possível observar que as ilhotas pancreáticas no grupo hiperglicêmico e no grupo mentol apresentam hipoplasia. A figura 9 mostra a contagem de ilhotas pancreáticas, na qual o grupo normoglicêmico apresentou maior quantidade de ilhotas pancreáticas em comparação aos grupos hiperglicêmico e mentol ($p<0,01$).

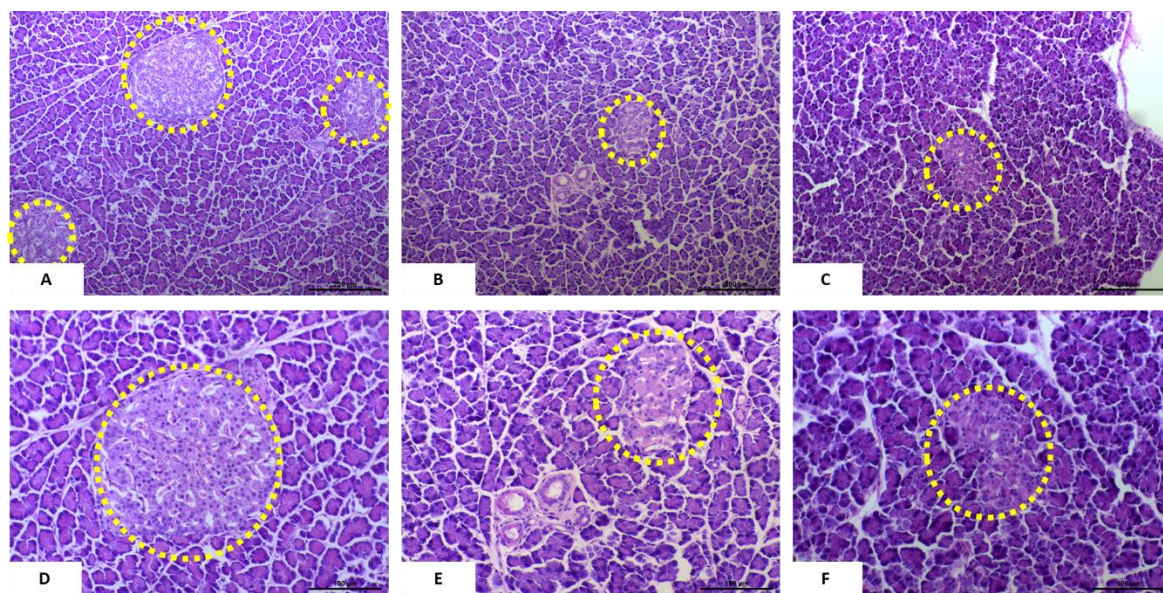


Figura 8: Imagens histológicas do pâncreas, coradas com HE, após 28 dias de tratamento oral com veículo nos grupos normoglicêmico (A e D) e hiperglicêmico (B e E) ou mentol (50 mg/kg, C e F). Círculos tracejados em amarelo indicam as ilhotas pancreáticas. A, B, C – barra: 100 μ m; C, D, F – barra: 200 μ m.

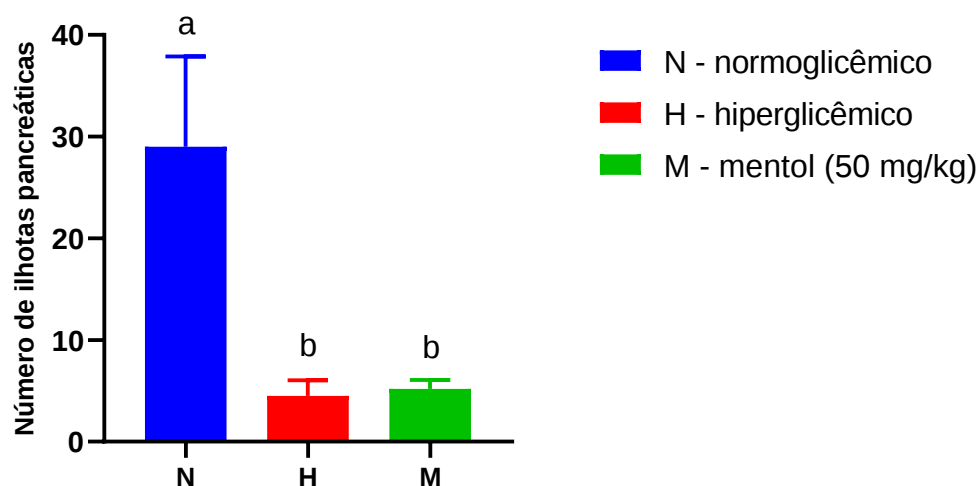


Figura 9: Número de ilhotas pancreáticas encontradas nos cortes histológicos do pâncreas. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média, $n=4$. Letras diferentes indicam diferença significativa; ANOVA de uma via, seguido de teste de Tukey, $p<0,05$.

Na figura 10, podemos observar que há diferenças morfológicas nos cortes histológicos do tecido hepático, coradas com HE. O grupo normoglicêmico apresenta um tecido hepático organizado, com hepatócitos com núcleos claros. Enquanto no grupo hiperglicêmico observamos um tecido com o núcleo dos hepatócitos escurecidos e com capilares sinusóides dilatados, apontados pela seta em amarelo, e células de Kupffer em hiperplasia, destacadas pelo retângulo tracejado em amarelo. Já no grupo tratado com mentol a arquitetura morfológica é mais semelhante visualmente ao grupo normoglicêmico, apresentando capilares sinusóides pouco dilatados.

A figura 11 apresenta a contagem de células de Kupffer, que são células que realizam a fagocitose no tecido hepático. O resultado das contagens demonstrou que o grupo normoglicêmico apresentou menor quantidade nas células de Kupffer, contidas nos cortes histológicos do fígado, em comparação aos grupos hiperglicêmico e mentol ($p<0,05$).

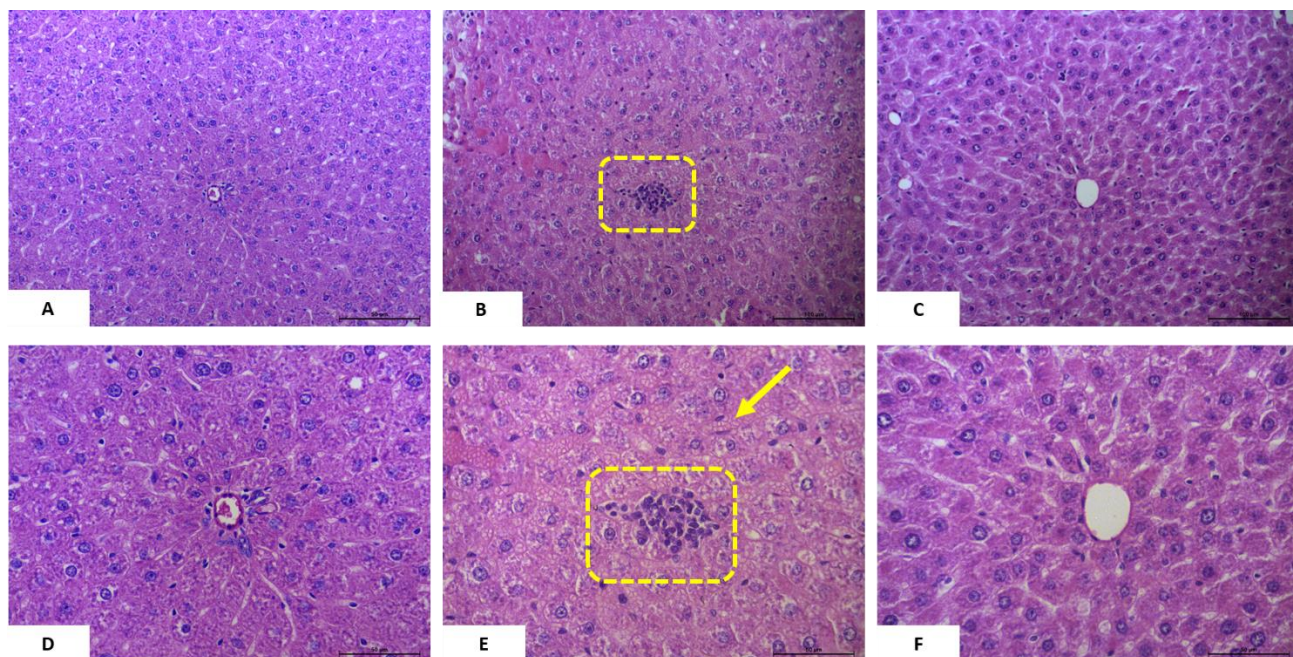


Figura 10: Imagens histológicas do fígado, coradas com HE, após 28 dias de tratamento oral com veículo nos grupos normoglicêmico (A e D) e hiperglicêmico (B e E) ou mentol (50 mg/kg, C e F). Retângulos tracejados em amarelo indicam a hiperplasia de células de Kupffer; Seta amarela indica dilatação dos capilares sinusóides. A, B, C – barra: 100 µm; C, D, F – barra: 50 µm.

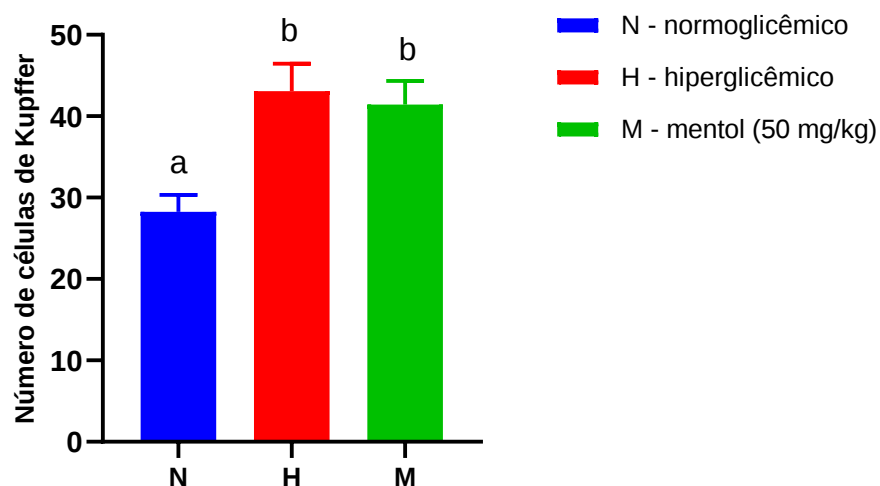


Figura 11: Número de células de Kupffer encontradas nos cortes histológicos do fígado. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média, n=4. Letras

diferentes indicam diferença significativa; ANOVA de uma via, seguido de teste de Tukey, $p < 0,05$.

4.5. GLICOGÊNIO HEPÁTICO

O glicogênio é forma de armazenar a glicose nos tecidos musculares e hepático, que tem como função manter a glicemia regulada durante as refeições. A coloração PAS tem como objetivo corar carboidratos presentes nas células, como é o caso do glicogênio presente nos hepatócitos. Na figura 12, observamos cortes histológicos do tecido hepático corados com PAS. As setas em amarelo indicam o glicogênio armazenado nos hepatócitos.

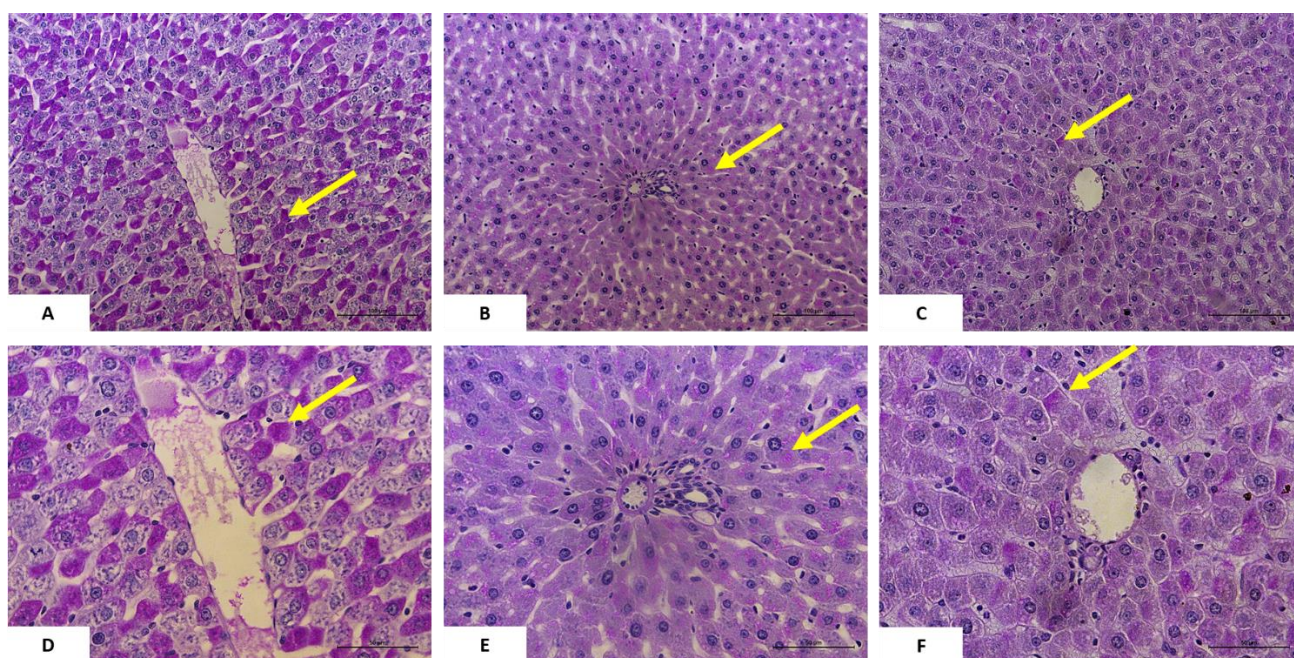


Figura 12: Imagens histológicas do fígado, coradas com PAS, após 28 dias de tratamento oral com veículo nos grupos normoglicêmico (A e D) e hiperglicêmico (B e E) ou mentol (50 mg/kg, C e F). Setas amarelas indicam o glicogênio marcado com a coloração PAS; A, B, C – barra: 100 μm ; C, D, F – barra: 50 μm .

O glicogênio foi mensurado em amostras de fígados após 28 dias de tratamento e os resultados obtidos revelaram que o grupo normoglicêmico apresentou um aumento ($p<0,0001$) no nível de glicogênio armazenado em relação aos grupos hiperglicêmico e mentol (figura 13).

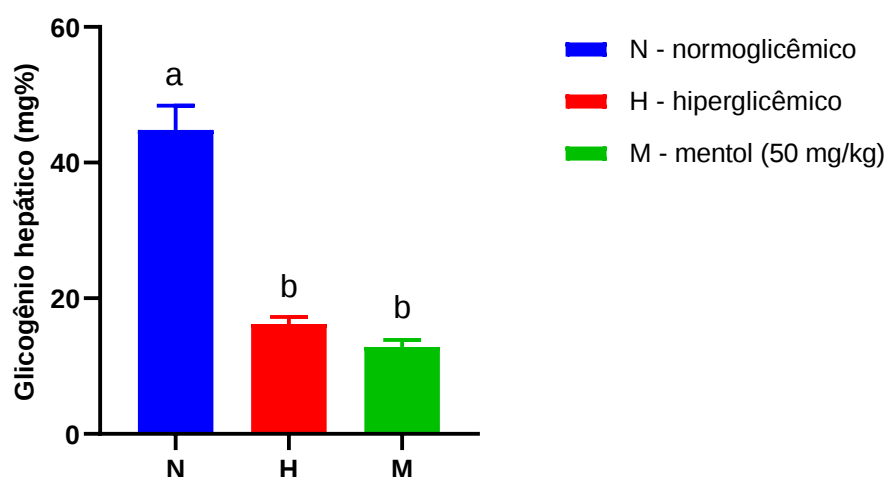


Figura 13: Glicogênio hepático medido, após 28 dias de tratamento oral com veículo nos grupos normoglicêmico e hiperglicêmico ou mentol (50 mg/kg). Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média, $n=10$. Letras diferentes indicam diferença significativa; ANOVA de uma via, seguido de teste de Tukey, $p<0,05$.

4.6. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Na figura 14, são apresentados os níveis das citocinas inflamatórias TNF- α (A) e IL-6 (B) quantificadas no tecido hepático, na qual é possível notar que após 28 dias de tratamento com mentol diminuiu de forma significativa a quantidade de TNF- α ($p<0,001$) e de IL-6 ($p<0,01$) em comparação ao grupo hiperglicêmico. Já a figura 14C apresenta a quantificação dos níveis de IL-10, uma citocina anti-inflamatória. O tratamento com mentol por 28 dias aumentou os níveis de IL-10 no tecido hepático, em comparação ao grupo hiperglicêmico ($p<0,001$).

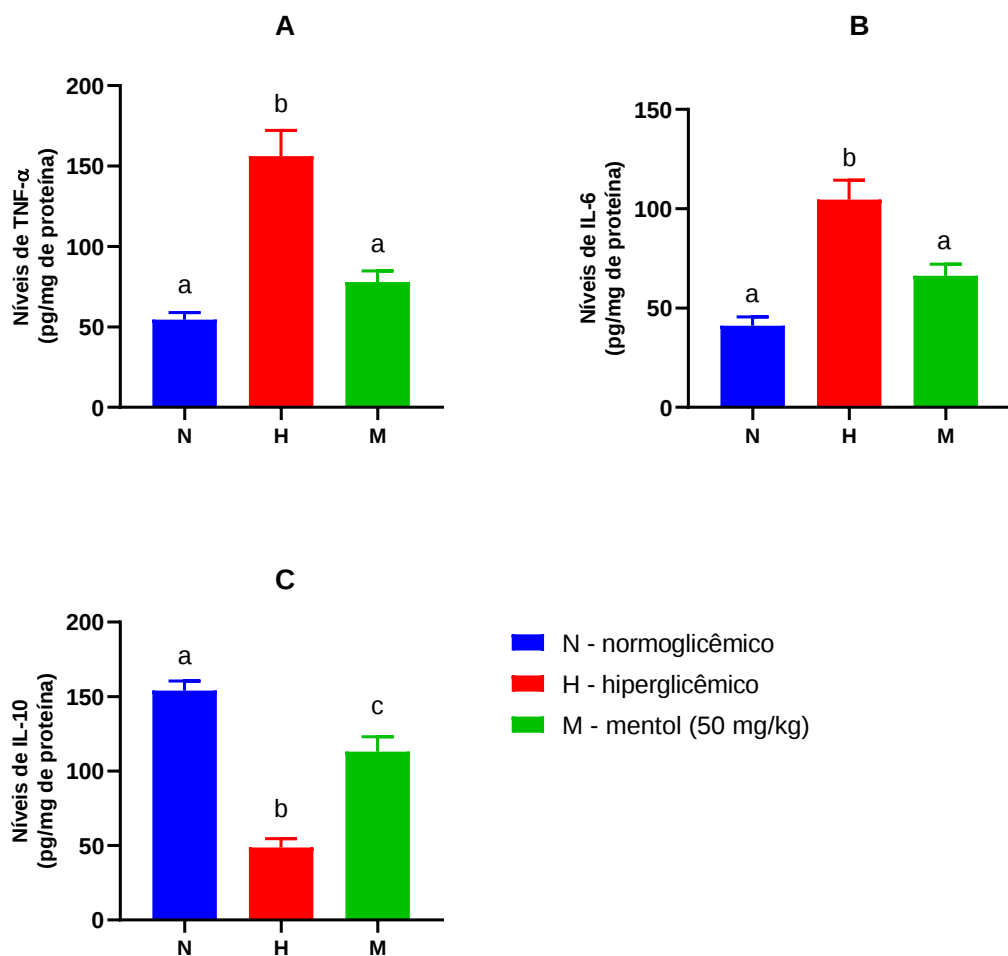


Figura 14: Níveis das citocinas TNF- α (A), IL-6 (B) e IL-10 (C) quantificadas no tecido hepático, após 28 dias de tratamento oral com veículo nos grupos normoglicêmico e hiperglicêmico ou mentol (50 mg/kg). Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média, n=10. Letras diferentes indicam diferença significativa; ANOVA de uma via, seguido de teste de Tukey, $p < 0,05$.

4.7. ESTRESSE OXIDATIVO

4.7.1. NÍVEIS DE MDA

O MDA é um marcador de estresse oxidativo, que indica se há peroxidação lipídica. Na figura 15, os níveis de MDA no tecido hepático são apresentados, na qual sugere que o tratamento com o mentol diminuiu a quantidade desse marcador em comparação com o grupo normoglicêmico e o grupo hiperglicêmico ($p < 0,05$).

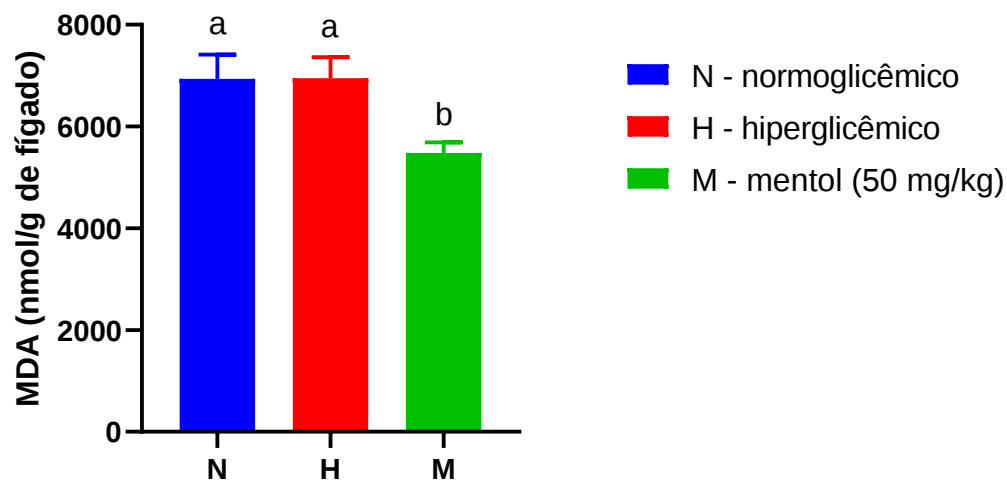


Figura 15: Níveis de MDA medidos nos fígados dos animais, após 28 dias de tratamento oral com veículo nos grupos normoglicêmico e hiperglicêmico ou mentol (50 mg/kg). Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média, $n=10$. Letras diferentes indicam diferença significativa; ANOVA de uma via, seguido de teste de Tukey, $p<0,05$.

4.7.2. ATIVIDADE DA MPO

A MPO é uma enzima inflamatória e oxidante produzida pelos neutrófilos. Na figura 16 é mostrada a atividade da MPO nos grupos normoglicêmico, hiperglicêmico após 28 dias de tratamento. O tratamento com mentol diminuiu a atividade da MPO no tecido hepático, apresentando menor atividade dessa enzima em comparação ao grupo hiperglicêmico ($p<0,05$).

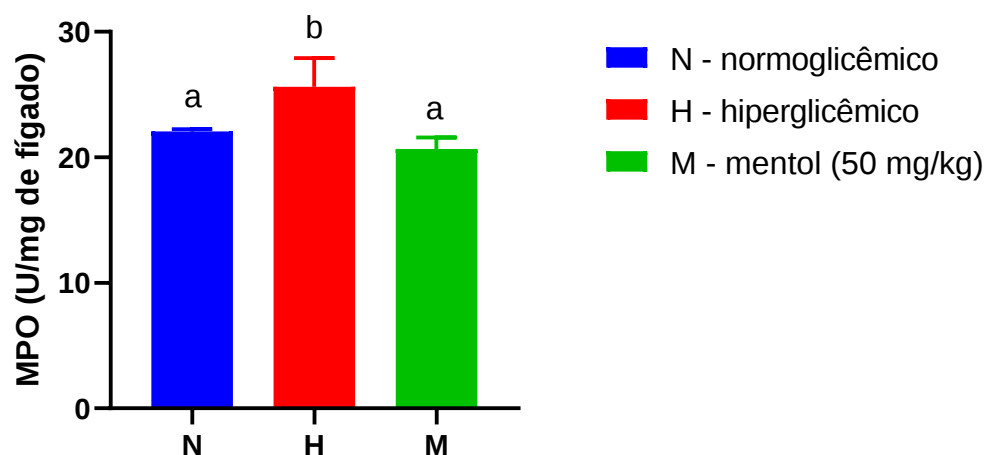


Figura 16: Atividade da MPO medida nos fígados dos animais, após 28 dias de tratamento oral com veículo nos grupos normoglicêmico e hiperglicêmico ou mentol (50 mg/kg). Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média, $n=10$. Letras diferentes indicam diferença significativa; ANOVA de uma via, seguido de teste de Tukey, $p<0,05$.

4.7.3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Amostras de fígados foram utilizadas para medir a atividade das enzimas SOD e CAT e a quantidade de GSH após 28 de tratamento (figura 17). O grupo tratado com mentol apresentou aumento significativo na atividade da SOD ($p<0,0001$ em relação ao grupo normoglicêmico; $p<0,001$ em relação ao grupo hiperglicêmico), aumento na atividade da enzima CAT ($p<0,0001$ em relação aos grupos normoglicêmico e hiperglicêmico) e apresentou aumento na quantidade de GSH ($p<0,0001$ em relação aos grupos normoglicêmico e hiperglicêmicos).

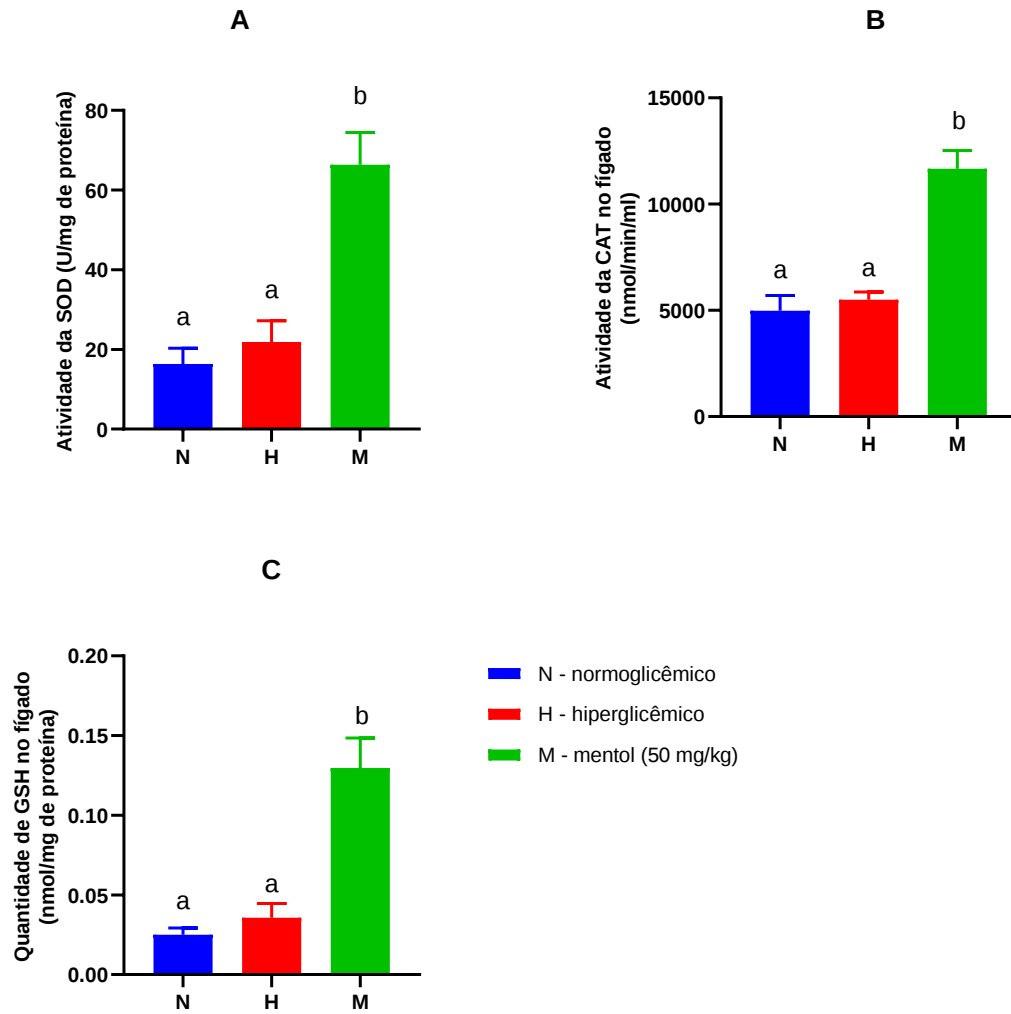


Figura 17: Atividade da SOD (A) e CAT (B) e quantidade de GSH (C) medidas nos fígados dos animais, após 28 dias de tratamento oral com veículo nos grupos normoglicêmico e hiperglicêmico ou mentol (50 mg/kg). Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média, n=10. Letras diferentes indicam diferença significativa; ANOVA de uma via, seguido de teste de Tukey, $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar se o tratamento com o mentol exerceria efeito hipoglicemiante em ratos portadores diabetes tipo 1, induzido por estreptozotocina e seus efeitos no tecido hepático após 28 dias. O diabetes é uma doença crônica que afeta o organismo como um todo. A principal característica do diabetes é hiperglicemia, que pode ser resultante da falha na produção da insulina ou na ação da insulina no organismo (Volpe et al., 2018).

O diabetes é uma doença silenciosa, no entanto alguns sintomas podem ser percebidos a curto prazo, como a polidipsia (sede excessiva), poliúria (aumento na excreção de urina) e polifagia (aumento no apetite) associada à perda de peso. A poliúria pode ser explicada pela alta concentração de glicose no sangue, o que faz com que altas quantidades de glicose sejam captadas pelos rins, aumentando sua osmolaridade, que resulta em maior captação de água e aumento na quantidade de urina. O aumento na captação de água pelos rins pode causar desidratação, explicando o maior consumo de água pelos indivíduos. A polifagia pode ser explicada pela deficiência na captação de glicose nos tecidos-alvo, que leva à deficiência no mecanismo de saciedade do indivíduo. A perda de peso é decorrente da alta taxa de catabolismo observada em diabéticos além da dificuldade de absorção de glicose (Muruganathan et al, 2017). O grupo normoglicêmico foi incluído como parâmetro de normalidade neste estudo. Ao decorrer do experimento para avaliarmos se o mentol possuía atividade hipoglicemiante, nós fizemos o controle de consumo de ração e água e monitoramos a massa corpórea. Os resultados apresentados mostraram que o grupo tratado com mentol obteve um ganho de cerca de 17% na massa corpórea. Todavia, o consumo médio de ração e água observada nesse grupo foi equivalente ao grupo hiperglicêmico e superior ao grupo normoglicêmico, indicando que o tratamento com mentol não reestabeleceu os parâmetros fisiológicos, que são alterados pelo estado diabético.

O tratamento oral com mentol não apresentou efeito hipoglicemiante significativo após 28 dias. Uma possível justificativa para esses resultados é o modelo experimental escolhido. Enquanto no modelo de diabetes tipo 1, a estreptozotocina age na necrose das células β pancreáticas, que são responsáveis

pela produção de insulina, o modelo utilizado por Muruganathan e colaboradores (2017) foi o diabetes tipo 2, induzido por estreptozotocina e niacinamida, no qual o mentol teve efeito hipoglicemiante. O papel da niacinamida é atenuar o efeito destruidor de células β que a estreptozotocina produz, que evita a ativação da poli ADP-ribose, diminui a morte celular e permite que haja produção de insulina (Szkudelski, 2012). Ou seja, no modelo de diabetes escolhido houve uma destruição maior das células β pancreáticas do que haveria no modelo de diabetes tipo 2, induzido por estreptozotocina e niacinamida.

Avaliamos a histologia do tecido pancreático e hepático após 28 dias dos tratamentos. No tecido pancreático, pudemos observar que há uma diferença no tamanho das ilhotas de pancreáticas entre o grupo normoglicêmico e os grupos hiperglicêmicos e, também na quantidade dessas ilhotas, que são menores nos grupos hiperglicêmicos. Essa diminuição também pode estar relacionada ao modelo de diabetes escolhido, já que a estreptozotocina destrói as células β pancreáticas. No tecido hepático, observamos uma diferença na estrutura celular no grupo hiperglicêmico em relação aos grupos normoglicêmico e mentol, que apresenta os capilares sinusóides dilatados e áreas de hiperplasia de células de Kupffer, que são células responsáveis pela fagocitose no tecido hepático e o núcleo dos hepatócitos claros, enquanto no grupo hiperglicêmico, o núcleo dos hepatócitos estavam escurecidos. A hiperglicemia, decorrente do diabetes, causa essas alterações morfológicas que afetam negativamente o funcionamento do tecido hepático (Ma et al., 2020, Rodríguez et al., 2018, Al-shaqha et al., 2015).

O glicogênio é um polissacarídeo, resultante do metabolismo da glicose, e tem como função servir de armazenamento de energia e, também na manutenção dos níveis de glicose no organismo. É encontrado em todos os tipos celulares, porém em maior quantidade no fígado e no músculo esquelético. O diabetes causa alteração nos níveis de glicogênio hepático, que diminuem em decorrência da ausência de insulina, que age na homeostase da glicose no organismo e sinaliza para seus tecidos-alvo, como o fígado, que há glicose a ser absorvida e armazenada em forma de energia (Muruganathan et al, 2017, Petersen et al, 2017). Em nosso estudo, observamos que o grupo normoglicêmico apresentou uma quantidade

maior de glicogênio hepático, que foi evidenciada pelos cortes histológicos corados com PAS, em contrapartida os grupos hiperglicêmicos apresentaram níveis baixos de glicogênio no fígado. O tratamento com mentol não instaurou os níveis baixos de glicogênio hepático, devido à ausência de insulina no organismo dos animais, que sinaliza para o tecido hepático quando realizar a glicogênese, processo de síntese do glicogênio. Em um modelo de obesidade crônica induzida por dieta hipercalórica, o tratamento com mentol também diminuiu o nível de glicogênio hepático, entre outras alterações que estão relacionadas ao estado de gasto energético do fígado dependentes de glucagon (Khare et al., 2018).

Uma das características do diabetes, é a inflamação crônica que é resultado do estado hiperglicêmico, que altera as funções de macrófagos e neutrófilos. Outro fator que também influencia no estado de inflamação crônica em indivíduos portadores de diabetes é o aumento de produtos de glicação avançada (AGE's) (Du et al., 2022, Cabrera et al., 2016). Os AGE's são moléculas resultantes de da oxidação de lipídeos e carboidratos, que quando ligados aos seus receptores celulares, denominados RAGE's estimulam a produção de agentes inflamatórios como as citocinas, TNF- α e IL-6, a produção da MPO pelos neutrófilos, que é uma enzima inflamatória e oxidante (Dong et al., 2022, Huang et al., 2016). O tratamento com mentol foi capaz de diminuir os níveis de TNF- α e IL-6 e a atividade da MPO e, também aumentou a quantidade de IL-10 no tecido hepáticos dos animais diabéticos. Esses resultados evidenciam o efeito anti-inflamatório do mentol no tecido hepático de ratos diabéticos, que pode auxiliar no tratamento da inflamação crônica causada pelo diabetes.

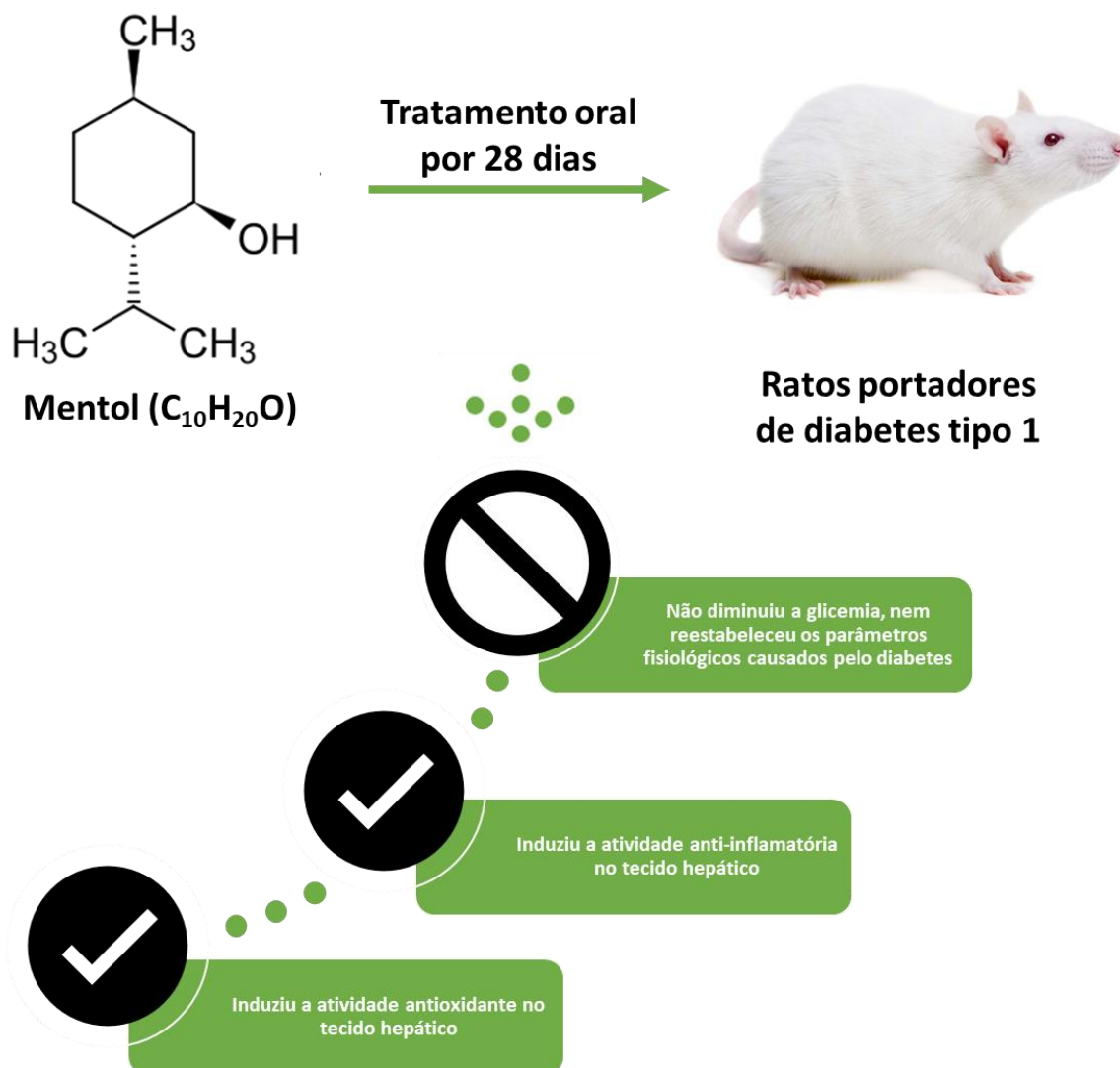
A produção de espécies reativas de oxigênio é algo natural no organismo e está envolvido em processos celulares, como por exemplo apoptose e resposta imune. Entretanto, quando a produção de espécies reativas de oxigênio é exacerbada resulta em estresse oxidativo, que também é uma das complicações causadas pelo diabetes (Xie et al., 2018). O estresse oxidativo causa danos aos principais compostos celulares, como lipídeos, proteínas e DNA (Sifuentes-Franco et al., 2017). O organismo tem sua própria forma de ação contra estresse oxidativo e que pode ser melhorado por meio de agentes antioxidantes, como o mentol. Um

estudo recente (Matouk et al., 2022) avaliou o efeito do mentol no tecido hepático em modelo experimental de sepse induzida em ratas e demonstrou que administração do mentol diminuiu o estresse oxidativo, a inflamação e apoptose no tecido hepático e promoveu a regeneração das células do fígado, evidenciando o efeito hepatoprotetor do mentol. Agentes oxidantes enzimáticos como a SOD e CAT e não enzimáticos, como a GSH, atuam na manutenção dos níveis normais de espécies reativas de oxigênio (Bhattamisra et al., 2021). O tratamento com mentol aumentou os níveis de GSH no fígado dos animais diabéticos. Além disso, houve aumento da atividade das enzimas SOD e CAT no tecido hepático do grupo tratado com mentol, que pode ter contribuído para o efeito protetor no tecido hepático. Visar o estresse oxidativo e a inflamação pode ser promissor para preservar a função hepática e atenuar as complicações relacionadas ao fígado no diabetes (Delli Bovi et al., 2021).

6. CONCLUSÃO

O tratamento oral com mentol em ratos portadores de diabetes tipo 1, induzido por estreptozotocina após 28 dias não diminuiu os níveis glicêmicos dos animais diabéticos de forma significativa, nem reestabeleceu os parâmetros de massa corporal, consumo de água e ração que são prejudicados pelo estado diabético. No entanto, o tratamento com mentol após 28 dias induziu aumento na atividade anti-inflamatória, aumentando os níveis de IL-10 e diminuindo os níveis de TNF- α , e evidenciou o efeito antioxidante do mentol, que aumentou a atividade da SOD e CAT, aumentou a quantidade de GSH e diminuiu a atividade da MPO e da quantidade de MDA no tecido hepático. Juntos, esses resultados apontam o mentol como um promissor agente hepatoprotetor. Ainda são necessários mais ensaios a fim de identificar possíveis mecanismos de atuação do mentol no tecido hepático.

7. RESUMO GRÁFICO



8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Ahmad, S., Pandey, A. R., Rai, A. K., Singh, S. P., Kumar, P., Singh, S., Gulzar, F., Ahmad, I., Sashidhara, K. V., & Tamrakar, A. K. (2022). Moringa oleifera impedes protein glycation and exerts reno-protective effects in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of ethnopharmacology*, 116117. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.116117>

Al-Shaqha, W. M., Khan, M., Salam, N., Azzi, A., & Chaudhary, A. A. (2015). Anti-diabetic potential of Catharanthus roseus Linn. and its effect on the glucose transport gene (GLUT-2 and GLUT-4) in streptozotocin induced diabetic wistar rats. *BMC complementary and alternative medicine*, 15, 379. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0899-6>

Atkinson, M. A., Campbell-Thompson, M., Kusmartseva, I., & Kaestner, K. H. (2020). Organisation of the human pancreas in health and in diabetes. *Diabetologia*, 63(10), 1966–1973. <https://doi.org/10.1007/s00125-020-05203-7>

Bhattamisra, S. K., Koh, H. M., Lim, S. Y., Choudhury, H., & Pandey, M. (2021). Molecular and Biochemical Pathways of Catalpol in Alleviating Diabetes Mellitus and Its Complications. *Biomolecules*, 11(2), 323. <https://doi.org/10.3390/biom11020323>

Bidaux, G., Borowiec, A. S., Gordienko, D., Beck, B., Shapovalov, G. G., Lemonnier, L., Flourakis, M., Vandenberghe, M., Slomianny, C., Dewailly, E., Delcourt, P., Desruelles, E., Ritaine, A., Polakowska, R., Lesage, J., Chami, M., Skryma, R., & Prevarskaya, N. (2015). Epidermal TRPM8 channel isoform controls the balance between keratinocyte proliferation and differentiation in a cold-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(26), E3345–E3354. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423357112>

Bortell, R., & Yang, C. (2012). The BB rat as a model of human type 1 diabetes. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 933, 31–44. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-068-7_3

Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>

Cabrera, S. M., Henschel, A. M., & Hessner, M. J. (2016). Innate inflammation in type 1 diabetes. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*, 167(1), 214–227. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2015.04.011>

Capdevila, J., Ducreux, M., García Carbonero, R., Grande, E., Halfdanarson, T., Pavel, M., Tafuto, S., Welin, S., Valentí, V., & Salazar, R. (2022). Streptozotocin, 1982-2022: Forty Years from the FDA's Approval to Treat Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Neuroendocrinology*, 112(12), 1155–1167. <https://doi.org/10.1159/000524988>

Cheng, H., & An, X. (2022). Cold stimuli, hot topic: An updated review on the biological activity of menthol in relation to inflammation. *Frontiers in immunology*, 13, 1023746. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1023746>

de Jong, P. R., Takahashi, N., Peiris, M., Bertin, S., Lee, J., Gareau, M. G., Paniagua, A., Harris, A. R., Herdman, D. S., Corr, M., Blackshaw, L. A., & Raz, E. (2015). TRPM8 on mucosal sensory nerves regulates colitogenic responses by innate immune cells via CGRP. *Mucosal immunology*, 8(3), 491–504. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.82>

DeFronzo R. A. (2004). Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *The Medical clinics of North America*, 88(4), 787–ix. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2004.04.013>

Delli Bovi, A. P., Marciano, F., Mandato, C., Siano, M. A., Savoia, M., & Vajro, P. (2021). Oxidative Stress in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. An Updated Mini

Review. *Frontiers in medicine*, 8, 595371.
<https://doi.org/10.3389/fmed.2021.595371>

Dhaka, A., Earley, T. J., Watson, J., & Patapoutian, A. (2008). Visualizing cold spots: TRPM8-expressing sensory neurons and their projections. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(3), 566–575. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3976-07.2008>

Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018 / Organização José Egídio Paulo de Oliveira, Renan Magalhães Montenegro Junior, Sérgio Vencio. -- São Paulo: Editora Clannad, 2017.

Dong, H., Zhang, Y., Huang, Y., & Deng, H. (2022). Pathophysiology of RAGE in inflammatory diseases. *Frontiers in immunology*, 13, 931473. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.931473>

Du, C., Whiddett, R. O., Buckle, I., Chen, C., Forbes, J. M., & Fotheringham, A. K. (2022). Advanced Glycation End Products and Inflammation in Type 1 Diabetes Development. *Cells*, 11(21), 3503. <https://doi.org/10.3390/cells11213503>

Faure, P.; Lafond, J.L. (1995) Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: *Analysis of free radicals in biological systems*. Ed. Verla Bostonp. p. 237-248.

Galeotti, N., Di Cesare Mannelli, L., Mazzanti, G., Bartolini, A., & Ghelardini, C. (2002). Menthol: a natural analgesic compound. *Neuroscience letters*, 322(3), 145–148. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(01\)02527-7](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(01)02527-7)

Galeotti, N., Ghelardini, C., Mannelli, L., Mazzanti, G., Baghiroli, L., & Bartolini, A. (2001). Local anaesthetic activity of (+)- and (-)-menthol. *Planta medica*, 67(2), 174–176. <https://doi.org/10.1055/s-2001-11515>

Ghasemi, A., & Jeddi, S. (2023). Streptozotocin as a tool for induction of rat models of diabetes: a practical guide. *EXCLI journal*, 22, 274–294. <https://doi.org/10.17179/excli2022-5720>

Harrington, A. M., Hughes, P. A., Martin, C. M., Yang, J., Castro, J., Isaacs, N. J., Blackshaw, A. L., & Brierley, S. M. (2011). A novel role for TRPM8 in visceral afferent function. *Pain*, 152(7), 1459–1468. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2011.01.027>

Henriksson, M., Jindal, R., Sternhufvud, C., Bergenheim, K., Sörstadius, E., & Willis, M. (2016). A Systematic Review of Cost-Effectiveness Models in Type 1 Diabetes Mellitus. *PharmacoEconomics*, 34(6), 569–585. <https://doi.org/10.1007/s40273-015-0374-8>

Hijmans, B. S., Grefhorst, A., Oosterveer, M. H., & Groen, A. K. (2014). Zonation of glucose and fatty acid metabolism in the liver: mechanism and metabolic consequences. *Biochimie*, 96, 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.06.007>

Huang, J., Xiao, Y., Xu, A., & Zhou, Z. (2016). Neutrophils in type 1 diabetes. *Journal of diabetes investigation*, 7(5), 652–663. <https://doi.org/10.1111/jdi.12469>

IDF Diabetes Atlas 2022 Reports | IDF Diabetes Atlas. <https://diabetesatlas.org/2022-reports/>

International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 10th ed. Brussels, Belgium: 2021. Available at: <https://www.diabetesatlas.org>

Kamatou, G. P., Vermaak, I., Viljoen, A. M., & Lawrence, B. M. (2013). Menthol: a simple monoterpene with remarkable biological properties. *Phytochemistry*, 96, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.08.005>

Khare, P., Mangal, P., Baboota, R. K., Jagtap, S., Kumar, V., Singh, D. P., Boparai, R. K., Sharma, S. S., Khardori, R., Bhadada, S. K., Kondepudi, K. K., Chopra, K., & Bishnoi, M. (2018). Involvement of Glucagon in Preventive Effect of Menthol Against High Fat Diet Induced Obesity in Mice. *Frontiers in pharmacology*, 9, 1244. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01244>

Khorami, S. A. H., Movahedi, A. R. I. Y. O., Huzwah, K., & Sokhini, A. M. M. (2015). PI3K/AKT pathway in modulating glucose homeostasis and its alteration in diabetes. *Annals of Medical and Biomedical Sciences*, 1(2), 46-55.

Kim, H. I., & Ahn, Y. H. (2004). Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in the glucose-sensing apparatus of liver and beta-cells. *Diabetes*, 53 Suppl 1, S60–S65. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.2007.s60>

Lei, H. Q., Li, D. M., Woo, M. W., Zeng, X. A., Han, Z., & Wang, R. Y. (2022). The antihyperglycemic effect of pulsed electric field-extracted polysaccharide of *Kaempferia elegans* officinale on streptozotocin induced diabetic mice. *Frontiers in nutrition*, 9, 1053811. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1053811>

Lewis, G. F., & Brubaker, P. L. (2021). The discovery of insulin revisited: lessons for the modern era. *The Journal of clinical investigation*, 131(1), e142239. <https://doi.org/10.1172/JCI142239>

Liu, Y., Yang, Z., Kong, D., Zhang, Y., Yu, W., & Zha, W. (2019). Metformin Ameliorates Testicular Damage in Male Mice with Streptozotocin-Induced Type 1 Diabetes through the PK2/PKR Pathway. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019, 5681701. <https://doi.org/10.1155/2019/5681701>

Ma, J., Meng, X., Liu, Y., Yin, C., Zhang, T., Wang, P., Park, Y. K., & Jung, H. W. (2020). Effects of a rhizome aqueous extract of *Dioscorea batatas* and its bioactive compound, allantoin in high fat diet and streptozotocin-induced diabetic mice and the regulation of liver, pancreas and skeletal muscle dysfunction.

Matouk, A. I., El-Daly, M., Habib, H. A., Senousy, S., Naguib Abdel Hafez, S. M., Kasem, A. W., Almalki, W. H., Alzahrani, A., Alshehri, A., & Ahmed, A. F. (2022). Protective effects of menthol against sepsis-induced hepatic injury: Role of mediators of hepatic inflammation, apoptosis, and regeneration. *Frontiers in pharmacology*, 13, 952337. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.952337>

Mostafavinia, A., Amini, A., Ghorishi, S. K., Pouriran, R., & Bayat, M. (2016). The effects of dosage and the routes of administrations of streptozotocin and alloxan on induction rate of type1 diabetes mellitus and mortality rate in rats. *Laboratory animal research*, 32(3), 160–165. <https://doi.org/10.5625/lar.2016.32.3.160>

Muruganathan, U., Srinivasan, S., & Vinothkumar, V. (2017). Antidiabetogenic efficiency of menthol, improves glucose homeostasis and attenuates pancreatic β -cell apoptosis in streptozotocin-nicotinamide induced experimental rats through ameliorating glucose metabolic enzymes. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 92, 229–239. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.068>

Nathan, D. M., Buse, J. B., Davidson, M. B., Ferrannini, E., Holman, R. R., Sherwin, R., Zinman, B., American Diabetes Association, & European Association for Study of Diabetes (2009). Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes care*, 32(1), 193–203. <https://doi.org/10.2337/dc08-9025>

Newsholme, P., & Krause, M. (2012). Nutritional regulation of insulin secretion: implications for diabetes. *The Clinical biochemist. Reviews*, 33(2), 35–47.

Nna, V. U., Bakar, A. B. A., Ahmad, A., & Mohamed, M. (2019). Down-regulation of steroidogenesis-related genes and its accompanying fertility decline in

streptozotocin-induced diabetic male rats: ameliorative effect of metformin. *Andrology*, 7(1), 110–123. <https://doi.org/10.1111/andr.12567>

Pearson, J. A., Wong, F. S., & Wen, L. (2016). The importance of the Non Obese Diabetic (NOD) mouse model in autoimmune diabetes. *Journal of autoimmunity*, 66, 76–88. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.08.019>

Petersen, M. C., Vatner, D. F., & Shulman, G. I. (2017). Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. *Nature reviews. Endocrinology*, 13(10), 572–587. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.80>

Rafacho, A., Giozzet, V. A., Boschero, A. C., & Bosqueiro, J. R. (2008). Functional alterations in endocrine pancreas of rats with different degrees of dexamethasone-induced insulin resistance. *Pancreas*, 36(3), 284–293. <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e31815ba826>

Ren, H., Shao, Y., Wu, C., Ma, X., Lv, C., & Wang, Q. (2020). Metformin alleviates oxidative stress and enhances autophagy in diabetic kidney disease via AMPK/SIRT1-FoxO1 pathway. *Molecular and cellular endocrinology*, 500, 110628. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110628>

Rodríguez, V., Plavnik, L., & Tolosa de Talamoni, N. (2018). Naringin attenuates liver damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 105, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.120>

Romana-Souza, B., Nascimento, A. P., & Monte-Alto-Costa, A. (2009). Propranolol improves cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *European journal of pharmacology*, 611(1-3), 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.03.053>

Rozza, A. L., Beserra, F. P., Vieira, A. J., Oliveira de Souza, E., Hussni, C. A., Martinez, E. R. M., Nóbrega, R. H., & Pellizzon, C. H. (2021). The Use of Menthol in Skin Wound Healing-Anti-Inflammatory Potential, Antioxidant Defense System

Stimulation and Increased Epithelialization. *Pharmaceutics*, 13(11), 1902. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111902>

Rozza, A. L., Hiruma-Lima, C. A., Takahira, R. K., Padovani, C. R., & Pellizzon, C. H. (2013). Effect of menthol in experimentally induced ulcers: pathways of gastroprotection. *Chemico-biological interactions*, 206(2), 272–278. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.10.003>

Rozza, A. L., Meira de Faria, F., Souza Brito, A. R., & Pellizzon, C. H. (2014). The gastroprotective effect of menthol: involvement of anti-apoptotic, antioxidant and anti-inflammatory activities. *PloS one*, 9(1), e86686. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086686>

Rui L. (2014). Energy metabolism in the liver. *Comprehensive Physiology*, 4(1), 177–197. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130024>

Schelz, Z., Molnar, J., & Hohmann, J. (2006). Antimicrobial and antiplasmodial activities of essential oils. *Fitoterapia*, 77(4), 279–285. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.03.013>

Sifuentes-Franco, S., Pacheco-Moisés, F. P., Rodríguez-Carrizalez, A. D., & Miranda-Díaz, A. G. (2017). The Role of Oxidative Stress, Mitochondrial Function, and Autophagy in Diabetic Polyneuropathy. *Journal of diabetes research*, 2017, 1673081. <https://doi.org/10.1155/2017/1673081>

Silva Filho, R. L. da, Albuquerque, L., Cavalcanti, S., Tambascia, M., Valente, F., & Bertoluci, M. (2022). Tratamento farmacológico da hiperglicemia no DM2. Diretriz Oficial Da Sociedade Brasileira de Diabetes. <https://doi.org/10.29327/557753.2022-10>

Soetedjo, A. A. P., Lee, J. M., Lau, H. H., Goh, G. L., An, J., Koh, Y., Yeong, W. Y., & Teo, A. K. K. (2021). Tissue engineering and 3D printing of bioartificial pancreas for regenerative medicine in diabetes. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 32(8), 609–622. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2021.05.007>

Solaimani, H., Soltani, N., MaleKzadeh, K., Sohrabipour, S., Zhang, N., Nasri, S., & Wang, Q. (2014). Modulation of GLUT4 expression by oral administration of Mg(2+) to control sugar levels in STZ-induced diabetic rats. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 92(6), 438–444. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2013-0403>

Sorour, O. A., Nassar, E., Sarhan, N., El-Anwar, N., ElKholy, R. A., Tahooun, D. M., Sweilam, A., & Tadros, D. (2023). Chronic sildenafil citrate use decreases retinal vascular endothelial growth factor expression in diabetic rats: a pilot study. *International journal of retina and vitreous*, 9(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s40942-023-00480-x>

Standring S (Editor). *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*. 41st edition. London: Elsevier; 2016. Chapter 78, Liver and Biliary System.

Szkudelski T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological research*, 50(6), 537–546.

Szkudelski T. (2012). Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.), 237(5), 481–490. <https://doi.org/10.1258/ebm.2012.011372>

Thomas, C. C., & Philipson, L. H. (2015). Update on diabetes classification. *The Medical clinics of North America*, 99(1), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2014.08.015>

Trefts, E., Gannon, M., & Wasserman, D. H. (2017). The liver. *Current biology* : CB, 27(21), R1147–R1151. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019>

Vaddi, H. K., Ho, P. C., & Chan, S. Y. (2002). Terpenes in propylene glycol as skin-penetration enhancers: permeation and partition of haloperidol, Fourier transform infrared spectroscopy, and differential scanning calorimetry. *Journal of pharmaceutical sciences*, 91(7), 1639–1651. <https://doi.org/10.1002/jps.10160>

Valderrama, I. H., Echeverry, S. M., Rey, D. P., Rodríguez, I. A., Silva, F. R. M. B., Costa, G. M., Ospina-Giraldo, L. F., & Aragón, D. M. (2022). Extract of Calyces from *Physalis peruviana* Reduces Insulin Resistance and Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *Pharmaceutics*, 14(12), 2758. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122758>

Volpe, C. M. O., Villar-Delfino, P. H., Dos Anjos, P. M. F., & Nogueira-Machado, J. A. (2018). Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications. *Cell death & disease*, 9(2), 119. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0135-z>

Winterbourn, C.C., Hawkins, R.E.; Brian, M., Carrel, R.W. (1985) The stimulation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med* 85, 337-341.

Witters L. A. (2001). The blooming of the French lilac. *The Journal of clinical investigation*, 108(8), 1105–1107. <https://doi.org/10.1172/JCI14178>

World Health Organization. (2022, September 16). Diabetes. Retrieved from World Health Organization website: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>

Xie, Z., Wu, B., Shen, G., Li, X., & Wu, Q. (2018). Curcumin alleviates liver oxidative stress in type 1 diabetic rats. *Molecular medicine reports*, 17(1), 103–108. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7911>

Xu, J., Liu, L. Q., Xu, L. L., Xing, Y., & Ye, S. (2020). Metformin alleviates renal injury in diabetic rats by inducing Sirt1/FoxO1 autophagic signal axis. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 47(4), 599–608. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13226>

Xu, L., Han, Y., Chen, X., Aierken, A., Wen, H., Zheng, W., Wang, H., Lu, X., Zhao, Z., Ma, C., Liang, P., Yang, W., Yang, S., & Yang, F. (2020). Molecular mechanisms underlying menthol binding and activation of TRPM8 ion

channel. *Nature communications*, 11(1), 3790. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17582-x>

Xu, X., Yi, H., Wu, J., Kuang, T., Zhang, J., Li, Q., Du, H., Xu, T., Jiang, G., & Fan, G. (2021). Therapeutic effect of berberine on metabolic diseases: Both pharmacological data and clinical evidence. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 133, 110984. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110984>

Zore, G., Thakre, A., Abdulghani, M., Bhosle, K., Shelar, A., Patil, R., Kharat, K., & Karuppayil, S. (2022). Menthol Inhibits *Candida albicans* Growth by Affecting the Membrane Integrity Followed by Apoptosis. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 2022, 1297888. <https://doi.org/10.1155/2022/1297888>

9. APÊNDICE

Certificado do protocolo experimental aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual Paulista (IBB/UNESP).



*Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Biociências de Botucatu*

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "MECANISMOS METABÓLICOS, BIOQUÍMICOS E MOLECULARES DO EFEITO ANTIADIABETOGENICO DO MENTOL EM RATOS HIPERGLICÊMICOS", protocolada sob o CEUA nº 9816221021 (ID 000322), sob a responsabilidade de **Ariane Leite Rozza** - 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 Estadual Paulista (IBB/UNESP) na reunião de 25/02/2022.

We certify that the proposal "METABOLIC, BIOCHEMICAL AND MOLECULAR PARAMETERS OF MENTOL ANTIADIABETOGENIC EFFECT USING HYPERGLICEMIC RATS", utilizing 40 Heterogenics rats (40 males), protocol number CEUA 9816221021 (ID 000322), under the responsibility of **Ariane Leite Rozza** - 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 São Paulo State University (IBB/UNESP) in the meeting of 02/25/2022.

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

Vigência da Proposta: de [11/2021](#) a [11/2024](#) Área: [Ciências Biológicas](#)

Origem: [Biotério Central da UNESP](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [2 a 4 meses](#)

N: [40](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [260 a 300 g](#)

Local do experimento: Biotério de Pequenos Mamíferos, departamento de Biologia Estrutural e Funcional

Botucatu, 03 de março de 2022

Prof. Dra. Ana Carolina Inhasz Kiss
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual Paulista

Prof. Assoc. Luis Fernando Barbisan
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual Paulista