

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 26/02/2021.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

AVALIAÇÃO DO CREME À BASE DE MENTOL NA
CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM RATOS
DIABÉTICOS

ANA JÚLIA VIEIRA

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

Orientadora: Ariane Leite Rozza

BOTUCATU – SP
2019

Vieira, Ana Júlia.

Avaliação do creme à base de mentol na cicatrização de feridas cutâneas em ratos diabéticos / Ana Júlia Vieira. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Ariane Leite Rozza

Capes: 33004064

1. Cicatrização de ferimentos. 2. Diabetes mellitus. 3. Mentol.

Palavras-chave: Cicatrização cutânea; Diabetes; Mentol.

Epígrafe

“Penso que cumprir a vida

Seja simplesmente

Compreender a marcha

E ir tocando em frente”

Almir Sater e Ricardo Teixeira

Dedicatória

Aos meus pais, Ana e Gilberto, ao meu irmão Júnior, a minha tia Creusa e a minha orientadora Profa. Dra. Arianne Leite Rozza.

Agradecimentos

Aos meus pais, Ana e Gilberto, que são o alicerce da minha vida, ao meu irmão, Júnior, a minha tia Creusa e minha prima Monize, que assim como meus pais sempre apoiaram minhas escolhas e me incentivaram,

A minha orientadora e amiga Profa. Dra. Arianne Leite Rozza, que me deu a oportunidade de conhecer a beleza da pesquisa científica, por todos ensinamentos e que é minha luz nos momentos de alegria, tristeza, dúvidas,

Aos membros da banca do exame de qualificação Dr. Sérgio Luis Felisbino, Dr. Carlos Alan Cândido Dias Júnior, Dr. Robson Francisco Carvalho e Dr. Celso Acácio Rodrigues de Almeida Costa pela disponibilidade e pelas contribuições valiosas,

Aos membros suplentes e titulares da banca da defesa da dissertação de mestrado Dra. Lucilene Delazari dos Santos, Dr. Sérgio Luis Felisbino, Dr. Carlos Alan Cândido Dias Júnior e Dra. Carla dos Santos Riccardi por aceitarem a contribuir com este trabalho,

A Profa. Dra. Maeli Dal Pai, por ter me orientado durante um período do mestrado,

Ao Prof. Dr. Rafael Henrique Nóbrega e ao Dr. Emanuel Ricardo Monteiro Martinez por toda ajuda nas análises de PCR, disposição e amizade,

Ao Prof. Luis Fernando Barbisan e ao seu aluno Gabriel Bacil pelos ensinamentos e ajuda na técnica de Western Blot,

A Profa. Dra. Cláudia Helena Pellizzon, por disponibilizar o laboratório,

Aos amigos e colegas de laboratório, que estão e passaram por aqui, Fernando, Bianca, Eduardo, Matheus, Carol, Ana Laura, Murilo, Mateus, Lucas, Mariana, por toda ajuda e pela paciência,

Aos professores, alunos e funcionários do Departamento de Morfologia, por sempre estarem dispostos a ajudar,

Aos amigos do mestrado, em especial Arianne, Aislan, Luciana, Luan, pela companhia nas disciplinas, almoços e momentos de descontração,

As minhas amigas Isadora, Gabi e Kalyne, que sempre me incentivaram e estavam dispostas a ouvir sobre as “coisas complicadas de cientista”,

A minha professora de inglês Mônica, pelos conselhos, aulas e amizade,

Aos amigos do coração Mayumi, Giovana, Glauber, Carol, Ana Sílvia, Deliane, Alice, Júlia, Marie, Jessy, Micheli, que fazem a vida mais divertida e leve,

A CAPES, pelo auxílio financeiro durante todo período do mestrado e a FAPESP, que financiou o auxílio à pesquisa,

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

Capítulo 1	1
Resumo	2
1.Introdução	3
1.1. Pele e Cicatrização	3
1.2.Pâncreas e Diabetes Mellitus	5
1.3. Modelo experimental de diabetes tipo 1	8
1.4. Fatores que influenciam na cicatrização em indivíduos diabéticos	8
1.5. Produtos naturais e cicatrização de feridas diabéticas	11
1.6. Mentol	12
2. Referências bibliográficas	16
Capítulo 2	22
MENTHOL-BASED CREAM, A NOVEL THERAPY FOR DIABETIC SKIN WOUNDS: THE ANTI-INFLAMMATORY, ANTIOXIDANT AND CELL PROLIFERATIVE ACTIVITIES	23
Abstract	23
1. Introduction	24
2. Material and Methods	24
3. Results	28
4. Discussion	36
5. Conclusion	38
6. References	38

Capítulo 1

Resumo

A hiperglicemia causada pelo diabetes prejudica o processo de cicatrização da ferida cutânea, promovendo uma resposta inflamatória crônica e aumento do estresse oxidativo. O mentol é um composto natural, encontrado no óleo essencial de folhas de plantas *Mentha*, que possui propriedades bactericida, fungicida, analgésica e anestésica descritas na literatura. O objetivo deste estudo foi investigar o potencial efeito cicatrizante do creme à base de mentol em feridas cutâneas de ratos hiperglicêmicos e seus mecanismos de ação. A hiperglicemia foi induzida em ratos Wistar machos (n=10) através de dose única de estreptozotocina (50 mg/kg, i.p.). Após confirmação do estado diabético (≥ 250 mg glicose/dL), os ratos foram divididos em três grupos: veículo, creme de insulina (0.5 U/g), creme à base de mentol (0.5%). Os animais foram anestesiados com quetamina (80 mg/kg, i.p.) e xilazina (40 mg/kg, i.p.) e a ferida cutânea foi confeccionada no dorso dos animais com um punch de 2 cm de diâmetro. A área da ferida foi medida, fotografada e tratada com cremes uma vez ao dia durante 14 dias. No final do período, os ratos foram eutanasiados, a área da ferida foi destinada a ensaios de atividade anti-inflamatória e antioxidante e expressão quantitativa de mRNA. Os níveis de NO foram dosados no plasma sanguíneo. Após 14 dias de tratamento, o grupo tratado com mentol apresentou redução na área da ferida (94%) em comparação com o grupo veículo (88%). Além disso, o grupo tratado com mentol apresentou níveis reduzidos de TNF- α e IL-6, diminuiu a atividade de MPO e a expressão de *Nfkb* e aumentou os níveis e a expressão de IL-10 e *Ki67*, além de maior atividade das enzimas antioxidantes SOD, GPx e GR e aumento nos níveis de GSH e NO. Em conjunto, esses resultados evidenciam que o creme à base de mentol acelerou o processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos hiperglicêmicos através das atividades anti-inflamatória e antioxidante e aumento da proliferação celular.

5. Conclusion

We investigated if the menthol-based cream was effective in the healing of skin wounds of streptozotocin-induced diabetic rats. After 14 days of treatment, menthol-based cream accelerated the skin wound healing in diabetic rats, by increasing the expression of *Ki67* and NO production, modulating the inflammatory response through decrease of *NfκB* mRNA expression, TNF- α and IL-6 levels and increasing IL-10 levels. Menthol also triggered an antioxidant response through increasing the enzymatic activities of SOD, GPx and GR, also increasing the levels of GSH and decreasing the activity of MPO. These promising results showed that menthol can be a target for future clinical trials and treatment of skin wounds of diabetics.

6. References

- Abbaszadeh, S., Sharifzadeh, A., Shokri, H., Khosravi, A.R., Abbaszadeh, A., 2014. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *J Mycol Med* 24, e51-e56.
- Almeida, M.E., Monteiro, K.S, Kato, E.E., Sampaio, S.C., Braga, T.T., Camara, N.O., Lamers, M.L., Santos, M.F., 2016. Hyperglycemia reduces integrin subunits alpha v and alpha 5 on the surface of dermal fibroblasts contributing to deficient migration. *Mol Cell Biochem* 421, 19-28.
- Ambrozova, N., Ulrichova, J., Galandakova, A., 2017. Models for the study of skin wound healing. The role of Nrf2 and NF- κ B. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 161, 1-13.
- Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M.S., Brem, H., Tomic-Canic, M., 2008. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* 16, 585-601.
- Bromm, B., Scharein, E., Darsow, U., Ring, J., 1995. Effects of menthol and cold on histamine-induced itch and skin reactions in man. *Neurosci Lett* 187, 157-160.
- Burrow, J.W., Koch, J.A., Chuang, H.H., Zhong, W., Dean, D.D., Sylvia, V.L., 2007. Nitric oxide donors selectively reduce the expression of matrix metalloproteinases-8 and -9 by human diabetic skin fibroblasts. *Journal of Surgical Research* 140, 90–98.
- Carlberg, I., Mannervick, B., 1985. Glutathione reductase. *Methods in Enzymol* 113, 484-499.

Dos Santos Gramma, L.S., Marques, F.M., Vittorazzi, C., de Andrade, T.A., Frade, M.A., de Andrade, T.U., Endringer, D.C., Scherer, R., Fronza, M., 2016. *Struthanthus vulgaris* ointment prevents an over expression of inflammatory response and accelerates the cutaneous wound healing. *J Ethnopharmacol* 190, 319-327.

Edmonds, M. E., Bodansky, H. J., Boulton, A. J., Chadwick, P. J., Dang, C. N., D'Costa, R., Johnston, A., Kennon, B., Leese, G., Rajbhandari, S. M., Serena, T. E., Young, M. J., Stewart, J. E., Tucker, A. T. and Carter, M. J., 2018. Multicenter, randomized controlled, observer-blinded study of a nitric oxide generating treatment in foot ulcers of patients with diabetes—ProNOx1 study. *Wound Rep Reg* (Epub ahead of print).

Falanga, V., 2005. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet*, 366, 1736–1743.

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. 1995. p. 237-248.

Galeotti, N., Di Cesare-Mannelli, L., Mazzanti, G., Bartolini, A., Ghelardini, C., 2002. Menthol: a natural analgesic compound. *Neurosci Lett* 322,145-148.

Galeotti, N., Ghelardini, C., Mannelli, L., Mazzanti, G., Baghiroli, L., Bartolini, A., 2001. Local anaesthetic activity of (+)- and (-)-menthol. *Planta Med* 67, 174-176.

Griess P. Comments on the treatise of the HH. Weselsky and Benedikt “About some azo compounds” *Ber German Chem Ges* 1879, 12, 426–428.

Huang, Y.W., Zhu, Q.Q., Yang, X.Y., Xu, H.H., Sun, B., Wang, X.J., Sheng, J., 2018. Wound healing can be improved by (-)-epigallocatechin gallate through targeting Notch in streptozotocin-induced diabetic mice. *FASEB J*2:fj201800337R

Kamatou, G.P.P., Vermaak, I., Vijoen, A.M., Lawrence, B.M., 2013. Menthol: A simple monoterpene with remarkable biological properties. *Phytochemistry* 96, 15-25.

Kant, V., Gopal, A., Pathak, N.N., Kumar, P., Tandan, S.K., Kumar, D., 2014. Antioxidant and anti-inflammatory potential of curcumin accelerated the cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int Immunopharmacol* 20, 322-330.

Lamers, M.L., Almeida, M.E., Vicente-Manzanares, M., Horwitz, A.F., Santos, M.F., 2011. High glucose-mediated oxidative stress impairs cell migration. *PLoS One* 6, e22865.

Li, W., Kandhare, A.D., Mukherjee, A.A., Bodhankar, S.L., 2018. Hesperidin, a plant flavonoid accelerated the cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats: Role of TGF- β /Smads and Ang-1/Tie-2 signaling pathways. *EXCLI J* 17, 399-419.

Lodhi, S., Singhai, A.K., 2013. Wound healing effect of flavonoid rich fraction and luteolin isolated from *Martynia annua* Linn. on streptozotocin induced diabetic rats. *Asian Pac J Trop Med* 6, 253-259.

Nóbrega, R.H., Greebe, C.D., van de Kant, H., Bogerd, J., de Franca, L.R., Schulz, R.W., 2010. Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish. *PlosOne* 5, e12808.

Ram, M., Singh, V., Kumar, D., Kumawat, S., Gopalakrishnan, A., Lingaraju, M.C., Gupta, P., Tandan, S.K., Kumar, D., 2014. Antioxidant potential of bilirubin-accelerated wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Arch Pharmacol* 387, 955-961.

Romana-Souza, B., Nascimento, A.P., Monte-Alto-Costa, A., 2009. Propranolol improves cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 611, 77-84.

Rozza, A.L., de Faria, F.M., 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, e86686.

Sarandy, M.M., Novaes, R.D., Xavier, A.A., Vital, C.E., Leite, J.P.V., Melo, F.C.S.A., Gonçalves, R.V., 2017. Hydroethanolic Extract of *Strychnos pseudoquina* Accelerates Skin Wound Healing by Modulating the Oxidative Status and Microstructural Reorganization of Scar Tissue in Experimental Type I Diabetes. 2017, 9538351.

Siqueira, M.F., Li J, Chehab, L., Desta, T., Chino, T., Krothpali, N., Behl, Y., Alikhani, M., Yang, J., Braasch, C., Graves, D.T., 2010. Impaired wound healing in mouse models of diabetes is mediated by TNF- α dysregulation and associated with enhanced activation of forkhead box O1 (FOXO1). *Diabetologia* 53, 378-388.

Sun, C., Sun, L., Ma, H., Peng, J., Zhen, Y., Duan, K., Liu, G., Ding, W., Zhao, Y., 2012. The phenotype and functional alterations of macrophages in mice with hyperglycemia for long term. *J Cell Physiol* 227, 1670-1679.

Vischer, H.F., Teves, A.C., Ackermans, J.C., van Dijk, W., Schulz, R.W., Bogerd, J., 2003. Cloning and spatiotemporal expression of the follicle-stimulating

hormone beta subunit complementary DNA in the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Biol Reprod* 68,1324-1332.

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 Dis* 9, 119.

Weledji, E.P., Fokam, P., 2014. Treatment of the diabetic foot – to amputate or not? *BMC Surg* 14, 83.

Winterbourn, C.C., Hawkins, R.E.; Brian, M., Carrel, R.W., 1995. The stimulation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med* 85, 337-341.

Xuan, Y.H., Huang, B.B., Tian, H.S., Chi, L.S., Duan, Y.M., Wang, X., Zhu, Z.X., Cai, W.H., Zhu, Y.T., Wei, T.M., Ye, H.B., Cong, W.T., Jin, L.T., 2014. High-glucose inhibits human fibroblast cell migration in wound healing via repression of bFGF-regulating JNK phosphorylation. *PLoS One* 9, e108182.