

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 01/07/2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

FERNANDO PEREIRA BESERRA

Mecanismos envolvidos no efeito cicatrizante de feridas cutâneas do lupeol isolado das cascas do caule de *Bowdichia virgilioides* Kunth. (Fabaceae) em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*

**Botucatu - São Paulo
2019**



unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



FERNANDO PEREIRA BESERRA

Mecanismos envolvidos no efeito cicatrizante de feridas cutâneas do lupeol isolado das cascas do caule de *Bowdichia virgilioides* Kunth. (Fabaceae) em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Área de concentração: Biotecnologia aplicada à saúde humana e animal, Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Profa. Dra. Cláudia Helena Pellizzon

Co-orientador: Profa. Dra. Ariane Leite Rozza

**Botucatu - São Paulo
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Beserra, Fernando Pereira.

Mecanismos envolvidos no efeito cicatrizante de feridas cutâneas do lupeol isolado das cascas do caule de *Bowdichia virgilioides* Kunth. (Fabaceae) em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* / Fernando Pereira Beserra. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Cláudia Helena Pellizzon
Coorientador: Ariane Leite Rozza
Capes: 90400003

1. Ferimentos e lesões. 2. Cicatrização. 3. Hiperglicemia.
4. Produtos naturais.

Palavras-chave: Cicatrização; Feridas cutâneas;
Hiperglicemia; Lupeol; Triterpeno.

FERNANDO PEREIRA BESERRA

Mecanismos envolvidos no efeito cicatrizante de feridas cutâneas do lupeol isolado das cascas do caule de *Bowdichia virgilioides* Kunth. (Fabaceae) em modelos experimentais *in vivo e in vitro*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Área de concentração: Biotecnologia aplicada à saúde humana e animal, Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor.

Aprovado em ____ / ____ / 2019

BANCA EXAMINADORA

1º Titular/Presidente

Profa. Dra. Cláudia Helena Pellizzon (IBB/UNESP)

2º Titular

Profa. Dra. Gabriela Lemos de Azevedo Maia (FCF/UNIVASF)

3º Titular

Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos (FCFRP/USP)

4º Titular

Prof. Dr. Luis Fernando Barbisan (IBB/UNESP)

5º Titular

Profa. Dra. Carla dos Santos Riccardi (FCA/UNESP)

Auxílio Financeiro:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Programa Ciências Sem Fronteiras (Csf)



“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito... não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes...”

Martin Luther King

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Maria do Carmo e Jucelino, o alicerce que me ampara em todos os momentos da minha vida, que mesmo distantes no decorrer desta caminhada, se fizeram presentes, pelo amor, carinho e todo apoio e incentivo necessário.

*A cada um dos **ratos** que tiveram suas vidas sacrificadas em prol da nobre tentativa de se obter novos medicamentos que amenizem e curem as mazelas da humanidade.*

Agradecimentos

Não sei se estou terminando uma etapa ou apenas iniciando outra. Só sei que é com grande felicidade e enorme dose de alívio que chego ao final desta tese. Nada seria possível sem a saúde que Deus me proporcionou e as pessoas que ele colocou em meu caminho e, desse modo, seria injusto se não as agradecesse enormemente.

Antes de tudo, agradeço primeiramente a **Deus**, a fonte de toda a sabedoria, energia cósmica universal, criador e Senhor da minha vida, aquele que encarnado em Cristo, demonstra que somente o amor pode transformar conhecimento e inteligência em sabedoria.

Aos meus pais, **Jucelino e Maria do Carmo**, expressão maior desse amor sábio de Deus em minha vida, que nunca mediram esforços para propiciar tão grande riqueza na minha vida, a educação, os valores e ensinamentos que recebi, aos quais sempre buscarei ser fiel. Obrigado também por todo o apoio que tive de vocês, pelo incentivo e mesmo sem entender muito dos detalhes deste trabalho, morriam de orgulho. No meio de toda a dificuldade, o meu suprimento chamou pai e mãe!

Ao meu irmão **Leonardo**, pelo apoio, força e estímulo durante essa caminhada, e junto com a sua esposa **Maiana**, por nos agraciarem com duas princesas lindas, **Nicolly e Amanda**, os melhores presentes que chegaram pra mudar as nossas vidas. Amo muito vocês!

À **Paula**, minha namorada, companheira e amiga. Parafrazeando o grande poeta Vinícius de Moraes: “A vida é a arte do encontro, embora haja tantos desencontros pela vida”. Fui agraciado por ter (re) encontrado você e naqueles quase 2 anos que percorremos separados, a vida nos mostrou que o amor nunca acaba, apenas se transforma. A Paula me fez redescobrir o significado da palavra “recomeçar”, trazendo amadurecimento, novos sentimentos e momentos bons para a minha existência. Muito obrigado por entender todos os momentos que me ausentei mesmo estando presente, até mesmo aqueles que eu não estaria presente, como foi nos dois períodos de estágio de doutorado sanduíche, o primeiro deles em 2016 e o segundo em 2018. Superamos além da distância, tantas coisas juntos nesse período. Obrigado também, por sonhar comigo os meus sonhos, pelo carinho e paciência, que tantas vezes me trouxeram alento e completude, e pelas palavras de apoio quando tudo parecia estagnado. Você não foi só amparo, mas também cuidado, amor, incentivo, e muito mais... enfim, você foi essencial. Te amo!!!

Agradeço a toda família da minha namorada, que se tornou a minha família também, a família de Botucatu, **Antônio, Sandra, Leonardo e Juliana**, que compartilharam comigo tantas datas, viagens e comemorações... momentos bons, incluindo os tradicionais almoços e jantas, seja durante a semana ou nos finais de semana, os quais apoiaram e torceram durante toda a jornada deste projeto. Obrigado pela confiança, o cuidado, atenção e fazer me sentir em casa na casa de vocês. Minha gratidão!

Agradeço a minha orientadora **Profa. Dra. Cláudia Helena Pellizzon**, pelo acolhimento e aceitação na orientação deste projeto, quando tudo parecia sem rumo... pela oportunidade de convívio, o aprendizado diário, pela paciência, persistência e o principal: por não ter desistido de mim. Te agradeço por tudo que sempre precisei, pelas conversas, risadas, piadas, pelos “puxões de orelhas” também, e por sempre me acalmar e dar diferentes perspectivas me mostrando caminhos. Obrigado pelo apoio ao me deixar voar nas grandes oportunidades que me surgiram, mas por me segurar no chão também quando era necessário.

Meus sinceros agradecimentos à **Profa. Ariane Leite Rozza**, por ter me salvado no momento mais difícil de todos, me apresentando à Profa. Cláudia e o LEPN, onde seria o meu futuro local de trabalho durante esses quatro anos. Obrigado pela co-orientação nesse estudo, por ter ajudado na idealização e construção desse projeto, bem como na execução de toda a parte experimental com toda calma, paciência e atenção.

À **Profa. Gabriela Maia**, da UNIVASF, que por intermédio do **Prof. José Maria Barbosa**, gentilmente aceitou colaborar com o nosso projeto, fornecendo o lupeol isolado da planta sucupira-preta, objeto de estudo principal nesse trabalho.

À **Profa. Maria Helena**, da UNICAMP, pela confiança depositada através daquele único e-mail enviado, solicitando esta colaboração, e dessa forma, nos presentear com o creme de insulina, utilizado como controle positivo em nossos estudos em ratos hiperglicêmicos.

À toda equipe do **LEPN**, aos que ainda permanecem no lab e também aos que já estão em outros caminhos: **Danilo, Patrícia, Mariana, Júlio, Amanda, Eduardo, Matheus, Fernanda, Murilo Tirelli, Bianca, Ana Laura, Murilo Ciciliato e Carol**. Agradeço por terem compartilhado o ambiente de trabalho, nos momentos bons e ruins também, tornando o ambiente de trabalho mais agradável. Um especial agradecimento ao **Lucas (Zaraga)**, pelo companheirismo, amizade, presteza e por toda a ajuda sempre que precisei. Talvez o Zaraga não tem ideia do tamanho da contribuição que ele teve na minha formação. Sempre muito

solícito desde o seu mais vasto conhecimento teórico, nos estudos compartilhados para as provas e seminários de Biologia Molecular e Bioquímica, ao prático, botando a mão na massa e me auxiliando na condução de diversas análises, inclusive as análises histológicas e imunohistoquímicas. Minha grande e eterna admiração pelo ser humano bom que você é. Agradeço também à **Ana Jú**, pela parceria em quase toda a parte experimental e por ter aceitado o desafio de padronizar o modelo de feridas em ratos hiperglicêmicos, além de toda a assistência nas análises de qPCR, principalmente nos momentos em que eu estive ausente do laboratório. Obrigado pela dedicação, a capacidade, perseverança e crescimento durante todo esse tempo. Você também foi uma peça fundamental na construção dessa tese.

Ao **Prof. Rafael Henrique Nóbrega e seu grupo de pesquisadores**, por sempre disponibilizar seu laboratório para os experimentos de qPCR e tudo mais que precisei, além das conversas técnicas, científicas e da vida. Ao **Dr. Emanuel Martinez**, cientista muito competente que prontamente nos ajudou na padronização, análise e interpretação de todos os dados relacionados à técnica de qPCR. Todas as dúvidas que tive, ele sempre foi consultado. Nunca fiquei sem resposta, seja ela prática ou filosófica.

Ao **Prof. Christopher Jackson**, meu “paizão científico”, que me supervisionou durante 6 meses em meu primeiro estágio de doutorado sanduíche através do CNPq/Csf, no Kolling Institute of Medical Research, da Universidade de Sydney (Austrália). Obrigado por toda a paciência, encorajamento e disposição em compartilhar o seu conhecimento, por dispensar o seu tempo para sentar comigo nas bancadas dos laboratórios, por explicar todos os princípios de cada técnica de rotina do laboratório, pelas leituras atentas do meu trabalho e valiosas sugestões dadas no decorrer desse estudo. Sou eternamente grato por tudo que o Chris fez e ainda vem fazendo por mim. Agradeço também toda a equipe do Sutton Lab, **Meilang Xue, Yan Peng, Hang Li, Kelly Jeffrey e Ruilong Zhang** por me ensinarem pacientemente os protocolos e por todo o tempo gasto à mim.

Ao **Prof. Michał Żmijewski**, por me aceitar e me receber tão bem para a realização do meu segundo estágio de doutorado sanduíche, através da BEPE-FAPESP durante 5 meses no Departamento de Histologia da Universidade Médica de Gdańsk, em Gdańsk, Polônia. Talvez eu pouco confiei quando através daquele primeiro e-mail fosse surgir essa oportunidade que posteriormente se tornasse nesta grande parceria. Sou eternamente grato a tudo que Deus tem me proporcionado, por ter colocado o Prof. Michał em meu caminho, grande mentor, chefe e mais do que isso, um grande líder. Agradeço-o pela oportunidade de me apresentar esse mundo

do “melanoma” e as valiosas ferramentas que a mim foram oferecidas, como o cediranib, 1,25(OH)2D3 e Calcipotriol. Meu carinho a **todos do VitDLab, Adam Figarski, Tomasz Wasiewicz, Dominika Pankanin, Anna Piotrowska, Anna Olszewska, Elwirka Smolinska, Andrzej Slominski** e, especialmente, a **Justyna Wierzbicka**, por me supervisionar e acompanhar em praticamente todos os experimentos. Esse grupo de pesquisa é fantástico. A energia positiva do VitDLab fez a diferença nos resultados.

A **todos os servidores do Departamento de Morfologia**, especialmente, **os Professores: Sérgio, Maeli e Robson**, pelas palavras de apoio, ensinamentos e observações didáticas. Agradeço também o **Prof. Luís Fernando Barbisan**, e toda sua equipe de laboratório, por tantas vezes terem cedido equipamentos ou materiais para a execução de alguns experimentos. Não poderia deixar de mencionar os nomes de **José Eduardo e Ricardo Teixeira** (servidores técnicos do Depto), que tanto contribuíram com esse trabalho através do auxílio na preparação das lâminas para as análises histológicas.

A todas as pessoas que passaram pelo Departamento de Morfologia e os atuais colegas de departamento. Um agradecimento e um salve especial ao grupo “morféticos” do WhatsApp, **Bacil, Tupã, Zaraga e Cravinho**.

Deixo aqui os meus agradecimentos ao Professor e amigo **Willian Fernando Zambuzzi do Departamento de Química e Bioquímica**, também grande líder, brilhante pesquisador, a personificação da dedicação à ciência e muita competência em tudo aquilo que faz. Obrigado por todo o apoio, pelas portas abertas de sua sala para que eu pudesse explorar minhas curiosidades científicas, mas também pelos conselhos, orientações e estímulos, ressaltando sempre o meu potencial. Jamais me esquecerei daquele empurrãozinho inicial dado através daquela carta de referência sobre a minha pessoa, conforme solicitado pelo Prof. Christopher, e dessa forma, contribuindo para a realização do meu estágio no exterior.

A todos os meus amigos de Repúblicas em que passei durante esse tempo, **República Mato-Minas e Zona Azul**, especialmente aqueles cuja amizade prevaleceu até os dias atuais, **Bruno (Alagoas), Hugo (Manaus), Vinícius (Papada), Vitoldo (Frozen), Nilton e Fábio**. Agradeço também os companheiros atuais, **Edilson e Célio**, pelo apoio incondicional e por me acolherem na casa que hoje se tornou mais uma grande pequena família.

Aos meus inúmeros amigos de Gurupi ou Palmas, **Ricardo, Guilherme, Eloi, Tia Karine, Tio Eveni, Talyta, Tyrza, Hellen, Daniela**, e especialmente, os bravos, guerreiros e

resistentes “Little lambs...”, **Renato, Filipe, Daniel, Karol, Ludmilla, Jonathan e Léo**, que viram toda essa história surgir, e que me deram o incentivo necessário até aqui, que apesar da distância, sempre há os reencontros, mostrando que amizade verdadeira permanece pra sempre. *“Aqueles que passam por nós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”* (Antoine de Sant-Exupery).

Aos colegas da Pós-Graduação mais jovem do IB (Biotecnologia), seja pelo coleguismo nas disciplinas cursadas, os desesperos compartilhados, ajudas necessárias e, claro, as cervejadas que deram certo, Ufa!

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, em especial ao **Davi**, por estar sempre disposto a ajudar e resolver os contra-tempos e todas a burocracias da Pós-Graduação.

Não posso deixar de agradecer também **os funcionários do Biotério Central**, especialmente, à **Sislayne**, pela paciência, atenção e os serviços prestativos.

Aos membros da banca examinadora, pelo interesse, disposição e as valiosas sugestões que muito servirão para o crescimento deste trabalho.

Agradeço à **CAPES**, pelos primeiros 15 meses de bolsa no programa antes que saísse a FAPESP.

Agradeço ao **CNPq**, pela concessão dos 6 meses de bolsa de doutorado sanduíche no exterior através do Programa ciências sem fronteiras, na Universidade de Sydney, Sydney, Austrália (Processo nº: 02513/2015-7).

Agradeço à **FAPESP**, por ter financiado a pesquisa que originou essa tese, com uma bolsa de doutorado no país, processo nº: 2014/23247-4 e pelo projeto de auxílio regular, processo nº: 2013/23340-1, o qual financiou integralmente este projeto. Agradeço também pela bolsa BEPE/FAPESP, processo nº: 2017/17600-1, que possibilitou a minha segunda ida ao exterior para um estágio de pesquisa na Universidade Médica de Gdańsk, em Gdańsk, Polônia.

Há muito mais a quem agradecer... a todos aqueles que, embora não nomeados, me brindaram com seus inestimáveis apoios em distintos momentos e por suas presenças efetivas, o meu reconhecido **MUITO OBRIGADO!!!**

PRÓLOGO

O projeto de doutorado possibilitou a formação específica em Biotecnologia, com estudos direcionados para a caracterização da atividade cicatrizante do lupeol estudada em modelos *in vitro* e *in vivo*. Durante a execução do projeto de doutorado, foram realizadas outras atividades, no intuito de enriquecer a formação profissional e científica do aluno.

Estágios de doutorado sanduíche

1. CNPq – Process nº: 202513/2015-7. Project: “*Effect of the triterpene lupeol isolated from Bowdichia virgilioides Kunth (Fabaceae) on the proliferation, apoptosis, migration and wound closure in cultured human keratinocytes*”. Kolling Institute of Medical Research, The University of Sydney, Sydney, Australia. Effective date: May/2016 up to October/2016.

2. FAPESP – Process nº: 2018/06042-0. Project: “*Interaction between Vitamin D analogs and anticancer drug (cediranib) in human malignant melanoma cell lines*”. Department of Histology, Medical University of Gdansk, Gdansk, Poland. Effective date: Jun/2018 up to November/2018.

Trabalhos completos publicados em periódicos científicos

- Vieira, A.J. ; **Beserra, F.P.** ; Souza, M.C. ; Totti, B.M. ; Rozza, A.L. . Limonene: Aroma of innovation in health and disease. *Chemico-Biological Interactions*, v. 283, p. 97-106, 2018.
- **Pereira Beserra, Fernando**; Xue, Meilang; Maia, Gabriela ; Leite Rozza, Ariane; Helena Pellizzon, Cláudia ; Jackson, Christopher. Lupeol, a Pentacyclic Triterpene, Promotes Migration, Wound Closure, and Contractile Effect In Vitro: Possible Involvement of PI3K/Akt and p38/ERK/MAPK Pathways. *Molecules*, v. 23, p. 2819, 2018.
- De Souza, Matheus Chiaradia ; Vieira, Ana Júlia ; **Beserra, Fernando Pereira**; Pellizzon, Cláudia Helena; Nóbrega, Rafael Henrique; Rozza, Ariane Leite. Gastroprotective effect of limonene in rats: influence on oxidative stress, inflammation and gene expression. *Phytomedicine*, v. 53, p. 37-42, 2018.
- Souza, M. O.; Gushiken, L. F. S.; **Beserra, F. P.**; Pellizzon, C. H. Evaluation of the Gastroprotective and Antioxidant Effects of Caffeine and Caffeic Acid on EthanolInduced Gastric Ulcer. *JSM hepatitis*, v. 2, p. 1-5, 2017.

- Gushiken, Lucas Fernando Sérgio; Hussni, Carlos Alberto; Bastos, Jairo Kenupp; Rozza, Ariane Leite; **Beserra, Fernando Pereira**; Vieira, Ana Júlia; Padovani, Carlos Roberto; Lemos, Marivane; Polizello Junior, Maurilio; Silva, Jonas Joaquim Mangabeira Da; Nóbrega, Rafael Henrique; Martinez, Emanuel Ricardo Monteiro; Pellizzon, Cláudia Helena. Skin Wound Healing Potential and Mechanisms of the Hydroalcoholic Extract of Leaves and Oleoresin of *Copaifera langsdorffii* Desf. Kuntze in Rats. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, v. 2017, p. 1-16, 2017.
- **Beserra, Fernando**; De Cássia Santos, Raquel; Périco, Larissa; Rodrigues, Vinicius; De Almeida Kiguti, Luiz; Saldanha, Luiz; Pupo, André; Da Rocha, Lúcia; Dokkedal, Anne; Vilegas, Wagner; Hiruma-Lima, Clélia. Cissus sicyoides: Pharmacological Mechanisms Involved in the Anti-Inflammatory and Antidiarrheal Activities. International Journal of Molecular Sciences (Online), v. 17, p. 149, 2016.
- Gushiken, Lucas F.; **Beserra, Fernando P.**; Rozza, Ariane L.; Bérnago, Patrícia L.; Bérnago, Danilo A.; Pellizzon, Cláudia H. Chemical and Biological Aspects of Extracts from Medicinal Plants with Antidiabetic Effects. The Review of Diabetic Studies (Print), v. 13, p. 96-112, 2016.
- Périco, Larissa Lucena; Heredia-Vieira, Silvia Cristina; **Beserra, Fernando Pereira**; De Cássia Dos Santos, Raquel ; Weiss, Marcio Barczyszyn ; Resende, Flavia Aparecida ; Dos Santos Ramos, Matheus Aparecido; Bonifácio, Bruna Vidal; Bauab, Taís Maria; Varanda, Eliana Aparecida; De Gobbi, Juliana Irani Fratucci; Da Rocha, Lúcia Regina Machado; Vilegas, Wagner; Hiruma-Lima, Clélia Akiko. Does the gastroprotective action of a medicinal plant ensure healing effects? An integrative study of the biological effects of *Serjania marginata* Casar. (Sapindaceae) in rats. Journal of Ethnopharmacology, v. 172, p. 312-324, 2015.

Capítulos de livros publicados

- **Beserra, F. P.**; Gushiken, L. F. S.; Hussni, M. F.; Pellizzon, C. H. Regulatory mechanisms and chemical signaling of mediators involved in the inflammatory phase of cutaneous wound healing. In: Kamil Hakan Dogan. (Org.). Wound Healing. xxed. London: IntechOpen, 2018, v.2, p.12-23.
- Vieira, A. J.; **Beserra, Fernando P.**; Totti, B. M.; Souza, M. C.; Pellizzon, C. H.; Rozza, A. L. Epicatechin, a True Scientific Challenge: A Review of the Most Recent Preclinical Studies. Epicatechin: Sources, Effects and Research. 3ed. New York: Nova Science Publishers, 2017, v. 2, p. 71-98.

- Rozza, A. L.; Gushiken, L. F. S.; Vieira, A. J.; **Beserra, F.P.**; Pellizzon, C. H. Diabetic skin wound healing and the use of medicinal plants. In: V.K.Gupta. (Org.). The Natural Products: Research Review. 4ed.: Astral, 2016, v. 4, p. 479-491.
- Gushiken, L. F. S.; Rozza, A. L.; Vieira, A. J.; **Beserra, F.P.**; Pellizzon, C. H. Essential oils and their use in skin wound healing. In: V.K. Gupta. (Org.). Natural Products: Research Review. 4ed.: New Delhi: Daya Publishing House, 2016, v. 3, p. 501-513.
- **Beserra, Fernando Pereira**; Rozza, Ariane Leite; Vieira, Ana Júlia; Sérgio Gushiken, Lucas Fernando; Pellizzon, Cláudia Helena. Antiulcerogenic Compounds Isolated From Medicinal Plants. Studies in Natural Products Chemistry. 47ed.: Elsevier, 2016, v.3, p.215-234.

Trabalhos apresentados na forma de painel e oral em eventos científicos internacionais

- **Beserra, F.P.**; Rozza, A. L.; Maia, G. L. A.; Vieira, A. J.; Gushiken, L. F. S.; Xue, M.; Jackson, C.; Pellizzon, C. H. Lupeol, a dietary triterpene, inhibits inflammation and promotes migration and angiogenesis via Pi3k/Akt and Mapk pathways. In: Symposium on Advanced Wound Care, 2018, Charlotte. Oral & Poster Abstracts SAWC/SPRING, 2018.
- **Beserra, F. P.**; Vieira, A. J.; Souza, E. O.; Gushiken, L. F. S.; Hussni, C. A.; Maia, G. L. A.; Rozza, A. L.; Pellizzon, C. H. Lupeol, a triterpene isolated of *Bowdichia virgilioides* Kunth. (steam bark) accelerates cutaneous wound healing in diabetic rats. In: 21th International Congress of Phytopharm, 2017, Graz, Austria. Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy. Graz, 2017. v. 15.
- **Beserra, F. P.**; Maia, G. L. A.; Rozza, A. L.; Pellizzon, C. H.; Xue, M.; Jackson, C. In vitro wound healing potential of the triterpene Lupeol isolated from the steam bark of *Bowdichia virgilioides* Kunth. In: 21th International Congress of Phytopharm, 2017, Graz, Austria. Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy. Graz, 2017. v. 15.
- Vieira, A. J.; **Beserra, F. P.**; Pellizzon, C. H.; Rozza, A. L. Menthol, a cool alternative on treatment of skin wounds in diabetics rats. In: 11th International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2017, Ribeirão Preto. Anais do CIFARP, 2017.
- **Beserra, F. P.**; Bergamo, D. A.; Bergamo, P. L.; Vieira, A. J.; Hussni, C. A.; Maia, G. L. A.; Rozza, A. L.; Pellizzon, C. H. Modulation of pro- and anti-inflammatory cytokines contribute to the healing effect of the triterpene lupeol in cutaneous wounds in rats. In: 14th International Congress of Immunology, 2016, Melbourne. Abstract book of 14th ICI, 2016.
- Rodrigues, V. P.; Ohara, R.; **Beserra, F.P.**; Perico, L. L.; Dias, M. J.; Vilegas, W.; Rocha, L. R. M.; Hiruma-Lima, C. A. Anti-inflammatory effect of the hydroalcoholic extract of *Mimosa*

caesalpiniifolia Benth (Mimosidaea) in animal model. In: IV International Symposium on Drug Discovery, 2015, Araraquara. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 2015.

Trabalhos apresentados na forma de painel e oral em eventos científicos nacionais

- Vieira, A. J.; **Beserra, F.P.**; Pellizzon, C. H.; Rozza, A. L. Topic use of menthol accelerates skin wound healing in diabetic rats. In: X Encontro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, 2018, Botucatu. Anais do X Encontro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, 2018.
- Vieira, A. J.; **Beserra, F. P.**; Pellizzon, C. H.; Martinez, E. R. M.; Nobrega, R. H.; Rozza, A. L. Tratamento tópico com creme de mentol na cicatrização de feridas cutâneas em ratos diabéticos. In: XXV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2018, São Paulo. Anais do XXV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2018.
- Souza, M. C.; Vieira, A. J.; **Beserra, F. P.**; Pellizzon, C. H.; Nobrega, R. H.; Rozza, A. L. Análises de atividade antioxidante, anti-inflamatória e de expressão gênica do limoneno em úlceras gástricas experimentais em ratos. In: XXV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2018, São Paulo. Anais do XXV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2018.
- Vieira, A. J.; **Beserra, F. P.**; Pellizzon, C. H.; Martinez, E. R. M.; Nobrega, R. H.; Rozza, A. L. Creme de mentol promove a proliferação celular e tem ação anti-inflamatória em feridas cutâneas de ratos. In: IV Workbiotech, 2018, Botucatu. Anais do IV Workbiotech, 2018.
- Hussni, M. F.; Gushiken, L. F. S.; **Beserra, F. P.**; Takahira, R. K.; Hussni, C. A.; Pellizzon, C. H. Initial trial to development of new use drug aiming the skin wound treatment for clinical application in horses. In: 50th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics (SBFTE), 2018, Ribeirão Preto. Abstract book from 50th SBFTE, 2018.
- **Beserra, F.P.**; Vieira, A. J.; Gushiken, L. F. S.; Hussni, C. A.; Maia, G. L. A.; Nobrega, R. H.; Martinez, E. R. M.; Rozza, A. L.; Pellizzon, C. H. Lupeol enhances wound healing process in hyperglycemic rats via modulatory effects on inflammation, oxidative stress, re-epithelialization and angiogenesis. In: 7th Brazilian Biotechnology Congress, 2018, Brasília. Anais do 7th cbbiotech, 2018.
- Vieira, A. J.; **Beserra, F. P.**; Pellizzon, C. H.; Rozza, A. L. Menthol, a cool alternative on treatment of skin wounds in diabetic rats. In: 11th International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2017, Ribeirão Preto. Anais do CIFARP, 2017.
- **Beserra, F.P.**; Vieira, A. J.; Bergamo, D. A.; Bergamo, P. L.; Gushiken, L. F. S.; Hussni, C. A.; Maia, G. L. A.; Rozza, A. L.; Pellizzon, C. H. Histomorphometric characteristics of

cutaneous lesions of rats after topical treatment with Lupeol, a triterpene isolated from *Bowdichia virgilioides* Kunth. In: III Workbiotech: Workshop da Pós Graduação em Biotecnologia e II Symposium on Cellular Dynamics: Building Insights and Breaking Boundaries, 2017, Botucatu. Anais do III Workbiotech, 2017.

- Vieira, A. J.; **Beserra, F. P.**; Vendrami, A. C.; Souza, E. O.; Pellizzon, C. H.; Rozza, A. L. Menthol-based cream as treatment of skin wounds in diabetic rats. In: IX Encontro da Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, 2016, Botucatu. Anais do IX Encontro da Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu. Botucatu, 2016.
- Rozza, A. L.; Vieira, A. J.; **Beserra, F. P.**; Pellizzon, C. H. Atividade antioxidante do mentol na cicatrização cutânea em ratos. In: 19º Encontro Nacional de Biomedicina, 2016, Botucatu. Anais do 19º ENBM, 2016.
- Souza, M. O.; Gushiken, L. F. S.; **Beserra, F. P.**; Pellizzon, C. H. Cafeína é citoprotetora mediante indução de úlceras gástricas em roedores. In: VIII Simpósio Ibero-americano de Plantas Medicinais, 2016, Itajaí. Anais do VIII Simpósio Ibero-americano de Plantas Medicinais, 2016.
- Souza, E. O.; Vendrami, A. C.; **Beserra, F. P.**; Takahira, R. K.; Rozza, A. L.; Pellizzon, C. H. Efeitos do uso de creme à base de mentol na cicatrização de feridas cutâneas em ratos diabéticos. In: XXVII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2015, Botucatu. Anais do XXVII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2015
- Vieira, A. J.; Bergamo, P. L.; **Beserra, F. P.**; Rozza, A. L.; Pellizzon, C. H. Cicatrização de feridas utilizando creme à base de mentol em ratos. In: XXVII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2015, Botucatu. Anais do XXVII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2015
- Bergamo, P. L.; Bergamo, D. A.; Rozza, A. L.; Maia, G. L. A.; **Beserra, F. P.**; Pellizzon, C. H. Avaliação do efeito cicatrizante do Lupeol isolado de *Bowdichia virgilioides* Kunth (Sucupira-Preta) em lesões cutâneas em ratos. In: XXVII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2015. Anais do XXVII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2015.
- Bergamo, D. A.; Bergamo, P. L.; **Beserra, F. P.**; Maia, G. L. A.; Rozza, A. L.; Pellizzon, C. H. Avaliação do efeito anti-inflamatório do creme à base de lupeol sobre o processo de cicatrização de feridas cutâneas através da mensuração dos níveis de TNF- α . In: 18º Encontro Nacional de Biomedicina, 2015, Botucatu. Anais do 18º ENBM, 2015.

Cursos

- Basic Immunology Course. (Carga horária: 4h). Monash University, Monash, Austrália, **2016**.
- Parasitic worms: should we reunite with these old friends. (Carga horária: 2h), **2016**.
Kolling Institute of Medical Research, The University of Sydney, USYD, Austrália.
- Novel pathways in the development of diabetic nephropathy. (Carga horária: 20h), Kolling Institute of Medical Research, The University of Sydney, USYD, Austrália, **2016**.

Participação em bancas de comissões julgadoras

1. **Beserra, F.P.** XXVI CIC Congresso de Iniciação Científica da UNESP. 2014. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
2. **Beserra, F.P.** XXVII CIC Congresso de Iniciação Científica da UNESP. 2015. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

Organização de eventos científicos

1. **Beserra, F.P.** III WorkBiotech - Workshop de Biotecnologia da Unesp. 2017.
2. **Beserra, F.P.** XIV Workshop da Pós-Graduação da UNESP. 2015.

Participação em eventos científicos

1. 7th Brazilian Biotechnology Congress, Brasília, Brasil. 2018
2. Symposium on Advanced Wound Care, Charlotte, USA. 2018.
3. III Workshop de Biotecnologia. 2017.
4. 21th International Congress of Phytopharm, Graz, Austria. 2017.
5. II Feira Internacional da UNESP e Road Show, São Paulo, Brasil. 2017.
6. 17th International Congress of Immunology, Melbourne, Australia. 2016.
7. I Workshop de Biotecnologia, Botucatu, Brasil. 2015.
8. XIV Workshop da Pós-Graduação da UNESP, Botucatu, Brasil. 2015.

Prêmios

1. Melhor trabalho apresentado na categoria apresentação de pôster, 21st International Congress of Phytopharm, Graz, Austria. **2017**
2. Menção honrosa na categoria apresentação oral, Faculdade de Medicina da UNESP, Botucatu. **2015**

Disciplinas cursadas

- 1 – Biologia Celular – **3 créditos**
- 2 – Biologia Molecular – **4 créditos**
- 3 – Bioquímica Avançada – **4 créditos**
- 4 – Bioestatística – **4 créditos**
- 5 – Bioética e Biossegurança – **2 créditos**
- 6 – Seminários – **2 créditos**
- 7 – Microscopia Eletrônica e Ultraestrutura Celular – **4 créditos**
- 8 – Sinalização Celular – **4 créditos**
- 9 – Farmacogenética – **3 créditos**
- 10 – Tópicos Avançados em Farmacologia e Biotecnologia – **3 créditos**
- 11 – Tópicos Especiais em Farmacologia: Métodos de Purificação e Análise de Produtos Naturais – **3 créditos**

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1: Esquema representativo demonstrando as estruturas da pele.....	8
Figura 2: Esquema representativo das fases da cicatrização de feridas.....	10
Figura 3: Esquema das principais alterações celulares de feridas crônicas.....	Error! Bookmark not defined. 17
Figura 4: Estrutura química do lupeol.....	Error! Bookmark not defined. 20
Figura 5: Diagrama representativo dos efeitos biológicos do lupeol e suas aplicações em doenças crônicas.....	20

CAPÍTULO II

Figure 1: Cell proliferation of epidermal keratinocytes (A) and dermal fibroblasts (B) in response to lupeol.....	34
Figure 2: Cell proliferation of epidermal keratinocytes (A) and dermal fibroblasts (B) in response to lupeol.....	34
Figure 3: Wound healing effect of lupeol on human epidermal keratinocytes in the scratch assay after 24 hours of incubation.....	35
Figure 4: Keratinocyte migration using a scratch assay after 24 hours of incubation with lupeol.....	36
Figure 5: Contractility of lupeol on human fibroblasts.....	37
Figure 6: Lupeol regulates the expression of Akt and ERK in epidermal keratinocytes.....	38
Figure 7: Lupeol regulates the expression of p-38, NFκB-p65 and MMP-2 in epidermal keratinocytes.....	39
Figure 8: Lupeol regulates the expression of Tie-2 in epidermal keratinocytes.....	39
Figure 9: Lupeol regulates the expression of keratin 16 in epidermal keratinocytes.....	40
Figure 10: Hypothetical model of the regulatory mechanisms of lupeol in human keratinocytes on wound healing.....	45
Figure 11: Chemical structure of lupeol.....	46

CAPÍTULO III

Figure 1: Effect of lupeol on the healing of excisional wounds in rats.....	84
Figure 2: HE stained skin tissue sections on day 3 (A), 7 (B) and 14 (C) post wound induction.....	86

Figure 3: Masson's trichrome stained skin sections on day 3 (A), 7 (B) and 14 (C) post wound induction.....	89
Figure 4: Immunolabeled area (μm^2) for NF- κ B (A), Ki-67 (B), EGF (C) and VEGF (D) post wound induction.....	92
Figure 5: Quantification of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 levels (pg/mg protein) in rats cutaneous lesions treated with Lanette, 1.2 U/g or lupeol 0.2% for 3, 7 or 14 days.....	94
Figure 6: Gene expression (RT-qPCR) of NF- κ B, Ki-67, VEGF-A, EGF and TGF- β 1 in rats cutaneous lesions treated with Lanette, 1.2 U/g or lupeol 0.2% for 3, 7 or 14 days.....	95

CAPÍTULO IV

Figure 1: Overview of experimental protocol for wound healing in streptozotocin-induced hyperglycemic rats.....	137
Figure 2: Effect of lupeol on skin wound healing in streptozotocin-induced hyperglycemic rats.....	138
Figure 3: HE stained skin tissue sections on day 14 post wound induction in streptozotocin-induced hyperglycemic rats.....	139
Figure 4: Masson's trichrome stained skin tissue sections on day 14 post wound induction in streptozotocin-induced hyperglycemic rats.....	140
Figure 5: Photomicrography of the immunostaining and immunolabeled area (μm^2) for NF- κ B (A-B), TGF- β 1 (C-D), FGF-2 (E-F) and Collagen III (G-H) in the border and central region of rats hyperglycemic wounds treated with Lanette, Insulin 0.5 U/g or lupeol 0.2% for 14 days.....	141
Figure 6: Quantification of TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C) and IL-10 (D) levels (pg/mg protein) in rats hyperglycemic wounds treated with Lanette, Insulin 0.5 U/g or lupeol 0.2% for 14 days.....	145
Figure 7: Gene expression (RT-qPCR) of <i>Nf-κb</i> (A), <i>Ki-67</i> (B), <i>Egf</i> (C), <i>Vegf-A</i> (D), <i>Hif-1α</i> (E), <i>Angiopoietin-4</i> (F), <i>Nos-2</i> (G), <i>Sod-2</i> (H), <i>Gpx-1</i> (I), <i>Ho-1</i> (J), <i>Ho-2</i> (L) and <i>Col3a1</i> (M) in rats hyperglycemic wounds treated with Lanette, Insulin 0.5 U/g or lupeol 0.2% for 14 days.....	146

CAPÍTULO V

Figura 1: Mecanismos de regulação na cicatrização <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> (normoglicêmicos e hiperglicêmicos).....	152
--	-----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1: Citocinas e suas propriedades biológicas na fase inflamatória..... 12

Tabela 2: Fatores de crescimento que atuam na cicatrização de lesões de pele..... 13

CAPÍTULO II

Table 1: ¹H and ¹³C- NMR (1D, 2D) spectra data for lupeol isolated from the *B. virgilioides* (400 MHz, CDCl₃) and ¹³C-NMR data lupeol..... 50

CAPÍTULO III

Table 1: Sequence of primers used in RT-qPCR..... 82

Table 2: Clinical parameters of cutaneous lesions after topical treatment with Lanette, Colagenase 1.2 U/g and lupeol 0.1, 0.2 or 0.4% (n=8) in rats..... 83

CAPÍTULO IV

Table 1: Sequence of primers used in RT-qPCR..... 135

Table 2: Blood glucose levels in different groups before and after administration (i.p) of streptozotocin (STZ)..... 136

Table 3: Clinical parameters of hyperglycemic cutaneous wound after topical treatment with Lanette, Insulin 0.5 U/g and lupeol 0.2 % (n=8) in rats..... 136

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A	alfa
B	beta
Δ	delta
°C	graus Celsius
μL	microlitros
μm	micrometros
μm^2	micrômetros quadrados
Akt	protein kinase B
ALT	Alanine aminotransferase
ANOVA	one-way analysis of variance
AST	aspartate aminotransferase
CAT	catalase
cDNA	complementary DNA
Cq	quantification cycle
Ct	cycle threshold
DAB	3'-diaminobenzidine
ddCT	overall average of cycle threshold
EGF	fator de crescimento epidermal
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	extracellular-signal-regulated kinase
EtOHE	extrato etanólico
F	<i>forward primer</i>
FGF-2	fator de crescimento de fibroblasto-2
FW	forward
GPx	glutathione peroxidase
HE	hematoxilina and eosina
HIF-1 α	fator induzível de hipóxia-1alpha
HO-1	heme oxygenase-1
HO-2	heme oxygenase-2
IL-10	interleucina 10

IL-1 β	interleucina-1beta
IL-6	interleucina 6
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
IP	intraperitoneal
Ki-67	antígeno Ki-67
MAPK	mitogen-activated protein kinases
MIF	fator inibidor de migração de macrófago
MMP-1	metaloproteinase de matriz extracelular – 1
MMP-2	metaloproteinase de matriz extracelular – 2
MMP-8	metaloproteinase de matriz extracelular – 8
MMP-9	metaloproteinase de matriz extracelular – 9
MMPs	metaloproteinases de matriz extracelular
mRNA	messenger RNA
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF- κ B	factor nuclear-kappa B
nm	nanômetros
NMR	ressonância magnética nuclear
NOS-2	óxido nítrico sintase-2
PCNA	antígeno nuclear de proliferação celular
PCR	reação em cadeia da polimerase
PDGF	fator de crescimento derivado de plaqueta
pg	picogramas
Pi3k	phosphoinositide-3-kinase-protein kinase
PMNs	células polimorfonucleares
pró-MMP-2	forma inativa da MMP-2
pró-MMP-9	forma inativa da MMP-9
psi	libra por polegada quadrada
R	<i>reverse primer</i>
RNA	ácido ribonucleico
RT-qPCR	reação em cadeia da polimerase quantitativa por transcrição reversa
RV	reverse
SC	subcutâneo
SEM	erro padrão da média
SOD	superóxido dismutase

STZ	estreptozotocina
Temp	temperatura em °C
TGF- β 1	fator de crescimento transformador- β 1
TNF- α	fator de necrose tumoral- α
UI	unidade internacional
VEGF	fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
PREFÁCIO	3
CAPÍTULO I	4
1. INTRODUÇÃO	5
2. OBJETIVOS	7
2.1. Objetivo Geral	7
2.2. Objetivos Específicos	7
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
3.1. Morfofisiologia da pele	8
3.2. Processo de cicatrização de feridas	9
3.3. Cicatrização e Diabetes	15
3.4. Tratamentos convencionais de feridas cutâneas e o uso de produtos naturais	17
3.5. Triterpeno lupeol	19
REFERÊNCIAS	21
CAPÍTULO II	28
GRAPHICAL ABSTRACT	29
ABSTRACT	30
1. INTRODUCTION	31
2. RESULTS	33
2.1. High concentrations of lupeol decrease the proliferation and cause cytotoxicity in keratinocytes and fibroblast	33
2.2. Lupeol enhances migration and wound closure in human epidermal keratinocytes	35
2.3. Lupeol promotes contractile effect on a collagen gel matrix	36
2.4. Lupeol regulates via PI3K/Akt and MAPK pathways.	37
2.5. Lupeol regulates the differentiation of cytokeratin 16	40
3. DISCUSSION	40
4. MATERIALS AND METHODS	45
4.1. Plant material, extraction and isolation of lupeol	45
4.2. Cell isolation and culture	46
4.3. Cell proliferation assay	47

4.4. Cytotoxicity assay	47
4.5. In vitro migration (“scratch”) assay	47
4.6. In vitro wound healing (“scratch”) assay	48
4.7. Collagen gel contraction assay	48
4.8. Cell lysate preparation and Western blot analysis.....	49
4.9. Statistical analysis	49
5. CONCLUSIONS	49
REFERENCES	53
CAPÍTULO III	59
GRAPHICAL ABSTRACT.....	60
ABSTRACT	61
1. INTRODUCTION.....	62
2. MATERIALS AND METHODS.....	63
2.1. Plant material, extraction and isolation of lupeol.....	63
2.2. Animals	64
2.3. Excision wound model.....	64
2.4. Grouping and topical treatment	64
2.5. Determination of wound retraction percentage	65
2.6. Clinical evaluation.....	65
2.7. Histological analysis	65
2.8. Immunohistochemistry analysis	66
2.9. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....	66
2.10. RNA extraction and Reverse Transcription Quantitative PCR (RT-qPCR)	66
2.11. Statistical analysis	67
3. RESULTS.....	67
3.1. Macroscopic analysis of lupeol treatment in cutaneous wounds	67
3.2. Histological examination	68
3.3. Effect of lupeol on the immunostaining of NF- κ B, Ki-67, EGF and VEGF.....	69
3.4. Effect of lupeol on pro-and anti-inflammatory cytokine levels	70
3.5. Effect of lupeol on <i>Nf-κb</i> , <i>Ki-67</i> , <i>Egf</i> , <i>Vegf-A</i> and <i>Tgf-β1</i> mRNA expression	70
4. DISCUSSION	70
5. CONCLUSIONS	74
ABBREVIATIONS	74

REFERENCES	75
TABLE LEGENDS	79
FIGURE LEGENDS	80
TABLES	82
FIGURES	84
SUPPLEMENTARY MATERIALS	96
CAPÍTULO IV	108
GRAPHICAL ABSTRACT	109
ABSTRACT	110
1. INTRODUCTION	111
2. MATERIALS AND METHODS	113
2.1. Chemicals and reagents	113
2.2. Plant material, extraction and isolation of lupeol	113
2.3. Animals	113
2.4. Induction of experimental hyperglycemia	114
2.5. Excision wound model and experimental design	114
2.6. Collection of blood samples	115
2.7. Determination of macroscopic parameters	115
2.8. Histopathological examination	115
2.9. Immunohistochemistry analysis	116
2.10. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	116
2.11. RNA extraction and RT-qPCR	116
2.12. Statistical analysis	117
3. RESULTS	117
3.1. Hyperglycemia status	117
3.2. Wound closure	118
3.3. HE staining	118
3.4. Masson's trichrome staining	118
3.5. Effect of lupeol on immunostaining of NF- κ B, TGF- β 1, FGF-2, and Collagen III	118
3.6. Effect of lupeol on pro-and anti-inflammatory markers	119
3.7. Effect of lupeol on molecular markers of angiogenesis and cell proliferation	119
3.8. Effect of lupeol on molecular markers of oxidative stress	119
4. DISCUSSION	120
5. CONCLUSION	123
ABBREVIATIONS	124

REFERENCES	125
TABLE LEGENDS	133
FIGURE LEGENDS	133
TABLES	135
FIGURES	137
SUPPLEMENTARY MATERIALS	147
CAPÍTULO V	149
CONCLUSÃO GERAL	150
ANEXO A	152
ANEXO B	153

RESUMO

A dificuldade de cicatrização de feridas é uma das principais complicações decorrentes do *Diabetes mellitus* (DM), que torna o processo cicatricial mais lento e o tratamento mais dispendioso. O presente estudo teve como objetivo investigar o efeito e os mecanismos do lupeol envolvidos no processo de cicatrização de feridas cutâneas experimentais *in vitro* e em ratos normoglicêmicos (RN) e hiperglicêmicos (RH). Foi investigado o efeito do lupeol (0,1, 1, 10 e 20 µg/mL) em ensaios *in vitro* de cicatrização de feridas utilizando queratinócitos e fibroblastos de prepúcio neonatal humano. Para os estudos *in vivo*, ratos Wistar machos (n=8) foram randomicamente divididos nos seguintes grupos experimentais usando RN: creme base, colagenase 1.2 U/g, creme à base de lupeol 0,1%, 0,2% e 0,4% tratados durante 3, 7 e 14 dias. O estudo realizado em RH, os grupos foram divididos em: creme base, insulina 0.5 U/g e creme à base de lupeol 0.2% (menor dose efetiva em RN) em RH tratados durante 14 dias. A indução experimental de feridas cutâneas foi realizada na região dorsal dos ratos com o auxílio de um *punch* de 2 cm de diâmetro. Foram investigados parâmetros macroscópicos, histológicos, imunohistoquímicos, imunoenzimáticos e moleculares. Os resultados *in vitro* mostraram que, baixas concentrações do lupeol foi capaz de estimular a migração e proliferação celular de queratinócitos, efeito contrátil em fibroblastos dérmicos embebidos em um solução gel de colágeno, possivelmente através das vias PI3k/Akt, MAPK/p38, vias sinalizadoras envolvidas na proliferação/migração celular, angiogênese e reparo tecidual. Nossos resultados *in vivo* mostraram potencial cicatricial do lupeol após 7 e 14 dias de tratamentos em feridas de ratos normoglicêmicos. Lupeol mostrou atividade anti-inflamatória, com significativa redução de TNF- α , IL-6 e NF- κ B, e aumento nos níveis de IL-10, atividade proliferativa por estimular a expressão de Ki-67, aumento do processo angiogênico por aumento da expressão de VEGF, estímulo da reepitelização observados pelo aumento de EGF e remodelação da matriz extracelular por estimular a síntese de colágenos. Os resultados em RH, mostraram um aumento na porcentagem de retração da lesão a partir do 11º dia de tratamento após da indução da lesão. As análises histopatológicas revelaram uma diminuição da infiltração de células inflamatórias, aumento da proliferação de fibroblastos, vascularização e deposição de fibras colágenas no tratamento com lupeol. Os resultados do ELISA revelaram níveis de TNF- α e IL-6 reduzidos e níveis de IL-10 sobrerregulados, mostrando atividade anti-inflamatória. Os resultados moleculares e imunohistoquímicos confirmaram o potencial anti-inflamatório do lupeol através da redução de NF- κ B e do estresse oxidativo por aumentar a expressão de enzimas antioxidantes, como HO-1 e SOD-2, bem como mecanismos de proliferação celular, angiogênese e remodelante de matriz extracelular estimulados por FGF-2, TGF- β 1, HIF-1 α e colágeno III. Nossos achados permitem concluir que o lupeol pode servir como uma nova opção terapêutica para o tratamento de feridas cutâneas normais e em condições hiperglicêmicas, regulando os mecanismos envolvidos nas fases inflamatória, proliferativa e de remodelação tecidual.

Palavras-chave: lupeol, pele, feridas, cicatrização de feridas, hiperglicemia

ABSTRACT

The difficulty of wound healing is one of the main complications due to *Diabetes mellitus* (DM), which makes the healing process slower and the treatment more expensive. The present study aimed to investigate the effect of lupeol and mechanisms involved in the healing process of experimental skin wounds *in vitro* as well as in normoglycemic (NR) and hyperglycemic rats (HR). The effect of lupeol (0.1, 1, 10 and 20 $\mu\text{g/mL}$) on *in vitro* wound healing assays using keratinocytes and human neonatal foreskin fibroblasts was investigated. For *in vivo* studies, male Wistar rats (n=8) were randomly divided into the following experimental groups using NR: lanette, collagenase 1.2 U/g and lupeol 0.1%, 0.2% or 0.4% treated for 3, 7 and 14 days. In the study performed in HR, the groups were divided into: lanette, insulin 0.5 U/g and lupeol 0.2% cream (lowest effective dose in NR) in HR treated for 14 days. Experimental induction of cutaneous wounds was performed on dorsal region of the rats using a punch 2 cm in diameter. Macroscopic, histological, immunohistochemical, immunoenzymatic and molecular parameters were investigated. The *in vitro* results showed that low concentrations of lupeol were able to stimulate cell migration and proliferation of keratinocytes, a contractile effect on dermal fibroblasts embedded in a collagen gel solution, possibly through PI3k/Akt, and MAPK/p38 signaling pathways involved in cell proliferation/migration, angiogenesis and tissue repair. Our *in vivo* results showed wound healing potential of lupeol after 7 and 14 days of treatment in normoglycemic rat wounds. Lupeol showed anti-inflammatory activity, with significant reduction of TNF- α , IL-6 and NF- κ B, and increased IL-10 levels, proliferative activity by stimulating Ki-67 expression, increased angiogenic process by increased VEGF expression, stimulus of re-epithelialization observed by the increase of EGF and extracellular matrix remodeling by increase the collagens deposition. The results in HR, showed an increase in the percentage of wound retraction from the 11th day of treatment after the lesion induction. Histopathological analyzes revealed a decrease in inflammatory cells infiltration, increased proliferation of fibroblasts, vascularization and deposition of collagen fibers in lupeol treatment. ELISA results demonstrated reduced TNF- α and IL-6 levels and increased IL-10 levels, suggesting anti-inflammatory activity. Molecular and immunohistochemical results confirmed the anti-inflammatory potential of lupeol by reducing NF- κ B and oxidative stress by increasing the expression of antioxidant enzymes, such as HO-1 and SOD-2, as well as mechanisms of cell proliferation, angiogenesis and remodeling of extracellular matrix stimulated by FGF-2, TGF- β 1, HIF-1 α and collagen III. Our findings allow us to conclude that lupeol may serve as a new therapeutic option for the treatment of normal and hyperglycemic skin wounds, regulating the mechanisms involved in the inflammatory, proliferative and tissue remodeling phases.

Key words: lupeol, skin, wounds, wound healing, hyperglycemia

PREFÁCIO

O **capítulo 1** contém uma revisão bibliográfica sobre o processo de cicatrização de feridas e suas três fases sobrepostas, inflamatória, proliferativa e de remodelamento, assim como, a terapêutica atual no tratamento de feridas. Este capítulo também faz uma abordagem sobre a cicatrização de feridas e sua relação com diabetes e/ou hiperglicemia, o uso de produtos naturais no tratamento de feridas, além dos objetivos propostos nesse trabalho com o triterpeno lupeol, isolado da espécie vegetal “*Bowdichia virgilioides*” (Sucupira-preta).

O **capítulo 2** é decorrente do projeto de doutorado sanduíche realizado na The University of Sydney, em Sydney, na Austrália, pelo Programa Ciências sem Fronteiras (Processo de nº: 202513/2015-7) e o estudo foi recentemente publicado na *Molecules*, intitulado: “Lupeol, a pentacyclic triterpene promotes migration, wound closure and contractile effect *in vitro*: possible involvement of PI3K/Akt and p38/ERK/MAPK pathways”. Esta pesquisa mostrou efeito cicatrizante *in vitro* através do estímulo do processo de migração e cicatrização de feridas em queratinócitos epidérmicos humanos e aumento da contração de fibroblastos incorporados em uma solução gel de colágeno.

No **capítulo 3** encontra-se o manuscrito no formato padrão da revista *European Journal of Pharmacology*, intitulado: “From inflammation to cutaneous repair: Topical application of lupeol improves skin wound healing in rats by modulating the cytokine levels, NF- κ B, Ki-67 and growth factors expression, and distribution of collagen fibers”. Os resultados deste estudo são oriundos do projeto de doutorado aprovado pela Fapesp (Processo de nº: 2014/23247-4). Este estudo mostrou o potencial efeito do creme de lupeol e mecanismos envolvidos na ação cicatrizante em ratos normoglicêmicos tratados após 3, 7 e 14 dias após a indução da lesão.

O **capítulo 4** mostra os resultados do efeito cicatrizante do lupeol em feridas de ratos hiperglicêmicos induzidas por estreptozotocina. Este estudo também faz parte do projeto aprovado pela Fapesp (Processo de nº: 2014/23247-4): “Avaliação dos mecanismos celulares e moleculares do lupeol no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos”. Os resultados são promissores e nos encorajaram a escrever o manuscrito, intitulado: “Lupeol enhances wound healing in streptozotocin-induced hyperglycemic rats with modulatory effects on inflammation, oxidative stress, angiogenesis and extracellular matrix components”, no formato padrão da revista: *Journal of Diabetes and its Complication*.

O **capítulo 5** descreve as considerações finais da tese, concluindo de uma forma geral, todos os achados deste estudo desenvolvidos durante o doutorado.

Considerações gerais

Capítulo I

1. INTRODUÇÃO

As feridas cutâneas têm impacto significativo na saúde pública e no investimento de recursos públicos. Atualmente, devido à sua complexidade de tratamento, muitos protocolos e pesquisas vêm sendo estabelecidos visando acelerar o processo cicatricial, fenômeno pelo qual o organismo tende a reparar uma porção lesada, de modo a guiar ou gerir este processo, para que sejam obtidos resultados mais eficientes em relação ao tempo de resolução e qualidade da cicatriz do tecido lesado.

O sucesso da reestruturação da pele depende de uma cascata de eventos ordenados, que envolvem respostas e/ou interações celulares e moleculares. A cicatrização de feridas é um processo importante, mas complexo, afetado por uma série de fatores, incluindo a coagulação do sangue, inflamação, fibroplasia, deposição de colágeno e contração da ferida (Lindley *et al.*, 2016). Por questões didáticas, o processo cicatricial é analisado a partir de três fases que se sobrepõem: fase inflamatória, formada por eventos como hemostasia e inflamação; fase proliferativa, caracterizada pela formação do tecido de granulação e reepitelização; e a fase de remodelamento da matriz (Morin *et al.*, 2012).

A descoberta de protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos ou de novos agentes terapêuticos representa uma possibilidade para o tratamento de diferentes patologias, incluindo as feridas cutâneas. Os produtos naturais apresentam-se como fonte de compostos com potencial atividade biológica e determinadas espécies de plantas ou substâncias naturais isoladas das mesmas têm sido utilizados com sucesso em estudos recentes sobre o tratamento de feridas cutâneas (Cetin *et al.*, 2013; Upadhyay *et al.*, 2013). Metabólitos secundários ou compostos ativos isolados de muitas fontes naturais, além das plantas, também têm se mostrado responsáveis pela indução da cicatrização de feridas cutâneas em modelos animais (Fikru *et al.*, 2012; Thangapazham *et al.*, 2013).

Em função da busca por novos compostos e suas aplicações, usamos a *Bowdichia virgilioides* Kunth (Sucupira-preta), uma árvore bastante dispersa no cerrado e em regiões amazônicas, que pertence a ecossistemas latino-americanos e está classificada na família Fabaceae. Esta espécie, está presente em vários países da América Latina, sendo que no Brasil, se encontra distribuída pelas Regiões Sudeste, Centro Oeste, Norte e Nordeste (Barros *et al.*, 2010). O seu uso medicinal é empregado através de infusões obtidas a partir de diferentes partes da planta (semente, casca da árvore e casca da raiz), utilizadas

Conclusão geral

Capítulo V

CONCLUSÃO GERAL

A análise dos resultados geral permite concluir que:

- Lupeol tem efeito cicatrizante de feridas *in vitro* em baixas concentrações, através de estímulos da migração de queratinócitos e aumento da contração de fibroblastos em uma matriz gel de colágeno;
- Este efeito *in vitro*, ocorre possivelmente a ativação das vias PI3k/Akt e MAPK/p38;
- Lupeol aumenta a expressão de moléculas citoprotetoras da barreira epidérmica, como Tie-2 e MMP-2;
- Os resultados das análises *in vivo*, mostram efeito cicatrizante do lupeol nas concentrações de 0.2% e 0.4% em feridas de ratos normoglicêmicos tratados após 7 e 14 dias da indução da lesão;
- A concentração de 0.2% do creme à base de lupeol mostrou cicatrização acelerada em feridas de ratos hiperglicêmicos tratados durante 14 dias;
- Este potencial efeito observados em ambos os modelos, envolve a regulação do processo inflamatório, através da redução de moléculas pró-inflamatórias, como NF- κ B, TNF- α e IL-6, e aumento da expressão de IL-10, citocina anti-inflamatória;
- Aumenta a expressão de mediadores envolvidos na formação de tecido de granulação, angiogênese e reepitelização, como Ki-67, VEGF, HIF-1 α , EGF, FGF-2 e TGF- β 1;
- Os achados histopatológicos em ambos os modelos *in vivo*, revelaram uma diminuição no processo inflamatório, neovasclogênese e aumento na deposição de fibras colágenas totais após tratamento com lupeol;
- Lupeol também minimizou o estresse oxidativo e melhorou o status antioxidante através da expressão gênica aumentada de HO-1 e SOD-2 em feridas de ratos hiperglicêmicos;
- Nenhum sinal de toxicidade avaliado pelo teste de irritação dérmica foi observado, garantindo a segurança da utilização do creme à base do lupeol.

Nossos achados, de uma forma geral, indicam o potencial de cicatrização de feridas cutâneas do lupeol, um triterpeno isolado de *Bowdichia virgilioides*, e fornece boas evidências científicas de que a aplicação de creme à base lupeol, é promissor no tratamento de feridas normais e em condições hiperglicêmicas.