

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.

1. Introdução

1.1. Pele e Cicatrização

A pele é o órgão que recobre o corpo humano, totalizando cerca de 15% do peso corporal. Tem como principais funções manter a homeostasia, evitar a desidratação e proteger contra injúrias causadas por agentes biológicos, químicos e mecânicos (Yang et al., 2016).

A pele é constituída por duas regiões histologicamente distintas, epiderme e derme (figura 1). A epiderme é responsável pela cor, textura e hidratação da pele. É constituída principalmente por queratinócitos, células que tem a função de depositar queratina, que protege a pele contra a desidratação. Há também os melanócitos, que atuam na produção de melanina, conferindo a cor da pele e protegendo contra o efeito nocivo dos raios solares. As células de Langerhans são células dendríticas que atuam na resposta imune, tendo a função de apresentação de antígenos para os linfócitos T. Já as células de Merkel residem na camada basal e estão associadas às terminações nervosas, que formam discos táteis que estão relacionadas a sensibilidade da pele (Losquadro, 2017).

A derme é formada por tecido conjuntivo, dividido em duas camadas: papilar e reticular. A camada papilar é estruturada por tecido conjuntivo frouxo, formando as papilas dérmicas, e a camada reticular é constituída por tecido conjuntivo denso não modelado. Dentre os componentes do tecido conjuntivo que compõem a derme, estão os diversos tipos de colágeno e elastina, que conferem a resistência à tração e elasticidade à pele. O colágeno e a elastina são sintetizados pelos fibroblastos, que também podem se diferenciar em miofibroblastos. Também estão presentes na derme células do sistema imune como macrófagos e neutrófilos, que fagocitam microrganismos e secretam citocinas e enzimas que induzem resposta inflamatória (Kanitakis, 2002).

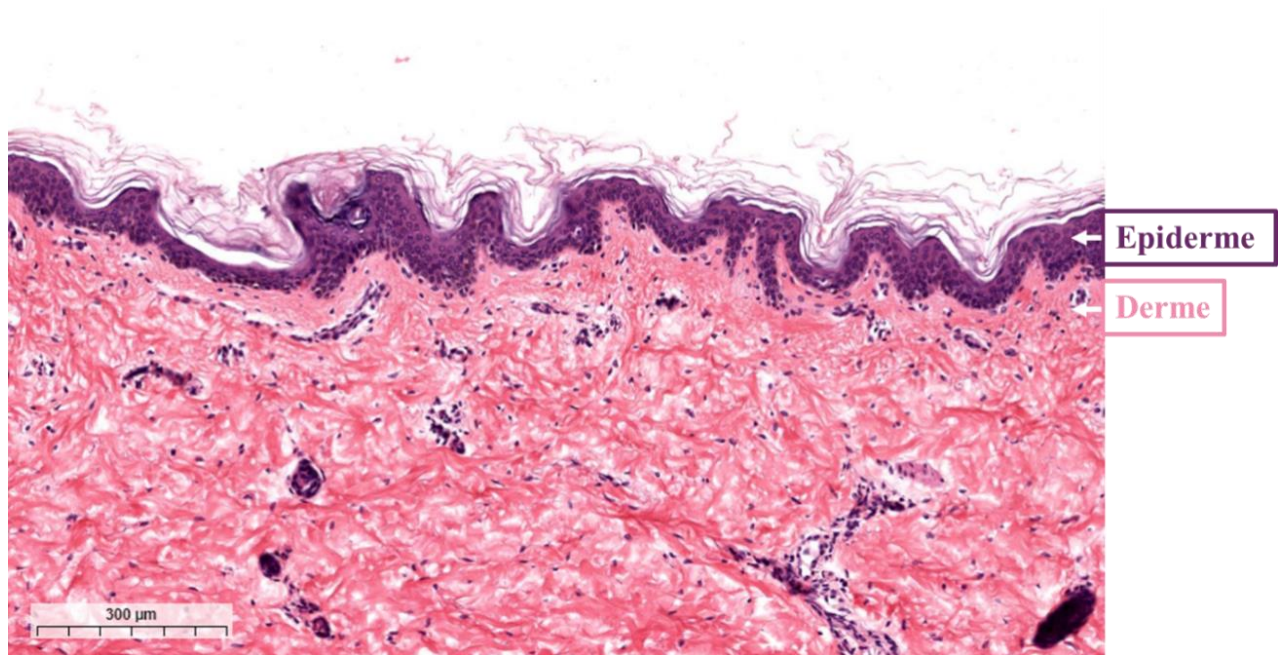


Figura 1: Estrutura morfológica da pele (fonte: histologyguide.org, acesso em 15/10/2018).

Em resposta a qualquer dano que resulte na perda da integridade da pele, o organismo inicia o processo de cicatrização. Tal processo obedece à uma orquestra de eventos celulares que pode ser dividida em três fases sobrepostas: inflamatória, proliferativa e remodelamento da matriz extracelular (Profyris, 2012, Guo e Dipietro, 2010).

A primeira fase é a inflamatória, que engloba a hemostasia e migração de neutrófilos e macrófagos para região da lesão. A hemostasia é realizada através da deposição de plaquetas que visa cessar a hemorragia na área ferida. Após isso, os macrófagos são as primeiras células inflamatórias a serem recrutadas para a área da lesão, com a função de fagocitar patógenos e secretar fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas, que sinalizarão as fases seguintes. Após alguns dias, os neutrófilos são atraídos para lesão, com o objetivo de evitar a infecção por bactérias e degradar o tecido morto.

A fase seguinte é a proliferativa, que tem como principal característica a formação do tecido de granulação. Esse tecido é formado principalmente por fibroblastos, macrófagos e células endoteliais vasculares. Os macrófagos secretam fatores de crescimento que estimulam a proliferação dos fibroblastos. A função dos fibroblastos é a síntese e deposição do colágeno do tipo III, que atua como uma rede

estrutural para que as células endoteliais se proliferem e estabeleçam novos vasos através da angiogênese.

A terceira e última fase é denominada de remodelamento da matriz extracelular. O colágeno do tipo III é degradado e substituído pelo colágeno do tipo I – com feixes mais resistentes e dispostos paralelamente – que, em conjunto com os miofibroblastos, exercem uma força contrátil na área de lesão, que resultará no fechamento completo, finalizando o processo de cicatrização (Guo e DiPietro, 2010, Kasuya e Tokura, 2014).

Alguns fatores prejudicam o processo de cicatrização, atrasando o seu início e prolongando o tempo do processo. Esses fatores podem ser classificados em locais ou sistêmicos. Os fatores locais atuam diretamente na região da ferida, alterando sua fisiologia, tais como infecções, oxigenação deficiente, inflamação, problemas microvasculares. Já os fatores sistêmicos atuam no organismo todo e alteram a habilidade do indivíduo de cicatrizar a região ulcerada. Os fatores sistêmicos incluem idade avançada, estresse, obesidade, abuso de uso de álcool e determinados fármacos, além de doenças como o diabetes (Guo e DiPietro, 2010).

1.2. Pâncreas e Diabetes Mellitus

O pâncreas é um órgão encontrada na região retroperitoneal do corpo humano e constituído por uma porção exócrina e uma porção endócrina (figura 2). Cerca de 96% da massa total do pâncreas corresponde à sua porção exócrina, que é responsável pela liberação de enzimas e solução aquosa de bicarbonato no duodeno para auxiliar na digestão e neutralizar o quimo ácido vindo do estômago. A porção endócrina do pâncreas corresponde as ilhotas de Langerhans, que são regiões circulares ou ovaladas compostas por células endócrinas. As ilhotas pancreáticas possuem quatro tipos celulares: as células α , produtoras de glucagon, as células δ , secretoras de somostatina, células PP, secretoras de polipeptídeo pancreático, e as células β , produtoras de insulina, que estão presentes em maior quantidade (Dolenšek et al., 2015).

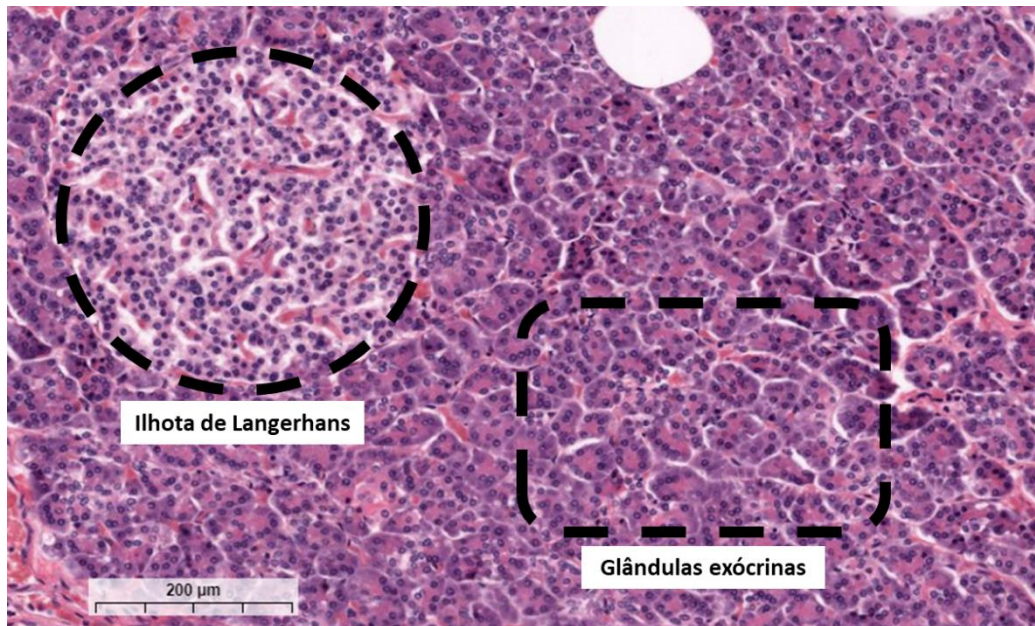


Figura 2: Estrutura morfológica do pâncreas. (fonte: histologyguide.org, acesso em 27/01/2019)

As células β do pâncreas são responsáveis pela produção e secreção da insulina, uma proteína composta por 51 aminoácidos, responsável pelo metabolismo da glicose no organismo (Aronoff et al., 2004). A secreção da insulina é um processo extremamente ordenado, no qual a alta concentração de glicose extracelular é o principal estímulo (Fu et al., 2013). A glicose é transportada para o meio intracelular através dos 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 (figura 3), onde serão direcionadas aos seus tecidos alvos: muscular, hepático e adiposo (Newsholme e Kreuse, 2012).

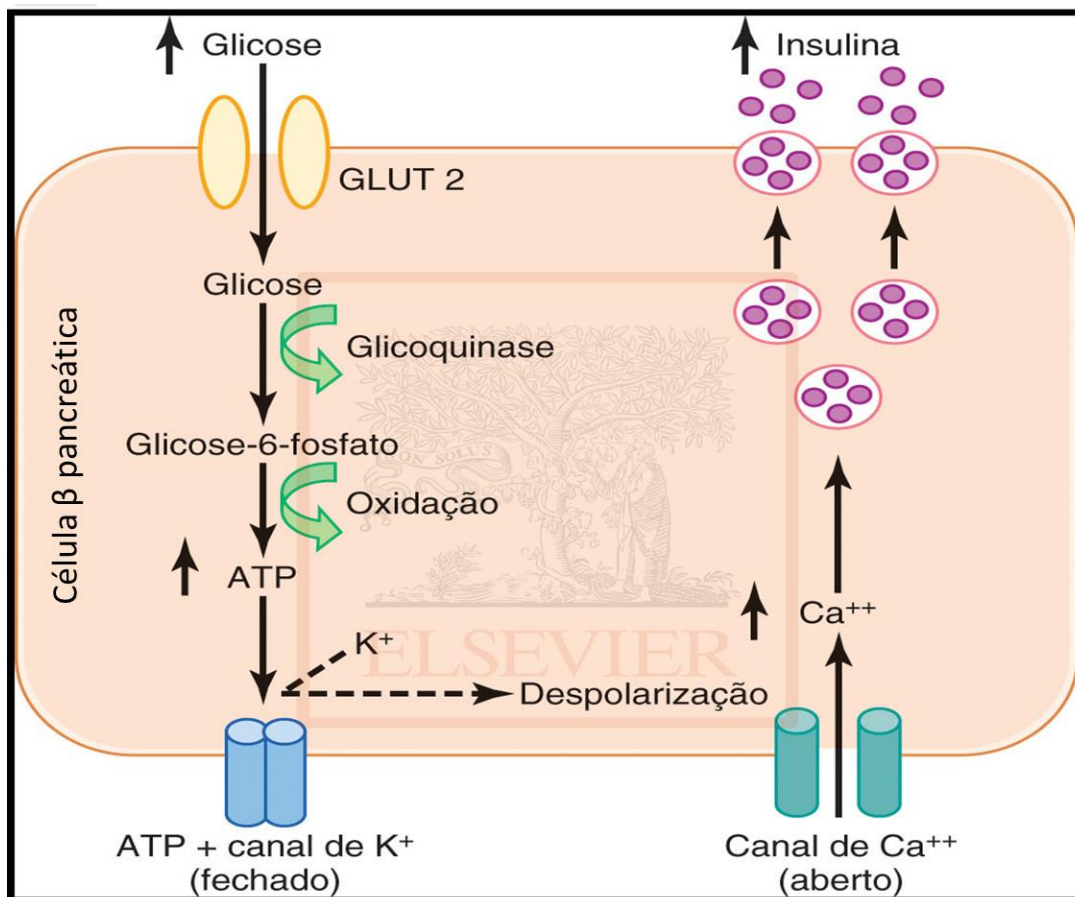


Figura 3: Mecanismo de secreção da insulina nas células β (Guyton, 1985).

Quando há desregulação no processo de secreção de insulina estimulada por glicose, disfunções metabólicas como o diabetes mellitus ocorrem. O diabetes mellitus é uma doença metabólica crônica que afeta cerca de 400 milhões de pessoas. É caracterizada pela hiperglicemia, resultante da ausência na produção de insulina pelo pâncreas ou da resistência do organismo na ação deste hormônio. É mais comumente classificada em dois tipos, 1 e 2 (Thomas e Philipson, 2015).

O diabetes tipo 1 é uma doença autoimune, na qual as células do sistema imunológico atacam as células β nas ilhotas pancreáticas, que são responsáveis pela síntese de insulina, fazendo com que a produção desse hormônio seja diminuída ou inexistente. Pessoas acometidas pelo diabetes tipo 1 são consideradas insulino dependentes, ou seja, necessitam da administração de insulina exógena para normalizar os níveis de glicose no sangue (revisado por Henriksson et al., 2016).

O diabetes tipo 2 é caracterizado pela resistência do organismo à ação da insulina e deficiência relativa na produção desse hormônio. A resistência à insulina pode ser atribuída ao acúmulo de gordura nos tecidos hepático e muscular, que

comprometem a captação de glicose mediada pela insulina. Indivíduos portadores de diabetes tipo 2 também podem apresentar defeitos nas células β do pâncreas, que impedem que a produção de insulina seja suficiente às necessidades dos tecidos. Em ambos os tipos, a hiperglicemia causada pelo diabetes prejudica o funcionamento ou até mesmo leva à falência órgãos como os rins, olhos, fígado, coração, nervos e vasos sanguíneos (DeFronzo, 2004, Thomas e Philipson, 2015, Volpe et al., 2018).

1.3. Modelo experimental de diabetes tipo 1

Animais tem sido usado como modelo de estudo com o objetivo de elucidar os mecanismos que envolvem o diabetes. Existem animais que desenvolvem espontaneamente o diabetes tipo 1, como o camundongo NOD e o rato BB, porém esses animais possuem manutenção de custos elevados. Uma alternativa mais acessível para mimetizar o diabetes tipo 1 em animais é o uso de fármacos que promovem a destruição das células β pancreáticas, levando à ausência na produção de insulina e à consequente hiperglicemia, como é o caso da estreptozotocina (Chatzigeorgiou et al., 2009, King, 2012). A estreptozotocina penetra nas células β pancreáticas via receptores GLUT2 e causa alquilação do material genético. Tais danos ao DNA resultam na formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) que contribuem para necrose das células β do pâncreas (Szkudelski, 2001).

1.4. Fatores que influenciam na cicatrização em indivíduos diabéticos

Estudos mostram que um terço das pessoas diabéticas desenvolverão alguma complicação cutânea, sendo a má cicatrização de feridas uma dessas complicações. Uma ferida que não seja devidamente tratada pode se tornar crônica, podendo ser causa de amputação (Weledji e Fokan, 2004). A hiperglicemia, resultante do estado diabético, causa aumento da produção de produtos de glicação avançada (AGEs), inflamação crônica, estresse oxidativo, anormalidades microvasculares, danos no material genético, que também estão intimamente conexos ao prejuízo do processo de cicatrização cutânea (Volpe et al., 2018). O diabetes e suas complicações são a causa de disfunções nos fibroblastos, redução na deposição de colágeno e remodelação desregulada que prolongam o processo de cicatrização (Almeida et al., 2016, Lamers et al., 2016, Xuan et al., 2014).

Os AGEs compreendem uma variedade de moléculas resultantes de reações de oxidação de lipídeos e açúcares. Células inflamatórias também podem desencadear a

formação de AGEs através da produção de mieloperoxidase (MPO) e NADPH oxidase, que são produtos resultantes de estímulos inflamatórios em neutrófilos, monócitos e macrófagos (Huebschmann et al., 2006). A hiperglicemia causa aumento na produção dos AGEs, que atuam na progressão do diabetes por meio de modificações das estruturas intracelulares, interações com proteínas da matriz extracelular, modificações de proteínas e lipídeos sanguíneos, que causam desregulação na produção de fatores de crescimento e citocinas pró-inflamatórias, contribuindo para anormalidades vasculares características do estado diabético (Bierhaus et al., 1998, Brownlee, 2005). Células que tem papel fundamental no processo de cicatrização, como células endoteliais, macrófagos e fibroblastos, tem suas atividades biológicas prejudicadas pela ação dos AGEs (Alikhani et al., 2005, Zhuang et al., 2012, Miao et al., 2012).

A baixa biodisponibilidade de NO está relacionada com a produção de AGEs (Xu et al., 2005). O NO é responsável por modular o fluxo sanguíneo através de sua difusão nas células musculares lisas presentes nas paredes dos vasos sanguíneos (Datta et al., 2004). Há diversos trabalhos que apontam que o NO auxilia na promoção da cicatrização cutânea através da aceleração do processo cicatricial, reepitelização, deposição de colágeno e formação de novos vasos sanguíneos em indivíduos normo ou hiperglicêmicos (Edmonds et al., 2018, Kang et al., 2015, Lowe et al., 2015, Witte et al., 2002).

A resposta inflamatória tem papel crucial na cicatrização de feridas cutâneas. Quando em equilíbrio, os macrófagos e neutrófilos secretam citocinas e fatores de crescimento que sinalizarão as etapas seguintes do processo de cicatrização. A hiperglicemia causada pelo diabetes prejudica a funcionalidade dos macrófagos, resultando numa resposta inflamatória tardia e prolongada, que atrasa o processo de cicatrização cutânea (Sun et al., 2012).

O fator nuclear kappa B (NF- κ B) é um complexo proteico e fator de transcrição nuclear, responsável por regular a expressão de genes ligados a inflamação e estresse oxidativo, diferenciação, proliferação celular, apoptose e adesão celular (Ambrozova et al., 2017), portanto esta via de sinalização é ativada durante o processo de cicatrização. No entanto, na presença do diabetes, há aumento da expressão de NF- κ B, e consequentemente, da produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina 6 (IL-6), que desencadeiam uma resposta inflamatória prolongada, prejudicando o processo de cicatrização (Patel e Satani, 2009).

O TNF- α é uma citocina inflamatória, produzida principalmente por macrófagos. Em condições normais, o TNF- α é responsável por prevenir a invasão de microrganismos patogênicos e regular eventos essenciais para uma cicatrização efetiva, como atividade dos fibroblastos, células endoteliais vasculares e queratinócitos e síntese de proteínas da matriz extracelular (Mastand e Schultz, 1996, Barrientos et al., 2008, Eming et al., 2007).

A IL-6 é produzida por neutrófilos e monócitos, sendo considerada uma citocina pro-inflamatória relevante na fase inicial da cicatrização. Durante uma cicatrização normoglicêmica, a IL-6 regula a proliferação de queratinócitos e atua no recrutamento de neutrófilos para a área da ferida, mas assim como o TNF- α , em condições de feridas crônicas os níveis de IL-6 se encontram elevados, resultando numa cicatrização prejudicada (Gallucci et al., 2004, Sato et al., 1999, Peschen et al., 1998). Porém, na condição diabética, os níveis de TNF- α e IL-6 se encontram aumentados, prejudicando o processo de cicatrização através da diminuição da proliferação de fibroblastos, produção da matriz extracelular e aumento na apoptose de fibroblastos (Graves e Dasu, 2011).

A interleucina 10 (IL-10) é uma citocina com potente efeito anti-inflamatório. Seu mecanismo de ação se baseia na inibição da produção de citocinas pro-inflamatórias; TNF- α e IL-6 são alguns exemplos (Das et al., 2014, Lee et al., 2015). Kieran e colaboradores (2013) mostraram que a IL-10 também está envolvida na deposição de colágeno, prevenindo a formação de cicatriz em ensaios pré-clínicos com humanos e camundongos.

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que também podem ser chamados de radicais livres, é benéfica quando se encontra em equilíbrio no organismo, atuando no combate a agentes patógenos, hemostasia, inflamação, fechamento da ferida e maturação da matriz extracelular. Entretanto, quando há produção exacerbada é desencadeado o estresse oxidativo. Alguns autores já demonstraram que indivíduos hiperglicêmicos apresentam elevada produção de ROS, que prejudica o processo de cicatrização cutânea (Dhall et al., 2014).

O estresse oxidativo pode ser atenuado através das ações de enzimas e proteínas antioxidantes que são produzidas pelo próprio organismo ou também através do uso ou ingestão de produtos naturais que possuem atividade antioxidante. As principais enzimas que atuam contra o estresse oxidativo são: a superóxido dismutase (SOD), que converterá o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, o qual poderá ser convertido

em água e gás oxigênio ou água, respectivamente por ação da catalase (CAT) ou da glutathiona peroxidase (GPx). Para a conversão de peróxido de hidrogênio em água, a GPx atua em conjunto com a glutathiona redutase (GR), que é responsável pela redução da glutathiona oxidada (GSSG) em glutathiona reduzida (GSH) (Matés et al., 1999, Chaudière e Ferrari-Iliou, 1999). O mecanismo antioxidante está representado na figura 4.

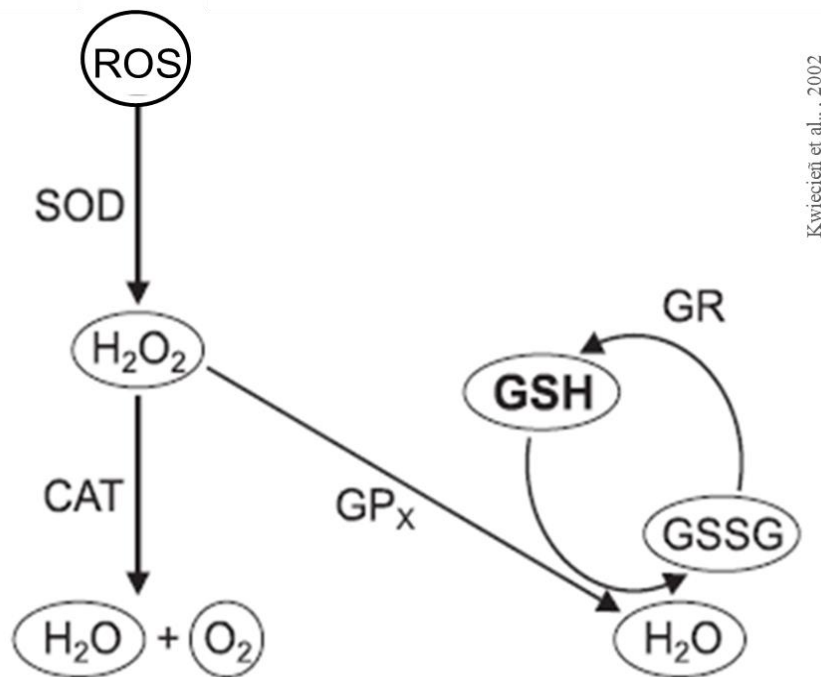


Figura 4: Metabolismo geral de espécies reativas de oxigênio (ROS). SOD – superóxido dismutase; H₂O₂ – peróxido de hidrogênio; CAT – catalase; GPx – glutathiona peroxidase; GSH – glutathiona reduzida; GSSG – glutathiona oxidada, GR – glutathiona redutase; H₂O – água; O₂ – gás oxigênio.

1.5. Produtos naturais e cicatrização de feridas diabéticas

O atual tratamento de feridas de indivíduos hiperglicêmicos demanda dos mesmos instrução, prevenção e diagnóstico precoce, pois quando a ferida se instala e se torna crônica, devido às complicações mencionadas, os tratamentos existentes são caros, demorados e pouco efetivos (Davis et al., 2018). Em virtude disso, pesquisadores tem buscado novas alternativas para o tratamento de feridas de indivíduos diabéticos, como o uso de plantas medicinais e seus princípios ativos.

Um estudo utilizando curcumina mostrou que esse composto natural, presente na *Curcuma longa*, de nome popular açafrão, teve efeito cicatrizante em feridas cutâneas de ratos Wistar com hiperglicemia induzida por estreptozotocina após 3, 7, 14 e 19 dias de tratamento. Os resultados revelaram que a curcumina acelerou o processo de cicatrização através da regeneração epitelial antecipada, diminuiu a quantidade da produção de TNF- α e IL-1 β e aumentou os níveis de IL-10, SOD, CAT e GPx, indicando os efeitos anti-inflamatório e antioxidante (Kant et al., 2014).

O efeito cicatrizante da (-)-epigallocatequina galato foi avaliada em camundongos ICR com hiperglicemia induzida por estreptozotocina pelo período de 14 dias. O composto inibiu o acúmulo de macrófagos, a resposta inflamatória e a via de sinalização Notch, exibindo efeito anti-inflamatório (Huang et al., 2018).

Uma pomada contendo o extrato hidroetanólico de *Strychnos pseudoquina* foi utilizada para tratar as feridas cutâneas de ratos Wistar hiperglicêmicos induzido por estreptozotocina durante 7, 14 e 21 dias. A pomada acelerou o processo de cicatrização cutânea por ter estimulado a proliferação celular e diminuído os danos oxidativos no tecido reparado (Sarandy et al., 2017).

No campo de estudos sobre cicatrização, a aplicação de monoterpenos de origem natural e sintética tem sido aprofundada e resultados promissores foram descobertos. Essa classe química apresenta atividades antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, além de baixa toxicidade. Tais características estão conexas ao sucesso da cicatrização cutânea (revisado por Costa et al., 2019).

1.6. Mentol

O mentol, um monoterpeno cíclico de fórmula C₁₀H₂₀O (figura 5), é o principal composto encontrado no óleo essencial extraído de folhas de plantas do gênero *Mentha*, que pertencem à família Lamiaceae, conferindo à estas plantas um aroma característico. Este composto é amplamente utilizado por indústrias alimentícias, cosméticas, farmacêuticas, sendo uma das substâncias aromatizantes mais utilizadas, junto com a baunilha e o citrus (Kamatou et al., 2013).

O mentol é considerado um composto seguro pela Food and Drug Administration (Vaddi et al., 2002). Um estudo realizado pelo NCI – National Cancer Institute (1979) testou o efeito carcinogênico do mentol em ratos e ratas Fischer 344 e camundongos B6C3F1. Após 103 semanas de ingestão diária do mentol administrado na ração, os pesquisadores concluíram que o mentol não apresentou nenhum sinal de

toxicidade, alteração histopatológica nos principais órgãos ou incidência de tumores em relação aos animais controle. Estudos *in vitro* também demonstraram que o mentol não possui atividade genotóxica ou mutagênica (Murthy et al., 1991, Hartmann e Speit, 1997, Gomes-Carneiro et al., 1998, Wada et al., 2015).

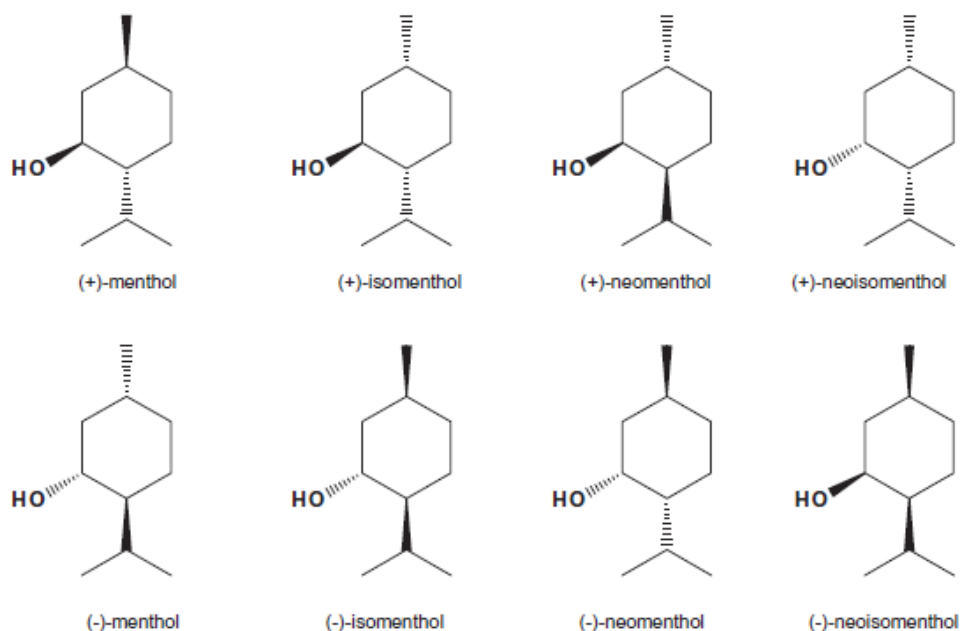


Figura 5: estrutura química e formas isômeras do mentol (Kamatou et al., 2013).

Algumas atividades biológicas do mentol já foram descritas na literatura. Galeotti et al. (2001) relatou o efeito anestésico local do mentol em estudos *in vivo* e *in vitro*. Para o estudo *in vivo*, o teste do reflexo conjuntival em coelhos tratados com mentol demonstrou que houve necessidade de aumentar estímulos para produzir um reflexo. O estudo *in vitro* utilizou uma preparação de nervo frênico e diafragma, na qual o mentol foi capaz de reduzir as contrações evocadas eletricamente de forma dose-dependente.

A atividade analgésica do mentol foi testada em camundongos albinos Swiss utilizando os modelos de placa quente e constrição abdominal. No modelo de placa quente, o mentol foi administrado via oral (3-10 mg/kg) e no modelo de constrição abdominal, o mentol foi administrado via intracerebroventricular (3-10 mg/kg). Em ambos os modelos, o mentol amplificou o limiar da dor de maneira dose-dependente, evidenciando efeito analgésico (Galeotti et al., 2002).

Um estudo avaliou o efeito antibacteriano do mentol em cultura de *Staphylococcus aureus*, bactéria presente na flora humana e que pode ser patogênica, causando desde infecções leves na pele a condições mais graves como pneumonia e endocardites. O mentol foi testado sozinho e em conjunto com mupirocina, um potente agente antibacteriano. Os resultados demonstraram que o mentol tem atividade antibacteriana quando utilizado sozinho e, administrado junto à mupirocina, exibe efeito sinérgico e eficiente contra *S. aureus* (Kifer et al., 2016).

A atividade antifúngica do mentol foi avaliada por Abbaszadeh et al. (2014) em 11 tipos de fungos. Concentrações crescentes de mentol foram testadas (25–500 mg/ml) e os resultados obtidos mostraram que o mentol teve atividade antifúngica em todos os fungos testados e sua atividade mais potente foi para *Cladosporium* spp. e *Aspergillus* spp. na concentração 125 mg/ml.

Um estudo deste grupo de pesquisa revelou que o mentol possui atividade gastroprotetora em ratos Wistar, através da modulação da produção de citocinas, e atuando na produção de fatores locais, tais como aumento na produção de muco gástrico e diminuição da produção de secreção ácida (Rozza et al., 2014).

Muruganathan et al. (2017) descreveu atividade antidiabetogênica do mentol em ratos Wistar. O diabetes foi induzido nos animais através da administração de estreptozotocina e nicotinamida e foram tratados por 45 dias via oral com mentol em três concentrações diferentes (25, 50 e 100 mg/kg). Os resultados mostraram que o mentol controlou a glicemia dos animais, aumentou os níveis de insulina, restaurou a atividade das enzimas metabólicas da glicose hepática e regenerou as células β do pâncreas.

Rozza et al. (dados em fase de publicação) estudaram o efeito cicatrizante do mentol em feridas cutâneas de ratos Wistar normoglicêmicos. O mentol foi incorporado em creme base em três concentrações diferentes (0,25%, 0,5% e 1%) e aplicado na região da ferida cutânea dos animais durante 3, 7 e 14 dias de tratamento. Os resultados revelaram que o mentol na concentração 0,5% apresentou o efeito cicatrizante mais eficiente em comparação ao grupo controle a partir do terceiro dia de tratamento. Os autores sugeriram que o efeito cicatrizante do mentol está relacionado a sua atividade anti-inflamatória, antioxidante e de proliferação de células epiteliais.

Tais atividades biológicas do mentol fazem dele um composto de interesse para o campo de estudo da cicatrização em feridas cutâneas em modelos hiperglicêmicos. Assim, este trabalho teve como objetivo elucidar os mecanismos fisiológicos ativados

no processo de cicatrização de feridas cutâneas sob o efeito do mentol, através de parâmetros morfológicos, bioquímicos e moleculares em ratos hiperglicêmicos induzidos por estreptozotocina.

2. Referências bibliográficas

Alikhani, Z., Alikhani, M., Boyd, C.M., Nagao, K., Trackman, P.C., Graves, D.T., 2005. Advanced glycation end products enhance expression of pro-apoptotic genes and stimulate fibroblast apoptosis through cytoplasmic and mitochondrial pathways. *J BiolChem* 280, 12087-12095.

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 α v and α 5 on the surface of dermal fibroblasts contributing to deficient migration. *Mol Cell Biochem* 421, 19-28.

Aronoff, S.L., Berkowitz, K., Shreiner, B., Want, L., 2004. Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon. *Diabetes Spectrum* 17, 183-190.

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.

Bierhaus, A., Hofman, M.A., Ziegler, R., Nauroth, P.P., 1998. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovasc Res* 37, 586-600.

Brownlee, M., 2005. The pathobiology of diabetic complications. A unifying mechanism. *Diabetes* 54, 1615-1625.

Chatzigeorgiou, A., Halapas, A., Kalafatakis, K., Kamper, E., 2009. The use of animal models in the study of diabetes mellitus. *In Vivo* 23, 245-258.

Chaudière, J., Ferrari-Iliou, R., 1999. Intracellular Antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food and Chemical Toxicology* 37, 949-962.

Costa, M.F., Durço, A.O., Rabelo, T.K., Barreto, R.S.S., Guimarães, A.G., 2019. Effects of Carvacrol, Thymol and essential oils containing such monoterpenes on wound healing: a systematic review. *J Pharm Pharmacol* 71, 141-155.

Das, A., Ganesh, K., Khanna, S., Sen, C.K., Roy, S., 2014. Engulfment of apoptotic cells by macrophages: A role of microRNA-21 in the resolution of wound inflammation. *J Immunol* 192, 1120–1129.

Datta, B., Tufnell-Barrett, T., Bleasdale, R.A., et al., 2004. Red blood cell nitric oxide as an endocrine vasoregulator: a potential role in congestive heart failure. *Circulation* 109, 1339–1342.

Davis, F.M., Kimball, A., Boniakowski, A., Gallagher, K., 2018. Dysfunctional Wound Healing in Diabetic Foot Ulcers: New Crossroads. *Curr Diab Rep* 18, 2.

DeFronzo, R.A., 2004. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *MedClin North Am* 88, 787–835.

Dolenšek, J., Rupnik, M.S., Stožer, A., 2015. Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets* 7, e1024405.

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., 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 for print).

Eming, S.A., Krieg, T., Davidson, J.M., 2007. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J. Invest. Dermatol* 127, 514–525.

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

Fu, Z., Gilbert, E. R., Liu, D., 2013. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Current Diabetes Reviews*, 9(1), 25–53.

Gallucci, R.M., Sloan, D.K., Heck, J.M., Murray, A.R., O'Dell, S.J., 2004 Interleukin 6 indirectly induces keratinocyte migration. *J Invest Dermatol* 122, 764–772.

Graves, D., Dasu, M.R., 2011. Inflammation Impairs Wound Healing in Diabetic Mice *Advances in Wound Care* 2.

Gomes-Carneiro, M.R., Felzenszwalb, I., Paumgarten, F.J., 1998. Mutagenicity testing (+/-)-camphor, 1,8-cineole, citral, citronellal, (-)-menthol and terpineol with the Salmonella/microsome assay. *Mutat Res*, 416, 129-136.

Guo, S., Dipietro, L.A., 2010. Factors affecting wound healing. *J Dent Res* 89, 219-229.

Hartmann, A., Speit, G., 1997. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicol Lett*, 90, 183-188.

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, 569.

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.

Huebschmann, A.G., Regensteiner, J.G., Vlassara, H., Reusch, J.E., 2006. Diabetes and glycoxidation end products. *Diabetes Care*, 29, 1420-1432

Kang, Y., Kim, J., Lee, Y.M., Im, S., Park, H., Kim, W.J., 2015. Nitric oxide-releasing polymer incorporated ointment for cutaneous wound healing. *J Control Release* 220 (Pt B), 624-630.

Kanitakis J., 2002. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol* 12:390-399.

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.

Kasuya, A., Tokura, Y., 2014. Attempts to accelerate wound healing. *J Dermatol Sci* 76, 169-172.

Kieran, I., Knock, A., Bush, J., et al., 2013. Interleukin-10 reduces scar formation in both animal and human cutaneous wounds: results of two preclinical and phase II randomized control studies. *Wound Repair Regen* 21, 428-436.

Kifer, D., Mužinić, V., Klarić, M.Š., 2016. Antimicrobial potency of single and combined mupirocin and monoterpenes, thymol, menthol and 1,8-cineole against *Staphylococcus aureus* planktonic and biofilm growth. *J Antibiot (Tokyo)* 69, 689-696

King, A.J., 2012. The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol* 166, 877-894.

Kwiecień, S., Brzozowski, T., Konturek, S.J., 2002. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. *J Physiol Pharmacol* 53, 39-50.

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.

Lee, K., Lee, B., Lee, M., et al., 2015. Effect of *Ampelopsis radix* on wound healing in scalded rats. *BMC Complement Altern Med* 15, 213.

Losquadro, W.D., 2017. Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. *Facial Plast Surg Clin North Am* 25, 283-289.

Lowe, A., Bills, J., Verma, R., Lavery, L., Davis, K., Balkus, K.J.Jr, 2015. Electrospun nitric oxide releasing bandage with enhanced wound healing. *Acta Biomater* 13, 121-130.

Mast, B.A., Schultz, G.S., 1996. Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds. *Wound Repair Regen* 4, 411–420.

Matés, J.M., Pérez-Gómez, C., Núñez de Castro, I., 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry* 32, 595-603.

Miao, M., Niu, Y., Xie, T., Yuan, B., Qing, C., Lu, S., 2012. Diabetes-impaired wound healing and altered macrophage activation: a possible pathophysiologic correlation. *Wound Repair Regen* 20, 203-213.

Murthy, P.K., Ahmed, M., Regu, K., 1991. Lack of genotoxicity of menthol in chromosome aberration and sister chromatid exchange assays using human lymphocytes in vitro. *Toxicology in Vitro* 5, 337–340.

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. *Biomed Pharmacother* 92, 229-239

Newsholme, P., & Krause, M., 2012. Nutritional regulation of insulin secretion: Implications for diabetes. *The Clinical Biochemist. Reviews/Australian Association of Clinical Biochemists*, 33(2), 35–47.

Patel, S., Santani, D., 2009. Role of NF-kappa B in the pathogenesis of diabetes and its associated complications. *Pharmacol Rep* 61, 595-603.

Peschen, M., Grenz, H., Brand-Saberi, B., Bunaes, M., Simon, J.C., Schopf, E., Vanscheidt, W., 1998. Increased expression of plate-let-derived growth factor receptor alpha and beta and vascular endothelial growth factor in the skin of patients with chronic venous insufficiency. *Arch Dermatol Res* 290, 291–297

Profyris, C., Tziotzios, C., Do Vale, I., 2012. Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics Part I. The molecular basis of scar formation. *J Am Acad Dermatol* 66, 1-10.

Ramalho, T., Filgueiras, L., Silva-Jr, I.A., Pessoa, A.F.M., Jancar, S., 2018. Impaired wound healing in type 1 diabetes is dependent on 5-lipoxygenase products. *Sci Rep* 8, 14164.

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. *Biomed Res Int* 9538351.

Sato, M., Sawamura, D., Ina, S., Yaguchi, T., Hanada, K., Hashi-moto, I., 1999. In vivo introduction of the interleukin 6 gene into human keratinocytes: induction of epidermal proliferation by the fully spliced form of interleukin 6, but not by the alternatively spliced form. *Arch Dermatol Res* 291, 400–404.

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.

Szkudelski, T., 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 50, 537-546.

Thomas, C.C., Philipson, L.H., 2015. Update on diabetes classification. *Med Clin North Am* 99.

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. *J Pharm Sci* 91, 1639-1651.

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.

Wada, K., Fukuyama, T., Nakashima, N., Matsumoto, K., 2015. Assessment of the in vivo genotoxicity of cadmium chloride, chloroform, and D,L-menthol as coded test chemicals using the alkaline comet assay. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 786-788, 114-119

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

Witte, M.B., Kiyama, T., Barbul, A., 2002. Nitric oxide enhances experimental wound healing in diabetes. *Br J Surg* 89, 1594-1601.

Xu B., Ji Y., Yao K., Cao Y.X., Ferro A., 2005. Inhibition of human endothelial cell nitric oxide synthesis by advanced glycation end-products but not glucose: relevance to diabetes. *Clinical Science (London)* 109, 439–446.

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.

Yang, S.W., Geng, Z.J., Ma, K., Sun, X.Y., Fu, X.B., 2016. Comparison of the histological morphology between normal skin and scar tissue. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci 36, 265-269.

Zhuang, X., Pang, X., Zhang, W., et al., 2012. Effects of zinc and manganese on advanced glycation end products (AGEs) formation and AGEs-mediated endothelial cell dysfunction. Life Sci 90, 131-139.

Capítulo 2

MENTHOL-BASED CREAM, A NOVEL THERAPY FOR DIABETIC SKIN WOUNDS: THE ANTI-INFLAMMATORY, ANTIOXIDANT AND CELL PROLIFERATIVE ACTIVITIES

Abstract

Diabetes impairs skin wound healing process by promoting a chronic inflammatory response and increased oxidative stress. Menthol is a natural compound, found in the essential oil of leaves of *Mentha* plants, which has bactericidal, fungicidal, analgesic and anesthetic properties described in the literature. The aim of our study was to investigate the healing potential of menthol-based cream in skin wounds of diabetic rats and the mechanisms of action. Diabetes was induced in male Wistar rats (n=10) via a single dose of streptozotocin (50 mg/kg, i.p.). After confirmation of the diabetic state (≥ 250 mg glucose/dL), the rats were divided into three groups: vehicle, insulin cream (0.5 U/g) and menthol-based cream (0.5%). The animals were anesthetized with ketamine (80 mg/kg, i.p.) and xylazine (40 mg/kg, i.p.) and the skin wound was made on the back of the mice with a 2 cm diameter punch. The wound area was measured, photographed and treated with creams once a day for 14 days. At the end of the period, the animals were euthanized through an increased depth of anesthesia, the wound area was destined to anti-inflammatory and antioxidant assays, measurement of MPO activity, and quantitative mRNA expression. Blood plasma was used to perform NO measurement. We observed that after 14 days of treatment, the group treated with menthol-based cream decreased the wound area at 94% and the vehicle and insulin cream-treated group decreased the wound area at 88% and 93%, respectively. Also, the treatment with menthol-based cream presented reduced levels of TNF- α and IL-6, and increased IL-10 levels, besides high activity of antioxidant enzymes, such as SOD, GPx, GR and an enhancement in GSH and NO levels. The treatment with menthol-based cream downregulate the expression of *Nfkb*, upregulated the expression of *Il10* and *Ki67*. Taken together, these results evidence that menthol-based cream accelerated the skin healing process in diabetic wounds by an anti-inflammatory and antioxidant activities and increased cell proliferation.

1. Introduction

Diabetes mellitus comprises a set of metabolic dysfunctions caused by hyperglycemia. According to data from the World Health Organization, currently, 422 million people worldwide are affected by diabetes. One-third of these individuals will develop skin disorders and the development of chronic wounds is one of the complications (Falanga, 2005). In the last 20 years, the costs of treating diabetes-related chronic wounds have extensively increased and estimated at 3.2 billion of dollars in the United States, being considered a public health problem (Nussbaum et al., 2018).

Diabetes causes hyperglycemia, which leads to increased oxidative stress, chronic inflammation, microvascular abnormalities, genetic material damage, and poor wound healing. In addition, the skin wound healing process is impaired by diabetes due to fibroblast dysfunctions, reduced collagen deposition, and deregulated remodeling (Almeida et al., 2016, Lamers et al., 2016, Xuan et al., 2014, Volpe et al., 2018).

In order to find new treatments for diabetic wounds, researchers have been studying the use of natural products and compounds (Huang et al., 2018, Sarandy et al., 2018, Kant et al., 2014). Menthol, a cyclic monoterpene, is the major compound found in essential oil extracted from leaves of plants of the genus *Mentha*. This compound is widely used by the food, cosmetic and pharmaceutical industries and is one of the most used flavoring substances (Kamatou et al., 2013). Menthol has biological activities described in the literature, such as local anesthetic (Galeotti et al., 2001), analgesic (Galeotti et al., 2002), antipruritic (Bromm et al., 1995), antibacterial (Trombetta et al., 2005), antifungal (Abbaszadeh et al., 2014), and anti-inflammatory (Rozza et al., 2014). Such properties make menthol a compound of interest in the study of skin wound healing in diabetic rats. For this reason, we aimed to investigate the skin wound healing potential of menthol by an anti-inflammatory response, antioxidant activity and mRNA expression in streptozotocin-induced diabetic rats.

2. Material and Methods

2.1. Experimental Animals

Male Wistar rats weighing 250-300 g were acquired from the Central Animal House of UNESP in Botucatu. The rats were housed in cages for acclimatization with controlled temperature ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$) and humidity ($60 \pm 1\%$) with 12 h light-dark cycles. The rats had free access to a certified diet and tap water. All efforts were done to

minimize animal suffering. All experimental protocols followed the recommendations of the Canadian Council on Animal Care and were approved by the UNESP Institutional Animal Care and Use Committee (permit number 793-CEUA).

2.2. Diabetes induction

After the acclimatization period, the rats were submitted to the glycemic dosage to determine the normal glycemic levels. The glycemic parameters were defined by the enzymatic glucose oxidase method using blood samples collected from the animal's tail, using Accu-Chek Active glucometer (Roche Diagnostics, São Paulo, Brazil). Then, the rats received a single dose of streptozotocin (50 mg/kg, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), diluted in citrate buffer solution (0.1 M, pH 4.5) via intraperitoneal injection (Romana-Souza et al., 2009). After two days, rats with glycemic levels greater than or equal to 250 mg/dl were considered diabetic.

2.3. Formulation of Creams

(-)-Menthol (catalog #63660, < 99% purity) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and incorporated into lanette cream at 0.5% (w/w). Insulin cream was incorporated into lanette cream and used as a reference drug (0.5 U/g). Lanette cream alone was used as the vehicle group.

2.4. Wound creation and treatment

At first, rats were anesthetized using an intraperitoneal injection of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), before a single subcutaneous injection of ketoprofen (100 mg/kg) to alleviate postoperative discomfort. We removed the hair of the back of rats and skin wound was performed using a 2 cm of diameter punch. After the wounding procedure, the rats were moved to individual cages and randomly distributed into three groups (n=10): vehicle, insulin cream (0.5 U/g) and menthol-based cream (0.5). Once a day, the wound region was measured using a transparent plastic film, then photographed using a ruler as a scale, furthermore the creams were applied in skin wounds. Rats were treated for 14 days. In the end, the rats were euthanized by an increased depth of anesthesia. The wound region was collected for biochemical and molecular assays, livers were collected for antioxidant assays and blood was collected to perform nitric oxide measurement.

2.5. Wound area retraction

We calculated the wound area using Adobe Photoshop CS3 (San José, CA, USA). We used the following equation to calculate the wound area retraction: $[(\text{wound area at day 1} - \text{wound area at day 14}) / \text{wound area at day 1}] \times 100$. Values were expressed as the percentage of wound retraction (Dos Santos Gramma et al., 2016).

2.6. Histological analysis

Histological slides were prepared from intact samples and were fixed in alcian solution (85% alcohol 80, 10% formalin and 5% acetic acid) and processed in a paraffin tissue processing machine. Sections of the skin wounds were cut to a thickness of 5 μm and stained with hematoxylin-eosin (HE) or Masson's trichrome for histological evaluation

2.7. Measurement of nitric oxide (NO) levels

Levels of NO in blood plasma were determined by a spectrophotometric method based on the Griess reaction (Griess, 1879). The colorimetric reaction was read in a spectrophotometer at 557 nm. The data was expressed as μmol of nitrite per μg of total protein.

2.8. Myeloperoxidase (MPO) activity

In order to assess the neutrophils accumulation, MPO activity was measured in liver samples. The method consisted in mixing the supernatant with phosphate buffer (0.05M, pH 6.8), O-dianisidine dihydrochloride, 0,0005% hydrogen peroxide and MPO (5 U/ml), read at 460 nm every minute for ten minutes. The results were expressed in units of MPO in a gram of protein (Winterbourn et al., 1995)

2.9. Pro- and anti-inflammatory assay

Skin samples were diluted in phosphate buffered saline (1:10) and centrifuged at 4 °C. Cytokines were detected in the supernatant using commercial ELISA kits for TNF- α , IL-6, and IL-10 from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). All procedures followed the manufacturer's protocols.

2.10. Antioxidant assays

2.10.1. Measurement of Glutathione (GSH) levels

The liver homogenate was diluted in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) and then added to the ELISA plate containing TRIS (1 mM) and EDTA buffer (2 mM, pH 8.2). To complete the reaction, 5'5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB,) was added. The yellow color was read at 412 nm on a spectrophotometer and the result obtained was in nm of GSH in mg of protein (Faure and Lafond, 1995)

2.10.2. Glutathione peroxidase (GPx) activity

The GPx activity was estimated as follows: liver homogenate diluted in phosphate buffer (0.1M, pH 7.4), a cocktail containing GR, GSH and NADPH, and hydrogen peroxide. Enzyme activity was determined by measuring the consumed NADPH per minute per mg, read at 365 nm every minute for ten minutes (Yoshikawa et al., 1993).

2.10.3. Glutathione reductase (GR) activity

The GR activity was established according to Carlberg and Mannervik (1985). The assay was conducted using phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4), EDTA (0,2 mM), oxidized glutathione (1 mM) and NADPH (0.1 mM). The consumption of NADPH was read at 340 nm every minute for ten minutes and the result was shown as nmol per min per mg protein.

2.10.4. Superoxide dismutase (SOD) activity

The SOD activity was evaluated in liver homogenate diluted in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4). The method consists of superoxide generation caused by a reduction in nitroblue tetrazolium using hypoxanthine-xanthine oxidase system (superoxide generation, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The reaction was read at 560 nm every minute for ten minutes and the result obtained was in SOD unit per milligram of protein (Winterbourn et al., 1995).

2.11. mRNA expression by RT-qPCR method

Total skin wound RNA was extracted and treated to avoid DNA contamination and then cDNA synthesis was performed (Nóbrega et al., 2010). The qPCR analysis was performed in duplicate in StepOne system (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instructions, and relative gene expression profiles were calculated according to Vischer et al. (2003). Cq values were performed using SYBR

Green (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and based on the reference gene *βactin* and then calibrated with ddCT. qPCR was conducted using designed and specific primers for *Rattus norvegicus* (table 1).

Target	Size	Sequence 5' - 3'	Melting Temperature	NCBI Reference sequence
<i>Ki67</i>	100	F: GGGTTTCCAGACACCAGACC R: ACCAGGAAGACCAGTTAGAACC	60°C	NM_001271366.1
<i>Angptl4</i>	90	F: AACTGTTCCAGAAGGTAGCCC R: TCAAGAGGTCAATCTGGCTCTG	60°C	NM_199115.2
<i>Nfkb</i>	98	F: CCTCATCTTTCCCTCAGAGCC R: CGCACTTGTAACGGAAACGC	60°C	NM_199267.2
<i>Il10</i>	95	F: GACGCTGTCATCGATTTCTCC R: GCTCCAAGACAAAGGTGTCTAC	60°C	NM_012854.2
<i>βactin</i>	80	F: CCCTGGCTCCTAGCACCAT R: GATAGAGCCACCAATCCACACA	60°C	NM_031144.3

Table 1: Specifications of primers used in RT-qPCR. F: forward, R: reverse.

2.12. Statistical analyses

The results were analyzed using ANOVA followed by Dunnett's test and compared with vehicle group. The results were presented as mean $\pm$ s.e.m. All analyses were performed using Graph Pad Prism version 5 for Windows (Graph Pad Software, La Jolla, CA, USA). A value of $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Glycemic levels

The glycemic levels were measured at a day before the wound procedure and a day before the euthanasia. The results showed that all the groups, during the experimental phase, maintained their glycemic levels above 400 mg of glucose/dL of blood, validating the establishment of diabetes in rats (figure 1).

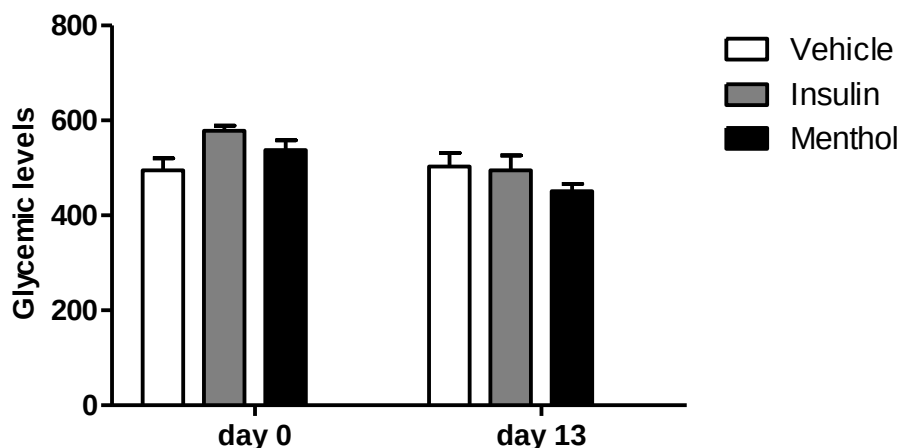


Figure 1: Glycemic levels measured at the day before the wound (day 0) and at a day before the euthanasia (day 13). Results were expressed as mean $\pm$ s.e.m. and analyzed by paired t test.

3.2. Wound area retraction

The group treated with vehicle reduced the wound area in 88% and the insulin cream treated-group, in 93% after 14 days of treatment. The menthol-based cream presented the highest percentage of skin wound retraction (94%, $p < 0,01$, figure 2). The progression of skin wound healing process at the days 1, 6, 10 and 14 are shown in figures 3 and 4.

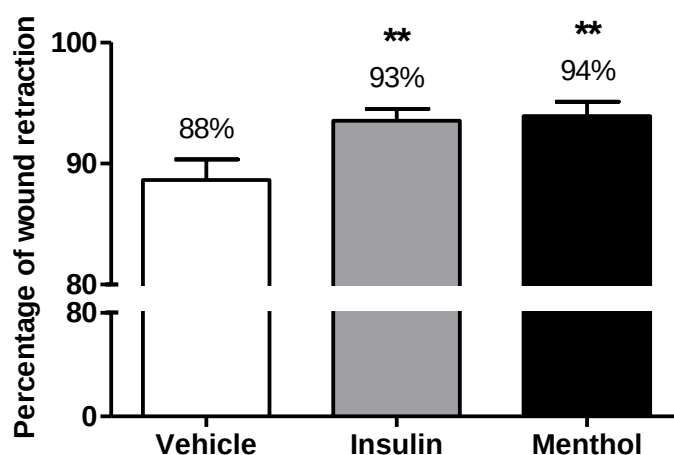


Figure 2: Percentage of skin wound retraction on the back of diabetic Wistar rats after 14 days of treatment with vehicle, insulin cream and menthol-based cream. Results were expressed as mean $\pm$ s.e.m. and analyzed by ANOVA followed by Dunnett, $**p < 0,01$.

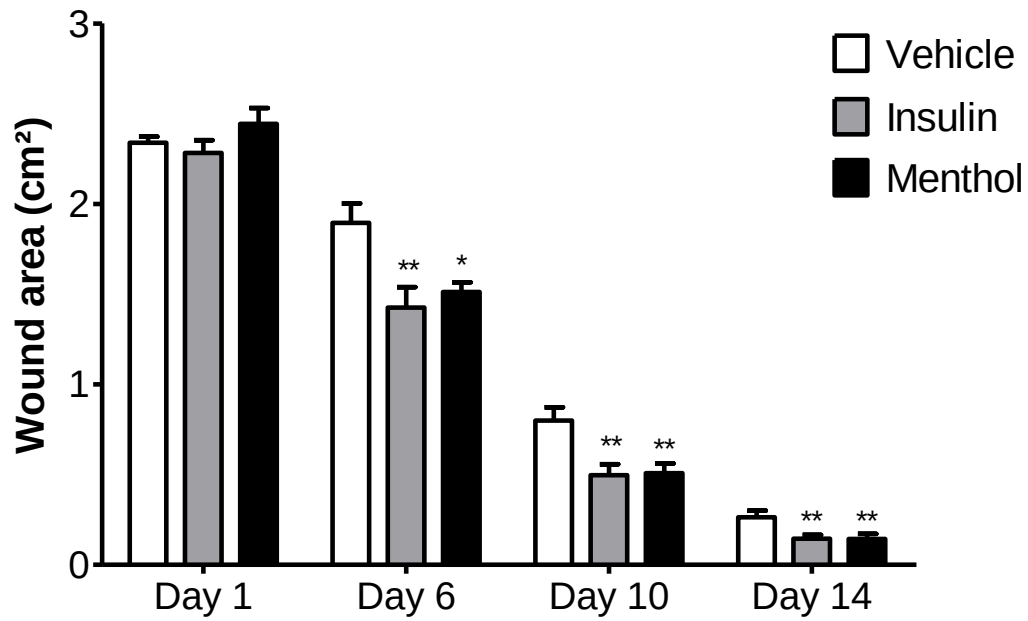


Figure 3: Wound area on the back of diabetic Wistar rats at day 1, 6, 10 and 14 of treatment with vehicle, insulin cream and menthol-based cream. Results were expressed as mean $\pm$ s.e.m. and analyzed by ANOVA followed by Dunnett, *p<0,05, **p<0,01.

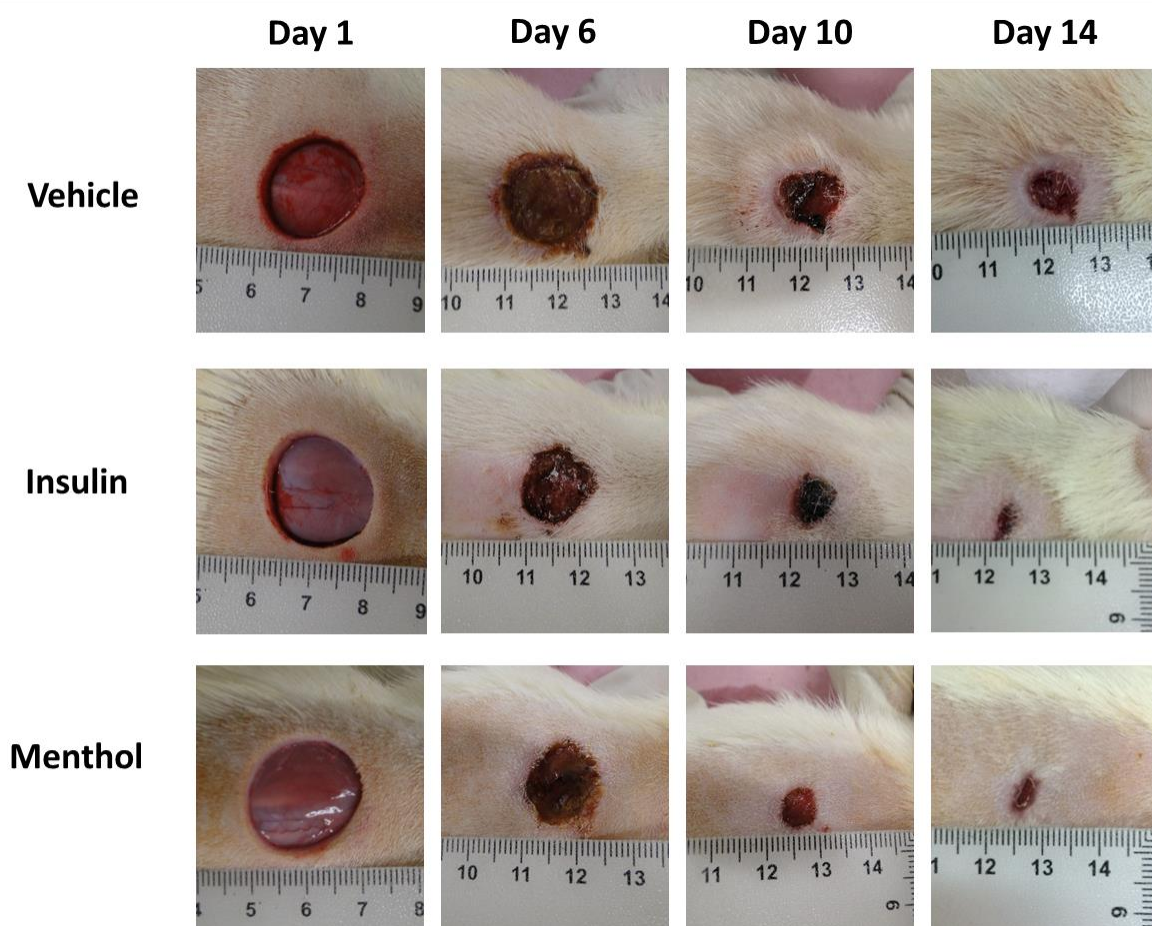


Figure 4: Skin wounds on the back of diabetic Wistar rats at day 1, 6, 10 and 14 of treatment with vehicle, insulin cream or menthol-based cream.

3.3. Histological analyses

The HE stained slides showed that after 14 days the group treated with the vehicle still had the epidermal region undergoing regeneration compared to the groups treated with insulin cream and menthol-based cream, which showed an advanced repair process observed through an epidermal layer established and an organized extracellular matrix. The sections stained with Masson's trichrome evidenced the collagen fibers in the group treated with insulin cream and menthol-based cream (figure 5).

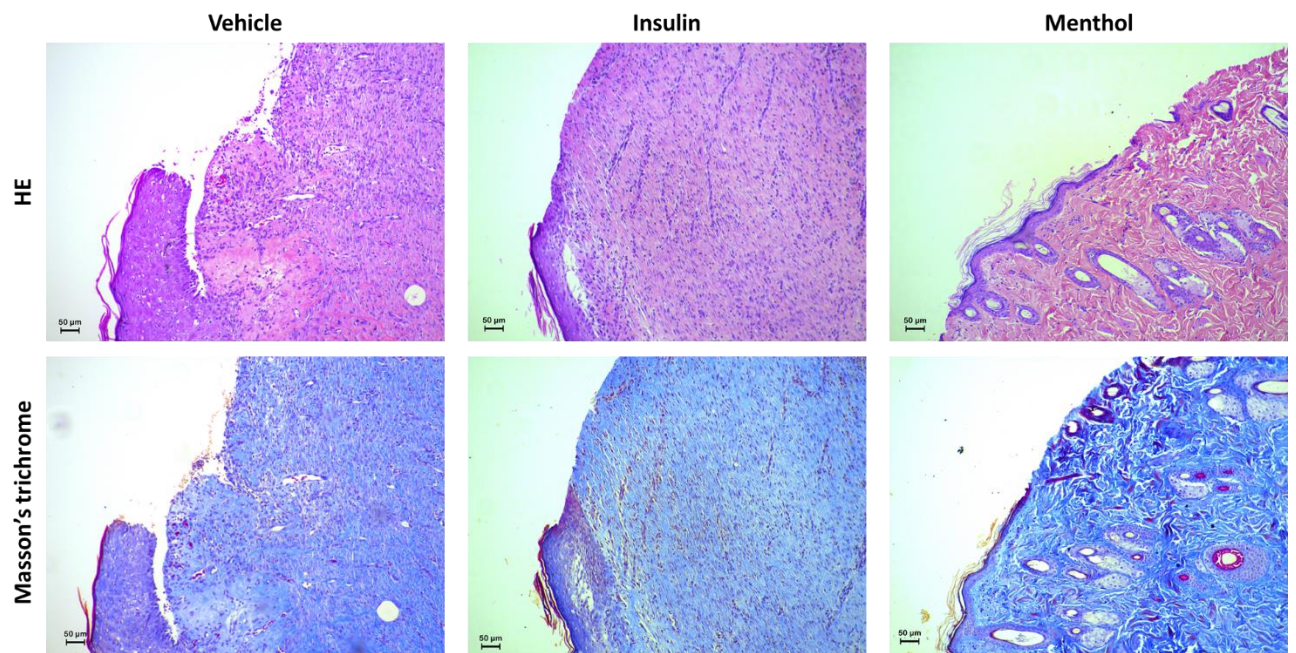


Figure 5: HE-stained and Masson's trichrome-stained histological skin wound sections after 14 days of treatment with vehicle, insulin cream or menthol-based cream.

3.4. Measurement of NO levels

NO plays a role in wound healing, modulating the reepithelization and collagen deposition. After 14 days, the group treated with menthol-based cream showed a significant increase in NO levels in comparison to base group (figure 6).

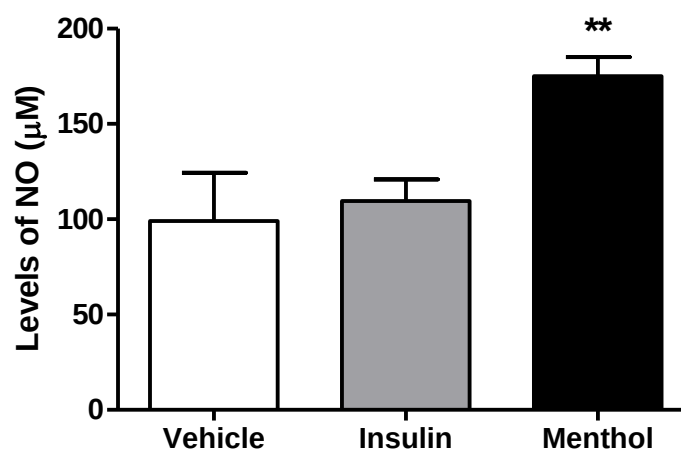


Figure 6: NO levels measured in blood plasma after 14 days of treatment with vehicle, insulin cream or menthol-based cream in diabetic Wistar rats. Results were expressed as mean $\pm$ s.e.m. and analyzed by ANOVA followed by Dunnett, ** $p < 0.01$.

3.5. MPO activity

MPO is produced by neutrophils and is well-known for being a pro-inflammatory marker and a pro-oxidant enzyme. The activity of MPO was decreased in the groups treated with insulin cream and menthol-based cream groups after 14 days of treatment (figure 7).

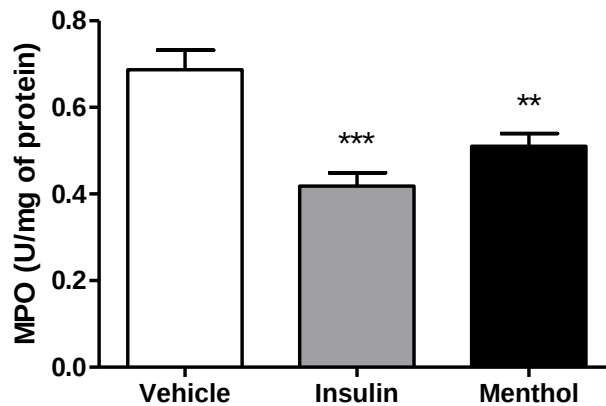


Figure 7: MPO activity after 14 days of treatment with vehicle, insulin cream or menthol-based cream. Results were expressed as mean $\pm$ s.e.m. and analyzed by ANOVA followed by Dunnett, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3.6. Pro- and anti-inflammatory assay

We measured the levels of pro-inflammatory cytokines, TNF- α and IL-6, and anti-inflammatory cytokine, IL-10, in skin wound samples. As shown in figure 8, in comparison to vehicle, the levels of pro-inflammatory cytokines were decreased in the group treated with the menthol-based cream. Whereas, the levels of IL-10, which inhibits the production of TNF- α and IL-6, were increased.

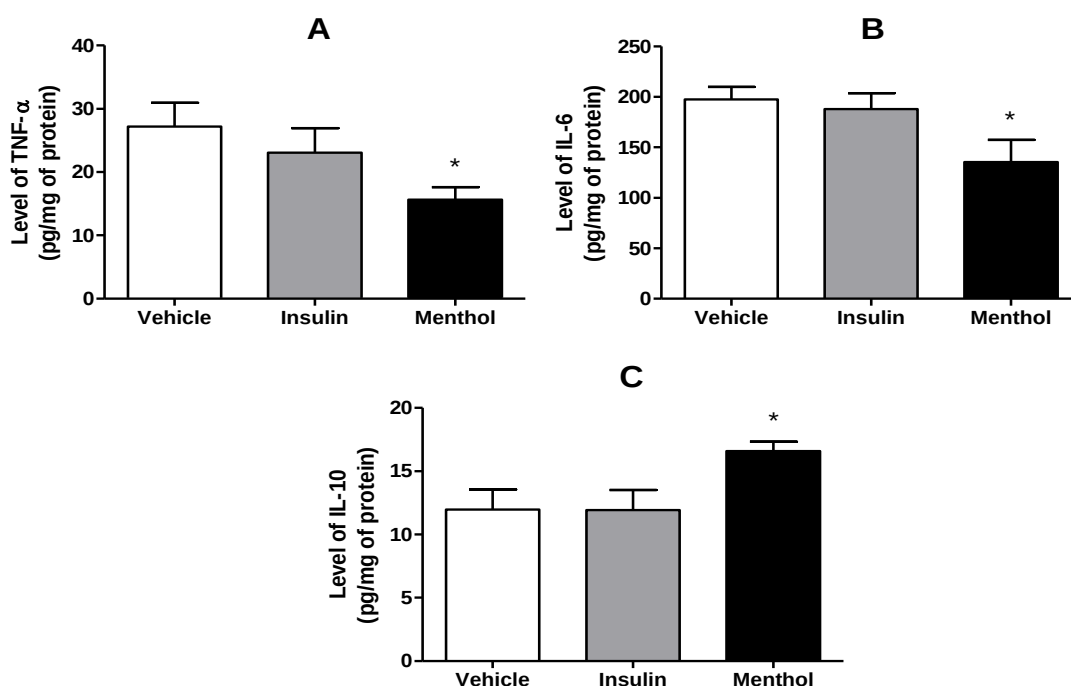


Figure 8: Levels of TNF- α (A), IL-6 (B) and IL-10 (C) in skin wound samples of diabetic Wistar rats after 14 days of treatment with vehicle, insulin cream or menthol-based cream. Results were expressed as mean $\pm$ s.e.m. and analyzed by ANOVA, followed by Dunnett, * $p < 0,05$.

3.7. Antioxidants assays

We measured the level of GSH and the activity of GPx, GR and SOD enzymes. We observed that the group treated with menthol-based cream presented an enhanced level of GSH and high enzymatic activity of GPx, GR and SOD in comparison to vehicle, evidencing an antioxidant effect offered by menthol-based cream (figure 9).

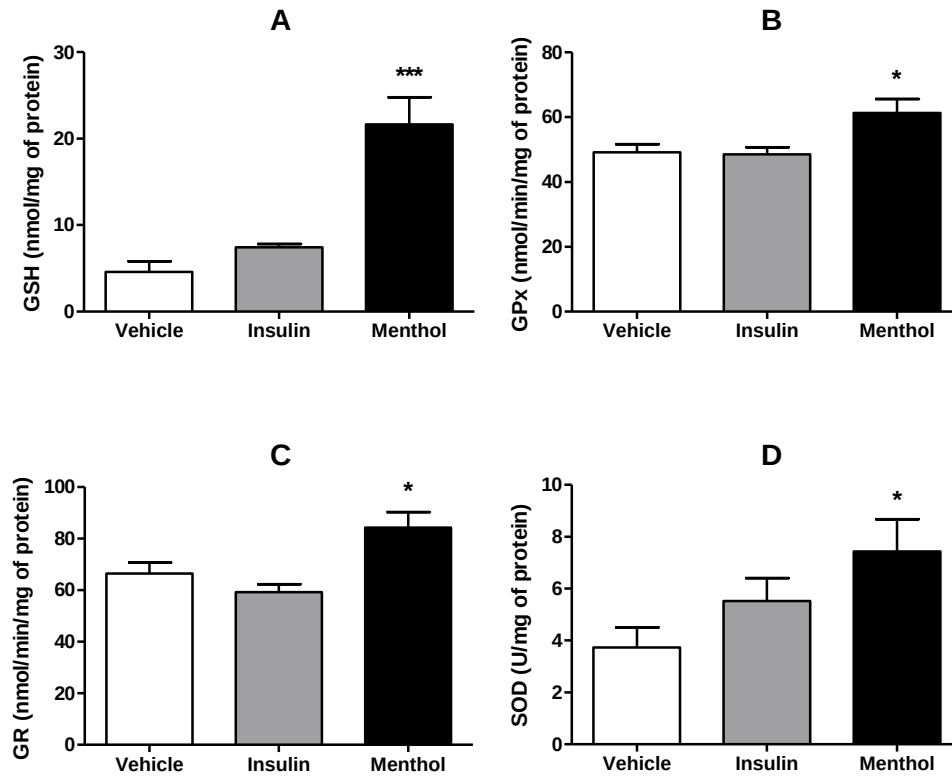


Figure 9: Levels of GSH and enzymatic activity of GPx, GR e SOD after 14 days of treatment with vehicle, insulin cream or menthol-based cream. Results were expressed as mean $\pm$ s.e.m. and analyzed by ANOVA followed by Dunnett, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

3.8. mRNA expression by RT-qPCR method

We quantified and analyzed the mRNA expression of *Ki67*, a proliferative cell marker, *Angptl4*, which plays a role in re-epithelization, *Nfkb*, a transcriptional factor responsible for regulating the inflammatory response, and *Il10*, an anti-inflammatory cytokine. As a result, shown in figure 10, the group which was treated for 14 days with menthol-based cream showed increased *Ki67* and *Il10* mRNA expression, besides decreased *Nfkb* mRNA expression. The *Angptl4* mRNA expression was not altered by the treatments.

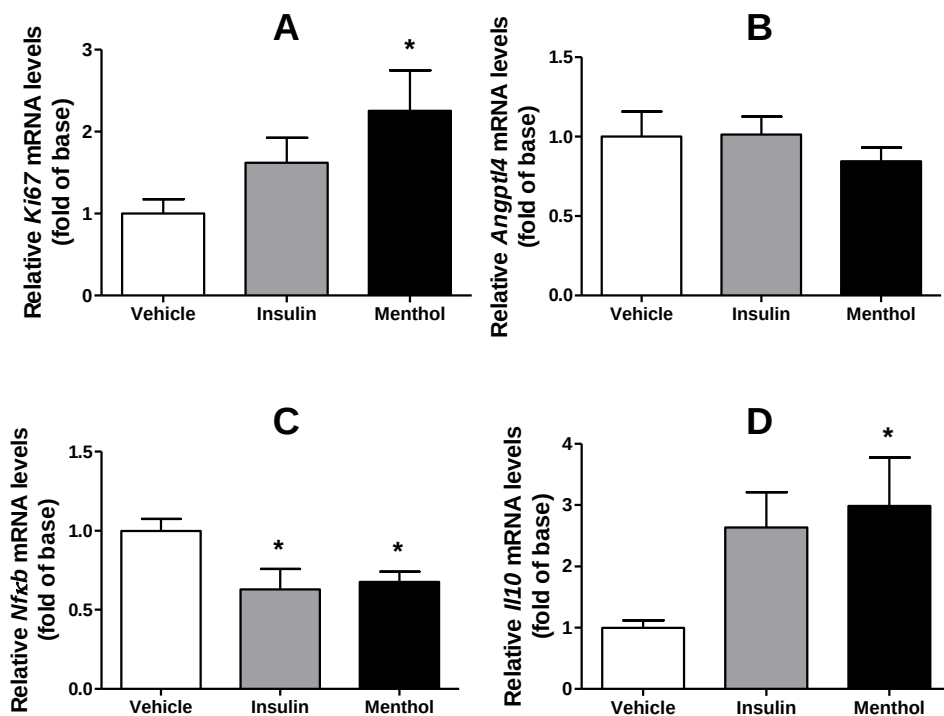


Figure 10: Quantity of *Ki67* (A), *Angptl4* (B), *Nfkb* (C), and *Il10* (D) mRNA expression, normalized with β actin, in skin wounds samples of diabetic Wistar rats after 14 days of treatment with vehicle, insulin cream or menthol-based cream. Results were expressed as mean $\pm$ s.e.m. and analyzed by ANOVA followed by Dunnett test, * $p < 0.05$.

4. Discussion

The present study aimed to investigate the healing potential of menthol-based cream in skin wounds of diabetic rats and its mechanisms of action. The process of skin wound healing is complex and regulated by several molecular and biochemical factors. Under the diabetic condition, which systematically affects the organism due to hyperglycemia, this process has its effectiveness impaired, which can lead to limb amputation or death (Weledji and Fokam, 2014). Our results showed that menthol-based cream was capable of accelerating the healing process in diabetic rats.

NO has been used in the treatment of non-healing skin wound. A recent clinical trial was performed using a device that generates NO directly in the diabetic wound region, improving the skin wound healing, an effect credited to stimulation of angiogenesis and antimicrobial activity (Edmonds et al., 2018). In an earlier study conducted by Burrow et al. (2007), the treatment with NO donor compounds in diabetic fibroblasts increased the NO production and cell proliferation. The increased NO

production observed after treatment with the menthol-based cream could have increased the mRNA expression of Ki-67, contributing to enhance the wound healing process.

Some studies have shown that the inflammatory process in diabetic individuals is delayed and prolonged (Sun et al., 2012). NF- κ B is activated during the skin wound healing process and is responsible for regulating the expression of genes related to inflammation and oxidative stress, cell migration, proliferation, and adhesion. However, under a diabetic condition, the upregulation of NF- κ B impairs the healing process by upregulating the expression of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-6 (Ambrozova et al., 2017). TNF- α level is increased in diabetic wounds, leading to a decreased cell proliferation and an enhancement of fibroblast apoptosis (Siqueira et al., 2010). Barrientos (2008) showed that high levels of IL-6 in diabetic wounds hamper the healing process. Our data suggest that menthol-based cream treatment was capable of downregulating the expression of Nf- κ B and, consequently, decrease the levels of TNF- α and IL-6. Also, the mRNA expression and levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 were upregulated, demonstrating that the wound healing effect induced by menthol is related to an anti-inflammatory property.

Natural products with antioxidant potential have been studied as a therapy for diabetic wounds (Kant et al., 2014, Lodhi and Singhai, 2013). Diabetes induces an increase in MPO activity and subsequent ROS production, resulting in oxidative stress, which affects the angiogenesis, keratinocytes migration, and collagen deposition, leading to a poor healing process (Dhall et al., 2014). The body has its own way to counteract the oxidative stress by producing proteins and enzymes that degrade ROS, thus diminishing its effects. Natural products can have a free radical-scavenging activity that improves our antioxidant defense. SOD is an antioxidant enzyme which catalyzes the conversion of ROS into hydrogen peroxide. GPx in association with GSH degrades hydrogen peroxide into water at the same time that GR converts GSH from the reduced form to the oxidized (Matés et al., 1999, Chaudière and Ferrari-Iliou, 1999). The level of GSH and activities of these enzymes are decreased in skin wounds of streptozotocin-induced diabetic rats, a condition which can be reversed after topical treatment with natural products, accelerating the wound healing process (Li et al., 2008, Ram et al., 2014). The group treated with menthol-based cream showed low activity of the pro-oxidant enzyme MPO, which resulted in high activities of SOD, GPx, and GR, and high levels of GSH. These results evidenced that menthol-based cream displayed an antioxidant activity, which probably contributed to speed up the skin wound healing.

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*2:201800337R

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.