

Artigo

ANDROGRAPHOLIDE PROMOVE CAPTAÇÃO DE GLICOSE E TRANSPORTE DE GLUT4 ATRAVÉS DA VIA PKC EM CÉLULAS L6

RESUMO

Jingya Liao 1, †, Ziwei Yang 1, †, Yanhong Yao 1, Xinzhou Yang 2, Jinhua Shen 1 and Ping Zhao 1, *

1. Instituto de Biologia Médica e Laboratório Chave Provincial de Hubei para Proteção e Aplicação de Produtos Especiais Plantas na área de Wuling da China, Faculdade de Ciências da Vida, Universidade Centro-Sul de Minzu, Wuhan 430074, China

2 Escola de Ciências Farmacêuticas, Universidade Centro-Sul de Minzu, Min-Zu Road, Wuhan 430074, China

* Correspondência: p.zhao@scuec.edu.cn

† Estes autores contribuíram igualmente para este trabalho.

RESUMO

O transportador de glicose 4 (GLUT4) é uma proteína de membrana que regula o equilíbrio da glicose no sangue e está intimamente relacionada ao diabetes tipo 2. Andrographolide (AND) é uma lactona diterpênica extraída do fitoterápico *Andrographis paniculata*, que possui uma variedade de atividades biológicas. Neste estudo, o efeito antidiabético do AND nas células L6 e seu mecanismo foram investigados. A captação de glicose pelas células L6 foi detectada por um kit de ensaio de glicose. A expressão de GLUT4 e a fosforilação da proteína quinase B (PKB/Akt), proteína quinase dependente de AMP (AMPK) e proteína quinase C (PKC) foram detectadas por Western blot. Ao mesmo tempo, os níveis intracelulares de Ca²⁺ e a translocação de GLUT4 em células myc-GLUT4-mOrange-L6 foram detectados por microscopia confocal de varredura a laser. Os resultados mostraram que o AND aumentou a captação de glicose, a expressão de GLUT4 e a fusão com a membrana plasmática nas células L6. Enquanto isso, AND também ativou significativamente a fosforilação de AMPK e PKC e aumentou a concentração de Ca²⁺ intracelular. A expressão de GLUT4 induzida por AND foi significativamente inibida por um inibidor de PKC (Gö6983). Além disso, no caso de 0 mM de Ca²⁺ extracelular e 0 mM de Ca²⁺ extracelular + 10 µM de BAPTA-AM (quelante de Ca²⁺ intracelular), AND induziu a translocação de GLUT4, e a captação de glicose foi significativamente inibida. Portanto, concluímos que o AND promoveu a expressão de GLUT4 e sua fusão com a membrana plasmática em células L6 através das vias PKC de maneira dependente de Ca²⁺, aumentando assim a captação de glicose.

Palavras-chave: Andrographolida; GLUT4; Ca²⁺; Células L6; Diabetes Tipo 2

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a federação internacional de diabetes (IDF), até 2045, a prevalência global de diabetes aumentará de 9,3% em 2019 (463 milhões) para 10,9% (700 milhões de pessoas), enquanto mais de 90 % dos pacientes com diabetes mellitus têm diabetes mellitus tipo 2 (DM2) [1]. O DM2 é uma doença metabólica multietiológica vitalícia caracterizada por hiperglicemia crônica acompanhada por distúrbios no metabolismo de açúcares, gorduras e proteínas devido à secreção ou função defeituosa de insulina [2–5]. Anormalidades metabólicas a longo prazo levam a danos crônicos e disfunções de vários tecidos, especialmente olhos, rins e nervos, causando uma série de complicações, como nefropatia diabética e complicações cardiovasculares e cerebrovasculares do diabetes, que ameaçam seriamente a segurança da vida dos pacientes. 6–8]. Portanto, manter o metabolismo normal da glicose é essencial para a saúde.

A proteína transportadora de glicose 4 (GLUT4) é um membro da família de transportadores de glicose que existe principalmente no músculo esquelético, no tecido adiposo e no coração. É uma proteína de membrana que a insulina regula para reduzir a glicose no sangue e possui um domínio transmembrana de 12 vezes [9]. O GLUT4 é responsável pelo transporte extracelular de glicose e desempenha um papel central no metabolismo da glicose em todo o corpo, que está intimamente relacionado ao DM2 [10,11]. As vesículas de armazenamento GLUT4 (GSV) são transportadores de vesículas transportáveis que existem na gordura e no músculo esquelético células [12,13].

A translocação do GLUT4 é induzida principalmente por vias dependentes e independentes de insulina [14,15]. Estudos demonstraram que a fosforilação da proteína quinase B (Akt/PKB) e suas proteínas a montante e a jusante, bem como a ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), pode promover a translocação de GLUT4, de modo a promover a captação de glicose pelo músculo esquelético [16–19]. Outros estudos mostraram que a fosforilação da via atípica da proteína quinase C (aPKC) desempenha um papel importante na translocação do GLUT4 e na captação de glicose [20,21]. O aumento de Ca^{2+} no citosol medeia a contração muscular, que por sua vez induz a transferência de GLUT4 do interior da célula para a superfície celular para aumentar o transporte de glicose [22,23].

Esses relatórios forneceram referência para o estudo do mecanismo de diferentes medicamentos hipoglicemiantes. Alguns estudos anteriores mostraram que muitos ingredientes ativos de fitoterápicos têm efeitos antidiabéticos significativos, como saponinas totais panax notoginseng [24], semente de cássia [25], neferina [26] e berberina [27]. Andrographolide (AND) é um composto de lactona diterpenóide extraído da erva chamada *Andrographis paniculata* [28], que tem uma variedade de efeitos biológicos, incluindo efeitos antiinflamatórios, antioxidantes e antitumorais [29,30].

Em relação ao efeito terapêutico do AND no diabetes, estudos anteriores mostraram que o AND tem um efeito hipoglicêmico em camundongos diabéticos induzido por estreptozotocina (STZ) [31] e também pode melhorar o metabolismo lipídico e a utilização de glicose em camundongos obesos induzidos por uma dieta rica em gordura. [32]. E pode reduzir o estresse oxidativo renal e a inflamação mediados pela hiperglicemia e melhorar a nefropatia diabética [33]. Em nosso estudo, confirmamos que o AND promove a expressão do GLUT4 através da via PKC, promovendo assim a fusão do GLUT4 na membrana plasmática e a captação de glicose. Também demonstramos que a fusão de GLUT4 induzida por AND na membrana plasmática e a captação de glicose eram dependentes de Ca^{2+} intracelular. Em conclusão, estes estudos fornecem ainda uma referência para o mecanismo molecular antidiabético do AND com GLUT4 como alvo. **2. RESULTADOS**

2.1. E foi o componente principal no AP-EtOAc

A homogeneidade foi comparada com cromatogramas representativos de LC-ESIMS entre AP-EtOAc e AND na Figura 1. Descobrimos que AP-EtOAc e AND tiveram o mesmo tempo de retenção. E foi considerado o principal ingrediente ativo no AP-EtOAc com conteúdo de cerca de 22,71%. Portanto, levantamos a hipótese de que AND era a base do efeito antidiabético direcionado ao GLUT4 do AP-EtOAc. Em seguida, investigamos a atividade antidiabética Pharmaceuticals 2022, 15, x FOR PEER REVIEW 3 of 19 of AND visando GLUT4.

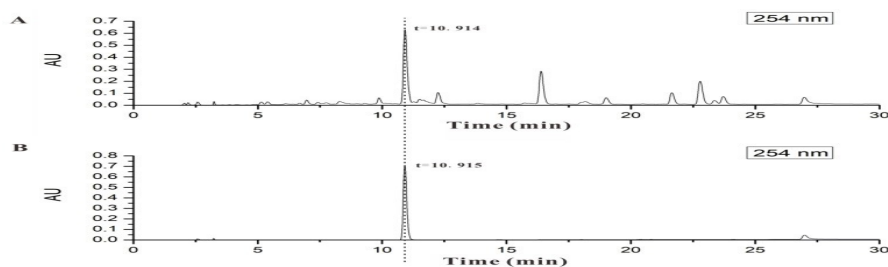


Figura 1. AND foi o principal componente do AP-EtOAc. (A) Análise HPLC de AP-EtOAc mostrada em 254 nm. (B) análise HPLC de AND mostrada em 254 nm. (B) análise HPLC de AND mostrada em 254 nm. 254 nm. (B) análise HPLC de AND mostrada em 254 nm.

2.2. AP-EtOAc Promoveu a Captação de Glicose e Melhora o Transporte de GLUT4

Neste estudo, primeiro analisamos o efeito do AP-EtOAc na captação de glicose em células L6 usando um kit de ensaio de glicose (GLU-OX) (método de glicose oxidase). Supomos que AP EtOAc poderia aumentar a captação de glicose tanto na resistência à insulina (IR) quanto nas células L6 normais, enquanto a insulina 100 nM apenas induziu o aumento da captação de glicose em células não resistentes à insulina, como mostrado na Figura 2A,B. No modelo sem resistência à insulina, após a adição de drogas para incubar células L6, o efeito de 60 µg/mL AP-EtOAc na captação de glicose foi significativamente maior do que no grupo controle, e o efeito de captação de glicose de 90 µg/mL AP-EtOAc foi comparável ao da insulina.

Em contraste, o efeito do fármaco na promoção da captação de glicose foi dependente da dose. A seguir, a fim de estudar se o AP-EtOAc poderia promover a captação de glicose aumentando o transporte de GLUT4 nas células, observamos as alterações nos níveis de GLUT4 nas células por microscopia confocal a laser. Os resultados mostraram que nas células myc-GLUT4-mOrange-L6 tratadas com AP-EtOAc a 60 µg/mL em 30 min, o nível de proteína fluorescente vermelha (GLUT4-mOrange) Pharmaceuticals 2022, 15, x FOR PEER REVIEW 4 of 19 nas células aumentou rapidamente em cerca de duas vezes (Figura 2 C, D).

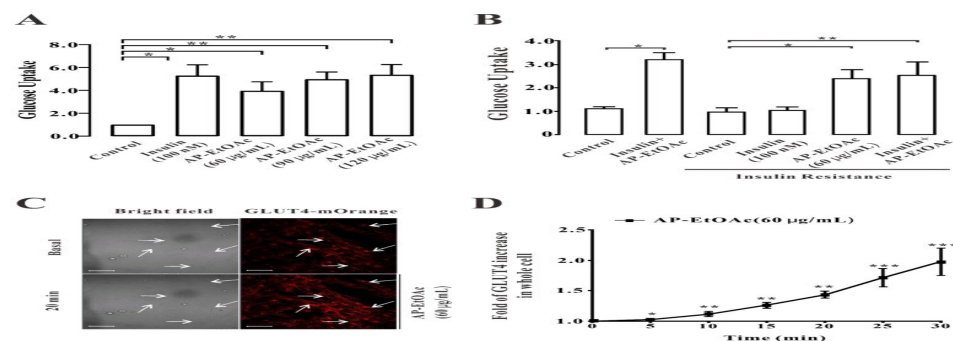


Figura 2. AP-EtOAc promoveu a captação de glicose e melhorou o transporte de GLUT4 em células L6. (A) AP-EtOAc promoveu a captação de glicose e melhorou o transporte de GLUT4 em células L6. Os valores no eixo Y representam a relação dobrada da captação de glicose pelas células L6 em comparação com aquelas em condições normais. Captação de glicose detectada usando um kit de glicose oxidase em células L6, os valores (A) no eixo Y representam a relação dobrada da captação de glicose

pelas células L6 em comparação com os dados que representam a média \pm sem. de valores de três experimentos separados. O grupo controle foi aquele em condições normais. Captação de glicose detectada por meio de kit de glicose oxidase em células L6, considerada 1 para análise de dados. (B) Os valores no eixo Y representam a relação dobrada da captação de glicose pelas células L6 em comparação com condições normais. Os dados induzidos pela captação de glicose nas células L6 representam a média \pm sem. de valores de três experimentos separados. (C) Imagens de 60 μ g/mL AP-EtOAc estimulando o transporte de GLUT4 em células L6. Barra de escala = 50 μ m. (D) Cálculo da intensidade de fluorescência em células myc-GLUT4-mOrange-L6 usando Software Zen 2010, n = 30 células. *: p < 0,05; **: p < 0,01, ***: p < 0,001 por AP-EtOAc em células L6 resistentes à insulina, os dados representam a média \pm sem. de valores de três

2.3. Níveis de Expressão da Proteína GLUT4 Induzidos por AP-EtOAc e Fusão na Membrana Plasmática em Células L6.

Após AP-EtOAc induzir o transporte de GLUT4 em células myc-GLUT4-mOrange-L6 por um microscópio confocal de varredura a laser (CLSM), consideramos se o AP-EtOAc poderia também promover a fusão do GLUT4 à membrana plasmática. Portanto, para verificar isso conclusão, realizamos um experimento de imunofluorescência para detectar fluorescência vermelha (GLUT4-mOrange) e fluorescência verde (FITC-myc). Como resultado, descobrimos que ambos 60 μ g/mL AP-EtOAc e 100 nM de insulina poderiam promover a fusão do GLUT4 com a membrana plasmática (Figura 3A).

Contamos a fluorescência FITC da superfície celular para quantificar células positivas sob AP-EtOAc e insulina foram de 70% e 85%, respectivamente (Figura 3B). O examinamos os níveis de expressão da proteína GLUT4 em células L6. Depois de adicionar 60 μ g/mL e 90 μ g/mL AP-EtOAc em 30 min, a expressão da proteína GLUT4 aumentou em aproximadamente 0,9 vezes e 1,3 vezes, respectivamente (Figura 3C). Concluímos que AP-EtOAc promoveu a expressão e fusão do nível da proteína GLUT4 na membrana plasmática em células L6.

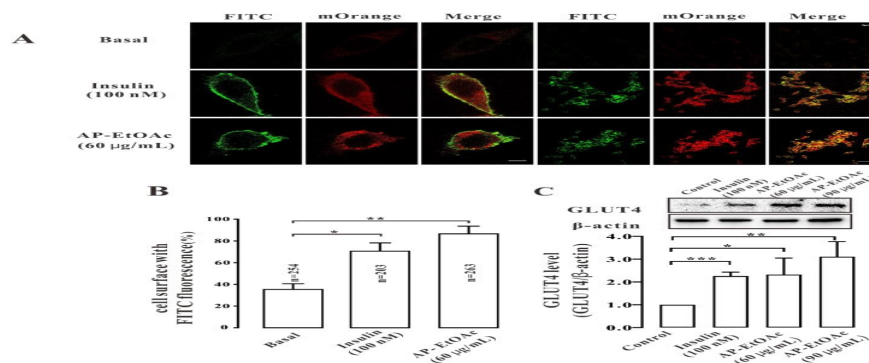


Figura 3. AP-EtOAc melhorou a expressão da proteína GLUT4 e fusão de GLUT4 com a membrana plasmática em células L6. (A) Ensaio de fluorescência FITC em células myc-GLUT4-mOrange tratadas com membrana de 60 μ g/mL em L6 cAelPls-E.tO(Ac)oFrIT10C0 nfmUoinrseuslcine.nScealeasbsaar:y5ijnmminysci-nGgILeUceTII4i-magOe,ra50nguemicnelmsutltrie-caetleldim wagiet.h(B) Número de Células positivas para GLUT4-mOrange, os dados representam a média \pm sem. de valores de três AP-EtOAc 60 μ g/mL ou insulina 100 nM. Barra de escala: 5 μ m em imagem de célula única, 50 μ m em experimentos separados de múltiplas células, com entre 200 e 300 células sendo examinadas em cada experimento. (C) A imagem. (B) Número de células

positivas para GLUT4-mOrange, os dados representam a média \pm sem. de valores nível de expressão de GLUT4 após tratamento com insulina 100 nM ou diferentes concentrações de AP- fromtrêsseparadosEetOxpAecrfiomre3n0tmsiwnitnhLb6ectewlles.eTnh2e0c0onatnrodl 3gr0o0ucpewllsasbceoinsgidexreadmaisn1edfoirdeatacahneaxlypsiesr.iTmhendta.ta representam a média \pm s. em. de valores de três experimentos separados. : $p < 0,05$; *: $p < 0,01$, *: $p < (C)$ O nível de expressão de GLUT4 após tratamento com insulina 100 nM ou diferentes concentrações 0,001. de AP-EtOAc por 30 min em células L6. O grupo controle foi considerado como 1 para análise dos dados. Os dados representam a média \pm sem. de valores de três experimentos separados. : $p < 0,05$; *: $p < 0,01$, *: $p < 0,001$.

2.4. Promoção e Captação de Glicose em Células L6 Normais e Resistentes à Insulina

Analizamos o efeito de AND na captação de glicose em células L6. A Figura 4A mostra que analisamos o efeito do AND na captação de glicose nas células L6. A Figura 4A mostra a estrutura química do andrographolide. Conforme mostrado na Figura 4B, D, descobrimos que 30, 50, a estrutura química do andrographolide. Como mostrado na Figura 4B, D, descobrimos que 30, 100 μ M E e 150 μ M E aumentaram significativamente a captação de glicose em ambas as insulinas - 50, 100 μ M E e 150 μ M E aumentaram significativamente a captação de glicose em ambos resistentes (IR) e células L6 normais de maneira dependente da dose. Após o tratamento medicamentoso, as células L6 resistentes à insulina (IR) e normais de maneira dose-dependente. Após o tratamento medicamentoso, a taxa de sobrevivência das células foi determinada por um ensaio MTT. Os resultados do MTT mostraram que, a taxa de sobrevivência das células foi determinada por um ensaio MTT. Os resultados do MTT tanto AND quanto insulina não tiveram efeito tóxico nas células L6 (Figura 4C).

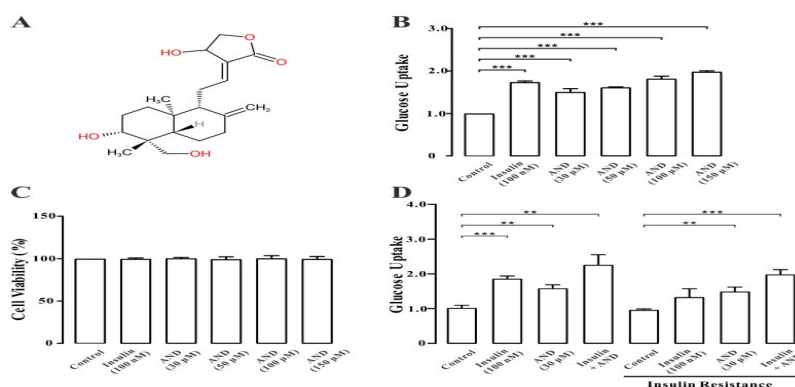


Figura 4. AND promoveu a captação de glicose nas células L6. (A) Estrutura química de AND (B) Os valores no eixo Y representam a relação dobrada da captação de glicose pelas células L6 em comparação com isso em condições normais. Captação de glicose nas células L6 sob a incubação de AND ou insulina, os dados representam a média \pm sem. de valores de três experimentos separados. (C) Toxicidade de E para células L6, os dados representam a média \pm sem. de valores de três experimentos separados (D) Os valores no eixo Y representam a relação dobrada da captação de glicose pelas células L6 em comparação com isso em condições normais. Captação de glicose em células L6 induzida por AND em resistentes à insulina Células L6, os dados representam a média \pm sem. De valores de três experimentos separados. **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

2.5. Promoção e Fusão de GLUT4 na Membrana Plasmática e Regulação Positiva da Expressão do Regulador GLUT4 em Células L6,

Primeiro realizamos experimentos de imunofluorescência em myc-GLUT4 em células L6. Para determinar se AND promoveu a captação de glicose afetando o regulador de glicose GLUT4 em células L6, realizamos primeiro experimentos de imunofluorescência em células myc-GLUT4-mOrange-L6. Os resultados mostraram que tanto AND quanto a insulina poderiam GLUT4-mOrange-L6 nas células. Os resultados mostraram que tanto o AND quanto a insulina poderiam promover a fusão do GLUT4 na membrana plasmática (Figura 5A). Contamos com FITC a fusão do GLUT4 na membrana plasmática (Figura 5A).

Contamos a fluorescência do FITC na superfície celular para quantificar esse efeito. Verificou-se que na presença de cence na superfície celular é possível quantificar esse efeito. Verificou-se que na presença de 100 nM de insulina 100 nM e 30 μ M AND, a proporção de células FITC positivas para fluorescência em insulina e 30 μ M AND, a proporção de células FITC positivas para fluorescência no GLUT4- o GLUT4-mOrange -o número de células positivas foi de 76% e 64%, respectivamente (Figura 5B). Para determinar ainda mais o efeito de AND na expressão GLUT4, exploramos a expressão nível de proteína GLUT4 em células L6 após estimulação com insulina ou AND. Os resultados mostraram que a expressão da proteína GLUT4 foi significativamente aumentada em células tratadas com 100 Nm insulina ou diferentes concentrações de AND em comparação com o grupo controle em branco (Figura 5C). Portanto, assumimos que AND promoveu a expressão e translocação de GLUT4 em células L6.

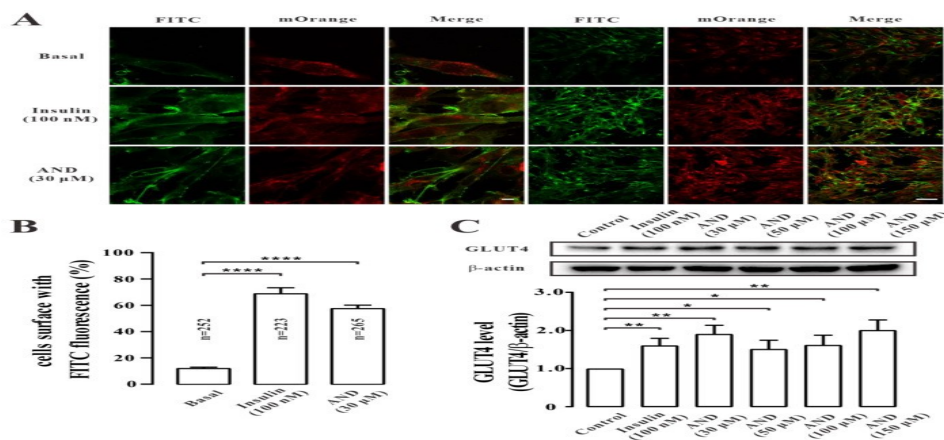


Figura 5. AND promoveu expressão e fusão de GLUT4 na membrana plasmática. (A) análise de fluorescência FITC de células L6 tratadas com AND ou insulina. Barra de escala: 10 μ m para imagens unicelulares e 50 μ m para imagens multicelulares. (B) O número de células positivas para GLUT4-mOrange, os dados representam o média \pm sem de valores de três experimentos separados com entre 200 e 300 células examinadas em cada experimento. (C) O nível de expressão de GLUT4 após tratamento com insulina 100 nM ou diferentes concentrações de AND por 30 min em células L6. O grupo controle foi considerado como 1 para dados análise. Os dados representam a média \pm sem. de valores de três experimentos separados. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ****: $p < 0,0001$.

2.6. E Caminhos AMPK e PKC Ativados

Em seguida, tentamos determinar a via de transdução de sinal envolvida na indução de AND Translocação de GLUT4 em células L6. As células foram tratadas com diferentes concentrações de E, e insulina [34], metformina [35] e forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) [36] foram utilizados como controles positivos para as vias Akt, AMPK e PKC, respectivamente. Você dados mostraram que a fosforilação da via Akt não mudou significativamente após tratamento com diferentes concentrações de AND (Figura 6A), mas fosforilação de AMPK e a PKC aumentou (Figura 6B,C). Estes resultados podem sugerir que AND poderia ativar o Vias AMPK e PKC, mas não vias Akt.

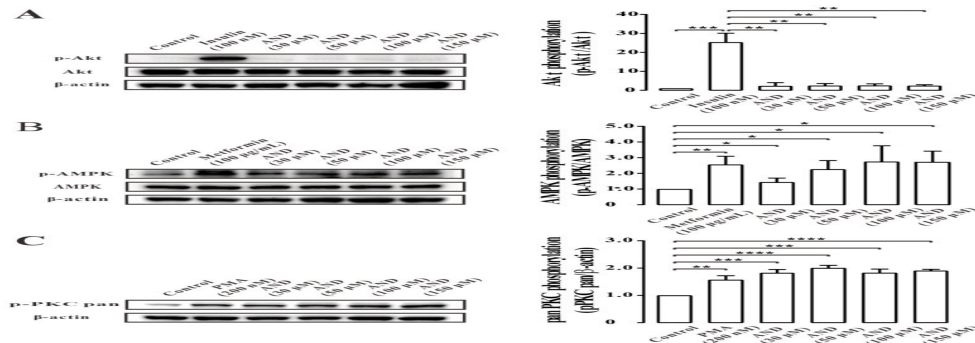
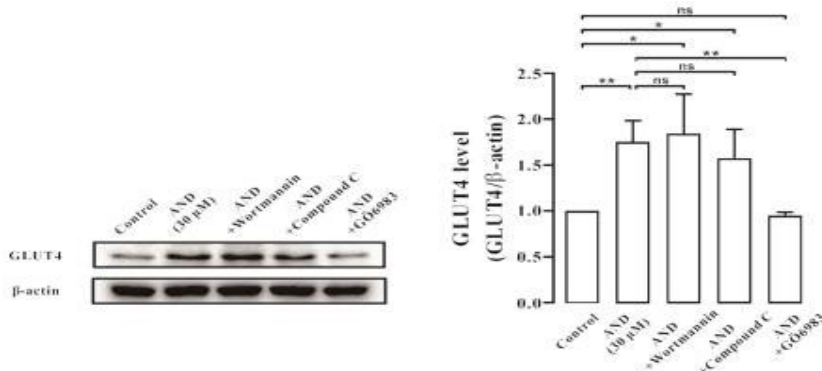


Figura 6. E induziu a fosforilação das vias de sinalização PKC e AMPK. (A) A fosforilação de Akt em células L6 tratadas com insulina e diferentes concentrações de AND. O controle o grupo foi considerado como 1 para análise dos dados. Os dados representam a média \pm sem. de valores de três experimentos separados. (B) A fosforilação da AMPK no tratamento de células L6 com metformina e diferentes concentrações de AND. O grupo controle foi considerado como 1 para análise dos dados. O os dados representam a média \pm sem. de valores de três experimentos separados. (C) A fosforilação de PKC em células L6 tratadas com PMA e diferentes concentrações de AND. O grupo controle foi considerado como 1 para análise dos dados. Os dados representam a média \pm sem. de valores de três separados experimentos. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$.

Posteriormente, utilizamos um inibidor da via PI3K/Akt (Wortmannin), um inibidor da via AMPK (Composto C) e um inibidor da via PKC (Gö6983) para validação adicional. Após 30 min de tratamento com inibidor, o AND foi incubado durante 30 min, e o nível de expressão da proteína GLUT4 em células L6 foi detectado por Western blotting. Os resultados mostraram que Gö6983, mas não Wortmannin e Composto C, inibiram a expressão da proteína GLUT4 estimulada por AND (Figura 7). Estes resultados sugerem que a expressão de GLUT4 induzida por AND pode ser mediada principalmente através do pat PKC



7. E induziu a expressão de GLUT4 através da via de sinalização PKC. O grupo controle foi considerado como 1 para análise dos dados. A expressão de GLUT4 induzida por AND sob a ação de três inibidores. ns: $p > 0,05$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$

2.7 E Promoveu Concentração de Ca^{2+} em Células L6

Para estudar o papel da concentração de Ca^{2+} nas células myc-GLUT4-mOrange-L6 estimuladas por AND, primeiro coramos o Ca^{2+} intracelular com um corante fluorescente Fluo-4 AM para determinar seu conteúdo nas células. Sob microscopia confocal de varredura a laser, as alterações na concentração de Ca^{2+} nas células L6 estimuladas por AND dentro de 30 min foram monitoradas em tempo real. As imagens foram tiradas a cada 5 minutos após a dosagem. Descobrimos que os níveis intracelulares de Ca^{2+} aumentaram significativamente cerca de 3,4 vezes após a incubação a 30 μM AND por 30 min de maneira dependente do tempo (Figura 8). Portanto, especulamos que o AND poderia estimular o aumento da concentração de Ca^{2+} nas células L6. No entanto, se o cálcio intracelular estava envolvido no GLUT4 estimulado por AND a expressão e a captação de glicose precisam ser mais exploradas.

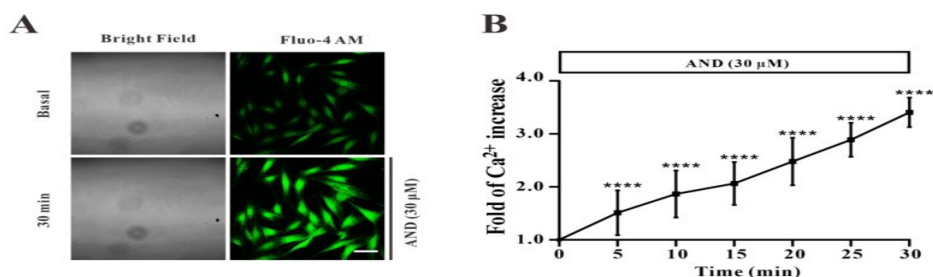


Figura 8. AND induziu aumento da concentração de Ca^{2+} em células L6. (A) Imagens de concentração de Ca^{2+} alterações nas células L6 tratadas com AND. Barra de escala: 50 μM . (B) A alteração da intensidade de fluorescência intracelular de Ca^{2+} causada por E dentro de 30 min, $n = 15$ células. ****: $p < 0,0001$.

2.8. Translocação de GLUT4 Afetada e Induzida por Ca^{2+} e Captação de Glicose em Células MycGLUT4-mOrange-L6

Para determinar se o aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} após AND a estimulação foi relacionada à translocação de GLUT4, bloqueamos o Ca^{2+} intracelular de diferentes fontes antes do tratamento com 30 μM AND e observamos a translocação de GLUT4. O alterações da fluorescência verde FITC em células myc-GLUT4-mOrange-L6 sob 2 mM de Ca^{2+} extracelular, 0 mM de Ca^{2+} extracelular e 0 mM de Ca^{2+} extracelular foram observadas por um método de imunofluorescência sob o tratamento do quelante intracelular de Ca^{2+} BAPTAAM.

Os resultados mostraram que a fluorescência verde do FITC em células L6 sob três condições quase não foi detectado nas células de controle. Observamos um aumento significativo no FITC fluorescência verde na superfície da membrana celular após

estimulação de Ca^{2+} extracelular (2 mM) quando 30 μM E estimulou as células. Curiosamente, sob condições de 0 mM Ca^{2+} extracelular e 0 mM de Ca^{2+} extracelular + 10 μM BAPTA-AM, a fluorescência verde FITC dificilmente pôde ser detectada na membrana celular (Figura 9A,B). Portanto, a fusão de GLUT4 induzida por AND na membrana celular foi de fato regulada pela sinalização de Ca^{2+} .

Posteriormente, testamos o efeito da concentração de Ca^{2+} na captação induzida por AND de glicose usando um kit de glicose oxidase. Realizamos os experimentos utilizando um kit de glicose oxidase com ou sem AND ou insulina sob condições de 2 mM, 0 mM extracelular Ca^{2+} ou 0 mM de Ca^{2+} extracelular + 10 μM BAPTA-AM. Os resultados mostraram que houve não houve diferença significativa na captação de glicose na ausência de AND ou insulina em três condições.

No entanto, quando as células foram tratadas com AND ou insulina, a captação de glicose foi significativamente menor no tratamento com concentração extracelular de Ca^{2+} 0 mM do que no tratamento com concentração extracelular de Ca^{2+} 2 mM. Da mesma forma, a captação de glicose foi significativamente inibido com AND ou insulina quando tratado com Ca^{2+} extracelular 0 mM + 10 μM BAPTA-AM (Figura 9C). Portanto, assumimos que a translocação induzida por AND de GLUT4 e captação de glicose nas células L6 foram de fato afetadas pela concentração de Ca^{2+} .

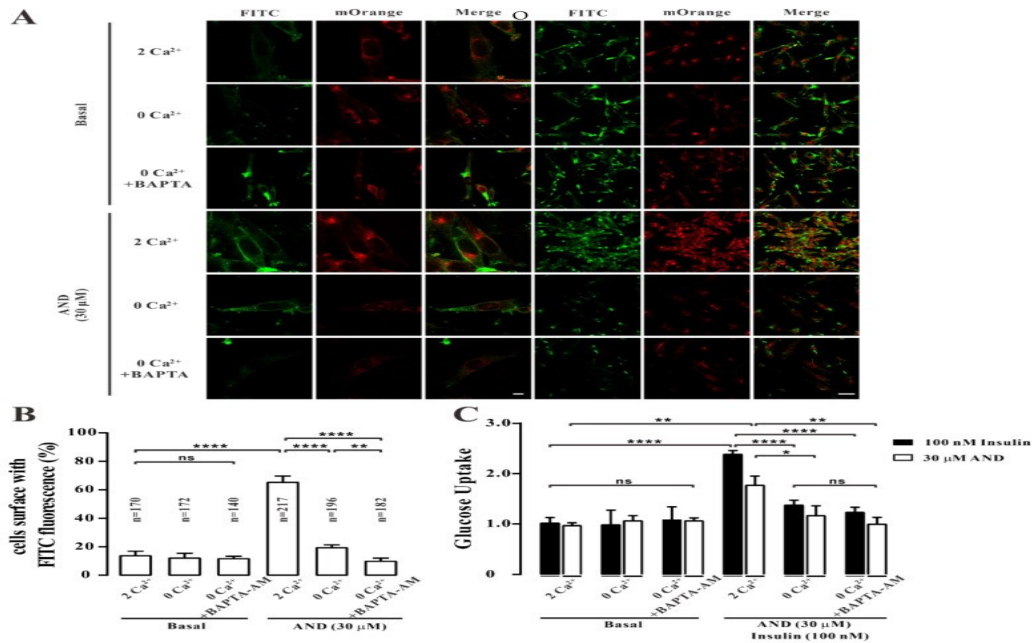


Figura 9. Translocação de GLUT4 e captação de glicose induzida por AND em células L6 bloqueadas por 0 mM Ca^{2+} extracelular e Ca^{2+} extracelular 0 mM + BAPTA-AM 10 μM . (A) células L6 foram estimuladas por E sob as condições de 2 mM de Ca^{2+} extracelular, 0 mM de Ca^{2+} extracelular e 0 mM Ca^{2+} extracelular + 10 μM BAPTA-AM. A distribuição da fluorescência vermelha

e verde nas células L6 foi detectado por microscopia confocal de varredura a laser. Barra de escala: 10 μ m para imagens unicelulares e 50 μ m para imagens multicelulares. (B) O número de dados de células positivas para GLUT4-mOrange representa o média \pm sem de valores de três experimentos separados, com entre 200 e 300 células examinadas em cada experimento. (C) Captação de glicose induzida por insulina ou AND nos três tampões de Ca^{2+} sistemas. Os três grupos à esquerda são o grupo controle e os três grupos à direita representam captação de glicose após adição de insulina e AND. Os dados representam a média \pm sem. de valores de três experimentos separados. ns: $p > 0,05$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ****: $p < 0,0001$.

3. DISCUSSÃO

E é o principal ingrediente da planta natural *Andrographis paniculata*. É um composto de lactona diterpenóide que possui remoção de calor, desintoxicação, anti-inflamatório e efeitos analgésicos. Como antibiótico natural, tem um efeito curativo especial em infecções bacterianas e virais. infecções do trato respiratório superior e diarreia. Outros estudos in vitro mostram que em db/db diabetes em ratos, E tem um efeito hipoglicêmico, melhorando a função da barreira intestinal e aumentando a diversidade microbiana [37].

Outros estudos mostraram que AND poderia inibir o expressão de fibronectina em células mesangiais induzida por glicose elevada e inibe diabetes nefropatia ao inibir a via AP-1 [38]. E tem sido usado no tratamento de diabetes e suas complicações; no entanto, existem poucos estudos sobre o mecanismo molecular do seu efeito anti-diabetes. Neste estudo, descobrimos que o AP-EtOAc promoveu a captação de glicose e transporte aprimorado de GLUT4 nas células L6. E é provavelmente o principal componente em AP-EtOAc. E regulou positivamente a expressão de GLUT4 e promoveu a fusão de GLUT4 no membrana plasmática, ativando as vias PKC, enquanto aumenta a captação de glicose de maneira dose-dependente. Além disso, AND poderia aumentar o conteúdo de intracelular Ca^{2+} , e a fusão do GLUT4 com a membrana plasmática e a captação de glicose induzida por AND dependia da existência de Ca^{2+} nas células L6.

GLUT4 é um membro da família de proteínas GLUT, que é distribuída principalmente em partes sensíveis à insulina, como músculo esquelético, tecido adiposo e outros, e atua em a forma de vesículas de armazenamento GLUT4 (GSVs). Quando estimulado por insulina e aumento de Ca^{2+} concentrações, as vesículas de armazenamento de GLUT4 translocam-se da célula para a membrana celular e absorver glicose [39]. Portanto, o GLUT4 pode ser usado como alvo terapêutico para o tipo 2 diabetes.

Estudos anteriores relataram que AND reduziu o fator de necrose tumoral- α induzido resistência à insulina em adipócitos 3T3-L1 [40], mas seu mecanismo

hipoglicêmico nas células L6 é não está claro. Neste estudo descobrimos pela primeira vez que AP-EtOAc promoveu a captação de glicose e transporte aprimorado de GLUT4 em células L6 (Figura 1). AP-EtOAc aumentou a fusão de GLUT4 em a membrana celular (Figura 2A, B) e também aumentou a expressão da proteína GLUT4 em células L6 (Figura 2C). Portanto, supusemos que o AP-EtOAc tivesse atividade antidiabética, visando GLUT4. Descobrimos ainda que AND era o principal componente do AP-EtOAc (Figura 3). Em seguida, descobrimos que o AND poderia aumentar a captação de glicose em pacientes resistentes à insulina e células L6 não resistentes através de um kit de detecção de glicose (Figura 4B,D), enquanto um ensaio MTT descobriram que AND não teve efeito tóxico nas células L6 (Figura 4C). Em segundo lugar, também usamos CLSM observar a distribuição de fluorescência em células myc-GLUT4-mOrange-L6 estimuladas por E através de um experimento de imunofluorescência.

Como a tag myc é inserida no primeiro domínio externo do GLUT4, a tag myc está localizada fora da membrana celular quando o GLUT4 está fundido na membrana plasmática e pode servir adequadamente como uma molécula repórter para Fusão do GLUT4 na membrana plasmática. Enquanto isso, AND poderia induzir a fusão de GLUT4 na membrana plasmática em células myc-GLUT4-mOrange-L6 (Figura 5A,B), e a proteína nível de expressão também mostrou que AND promoveu a expressão de GLUT4 (Figura 5C).

Posteriormente, procuramos identificar vias de transdução de sinal relacionadas ao GLUT4 ativado por AND. Estudos anteriores mostraram que a translocação e expressão do GLUT4 envolve várias vias de sinalização, uma das três vias mais clássicas para o Via Akt, via AMPK e via PKC [41,42]. Os três caminhos podem regular o aumento de GLUT4 e a captação de glicose [43]. Quando investigamos quais destas três vias de sinalização estavam relacionadas à translocação de GLUT4 induzida por AND e expressão, descobrimos que AND poderia ativar significativamente a fosforilação da AMPK e vias PKC, mas não teve efeito na via Akt (Figura 6).

Enquanto isso, quando três inibidores da via Composto C (inibidor da via AMPK), Gö6983 (via PKC inibidor) e Wortmanina (inibidor da via PI3K/Akt), Gö6983 inibiu significativamente a expressão de GLUT4 induzida por AND, enquanto o Composto C e Wortmannina não teve efeito inibitório ou indutor na expressão de GLUT4 (Figura 7). Portanto, acreditamos que isso ativou principalmente a via PKC para promover a expressão de GLUT4.

Foi relatado anteriormente que um aumento na concentração de Ca^{2+} pode promover Translocação de GLUT4 para a superfície celular e aumento do transporte de glicose [44]. A fim de explorar ainda mais o mecanismo de AND promovendo a expressão e translocação de GLUT4 em células L6, investigamos se a concentração de Ca^{2+} desempenhava um papel nesse processo. Em primeiro lugar, A coloração de cálcio Fluo-4 AM mostrou que AND aumentou a concentração intracelular de Ca^{2+} em células L6 de maneira dependente do tempo (Figura 8). Em segundo lugar, células myc-GLUT4-mOrange-L6 foram estimuladas com AND sob condições de 2 mM e 0 mM de Ca^{2+} extracelular e 0 mM de Ca^{2+} extracelular + 10 μM de BAPTA-AM.

Estes resultados descobriram que AND induziu a fusão de GLUT4 à membrana plasmática em apenas 2 mM de Ca^{2+} extracelular por experimentos de imunofluorescência, enquanto sob as condições de 0 mM de Ca^{2+} extracelular e 0 mM de Ca^{2+} extracelular + 10 μM de BAPTA-AM, a translocação de GLUT4 induzida por AND foi inibido (Figura 9A,B). Entretanto, sob as condições de eliminação extracelular de Ca^{2+} e presença intracelular de Ca^{2+} , a captação de glicose induzida por AND nas células L6 foi significativamente reduzida (Figura 9C). No entanto, a ativação da via da proteína G-PLC-IP3-IP3R promove a liberação de Ca^{2+} na membrana do retículo endoplasmático, resultando em aumento das concentrações de cálcio intracelular e, assim, aumentando a captação de glicose nas células L6 [26].

Embora a translocação de GLUT4 induzida por AND tenha sido inibida com 0 mM de Ca^{2+} extracelular, ainda houve um aumento significativo em comparação com aquele com 0 mM de Ca^{2+} extracelular + 10 μM de BAPTA-AM por ensaio de imunofluorescência (Figura 9B). Portanto, levantamos a hipótese de que o AND poderia promover a liberação de Ca^{2+} intracelular a 0 mM de Ca^{2+} extracelular, aumentando assim a translocação de GLUT4 e a captação de glicose nas células L6 até certo ponto. Em conclusão, o AND poderia aumentar o conteúdo intracelular de Ca^{2+} , enquanto a translocação do GLUT4 e a captação de glicose induzida pelo AND dependem do Ca^{2+} nas células L6.

Em conclusão, AND promoveu a expressão de GLUT4 e sua fusão na membrana plasmática em células L6 através de vias PKC, aumentando assim a captação de glicose, e induziu tanto a translocação de GLUT4 quanto a captação de glicose de maneira dependente de Ca^{2+} (Figura 10) . Muitos experimentos em animais mostraram que o AND teve certos efeitos contra o diabetes e suas complicações. Nosso estudo revelou o

mecanismo molecular do efeito antidiabético do AND e forneceu ainda suporte teórico para o AND como um produto natural para tratar o diabetes.

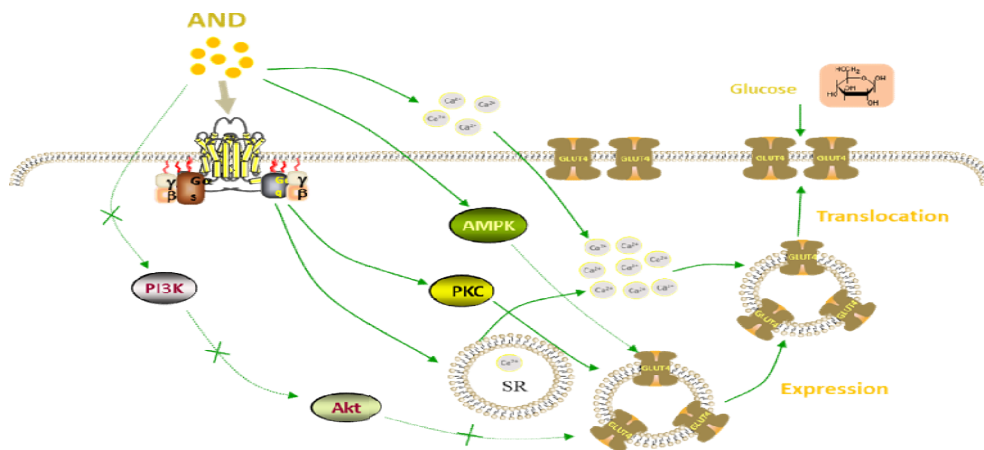


Figura 10. Modelo proposto do aumento da captação de glicose induzido por AND em células L6.

E promoveu a expressão do GLUT4 principalmente através das vias PKC, aumentando assim a fusão do GLUT4 com a membrana plasmática e a captação de glicose. E também aumentou o Ca^{2+} intracelular nas células L6. Além disso, a fusão do GLUT4 na membrana plasmática e a captação de glicose foram induzidas pelo AND de maneira dependente de Ca^{2+} .

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Produtos Químicos e Reagentes

Andrographis paniculata (Burm. f) Nees foi coletado em Bozhou, província de Anhui, China, e foi identificado pelo professor DingrongWan na Escola de Ciências Farmacêuticas da Universidade Centro-Sul de Minzu (SCMZU), Wuhan, China. Andrographolide (98, 9%, $C_{20}H_{30}O_5$, MW350.45) e metformina foram adquiridos da Shanghai Yuanye Bio-Technology Company (Xangai, China). GLUT4 (1F8) mAb de camundongo (anti-GLUT4, Cat# 2213S), β -Actina (8H10D10) mAb de camundongo (anti- β -actina, Cat# 3700S), Phospho-Akt (Ser473) (193H12) mAb de coelho (anti-p-Akt, Cat# 4058S), Akt Rabbit Ab (Anti-Akt, Cat# 9272S), Phospho-AMPK α (Thr172) (D79.5E) Rabbit mAb (anti-p-AMPK, Cat# 4188S), AMPK α Rabbit Ab (anti-AMPK, Cat# 2532S) e Phospho-PKC (pan) (zeta Thr410) (190D10) Rabbit mAb (anti-p-PKC, Cat# 2060S) foram os produtos da Cell Signaling Technology (Boston, MA, EUA). IgG de cabra anti-coelho, conjugado com HRP (Cat # CW0103L) e IgG de cabra anti-rato, conjugado com HRP (Cat # CW0102L) foram adquiridos à CWBIO (Pequim, China). Anticorpo monoclonal de camundongo anti-c-myc (Anti-c-myc, Cat # HT101) e IgG anti-camundongo de cabra (H + L), conjugado FITC (FITC, Cat # HS211-01) foram

adquiridos da Transgen Biotech (Pequim, China). Dorsomorfina (Composto C, Cat# S7840) e GÖ6983 (Cat# S2911) foram os produtos da Selleckchem (Houston, Texas, EUA). Wortmannin (Cat # 681676) e BAPTA-AM (Cat # 196419) foram adquiridos da Sigma (Darmstadt, Alemanha). O FBS foi adquirido da Sijiqing (Hangzhou, China), os antibióticos e o mínimo foram adquiridos da Gibco (Grand Island, NE, EUA). O Ca^{2+} 2 mM em solução salina fisiológica (PSS) continha o seguinte (em mM): 135 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl_2 , 2 CaCl_2 , 10 HEPES e 10 glicose (pH = 7,4 ajustado com NaOH). O PSS de Ca^{2+} 0 mM continha o seguinte (em mM): 135 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl_2 , 0,5 EGTA, 10 HEPES e 10 glicose (pH = 7,4).

4.2. Extrato de Acetato de Etila de *Andrographis Paniculata* (AP-EtOAc)

O rizoma seco da raiz de *andrographis* foi moído até formar um pó e embebido em solução de etanol a 80% de acordo com a proporção material-líquido de 1:5, e o sobrenadante foi coletado a cada 2 dias. Após a filtração por sucção, foi evaporado até a secura em um evaporador rotativo e repetido 3 a 5 vezes. Em seguida, obteve-se o extrato parcial em etanol. A substância solúvel em etanol foi extraída com água ultrapura e éter de petróleo. Após a remoção da gordura, o extrato foi extraído com acetato de etila, e o extrato foi evaporado e seco em rotaevaporador para obtenção do extrato de *Andrographis*.

4.3. Determinação de Conteúdo

Andrographolide foi dissolvido com metanol a uma concentração de 1,5 mg/mL e filtrado com um filtro de membrana microporosa de 0,22 μm . Uma solução padrão com concentração de 1,5 mg/mL foi colocada em um frasco líquido e 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20 μL foram adicionados a cada amostra. A área do pico de andrographolida medida pela concentração foi traçada como uma curva padrão.

Ao mesmo tempo, o AP-EtOAc foi dissolvido em 6,5 mg/mL com uma solução de metanol, filtrado da mesma forma que na solução acima e depois colocado no frasco líquido. As amostras foram injetadas sempre nas mesmas condições. O cromatograma e o tempo de retenção de andrographolide e AP-EtOAc foram comparados para determinar a existência de andrographolide em AP-EtOAc. O conteúdo de andrographolida em AP-EtOAc foi determinado substituindo os dados relevantes na curva padrão. A aquisição e processamento dos dados foram realizados pelo MassLynx™ Software 4.0 (Waters, Milford, CT, EUA).

4.4. Cultura e Diferenciação de Células L6

As células L6 (mioblastos de rato) foram adquiridas da Procell Life Science & Technology Company (Cat # CL-0136, Wuhan, China) com 10% de soro fetal bovino (FBS), 1% de antibióticos (100 U/mL penicilina estreptomicina e 100 µg/mL) e 89% de meio do mínimo necessário para preparar o meio completo. Células L6 foram cultivadas a 37 °C em uma incubadora contendo 5% de CO₂ (Thermo Fisher Scientific, Nova York, NY, EUA) e subcultivado quando a densidade das células era de cerca de 80%.

Para obter células diferenciadas, as células foram crescidas no fundo da placa e os miotubos foram obtidos substituindo o meio de diferenciação por soro fetal bovino (FBS) a 2%, antibióticos a 1% (100 U/mL de penicilina e 100 µg/ mL de estreptomicina) e 97% de alfa médio essencial mínimo diferenciado por 5–7 dias.

4.5. Ensaios de Captação de Glicose de Células Normais e Células Resistentes à Insulina

Neste estudo, os níveis de captação de glicose foram medidos utilizando um kit de ensaio de glicose (GLU-OX) nos miotubos L6. Em primeiro lugar, as sementes da placa de 96 poços com aproximadamente 20.000 células por poço e as células foram cultivadas para proliferação e diferenciação. Antes de iniciar o experimento, as células foram lavadas com tampão PBS e privadas de α -MEM por 2 h.

Após a privação, o líquido anterior foi sugado de todos os poços, e um grupo α -MEM livre de soro (grupo controle em branco), um grupo insulina 100 nM (grupo controle positivo) e quatro grupos de drogas com gradiente de concentração foram projetados. O fármaco na configuração acima foi adicionado a 100 µL por poço e incubado durante 30 min.

Após a incubação, as amostras foram adicionadas a uma placa de 96 poços de acordo com as instruções do kit de glicose oxidase e detectadas em valores de absorbância de 505 nm usando um leitor de microplacas (TECAN, Áustria) dentro de 30 min para cálculos subsequentes. Para obter o modelo de células resistentes à insulina, foi necessário induzir os miotubos com alta concentração de solução de insulina. Os miotubos totalmente diferenciados foram cultivados com insulina 1 µM durante 24 h, enquanto as células de controlo negativo foram cultivadas num meio α -MEM isento de soro. Após a obtenção do modelo de resistência à insulina, o procedimento experimental foi o mesmo do experimento de captação de glicose descrito acima.

4.6. Ensaio Colorimétrico MTT para Taxa de Sobrevida Celular

As células L6 foram inoculadas em placas de 96 poços para diferenciação de cultura, e o experimento foi conduzido após 5 a 7 dias de diferenciação em miotubos

L6. Primeiro, as células passaram fome e a operação foi a mesma do experimento de absorção de glicose. O líquido nas placas de 96 poços foi descartado após 30 min da reação de adição da dose e 100 µL de solução de MTT (0,5 mg/mL) foram adicionados a cada poço. O MTT das células L6 após 4 h de incubação foi aspirado e uma solução de DMSO a 150 µL por poço foi adicionada; após agitação por 60 s, o valor de absorbância a 492 nm foi medido por um leitor de microplacas para cálculo posterior.

4.7. Análise de Fusão de GLUT4 com Membrana Plasmática

As células L6 foram transfectadas com um vetor de lentivírus GV348-myc-GLUT4-mOrange, que codifica uma proteína de fusão mOrange de GLUT4 marcada com epítopos myc [45]. As células myc-GLUT4-mOrange-L6 foram cultivadas em lâminas de vidro redondas em placas de 6 poços até se diferenciarem em miotubos L6. As células diferenciadas foram privadas de meio de soro livre durante 2 h. O grupo controle branco, grupo insulina 100 nM (grupo controle positivo) e grupo AP-EtOAc 60 µg/mL e grupo AND 30 µM (grupo experimental) foram montados em placas de 6 poços.

Após 30 min de administração do fármaco, as células foram imobilizadas com paraformaldeído a 3%, incubadas com glicina 50 mM durante 20 min para remover impurezas de fundo e depois seladas com albumina de soro bovino a 2% (BSA) em PBS. Após o bloqueio, as células foram incubadas com anti-c-myc durante 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com BSA a 2% em PBS e incubadas com um anticorpo secundário (cabra anti-rato-FITC) contra a luz.

As células foram lavadas 3 vezes com BSA e depois lavadas 3 vezes em PBS antes de colocar a lamela de cabeça para baixo na lâmina de vidro. Finalmente, a intensidade e distribuição da fluorescência vermelha e verde nas células foram observadas por um microscópio confocal de varredura a laser (LSM 700; Carl Zeiss, Jena, Alemanha), e então a expressão de GLUT4 nas células e a fusão de GLUT4 com o membrana plasmática foram analisadas. As imagens foram analisadas pelo software Zen 2010 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) e foi contado o número de células portadoras de fluorescência verde FITC.

4.8.Preparação de Proteína de Células L6

As células L6 diferenciadas foram privadas de meio de soro livre durante 2 h e depois a concentração correspondente de fármacos foi adicionada e incubada numa incubadora durante 30 min. Após a conclusão da estimulação medicamentosa, as células foram imediatamente retiradas e colocadas em gelo e depois lavadas com PBS pré-

resfriado a 4 °C por 3 vezes. Ao mesmo tempo, 100 µL de solução de lise RIPA contendo PMSF e inibidor de fosfatase foram adicionados a cada placa. As células na placa foram coletadas em tubos EP de 1,5 mL e depois extraídas e quebradas por 30 vezes com seringas de 27 e 12 aberturas sucessivamente.

Toda a operação foi realizada no gelo. Em seguida, o lisado foi centrifugado a 12.000 rpm a 4 °C por 15 min; o sobrenadante foi proteína celular total. A concentração de proteína foi detectada por um kit de determinação de concentração de proteína BCA (Beyotime, Shanghai, China) e o valor de absorvância a 562 nm foi detectado por um leitor de microplacas. Todas as amostras de proteína foram desnaturadas a 65 °C por 10 minutos após serem adicionadas ao tampão de carga de proteína e armazenadas na geladeira a -20 °C.

4.9. Análise de Western Blot

De acordo com o Kit de preparação rápida PAGE Gel (10%), foram preparados o gel de separação e o gel concentrado. Após a amostra de proteína ter sido processada durante 2 h, a proteína foi transferida para uma membrana filtrante de nitrocelulose (NC) e selada com BSA a 5% em PBS com Tween-20 (PBST) à temperatura ambiente durante 2 h. Um anticorpo primário diluído foi preparado com um tampão PBST e um anticorpo primário correspondente em uma proporção de 1000:1 e incubado durante a noite a 4 °C em um agitador. No dia seguinte, o anticorpo secundário conjugado com peroxidase de rábano correspondente (1:10.000) foi incubado durante 1 h à temperatura ambiente. O valor cinza da proteína foi determinado quantitativamente por um sistema ChemiDoc XRS (Bio-RAD, Hercules, CA, EUA).

4.10. Ensaios Intracelulares de Ca²⁺

As células myc-GLUT4-mOrange-L6 foram cultivadas em uma lamínula até se diferenciarem em células de miotubos e depois deixadas sem soro em α -MEM livre de soro por 2 h. Em seguida, as células foram tratadas com uma solução de PSS contendo Fluo4-AM 2,5 µM, incubadas à temperatura ambiente durante 20 min e lavadas duas vezes com PSS. Em seguida, as alterações na intensidade de fluorescência do Fluo4-AM nas células dentro de 30 minutos após a adição de AND foram detectadas por um microscópio confocal de varredura a laser a 488 nm. As imagens foram tiradas 10 s antes do tratamento AND e a cada 5 minutos após o tratamento AND. O software Zen 2010 foi utilizado para analisar e registrar as alterações da fluorescência citoplasmática do Fluo-4.

4.11. Análise de Dados

Para determinar se houve diferenças significativas entre os grupos, realizamos testes t usando o software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, Lung cancer San Diego, CA, EUA). Enquanto isso, a análise multivariada foi realizada por ANOVA bidirecional. Os dados são mostrados como o erro padrão médio. Os valores representam o número de experimentos repetidos. A diferença foi considerada estatisticamente significativa se $p < 0,05$.

5. CONCLUSÕES

Neste estudo, descobrimos que o AP-EtOAc tinha atividade antidiabética e o AND era o principal componente do AP-EtOAc. AND promoveu a expressão de GLUT4 e sua fusão com a membrana plasmática em células L6 através das vias PKC de maneira dependente de Ca^{2+} , de modo a aumentar a captação de glicose.

Contribuições do autor: P.Z. e X.Y. concebeu e desenhou o estudo. J.L. e Z.Y. conduziu os experimentos e escreveu o manuscrito. Y.Y. analisou os dados e revisou o manuscrito. J.S., P.Z. e X.Y. supervisionou este estudo e editou o manuscrito. Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

Financiamento: A pesquisa recebeu apoio financeiro de bolsas da Fundação Nacional de Ciências Naturais da China (31070744, 81573561 e 81774000); Construção de Laboratório Principal da Província de Hubei (2018BFC360); Projeto Aberto do Laboratório Chave Provincial de Hubei para Proteção e Aplicação de Germoplasma Vegetal Especial na Área de Wuling da China (WLSP202002) e Base Internacional de Cooperação Científica e Tecnológica de Biologia Médica de Hubei.

Declaração do Conselho de Revisão Institucional: Não aplicável.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: Não aplicável.

Declaração de disponibilidade de dados: os dados estão contidos no artigo.

Conflitos de interesse: Os autores declaram não haver conflito de interesses.

6. REFERÊNCIAS

1. Saeedi, P.; Petersohn, I.; Salpea, P.; Malanda, B.; Karuranga, S.; Unwin, N.; Colagiuri, S.; Guariguatá, L.; Motala, AA; Ogurtsova, K.; e outros. **Estimativas globais e regionais de prevalência de diabetes para 2019 e projeções para 2030 e 2045:** Resultados do Atlas de Diabetes da Federação Internacional de Diabetes, 9(a) edição. Diabetes Res. Clin. Pratique. 2019, 157, 107843. [CrossRef] [PubMed]
2. Cole, JB; Florez, J.C. **Genética do diabetes mellitus e complicações do diabetes.** Nat. Rev. Nefrol. 2020, 16, 377–390. [RefCruz] [Pub Med]
3. Petersen, MC; Shulman, G.I. **Mecanismos de ação e resistência à insulina.** Fisiol. Rev. [CrossRef] [PubMed]
4. Haeusler, RA; McGraw, TE; Accili, D. **Propriedades bioquímicas e celulares da sinalização do receptor de insulina.** Nat. Rev. Biol celular. 2018, 19, 31–44. [CrossRef] [PubMed]
5. Stumvoll, M.; Goldstein, BJ; van Haeften, T. W. **Diabetes tipo 2:** Princípios de patogênese e terapia. Lanceta 2005, 365, 1333–1346. [RefCruz]
6. Garla, V.; Kanduri, S.; Yanes-Cardozo, L.; Lien, L.F. **Manejo do diabetes mellitus na doença renal crônica.** Minerva Endocrinol. 2019, 44, 273–287. [RefCruz]
7. Bahtiyar, G.; Gutterman, D.; Lebovitz, H. **Insuficiência Cardíaca:** Uma Complicação Cardiovascular Principal do Diabetes Mellitus. Curr. Diab. Rep. 2016, 16, 116. [CrossRef]
8. Einarson, TR; Acs, A.; Luís, C.; Panton, U. H. **Prevalência de doenças cardiovasculares no diabetes tipo 2:** uma revisão sistemática da literatura de evidências científicas de todo o mundo em 2007–2017. Cardiovascular. Diabetol. 2018, 17, 83. [CrossRef]
9. Chakraborty, C.; Bandyopadhyay, S.; Maulik, U.; Agoramoorthy, G. **Mapeamento topológico do transportador de glicose regulado por insulina GLUT4 usando biologia computacional.** Bioquímica Celular. Biofísica. 2013, 67, 1261–1274. [RefCruz]
10. Kubota, T.; Kubota, N.; Kumagai, H.; Yamaguchi, S.; Kozono, H.; Takahashi, T.; Inoue, M.; Itoh, S.; Takamoto, I.; Sasako, T.; e outros. **A sinalização prejudicada da**

insulina nas células endoteliais reduz a captação de glicose induzida pela insulina pelo músculo esquelético. Metab celular. 2011, 13, 294–307. [RefCruz]

11. Gao, L.; Chen, J.; Gao, J.; Wang, H.; Xiong, W. **A microscopia de super-resolução revela a reorganização do GLUT4 regulada pela resistência à insulina nas membranas plasmáticas.** J. Cell Sci. 2017, 130, 396–405. [CrossRef] [PubMed]

12. James, DE; Marrom, R.; Navarro, J.; Pilch, P.F. **Os tecidos reguláveis pela insulina expressam uma proteína única de transporte de glicose sensível à insulina.** Natureza 1988, 333, 183–185. [CrossRef] [PubMed]

13. Cushman, SW; Wardzala, LJ **Mecanismo potencial de ação da insulina no transporte de glicose na célula adiposa isolada de rato.** Aparente translocação de sistemas de transporte intracelular para a membrana plasmática. J. Biol. Química. 1980, 255, 4758–4762. [RefCruz]

14. Ferrari, F.; Bock, PM; Motta, MT; Helal, L. **Mecanismos bioquímicos e moleculares de captação de glicose estimulados pelo exercício físico no estado de resistência à insulina: papel da inflamação.** Arq. Sutiãs. Cardiol. 2019, 113, 1139–1148. [CrossRef] [PubMed]

15. Alvim, RO; Cheuhen, MR; Machado, SR; Sousa, AG; Santos, P.C. **Aspectos gerais da captação muscular de glicose.** Um. Acad. Sutiãs. Ciência. 2015, 87, 351–368. [CrossRef] [PubMed]

16. Mackenzie, RW; Elliott, B. T. **Ativação de Akt/PKB e sinalização de insulina:** Uma nova via de sinalização de insulina no tratamento do diabetes tipo 2. Diabetes Metab. Sindr. Obesos. 2014, 7, 55–64. [RefCruz]

17. Chen, S.; Wasserman, DH; MacKintosh, C.; Sakamoto, K. **Ratos com mutação knockin AS160/TBC1D4-Thr649Ala são intolerantes à glicose com sensibilidade reduzida à insulina e tráfego de GLUT4 alterado.** Metab celular. 2011, 13, 68–79. [RefCruz]

18. Cartee, GD; Wojtaszewski, J.F. **Papel do substrato Akt de 160 kDa no transporte de glicose estimulado por insulina e estimulado por contração.** Apl. Fisiol. Nutr. Metab. 2007, 32, 557–566. [RefCruz]

19. Musi, N.; Hirshman, MF; Nygren, J.; Svanfeldt, M.; Bavenholm, P.; Rooyackers, O.; Zhou, G.; Williamson, JM; Ljunqvist, O.; Efendic, S.; e outros. **A metformina aumenta a atividade da proteína quinase ativada por AMP no músculo esquelético de indivíduos com diabetes tipo 2.** Diabetes 2002, 51, 2074–2081. [RefCruz]

20. Danis, RP; Sheetz, MJ **Ruboxistaurina: inibição de PKC-beta para complicações do diabetes.** Opinião de especialistas. Farmacoter. 2009, 10, 2913–2925. [RefCruz]
21. Farese, RV; Lee, MC; Sajan, M.P. **PKC atípica: um alvo para o tratamento de distúrbios de obesidade resistentes à insulina, síndrome metabólica e diabetes mellitus tipo 2.** Opinião de especialistas. Lá. Metas 2014, 18, 1163–1175. [CrossRef] [PubMed]
22. Wright, DC; Hucker, KA; Holloszy, JO; Han, DH **Ca²⁺ e AMPK medeiam a estimulação do transporte de glicose por contrações musculares.** Diabetes 2004, 53, 330–335. [CrossRef] [PubMed]
23. Gandasi, NR; Yin, P.; Riz, M.; Chibalina, MV; Cortese, G.; Lund, PE; Matveyev, V.; Rorsman, P.; Sherman, A.; Pedersen, MG; e outros. **O agrupamento de canais de Ca²⁺ com grânulos contendo insulina é perturbado no diabetes tipo 2.** J. Clin. Investigue. 2017, 127, 2353–2364. [CrossRef] [PubMed]
24. Guo, X.; Sol, W.; Luo, G.; Wu, L.; Xu, G.; Hou, D.; Hou, Y.; Guo, X.; Mu, X.; Qin, L.; e outros. **As saponinas Panax notoginseng aliviam a resistência à insulina do músculo esquelético, regulando a via de sinalização IRS1-PI3K-AKT e a expressão de GLUT4.** FEBS Open Bio 2019, 9, 1008–1019. [RefCruz]
25. Kamga-Simo, FDY, 3º; Kamatou, GP; Ssemakalu, C.; Shai, LJ Cassia **Abbreviata aumenta a captação de glicose e a translocação do transportador de glicose 4 em células musculares esqueléticas de camundongos C2C12.** J. Evid. Baseado em Integr. Med. 2021, 26, 2515690X211006333. [RefCruz]
26. Zhao, P.; Tian, D.; Canção, G.; Ming, Q.; Liu, J.; Shen, J.; Liu, QH; Yang, X. **Neferina promove expressão e fusão de GLUT4 com a membrana plasmática para induzir a captação de glicose nas células L6.** Frente. Farmacol. 2019, 10, 999. [CrossRef]
27. Zhang, W.; Xu, JH; Yu, T.; Chen, Q.K. **Efeitos da berberina e da metformina na inflamação intestinal e na composição do microbioma intestinal em camundongos db/db.** Biomédica. Farmacoter. 2019, 118, 109131. [CrossRef]
28. Pholphana, N.; Rangkadilok, N.; Saehun, J.; Rittruechai, S.; Satayavivad, J. **Mudanças no conteúdo de quatro diterpenóides ativos em diferentes estágios de crescimento em Andrographis paniculata (Burm.f.) Nees (Chuanxinlian).** Queixo. Med. 2013, 8, 2. [CrossRef]

29. Burgos, RA; Alarcón, P.; Quiroga, J.; Manosalva, C.; Hancke, J. **Andrographolide, uma droga antiinflamatória multialvo: todos os caminhos levam ao metabolismo celular.** *Moléculas* 2020, 26, 5. [CrossRef]
30. Farooqi, AA; Attar, R.; Sabitaliyevich, U.Y.; Alaaeddine, N.; de Sousa, DP; Xu, B.; Cho, W.C. **A habilidade do Andrographolide como arma natural na guerra contra o câncer.** *C*
31. Yu, BC; Pendurado, CR; Chen, WC; Cheng, J. T. **Efeito anti-hiperglicêmico da andrographolida em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina.** *Planta Med.* 2003, 69, 1075–1079. [CrossRef] [PubMed]
32. Ding, L.; Li, J.; Canção, B.; Xiao, X.; Huang, W.; Zhang, B.; Tang, X.; QI, M.; Yang, Q.; Yang, Q.; e outros. **Andrographolide previne a obesidade induzida por dieta rica em gordura em camundongos C57BL/6, suprimindo a via da proteína de ligação ao elemento regulador do esterol.** *J. Farmacol. Exp. Lá.* 2014, 351, 474–483. [CrossRef] [PubMed]
33. Ji, X.; Li, C.; Ou, Y.; Li, N.; Yuan, K.; Yang, G.; Chen, X.; Yang, Z.; Liu, B.; Cheung, WW; e outros. **Andrographolide melhora a nefropatia diabética ao atenuar o estresse oxidativo renal mediado pela hiperglicemia e a inflamação através da via Akt/NF-kappaB.** *Mol. Célula. Endocrinol.* 2016, 437, 268–279. [RefCruz]
34. Gray, CW; Coster, A.C.F. **Da insulina à Akt: atrasos de tempo e processos dominantes.** *J. Teor. Biol.* 2020, 507, 110454. [CrossRef]
35. Lee, JO; Lee, SK; Kim, JH; Kim, N.; Você, GY; Lua, JW; Kim, SJ; Park, SH; Kim, H.S. **A metformina regula a translocação do transportador de glicose 4 (GLUT4) através da sinalização Cbl / CAP mediada por proteína quinase ativada por AMP (AMPK) em células pré-adipócitos 3T3-L1.** *J. Biol. Química.* 2012, 287, 44121–44129. [RefCruz]
36. Luiken, JJ; Ouwens, DM; Habets, DD; van der Zon, GC; Coumans, WA; Schwenk, RW; Bonen, A.; Glatz, J.F. **Ação permissiva da proteína quinase C-zeta na translocação de CD36 e GLUT4 induzida por insulina em miócitos cardíacos.** *J. Endocrinol.* 2009, 201, 199–209. [CrossRef] [PubMed]
37. Su, H.; Mo, J.; Ni, J.; Ke, H.; Bao, T.; Xie, J.; Xu, Y.; Xie, L.; Chen, W. **Andrographolide exerce efeito anti-hiperglicêmico por meio do fortalecimento da função da barreira intestinal e do aumento da composição microbiana de *Akkermansia muciniphila*.** *Óxido. Med. Célula. Longev.* 2020, 2020, 6538930. [RefCruz 2020, 12, 2159. [CrossRef]

38. Lan, T.; Que., H.; Gou, H.; Zhang, Q.; Li, J.; Qi, C.; Ele, X.; Wu, P.; Wang, L. **Andrographolide suprime a alta expressão de fibronectina induzida por glicose em células mesangiais através da inibição da via AP-1.** J. Célula. Bioquímica. 2013, 114, 2562–2568. [RefCruz]
39. Jaldin-Fincati, J.R.; Pavarotti, M.; Frendo-Cumbo, S.; Bilan, PJ; Klip, A. **Atualização sobre o tráfego de vesículas GLUT4: uma pedra angular da ação da insulina.** Tendências Endocrinol. Metab. 2017, 28, 597–611. [RefCruz]
40. Jin, L.; Shi, G.; Ning, G.; Li, X.; Zhang, Z. **Andrographolide atenua a resistência à insulina induzida pelo fator de necrose tumoral alfa em adipócitos 3T3-L1.** Mol. Célula. Endocrinol. 2011, 332, 134–139. [RefCruz]
41. Klip, A.; McGraw, TE; James, D. E. **Trinta doces anos de GLUT4.** J. Biol. Química. 2019, 294, 11369–11381. [RefCruz]
42. Nishino, Y.; Miura, T.; Miki, T.; Sakamoto, J.; Nakamura, Y.; Ikeda, Y.; Kobayashi, H.; Shimamoto, K. **O pré-condicionamento isquêmico ativa a AMPK de maneira dependente da PKC e induz a regulação positiva do GLUT4 na fase tardia da cardioproteção.** Cardiovascular. Res. 2004, 61, 610–619. [CrossRef] [PubMed]
43. Park, JE; Lee, JS; Lee, HA; Han, J.S. **O extrato de Portulaca oleracea L. aumenta a captação de glicose estimulando a translocação de GLUT4 para a membrana plasmática em adipócitos 3T3-L1.** J. Med. Alimentos 2018, 21, 462–468. [CrossRef] [PubMed]
44. Li, Q.; Zhu, X.; Ishikura, S.; Zhang, D.; Gao, J.; Sol, Y.; Contreras-Ferrat, A.; Foley, KP; Lavandero, S.; Yao, Z.; e outros. **Os sinais de Ca(2)(+) promovem a exocitose do GLUT4 e reduzem sua endocitose nas células musculares.** Sou. J. Fisiol. Endocrinol. Metab. 2014, 307, E209–E224. [CrossRef] [PubMed]
45. Zhao, P.; Ming, Q.; Qiu, J.; Tian, D.; Liu, J.; Shen, J.; Liu, QH; Yang, X. **Extrato Etanólico de Folium Sennae medeia a captação de glicose pelas células L6 por GLUT4 e Ca(2).** Moléculas 2018, 23, 2934. [CrossRef] [PubMed]