

Allisson Jhonatan Gomes Castro

Estudo do efeito e do mecanismo de ação de triterpenos naturais e da 1,25(OH)₂ vitamina D₃ na homeostasia da glicose: Papel destes compostos como secretagogos de insulina e/ou insulinoimiméticos

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Fátima Regina Mena Barreto Silva

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Castro, Allisson Jhonatan Gomes

Estudo do efeito e do mecanismo de ação de triterpenos naturais e da 1,25(OH)₂ vitamina D3 na homeostasia da glicose : Papel destes compostos como secretagogos de insulina e/ou insulinoiméticos / Allisson Jhonatan Gomes Castro ; orientador, Fátima Regina Mena Barreto Silva - Florianópolis, SC, 2015.

324 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Glicemia. 3. Triterpenos. 4. Insulina. 5. Vitamina D3. I. Silva, Fátima Regina Mena Barreto. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

“Estudo do efeito e do mecanismo de ação de triterpenos naturais e da 1,25 (OH)₂ vitamina D₃ na homeostasia da glicose: papel deste compostos como secretagogos de insulina e/ou insulínomiméticos.”

Por

Allisson Jhonatan Gomes Castro

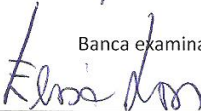
Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (001/BQA/UFSC) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica – UFSC, composta pelos doutores:

Orientador:




Dr(a) Fátima Regina Mena Barreto Silva (BQA/CCB/UFSC)


Banca examinadora:



Dr(a) Eloisa da Silveira Loss (UFRGS)



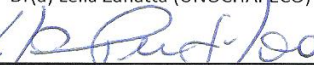
Dr(a) Edson Luiz da Silva (ACL/CCS/UFSC)




Dr(a) Flávio Reginatto (CCS/UFSC)



Dr(a) Leila Zanatta (UNOCHAPECÓ)



Dr(a) Carlos Peres (BQA/CCB/UFSC)



Prof(a). Dr(a). Carlos Peres Silva
Coordenador(a) do Programa de Pós Graduação em Bioquímica

Florianópolis, 24 de fevereiro de 2015.

Este trabalho é dedicado aos meus pais Luiz e Maria, a minha esposa Luiza e aos meus irmãos Alex e Allan.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pois por todos os caminhos que andei sei que foi ele quem me guiou e ao acaso, ao qual me levou para esses caminhos;

À minha orientadora Profa. Dra. Fátima Regina Mena Barreto Silva pela fé em meu trabalho, pela ética e pela enorme generosidade em tudo que lhe é possível;

À Luiza Sheyla Evenni Porfirio Will Castro, minha esposa, companheira, motivo e alicerce;

Aos meus pais Maria de Deus Gomes Castro e Luiz Carlos Garcez Castro pelo total apoio nessa minha jornada;

Aos meus irmãos Alex Garcêz Gomes Castro e Allan Radji Gomes Castro pelo companheirismo;

Aos meus avós Joaquina Fernandes e Manoel Cardoso;

À minha família, tias Celma Gomes e Fátima Gomes, sogro Dr. João Willl, sogra Dra. Raimunda Porfírio e cunhada M.Sc. Karhen Will pelo apoio familiar e orações;

Ao professor Moacir Geraldo Pizzolatti pela disponibilização dos triterpenos testados;

A todos os membros e amigos do Laboratório de Hormônios & Transdução de Sinais, do Laboratório de Bioquímica Experimental e Sinalização Celular e do Laboratório de Bioquímica experimental;

À professora Dra. Ariane Zamoner Pacheco de Souza;

Aos Professores componentes da banca examinadora, por sua cordialidade e disponibilidade na avaliação deste trabalho;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, que contribuíram para minha formação;

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica;

À CAPES pelo auxílio financeiro;

À profa. Dra. Luiza Helena Cazarolli pela grande contribuição e ajuda na minha formação acadêmica e científica, pela amizade e pelos valiosos conselhos. Um grande exemplo que faço questão de seguir;

À Francieli Kanunfre e Lisandra C. Bretanha;

Aos técnicos, biólogos e químicos dos laboratórios de análises histológicas, do LABIOEX, dos LAMEBs e do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica, em especial ao João F. G. Correia, Demétrio G. Alves, Chirle ferreira, Emily D. dos Santos e Eliana Medeiros;

Aos professores Drs. Márcio Ferreira Dutra e Regina Pessoa Pureur;

A todos meus grandes amigos em Natal/RN que torceram por mim, em especial, a todos do LabGlicobio/ Dept. Bioquímica/ UFRN;

E aos meus grandes catalisadores acadêmico/científico, os professores Dra. Edda Lisboa Leite, Dra. Ana Katarina Menezes da Cruz e Dr. Jorge Ubiracy Barbosa.

“Um passo à frente e você não está mais no mesmo lugar”

(Francisco de Assis França- Chico Science)

RESUMO

A hiperglicemia crônica proveniente da diminuição da produção insulínica e do aumento da resistência tecidual à insulina é a principal causa de danos teciduais associados à diabetes e insulinoresistência, e pode ser desencadeada por fatores como menor disponibilidade de GLUT4. Compostos insulinoestimulantes e que regulam de forma rápida a homeostase da glicose e a translocação de GLUT4 para a membrana plasmática são de grande importância na terapêutica da diabetes, e nesse âmbito se encontram os triterpenos pentacíclicos (TPs) e a 1,25 (OH)₂ vitamina D₃ (1,25-D₃). Os TPs são metabólitos vegetais amplamente disponíveis na dieta humana e sua potencial ação nutracêutica desperta atenção devido ao efeito antidiabético frequentemente relatado, porém, cientificamente pouco comprovado. Ainda, estudos sugerem que a deficiência em 1,25-D₃ prejudica a secreção de insulina em ratos, podendo levar a diabetes melito tipo 2, enquanto o tratamento com esse hormônio aumentou a sensibilidade à insulina por estimular a expressão do receptor de insulina e o transporte de glicose. Contudo, os mecanismos de ação da 1,25-D₃ neste aspecto ainda são pouco elucidados. Neste trabalho foi estudado o efeito antihiper-glicêmico e o mecanismo de ação da 1,25-D₃ e de triterpenos naturais na secreção insulínica e absorção tecidual de glicose. Para análise de curva tempo e dose resposta dos triterpenos, ratos Wistar machos após jejum (16 h) foram pré-tratados com os TPs (ácido betulínico (AB), ácido ursólico (AU), trihidroxioleanano (THO), 3β-hidroxi-hopeno (BHH) ou fernenodiol) e após 30 min foi induzida a hiperglicemia para análise da tolerância à glicose. Do soro foram determinadas a glicemia, insulina, lactato desidrogenase, GLP-1 e a concentração de cálcio. Ainda nestes animais, o músculo sóleo e o fígado foram utilizados para dosagem de conteúdo total de glicogênio. Para estudos *in vitro* de mecanismo de ação, foram investigados os processos de captação de ¹⁴C-deoxiglicose, incorporação de ¹⁴C-timidina ao DNA, de ¹⁴C-leucina em proteínas em presença ou não de inibidores farmacológicos e expressão, síntese e translocação de transportadores GLUT4 no músculo e tecido adiposo. Em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos foram estudados os efeitos desses compostos na secreção de vesículas contendo insulina, no influxo de ⁴⁵Ca²⁺ e captação de ¹⁴C-deoxiglicose. Os triterpenos estudados reduziram fortemente a glicemia dos animais hiper-glicêmicos, bem como aumentaram a insulina, o GLP-1 séricos e o conteúdo de glicogênio muscular e hepático, sem aumentar a atividade da lactato desidrogenase (LDH) e a concentração sérica de cálcio. Os ácidos betulínico, ursólico e trihidroxioleanano agiram estimulando a captação de glicose por uma via dependente de PI3K, contudo, diferentemente do ácido ursólico, o AB e THO não estimularam prioritariamente as vias de ação nuclear, mas estimularam a translocação de GLUT4 no período estudado. Estudos com a 1,25-D₃ mostraram que esse hormônio age por mecanismo independente de PI3K, estimulou o aumento na incorporação de timidina ao DNA e o conteúdo total de GLUT4. Estudos com ilhotas pancreáticas isoladas incubadas em presença de ácido ursólico e 3β-hidroxi-hopeno mostraram que estes tratamentos

estimulam a secreção de insulina pelas células β -pancreáticas. Os triterpenos 3 β -hidroxihopeno, fernenodiol e AB estimularam o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas por mecanismo dependente de canais de cálcio do tipo L e de potássio sensíveis a ATP e em especial, o AB agiu também através de mecanismo mediado por canais de cloreto. Estes resultados juntos mostram que todos os triterpenos testados apresentaram forte ação nas vias de sinalização voltadas para a homeostasia da glicose, estimulando à secreção de insulina em ilhotas pancreáticas, bem como o aumentaram no influxo de cálcio e/ou ativaram a captação de glicose no músculo esquelético e tecido adiposo assim como a 1,25-D₃ estimulou a captação de glicose em músculo esquelético por meio de aumento de síntese e/ou translocação do GLUT4.

Palavras-Chave: Diabetes, GLUT4, Músculo esquelético, Pâncreas, Secreção de insulina, Tecido adiposo, Triterpenos pentacíclicos, 1,25-D₃.

ABSTRACT

Chronic hyperglycemia resulting from decreased insulin production and increased tissue insulin resistance is the major cause of tissue damage associated with diabetes and insulin resistance, and can be triggered by factors such as low availability of GLUT4. Insulinogenic compounds that quickly regulates glucose homeostasis and translocation of GLUT4 to the plasma membrane are of great importance in diabetes therapy, like the pentacyclic triterpenes (TPs) and 1,25-(OH)₂ vitamin D₃ (1,25-D₃). The TPs are plant metabolites widely available in the human diet and its potential nutraceutical action arouses attention due to the often reported antidiabetic effect, however, scientifically need proves. Also, studies suggest that 1,25-D₃ deficiency impairs insulin secretion in rats, leading to type 2 diabetes, while the treatment with this hormone increased insulin sensitivity by stimulating insulin receptor expression and glucose transport. However, the mechanisms of action of 1,25-D₃ in this regard are still poorly understood. In this work, was studed the antihyperglycemic effect and the mechanism of action of 1,25-D₃ and natural triterpenes in insulin secretion and tissue uptake of glucose. For analysis of time and dose-response curve of the triterpenes, male Wistar rats after fasting (16 hours) were pretreated with the triterpenes, male Wistar rats after fasting (16 hours) were pretreated with the triterpenes, male Wistar rats after fasting (16 hours) were pretreated with the triterpenes (betulinic acid (BA), ursolic acid (UA), trihydroxyoleanane (THO), 3β-hydroxyhopene (BHH) or fernenediol) and after 30 min was induced hyperglycemia for analysis of glucose tolerance. Were determined from serum glucose, insulin, lactate dehydrogenase, GLP-1 and calcium concentration. Also of these animals, the liver and soleus muscle were used for determination of the total glycogen content. *In vitro* mechanism of action studies of ¹⁴C-deoxyglucose uptake, ¹⁴C-thymidine incorporation into the DNA and ¹⁴C-leucine into protein in the presence or absence of pharmacological inhibitors and expression were investigated. Also, synthesis and translocation of GLUT4 transporters in muscle and adipose tissue were analysed. In isolated pancreatic islets of rats were studied the effects of these compounds in secretory vesicles containing insulin, in ⁴⁵Ca²⁺ influx and uptake of ¹⁴C-deoxyglucose. The triterpenes studied reduced the blood glucose of hyperglycemic animals and stimulates the insulin increase, serum GLP-1 and the contents of muscle and liver glycogen, without increasing the activity of lactate dehydrogenase (LDH) and serum calcium concentration. The betulinic acid, ursolic and trihydroxyoleanane acted stimulating glucose uptake by a PI3K-dependent pathway, however, unlike the ursolic acid, AB and THO not primarily stimulated nuclear courses of action, but stimulated GLUT4 translocation of the study period. The 1,25-D₃ showed a PI3K-independent mechanism, but stimulated the increase in thymidine incorporation to DNA and the total content of GLUT4. Studies using isolated pancreatic islets incubated in the presence of ursolic acid and 3β-hydroxyhopene showed that these treatments stimulate insulin secretion from pancreatic β-cells. The 3β-hydroxyhopene, fernenediol and AB-stimulated ⁴⁵Ca²⁺ influx in pancreatic islets was by a mechanism dependent of L-type calcium and ATP-sensitive potassium channels, and

especially, the AB act also through mechanisms mediated by chloride channels. These results together show that all triterpenes tested showed strong action in signaling pathways focused on glucose homeostasis by stimulating the secretion of insulin in pancreatic islets, as well as the increased calcium influx and/ or glucose uptake in skeletal muscle and adipose tissue as well as the 1,25-D₃ stimulated glucose uptake in skeletal muscle by increasing the synthesis and GLUT4 translocation.

Keywords: Diabetes, GLUT4, skeletal muscle, pancreas, insulin secretion, adipose tissue, pentacyclic triterpenes, 1,25-D₃.

LISTA DE FIGURAS

Fig		Página
1.	Estrutura do canal de potássio sensível a ATP (K_{ATP}). O canal é composto por 4 subunidades regulatórias, o SUR, e 4 subunidades de transporte iônico formadoras do poro (Kir 6.2). A subunidade SUR pode ser regulada por MgADP, que mantém o canal aberto após ligação ao domínio de ligação de nucleotídeos (NBF). A ligação do ATP ao Kir6.2 leva ao fechamento do canal K_{ATP} e despolarização celular, com resultante secreção insulínica. Figura adaptada de Nichols (2006).....	27
2.	Mecanismo de secreção insulínica induzida por glicose e perfil bifásico de secreção de insulina em células β pancreáticas. A glicose é o mais potente agente insulinogênico em ilhotas pancreáticas, uma vez que seu metabolismo produz intermediários que levam a despolarização celular após fechamento de canais K_{ATP} e abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV). A secreção de insulina induzida por glicose se dá em um perfil bifásico. Ácidos graxos também podem levar à secreção insulínica. Adaptado de Kahn, Hull e Utzschneider (2006) e Beaser, Horton e Zinman (2004).....	32
3.	Vias de translocação do GLUT4, induzido por insulina e cálcio. Em um mecanismo mediado pela insulina têm-se a ativação de maneira dependente de proteínas cinases como PI3K, PKB e/ou via proteína APS/Cbl/TC10. Quando ativada por cálcio, a translocação do GLUT4 é dependente de proteínas cinases como CaMKII e AMPK. Adaptado de LANNER et al. (2008).....	37
4.	Estrutura de triterpenos pentacíclicos do tipo Lupano (A), Ursano (B) e Oleanano (C). Adaptado de Mallavadhani, Panda e Rao (1998).....	43
5.	Biossíntese endógena de 1,25(OH) ₂ vitamina D ₃ em animais a partir do colesterol presente no epitélio ou	

da vitamina D ₃ obtida da dieta. Adaptado de Leysens, Verlinden e Verstuyf (2013).....	45
6. Ações membranares e nuclear de receptor de vitamina D (VDR). Adaptado de Deeb, Trump e Johnson (2007).....	46
7. Configuração <i>trans</i> e <i>cis</i> da 1 α 25(OH) ₂ D ₃ . Adaptado de Norman (2008).....	48
8. Efeito e mecanismo de ação dos triterpenos ácido betulínico, ácido ursólico, trihidroxioleanano, β -hidroxihopano e fernenodiol na homeostasia da glicose em ratos hiperglicêmicos.....	295

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AB – Ácido betulínico
AGEs - Produtos finais de glicação avançada (Advanced Glycation End-products)
AS160 – Proteína subtrato da Akt de 160 kDa
ADP – Adenosina difosfato
AMPK - Proteína cinase ativada por AMP
AO – Ácido oleanólico
ATP – Adenosina trifosfato
AU – Ácido ursólico
BHH- 3 β -hidroxihopeno
BSA – Albumina sérica bovina
CaCC – Canais de cloreto sensíveis a cálcio
CaMKII - Cinase dependente de cálcio/calmodulina II
cAMP - Adenosina monofosfato cíclico
CCDV – Canais e cálcio dependentes de voltagem
CICR – Liberação de cálcio induzida por cálcio
DAG – Diacilglicerol
DBP - proteína plasmática ligante de vitamina
DM - Diabetes melito
DMAPP - Dimetilalil difosfato
DPP-4 – Dipeptidil peptidase -4
EtOH - Etanol
EtOAc – Acetato de etila
FDG - Fludeoxiglicose
FPP - Farnesildifosfato
GEF – fator intesificador de GLUT4
GIP – Peptídeo inibidor gástrico
GLP-1 –Peptídeo 1 semelhante ao glucagon
GLUT4 – Transportador de glicose do tipo 4
GPP - Geranildifosfato
GSK – Glicogênio sintase cinase
GSVs – Vesículas contendo GLUT4
HEX- fração hexânica
II - Índice insulínogênico
IPP - Isopentenil difosfato pirofosfato
IP3 – Inositol trifosfato
IR – Receptor da insulina
K_{ATP} - Canais de potássio sensível a ATP
K⁺-Ca - Canais de potássio sensíveis a cálcio

Kir – Canal de potássio retificante interno
KRb – Krebs Ringer bicarbonato
Kv - Canais de potássio dependentes de voltagem
LBD - Domínio de ligação ao ligante
LDH – Lactato desidrogenase
MAPK – Proteína cinase ativada por mitógeno
MET - Microscopia eletrônica de transmissão
mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro
M-βCD – Metil-β ciclodextrina
NEM – N-etilmaleímda
PDK1 – Cinase 1 dependente de fosfoinosítídeo
PEPCK – Fosfoenolpiruvato carboxicinase
PI3K - Fosfatidil inositol-3 fosfato cinase
PIP₂ - Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato
PIP₃ - Fosfatidil inositol 3,4,5 trisfosfato
PKA - Proteína cinase A
PKB - Proteína cinase B
PKC - Proteína cinase C
PLC - Fosfolipase C
PTH – Hormônio da paratireóide
RI – Receptor de insulina
RT-PCR- Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RxR – Receptor X retinóide
SGLT – Co-transportador de sódio-glicose
SRIs - substratos do receptor de insulina
SUR – Receptor de sulfoniureia
TGR5 – Receptor de sais biliares
THO - Trihidroxioleanano
TPs - Triterpenos pentacíclicos
VAMP2 - proteína-2 de membrana associada à vesícula
VitD₃- vitamina D
VDR - Receptor para a vitamina D₃
VDRE – Elemento responsivo ao receptor de vitamina D₃
VDRmem - VDR de ação membranar
VDRnuc- VDR de ação nuclear
V_m - Potencial de membrana
1,25- D₃ – 1,25 (OH)₂D₃
[Ca²⁺]_i – Concentração de cálcio intracelular
¹⁴C-deoxiglicose - [U-¹⁴C]-2-Deoxi-D-glicose
¹⁴C-timidina- [Metil-¹⁴C]-Timidina
¹⁴C-leucina - L-[U-¹⁴C]-Leucina

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma:	Página
1. Tratamento de ratos normais hiperglicêmicos - Teste oral de tolerância à glicose.....	56
2. Determinação da insulina e GLP-1 séricos.	57
3. Determinação do conteúdo de glicogênio hepático e muscular.....	58
4. Captação de [U- ¹⁴ C]-2-Deoxi-D-glicose no músculo sóleo e tecido adiposo epididimal.....	59
5. Incorporação de L-[U- ¹⁴ C]-Leucina no músculo sóleo.....	60
6. Incorporação de [Metil- ¹⁴ C]-Timidina no músculo sóleo.....	61
7. Isolamento e captação de ⁴⁵ Ca ²⁺ em ilhotas pancreáticas.....	62
8. Microscopia Eletrônica de Transmissão em pâncreas.....	63
9. Isolamento de fração total de músculo esquelético e tecido adiposo para Western Blot.....	64
10. Isolamento da fração citosólica e membranas de músculo esquelético e tecido adiposo para Western Blot.....	65
11. Eletroforese e Western Blot.....	66
12. Imunofluorescência para tecido muscular esquelético e adiposo.....	67

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	Canais de potássio e de cálcio na secreção insulínica...	25
1.2	Importância da glicose e secreção de insulina.....	29
1.3	Transportadores de glicose e GLUT4.....	33
1.4	Diabetes e resistência à insulina.....	39
1.5	Produtos naturais e triterpenos.....	41
1.6	Vitamina D.....	44
2	JUSTIFICATIVA	49
3	OBJETIVOS	51
3.1	Objetivo geral.....	51
3.2	Objetivos específicos.....	51
4	MÉTODOS	55
5	RESULTADOS	69
5.1	Capítulo1: Efeitos insulinomiméticos.....	71
5.1.1	Ácido betulínico, Ursólico e Trihidroxioleanano.....	73
5.1.1.1	O ácido betulínico e a 1,25(OH) ₂ vitamina D ₃ compartilham a transdução de sinais intracelulares na homeostase da glicose no músculo sóleo.....	77
5.1.1.2	O mecanismo de ação do ácido ursólico como secretagogo de insulina e insulinomimético em músculo esquelético é dependente de vias mediadas por cálcio e de cinases.....	109
5.1.1.3	Sinalização celular do 2 α ,3 β ,23-trihidroxioleano-12-eno na translocação do GLUT4 no tecido adiposo.....	149
5.1.2	Conclusões deste capítulo.....	185
5.2	Capítulo2 : Ação secretagoga.....	187
5.2.1	3 β -hidroxihop-22(29)eno, Fern-9(11)-eno-2 α ,3 β -diol, Ácido betulínico.....	189
5.2.1.1	O efeito agudo de 3 β -hidroxihop-22(29)eno na secreção insulínica para a homeostase da glicose é mediado por GLP-1, canais de potássio e canais de cálcio.....	191
5.2.1.2	Fern-9(11)-eno-2 α ,3 β -diol estimula a secreção insulínica através do fechamento de canais K _{ATP} e da	

	ativação de canais de cálcio em condição hiperglicêmica.....	227
5.2.1.3	Ácido betulínico apresenta efeito insulinosecretor dependente da modulação de canais de K_{ATP} e de cloreto.....	263
5.2.2	Conclusões deste capítulo.....	287
6	DISCUSSÃO	289
7	CONCLUSÕES	293
	REFERÊNCIAS	297
	Anexo A- Artigos publicados.....	317
	Anexo B – Artigos aceitos para publicação.....	319
	Anexo C – Artigos publicados como co-autor em trabalhos relacionados ao tema em estudo.....	320
	Anexo D – Capítulo de livro publicado.....	323

1 INTRODUÇÃO

1.1 Canais de potássio e de cálcio na secreção insulínica

O pâncreas é uma glândula formada por dois compartimentos distintos de diferente morfologia e fisiologia: a porção exócrina, a qual é formada por células acinares e constitui a maior parte do tecido pancreático, sendo responsável pela produção e secreção de enzimas digestivas na forma de zimogênio para o duodeno, e a porção endócrina, que produz hormônios para controle do metabolismo de carboidratos, formado pelas ilhotas de Langerhans (ELLIS, 2013; MOTTA et al. 1997; WEISS, 2008).

As ilhotas de Langerhans são compostas por cinco tipos de células produtoras de hormônios: as células β produtoras de insulina, células α produtoras de glucagon, células ϵ produtoras de grelina, células δ produtoras de somatostatina e células PP produtoras de polipeptídeo pancreático (MASTRACCI; SUSSEL, 2012; BHONDE et al. 2007). As células β pancreáticas são as células endócrinas mais bem caracterizadas, com a função primária de secretar quantidades apropriadas de insulina bioativa em resposta alterações séricas de nutrientes, hormônios e a estímulos nervosos, o que mantém o nível sérico de glicose em um delicado *range* fisiológico para ótimo funcionamento de todos os tecidos (MASTRACCI; SUSSEL, 2012; KULKARNI, 2004; BOSCO et al. 2010).

Atualmente é unanimemente aceito que a entrada da glicose nas células β pancreáticas é seguida pelo seu metabolismo, promovendo o fechamento dos canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP}). A resultante redução na condutância do potássio leva a despolarização da membrana com subsequente abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV). O aumento no influxo de cálcio através dos CCDVs leva a um aumento na concentração de cálcio citoplasmático que por sua vez, eventualmente, ativa o sistema efetor responsável pela exocitose de grânulos de insulina (GEMBAL et al. 1993). Esses canais de potássio e cálcio são de grande importância fisiológica e celular, uma vez que eles acoplam o metabolismo bioquímico a atividade elétrica celular (GLUKHOV et al. 2013).

Os canais de potássio são proteínas de membrana que permitem o efluxo de potássio através de um poro seletivo. Eles são extremamente importantes para a manutenção da fisiologia e repolarização celular, sendo ativados por sinais como cálcio, neurotransmissores e alterações na diferença de potencial celular (SANDHIYA; DKHAR, 2009).

Os canais de potássio são agrupados em 3 famílias baseado na estrutura, fisiologia e farmacologia: 2TM, 4TM e 6TM. A família 2TM de canais de K^+ compreende os canais de potássio retificadores internos (Kir), que inclui as subfamílias KIR1.x, KIR2.x, KIR3.x, KIR4.x, KIR5.x, KIR6.x e canais de potássio sensíveis a ATP. A Família de canais e potássio 4TM (responsáveis pelo desenvolvimento de corrente em células neuronais) incluem as subfamílias dos canais TWIK, TREK, TASK, TALK, THIK e TRESK.

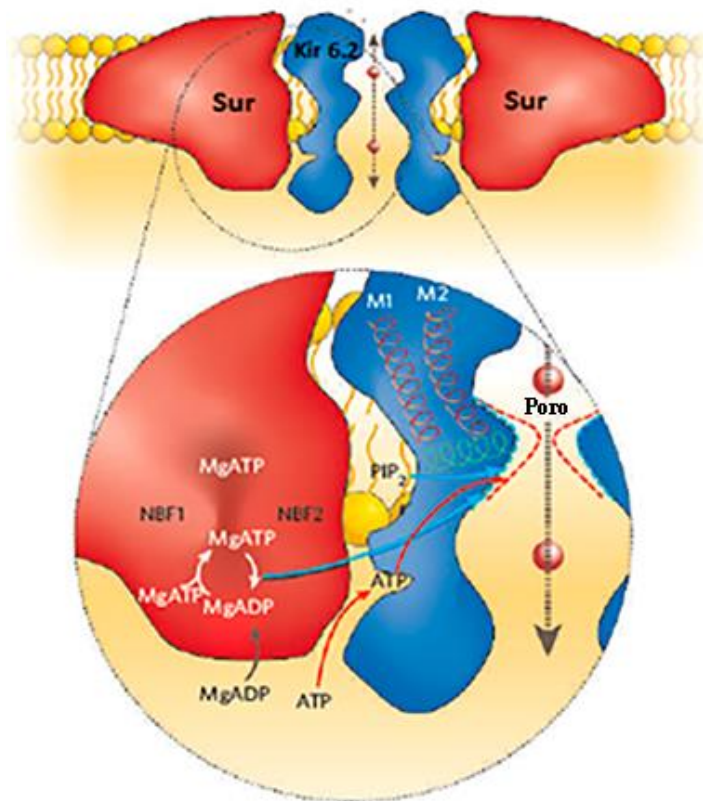
Ainda que os canais de potássio sensíveis a ATP (K_{ATP}) estejam fortemente envolvidos no processo de secreção insulínica, também estão presentes no coração, cérebro, músculo liso e esquelético. O Kir6.x é a proteína responsável pelo controle do fluxo de potássio através do canal e que possui um sítio de ligação ao ATP. O K_{ATP} também possui uma subunidade receptora de sulfonilurea (SURx) que possui o sítio de ligação para o ADP (ativador do canal) e para sulfonilureas (bloqueadores do canal).

No pâncreas, o K_{ATP} é predominantemente composto de Kir6.2 e SUR1 (FIG. 1), formando um octâmero com estequiometria de 4:4. A abertura e fechamento destes canais é modulada principalmente por ADP e ATP, como o ATP possui alta afinidade pelo Kir6.2, bloqueia esses canais em milissegundos (SANDHIYA; DDKHAR, 2009; KOSTER; PERMUTT; NICHOLS, 2005; HUOPIO et al. 2002). Estudos com ATP e análogos não hidrolisáveis do ATP mostram que ambos inibem os canais K_{ATP} , o que confirma que a inibição não é uma consequência de modulação por fosforilação, mas da direta ligação deste nucleotídeo ao canal (FLAGG et al. 2010).

O papel essencial dos canais K_{ATP} nas células β pancreáticas é fortemente ilustrado pela inibição e estimulação da secreção de insulina pelos fármacos diazóxido e glibenclamida, ativador e inibidor seletivo dos K_{ATP} , respectivamente. A glibenclamida, uma sulfonilurea, se liga ao receptor específico na subunidade SUR1, causa despolarização celular e abre os canais de cálcio sensíveis a voltagem e o diazóxido permite a repolarização celular por meio da abertura dos canais K_{ATP} , o que fecha canais de cálcio sensíveis a voltagem e cessa o influxo de cálcio (KAPPEL et al. 2013; GEMBAL et al. 1993).

Mutações nos genes ABCC8 e KCNJ11, codificantes do SUR1 e KIR6.2, respectivamente são descritos como responsáveis pela hiperinsulinemia familiar na infância e, o poliformismo no gene ABCC8 descrito por estar associado com a progressão da tolerância à glicose a diabetes do tipo 2 (SANDHIYA; DKHAR, 2009).

Fig 1. Estrutura do canal de potássio sensível a ATP (K_{ATP}). O canal é composto por 4 subunidades regulatórias, o SUR, e 4 subunidades de transporte iônico formadoras do poro (Kir 6.2). A subunidade SUR pode ser regulada por MgADP, que mantém o canal aberto após ligação ao domínio de ligação de nucleotídeos (NBF). A ligação do ATP ao Kir6.2 leva ao fechamento do canal K_{ATP} e despolarização celular, com resultante secreção insulínica. Figura adaptada de Nichols (2006).



Outro grupo de canais de potássio relacionados com a resposta à insulina são os canais de potássio dependentes de voltagem (Kv) e os canais de potássio sensíveis a cálcio (K⁺-Ca). Os canais Kv são compostos de 4 polipeptídeos, cada um contendo seis segmentos de membrana com um simples segmento formando poro entre as regiões de segmento transmembrana 5 e 6. Esta família inclui vários canais retificadores lentos conhecidos também como retificadores externos (SANDHIYA; DKHAR, 2009). Também, os canais K⁺-Ca significativamente contribuem para a secreção insulínica e repolarização celular (O'MALLEY; HARVEY, 2004). Após despolarização celular e abertura de canais de cálcio sensíveis a voltagem, a resultante entrada de cálcio bem como o aumento da concentração citosólica de cálcio leva a abertura de canais de potássio sensíveis a cálcio (K-Ca), o que culmina com uma secreção aumentada de insulina (JACOBSON et al. 2010).

Os Kv regulam o potencial de membrana celular através do controle da taxa de saída de potássio da célula, modulando um grande número de processos celulares. O Kv1.3 é um canal Kv expresso em vários tecidos sensíveis à insulina tais como tecido adiposo e musculatura esquelética. A atividade destes canais é regulada não somente por mudanças no potencial de membrana (Vm), mas também por fosforilações em treonina, serina e tirosina. Insulina pode modular negativamente a atividade do canal Kv1.3 por meio de fosforilação de múltiplos resíduos de serina, indicando que o Kv1.3 pode servir como um substrato do receptor de insulina permitindo um aumento na captação de glicose periférica (LI et al. 2006).

Outro grupo de canais relacionados com processos de secreção insulínica são os canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV). Estes canais são proteínas multiméricas ubiquamente distribuídos em muitos tecidos e células excitáveis e não excitáveis. A subunidade $\alpha 1$ é o principal componente funcional do complexo dos Cav, possuindo o sensor de voltagem para o canal: os aminoácidos arginina (carregada positivamente) e resíduos de lisina (KAMP; HELL, 2000).

Os canais Cav funcionam como poros condutores de cálcio na membrana plasmática que, em resposta a despolarização membranar, sofre uma mudança de conformação extremamente rápida do estado impermeável a um estado altamente permeável, permitindo a rápida entrada de cálcio ao citoplasma. O cálcio intracelular age como um segundo mensageiro acoplando o sinal elétrico a interações bioquímicas como respostas enzimáticas de proteínas dependentes de cálcio e a exocitose de vesículas contendo insulina (YANG; BERGGREN, 2006).

Caracterização dos canais Cav pelo tipo de corrente por eletrofisiologia, propriedades bioquímicas e biofísicas permitiu a criação da designação dos canais do tipo de corrente L-, P/Q-, N-, R-, e T. Os canais do tipo L-, P/Q-, N-, e R são denominados de alta voltagem e os do tipo T são denominados de baixa voltagem, uma vez que uma pequena despolarização é o suficiente para ativar estes últimos. Em células endócrinas se encontra predominantemente canais com corrente do tipo L (Cav1.2 e Cav1.3, sendo estes fortemente regulados pela proteína cinase A- PKA) e canais com corrente do tipo T (Cav3.x) (YANG; BERGGREN, 2006).

Múltiplos receptores acoplados a proteína G podem através da via cAMP/PKA regular canais de cálcio do tipo L através da estimulação ou inibição da adenilato ciclase. Um aumento na atividade da adenilato ciclase leva ao aumento no cAMP celular, que se liga a subunidade regulatória da proteína cinase dependente de cAMP (PKA), liberando sua subunidade catalítica para fosforilar seus substratos em resíduos específicos de serina e treonina. Subunidade β dos canais de cálcio do tipo L funcionam como substratos para a PKA (e outras cinases) permitindo a abertura destes canais (KAMP; HELL, 2000).

A proteína cinase C (PKC) também efetua um importante papel na regulação dos canais e cálcio do tipo L. Assim como ocorre com a PKA, a PKC é ativada por receptores acoplados a proteína G, que por sua vez estimula a fosfolipase C, a qual hidrolisa PIP_2 (fosfatidilinositol 4,5 bifosfato) em inositol trifosfato e diacilglicerol (DAG). O DAG, fosfatidil serina e em alguns casos o cálcio ativam a PKC. Estudos mostram que ambas subunidades α e β do canal de cálcio do tipo L podem ser substratos da PKC, onde, em alguns tecidos (como o músculo esquelético), os Cav do tipo L são sensíveis a fosforilação por várias isoformas de PKC o que aumenta sua capacidade em promover o influxo de cálcio tanto por aumento da máxima condutância destes canais quanto por deslocar para a esquerda a ativação dependente de voltagem (o que permite sua abertura em resposta a uma despolarização menos substancial) (KAMP; HELL, 2000; MCCARTY, 2006).

1.2 Importância da glicose e secreção de insulina

A glicose é um combustível essencial para os animais e um importante substrato metabólico em diversas vias de sinalização e pode ser obtida a partir da dieta e/ou por síntese endógena (BROSNAN, 1999; NORDILE; FOSTER; LANGE, 1999). Nas células, a glicose fornece energia, regula a atividade de enzimas e a secreção de hormônios

(THORENS; MUECKLER, 2010). Por exemplo, no tecido adiposo a glicose modula a atividade da proteína ligante ao elemento responsivo a carboidrato (ChREBP) que regula a expressão de proteínas da via glicolítica e da lipogênese, (HERMAN et al. 2012). Em células β -pancreáticas a glicose é o principal secretagogo de insulina, que por sua vez age regulando a glicemia (STRAUB; SHARP, 2002).

A exposição crônica a alta concentração sérica de glicose (hiperglicemia - glicemia acima de 6 mM (108 mg/dL)) está associada a danos aos tecidos renal, ocular, nervoso, cardíaco e endoteliais (BUFFET et al. 2012; DAILEY et al. 2013; LINDSBERG; ROINE, 2004; ROBERTSON et al. 2003; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2009). Estes danos ocorrem devido à toxicidade gerada pela glicose, que conduz ao estresse oxidativo (GRUNDY, 2004), aterosclerose (SEMENKOVICH, 2006), inflamação (MAH; BRUNO, 2012) e injúria cerebral aguda (GENTILE; SIREN, 2009). A hiperglicemia pode ocorrer por vários fatores, dentre eles se destacam a redução na liberação de insulina por destruição das células β -pancreáticas (YOON; JUN, 2005), e a resistência à insulina (TOMÁS et al. 2002), onde estes dois últimos podem levar ao estado fisiopatológico da diabetes (FELBER; GOLAY, 2002).

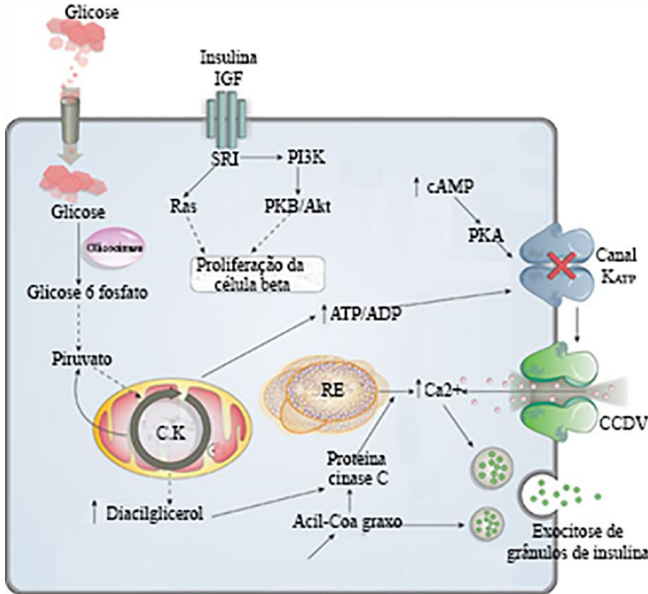
A insulina é um hormônio sintetizado e liberado proporcional a disposição de glicose (mais potente secretagogo de insulina) que regula fortemente a glicemia assim como suprime a produção endógena de glicose (HERRING; JONES; RUSSELL-JONES, 2013; TORRES; NORIEGA; TOVAR, 2009). A síntese de insulina se inicia com a formação da pré-proinsulina (um peptídeo com 110 aminoácidos) que, após clivagem de 24 resíduos de a.a. no retículo endoplasmático, passa a proinsulina, é dobrada em duas cadeias A e B e estabilizadas por pontes dissulfeto. Após estabilização, é estocada em grânulos nas células β -pancreáticas (REITER; GARDNER, 2003).

A liberação de grânulos contendo insulina inicia com a captação de glicose por células β -pancreáticas via transportadores de glicose do tipo 2 (GLUT2). No citosol a glicose é fosforilada a glicose 6-fosfato pela enzima glicocinase, metabolizada a piruvato pela via glicolítica e síntese de ATP na mitocôndria (TORRES; NORIEGA; TOVAR, 2009; THORENS, 2008). Aumento na taxa citosólica ATP/ADP fosforila e fecha canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP}), reduz o fluxo de K^+ e despolariza a membrana das células β -pancreáticas. Esta despolarização abre canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV), aumenta a concentração de cálcio citosólico livre ($[Ca^{2+}]_i$), conduz ao movimento, fusão e liberação de grânulos contendo insulina (ISHII et al. 2011;

OHARA-IMAIZUMI; NAGAMATSU, 2006). Esta secreção de insulina pós-prandial apresenta um perfil característico bifásico, com um pico inicial de secreção em 5-7 minutos após ingestão de alimentos se sustenta até 10-15 minutos. Aproximadamente 2-3% da insulina é liberada na primeira fase. Já na segunda fase que pode levar horas de sustentação, cerca de 20% do conteúdo de insulina é liberada das células β -pancreáticas (DEL PRATO, 2003) (FIG. 2).

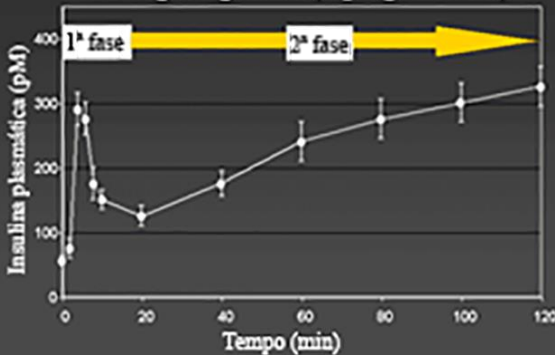
A redução na produção e resistência à insulina são reconhecidas como as causas primárias da diabetes do tipo 2 (FELBER e GOLAY, 2002). Em indivíduos pré-diabéticos, as células β -pancreáticas frequentemente produzem quantidades excessivas de insulina (hiperinsulinemia) para compensar a resistência à insulina e regularizar a glicemia. Contudo, a resistência à insulina gradualmente aumenta com a redução da habilidade do pâncreas para a secreção aumentada de insulina, conduzindo a progressiva hiperglicemia e diabetes, gerando exposição crônica à glicose e glicotoxicidade em tecidos como músculo esquelético, cérebro e córnea e desregulação no metabolismo lipídico (ARNER, 2002). Os mecanismos para a resistência à insulina ainda são pouco compreendidos, mas sabe-se que defeitos na captação de glicose mediada por insulina, obesidade (FELBER; GOLAY, 2002), redução na disponibilidade e responsividade do receptor de insulina à insulina e a redução na expressão de transportadores de glicose, como o GLUT4, são fatores significantes para este distúrbio (ARNER, 2002).

Fig 2. Mecanismo de secreção insulínica induzida por glicose e perfil bifásico de secreção de insulina em células β pancreáticas. A glicose é o mais potente agente insulínogênico em ilhotas pancreáticas, uma vez que seu metabolismo produz intermediários que levam a despolarização celular após fechamento de canais K_{ATP} e abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV). A secreção de insulina induzida por glicose se dá em um perfil bifásico. Ácidos graxos também podem levar à secreção insulínica. Adaptado de Kahn, Hull e Utzschneider (2006) e Beaser, Horton e Zinman (2004).



Secreção bifásica de insulina In vivo

+ 98 mg/dL glicose (hiperglicêmico)



1.3 Transportadores de glicose e GLUT4

A regulação da glicemia pós-prandial é marcadamente regulada pelo aumento na expressão de transportadores de glicose no tecido adiposo, muscular esquelético e cardíaco através do aumento sérico de insulina em resposta ao aumento na glicemia (KUPRIYANOVA; KANDROR, 1999). Os transportadores de glicose são classificados em duas famílias: os de transporte facilitado (GLUTs), que promovem o transporte de glicídeos por meio de difusão facilitada através da membrana plasmática, e os transportadores de glicose dependentes de sódio (SGLTs), que efetuam o co-transporte de Na^+ /Glicose através da membrana plasmática por meio de um gradiente eletroquímico (HARADA; INAGAKI, 2012; SILVA et al. 2013).

Em humanos, os GLUTs são divididos em 12 tipos mais o HMIT com estruturas altamente conservadas e relacionadas, possuindo 12 domínios transmembrana (sendo estes os de maior taxa de conservação), com regiões N- e C-terminal localizadas intracelularmente (ZHAO; KEATING, 2007; MEDINA; OWEN, 2002). Baseado em similaridade filogenética, os GLUTs são divididos em três classes: Classe I, que inclui os GLUTs 1- 4, aos quais apresentam 48-63% de identidade, classe II, que inclui os GLUTs com atividade de transporte de frutose e glicose (GLUTs 5, 7, 9 e 11, com 36-40% de identidade) e a classe III que compreende os GLUTs 6, 8, 10 e 12 e o HMIT, apresentando 19-41% de identidade. Esta última classe se distingue por ter uma alça 9 grande com um sítio de glicosilação, diferentemente dos outros GLUTs, que possuem este sítio na alça 1. Para alguns GLUTs (como o GLUT1) o processo de N- ou O-glicosilação é essencial para a atividade de transporte e em outros (como o GLUT2), está relacionada diretamente com a resposta à insulina (ZHAO; KEATING, 2007).

A função fisiológica dos GLUTs depende da cinética destes transportadores e da especificidade do substrato. Estudos com análogos da glicose não metabolizável (como o fluoro-deoxiglicose (FDG), a 2-deoxiglicose (DG) e a 3-O-metilglicose) usando meio de incubação com condições de troca equilibrada mostra um K_m aparente de 1,5 mM para o GLUT3 e 5-6 mM para do GLUT4. Este K_m denota alta afinidade destes transportadores para a glicose e o transporte máximo mesmo em baixas concentrações. Isto é particularmente importante para o cérebro e tecido muscular quando em exercício, que expressam GLUT3 e GLUT4, respectivamente, mostrando assim também a importância de uma expressão do tipo tecido-específica para os GLUTs (THORENS; MUECKLER, 2010; ZHAO; KEATING, 2007).

O GLUT1 é expressivamente presente no cérebro (incluindo barreira hemato-cefálica) e eritrócitos, contudo, moderado nível de expressão é visto nos adipócitos, músculo esquelético e fígado. O GLUT2 é expresso nas células β -pancreáticas, fígado, rins e membrana basolateral de enterócitos, neste participando do transporte de glicose e frutose. O GLUT3 está presente em tecidos que utilizam a glicose como principal fonte de energia, como o cérebro (WOOD; TRAYHURN, 2003). O GLUT4 (SLC2A4) é um transportador que apresenta a propriedade de ser translocado do citosol à membrana plasmática. Ele apresenta um K_m para a glicose de aproximadamente 5-6 mM, podendo também transportar ácido dehidroascórbico e glicosamina. Contém 509-510 aminoácidos e possui peso molecular de 55 kDa, em humanos (ZHAO; KEATING, 2007). Assim como outras isoformas de transportadores de glicose, o GLUT4 apresenta uma expressão específica ao tecido, é expresso predominantemente no tecido adiposo, musculatura esquelética e cardíaca (WOOD; TRAYHURN, 2003).

Sob condições normais, o GLUT4 está localizado em compartimentos microssomais intracelulares chamadas de GSVs (do inglês, *GLUT4 Storage Vesicles*) e são translocadas a membrana plasmática em resposta ao estímulo da insulina. Devido a quantidade de GLUT4 translocado para a membrana ser proporcional a captação total de glicose, este processo em geral é referenciado como o principal mecanismo de transporte de glicose (KUPRIYANOVA; KANDROR, 1999).

Bogan, McKee e Lodish (2001) citam que vesículas contendo GLUT4 se encontram ancoradas em vários compartimentos celulares, como em estruturas túbulo-vesicular assim como em regiões perinucleares que estão muito próximas a área de trabalho trans-golgi. Dois resíduos proteicos estão intimamente relacionados com a localização do GLUT4 em compartimento intracelular túbulo-vesicular em condições não estimuladas por insulina, uma dileucina no C-terminal e uma sequência contendo resíduos de fenilalanina, glutamina e isoleucina (FQQI) na região N-terminal (ZHAO; KEATING, 2007).

A translocação do GLUT4 se dá devido a uma complexa rede de proteínas associadas a estas vesículas contendo este transportador de glicose, como as 'carga' proteínas (Aminopeptidase regulada por insulina (IRAP), o receptor 6-fosfato IGFII/Man, o receptor de transferrina e a sortilina), sendo estas os maiores componentes destas vesículas e responsivas ao estímulo da insulina (LETO; SALTIEL, 2012). Existem outras proteínas que estão envolvidas com o tráfego e fusão de vesículas e que estão presentes nos GSVs, como a proteína-2 de membrana associada

à vesícula (VAMP2), celubrevina, proteínas de membrana associadas a carreadores secretórios, GTPases de baixa massa molecular e fosfatidil inosol cinases (KUPRIYANOVA; KANDROR, 1999).

A insulina classicamente aumenta a captação de glicose no músculo esquelético e tecido adiposo por ativar a translocação de vesículas contendo GLUT4 de estoques intracelulares à membrana plasmática (YIP et al. 2008). Este mecanismo se inicia com (em estado pós-prandial) a liberação de insulina pelas células β -pancreáticas na corrente sanguínea e a ligação da insulina no receptor específico do tipo tirosina cinase no tecido muscular ou adiposo. O receptor de insulina (RI) é uma glicoproteína transmembrana com duas subunidades idênticas, consistindo cada uma de uma subunidade alfa (extracelular) ligadas a uma subunidade beta (transmembrana e intracelular) (MORGAN; CHAI; ALBISTON, 2011). A subunidade beta do receptor de insulina é uma proteína cinase a qual é ativada a partir da ligação da insulina a subunidade extracelular, o que leva a uma mudança conformacional no RI, ativa o domínio de ligação ao ATP da subunidade beta, o que conduz a autofosforilação em resíduos de serina e tirosina, organizando o local de fosforilação de substratos do receptor de insulina (SRIs) e a ativação de duas vias, uma independente e outra dependente da enzima fosfatidil inositol-3 cinase (PI3K) (KANZAKI; PESSIN, 2001; MORGAN; CHAI; ALBISTON, 2011).

Em uma via dependente de PI3K, estudos mostrando redução na captação de glicose em tecido muscular esquelético e adiposo após estímulo com a insulina na presença de wortmannin, um inibidor farmacológico da enzima PI3K, mostra que esta proteína é significativamente importante para o processo de translocação de vesículas contendo GLUT4 (CAZAROLLI et al. 2013).

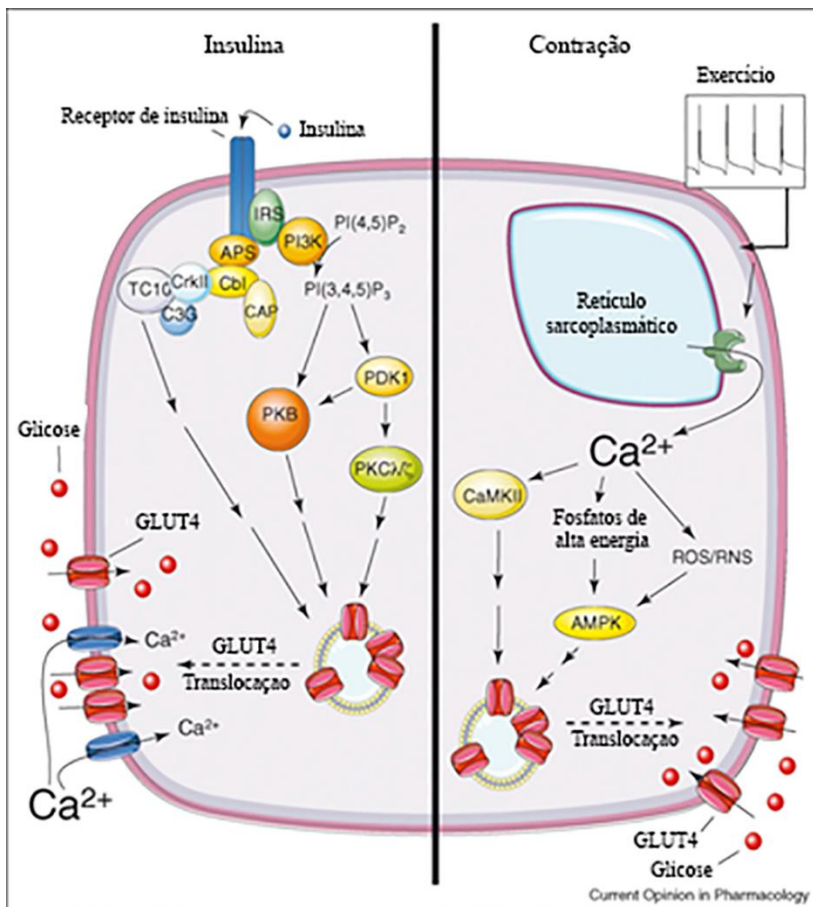
O substrato do RI (SRI 1/2) recruta a enzima fosfatidil inositol-3 cinase à membrana plasmática que catalisa a conversão dos lipídeos de membrana fosfatidil inositol 4,5 bisfosfato (PIP2) a fosfatidil inositol 3,4,5 trisfosfato (PIP3). A formação destes metabólitos, leva ao recrutamento de proteínas que contém domínios com homologia de plequistrina, como a proteína cinase B (PKB, ou Akt) e a PDK1 (LENEY; TAVARÉ, 2009; KUPRIYANOVA; KANDROR, 1999). Uma vez na membrana, a Akt é ativada por fosforilação pela PDK1 em um resíduo de treonina 308 e pela TORC2 em resíduo de serina 473 (LENEY; TAVARÉ, 2009). Uma vez ativada, os dois substratos da PKB são a AS160 (uma proteína ativadora de Rab GTPase) e o fosfatidil inositol 3 fosfo 5 cinase (PIKfyve). A AS160 (ou TBC1D4) é uma proteína de 160 kDa que possui um domínio seletivo para proteínas Rab

ligante de GTP monomérica e funciona como um regulador negativo da translocação do GLUT4. Sob estado não estimulado, o domínio GAP ativo da AS160 suprime a atividade da Rab, que no estado ativo, permite a translocação do GLUT4 (LENEY; TAVARÉ, 2009). A inativação do domínio GAP da AS160 (por fosforilação) promove a remoção do seu efeito inibitório sobre a Rab, o que leva a translocação do GLUT4 (SANO et al. 2011; LENEY; TAVARÉ, 2009; MÍNEA et al. 2005).

Alternativamente a via de ativação da PI3K, a ligação da insulina ao receptor pode recrutar proteínas que também levam a translocação do GLUT4, como a proteína adaptadora com homologia a plequistrina e domínio homólogo a src 2 (APS) e a proteína associada a c-Cbl (CAP) (WIJESEKARA et al. 2006). A autofosforilação do RI leva a fosforilação do Cbl e subsequente recrutamento da proteína adaptadora CrkII, o que leva a ativação da GTPase monomérica TC10 que diretamente promove rearranjo da actina e translocação de vesículas contendo GLUT4 (MORGAN; CHAI; ALBISTON, 2011).

Existem outras vias alternativas de translocação de GLUT4 independente de insulina, como a via da proteína cinase ativada por AMP (AMPK) que interage com a AS160 (TREEBAK et al. 2006). Esta via foi caracterizada em estudos utilizando o ativador farmacológico análogo a adenosina, o AICAR (5'-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleosídeo), em tecido muscular esquelético e cardiomiócitos. Nestes tecidos, o aumento da fosforilação da AS160 concomitante aumenta a atividade da AMPK (LEHNEN et al. 2012; WEBSTER et al. 2010). A AMPK funciona por meio de vias dependente de hipóxia e de contração muscular, identificando baixas concentrações de ATP e estimulando vias de síntese de ATP, como aumento na oxidação de ácidos graxos, via glicolítica e captação de glicose, e inibindo vias de utilização energética (WEBSTER et al. 2010). O exercício físico aumenta significativamente a expressão do GLUT4 já em poucas horas de exercício, tanto em humanos como em ratos (OJUKA; GOYARAM; SMITH, 2012) (FIG. 3).

Fig 3. Vias de translocação do GLUT4, induzido por insulina e cálcio. Em um mecanismo mediado pela insulina têm-se a ativação de maneira dependente de proteínas cinases como PI3K, PKB e/ou via proteína APS/Cbl/TC10. Quando ativada por cálcio, a translocação do GLUT4 é dependente de proteínas cinases como CaMKII e AMPK. Adaptado de LANNER et al. (2008).



Outras vias independentes de insulina podem ser ativadas pelo exercício físico além da via do AMPK, pelo fato de durante este processo a demanda de glicose para o músculo ser maior, o GLUT4 é translocado a membrana em maior quantidade assim como sua via de síntese encontra-se mais proeminente. Existem várias evidências que mostram que o exercício físico regula a expressão do GLUT4 muscular e a sensibilidade

do tecido à insulina (KRANIOU; CAMERON-SMITH; HARGREAVES, 2006; OJUKA; GOYARAM; SMITH, 2012).

Neste mecanismo se inclui o aumento das concentrações de cálcio intracelular [Ca^{2+}]_i, uma vez que isto é parte fundamental do processo de contração muscular, permitindo, desta forma, uma análise da relação de vias de sinalização do cálcio e eventos metabólicos mediados pelo cálcio, como a expressão e translocação do GLUT4 no músculo e captação de glicose (OJUKA; GOYARAM; SMITH, 2012; WITCZAK et al. 2010).

A enzima cinase dependente de cálcio/calmodulina II (CaMKII) é conhecida por ser um componente intermediário chave na captação de glicose mediada pela contração muscular. Esta enzima interage com cinases relacionadas com a síntese e translocação do GLUT4, como a proteína cinase ativada por AMP (AMPK), a MAPK Erk1/2 e a Akt (LANNER et al. 2008; ILLARIO et al. 2009). As CaMKs são holoenzimas de 8-12 unidades em cada subunidade, possuem um domínio catalítico que contém um sítio ligante de ATP e substrato, um domínio auto-inibitório (age como um pseudosubstrato ligado ao domínio catalítico) que possui um sítio ligante ao complexo cálcio/calmodulina e um domínio de associação necessário para a formação da holoenzima (OJUKA; GOYARAM; SMITH, 2012). A CaMKII (forma predominante de CaMKs no músculo) é ativada pelo complexo formado entre o cálcio citosólico (em concentração aumentada durante a contração muscular) e a proteína ligadora de cálcio, a calmodulina. O complexo cálcio/calmodulina se liga e ativa a CaMKII que fosforila proteínas substrato em resíduos de serina e treonina (OJUKA; GOYARAM; SMITH, 2012; MURGIA et al. 2009).

Acredita-se que a translocação do GLUT4 através do estímulo da CaMKII ocorra por meio da ativação da proteína AS160, através de um sítio de ligação específica da Akt e isto culmina na ativação da PI3K (MOHANKUMAR; TAYLOR; ZAHRADKA, 2012). Além disso, a CaMK II regula fatores de transcrição MEF2 (do inglês, Myocyte Enhancer Fator-2) e GEF (do inglês, GLUT4 Enhancer Factor), e de histonas (ZHAO; KEATING, 2007; OJUKA; GOYARAM; SMITH, 2012), aumentando além da expressão, a síntese do GLUT4. Muitas destas funções da CaMKII foram estudadas através da utilização de inibidores farmacológicos específicos, como o KN62 e o KN93 que inibem a CaMKII por competirem com o complexo cálcio/calmodulina no sítio de ligação deste (OJUKA; GOYARAM; SMITH, 2012; WITCZAK et al. 2010).

A translocação do GLUT4 em presença de insulina resulta em um aumento de 10-20 vezes a captação de glicose em tecidos dependentes de

insulina. Este fato torna o GLUT4 relevante alvo de estudos para o tratamento da diabetes (WOOD; TRAYHURN, 2003; ZHAO; KEATING, 2007). Isto é corroborado pela observação da resistência à insulina provocada pela diminuição da expressão do GLUT4 no tecido adiposo demonstrado tanto em modelos experimentais em animais como em humanos diabéticos (WOOD; TRAYHURN, 2003).

1.4 Diabetes e resistência à insulina

A diabetes melito (DM) é um grupo de doenças caracterizadas pela hiperglicemia crônica desenvolvida a partir da deficiência na função e/ou produção da insulina, levando a anormalidades no metabolismo da glicose e outros carboidratos assim como de lipídeos e proteínas (KUZUYA et al. 2002). Existem dois principais subtipos diferentes de DM, com etiologia, fatores de risco e evolução diferenciados: a diabetes melito do tipo 1 (DM 1) e do tipo 2 (DM 2). A DM 1, que é uma doença autoimune, é caracterizada pela destruição das células β -pancreáticas, o que leva a deficiência na produção e liberação de insulina (KUZUYA et al. 2002). Este processo é resultante de uma complexa interação de fatores genéticos (desregulação hormonal e imunitária) e epigenéticos (dieta e infecções virais), que permitem a progressão deste distúrbio a um estágio de absoluta deficiência de insulina (PAGLIUCA; MELTON, 2013).

A ativação de células inflamatórias e de citocinas está diretamente relacionada com a origem da diabetes melito do tipo 1. A ação citotóxica e citostática do TNF- α e da IL-6 influenciam diretamente a síntese e liberação de insulina (PIETROPAOLO et al. 2008; PHARMA et al. 2013; ERBAGCI et al. 2001).

Diversos fármacos são utilizados para a manutenção da glicemia em indivíduos com DM 1 e devido a total redução na produção de insulina, a constante administração destes é a forma de tratamento mais comum e eficiente para o tratamento (FUNGA et al. 2006).

A DM 2 se caracteriza pelo estágio final da resistência à insulina. Está completamente associado a fatores de riscos como idade avançada e a obesidade (DEFURIA et al. 2013), histórico familiar, metabolismo da glicose prejudicado e sedentarismo (TUOMILEHTO et al. 2001). Este é o tipo de diabetes que mais avança no mundo (sendo encontrado em cerca de 90-95 % dos casos de diabetes em adultos), o que pode ser explicado pelo fato deste estar diretamente ligado a hábitos de vida e a condições socioeconômicas (BELVIS et al. 2009; CRAIG et al. 2007; WING et al.

2011). Neste tipo de diabetes, a massa e a função de células β -pancreáticas são preservadas (KUZUYA et al. 2002).

A resistência à insulina é caracterizada pela redução da resposta fisiológica à insulina, o que resulta em hiperinsulinemia para compensar a deficiência no transporte de glicose em células da musculatura esquelética e adipócitos (LAMOUNIER-ZEPTEP; EHRHART-BORNSTEIN; BORNSTEIN, 2006). Na musculatura esquelética de animais resistentes à insulina é observada uma forte redução na taxa de transporte de glicose assim como baixa translocação de GLUT4, devido a uma redução na sensibilidade à insulina, levando a baixa fosforilação do receptor (RI) assim como dos SRIs 1/2 (CERF, 2007; RAGHAVAN, 2012).

A diabetes, nos mais diversos tipos e estágios da progressão, está associada a uma série de complicações que se dão desde sintomas como polidipsia, poliúria e perda de massa a problemas em longo prazo, tais como doenças em nível macrovascular e microvascular (retinopatia, nefropatia e neuropatia), culminando em cegueira, falha renal, e gangrena. Em casos severos de hiperglicemia há a ocorrência de cetoacidose, o que leva a distúrbios mentais, coma e morte (MOREIRA et al. 2010). A exposição crônica a hiperglicemia conduz a glicotoxicidade por meio da intensificação da produção de produtos finais de glicação avançada (AGEs [do inglês, Advanced Glycation End-products]), maiores responsáveis por toda sintomatologia diabética pois se acumulam em todos os tecidos e fluidos corporais (KOUIDRAT et al. 2013).

Os AGEs são formados pelo processo de Maillard, uma reação não enzimática entre cetonas ou aldeídos e grupos amino de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, sendo este um processo normal acelerado sob a condição de DM (YAMAGISHI, 2011). No tecido vascular, os AGEs levam a morte de pericitos, inflamação vascular, estresse oxidativo e ativação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), ativando a angiogênese e retinopatia diabética (PYRAMA et al. 2012; YAMAGISHI et al. 2012). Já no tecido renal, a nefropatia causada pela diabetes é explicada pela hiperfiltração glomerular e morte de células mesangiais estimulada pelos AGEs, aos quais ativam isoformas da PKC e vias das MAPKs, levando ao aumento de ROS e de fatores fibróticos como colágeno do tipo IV (PYRAMA et al. 2012; YAMAGISHI, 2011). Outro problema de alta incidência associada a DM é a neuropatia diabética, caracterizada por desmielinização e degeneração axonal de neurônios periféricos, que ocorre devido a glicação da mielina, tornando-a susceptível a fagocitose por macrófagos e ação imunomodulatória por ação sobre IgG e IgM (BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2008).

1.5 Produtos naturais e triterpenos

Em muitas comunidades, a diabetes é tratada por meio da medicina popular através da utilização de partes de plantas e fungos comestíveis (AYYANAR; SUBASH-BABU; IGNACIMUTHU, 2013), sendo muitos compostos análogos (semi-sintéticos ou sintéticos) com comprovada atividade biológica na diabetes inspirados em produtos naturais (CAZAROLLI et al. 2008; SILVA et al. 2013). Em muitos destes tratamentos é encontrado a presença e ação de compostos como flavonóides (AGATI et al. 2012), carotenóides (GURUVAYOORAPPAN; KUTTAN, 2007), e mais proeminentemente de terpenóides (NOKHODCHI et al. 2007). Os terpenos, assim como os carotenos, são moléculas classificadas como isoprenóides por serem formados por seis unidades de isopreno (C_5H_8)₆ derivado do ácido mevalônico (NAGEGOWDA, 2010). Além disso, são divididos de acordo com a estrutura do esqueleto carbônico em monoterpênos (contendo dez carbonos), sesquiterpênos (contendo quinze carbonos), diterpênos (contendo vinte carbonos) e triterpênos (contendo trinta carbonos) (DEGENHARDT; KÖLLNER; GERSHENZON, 2009).

As rotas de síntese desses isoprenóides consistem na organização do grupo isopreno, isopentenil difosfato pirofosfato (IPP) e do isômero, o dimetilalil difosfato (DMAPP) (MISAWA, 2011). A enzima preniltransferase condensa o DMAPP e o IPP gerando o geranildifosfato (GPP) contendo dez carbonos. O GPP, juntamente com o IPP, é convertido a farnesildifosfato (FPP) com quinze carbonos, por ação da FPP sintase. O FPP é condensado ao IPP pela enzima GGPP sintase formando geranylgeranyl difosfato (GGPP) (com vinte carbonos). Desta forma, o GPP, FPP e GGPP são os precursores dos monoterpênos, sesquiterpênos e diterpênos, respectivamente. Duas moléculas de FPP e GGPP são condensadas a esqualeno e fitoeno, que são os primeiros precursores dos triterpênos e carotenóides, respectivamente (MISAWA, 2011).

O esqualeno ($C_{30}H_{50}$) é um triterpeno acíclico que contém duas moléculas farnesol unidas em um modelo cauda-cauda. Possui seis duplas ligações, dez metilenos e oito grupos metil assimetricamente distribuídos. O esqualeno é a base para a síntese de muitos triterpênos como o lanosterol e o cicloartenol, que são também precursores de fitoesteróides (DESMAËLE; GREF; COUVREUR, 2012). Os triterpênos são os maiores constituintes de uma grande parte de plantas medicinais, estando presentes em plantas e alguns animais marinhos como metabólitos secundário podendo estar conjugados a glicídios (saponinas), livres ou

como ésteres (LEE et al. 2002; SALVADOR et al. 2012). Eles se originam do esqualeno ou do oxidoesqualeno por uma série de reações de condensação intramolecular. As enzimas esqualeno ciclases e oxidoesqualeno ciclases podem gerar aproximadamente duzentos tipos diferentes de triterpenos, sendo classificados em três grupos: acíclicos, tetracíclicos e pentacíclicos, sendo estes últimos ainda divididos em dezenas de famílias. Aqui focaremos as famílias dos triterpenos do tipo oleanano, ursano e lupano (SALVADOR et al. 2012) (FIG. 4).

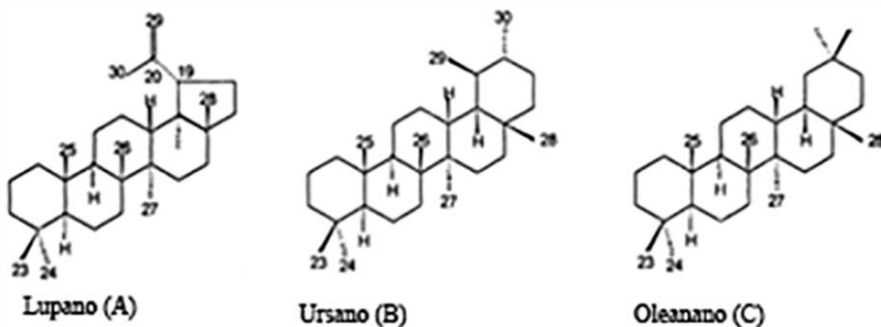
Os triterpenos do tipo oleanano ocorrem nos vegetais com maior frequência (50%) do que os outros tipos de triterpenos pentacíclicos, sendo o mais comum desta classe o ácido oleanólico, geralmente apresentando um grupo dimetil no carbono 20 (ALQAHTANI et al. 2013). Devido a significativa presença em diversas espécies de plantas, os oleananos são o centro de intensos estudos que focam na caracterização de atividades biológicas. São utilizados na medicina popular como diurético (YE et al. 2000), no tratamento da hepatite (CHENG et al. 2011), no tratamento de redução da glicemia e ações antidiabéticas através do aumento da insulina sérica e translocação do GLUT4 (LEE et al. 2002; ALQAHTANI et al. 2013). Em células vegetais, os oleananos são sintetizados a partir do 2,3 oxidoesqualeno derivado do isopentenil pirofosfato. A ciclização do 2,3 oxidoesqualeno pela oxidoesqualeno ciclase β -amirina sintase (BAS) leva a produção do esqueleto do triterpeno pentacíclico do tipo oleanano β -amirina (Olean-12-en-3-ol). Na reação final, a β -amirina sofre uma sequência de oxidações de três passos na posição C28 por uma citocromo P450 produzindo ácido oleanólico (POLLIER; GOOSSENS, 2012). O ácido oleanólico ((ácido 3-beta)-3-hidroxioleanano-12-en-28-oico), e o isômero, o ácido ursólico (ácido 3-beta-hidroxi-urs-12-en-28-oico) são triterpenos extensivamente encontrados livres ou como agliconas (LIU, 1995).

Assim como os triterpenos do tipo oleananos, os ursanos possuem anéis A/B, B/C, C/D trans-ligados, com anéis D/E cis-ligados e possuem um grupo metil nos carbonos dezenove e vinte (ALQAHTANI et al. 2013). Os ursanos são também chamados de α -amiranos (SUN et al. 2006) e o ácido ursólico (AU) é o mais representativo triterpeno ácido carboxílico do grupo dos ursanos (FARINA; PINZA; PIFFERI, 1998). Durante muito tempo o AU foi considerado como biologicamente inativo. Contudo, recentemente, significantes ações *in vivo* e *in vitro* combinadas com baixa toxicidade foram relatadas (IKEDA; MURAKAMI; OHIGASHI, 2008).

Os triterpenos do tipo lupano possuem todos os anéis (ABCDE) trans-ligados. A síntese nas plantas ocorre no citosol através da oxidação

do esqualeno pela esqualeno epoxidase a esqualeno 2,3 oxidoesqualeno. Este é então ciclizado ao cátion lupenil pela lupeol sintase (LUS) e convertido em lupeol por desprotonação do grupo metil vinte e nove (SIDDIQUE; SALEEM, 2011; SALVADOR et al. 2012).

Fig 4. Estrutura de triterpenos pentacíclicos do tipo Lupano (A), Ursano (B) e Oleanano (C). Adaptado de Mallavadhani, Panda e Rao (1998).



Os triterpenos naturalmente são encontrados em alimentos da dieta humana (consumidos em torno de 250 mg por dia) (SIDDIQUE; SALEEM, 2011). Eles exibem significativa ação biológica, com os triterpenos do tipo lupano (como a betulina, o ácido betulínico (ácido 3 β -hidroxi-lup-20(29)-en-28-oico) e o lupeol), por exemplo, apresentando forte atividade anti-inflamatória, antihiperlipidêmica, anti-oxidante (ALQAHTANI et al. 2013) e anticâncer (BAGLIN et al. 2003). Estruturas funcionalmente importantes aos triterpenos pentacíclicos são insaturações em C12, um grupo metil em C23, C28 ou C30 com variável funcionalização (hidroximetil, aldeído ou carboxil) e polihidroxilação em C2, C7, C11, C15, C16, C19. O esqualeno além de ser a molécula base para a síntese de terpenos, também é utilizado para a síntese de esteróides e moléculas estruturalmente similares como a vitamina E e a vitamina D, sendo esta última relacionada a diversas propriedades farmacológicas (KIM; KARADENIZ, 2012; NORMAN; SILVA, 2001).

1.6 Vitamina D

A vitamina D (VitD₃) é um secoesteróide (por ter um quebra na ligação carbono-carbono entre os carbonos nove e dez no anel B). Este secoesteróide possui a estrutura molecular intimamente associada aos clássicos hormônios esteróides (como o estradiol, cortisol e aldosterona), que possuem como esqueleto o ciclopentanoperidrofenantreno (NORMAN, 2008). A VitD₃ é classicamente conhecida por modular a homeostase do cálcio no intestino, ossos e rins (NORMAN, 2006).

A VitD₃, ainda que possa ser obtida da alimentação, não é tecnicamente uma vitamina por não ser um fator dietético essencial. Em animais, entre eles os seres humanos, a VitD₃ é considerada um pró-hormônio por ser produzida predominantemente por síntese endógena na pele iniciada pela incidência da luz UVB (290-315 nm) no precursor 7-deidrocolesterol (NORMAN, 2008; CHEW; HARRIS, 2013). Apesar de ainda não se conhecer alguma atividade biológica associada à VitD₃, esta é metabolizada a metabólitos considerados ativos no fígado e nos rins (NORMAN, 2008). No fígado, a VitD₃ é hidroxilada no C25 a 25OH-D₃ e posteriormente hidroxilada nos rins no C1 ao metabólito biologicamente ativo 1 α ,25(OH)₂ vitamina D₃ (1,25-D₃) pela enzima 1 α -hidroxilase (gene: CYP27B1). A 25(OH)D₃ é a principal forma circulante de um metabólito da VitD₃, sendo utilizada como parâmetro para dosagem da concentração sérica desta vitamina (NORMAN; BOUILLON, 2010; CHEW; HARRIS, 2013; CLINE, 2012; GRECO, 2012; DING et al. 2012).

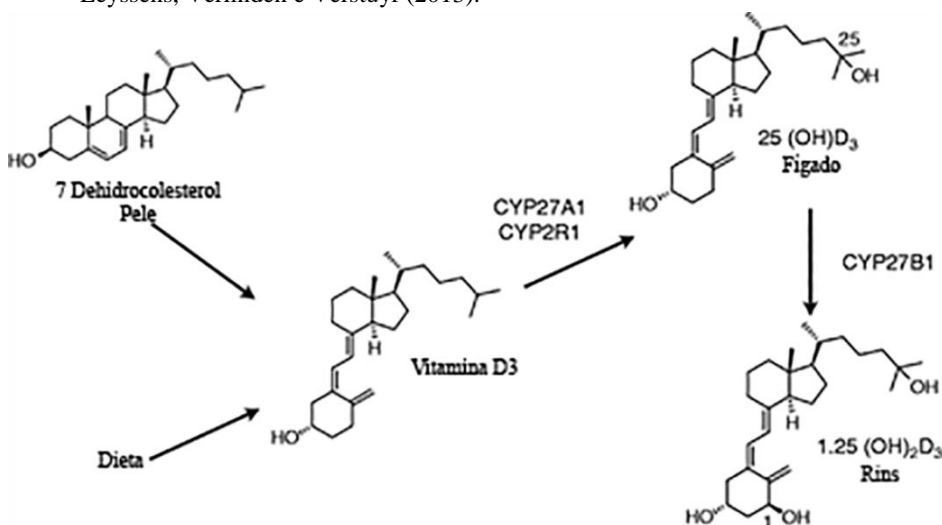
A regulação da síntese de 1,25-D₃ se dá através da enzima C1 hidroxilase nos rins pelo hormônio da paratireoide (PTH), onde uma redução nas concentrações de cálcio estimula a secreção de PTH que em resposta favorece a síntese de VitD₃ e aumenta a absorção intestinal de cálcio (GRECO, 2012).

O sistema endócrino da vitamina D é caracterizado pelo metabolismo hepático e renal e, pela habilidade em gerar respostas biológicas em mais de trinta tecidos alvos (incluindo intestino, osso, rins, células β -pancreáticas, placenta, monócitos e muitos tecidos tumorais) através de receptores específicos para a vitamina D₃ (VDR). Estas ações dependem de quatro proteínas que possuem uma região protéica em comum, o domínio de ligação ao ligante (LBD), que permite uma estereoespecificidade de ligação a 1,25-D₃ ou a análogos relacionados. São as enzimas do citocromo P450 no fígado, rins e outros tecidos que metabolizam a vitamina D a metabólitos ativos; a proteína plasmática ligante de vitamina (DBP) que seletivamente transporta moléculas de

vitamina D a vários tecidos alvos, o VDR de ação nuclear (VDRnuc) e o VDR de ações rápidas (VDRmem) (NORMAN; SILVA, 2001) (FIG. 5).

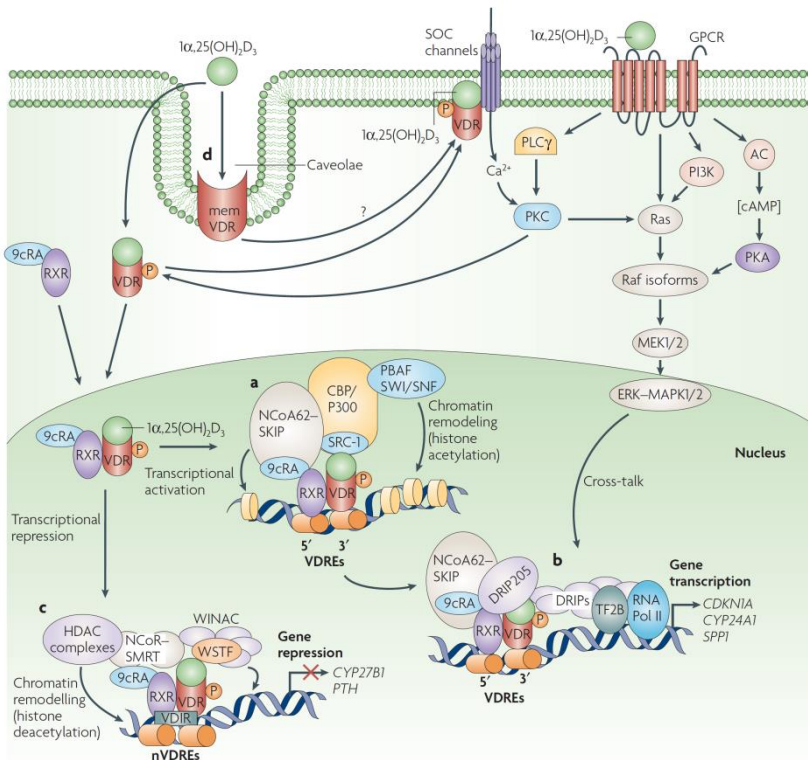
Após a 1,25-D₃ ser transportada aos tecidos alvos pela DBP, esta pode agir através da interação com VDR citosólico desencadear uma resposta nuclear ou se ligar a um VDR da superfície da membrana e conduzir a respostas rápidas (NORMAN, 2008; YANG et al. 2012). O VDR é uma proteína de 50 kDa, membro da superfamília de receptores de hormônios nucleares (que também inclui os receptores de hormônios esteróides). Apresenta uma sequência primária de aminoácidos com seis domínios funcionais: uma região variável (domínio A e B), um domínio de ligação ao DNA (domínio C), uma região de dobramento (domínio D), uma região de ligação ao ligante (domínio E) e um domínio de ativação transcricional (domínio F). Pesquisadores estimam que o VDR regule a expressão de mais de 500 genes no genoma humano (NORMAN, 2008). Em um mecanismo nuclear, dependendo da célula, o VDRnuc pode formar homo ou heterodímero com um dos receptores X retinóides (RXRa, RXRb, RXRc) para que haja uma interação específica a regiões do DNA. A ligação do 1,25-D₃ e a formação do complexo VDR-RXR é seguida por ligação deste complexo ao elemento responsivo a vitamina D, o VDRE, que inicia a transcrição na região promotora do gene alvo a vitamina D (YANG et al. 2012; NORMAN, 1998) (FIG. 6).

Fig 5. Biossíntese endógena de 1,25(OH)₂ vitamina D₃ em animais a partir do colesterol presente no epitélio ou da vitamina D₃ obtida da dieta. Adaptado de Leyssens, Verlinden e Verstuyf (2013).



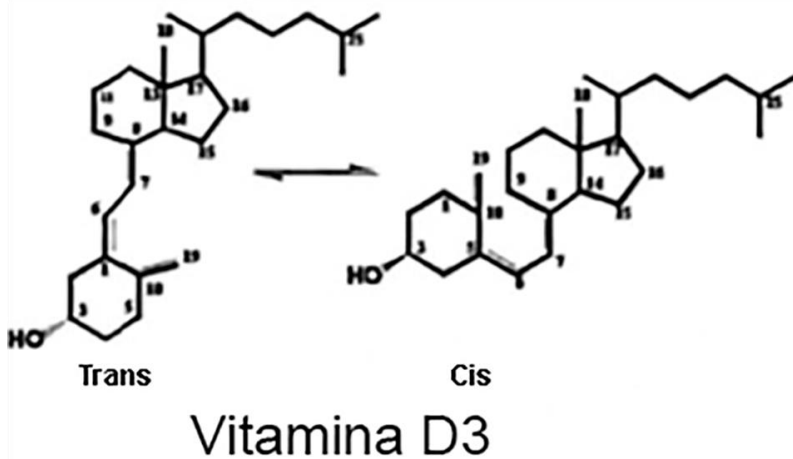
Há mais de duas décadas, pesquisadores relatam que as ações rápidas da 1,25-D₃ estão relacionadas à ligação a um VDR próximo ou associado a membrana plasmática em regiões de caveoleos no intestino, fígado, osteoclastos, músculo, células β-pancreáticas e células paratireoides (NORMAN; SILVA, 2001). O tempo destas respostas rápidas pode variar de segundos a minutos em contraste a respostas genômicas que podem levar de poucas horas a dias (NORMAN, 2006). Mecanismos de resposta rápida desencadeada pela ligação da 1,25-D₃ incluem a secreção de insulina em células β-pancreáticas (NORMAN, 2006), a modulação de canais iônicos em osteoblastos (NORMAN, 2008) e a transcritaquia - estímulo rápido do transporte de cálcio intestinal pela 1,25-D₃ (NORMAN; SILVA, 2001).

Fig 6. Ações membranares e nuclear de receptor de vitamina D (VDR). Adaptado de Deeb, Trump e Johnson (2007).



Estudos sugerem que a ativação de uma via de resposta rápida ou nuclear depende da conformação da 1,25-D₃ (NORMAN; SILVA, 2001), uma vez que é bem estabelecido que a 1,25-D₃ é uma molécula esteróide excepcionalmente flexível, com rotação em torno de ligações simples entre os carbonos 6 e 7, apresentando assim as orientações *cis* ou *trans* (OKAMURA et al. 2001; NORMAN, 2008). Análises sugerem que a 1,25-D₃ apresenta diferentes modelos de conformação que interagem separadamente a ambos receptores para gerar respostas biológicas diferentes. Em ensaios com análogos estruturais da 1,25-D₃ foi observado que análogos rígidos da 1,25-D₃ 6-*s-cis* (como o JN) se ligam fracamente ao VDRnuc e são significativamente menos efetivos que a 1,25-D₃ na geração de uma resposta genômica. Em contraste, estes mesmos análogos 6-*s-cis* são potentes em gerar respostas rápidas, equivalentemente a 1,25-D₃ (NORMAN; SILVA, 2001). Portanto, hoje se acredita que a 1,25-D₃ na conformação 6-*s-trans* apresenta ligação mais específica ao VDRnuc, enquanto que para ações não-genômicas a conformação 6-*s-cis* da 1,25-D₃ seja preferencial (NORMAN, 2008) (FIG. 7).

Consequências fisiológicas associadas tanto com a deficiência quanto com a concentração excessiva de vitamina D são bem conhecidas. Baixa concentração de vitamina D (25(OH)-vitamina D <50 nmol/litro) podem conduzir a problemas ósseos, musculares e diabetes (CHAKHTOURA; AZAR, 2013). A conexão entre a concentração sérica de vitamina D, a concentração de insulina e o metabolismo de glicose em animais é persistentemente estudado. Vários trabalhos sugerem que a deficiência em vitamina D causa diminuição na liberação de insulina em ratos e leva a diabetes melito do tipo 2 (ALZAIM; WOOD, 2013). O efeito da vitamina D na regulação da função das células β-pancreáticas e na secreção de insulina pode ser por um efeito imunomodulatório (com ação anti-inflamatória no tecido pancreático) (TALAEI; MOHAMADI; ADGI, 2013) ou, por meio da ligação da forma hormonal ativa circulante (1,25-D₃) ao receptor de vitamina D na célula β-pancreática que pode regular o balanço de cálcio nestas células (CAVALIER et al. 2011). A 1,25-D₃ pode também aumentar a sensibilidade à insulina por estimular a expressão do receptor de insulina e o transporte de glicose mediado por insulina (ALZAIM; WOOD, 2013). Contudo um tratamento para a diabetes com 1,25-D₃ é delicado devido ao excesso de hormônio conduzir a hipercalcemia aguda (TOMLINSON, 1980; KOTA et al. 2011). Além disso, a toxicidade associada a 1,25-D₃ resulta em calcificação de tecidos moles e malformação óssea (CLINE, 2012).

Fig 7. Configuração *trans* e *cis* da $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Adaptado de Norman (2008).

2 JUSTIFICATIVA

A cada ano o índice de indivíduos diagnosticados com diabetes aumenta de forma exponencial, segundo informações do ministério da saúde. Em torno de 5% da população adulta brasileira é constatada com diabetes, com previsão de que 380 milhões de pessoas em todo o mundo sejam diabéticas até o ano 2025 (BRASIL, 2013). O aumento nos índices dessa desordem, assim como os riscos associados a ela estão diretamente relacionados a hábitos alimentares, com aumento de ingestão de alimentos ricos em carboidratos e lipídeos e com a redução da prática de esportes (AJALA; ENGLISH; PINKNEY, 2013).

A diabetes melito é um distúrbio metabólico que requer cuidados rigorosos, principalmente, no controle do uso de medicação específica. No caso da diabetes tipo 1 a terapia é feita à base de insulina, enquanto para a diabetes tipo 2 inclui o uso de hipoglicemiantes orais e insulina. Alternativas da utilização de novas substâncias exógenas como: compostos provenientes de plantas medicinais, metabólitos de compostos naturais e/ou análogos se tornou uma prática cada vez mais difundida. Porém, o tratamento pode ser prejudicial ao paciente devido à falta de comprovação científica da ação e do mecanismo de atuação destas substâncias. Estudos realizados por nosso grupo, demonstraram com sucesso a influência de compostos naturais isolados ou sintéticos como as chalconas e derivados naftilchalconas (ALBERTON et al. 2008; DAMAZIO et al. 2010), flavonóides (FOLADOR et al. 2010; KAPPEL et al. 2013) e acilhidrazonas (FREDERICO et al. 2012) e o hormônio 1,25-D₃, na glicemia e em mecanismos que levam ao controle do metabolismo da glicose (NORMAN; SILVA, 2001; SAND, 2005; NORMAN et al. 2002; MENEGAZ et al. 2009; ZANATTA et al. 2010; MENEGAZ et al. 2010a).

Vários estudos destacaram a correlação entre deficiência em vitamina D e a diabetes (TAKIISHI et al. 2010). Indivíduos com diabetes do tipo 2 apresentam baixas concentrações séricas de 25(OH)VitD (TALAEI; MOHAMADI; ADGI, 2013), assim como alta ingestão de cálcio e vitamina D está associada com a prevenção da diabetes e redução nos valores glicêmicos (PITTAS et al. 2006). Essa ação da VitD₃ pode se dar pela presença de receptores de alta afinidade para a 1,25-D₃ nas células β-pancreáticas o que origina hipóteses da 1,25-D₃ como agente insulino-trófico (KAJIKAWA et al. 1999). Também foi demonstrado o efeito secretagogo de um análogo da 1,25-D₃ nas células β-pancreáticas, aumentando a liberação de insulina, induzida por altas concentrações de

glicose, junto com uma aceleração no influxo de cálcio (KAJIKAWA et al. 1999). Contudo, os mecanismos ainda são pouco elucidados.

Compostos naturais estruturalmente relacionados com a 1,25-D₃ que aumentem a proporção de transportadores de glicose na membrana plasmática, e/ou induzam a síntese de novos transportadores (GLUT4), e que, sobretudo não produzam efeitos hipercalcêmicos e de toxicidade celular são potenciais agentes a serem inseridos no tratamento a indivíduos resistentes à insulina e diabéticos. Nesse contexto, se incluem os triterpenos pentacíclicos que são compostos significativamente presentes na natureza e amplamente presentes na dieta humana. Dessa forma, neste trabalho foram analisadas as ações agudas *in vivo* na redução da glicemia e na secreção de insulina em ratos hiperglicêmicos. Além disto, os mecanismos insulinomiméticos *in vitro* de triterpenos naturais na musculatura esquelética foram estudados. Em geral, a caracterização do efeito e do mecanismo de ação destes compostos na tolerância à glicose e em vias de sinalização em tecidos dependentes de insulina apontam novos compostos potenciais para a terapia na diabetes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar o efeito e o mecanismo de ação dos triterpenos naturais, ácido betulínico, ácido ursólico, trihidroxioleanano, 3 β -hidroxihopeno e fernenodiol e da 1,25-D₃ como possíveis insulino-miméticos e/ou secretagogos de insulina.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Estudar o efeito *in vivo* (curva de tempo e de dose-resposta) de triterpenos na glicemia de ratos hiperglicêmicos;
- ✓ Analisar a influência desses triterpenos na secreção de insulina e no conteúdo de glicogênio muscular e hepático de ratos hiperglicêmicos após tratamento *in vivo*;
- ✓ Inferir se o trihidroxioleanano e 3 β -hidroxihopeno potenciam a secreção do hormônio incretínico GLP-1;
- ✓ Verificar o efeito dos triterpenos pentacíclicos (TPs) ácido ursólico e ácido betulínico na captação *in vitro* de [U-¹⁴C]-2-Deoxi-D-glicose no músculo esquelético, do trihidroxioleanano no tecido adiposo e do 3 β -hidroxihopeno, fernenodiol e ácido betulínico em ilhotas pancreáticas de ratos;
- ✓ Determinar o mecanismo de ação do ácido ursólico e ácido betulínico na captação *in vitro* de [U-¹⁴C]-2-Deoxi-D-glicose no músculo esquelético e do trihidroxioleanano no tecido adiposo de ratos;
- ✓ Estudar o efeito e o mecanismo de ação da 1,25 (OH)₂ D₃ na captação de [U-¹⁴C]-2-Deoxi-D-glicose *in vitro* no músculo esquelético de ratos normoglicêmicos;

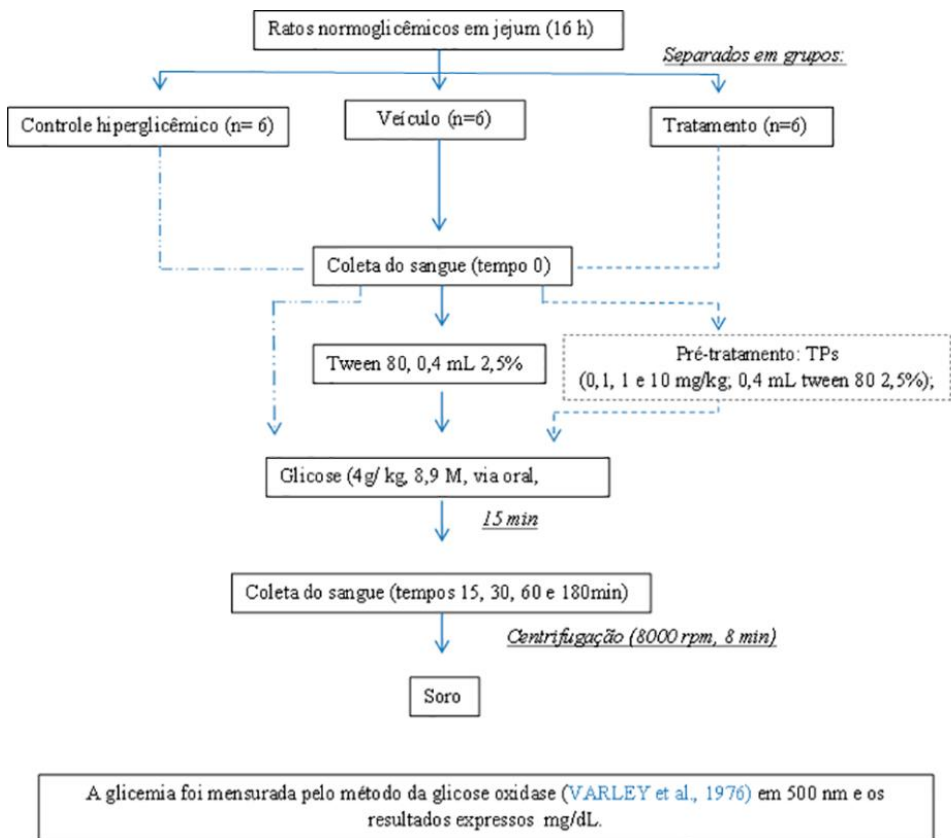
- ✓ Analisar respectivamente a influência do ácido ursólico e trihidroxioleanano (THO) na síntese de mRNA de GLUT4 *in vitro* no músculo esquelético e tecido adiposo de ratos normoglicêmicos;
- ✓ Estudar a influência do ácido betulínico, ursólico e da 1,25 (OH)₂ D₃ na síntese de GLUT4 *in vitro* e *in vivo* no músculo esquelético e do THO *in vitro* em tecido adiposo de ratos normoglicêmicos;
- ✓ Inferir a influência do ácido betulínico, ursólico e da 1,25 (OH)₂ D₃ na translocação de GLUT4 por vias dependentes e/ou independentes de PI3K no músculo esquelético e do trihidroxioleanano no tecido adiposo de ratos normoglicêmicos;
- ✓ Determinar se o efeito do THO na captação de [U-¹⁴C]-2-Deoxi-D-glicose em tecido adiposo é dependente da ativação do GLUT4 mediado pelas proteínas P38 e pP38;
- ✓ Analisar se ácido ursólico estimula a captação de glicose e síntese de GLUT4 por vias independentes de insulina (via cálcio);
- ✓ Verificar o envolvimento de proteínas cinases, como a fosfolipase C (PLC), proteína cinase C (PKC), MAP cinases (MEK-ERK), proteína cinase dependente de cálcio-calmodulina II (PKCam II) no mecanismo de ação de TPs na captação de glicose em tecido muscular esquelético, adiposo e na síntese e/ou translocação do GLUT4;
- ✓ Estudar o envolvimento do processo de fusão vesicular no mecanismo de ação do trihidroxioleanano na translocação do GLUT4 em músculo esquelético e tecido adiposo;

- ✓ Determinar o efeito 3 β -hidroxihopeno e ácido ursólico na secreção de vesículas insulínicas em ilhotas pancreáticas isoladas de rato;
- ✓ Verificar o efeito dos triterpenos pentacíclicos 3 β -hidroxihopeno, fernenodiol e ácido betulínico no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas isoladas de rato;
- ✓ Analisar o mecanismo de ação de 3 β -hidroxihopeno, fernenodiol e ácido betulínico no influxo de cálcio e secreção de insulina, bem como o envolvimento de canais de potássio sensíveis a ATP (K_{ATP}), canais de potássio dependentes de cálcio e canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L (L-CCDV) neste efeito;
- ✓ Determinar se o mecanismo de ação de AB no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas e secreção de insulina é dependente dos canais de cloreto;
- ✓ Estudar o envolvimento e ativação das proteínas cinase A e C no efeito estimulatório de 3 β -hidroxihopeno, fernenodiol e AB no influxo de cálcio e secreção de insulina;
- ✓ Verificar o efeito de AB na secreção estática de insulina;
- ✓ Estudar os efeitos na calcemia e a toxicidade de triterpenos após tratamento *in vivo* em ratos hiperglicêmicos.

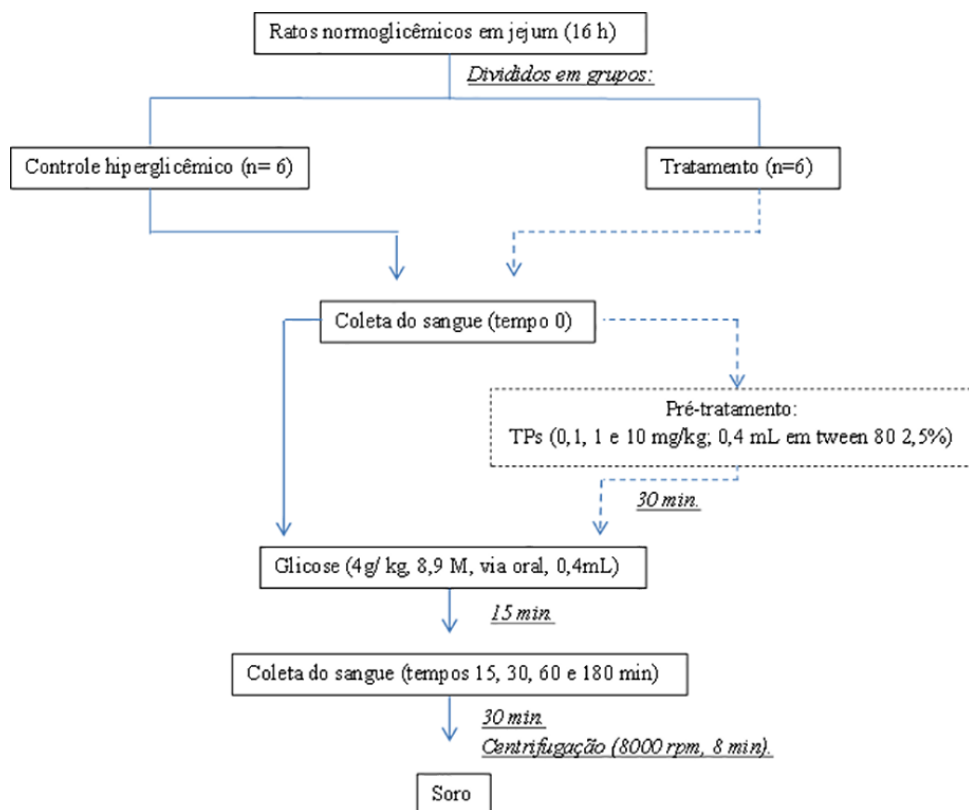
4 MÉTODOS

A metodologia utilizada nesse trabalho está apresentada na forma de fluxograma e descrita em detalhes nos respectivos capítulos.

Fluxograma 1: Teste oral de tolerância à glicose: Todos os animais foram submetidos a jejum de aproximadamente 16 h antes da coleta de sangue, conforme Frederico et al. (2012), e em seguida separados em três grupos: Controle hiperglicêmico (animais que recebem somente glicose – 4 g/kg), Veículo (Tween 80 + Glicose 4 g/kg) e tratamento (TPs em Tween 80 + glicose 4 g/kg). Os tratamentos ocorreram 30 min antes da indução da hiperglicemia e o sangue foi coletado nos períodos de 15, 30, 60 e 180 min após a indução da hiperglicemia. O tempo zero foi considerado a coleta de sangue para a dosagem da glicemia antes de qualquer tratamento. Após obtenção do soro por centrifugação a glicemia foi analisada por meio de reação enzimática com a glicose oxidase e quantificada através de espectrofotometria em 500 nm.

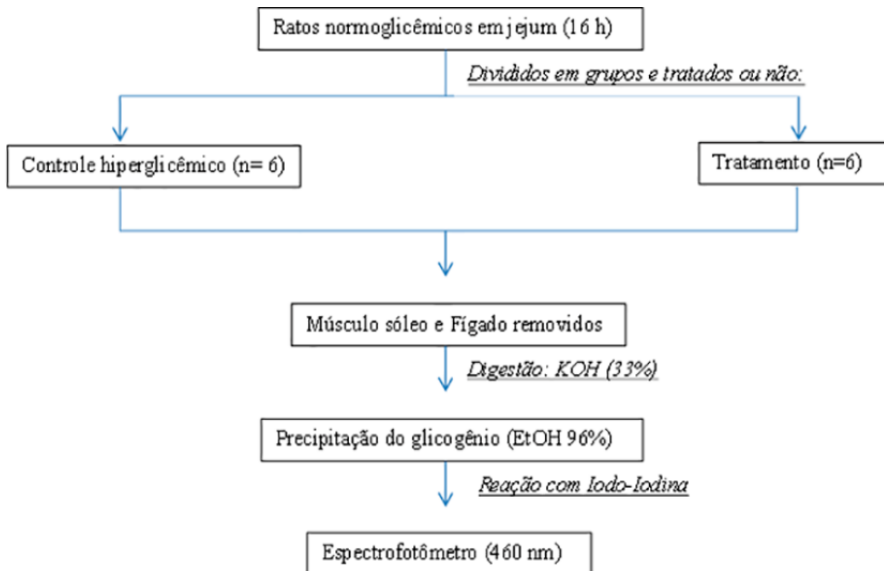


Fluxograma 2: Determinação da insulina e GLP-1 séricos. Todos os animais foram submetidos a jejum, separados em grupos e tratados conforme procedimentos do teste oral de tolerância à glicose. O sangue foi coletado nos períodos de 15, 30 e 60 e 180 min após a indução da hiperglicemia. O tempo zero foi coletado antes e qualquer tratamento. Após obtenção do soro por centrifugação, a insulina e GLP-1 séricos foram analisados por meio de imunoteste de ELISA de acordo com instruções do fabricante (CAZAROLLI et al. 2009).



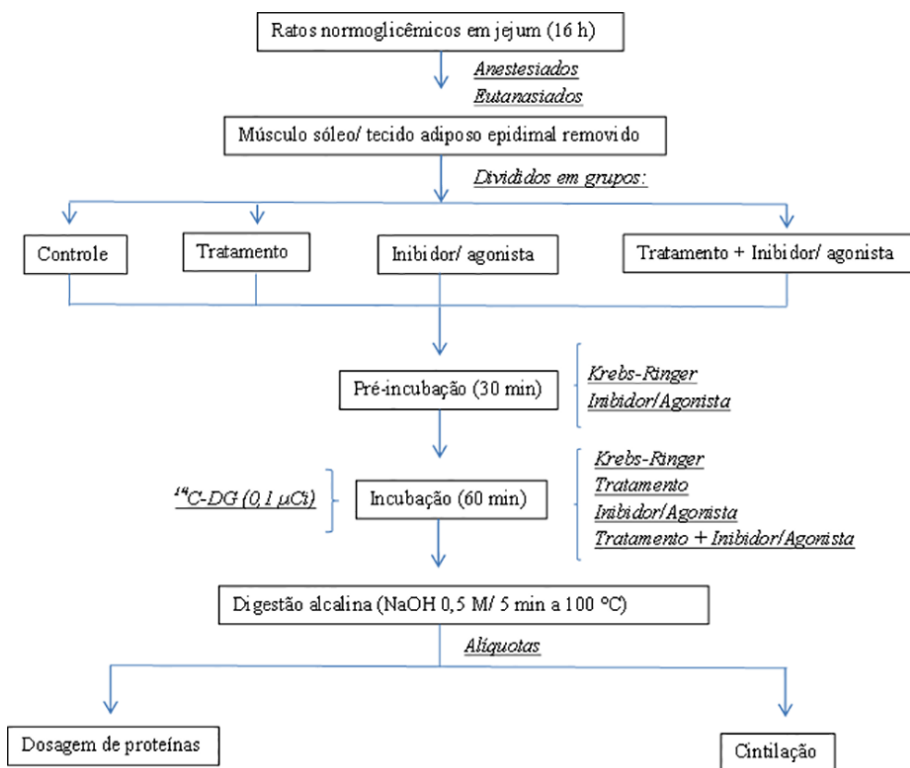
A insulina e GLP-1 séricos foram mensurados por meio de ELISA, determinadas por meio de interpolação em curva padrão e os resultados expressos como ng/mL e pM, respectivamente.

Fluxograma 3: Determinação do conteúdo de glicogênio hepático e muscular. Todos os animais foram submetidos a jejum de aproximadamente 16 h e em seguida separados em dois grupos: Controle hiperglicêmico (animais que recebem somente glicose – 4 g/kg) e Tratamento (TPs em Tween 80 + glicose 4 g/kg). Os animais foram eutanasiados 180 min após a indução da hiperglicemia e o glicogênio extraído e dosado segundo Krisman (1962). O músculo sóleo e fígado foram removidos, submetidos a digestão alcalina em KOH e em seguida adicionado etanol para a precipitação do glicogênio em banho de gelo. O glicogênio obtido foi analisado por meio de reação com solução de cloreto de cálcio saturado contendo iodo-iodina e os resultados expressos como mg de glicogênio/ g de tecido (ZANATTA et al. 2008).



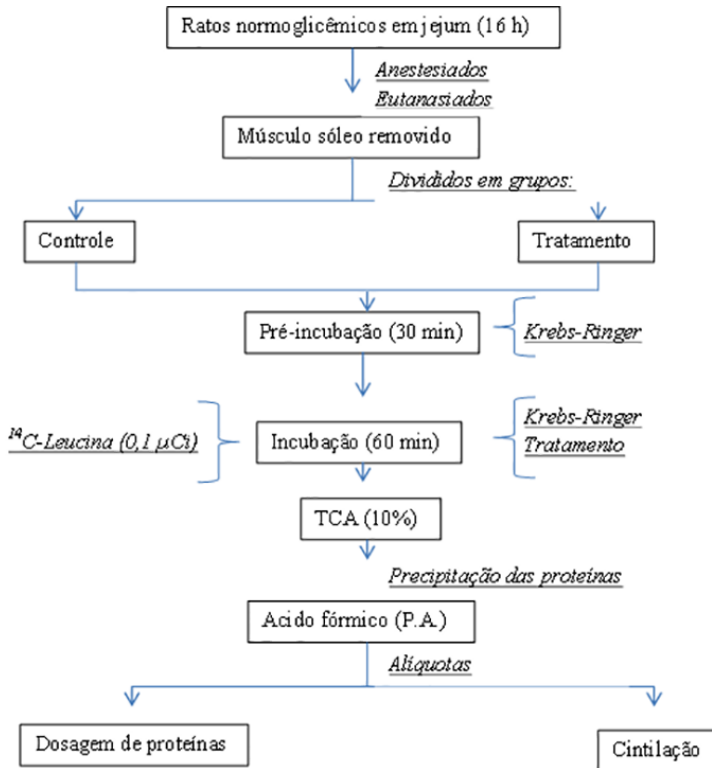
Os resultados foram mensurados por meio de interpolação em curva padrão de glicogênio e expressos como mg de glicogênio / g de tecido.

Fluxograma 4: Captação de $[U-^{14}C]$ -2-Deoxi-D-glicose no músculo sóleo e tecido adiposo epididmal. Os animais foram submetidos a jejum de aproximadamente 16 h, o músculo sóleo e o tecido adiposo epididmal foram dissecados, divididos nos grupos Controle (somente KRb), Tratamento (KRb + TP_s/1,25-D₃), Inibidor/agonista (KRb + Inibidor/agonista) e Tratamento + Inibidor/agonista e pré-incubados (30 min, 37°C, O₂: CO₂, 95:5, v/v) em presença somente de tampão KRb. Posteriormente os tecidos foram incubados nas mesmas condições e na presença de KRb contendo 0,1 μ Ci/mL de $[U-^{14}C]$ -2-Deoxi-D-glicose acrescido dos tratamentos e/ou inibidores/agonistas por 1 h. Os tecidos foram processados de acordo com Cazarolli et al. (2009), sendo submetidos a digestão alcalina em NaOH e em seguida efetuada dosagem de proteínas (LOWRY et al. 1951) e a medida da radioatividade por cintilação líquida.



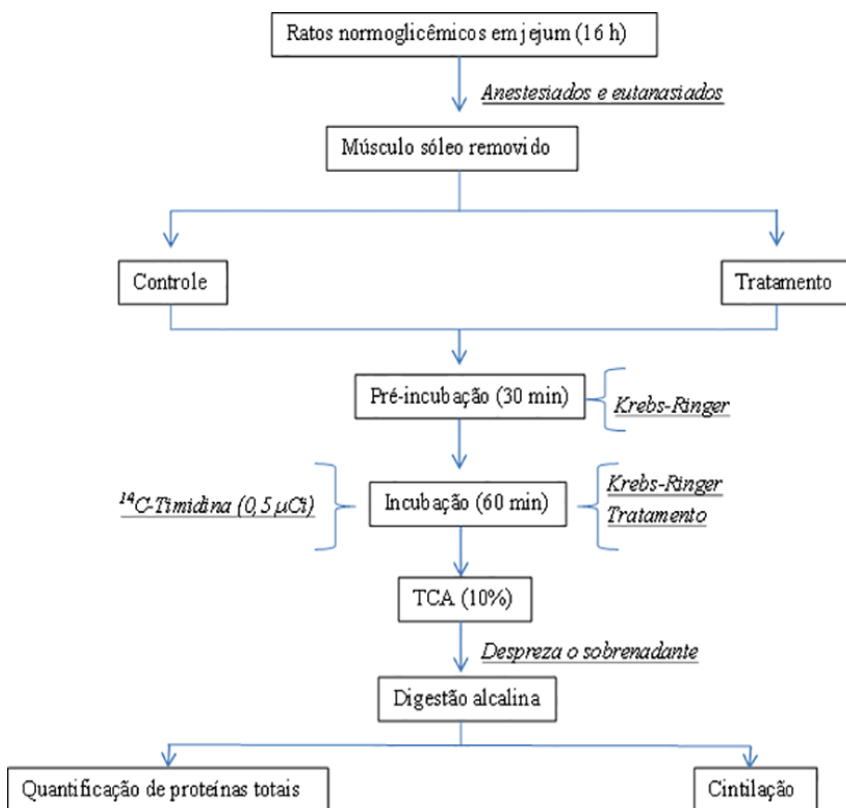
Os resultados da captação de ^{14}C -D-glicose são expressos em nM de unidade de glicose/ μ g de proteína

Fluxograma 5: Incorporação de L-[U- 14 C]-Leucina em proteínas no músculo sóleo. Os animais foram submetidos a jejum de aproximadamente 16 h, o músculo sóleo foi dissecado, dividido nos grupos Controle (somente KRb) e Tratamento (KRb + TPs) e pré-incubados (30 min, 37°C, O₂: CO₂, 95:5, v/v) na presença somente de tampão KRb. Posteriormente os tecidos foram incubados nas mesmas condições e em presença de KRb contendo 0,1 μ Ci/mL de 14 C-leucina acrescido ou não dos tratamentos por h. Os tecidos foram processados de acordo com Menegaz et al. (2006).

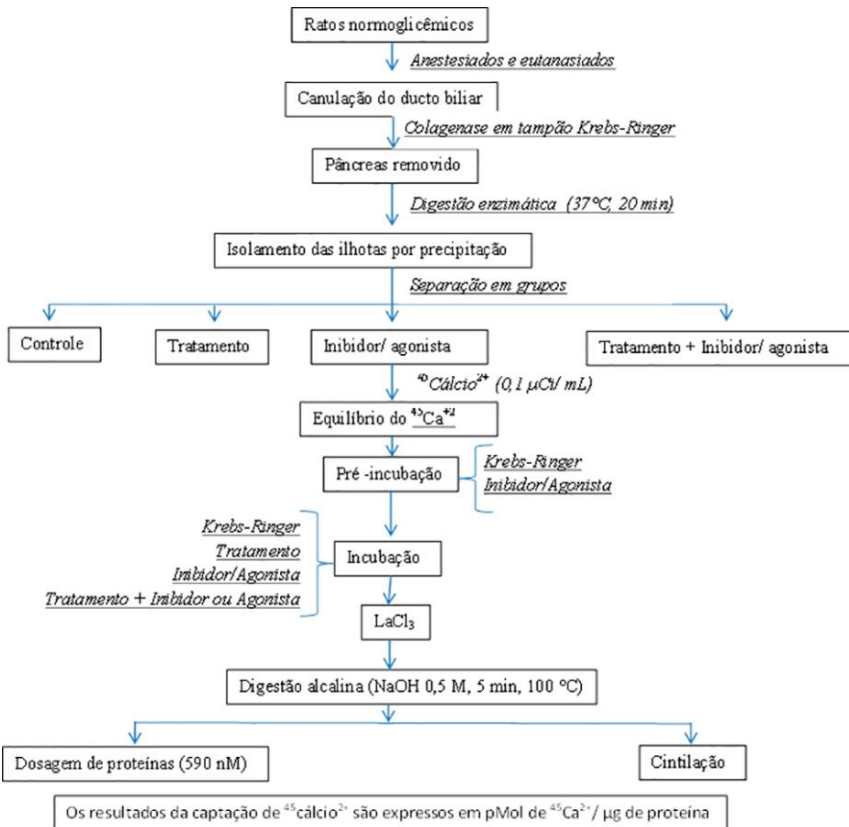


Os resultados da captação de 14 C-Leucina são expressos em nM de unidade de glicose/ μ g de proteína

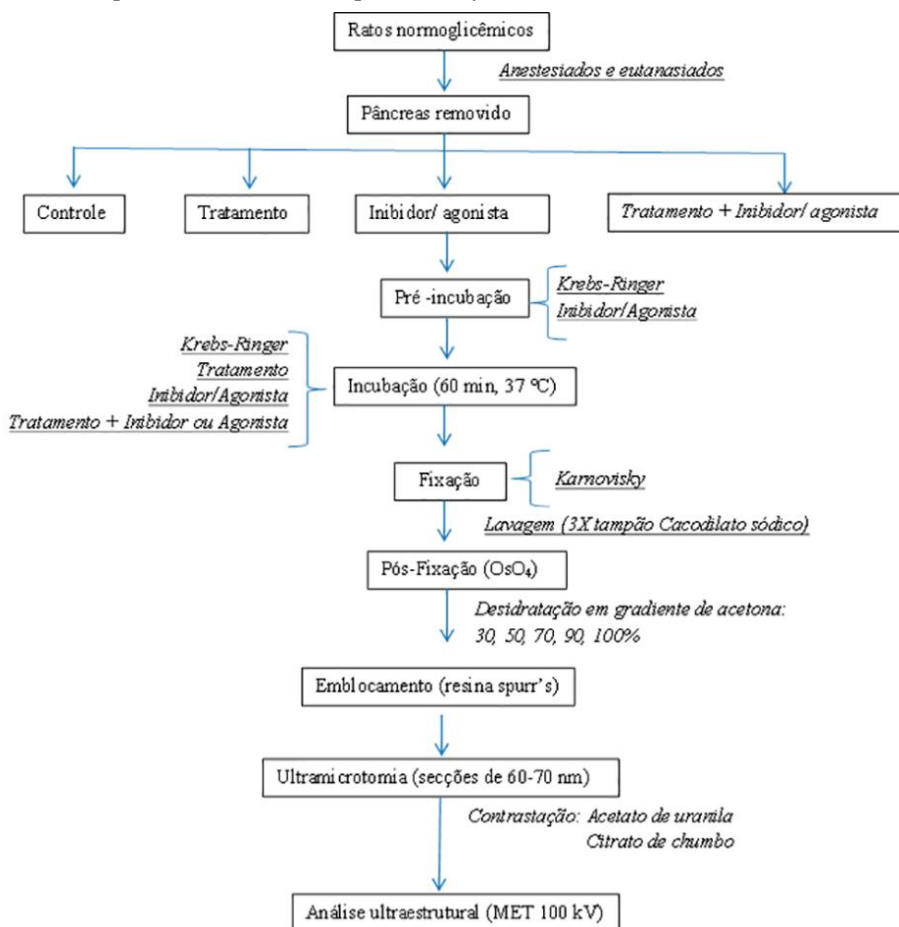
Fluxograma 6: Incorporação de [Metil- ^{14}C]-Timidina no DNA no músculo sóleo. Os animais foram submetidos a jejum de aproximadamente 16 h, o músculo sóleo foi dissecado, dividido nos grupos Controle (somente KRb) e Tratamento (KRb + TPs) e pré-incubados (30 min, 37°C , O_2 : CO_2 , 95:5, v/v) na presença somente de tampão KRb. Posteriormente os tecidos foram incubados nas mesmas condições e na presença de KRb contendo ^{14}C -timidina $0,5 \mu\text{Ci}$ acrescido ou não dos tratamentos por 1h. Os tecidos foram processados de acordo com Zanatta et al. (2013), com adição de TCA (10%) seguido por digestão alcalina em NaOH (0,5 M).



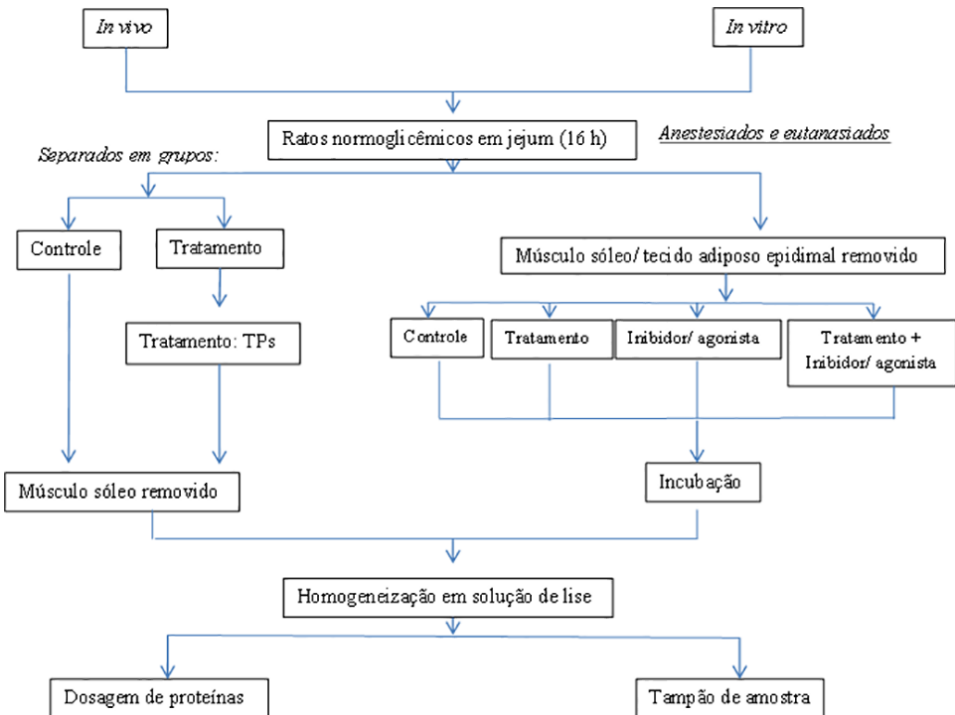
Fluxograma 7: Isolamento de ilhotas pancreáticas e influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas. Ratos normoglicêmicos foram anestesiados, o ducto biliar acessado e canulado com tampão com collagenase (0,3 mg/mL em KRb). O pâncreas foi removido e submetido a digestão enzimática e as ilhotas de Langerhans foram isoladas do tecido exócrino por meio de precipitação, separadas em grupos e submetidas ao equilíbrio do cálcio em tampão KRb contendo $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (37°C, 1 h). Os inibidores e/ou agonistas foram adicionados 15 min antes de qualquer tratamento (pré-incubação). Após incubação em presença dos tratamentos a reação foi parada por adição de cloreto de lantânio (10 mM). As ilhotas foram submetidas a digestão alcalina e processadas de acordo com Frederico et al. (2012) e Grillo et al. (2005).



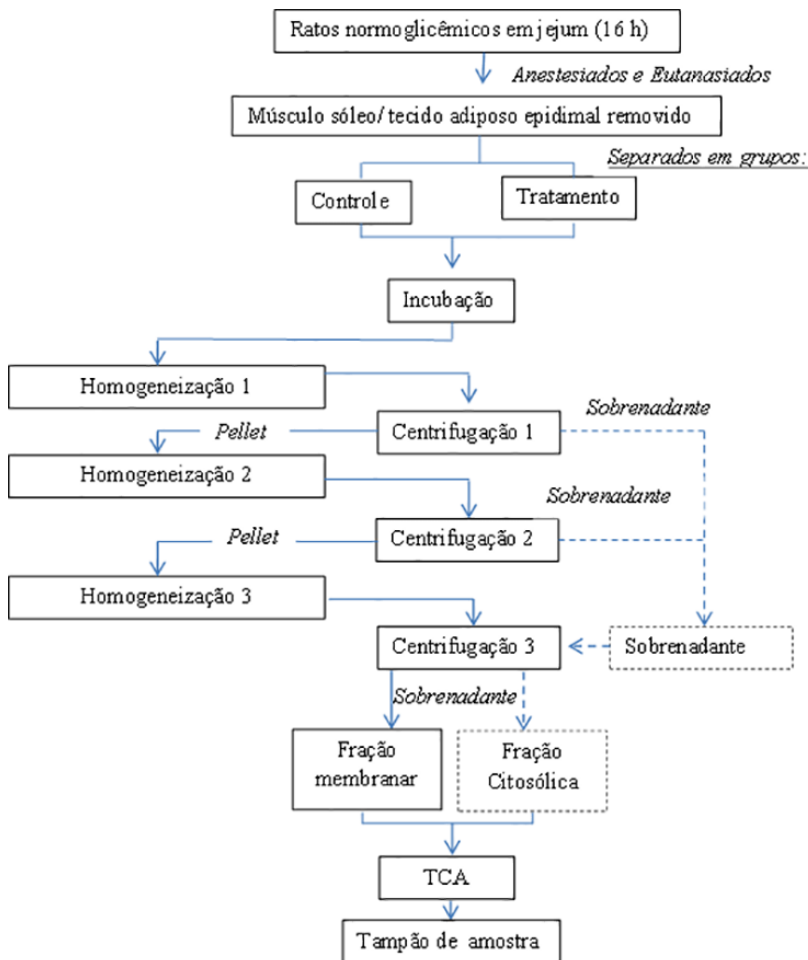
Fluxograma 8: Microscopia eletrônica de transmissão (MET) em pâncreas. Amostras de pâncreas de rato foram incubados *in vitro* na presença de AU (1 nM) durante 5 ou 20 min, fixados por 18 horas com 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) mais 0,2 M de sacarose e o material foi pós-fixado com tetróxido de ósmio a 1% durante 3 h. Após desidratação em gradiente de acetona e embebidos em resina *Spurr*, as seções finas foram coradas com acetato de uranila seguido por citrato de chumbo de acordo com Reynolds (1963). As amostras foram examinadas por MET no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME, UFSC, Brasil). Foi avaliada a relação de vesículas citoplasmáticas de insulina por células β .



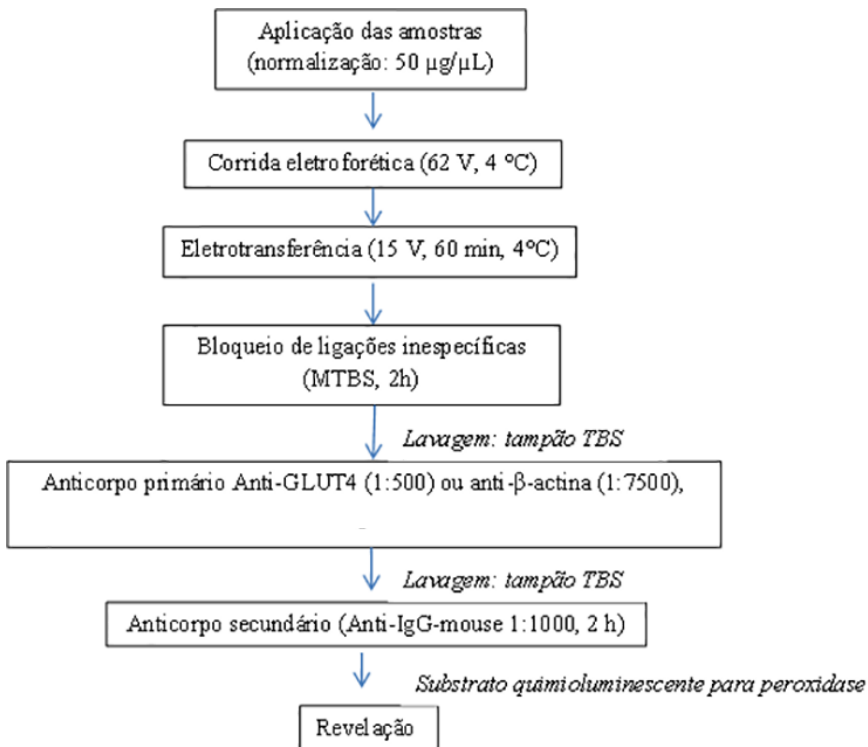
Fluxograma 9: Isolamento de fração total de músculo esquelético e tecido adiposo para Western Blot. Para análise da ação após tratamento *in vivo* com os triterpenos testados na síntese e/ ou translocação de GLUT4, ratos normoglicêmicos submetidos a jejum de 16 h foram tratados ou não (controle) e após 180 min o músculo sóleo removido. Para análise da ação *in vitro* dos triterpenos na síntese e/ ou translocação de GLUT4, o músculo sóleo e/ou tecido adiposo de ratos normoglicêmicos submetidos a jejum de 16 h foram dissecados, separados em grupos e incubados (em KRb pH 7,5, 1 h 30 min., a 37 °C em atmosfera de O₂: CO₂, 95:5, v/v) em presença ou não (controle) de tratamento, inibidores/agonistas e ou tratamentos + inibidores/ agonistas. Os tecidos de ambos procedimentos (*in vivo* e *in vitro*) foram processados em solução contendo EDTA (2 mM), Tris-HCl (50 mM, pH 6.8), SDS (4% p/v), e alíquotas foram separadas para a quantificação de proteínas totais e para solubilização em tampão contendo glicerol (40%), mercaptoetanol (5%) e Tris-HCl (50 mM).



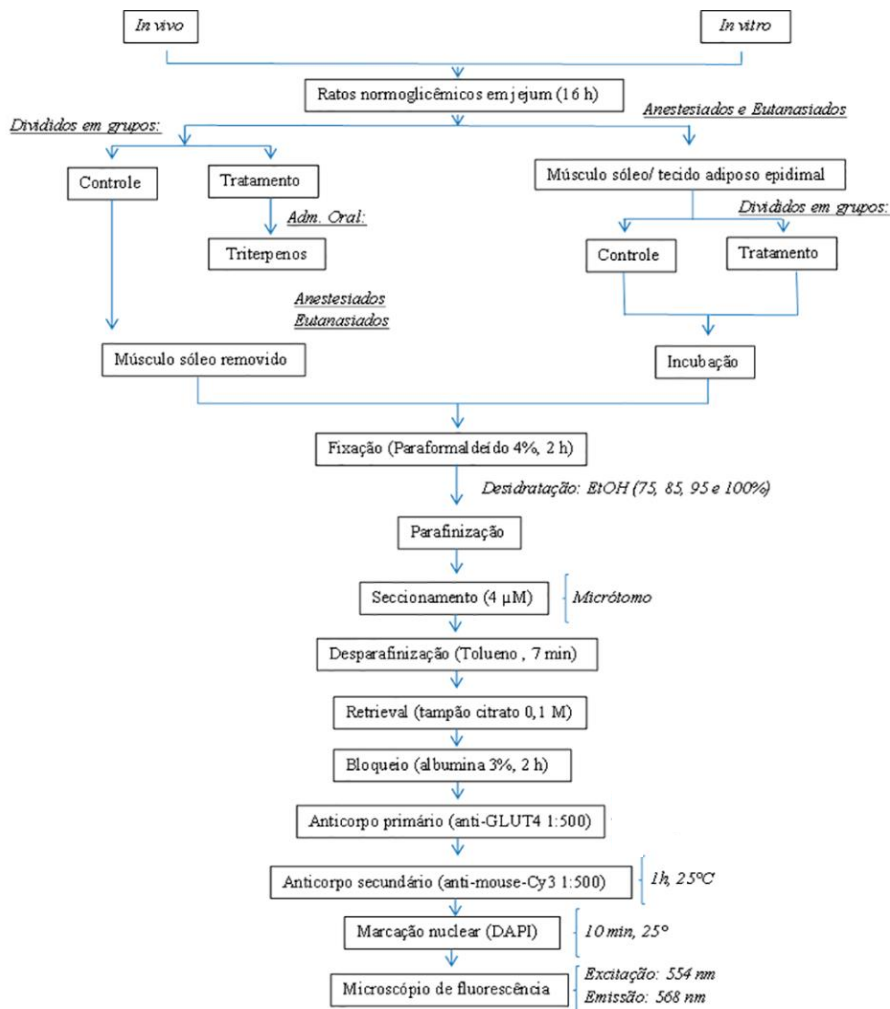
Fluxograma 10: Isolamento da fração citosólica e membranas de músculo esquelético e tecido adiposo para Western Blot. O músculo sóleo e/ou tecido adiposo de ratos em jejum foram dissecados, separados em grupos e incubados (em KRb por 90 min a 37 °C em atmosfera de O₂: CO₂, 95:5, v/v) em presença ou não de tratamento. Após incubação, os tecidos foram homogeneizados em tampão A1 (contendo triton X-100 0,1%), centrifugados (1000 xg por 10 min a 4 °C), o sobrenadante transferido a outro frasco e o sedimentado foi resuspenso em tampão A2 (sem triton X-100) e novamente centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante foi transferido para outro frasco e o sedimentado foi resuspenso em tampão A3 (contendo triton X-100 1%) e ambos centrifugados (16000 x g por 20 min a 4°C). Os sobrenadantes (fração citosólica e membranas) foram submetidos à precipitação protéica com TCA, desnaturação com SDS e solubilização em tampão de amostra (NISHIUMI; ASHIDA, 2007).



Fluxograma 11: Eletroforese e Western Blot. As amostras protéicas da fração total, membranar e citosólica obtidas de tecido muscular esquelético e adiposo foram aplicadas em concentrações iguais de proteína (50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) em gel de poliacrilamida (12%) em um sistema eletroforético descontínuo (LAEMMLI, 1970) e aplicada uma tensão elétrica de 62 V para mobilidade e separação protéica. Ao término da eletroforese, o gel foi submetido a eletrotransferência das proteínas à membrana de nitrocelulose por 1 h em sistema com tampão composto por Trizma (48 mM), glicina (39 mM), metanol (20%) e SDS (0,25%). Em seguida a membrana foi submetida a bloqueio de ligações inespecíficas (2 h, 4°C) em solução contendo 5% de leite desnatado (MTBS). Após bloqueio, a membrana foi incubada em presença de anti-GLUT4 ou anti- β -actina (em albumina 5 %, por 12 h a 4°C), lavagem com tampão contendo NaCl (0,5 M) e Trizma (20 mM) (TBS) e incubada em presença de anticorpo secundário (anti-IgG-mouse) por 2 h a 25°C. As bandas imunoreativas foram visualizadas após reação com solução quimioluminescente (ECL) e reveladas por meio de autoradiogramas e/ou fotodocumentador (Bio-Rad) foram utilizados para revelação das membranas (ZANATTA et al. 2011). A densidade das bandas foi quantificada utilizando o software OptiQuant version 02.00.



Fluxograma 12: Imunofluorescência para tecido muscular esquelético e adiposo. O músculo sóleo e/ou tecido adiposo de ratos em jejum (16 h) tratados com triterpenos ou incubados em presença dos triterpenos foram submetidos a análise de imunofluorescência após parafinização e incubação em presença de anti-GLUT4 e anticorpo secundário conjugado a Cy3. Os núcleos foram marcados com DAPI e as lâminas analisadas em microscópio de fluorescência.



As figuras obtidas foram analisadas através do software Fluoview 100

5 RESULTADOS

Os resultados do presente estudo estão divididos na forma de capítulos, e apresentados no formato de artigos, seguindo a distribuição abaixo:

5.1 Capítulo1: Efeitos insulínomiméticos

- O ácido betulínico e a 1,25(OH)₂ vitamina D₃ compartilham a transdução de sinais intracelulares na homeostase da glicose no músculo sóleo.

- O mecanismo de ação do ácido ursólico como secretagogo de insulina e insulínomimético em músculo esquelético é dependente de vias mediadas por cálcio e de cinases

- Sinalização celular do 2 α ,3 β ,23-trihidroxiolcano-12-eno na translocação do GLUT4 no tecido adiposo

5.2 Capítulo2 : Ação secretagoga

- O efeito agudo de 3 β -hidroxihop-22(29)eno na secreção insulínica para a homeostase da glicose é mediado por GLP-1, canais de potássio e canais de cálcio.

- Fern-9(11)-eno-2 α ,3 β -diol estimula a secreção insulínica através do fechamento de canais K_{ATP} e da ativação de canais de cálcio em condição hiperglicêmica

- Ácido betulínico apresenta efeito insulinosecretor dependente da modulação de canais de K_{ATP} e de cloreto.

Capítulo 1: Efeitos insulínomiméticos

Estudo do efeito e do mecanismo de ação de triterpenos na captação periférica de glicose: Músculo esquelético e tecido adiposo

5.1.1 Ácido betulínico, ursólico e trihidroxioleanano

O ácido betulínico (AB) [ácido 3 β -hidroxi-lup-20(29)-en-28-oico] é um triterpeno pentacíclico que ocorre naturalmente na natureza. Ele pode ser abundantemente extraído da casca de árvores como a Bétula (*Betula alba*) e do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) por meio de extração com solventes clorados (como o clorofórmio, para triterpenos agliconas) ou com o metanol (para ambos aglicona e heterosídeos) (FULDA, 2010; CICHEWICZ; KOUZI, 2004). O AB pertence à classe dos triterpenos lupanos, é diretamente derivado da betulina e possui características de ácido carboxílico no C28 (CICHEWICZ; KOUZI, 2004). Dependendo do material vegetal de prospecção, o lupeol, a betulina e o AB são os principais componentes do extrato seco de plantas (LASZCZYK, 2009). Diversas atividades biológicas já foram caracterizadas para o AB, possibilitando assim a aplicação de cerca de cinquenta patentes em âmbitos como o tratamento do câncer, infecção viral e perda de cabelo (CICHEWICZ; KOUZI, 2004).

O AB é um dos mais efetivos componentes da medicina tradicional chinesa, sendo suas ações farmacológicas associadas a, dentre outros, sua estrutura contendo um substituinte polar no carbono 3 (YANG et al. 2012). Dessa forma, verifica-se baixa ação citotóxica para esse composto em células humanas como astrócitos, fibroblastos e linfoblastos de sangue periférico, e é atualmente descrito como um inibidor altamente seletivo de crescimento de melanoma humano (YANG et al., 2012) através da estimulação de vias de apoptose mitocondrial (principalmente em células cancerosas) por meio da permeabilização da membrana externa da mitocôndria e liberação de citocromo c (FULDA, 2010). Também são descritas ações antivirais (AIKEN; CHEN, 2005), anti-inflamatória (através da modulação da ativação do NF-KB, por meio de inibição do TNF- α) (CSUK et al. 2013; GAUTAM; JACHAK, 2009) e antiglicativa (YIN, 2012), o que remete a uma possível ação antidiabética deste triterpeno.

O ácido ursólico (AU) é um triterpeno pentacíclico carboxílico membro da família dos cicloesqualenóides e encontrado na forma de ácido livre ou como aglicona (saponina) (CARDENAS; QUESADA; MEDINA, 2004; SHANMUGAM et al. 2013). Este é um isômero do ácido oleanólico (AO) e apresentam similaridades estruturais como a presença de um grupo metil no carbono dezanove no AU e no carbono vinte do AO no anel E. Ambos já foram considerados biologicamente inativos, contudo, estudos atuais mostram que estes apresentam fortes atividades biológicas e baixa toxicidade, o que contribui para a utilização

farmacológica (OVESNA; KOZICS; SLAMENOV, 2006; WANG et al. 2010; JANICSÁK et al. 2006).

Cardenas, Quesada e Medina (2004) descrevem que o AU está significativamente presente na dieta humana. O AU é o principal composto encontrado na casca e folhas da maçã e chega a uma taxa de presença em torno de 32% do total. Ele é ubiquamente presente no reino vegetal e, principalmente, em diversas plantas conhecidas como medicinais (FRIGHETTO et al. 2008). Dessa forma, muitas propriedades biológicas são atribuídas ao AU, como ação antiinflamatória, regulando a expressão de enzimas como as lipoxigenases, cicloxigenases e óxido nítrico sintase induzível (TAKADA et al. 2010), atividade hepatoprotetora e imunomodulatória (CARDENAS; QUESADA; MEDINA, 2004), antitumoral (HSU; YANG; LINB, 1997), antiparasitário (FERREIRA et al. 2013). Ainda que a potencial atividade antidiabética do AU tenha sido descrita (KAZMI et al. 2012), o mecanismo de ação envolvido na homeostasia da glicose ainda não foi elucidado. Sabe-se que o AU possui ação na homeostasia da glicose, reduz a glicemia em indivíduos diabéticos, melhora a tolerância à insulina e à glicose, aumenta a síntese e liberação de insulina (JANG et al. 2009) e inibe a glicação de proteínas (WANG et al. 2010). Contudo, os mecanismos de ação do AU na regulação da homeostasia da glicose nos tecidos dependentes de insulina (músculo esquelético e tecido adiposo), ainda não foram completamente descritos.

O trihidroxioleanano ($2\alpha,3\beta,23$ -trihidroxiolean-12-ene) é um triterpeno da família dos oleananos com três hidroxilações (C2, C3 e C23) e sem o ácido carboxílico comum ao AU e ácido oleanólico em C28). O ácido oleanólico (AO) é o principal representante da família dos triterpenos oleanólicos, sendo conhecido por suas fortes ações biológicas, sendo um dos triterpenos com maior número de pesquisas registradas no PubMed (3.135 publicações citando-o até janeiro de 2015). Seus efeitos descritos na regulação da glicemia e tratamento da diabetes vão desde ação reguladora da sensibilidade à insulina (CAMER et al. 2014) a redução da hiperglicemia pós-prandial (CASTELLANO et al. 2013). Estudos de mecanismo de ação do ácido oleanólico mostram que este favorece a fosforilação de enzimas como PI3K, ativando vias de ação insulínica, assim como pode agir como inibidor de PTP1B (CAMER et al. 2014). O triterpeno trihidroxioleanano é um derivado do AO inédito, sem estudos descritivos sobre suas ações biológicas ou mecanismo de ação na diabetes, o que corrobora a significância do seu estudo. Isto é fortalecido por estudos que mostram que funcionalizações no ácido oleanólico

podem resultar em aumento da sua atividade biológica ou afinidade (SHANMUGAM et al. 2014).

Um efeito antidiabético destes triterpenos, demonstrando o mecanismo de ação ainda não está descrito na literatura. Somando isto às diversas ações biológicas já identificadas intensifica a importância do estudo do efeito antihiperlipidêmico e da elucidação do mecanismo de ação para a seleção e proposta segura de um novo candidato a fármaco para a terapia a diabetes.

5.1.1.1 O ácido betulínico e a 1,25(OH)₂ vitamina D₃ compartilham a transdução de sinais intracelulares na homeostase da glicose no músculo sóleo.

Artigo publicado.

Periódico: International Journal of Biochemistry & Cell Biology. v. 48, p. 18-27, 2014.

Autores: Allisson Jhonatan Gomes Castro, Marisa Jádna Silva Frederico, Luisa Helena Cazarolli, Lizandra Czermainski Bretanha, Luciana de Carvalho Tavares, Ziliani da Silva Buss, Márcio Ferreira Dutra, Ariane Zamoner Pacheco de Souza, Moacir Geraldo Pizzolatti, Fátima Regina Mena Barreto Silva.

O ácido betulínico e a 1,25(OH)₂ vitamina D₃ compartilham a transdução de sinais intracelulares na homeostase da glicose no músculo sóleo.

Allisson Jhonatan Gomes Castro^a, Marisa Jádna Silva Frederico^a, Luisa Helena Cazarolli^b, Lizandra Czermainski Bretanha^c, Luciana de Carvalho Tavares^c, Ziliani da Silva Buss^d, Márcio Ferreira Dutra^e, Ariane Zamoner Pacheco de Souza^a, Moacir Geraldo Pizzolatti^c, Fátima Regina Mena Barreto Silva^a

^aDepartamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.

^bUniversidade Federal da Fronteira Sul, Campus Universitário Laranjeiras do Sul, Laranjeiras do Sul, PR, Brasil.

^cDepartamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.

^dDepartamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.

^eDepartamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.

*Correspondence to: Profa. Dra. Fátima Regina Mena Barreto Silva, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, UFSC. Campus Universitário, Bairro Trindade, Cx Postal 5069, CEP: 88040-970, Florianópolis, SC, Brazil. E-mail: mena.barreto@ufsc.br, Tel.: +55-48.3721.69.12, Fax.: +55-48.3721.96.72.

Resumo

O efeito do ácido betulínico na glicemia e seu mecanismo de ação comparado com a 1,25(OH)₂ vitamina D₃ em músculo de ratos foi investigado. O ácido betulínico melhorou a glicemia, induziu a secreção de insulina e aumentou o conteúdo de glicogênio e captação de glicose em tecido muscular. Adicionalmente, a integridade citoesquelética e da via da PI3K são necessários para a ação estimulatória do ácido betulínico na captação de glicose. O efeito genômico foi aparente, uma vez que cicloheximida e PD98059 anularam o efeito estimulatório do ácido betulínico na captação de glicose. Apesar deste composto não modificar a transcrição de DNA, a tradução protéica foi significativamente melhorada. Também, o ácido betulínico aumentou o conteúdo de GLUT4 e sua translocação foi corroborada pela localização do GLUT4 na membrana plasmática (após 180 min). O efeito da 1,25(OH)₂ vitamina D₃ na captação de glicose não é mediado por uma via dependente de PI3K e atividade de microtúbulos. Em contraste, a atividade nuclear da 1,25(OH)₂ vitamina D₃ é necessária para conduzir à captação de glicose. O aumento na transcrição de DNA e conteúdo do GLUT4 são evidências de um mecanismo pelo qual a 1,25(OH)₂ vitamina D₃ contribui para a glicemia. Em conclusão, o ácido betulínico possui ação secretagoga de insulina e insulinomimética via PI3K, MAPK e tradução geral de RNA, e parcialmente divide a via genômica com 1,25(OH)₂ vitamina D₃ para aumentar o GLUT4 total. Em resumo, o ácido betulínico regula a glicemia através da via de sinalização clássica da insulina, estimulando a síntese e translocação de GLUT4. Em adição, o ácido betulínico não causa hipercalcemia, o que é muito importante na perspectiva farmacológica deste composto.

Palavras-chave: Triterpenos; *Rosmarinus officinalis*; Ácido betulínico; glicemia; GLUT4; 1,25-D₃.

1. Introdução

A diabetes melito é caracterizada pela hiperglicemia crônica resultante de defeitos na ação e/ou secreção de insulina (American Diabetes Association, 2008). Produtos naturais identificados como antihiperglicêmicos ou hipoglicemiantes são hábeis em reduzir a glicemia em modelos experimentais animal (Cazarolli et al., 2009) e em humanos (Klein et al., 2011). Os triterpenóides, um grande e estruturalmente diverso grupo de compostos com atividades biológicas bem caracterizadas, incluem os esteróis, esteróides e saponinas. Milhares de estruturas e novos derivados são descritos (Connolly and Hill, 2000; Xu et al., 2004; Jäger et al., 2009). Triterpenos pentacíclicos, que incluem a família dos lupanos, oleananos e ursanos, estão presentes em muitas plantas. O ácido 3β -hidroxi-lup-20(29)-en-28-oico (ácido betulínico (AB)) é um triterpeno pentacíclico membro da classe dos lupanos. Ele induz a inibição de enzimas relacionadas com a absorção e metabolismo de carboidratos e lipídeos (Xu et al., 2004; Jäger et al., 2009). Também, o AB é hábil em inibir a fosforilase do glicogênio e a proteína tirosina fosfatase 1B e aumenta a secreção de insulina e leptina (Wen et al., 2008; Choi et al., 2009; Melo et al., 2009). Assim como os triterpenóides derivados do squaleno ou de precursores relacionados acíclicos de 30 carbonos, outros importantes esteróides e esteróis derivados de plantas que dividem estes precursores também aparentam influenciar o metabolismo dos carboidratos (Kajikawa et al., 1999; Gupta et al., 2011). Entre as mais importantes substâncias sintetizadas do esqueleto em plantas e animais está a vitamina D_3 e o metabólito ativo, a $1\alpha,25$ dihidroxivitamina D_3 ($1,25-D_3$). É bastante relatado que a $1,25-D_3$ regula a homeostase do cálcio, influencia o crescimento e diferenciação celular, secreção hormonal, metabolismo esterol e protege contra a resistência insulínica, sensibilidade à insulina e glicemia (Billaudel et al., 1990; Raghuramulu et al., 1992; Mathieu and Gysemans, 2006; Teegarden and Donkin, 2009; Dirks-Naylor and Lennon-Edwards, 2011).

O AB e $1,25-D_3$ são considerados antidiabéticos uma vez que melhoram a glicemia. Contudo, o efeito hipercalcêmico da $1,25-D_3$ é um dos mais significantes aspectos fisiológicos que necessitam ser resolvido antes de uma terapia sistêmica com a $1,25-D_3$ ser disponibilizada para pacientes (De Luca, 2004). Nesta perspectiva, o AB, que divide um precursor comum com a $1,25-D_3$, é apresentado como uma potencial alternativa, devido a características estruturais, para solucionar o problema de efeitos calcêmicos *in vivo*. Pouco está descrito dos mecanismos de ação do envolvimento do AB na sensibilidade à insulina e captação de glicose. Neste contexto, examinamos o potencial efeito

antihiperlicêmico do AB. Em paralelo, o AB e a 1,25-D₃ foram estudados no músculo sóleo para a análise do envolvimento nas vias de sinalização da insulina na captação de glicose.

2. Materiais e Métodos

2.1 Materiais

1 α ,25-dihidroxitamina D₃, 2-(2-amino-3-metoxifenil)-4H-1-benzopirano-4-ona (PD 98059), colchicina, wortmannin, cicloheximida, acrilamida e bis-acrilamida, anti- β -actina de camundongo e o anti-IgG conjugado a Cy3 de camundongo foram obtidos da Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Anti-GLUT4 (sc-53566) foi obtido da Santa Cruz Biotechnology (California, USA). O anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase, o substrato quimioluminescente da peroxidase Immobilon™ Western (HRP) e o kit ELISA para determinação quantitativa de insulina (catálogo no. EZRMI-13K) foram obtidos da Millipore (St Charles, MO; Temecula, California, USA). O kit teste para cálcio sérico (cálcio ASX, REF 12.002) foi obtido da Biotécnica Ind. Com. LTDA (MG, Brazil) e o kit teste para a LDH sérica (Ref: 860) foi obtido da Labtest (MG, Brasil). [U-¹⁴C]-2-Deoxi-D-glicose, atividade específica de 9,25 GBq/mmol, [Metil-¹⁴C]-Timidina, atividade específica de 1,7464 GBq/mmol, L-[U-¹⁴C]-Leucina, atividade específica de 11,4 GBq/mmo foram obtidos da Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences (Boston, MA, USA).

2.2 Animais

Ratos Wistar machos (190 – 220 g) foram mantidos em uma sala no biotério setorial com ar condicionado (21 \pm 2°C) e iluminação controlada (ciclo de luz/escuro de 12 h/12 h). Todos os animais foram mantidos com comida (Nuvital, Nuvilab CR1, Curitiba, PR, Brasil) e água disponível à vontade. Os ratos submetidos ao jejum de 16 h tinham livre acesso à água. Todos os animais foram monitorados e mantidos em acordo com as recomendações do Comitê de Ética Local do Uso de Animais – UFSC (CEUA/PP00179).

2.3 Isolamento de AB e caracterização química

Rosmarinus officinalis L. foi coletada em Santo Amaro da Imperatriz, estado de Santa Catarina, Brasil, e identificado pelo Dr. Daniel de Barcelos Falkenberg (Departamento de Botânica, UFSC). Um voucher do espécime (No. 34,918) foi depositado no herbário do departamento de Botânica, UFSC, Santa Catarina, Brasil. O extrato hidroalcolico de partes aéreas do *R. officinalis* L. foi obtido como descrito

por Machado et al. (2009). O AB foi identificado por análise em IR, MS e NMR.

2.4 Tolerância oral à glicose

Ratos submetidos a jejum foram divididos em três grupos de seis animais: Grupo I, ratos hiperglicêmicos que receberam glicose (4 g/kg; 8,9 M); Grupo II, ratos hiperglicêmicos que receberam a solução veículo (Tween 80 2,5%); e Grupo III, ratos hiperglicêmicos que receberam o AB nas doses de 0,1; 1 e 10 mg/kg. A glicemia foi mensurada antes de qualquer tratamento (tempo zero). Em seguida, os ratos receberam o tratamento (veículo ou AB) e após 30 min foram submetidos a uma sobrecarga de glicose. A curva de tolerância à glicose foi iniciada imediatamente após a sobrecarga de glicose e a glicemia foi mensurada no período de 15, 30, 60 e 180 min. Todos os tratamentos foram administrados por gavagem. O sangue foi coletado para determinação da glicemia pelo método da glicose oxidase (Varley et al., 1976).

2.5 Insulina sérica

A insulina sérica foi mensurada por meio de ELISA de acordo com instruções do fabricante. A faixa de valores detectado pelo kit de ensaio foi de 0,2 ng/mL a 10 ng/mL. Os coeficientes de variação intra- e inter-ensaio para a insulina foram de 3,22 e 6,95, respectivamente, com uma sensibilidade de 0,2 ng/mL. A concentração sérica de insulina foi estimada pela média das medidas em 450 nm com um leitor de placa ELISA (Organon Teknika, Roseland, NJ, USA) por interpolação da curva padrão. As amostras foram analisadas em duplicata e os resultados expressos como ng de insulina sérica por mL⁻¹ (Cazarolli et al., 2009).

2.6 Conteúdo de glicogênio

O músculo sóleo de ratos hiperglicêmicos e hiperglicêmicos tratados com AB (0,1; 1 e 10 mg/kg) foi removido e o conteúdo de glicogênio foi mensurado após 180 min de tratamento. O glicogênio foi isolado do tecido como descrito por Krisman (1962) e os resultados foram expressos como mg de glicogênio/g de tecido (Zanatta et al., 2008).

2.7 Estudos de captação de glicose em músculo

Para a captação de [U-¹⁴C]-2-Deoxi-D-glicose, o músculo sóleo de ratos euglicêmicos submetidos a jejum foi usado. Fatias de músculo foram distribuídas (alternadamente esquerda e direita) entre o grupo basal e tratado. Os músculos foram dissecados, pesados, pré-incubados (30 min) e então incubados (60 min) a 37°C em tampão Krebs Ringer-

bicarbonato (KRb) com uma composição de NaCl (122 mM), KCl (3 mM), MgSO₄ (1,2 mM), CaCl₂ (1,3 mM), KH₂PO₄ (0,4 mM), e NaHCO₃ (25 mM) em atmosfera de O₂/CO₂ (95%: 5%, v/v) até o pH 7,4. O AB (1 μM; 1 nM e 0,1 nM) e 1,25-D₃ (1 nM e 0,001 pM) foram adicionados ao meio com/sem wortmannin (100 nM), PD98059 (50 μM), cicloheximida (0,35 mM) ou colchicina (1 μM). A ¹⁴C-deoxiglicose (0,1 μCi/mL) foi adicionada a cada amostra durante a incubação. As amostras foram processadas de acordo com Cazarolli et al. (2009). Para a quantificação da proteína total foi usado o método de Lowry et al. (1951). Os resultados da captação de glicose foram expressos como nmol de unidades de glicose/ mg de proteína.

2.8 Estudos de incorporação de ¹⁴C-timidina

Para a incorporação de [Metil-¹⁴C]-Timidina ao DNA, fatias de músculo foram distribuídas (alternadamente esquerda e direita) entre os grupos basal e tratado. Os músculos foram pré-incubados e incubados a 37°C em tampão KRb com O₂/CO₂ (95%: 5%, v/v), em pH 7,4. O AB ou a 1,25-D₃ (1 nM) foram adicionados ao meio de pré-incubação (30 min) e incubação (60 min). A ¹⁴C-timidina (0,5 μCi/mL) foi adicionada a cada amostra durante a incubação. Após incubação, os músculos foram processados de acordo com Zanatta et al. (2013). Os resultados foram expressos como cpm/μg de proteína.

2.9 Síntese Protéica

Para síntese protéica, a incorporação de L-[U-¹⁴C]-Leucina (0,1 μCi/mL) em proteínas gerais foi mensurada. Fatias de músculo foram distribuídas (alternadamente esquerda e direita) entre o basal e o grupo tratado. Os músculos foram pré-incubados (30 min) e incubados (60 min) a 37°C em tampão KRb com O₂/CO₂ (95%: 5%, v/v), em pH 7,4, com/sem AB 1 nM. A L-[U-¹⁴C]-Leucina (0,1 μCi/mL) foi adicionada a cada amostra durante o período de incubação. No fim da incubação, as amostras foram processadas e a síntese de proteínas foi expressa como cpm/μg de proteína de acordo com Menegaz et al. (2006).

2.10 Eletroforese em gel de poliacrilamida e análise de imunoblotting

Para o homogeneizado integral de músculo, o músculo sóleo de ratos foi incubado por 105 min a 37°C em KRb com ou sem AB (1 nM), 1,25-D₃ (1 nM) ou insulina (10 nM). Os músculos foram incubados também com AB em presença de wortmannin (100 nM) ou cicloheximida (0,35 mM) e 1,25-D₃ em presença de cicloheximida (0,35 mM). As

amostras dos músculos foram homogeneizadas em solução de lise contendo EDTA (2 mM), Tris-HCl (50 mM, pH 6,8) e SDS (4% p/v) e o conteúdo total de proteína foi determinado. Para as frações de membrana e pós-membrana plasmática, os músculos foram incubados por 105 min ou por 180 min a 37°C em KRb com/ sem AB (1 nM). As frações de membrana plasmática e citosólica foram preparadas como descrito por Nishiumi e Ashida (2007) e a proteína total determinada. Para a eletroforese, as amostras (homogeneizado integral e frações) foram dissolvidas em 25% (v/v) de uma solução contendo glicerol (40%), mercaptoetanol (5%) e Tris-HCl (50 mM), em pH 6,8 e fervidas por 3 min. Concentrações iguais de proteínas foram aplicadas em gel de poliacrilamida (12%), analisadas por SDS-PAGE de acordo com o sistema descontínuo de Laemmli (1970) e transferidas para membranas de nitrocelulose por 1 h a 15 V em tampão de transferência (Trizma 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20% e SDS 0,25%). As membranas de nitrocelulose foram incubadas por 2 h em solução de bloqueio (TBS; NaCl 0,5 M, Trizma 20 mM, leite em pó desnatado 5%) e então incubado por 12 h a 4°C com anti-GLUT4 (1:500) ou anti- β -actina (1:7500). As membranas foram incubadas por 2 h com anti-IgG (1:1000) e as bandas imunoreativas foram visualizadas usando kit com substrato quimioluminescente HRP (Zanatta et al., 2011). Autoradiogramas foram quantificados por determinação das densidades ópticas com o software OptiQuant versão 02.00 (Packard Instrument Company).

2.11 Análise de Imunofluorescência

O músculo sóleo de tratamento *in vivo* (removidos 180 min após o tratamento oral com AB 10 mg/kg) ou de incubação *in vitro* com AB 1 nM AB ou 1,25-D₃ 1 nM por 105 min, foram fixados com paraformaldeído (4%), desidratado e emblocado em parafina, como descrito por Dos Santos et al (2012). Blocos representativos de tecido em parafina foram seccionados com 5 μ m de espessura, desparafinado, rehidratado e submetidos a recuperação antigênica em tampão citrato (10 mM, 8 min a 37 °C). As secções foram submetidas a uma solução de bloqueio (BSA 3% e Igepal 1% em PBS/ 1 h 37°C) e em seguida incubadas por 12 h a 37°C em presença do anticorpo primário anti-GLUT4 (1: 500). Após várias lavagens em PBS, as secções foram incubadas por 1 h a 37°C com anticorpo secundário anti-mouse (1: 500) conjugado a Cy3 e em seguida os núcleos de células musculares foram corados com DAPI. As secções foram montadas em meio FluorSave. A distribuição de GLUT4 no tecido foi analisada qualitativamente (adaptado de Barros *et al.*, 2005).

2.12 Cálculo e Lactato desidrogenase sérico

O cálcio e a atividade da desidrogenase sérica (LDH) foram determinados 180 min após o tratamento oral com AB (10 mg/kg). Amostras de soro foram utilizadas para determinar a atividade da LDH extracelular. O cálcio sérico foi determinado de acordo com instruções do fabricante (Zanatta et al., 2011; Kendrick, 1976).

2.13 Dados e análise estatística

Os resultados foram expressos como Média \pm E.P.M. Foi utilizado análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do teste *post-hoc* de Bonferroni ou teste *t* de Student's não pareado para identificar significativamente diferenças entre grupos. Diferenças foram consideradas significantes quando $p \leq 0.05$.

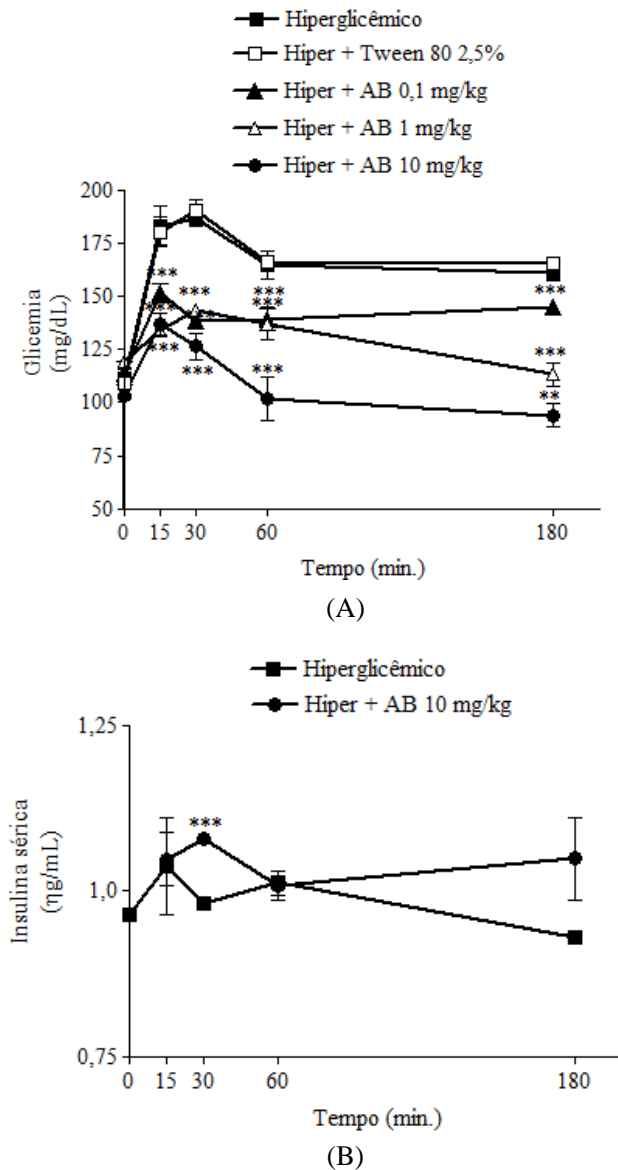
3. Resultados

3.1 Efeito do AB na glicemia e insulina sérica

A figura 1A mostra a glicemia após tratamento oral com AB (0,1, 1 e 10 mg/kg) em ratos hiperglicêmicos. Para todas as doses, o AB promove a redução na glicemia em 15, 30, 60 e 180 min comparado com o controle hiperglicêmico. O tratamento com 1 e 10 mg/ kg mostrou um efeito mais sustentado de 15 a 180 min, melhorando a tolerância à glicose (26, 23, 17, 29 % para 1 mg/ kg e 25, 32, 38, 41 % para 10 mg/kg, respectivamente). Ainda, o AB 10 mg/ kg reduziu à glicemia a valores próximos ao euglicêmico e exibiu um potente efeito antihiperglicêmico (41% em 180 min). Como esperado, após iniciar o teste de tolerância à glicose a glicemia foi aumentada quando comparada com o tempo zero. Também, o veículo (Tween 80 2,5%) não modificou o perfil glicêmico acima do período estudado quando comparado com o controle.

Baseado no efeito do AB na glicemia em ratos hiperglicêmicos, a insulina sérica foi determinada após sobrecarga de glicose em ratos submetidos a jejum (Fig. 1B). Foi observado que a sobrecarga de glicose estimulou a secreção de insulina, reforçando o papel clássico da glicose como um secretagogo. Em adição, após tratamento com AB, a secreção de insulina foi aumentada aos 30 min, apresentando um perfil de secreção sustentada no período estudado comparado com o respectivo controle hiperglicêmico. Isto foi corroborado pelo índice insulinogênico (II) do AB, que foi de 0,61 ng/ mg (o valor correspondente para o controle hiperglicêmico foi de 0,56).

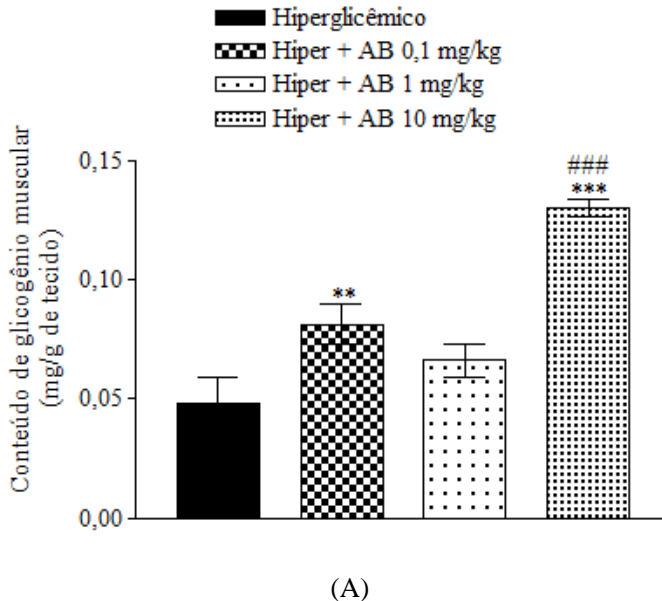
Fig. 1. Efeito do ácido betulínico (AB) na curva oral de tolerância à glicose (A) e na secreção de insulina sérica (B) em ratos hiperglicêmicos. Valores são expressos como média \pm E.P.M. com $n=5$. Significante em $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$ comparado ao respectivo valor do grupo controle hiperglicêmico.

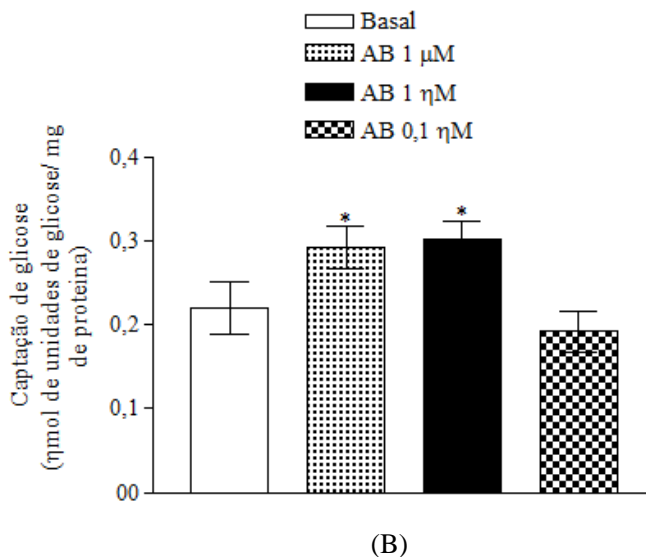


3.2 Efeito do AB no glicogênio e captação de glicose muscular

O tratamento com AB em ratos hiperglicêmicos aumenta o conteúdo de glicogênio no músculo 180 min após o tratamento oral, comparado ao controle hiperglicêmico. Em adição, AB 10 mg/ kg potentemente aumenta o conteúdo de glicogênio (em torno de um fator de 3), comparado com o grupo hiperglicêmico (Fig. 2A). Uma curva dose-resposta para AB foi obtida na captação de ^{14}C -deoxiglicose *in vitro* no músculo. A figura 2B mostra o efeito estimulatório do AB em 1 μM e 1 nM na captação de glicose após 1 h de incubação. O efeito estimulatório do AB na captação de ^{14}C -deoxiglicose representa 33% e 38% da captação de glicose comparada com o grupo controle basal, respectivamente.

Fig. 2. Efeito do ácido betulínico (AB) no conteúdo de glicogênio do músculo sóleo em ratos hiperglicêmicos 180 min após tratamento oral (A) e curva *in vitro* de concentração–resposta na captação de ^{14}C -deoxiglicose no músculo (B). Valores são expressos como média \pm E.P.M. com $n = 5$ para cada grupo. Estatisticamente significativo em $*p < 0,05$; $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$ comparado ao respectivo grupo controle/basal e em $###p < 0,001$ comparado ao grupo AB 0,1 mg/kg.

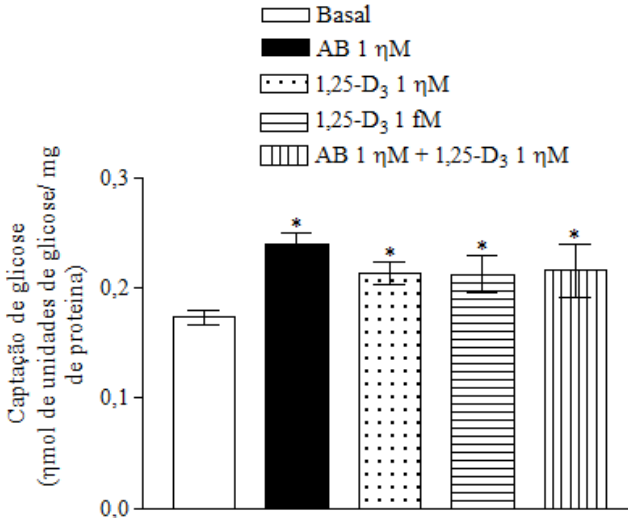




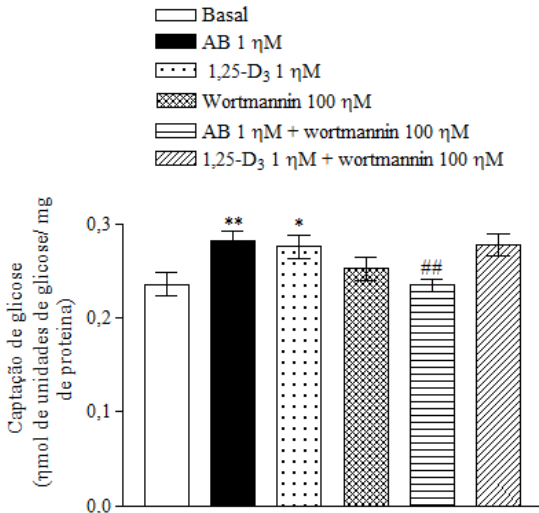
3.3 Influência de vários inibidores no efeito estimulatório do AB e da 1,25-D₃ na captação de glicose, incorporação de timidina ao DNA e síntese protéica

A figura 3A mostra o efeito estimulatório similar de 1,25-D₃ na captação de glicose quando comparado com o observado para o AB (1 nM). O efeito da 1,25-D₃ na captação de glicose foi significativo em 1 nM (24%) and 1 fM (23%) comparado com o grupo basal. Ambos compostos aumentam a captação de glicose no músculo, e em termos de percentagem o AB foi efetivo como a 1,25-D₃. Além disso, a administração de ambas as substâncias não causa um efeito aditivo na captação de glicose. Baseado nestes resultados, o mecanismo de ação associado com o efeito do AB e da 1,25-D₃ na captação de glicose foi investigado. A captação de glicose foi efetuada com wortmannin (100 nM), um inibidor específico da PI3K, PD98059 (50 μ M), um inibidor da MEK, cicloheximida (0,35 mM), um inibidor da síntese de proteínas ou colchicina (1 μ M), um agente despolimerizante de microtúbulos. Em todos os casos, as concentrações usadas foram aquelas que foram previamente testadas e resultaram em inibição em ensaios similares (Zanatta et al., 2008; Cazarolli et al., 2009). A estimulação da captação de glicose por AB foi completamente inibida com o pré-tratamento com wortmannin e colchicina. Por outro lado, estes inibidores não alteraram o efeito estimulatório da 1,25-D₃ na captação de glicose comparado com grupo 1,25-D₃ (Fig. 3B and 3C).

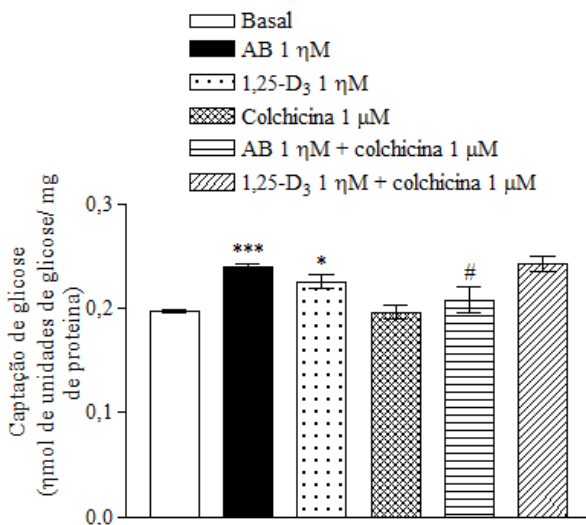
Fig. 3. Efeito do ácido betulínico (AB) e 1,25-D₃ na captação de ¹⁴C-deoxiglicose (A) e determinação do envolvimento da PI3K (B) e microtúbulos (C) no mecanismo de ação deste triterpeno. Tempo de pré-incubação= 30 min; tempo de incubação= 60 min. Valores são expressos como média ± E.P.M. com n= 6 em triplicata para cada grupo. Significante em **p*< 0,05, ***p*< 0,01 e ****p*< 0,001 comparado com o grupo basal. Significante em #*p*< 0,05 e ##*p*< 0,01 comparado com o grupo AB.



(A)



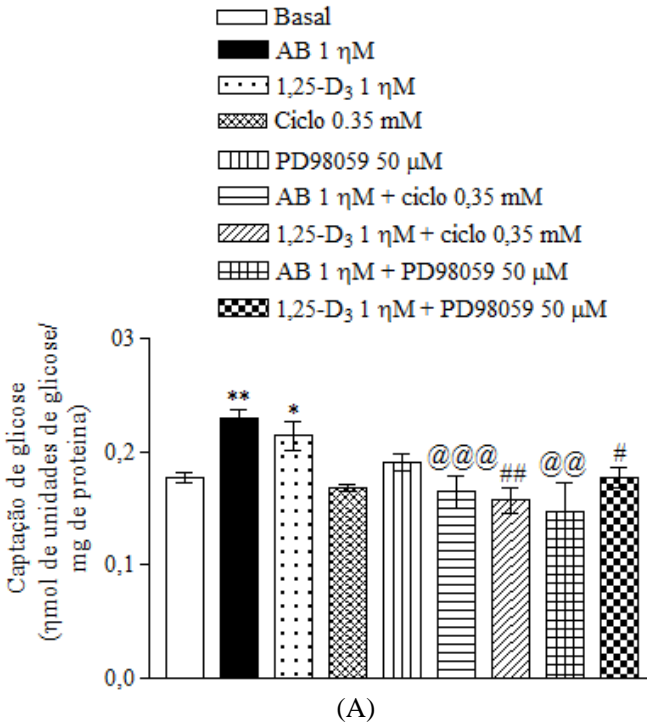
(B)

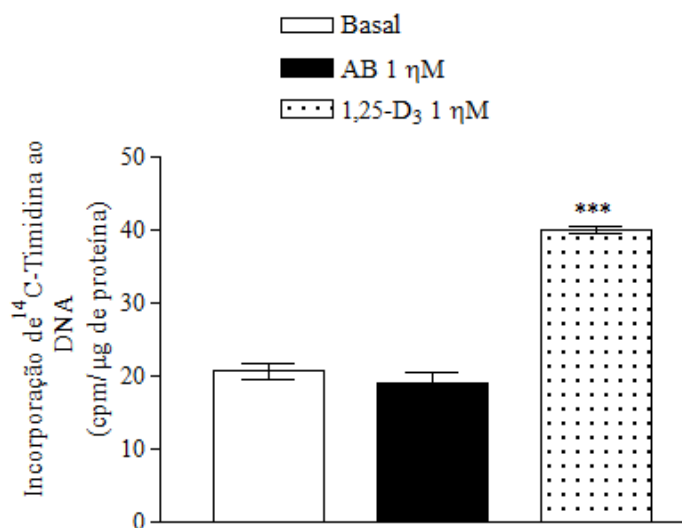


(C)

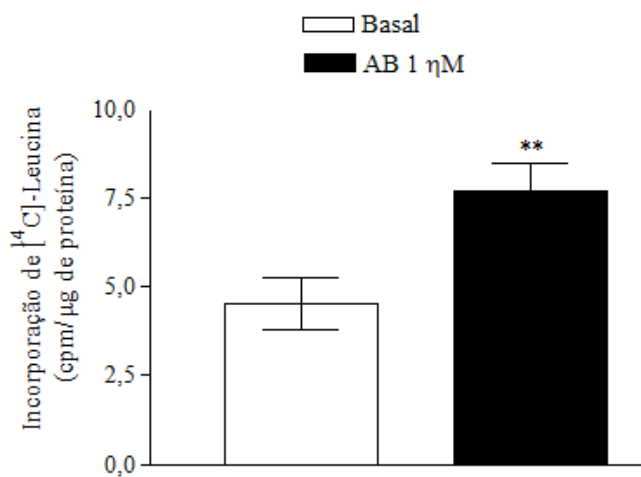
Para verificar se os efeitos do AB e da 1,25-D₃ na captação de glicose envolve síntese protéica e/ ou se a ação destas substâncias é associada à atividade nuclear, a tradução geral de mRNA e a cascata da MAPK foram estudados. Cicloheximida e PD98059 completamente bloquearam o aumento na captação de glicose comparado ao respectivo grupo controle tratado por ambos AB (36 e 28% de inibição, respectivamente) e 1,25-D₃ (27 e 17% de inibição, respectivamente) (Fig. 4A). A figura 4B mostra que o bem conhecido efeito genômico da 1,25-D₃ no músculo foi também observado, como esperado. Contudo, o AB não modificou a incorporação de ¹⁴C-timidina ao DNA dos músculos comparado com o grupo basal. Levando em consideração a influência da cicloheximida e PD98059 no efeito estimulatório do AB na captação de glicose e também que o AB não afeta a ativação nuclear no período analisado, estudamos o efeito do AB na incorporação de ¹⁴C-leucina em proteínas. A figura 4C mostra que o AB promove um aumento na síntese protéica em torno de 50% comparado com o músculo basal.

Fig. 4. Efeito da cicloheximida e PD98059 no mecanismo de ação do ácido betulínico (AB) e da 1,25-D₃ na captação de ¹⁴C-deoxiglicose em músculo (A) e efeito do AB e 1,25-D₃ na incorporação de ¹⁴C-timidina (B) e ¹⁴C-Leucina (C) em músculo sóleo. Tempo de pré-incubação= 30 min; tempo de incubação= 60 min. Valores são expressos como média ± E.P.M. com n= 6 em triplicata para cada grupo. Significante em **p*< 0,05, ***p*< 0,01 e ****p*< 0,001 comparado ao grupo basal. Significante em @@*p*< 0,01 e @@@*p*< 0,001 comparado ao grupo AB. Significante em #*p*< 0,05 e ##*p*< 0,01 comparado ao grupo 1,25-D₃.





(B)

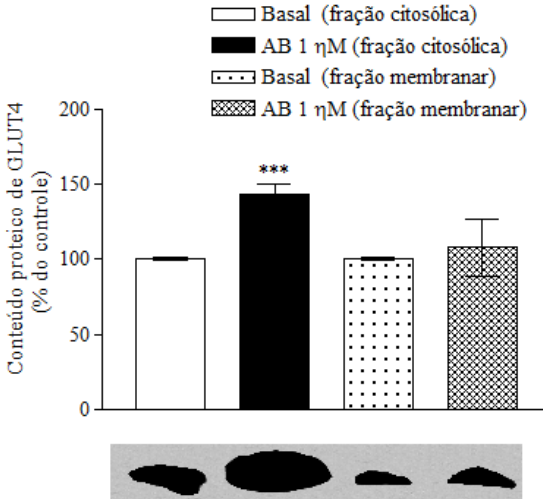


(C)

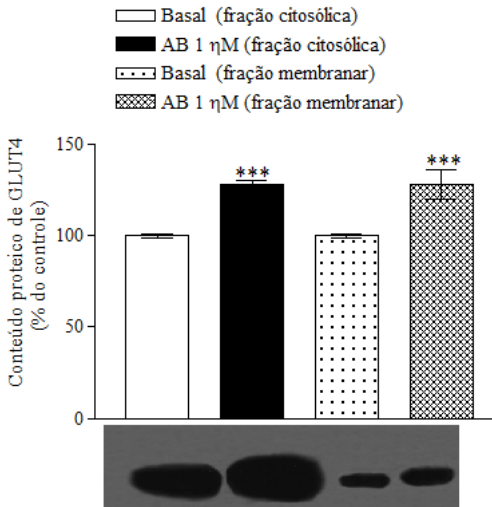
3.4 Efeito do AB e da 1,25-D₃ no GLUT4

A figura 5 mostra o conteúdo total de GLUT4 do músculo. Um aumento no GLUT4 total em presença do AB e da 1,25-D₃ foi observado após 105 min de incubação *in vitro*. Também, o AB aumentou o conteúdo total de GLUT4 após 180 min de incubação *in vitro* comparado com o grupo basal (resultados não apresentados). Como esperado, a insulina apresentou o efeito mais proeminente no conteúdo de GLUT4 (aumento de 76%). O efeito da wortmannin e da cicloheximida na ação estimulatória do AB e da 1,25-D₃ no conteúdo total de GLUT4 foi também investigado. Como pode ser visto na figura 5, o aumento no conteúdo de GLUT4 induzido por AB e 1,25-D₃ foi significativamente reduzido por cicloheximida e também, no caso do AB, por wortmannin. O conteúdo de GLUT4 citosólico e da membrana plasmática em presença de AB foi quantificado após 105 min e 180 min de incubação *in vitro*. O conteúdo citosólico de GLUT4 foi aumentado quando comparado com o grupo basal em ambos os períodos de tratamento (Figs. 6A e B). Contudo, significativo aumento no conteúdo de GLUT4 da membrana plasmática induzido por AB só foi detectado após 180 min (Fig. 6B). Também, o efeito na imunolocalização do GLUT4 no músculo após tratamento *in vitro* (105 min) com AB (painel C) ou 1,25-D₃ (painel E) e também por AB após tratamento *in vivo* (180 min; painel D) foi investigado (Fig. 7). A presença de GLUT4 na célula foi marcadamente aumentada por AB após 180 min (*in vivo*) bem como por 1,25-D₃ após 105 min de incubação *in vitro*, comparado com o respectivo grupo basal. Esta análise qualitativa está de acordo com o efeito do AB no conteúdo de GLUT4 na membrana plasmática, reforçando os resultados mostrados na figura 6B.

Fig. 6. Efeito do ácido betulínico (AB) no conteúdo de GLUT4 nas frações citosólica e membranária em músculo sóleo após um período de incubação de 105 min (A) ou 180 min (B) *in vitro*. Valores são expressos como média \pm E.P.M. n= 4 para três experimentos independentes. Significante em $***p < 0,001$ comparado com o respectivo grupo basal. Para cada grupo são apresentados imunoblots representativos.

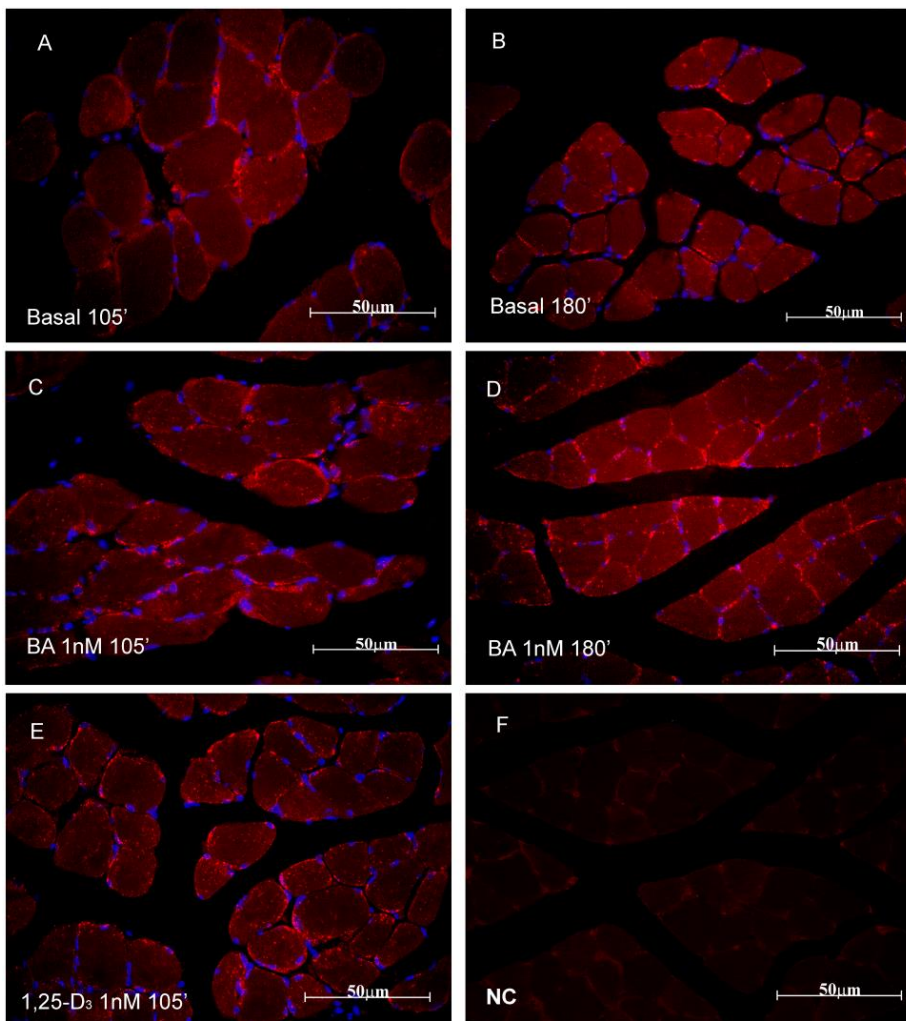


(A)



(B)

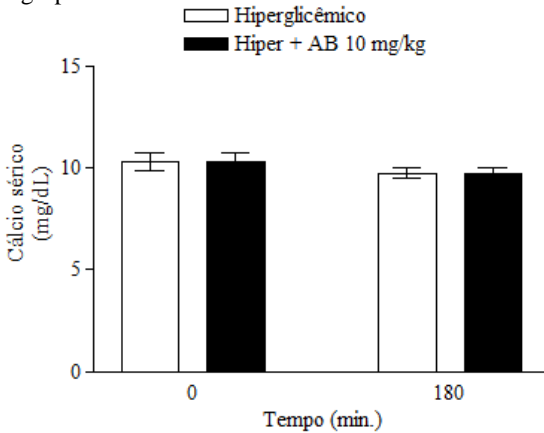
Fig. 7. Estudo de imunofluorescência do GLUT4 em músculo sóleo. Painel A (Basal 105 min *in vitro*), painel B (Basal 180 min *in vitro*), painel C (AB 105 min *in vitro*), painel D (AB 180 min *in vitro*), painel E (1,25-D₃ 105 min *in vitro*) e painel F (controle negativo). GLUT4 foi corado com Cy3 (vermelho), e a imunofluorescência revela a presença de GLUT4 em músculos tratados com veículo, AB ou 1,25-D₃. Os núcleos foram corados com DAPI (azul). A escala de barra é de 50 μ m.



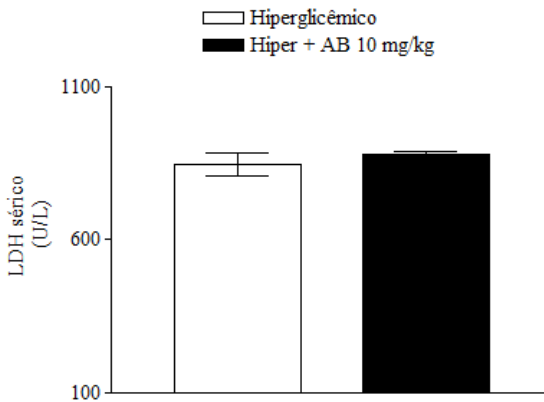
3.5 Efeito do AB na concentração sérica de cálcio e LDH

A figura 8A mostra que 180 min após o tratamento oral *in vivo* com AB não houve alterações na concentração sérica de cálcio comparando com o respectivo grupo controle hiperglicêmico. Também, ainda com a maior dose de AB, este composto não modifica a atividade da enzima LDH, sugerindo que este não exibe toxicidade tecidual (Fig. 8B).

Fig. 8. Efeito do ácido betulínico (AB) no cálcio sérico (A) e atividade da lactato desidrogenase sérica (B). Valores são expressos como média \pm E.P.M. com $n=5$ para cada grupo.



(A)



(B)

4. Discussão

O efeito agudo na glicemia identifica o AB como um potencial composto antihiper-glicêmico, e isto pode ser explicado por mecanismos envolvendo a secreção de insulina (Detimary et al., 1995; Rorsman, 1997). O AB potencializa o efeito da glicose na liberação de insulina e mantém alta a concentração sérica de insulina no período estudado. Outros triterpenos também melhoram a glicemia e a secreção de insulina após tratamento *in vivo* (Hsu et al., 2006; Jang et al., 2009; Melo et al., 2009). O tratamento com ácido oleanólico pode aumentar a quantidade total de mRNA e protéico, como da insulina (Teodoro et al., 2008). A insulina é o mais importante hormônio que regula a energia e o metabolismo do glicogênio, principalmente através da ativação e/ou inibição de várias enzimas e proteínas (Ferrer et al., 2003; Hardie, 2012). O efeito estimulatório do AB no conteúdo de glicogênio está de acordo com o reportado para outros triterpenos naturais e derivados no metabolismo do glicogênio através da inibição da atividade da fosforilase do glicogênio muscular (Wen et al., 2008; Zhang et al., 2009; Zhu et al., 2009; Liang et al., 2011). Ainda, a palbinona, o ácido ursólico, o AB e o ácido oleanólico também estimulam a deposição de glicogênio em células hepáticas da linhagem HepG2 através da fosforilação da AMPK e GSK-3 β (Ha et al., 2009; Hardie, 2012). Estes resultados sugerem que o AB pode controlar a glicemia por influenciar o metabolismo do glicogênio em tecidos alvos, tais como músculo e fígado.

Triterpenóides são um grupo de produtos derivados do esqualeno ou de compostos similares precursores acíclicos de 30 carbonos (Xu et al., 2004; Jäger et al., 2009). A 1,25-D₃, uma das mais importantes substâncias sintetizadas do esqualeno em plantas e animais, age no balanço do cálcio, na sensibilidade à insulina e glicemia (Mathieu et al., 2005; Mathieu e Gysemans, 2006; Teegarden e Donkin, 2009). A 1,25-D₃ é proposta para uso clínico no tratamento da diabetes ou contra a destruição de ilhotas transplantadas (Lemire, 1997). Contudo, a manipulação da estrutura da 1,25-D₃ é necessária para um desenvolvimento bem sucedido de fármacos antihiper-glicêmicos desprovidos de efeitos calcêmicos indesejáveis. Nesta observação, identificamos substâncias que apresentam órgãos-alvo específico para a homeostasia da glicose sem que induzam a hipercalcemia. Uma possível alternativa são os triterpenos, que dividem características estruturais em comum com a 1,25-D₃, porém não estão envolvidos na homeostasia do cálcio. Assim, para fortalecer o mecanismo do AB como um agente antihiper-glicêmico, estudos de estimulação da captação de glicose comparados com o efeito agudo da 1,25-D₃ foram desenvolvidos. Como

os dois compostos juntos não possuem efeito aditivo na estimulação da captação de glicose, estudos nas vias intracelulares foram desenvolvidos para esclarecer o potencial efeito insulinomimético. Nesta observação, mostramos que o efeito estimulatório do AB foi inibido por wortmannin e colchicina enquanto o efeito da 1,25-D₃ permaneceu inalterado. Já é bastante conhecido que o aumento na captação de glicose no músculo em resposta à insulina ocorre via PI3K para a translocação do GLUT4 (Chang et al., 2004; Kanzaki, 2006). Adicionalmente, o citoesqueleto é importante para este mecanismo, uma vez que a disruptura dos microtúbulos inibe a translocação do GLUT4 induzida por insulina e consequentemente a captação de glicose (Kanzaki, 2006; Chen et al., 2008). Uma vez que a ação estimulatória do AB foi inibida por wortmannin e colchicina, o efeito estimulatório na captação de glicose parece ser mediado por PI3K e a integridade dos microtúbulos é necessária para a completa captação de glicose induzida por AB.

Alguns triterpenos e seus derivados agem através de ambas as vias dependente e independente de insulina (Huang et al., 2010; Ha et al., 2009). Os triterpenos aumentam a auto-fosforilação do receptor de insulina e a fosforilação e ativação da PI3K, IRS1, Akt e AMPK. Adicionalmente, estes compostos estimulam a translocação do GLUT4 em adipócitos do tipo 3T3-L1 e células CHO/HIR (Jung et al., 2007; Huang et al., 2010; Ha et al., 2009; Shi et al., 2008).

Por outro lado, o efeito estimulatório da 1,25-D₃ na captação de glicose parece não envolver nem a ativação da PI3K nem o citoesqueleto. Estes resultados estão de acordo com os reportados por Huang et al. (2002) que mostra que a 1,25-D₃ não altera a ativação de PI3K induzida por insulina e a atividade da PKC. Contudo, estes autores mostram que a 1,25-D₃ suprime a captação de glicose induzida por insulina em adipócitos. Os efeitos da 1,25-D₃ na via da insulina são controversos, uma vez que a suplementação com 1,25-D₃ melhora no músculo a inibição da captação de glicose induzida por ácidos graxos livres de uma maneira dose e tempo-dependente.

A insulina também regula a síntese protéica mudando o processo de tradução de mRNA (Taha e Klip, 1999). Em adição, a insulina estimula o crescimento e diferenciação celular via, por exemplo, MAPK (Taha e Klip, 1999). Em nossos resultados, o efeito estimulatório de ambos AB e 1,25-D₃ na captação de glicose foi completamente bloqueado com os inibidores de síntese protéica e MEK. Estes resultados indicam que ambos AB e 1,25-D₃ podem agir através da via das MAPK e podem influenciar a síntese protéica no músculo. Esta hipótese foi reforçada pelo efeito estimulatório do AB na síntese protéica e pelo efeito da 1,25D₃ na

incorporação de timidina e leucina no DNA e proteína, respectivamente. Também, o AB e a 1,25-D₃ aumentaram o conteúdo total de GLUT4 no músculo.

Resultados similares foram descritos para o ácido paquímico, que aumentou a expressão de GLUT4 em adipócitos 3T3-L1 após tratamento *in vitro* (Huang et al., 2010) e para a 1,25-D₃ que alterou a síntese de proteínas das cascatas de fosforilação da insulina (Leal et al., 1995). Também, o efeito da 1,25-D₃ no GLUT4 está de acordo com o descrito por Manna e Jain (2012) que demonstram a regulação positiva do GLUT4 em adipócitos 3T3-L1. Os resultados descritos aqui sugerem que o AB estimula a captação de glicose através da via da insulina envolvendo ativação da PI3K e MAPK, e provavelmente interfere com outras proteínas e estruturas relacionadas à translocação do GLUT4 para a membrana plasmática. Usando a técnica de microscopia de imunofluorescência, observamos que o AB aumenta a quantidade de GLUT4 nas frações citosólica e membrana de maneira tempo dependente.

A insulina regula a captação de glicose nas células adipócitas e musculares através da redistribuição do GLUT4 de sua localização intracelular à membrana plasmática (Chang et al., 2004; Kanzaki, 2006). Contudo, uma discrepância entre a magnitude da translocação do GLUT4 e a captação de glicose é frequentemente observada. Estas características indicam que a atividade do GLUT4 não está restrita à translocação induzida (Furtado et al., 2003). Adicionalmente, alguns estudos demonstram que os mecanismos de retenção do GLUT4 são dinâmicos, baseado em lenta exocitose e rápida internalização. Neste modo de retenção, o GLUT4 intracelular está em equilíbrio com a superfície celular em condições basais, continuamente circulando entre compartimentos intracelulares e a membrana plasmática. A insulina acelera a exocitose do GLUT4 e inibe a endocitose, resultando em um aumento na superfície de GLUT4 e da captação de glicose (Govers et al., 2004; Karylowski et al., 2004; Martin et al., 2006). Baseado nestes resultados, nossos resultados indicam que o AB estimula a captação de glicose através de uma rede complexa de mecanismos, provavelmente envolvendo a ativação basal de GLUT4 na membrana plasmática, reduzindo o ciclo de exocitose/endocitose e aumentando a translocação de novos transportadores de glicose sintetizados à membrana.

5. Conclusões

Em conclusão, o AB age tanto como secretagogo de insulina quanto como agente insulinomimético via PI3K, MAPK e tradução de mRNA e parcialmente divide a via de sinalização genômica com a 1,25D₃ regulando positivamente o GLUT4 no músculo. Em adição, o AB não causa hipercalcemia e não apresenta toxicidade celular. Esta é a primeira descrição mostrando o efeito estimulatório do AB no conteúdo de GLUT4, que é imperativo para a manutenção da glicemia e importante como nova perspectiva farmacológica.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pelo CNPq, CAPES; FAPESC e PPG-Bioquímica. Os autores expressam seu agradecimento a Dra. Regina Pessoa Pureur pelo auxílio técnico.

Estado de conflito de interesse

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

Referências

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2008; 31: S55-S60.

Barros, R.P.A. et al. GLUT4 regulation by estrogen receptors ER α and ER β . *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006; 103 (5): 1605-1608.

Billaudel, B.J. et al. Effect of 1,25 dihydroxyvitamin D₃ on isolated islets from vitamin D₃-deprived rats. *American Journal of Physiology*. 1990; 258: E643-E648.

Cazarolli, L.H. et al. Mechanism of action of the stimulatory effect of apigegenin-6-C-(2''-O- α -L-rhamnopyranosyl)- β -L-fucopyranoside on ¹⁴C-glucose uptake. *Chemico-Biological Interactions*. 2009; 179: 407-412.

Chang, L. et al. Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Molecular Medicine*. 2004; 10: 65-71.

Chen, Y. et al. A pre-docking role for microtubules in insulin-stimulated glucose transporter 4 translocation. *Federation of European Biochemical Societies Journal*. 2008; 275: 705-712.

Choi, J.Y. et al. Isolation of betulinic acid, its methyl ester and guaiane sesquiterpenoids with protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity from the roots of *Saussurea lappa* C.B.Clarke. *Molecules*. 2009; 14: 266-272.

Connolly JD, Hill RA. Triterpenoids. *Natural Product Reports*. 2000; 17: 463–482.

De Luca, H.F. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2004; 80: 1689S-1696S.

Detimary, P. et al. Possible links between glucose-induced changes in the energy state of pancreatic B cells and insulin release. Unmasking by decreasing a stable pool of adenine nucleotides in mouse islets. *Journal of Clinical Investigation*. 1995; 96: 1738-1745.

Dirks-Naylor, A.J. Lennon-Edwards S. The effects of vitamin D on skeletal muscle function and cellular signaling. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 2011; 125: 159–168.

Ferrer, J.C. et al. Control of glycogen deposition. *FEBS Letters*. 2003; 546: 127–132.

Furtado, L.M. et al. GLUT4 activation: thoughts on possible mechanism. *Acta Physiologica Scandinavica*. 2003; 178: 287 – 296.

Govers, R. et al. Insulin increases cell surface GLUT4 levels by dose dependently discharging GLUT4 into a cell surface recycling pathway. *Molecular and Cellular Biology*. 2004; 24: 6456–6466.

Gupta, R. et al. Antidiabetic and antioxidant potential of b-sitosterol in streptozotocin-induced experimental hyperglycemia. *Journal of Diabetes*. 2011; 3: 29-37.

Ha, D.T. et al. Palbinone and triterpenes from Moutan Cortex (*Paeonia suffruticosa*, Paeoniaceae) stimulate glucose uptake and glycogen synthesis via activation of AMPK in insulin-resistant human HepG2 Cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2009; 19: 5556–5559.

Hardie, D.G. Organismal carbohydrate and lipid homeostasis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2012; 4: a00603.

Hsu, J.H. et al. Release of acetylcholine to raise insulin secretion in Wistar rats by oleanolic acid one of the active principles contained in *Cornus officinalis*. *Neuroscience Letters*. 2006; 404: 112–116.

Huang, Y. et al. Effect of 1 α ,25-dihydroxy vitamin D₃ and vitamin E on insulin-induced glucose uptake in rat adipocytes. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2002; 55: 175–183.

Huang, Y. et al. Pachymic acid stimulates glucose uptake through enhanced GLUT4 expression and translocation. *European Journal of Pharmacology*. 2010; 648: 39–49.

Jäger, S. et al. Pentacyclic triterpene distribution in various plants – rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. *Molecules* 2009; 14: 2016-2031.

Jang, S. et al. Ursolic acid enhances the cellular immune system and pancreatic β -cell function in streptozotocin-induced diabetic mice fed a high-fat diet. *International Immunopharmacology*. 2009; 9: 113–119.

Jung, S.H. et al. Insulin-mimetic and insulin-sensitizing activities of a pentacyclic triterpenoid insulin receptor activator. *Biochemical Journal*. 2007; 403: 243–250.

Kajikawa, M. et al. An insulinotropic effect of vitamin D analog with increasing intracellular Ca²⁺ concentration in pancreatic B-cells through nongenomic signal transduction. *Endocrinology*. 1999; 140: 4706-4712.

Kanzaki, M. Insulin receptor signals regulating GLUT4 translocation and actin dynamics. *Endocrine Journal*. 2006; 53: 167-293.

Karylowski, O. et al. GLUT4 Is Retained by an Intracellular Cycle of Vesicle Formation and Fusion with Endosomes. *Molecular Biology of the Cell*. 2004; 15: 870–882.

Kendrick, N.C. Purification of arsenazo III, a Ca²⁺-sensitive dye. *Analytical Biochemistry*. 1976; 76: 487–501.

Klein, G.A. et al. Mate tea (*Ilex paraguariensis*) improves glycemic and lipid profiles of type 2 diabetes and pre-diabetes individuals: a pilot study. *Journal of the American College of Nutrition*. 2011; 30: 320–332.

Krisman, C.R. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. *Analytical Biochemistry*. 1962; 4:17–23.

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680 – 685.

Leal, M.A. et al. The effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on insulin binding, insulin receptor mRNA levels, and isotype RNA pattern in U-937 human promonocytic cells. *Experimental Cell Research*. 1995; 217: 189-194.

Lemire, J.M. The role of vitamin D3 in immunosuppression: lessons from autoimmunity and transplantation. In *Vitamin D* edited by Feldman D, Glorieux FH, Pike JW. San Diego. Academic Press. 1997;1167-1181.

Liang, Z. et al. Identification of pentacyclic triterpenes derivatives as potent inhibitors against glycogen phosphorylase based on 3D-QSAR studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2011; 46: 2011-2021.

Lowry, O.H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 1951; 193: 265–275.

Machado, D.G. et al. Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: involvement of the monoaminergic system. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2009; 33: 642–650.

Manna, P.; Jain, SK. Vitamin D upregulates glucose transporter 4 (GLUT4) translocation and glucose utilization mediated by cystathionine- γ -lyase (CSE) activation and H₂S formation in 3T3L1 adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 2012; 287: 42324-42332.

Martin, O.J. et al. GLUT4 distribution between the plasma membrane and the intracellular compartments is maintained by an insulin-modulated bipartite dynamic mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006; 281: 484–490.

Mathieu, C.; Gysemans, C. Vitamin D and diabetes. *Diabetology*. 2006; 22: 187-193.

Melo, C.L. et al. Betulinic Acid, a natural pentacyclic triterpenoid, prevents abdominal fat accumulation in mice fed a high-fat diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009; 57: 8776-8781.

Menegaz, D. et al. Rapid responses to thyroxine in the testis: active protein synthesis-independent pathway. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2006; 26: 128-134.

Nishiumi, S.; Ashida, H. Rapid preparation of a plasma membrane fraction from adipocytes and muscle cells: application to detection of translocated glucose transporter 4 on the plasma membrane. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2007; 71: 2343-2346.

Raghuramulu, N. et al. Vitamin D improves oral glucose tolerance and insulin secretion in human diabetes. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 1992; 13: 45-51.

Rorsman, P. The pancreatic β -cell as a fuel sensor: an electrophysiologist's viewpoint. *Diabetologia*. 1997; 40: 487-495.

Dos Santos, J.M. et al. The effect of age on glucose uptake and GLUT1 and GLUT4 expression in rat skeletal muscle. *Cell Biochemistry and Function*. 2012; 30: 191-197.

Shi, L. et al. Corosolic acid stimulates glucose uptake via enhancing insulin receptor phosphorylation. *European Journal of Pharmacology*. 2008; 584: 21-29.

Taha, C.; Klip, A. The insulin signaling pathway. *The Journal of Membrane Biology*. 1999; 169: 1-12.

Teegarden, D.; Donkin, S.S. Vitamin D: emerging new roles in insulin sensitivity. *Nutrition Research Reviews*. 2009; 22: 82-92.

Teodoro, T. et al. Oleanolic acid enhances insulin secretion in pancreatic beta-cells. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 2008; 582: 1375-1380.

Varley, H. et al. *Practical Biochemistry*. 5th ed. Heinemann IW, editor. London: Medical Books Ltd; 1976.

Wen, X. et al. Naturally occurring pentacyclic triterpenes as inhibitors of glycogen phosphorylase: synthesis, structure-activity relationships, and X-ray crystallographic studies. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2008; 51: 3540–3554.

Xu, R. et al. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry*. 2004; 65: 261–291.

Zanatta, L. et al. Insulinomimetic Effect of Kaempferol 3-Neohesperidoside on the Rat Soleus Muscle. *Journal of Natural Products*. 2008; 71: 532–535.

Zanatta, L. et al. Effect of $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ in plasma membrane targets in immature rat testis: ionic channels and gamma-glutamyl transpeptidase activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* . 2011; 515: 46-53.

Zanatta, A.P. et al. Integrin participates in the effect of thyroxine on plasma membrane in immature rat testis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013; 1830:2629-2637.

Zhang, L. et al. Synthesis and Biological Evaluation of Asiatic Acid Derivatives as Inhibitors of Glycogen Phosphorylases. *Chemistry & Biodiversity*. 2009; 6: 864-874.

Zhu, P. et al. Terpenoids. III: Synthesis and biological evaluation of 23-hydroxybetulinic acid derivatives as novel inhibitors of glycogen phosphorylase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2009; 19: 6966–6969.

5.1.1.2 O mecanismo de ação do ácido ursólico como secretagogo de insulina e insulinomimético em músculo esquelético é dependente de vias mediadas por cálcio e de cinases

Artigo Publicado

Periódico: Biochimica et Biophysica Acta: General subjects. v. 1850, p. 51-61, 2015.

Autores: Allisson Jhonatan Gomes Castro, Marisa Jádna Silva Frederico, Luisa Helena Cazarolli, Camila Pires Mendes, Lizandra Czermainski Bretanha, Éder Carlos Schmidt, Zenilda Laurita Bouzon, Veronica Aiceles de Medeiros Pinto, Cristiane da Fonte Ramos, Moacir Geraldo Pizzolatti^c, Fátima Regina Mena Barreto Silva.

O mecanismo de ação do ácido ursólico como secretagogo de insulina e insulinomimético é compartilhado (*cross-talk*) entre vias do cálcio e cinases para regular o equilíbrio da glicose

Allisson Jhonatan Gomes Castro^a, Marisa Jádna Silva Frederico^a, Luisa Helena Cazarolli^b, Camila Pires Mendes^a, Lizandra Czermainski Bretanha^c, Éder Carlos Schmidt^d, Zenilda Laurita Bouzon^d, Veronica Aiceles de Medeiros Pinto^e, Cristiane da Fonte Ramos^c, Moacir Geraldo Pizzolatti^c, Fátima Regina Mena Barreto Silva^a

^a*Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.*

^b*Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Universitário Laranjeiras do Sul, Laranjeiras do Sul, PR, Brasil.*

^c*Departamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.*

^d*Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.*

^e*Departamento de Anatomia, Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.*

*Correspondência para: Profa. Dra. Fátima Regina Mena Barreto Silva, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, UFSC. Campus Universitário, Bairro Trindade, Cx Postal 5069, CEP: 88040-970, Florianópolis, SC, Brasil. E-mail: mena.barreto@ufsc.br, Tel.: +55-48.3721.69.12, Fax.: +55-48.3721.96.72.

Resumo

O efeito agudo de tratamentos *in vivo* com ácido ursólico (AU) na homeostasia da glicose em ratos hiperglicêmicos e o mecanismo de ação no músculo sóleo foi estudado. O efeito do AU na glicemia, o conteúdo de glicogênio, bem como, a secreção de insulina, o LDH e cálcio sérico foram avaliados após a curva de tolerância oral à glicose em ratos hiperglicêmicos. O conteúdo de grânulos contendo insulina nas células- β foram analisados através de microscopia eletrônica de transmissão. O mecanismo de ação o AU foi estudado através da captação de glicose com/ sem inibidores específicos da via de sinalização insulínica, em músculo sóleo isolado. O efeito nuclear do AU e a expressão do GLUT4 no músculo sóleo foram estudados utilizando análise de incorporação de timidina no DNA, conteúdo de GLUT4, imunofluorescência e PCR. O efeito agudo do AU apresentou uma potente ação hipoglicemiante, aumento da insulina sérica e conteúdo de glicogênio e redução de vesículas de insulina em células β . AU estimulou a captação de glicose no músculo sóleo através de mecanismos mediados por PI3K, citoesqueleto e MAPK. Além disso, a modulação da concentração de cálcio e atividade da fosfolipase C, proteína-quinase C e PKCaM II são fundamentais para o efeito estimulatório pleno do AU na captação de glicose. A atividade nuclear do AU foi corroborada pelo aumento na expressão de mRNA do GLUT4, incorporação de timidina no DNA e na expressão total de GLUT4. Além disso, se observou uma forte presença de GLUT4 na membrana plasmática de músculo esquelético tratado com AU. O triterpeno testado não causou alterações na atividade da LDH sérica nem na concentração de cálcio sérico. Verificou-se que o papel anti-hiperglicemiante do AU é mediado através da secreção de insulina e o aumento da síntese e da translocação de GLUT4 é coordenada pelo cálcio, PI3K e vias dependentes de MAPK.

Palavras-chave: Cálcio, cinases, GLUT4, hiperglicemia, ácido ursólico, triterpeno.

1. Introdução

A glicose é o principal combustível para a maioria das células e a homeostasia requer um controle integrado por todo o organismo. A insulina é, de longe, o principal elemento de regulação da glicemia e é secretada pelas células- β pancreáticas induzidas pela glicose (Hardie, 2012). Através da ligação aos seus receptores em diferentes tecidos, a insulina ativa as vias de sinalização que envolve uma complexa cascata de proteínas cinases e proteínas reguladoras que conduzem para os efeitos metabólicos da insulina (Kanzaki, 2006).

O músculo esquelético compõe um grande percentual de massa corporal total e é o principal local para a absorção de glicose dependente de insulina. Neste tecido, a insulina induz uma redistribuição de proteína transportadora de glicose (GLUT4) a partir do interior da célula para a superfície da membrana plasmática, que conduz a uma maior taxa de captação de glicose nas células musculares (Hardie, 2012). O aumento na exocitose do GLUT4 em resposta à insulina é acionado através de sinalização por meio do receptor de insulina, que induz a ativação de vias de sinalização a jusante, tais como PI3K/AKT/PKB, PKCs e CAP/CBL/TC10 (Kanzaki, 2006). Além disso, a insulina medeia um largo espectro de respostas biológicas que atuam através das MAPKs, incluindo a ativação da transcrição de genes específicos e da modulação do crescimento e diferenciação celular (Kanzaki, 2006).

A translocação de GLUT4 e captação de glicose também pode ser ativada pela contração muscular através de vias de sinalização que fazem *cross talk* com os mecanismos clássicos de regulação de captação de glicose mediada por insulina. A contração muscular envolve aumento da concentração de cálcio intracelular, que regulam várias vias de sinalização e eventos metabólicos. O aumento nas concentrações miocelulares de cálcio é proposto por ser um sinal na iniciação do transporte de glicose estimulada por contração e na translocação do GLUT4. Além disso, uma ou mais das proteínas intracelulares reguladas por cálcio podem estar envolvidas nestes processos, e potenciais candidatos incluem a calmodulina e a proteína cinase II dependente de calmodulina (CaMKII). A proteína cinase II dependente de Ca^{2+} -calmodulina (CaMKII) é proposta por atuar como um componente intermediário da contração, bem como da cascata de sinalização induzida pela insulina, que resulta na translocação de vesículas contendo GLUT4 para a membrana plasmática, aumento da expressão de GLUT4 e aumento da absorção de glicose no músculo esquelético (Ojuka et al., 2012).

Várias investigações demonstraram que compostos naturais podem potencializar a secreção de insulina e/ ou estimular a translocação de GLUT4 e captação de glicose (Cazarolli et al., 2008; Castellano et al., 2013; Cazarolli et al., 2013; Silva et al., 2013). Os triterpenos pentacíclicos são isoprenóides derivados do metabolismo secundário de plantas e representam os principais constituintes de diversas plantas medicinais (Salvador et al., 2012). Ácido ursólico (3-beta-hidroxiurs-12-en-28-oic acid; AU), o mais representativo triterpenóide do tipo ursano é descrito como um agente anti-inflamatório, hepatoprotetor, antitumoral e antidiabético (Jang et al., 2009). Sabe-se que o ácido ursólico tem ação significativa na homeostase da glicose, reduz a glicemia em indivíduos diabéticos, e melhora a tolerância à glicose e à insulina, aumenta a síntese e liberação de insulina do pâncreas e inibe a glicação das proteínas (Wang et al., 2010). No entanto, o mecanismo pelo qual o AU regula a absorção de glicose ao nível dos principais tecidos responsáveis pelo equilíbrio de glicose no sangue, tal como o músculo esquelético e o tecido adiposo, não é totalmente descrito. Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar o papel do AU na homeostasia da glicose e do envolvimento de cálcio no mecanismo de ação deste triterpeno na captação de glicose no músculo sóleo.

2. Materiais e Métodos

2.1 Químicos

Albumina sérica bovina (BSA), 2-(2-amino-3-metoxifenil)-4H-1-benzopirran-4-ona (PD 98059), colchicina, wortmannin, cicloheximida, anti- β -actina de camundongo, acrilamida e bis-acrilamida, anti IgG de camundongo conjugado ao Cy3 foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Anti-GLUT4 (sc-53566) foi obtido da Santa Cruz Biotechnology (California, USA). Anti IgG conjugado a peroxidase, kit luminescente contendo substrato para HR peroxiase Immobilon™ Western e o ensaio imunossorvente ligando à enzima (ELISA) (catalogo no. EZRMI-13K) foram obtidos da Millipore (St Charles, MO; Temecula, California, USA). $[U-^{14}C]$ -2-Deoxi-D-glicose, atividade específica de 9,25 GBq/mmol, $[Metil-^{14}C]$ -Timidina, atividade específica de 1,74 GBq/mmol e líquido de cintilação biodegradável foram obtidos da Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences (Boston, MA, USA). Todos os outros reagentes químicos foram de grau analítico.

2.2 Isolamento e caracterização química do AU

Folhas de *R. officinalis* (1500 g) adquiridas da Indústria Quimer Produtos Naturais foram submetidas a maceração em etanol (96%) durante 15 dias à temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Posteriormente, o extrato foi filtrado e em seguida concentrado sob pressão reduzida (aproximadamente a 60 °C). Este procedimento foi repetido três vezes. Após a remoção do solvente, o extrato etanólico foi seco por liofilização originando 153 g de um sólido castanho esverdeado. O extrato bruto foi submetido à passagem em uma coluna curta de gel de sílica (Vetec-63-230 mesh) com hexano, acetato de etila e etanol, em ordem de polaridade, produzindo três frações: hexânica (HEX), acetato de etila (EtOAc) e etanólica (EtOH). Parte da fração EtOAc (8,83 g) foi submetida a coluna gel de sílica e eluída com gradiente de hexano-acetato de etila em polaridade crescente, gerando 33 frações. As frações 20-33 eluídas com uma solução hexano-acetona (8:2 v/ v) foram combinadas e purificadas por cromatografia (coluna de gel de sílica; Vetec -230-400 mesh) com eluição isocrática (hexano: acetona 4:1 v/ v) produzindo ácido ursólico (87 mg). Ácido ursólico foi identificado através de análise de dados de infra vermelho (IR), ressonância magnética nuclear (RMN) e comparação com a literatura (Mahato e Kundu, 1994).

2.3 Animais

Ratos machos Wistar com 50-55 dias de idade (180-210 g) foram utilizados. Os ratos foram criados em biotério e alojados em biotério setorial com ar condicionado (cerca de 21 ± 2 °C), com iluminação controlada (luzes acesas 6:00-18:00 h). Os animais foram mantidos com ração (Nuvital, Nuvilab CR1, Curitiba, PR, Brasil), e água disponível *ad libitum*. Ratos em jejum foram privados de alimento durante 16 h, mas livre acesso à água. Todos os animais foram cuidadosamente monitorados e mantidos de acordo com as normas do Comitê de Ética local para Uso de Animais (CEUA-Protocolo UFSC PP00414).

2.4 Curva oral de tolerância à glicose

Ratos em jejum foram divididos em três grupos de seis animais. Grupo I, ratos hiperglicêmicos que receberam glicose (4 g/ kg, 8,9 M); Grupo II, ratos hiperglicêmicos que receberam o veículo, 2,5% de Tween 80; Grupo III, os ratos hiperglicêmicos que receberam AU (0,1; 1 e 10 mg/ kg). A glicemia foi medida antes de qualquer tratamento (tempo zero). Imediatamente, os ratos receberam o tratamento (veículo ou AU) e após 30 min receberam uma sobrecarga de glicose. A curva de tolerância à glicose foi iniciada apenas após a sobrecarga de glicose e, em seguida, a

glicemia foi medida em 15, 30, 60 e 180 min. Todos os tratamentos foram administrados via gavagem. O sangue foi coletado para determinação da glicemia pelo método da glicose-oxidase (Varley et al., 1976), e da concentração de insulina no soro.

2.5 *Dosagem sérica de insulina*

A concentração de insulina foi determinada por ELISA, de acordo com as instruções do fabricante. O espectro de valores detectados por este ensaio foi de 0,2-10 ng/ mL. Os coeficientes de variação intra-e inter-ensaio de insulina foram 3,22 e 6,95, respectivamente, com um valor de sensibilidade de 0,2 ng/ mL. A concentração de insulina foi estimada por meio de medida colorimétrica a 450 nm com um leitor de placas ELISA (Organon Teknika, Roseland, New Jersey, EUA) através de interpolação de uma curva padrão. As amostras foram analisadas em duplicata e os resultados foram expressos como ng/ mL de insulina sérica (Damazio et al., 2010).

2.6 *Conteúdo de glicogênio*

O músculo sóleo de ratos hiperglicêmicos e tratados com AU (0,1 e 10 mg/ kg) ou não (controle) foi removido 180 minutos após a sobrecarga de glicose (4 g/ kg) e o conteúdo de glicogênio foi determinado. O glicogênio foi isolado a partir do tecido de acordo com Krisman et al (2010) e os resultados foram expressos em mg de glicogênio/ g de tecido (Castro et al., 2014).

2.7 *Estudos de captação de ^{14}C -deoxiglicose em músculo sóleo de ratos*

Para ensaios de captação de $[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{-2-Deoxi-D-glicose}$, foram utilizados os músculos sóleo de ratos submetidos a jejum. Fatias de músculo foram distribuídas entre o grupo basal e tratado. Os músculos foram dissecados, pré-incubados (30 min) e em seguida incubados (60 min) a 37 °C, O_2/CO_2 (95%:5%, v/v), pH 7,4 em Krebs Ringer bicarbonato (KRb) com uma composição de NaCl (122 mM), KCl (3 mM), MgSO_4 (1,2 mM), CaCl_2 (1,3 mM), KH_2PO_4 (0,4 mM) e NaHCO_3 (25 mM). AU (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} e 10^{-12} M) foi adicionado ao meio de pré-incubação (30 min) e incubação (60 min) em presença ou ausência de HNMPA-AM (100 μM), wortmannin (100 nM), colchicina (1 μM), EGTA (2 mM), BAPTA-AM (50 μM), nifedipina (1 μM), flunarizina (1 μM), U73122 (1 μM), KN93 (10 μM), RO 318220 (40 μM), cicloheximida (350 μM) ou PD 98059 (50 μM). ^{14}C -deoxiglicose (0,1 $\mu\text{Ci/mL}$) foi adicionado a cada amostra durante o período de incubação. As amostras foram processadas de acordo com

(Cazarolli et al., 2009). Para a quantificação das proteínas totais foi usado o método de Lowry et al. (1951). Os resultados da captação de glicose foram expressos como unidades de glicose captada em nmol/ mg de proteína.

2.8 Estudos de incorporação de timidina ao DNA

Para análise da incorporação de [Metil-¹⁴C]-Timidina ao DNA, fatias de músculo sóleo foram distribuídas (alternadamente à esquerda e à direita) entre os grupos controle e tratados. Os músculos foram dissecados, pré-incubados (30 min) e incubados (60 min) a 37 °C em tampão KRb com O₂/CO₂ (95%: 5%, v/ v), pH 7,4. AU (1 nM) foi adicionado à pré-incubação (30 min) e incubação (60 min). ¹⁴C-timidina (0,5 µCi/ mL) foi adicionada a todas as amostras durante o período de incubação. Após a incubação, os músculos foram inseridos em KRb frio e processado de acordo com Castro et al. (2014). Os resultados foram expressos como cpm/ µg de proteína.

2.9 Análise de eletroforese em gel de poliacrilamida e 'immunoblotting'

Para o homogeneizado total muscular, músculos sóleos foram incubados (105 min) com/ sem AU (1 nM), homogeneizados em uma solução de lise contendo EDTA (2 mM), Tris-HCl (50 mM, pH 6,8) e SDS (4% p/ v) e a concentração total de proteína foi determinada. Para a análise de eletroforese, as amostras foram dissolvidas em solução contendo glicerol (40%), mercaptoetanol (5%) e Tris-HCl (50 mM, pH 6,8) e fervidas durante 3 min. As concentrações protéicas iguais foram carregadas em géis de poliacrilamida (12%) e analisadas por SDS-PAGE de acordo com o sistema descontínuo de Laemmli (Laemmli, 1970) e transferidas para membranas de nitrocelulose durante 1 h a 15 V em tampão de transferência (Trizma 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20 % e 0,25% de SDS). As membranas de nitrocelulose foram incubadas durante 2 horas em solução de bloqueio (TBS, 0,5 M de NaCl e Trizma 20 mM, mais 5% de leite em pó desnatado) e em seguida incubadas por 18 h a 4 °C com anti-GLUT4 diluído (1:500). As membranas foram incubadas durante 2 h com IgG anti-coelho (1:1000) e as bandas imunorreativas foram visualizadas utilizando o kit de quimioluminescência Immobilon™ Western com substrato de HRP (Zanatta et al., 2011). Autorradiogramas foram quantificadas por digitalização dos filmes com um scanner Scanjet 6100C Hewlett-Packard e determinadas as densidades ópticas com o software OptiQuant versão 02.00 (Packard Instrument Company).

2.10 Análises de Imunofluorescência

Músculos sóleo foram incubados (105 min) com/ sem 1 nM de AU, ou removidos 180 min após tratamento oral com AU 1 mg/kg, fixados com paraformaldeído (4%), desidratados e embebidos em parafina, tal como descrito por dos Santos et al (2012). Blocos representativos de tecidos embebidos em parafina foram cortados com 5 µm de espessura, desparafinizados, reidratados e colocados em tampão citrato (10 mM, 8 min a 37 °C) para a recuperação antigênica. As secções foram submetidas a uma solução de bloqueio de BSA a 3% e 1% de Igepal em PBS durante 1 h a 37 °C e incubadas durante 18 h a 7 °C, com anticorpo anti-GLUT4 (1:500) na mesma solução. Após várias lavagens, as secções foram incubadas durante 1 h a 37 °C com anticorpo anti-camundongo conjugado a Cy3 (1:500, Sigma) na mesma solução e, em seguida, contrastadas com DAPI. As secções foram então montadas em reagente FluorSave (Calbiochem). A análise de distribuição de GLUT4 no tecido foi meramente qualitativa (adaptado a partir de Barros et al., 2006).

2.11 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para a observação ao microscópio eletrônico de transmissão (MET), fatias de pâncreas de rato foram incubadas na presença de AU (1 nM) durante 5 ou 20 min, e foram fixadas por 18 h com glutaraldeído (2,5%) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) mais sacarose (0,2 M) (Schmidt et al., 2009). O material foi pós-fixado com tetróxido de ósmio a 1% durante 3 h, desidratado em gradiente de acetona e embebidos em resina *Spurr*. Em seguida, as seções finas foram coradas com acetato de uranila seguido por citrato de chumbo de acordo com Reynolds et al (1963). Quatro réplicas foram preparadas para cada grupo experimental; duas amostras por repetição foram examinadas sob MET (Jeol JEM1011 a 80 kV) no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME, UFSC, Brasil). Foi avaliada a relação de vesículas citoplasmáticas de insulina por células β (Annerén et al., 2007).

2.12 PCR em tempo real

Ácido ribonucleico total foi extraído dos tecidos utilizando reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acordo com o protocolo do fabricante. Um µg de RNA foi reversamente transcrito com Superscript III (Invitrogen). A amplificação por PCR em tempo real foi realizada usando 2 µL de cDNA, *primers* específicos para cada gene e SYBR Green reagente (Invitrogen), em um volume final de 10 µL. O método de

$2^{-(\Delta Ct)}$ (Livak e Schmittgen et al., 2001) foi usado para calcular os valores ΔCt . Além disso, a β -actina foi utilizada como controle interno. As seqüências de primers utilizadas foram as seguintes: GLUT4: senso: 5'-CGCGGCCTCCTATGAGATAC-3'; anti-senso: 5'-CCTGAGTAGGCGCCAATGA-3' β -actina: senso: 5'-TGTTACCAACTGGGACGA-3'; anti-senso: 5'-GGGGTGTGAAGTCTCA-3'

2.13 Dosagens séricas de cálcio e lactato desidrogenase

A concentração sérica de cálcio e lactato desidrogenase (LDH) foi determinada após 180 minutos de tratamento com AU por via oral (1 mg/kg). Amostras de sangue e soro foram usadas para determinar atividade da LDH extracelular. Além disso, a concentração sérica de cálcio foi determinada de acordo com as instruções do fabricante (Castro et al., 2014).

2.14 Dados e análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. análise de uma e duas vias de variância (ANOVA), seguido de pós-teste de Bonferroni ou teste t de Student não pareado foram utilizados para determinar diferenças significativas entre os grupos. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

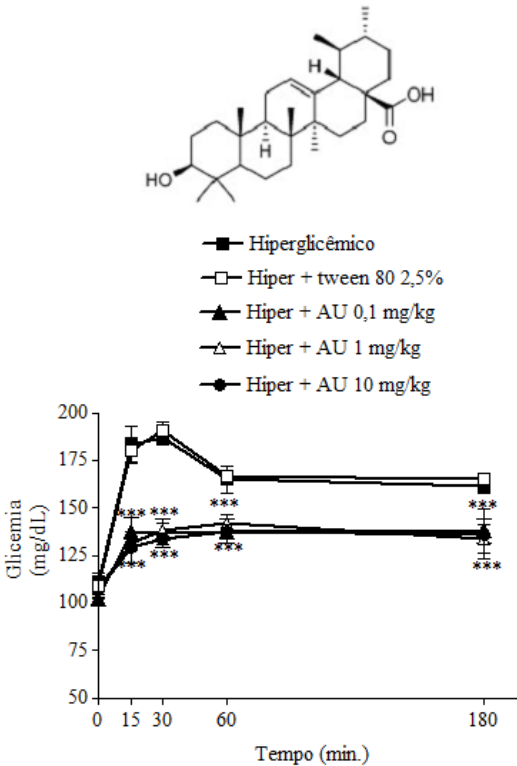
3. Resultados

3.1 Efeito do AU na glicemia e secreção de insulina

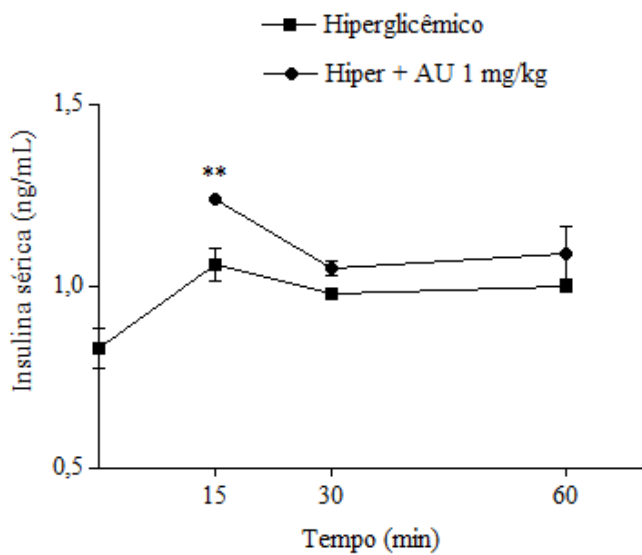
A figura 1A mostra a estrutura e a glicemia de ratos hiperglicêmicos após tratamento oral com AU (0,1, 1 e 10 mg/kg). Este triterpeno foi eficaz na redução da glicemia em todas as doses testadas durante o período estudado, quando comparado com o grupo controle hiperglicêmico. O tratamento com 0,1, 1 e 10 mg/kg mostrou um efeito sustentado 15-180 min, melhorando significativamente a curva de tolerância à glicose. Em termos de porcentagem, o composto reduziu em cerca de 28, 27, 17 e 16% a glicemia, quando comparado com o respectivo tempo do grupo hiperglicêmico. Além disso, a presença do veículo (Tween 80 2,5%) não alterou o perfil da glicemia durante o período estudado, quando comparado com o grupo hiperglicêmico. Levando-se em consideração o efeito antihiperglicêmico do AU após tratamento *in vivo*, a concentração de insulina no soro foi determinada em ratos em jejum após uma sobrecarga oral de glicose. Além disso, o

tratamento com AU potencializou significativamente a secreção de insulina induzida pela glicose em 15 minutos em ratos hiperglicêmicos (figura 1B). Ainda, como mostrado na figura 2, os grânulos de insulina presentes nas células- β se acumulam em torno da membrana plasmática. Após a incubação de amostras de pâncreas com AU 1 nM durante 5 min, se observou uma redução nos grânulos de insulina de cerca de 24% quando comparado com o respectivo controle hiperglicêmico. Além disso, após 20 min de incubação, AU não foi capaz de alterar a quantidade de vesículas de insulina em células β quando comparado com o respectivo grupo controle hiperglicêmico (Tabela 1).

Fig. 1. Estrutura e efeito do ácido ursólico (AU) na curva oral de tolerância à glicose (A) e secreção de insulina em ratos hiperglicêmicos (B). Valores em média \pm E.P.M. $n=5$. Significativo em *** $p<0,001$ e ** $p<0,01$ em comparação com respectivo controle hiperglicêmico.



(A)



(B)

Fig. 2. Efeito do ácido ursólico (AU) no conteúdo de vesículas insulínicas em amostras de pâncreas incubadas *in vitro* em meio hiperglicêmico. Tempo de incubação= 5 ou 20 min. Os quadros A e B indicam os controles com tempo de incubação de 5 e 20 min, respectivamente; Os quadros C e D representam as amostras incubadas em presença de ácido ursólico nos períodos de 5 e 20 min, respectivamente.

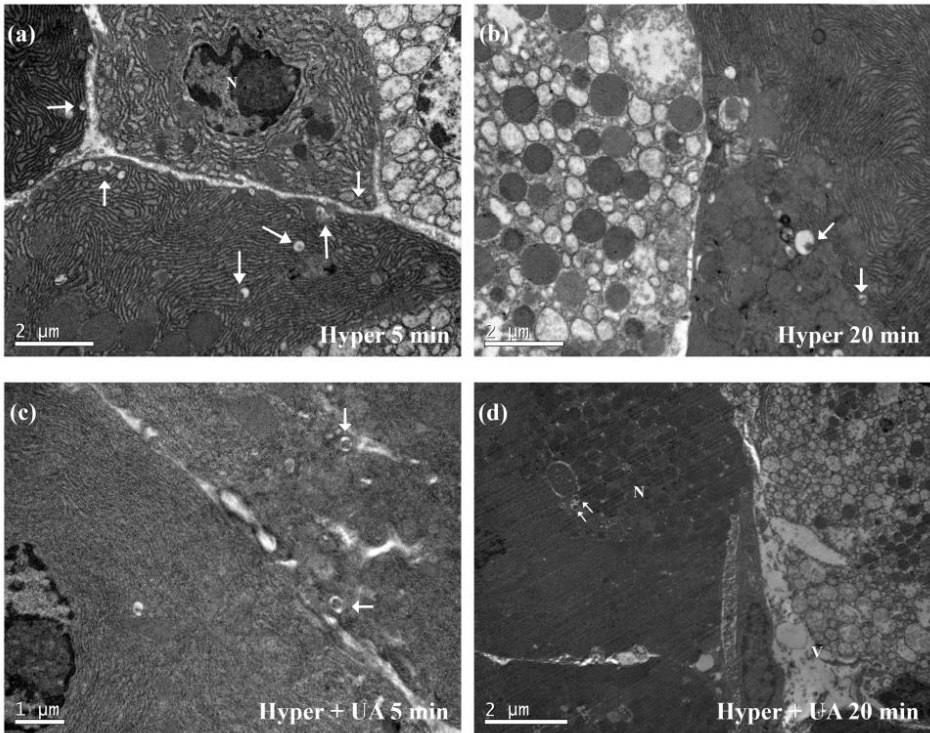


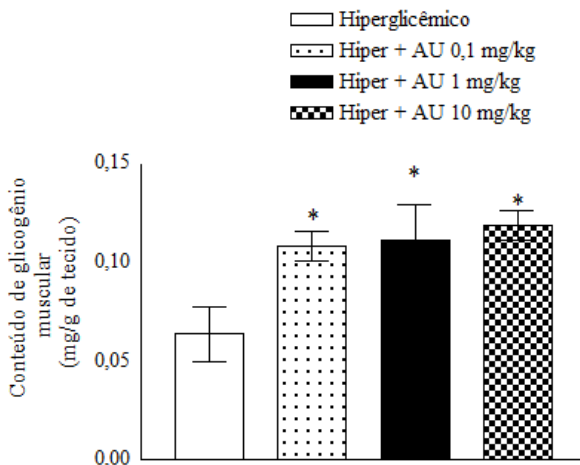
Tabela 1. Proporção de vesículas insulínicas citoplasmáticas por célula β na presença de 1 nM de ácido ursólico (AU) (tratados) ou não (controle) na primeira e segunda fase de secreção de insulina. Tempo de incubação= 5 e 20 min com/sem AU. n= 29 para o grupo controle hiperglicêmico em 5 min; n= 29 para hiper + grupo AU em 5 min; n= 16 para o grupo controle hiperglicêmico em 20 min e n= 23 para hiper + AU em 20 min. Cada grupo foi analisado em triplicata.

Tempo	Vesículas citoplasmáticas/célula			
	5 min		20 min	
	Hiper	Hiper + AU	Hiper	Hiper + AU
	4,03	0,96	1,62	1,65

3.2 Efeito do AU no conteúdo de glicogênio muscular

A figura 3 mostra o efeito do AU após tratamento *in vivo* no conteúdo de glicogênio muscular. O tratamento de ratos hiperglicêmicos com 0,1 e 10 mg/ kg de AU aumentou o conteúdo de glicogênio no músculo sóleo 3 h após o tratamento por via oral em comparação com o grupo controle hiperglicêmico. Além disso, a dose de 10 mg/ kg fortemente aumentou o conteúdo de glicogênio (em cerca de 2 vezes), quando comparado com o grupo controle hiperglicêmico.

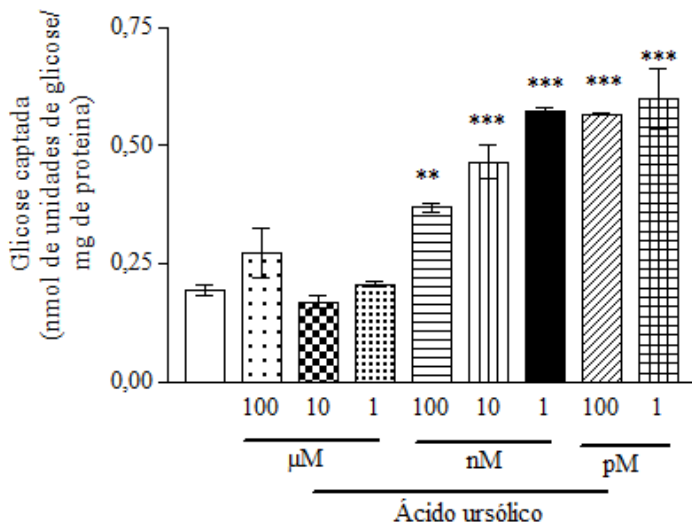
Fig. 3. Efeito do ácido ursólico (AU) no conteúdo de glicogênio do músculo sóleo em ratos hiperglicêmicos 180 min após o tratamento por sonda oral. Os valores são expressos como média \pm E.P.M. com $n = 5$ para cada grupo. Estatisticamente significativo em $*p < 0,05$ em comparação com o grupo controle hiperglicêmico.



3.3. Mecanismo de ação do AU na captação de glicose no músculo sóleo e o efeito na incorporação de timidina no DNA

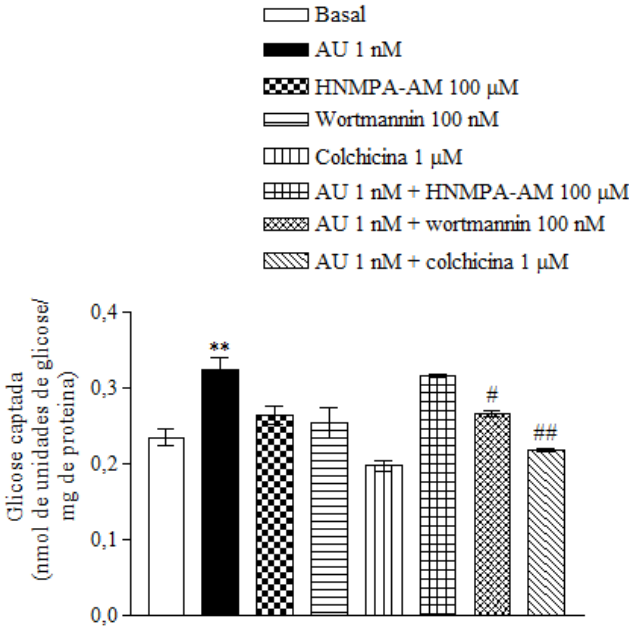
Na sequência destes estudos, o efeito *in vitro* de AU (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} e 10^{-12} M) na captação de glicose no músculo sóleo de rato durante 60 min de incubação foi analisado. O efeito estimulatório de AU na captação de glicose foi significativo em 100; 10; 1; 0,1 e 0,001 nM e representa cerca de 2,0; 2,5; 3,0; 3,0 e 3,1 vezes quando comparado com o grupo basal, respectivamente (figura 4).

Fig.4. Curva de concentração-resposta do AU na captação de ^{14}C -deoxiglicose no músculo sóleo de ratos. Tempo de pré-incubação= 30 min; tempo de incubação= 60 minutos. Os valores são expressos como média \pm E.P.M.; $n = 6$ em duplicata para cada grupo. Significativo em ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$ em relação ao grupo controle.



Para determinar o mecanismo pelo qual o AU induz a captação de glicose no músculo sóleo, foi realizado o ensaio de captação de glicose com wortmannin 100 nM, um inibidor específico da PI3K, colchicina (1 μM), um agente despolimerizante de microtúbulos ou HNMPA(AM)₃ (100 μM), um inibidor do receptor tirosina-cinase da insulina. Em todos os casos, as concentrações utilizadas foram previamente ensaiadas e publicadas utilizando abordagem semelhante (Cazarolli et al., 2009; Cazarolli et al., 2012). A figura 5 mostra que o aumento na captação de glicose com AU 1 nM foi completamente inibida com o pré-tratamento com wortmannin e colchicina, enquanto que não foi observada inibição do estímulo do AU na presença de HNMPA(AM)₃. Quando somente os inibidores foram adicionados às amostras de músculo, nenhuma mudança significativa na captação de glicose foi observada em comparação com o grupo controle.

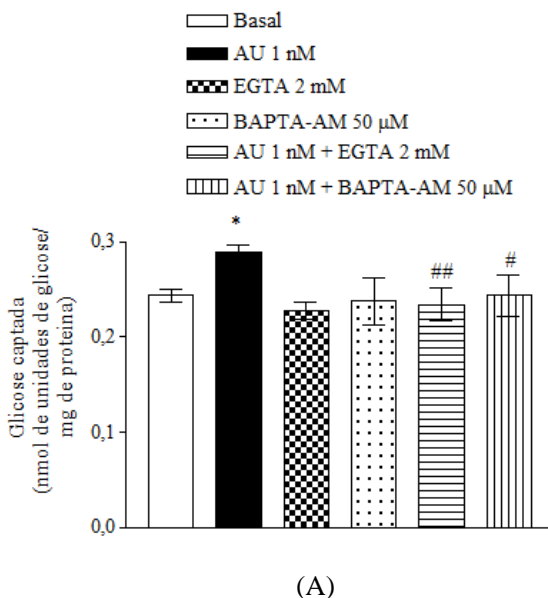
Fig. 5. Efeito do HNMPA-(AM)₃, colchicina e wortmannin na ação estimulante do ácido ursólico (AU) na captação de ¹⁴C-deoxiglicose no músculo sóleo de ratos. Grupo controle= nenhum tratamento. Tempo de pré-incubação= 30 min; tempo de incubação= 60 minutos. Os valores são expressos como média ± E.P.M.; n= 6 em duplicata para cada grupo. Significativo em ** $p \leq 0,01$ em relação ao grupo controle. Significativo em # $p \leq 0,05$ e ## $p \leq 0,01$ em relação ao grupo AU.

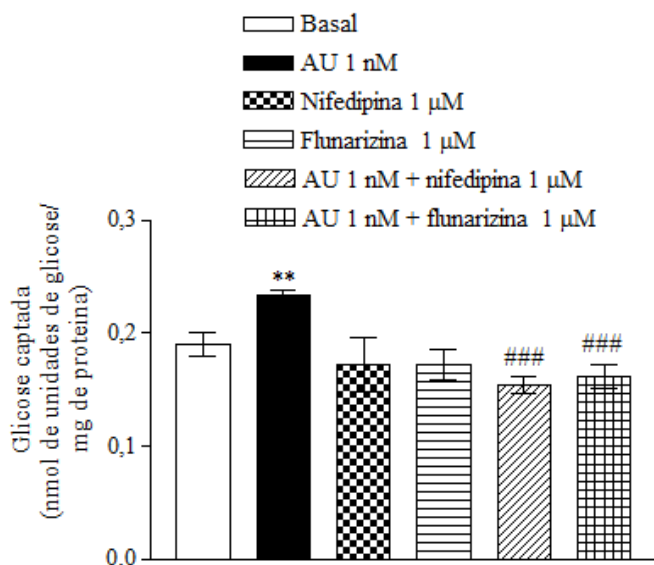


Para caracterizar mais precisamente os efeitos metabólicos do AU, foram utilizados BAPTA-AM (50 µM) (quelante de cálcio intracelular) e EGTA (2 mM) (quelante de cálcio extracelular) para investigar o envolvimento de cálcio na captação de glicose. Como pode ser visto na figura 6A, na presença de cada quelante, EGTA e BAPTA-AM, a ação estimulatória do AU na captação de glicose foi totalmente eliminada. Além disso, a fim de verificar a participação de canais de cálcio dependentes da voltagem do tipo L e T (L e T -VDCC) no mecanismo envolvido na ação do AU na captação de glicose, nifedipina (1 µM) e flunarizina (1 mM) foram utilizados para bloquear estes canais, respectivamente. Os resultados mostraram que a nifedipina e a flunarizina bloquearam completamente a captação de glicose estimulada por AU (figura 6B). Uma vez que os resultados indicaram que a concentração

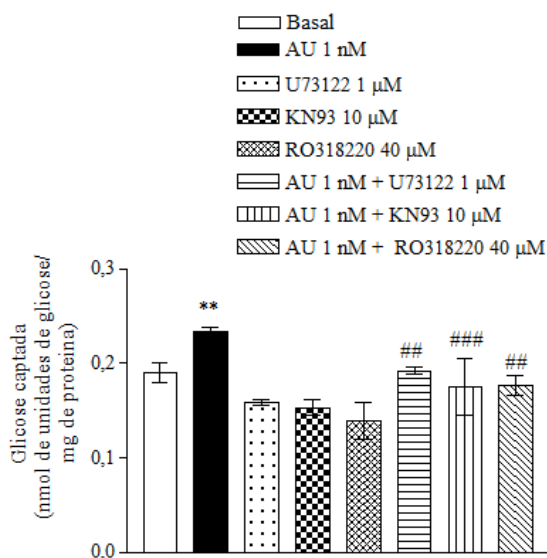
intracelular de cálcio e o influxo de cálcio extracelular através de canais de cálcio dependentes da voltagem do tipo L e T estão envolvidos na captação de glicose, também foi determinado se outras vias de sinalização intracelular podem desempenhar um papel no efeito estimulatório do AU na captação de glicose. A utilização de U73122 (1 μ M), KN93 (10 μ M), RO318220 (40 μ M) confirmam a participação da PLC, PKCaM II (uma cinase dependente de cálcio) e proteína cinase C atípica (aPKC) no mecanismo de ação do AU (figura 6C).

Fig. 6. Efeito do EGTA, BAPTA-AM (A), nifedipina, flunarizina (B), U73122, KN93 e RO318220 (C) na captação de glicose em músculo estimulado por ácido ursólico (AU). Significativo em $^* p \leq 0,05$ e $^{**} p \leq 0,01$ em relação ao grupo basal. Significativo em $^{\#} p \leq 0,05$, $^{\#\#} p \leq 0,01$ e $^{\#\#\#} p \leq 0,001$ em relação ao grupo AU.





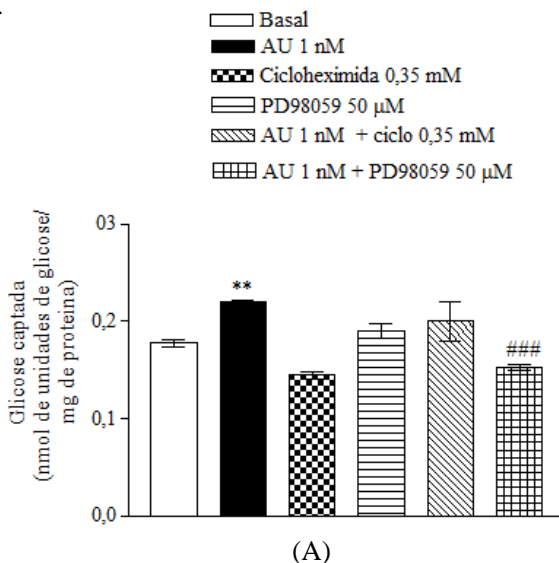
(B)

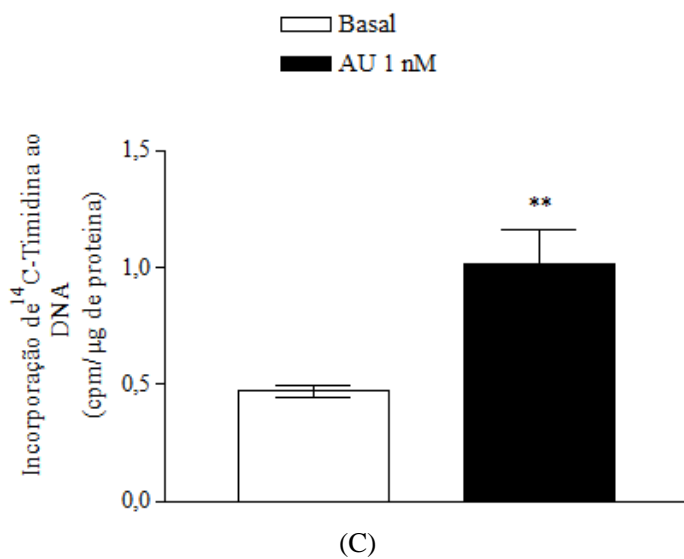
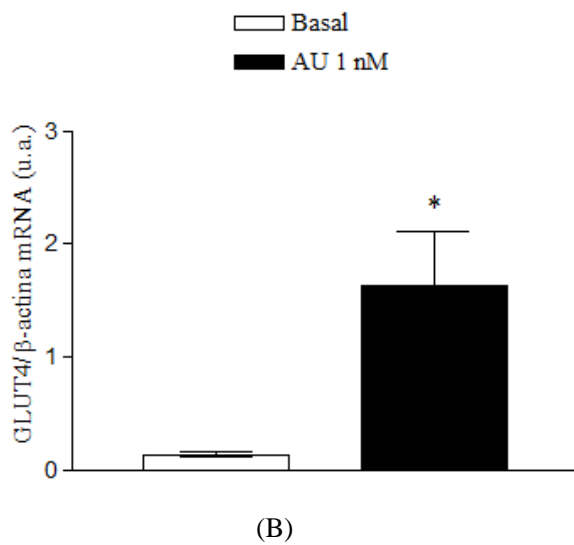


(C)

Para determinar se a transdução de sinais mediada por AU leva a vias de ações nucleares, tais como a via das MAPKs, de expressão gênica e/ ou a síntese geral de proteína, examinamos o efeito de PD 98059, um inibidor da via MEK/ ERK, e o efeito da cicloheximida na captação de glicose estimulada por AU, bem como a ação de AU na expressão de mRNA de GLUT4 (figura 7A e 7B). O efeito estimulatório do AU foi completamente bloqueado na presença de PD98059, enquanto a cicloheximida não alterou a captação de glicose induzida por AU no músculo. Além disso, por meio de RT-PCR, se observou que AU estimulou o aumento da expressão de mRNA de GLUT4 durante o período de incubação. Ainda, a incorporação de timidina no músculo sóleo foi também aumentada na presença de AU, quando comparados com o grupo controle (figura 7C). Estes resultados indicam que o AU pode atuar através da atividade nuclear e da via das MAPKs, onde ambos também estão envolvidos nas cascatas de fosforilação mediada pela insulina.

Fig. 7. Efeito da cicloheximida e do PD98059 no efeito estimulatório do ácido ursólico (AU) na captação de ^{14}C -deoxiglicose no músculo (A), efeito do AU na expressão de mRNA de GLUT4 (B) e efeitos do AU sobre a incorporação de ^{14}C -timidina no músculo (C). Pré-incubação= 30 min; Incubação= 60 minutos. Valores expressos como média \pm E.P.M. n= 6. Significativo em ** $p < 0,01$ comparado com o grupo de controle. Significativo em ### $p < 0,001$ em relação ao grupo AU.

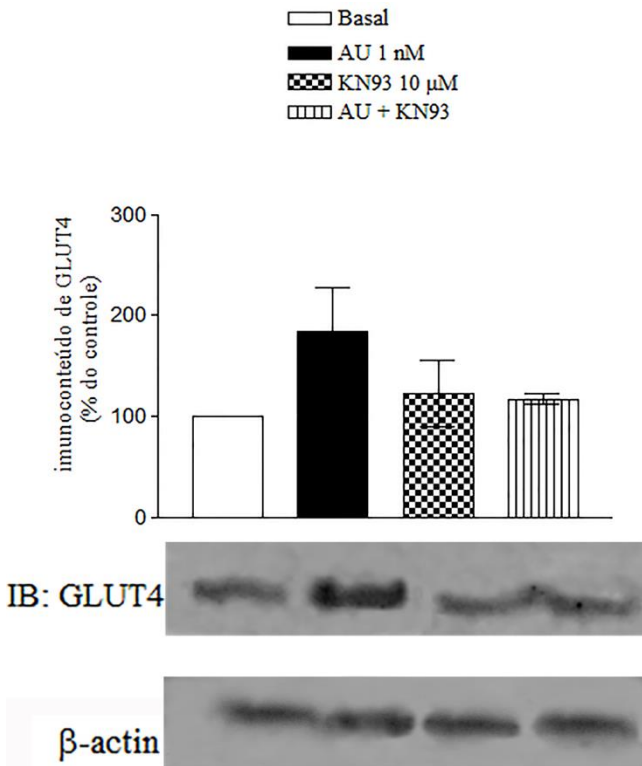




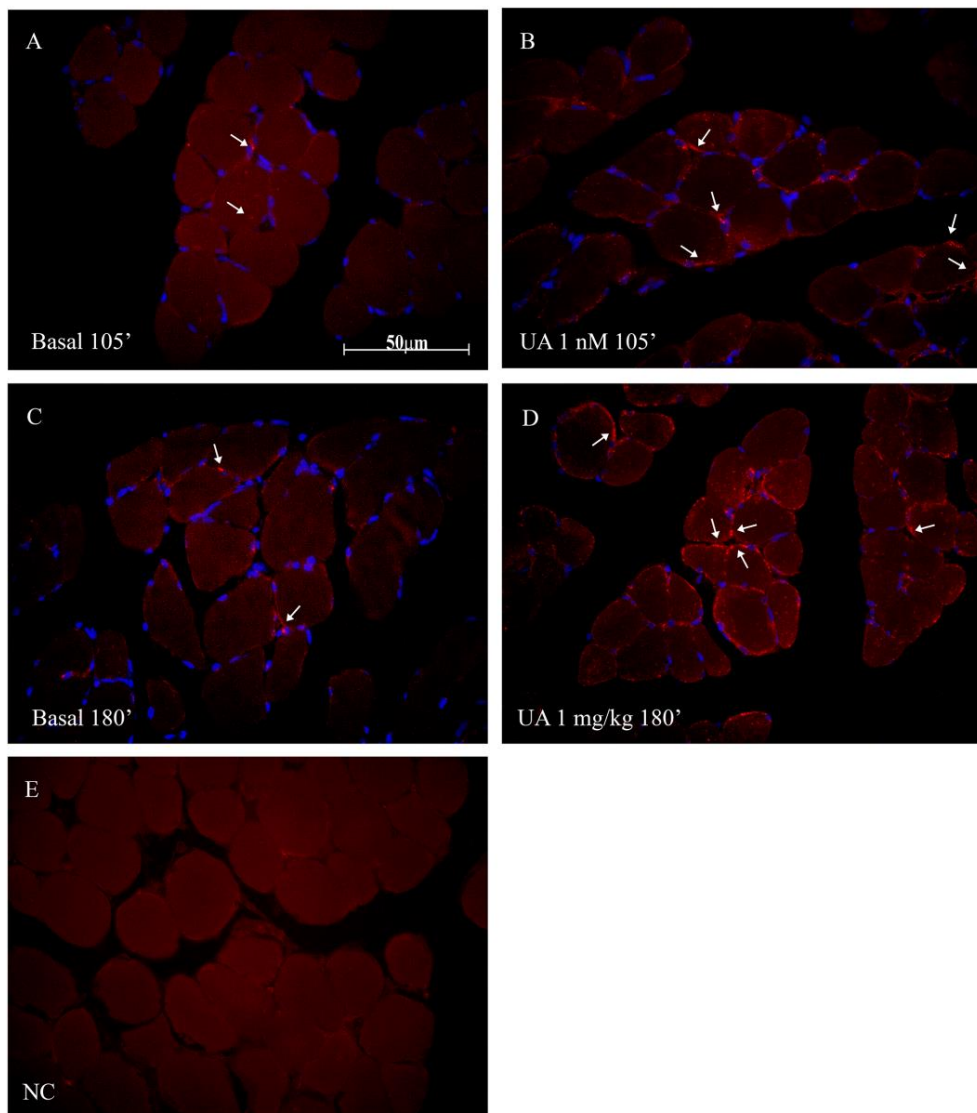
3.4 Efeito de ácido ursólico sobre o conteúdo de GLUT4

A figura 8A mostra o conteúdo total de GLUT4 no músculo. Foi observado um aumento significativo no GLUT4 total na presença do AU (cerca de 30%) após 105 min de incubação *in vitro*. O efeito agudo do controle positivo, a insulina, apresentou um efeito mais proeminente no conteúdo de GLUT4 (aumento de 76%) (resultados não mostrados). KN93 (10 μ M) não modificou o conteúdo de GLUT4, no entanto, na presença do triterpeno, este inibidor anulou o efeito estimulatório do UA no conteúdo de GLUT4. Além disso, a localização de GLUT4 no músculo após tratamento *in vitro* (105 min) com AU (painel B) e também para o tratamento *in vivo* com AU (180 min (painel D)) foi investigada por meio de estudo de imunofluorescência (Fig. 8B). A presença de GLUT4 em membranas plasmáticas foi substancialmente aumentada por AU 1nM em 105 min de incubação (*in vitro*), bem como após 180 min de tratamento (*in vivo*) com 1 mg/kg de AU em comparação com o respectivo grupo basal (painel A e C). Um controle negativo foi realizado incubando as fatias sem o anticorpo primário anti-GLUT4, demonstrando imunoreatividade negativa (painel E). Esta análise qualitativa está de acordo com o efeito de AU no conteúdo total de GLUT4, reforçando os resultados apresentados na Fig. 8A.

Fig. 8. Efeito do AU no conteúdo total de GLUT4 (extrato de tecido inteiro) no músculo sóleo (A). Imunolocalização de GLUT4 no músculo sóleo (B). Em 105 min (*in vitro*): Painel A (Basal 105 min), painel B (AU 1 nM 105 min), painel C (controle negativo - NC). GLUT4 foi imunocorado com Cy3 (vermelho) e a imunofluorescência revelou a presença de GLUT4 na membrana plasmática dos músculos tratados com 1 nM de AU (setas). β -actina foi utilizada como controle de carga e os núcleos foram corados com DAPI (azul). A barra de escala é de 50 μ m. Os valores são expressos como média \pm E.P. M. n= 4 para três ensaios independentes. Significativo em *** $p < 0,001$ comparado com o grupo controle.



(A)

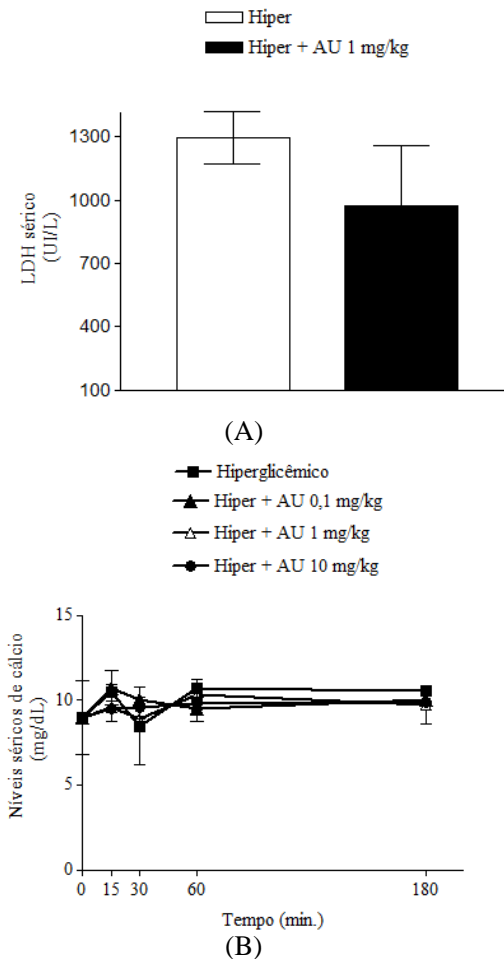


(B)

3.5 Efeito do AU na concentração de cálcio e de LDH sérico

A fim de verificar a potencial toxicidade deste composto, a atividade da LDH e cálcio sérico foram avaliados após o tratamento oral com AU. A dose de 1 mg/ kg oralmente administrada não alterou a concentração sérica de LDH nem de cálcio (Figura 9A e 9B), o que indica que nesta condição experimental, AU por via oral não causou efeitos tóxicos nem alterou a homeostasia do cálcio sérico.

Fig. 9. Efeito de AU na lactato desidrogenase (A) e no cálcio sérico (B). Os valores são expressos como média \pm E.P.M. com n= 5 para cada grupo.



4. Discussão

Ácido ursólico, um triterpeno pentacíclico do tipo ursano é descrito por apresentar influência no metabolismo dos carboidratos (Jang et al., 2009; Azevedo et al., 2010; Jang et al., 2010; Wang et al., 2010). No presente estudo, o efeito antihiper-glicêmico do AU indica que este composto pode controlar a hiper-glicemia, uma vez que significativamente reduz as concentrações séricas de glicose e potencia o efeito da glicose na secreção de insulina. Isto está de acordo com os resultados observados por Jang et al (2009) e Jayaprakasam et al. (2006), que mostraram aumentos significativos na concentração de insulina com a preservação das células- β pancreáticas e modulação da glicemia em ratos diabéticos e C57BL/6 ratos obesos após uma suplementação dietética com AU. Além disso, outros triterpenos também são conhecidos por melhorar a glicemia e a secreção de insulina, tais como o ácido betulínico, α e β -amirina e ácido oleanólico (Jang et al., 2009; Teodoro et al., 2008; de Melo et al., 2009; Singh et al., 2009; Castro et al., 2014). Nossos resultados sugerem que o AU age pelo aumento da secreção de insulina armazenada em vesículas e induz a translocação de grânulos, apontando um efeito imediato do triterpeno na primeira fase da secreção de insulina. Além disso, AU potencializa a secreção de insulina induzida pela glicose como caracterizado no perfil da concentração de insulina no soro nesta abordagem.

Em tecidos como músculo esquelético e fígado, a insulina promove a captação de glicose e a síntese de glicogênio, constituindo um importante mecanismo de controle glicêmico (Hardie, 2012). O AU aumentou significativamente o conteúdo de glicogênio no músculo esquelético que está de acordo com o efeito no conteúdo de glicogênio do fígado após tratamento *in vivo* (Azevedo et al., 2010). Como previamente demonstrado, vários triterpenos apresentam influência no metabolismo do glicogênio, especialmente através da inibição da atividade da fosforilase do glicogênio ou aumento na fosforilação da AMPK e GSK-3 β (Zhang et al., 2009; Wen et al., 2008; Zhu et al., 2009; Ha et al., 2009; Liang et al., 2011). Dessa forma, o aumento na deposição de glicogênio muscular associado com maior concentração de insulina sérica induzida por AU contribui para a redução na glicemia observada em ratos hiper-glicêmicos.

Os resultados apresentados aqui implicam o AU como um agente antidiabético, no entanto, os mecanismos através dos quais este composto melhora a glicemia continuam a ser elucidados. O AU significativamente estimulou a captação de glicose no músculo esquelético e este efeito foi inibido por wortmannin e colchicina, apontando para o envolvimento de PI3K e a integridade de microtúbulos na captação de glicose induzido

pelo AU. Já é demonstrado que a captação da glicose induzida por insulina no músculo é através de sinalização por meio do receptor de insulina, de PI3K e da integridade do citoesqueleto, terminando com a translocação de GLUT4 e a captação de glicose (Kanzaki, 2006; Chen et al., 2008). Para vários triterpenos e derivados, tais como AU, ácido paquímico, ácido betulínico, ácido oleanólico e o ácido corosólico foram demonstrados que estimulam a captação de glicose através do aumento da auto-fosforilação e/ou ativação de IR β , PI3K, AKT e IRS1, componentes da clássica via de sinalização da insulina. Além disso, estes compostos estimularam a translocação de GLUT4 em adipócitos 3T3-L1, células CHO/HIR, músculo esquelético e em modelos *in vivo* (Miura et al., 2004; Jung et al., 2007; Huang et al., 2010; Lee e Thuong, 2010; Shi et al., 2008; Castellano et al., 2013; Castro et al., 2014).

A partir dos resultados, verificamos que o envolvimento de PI3K no efeito estimulatório de AU na captação de glicose, assim como a atividade de tirosina-cinase do RI não parece ser essencial para a ativação completa da captação de glicose induzido por AU. Isto está de acordo com os resultados que mostram que o AU não teve efeito na auto-fosforilação IR β e na atividade do RI do tipo tirosina-cinase, em concentrações até 10 ng/ ml (cerca de 20 μ M). A ativação da auto-fosforilação de IR β por AU foi observada apenas em concentrações acima de 50 μ g/ mL (aproximadamente 0,1 μ M) (Jung et al., 2007). Embora o AU aparenta não ativar diretamente o RI em baixas concentrações, estimulou significativamente o transporte de glicose, o que denota que o AU pode atuar através da inibição de proteínas tirosina-fosfatases que provocam a desfosforilação de moléculas de sinalização, encerrando assim a sinalização de insulina (Zhang et al., 2006). Vários triterpenos e derivados já foram descritos como potentes inibidores de PTPases, especialmente da PTP1B (Shi et al., 2008; Zhang et al., 2008; Choi et al., 2009). Levando isto em consideração, acreditamos que o AU pode agir como um insulino-sensibilizador por elevar a fosforilação do receptor de insulina indiretamente (por inibição da PTP1B?) ou como um agente insulinomimético agindo através da cascata de sinalização da insulina.

Além do clássico papel da via da PI3K no efeito estimulatório do AU na captação de glicose, o envolvimento de segundos mensageiros intracelulares potencialmente associados com vias de insulina que aumentam a captação de glicose foram investigados. Como uma importante molécula de sinalização intracelular, o cálcio é necessário para a contração muscular e atua como um segundo mensageiro em vias dependentes e independentes de insulina, que levam à captação de glicose (Wijesekara et al., 2006; Lanner et al., 2008). No músculo esquelético, a

concentração citosólica de cálcio livre é rigidamente controlada pelo influxo do meio extracelular ou da liberação do retículo sarcoplasmático (Berridge et al., 2003). É relatado que a insulina aumenta a $[iCa^{2+}]$, que envolve tanto a mobilização de cálcio intracelular e extracelular e este efeito está positivamente correlacionado com a captação de glicose, induzida pela insulina no músculo (Lanner et al., 2006; Lanner et al., 2008; Mohankumar et al., 2012). Além disso, a insulina induz um aumento na concentração de cálcio na região próxima a membrana através de mecanismo dependente de canais de cálcio do tipo L e a captação de glicose induzida é atenuada por bloqueadores de canais de Ca^{2+} do tipo L (Cartee et al., 1992; Bruton et al., 1999; Lanner et al., 2006). Nossos resultados indicam que a absorção de glicose induzida pelo AU pode resultar de mobilização do cálcio extracelular bem como do cálcio citosólico, uma vez que a quelação do cálcio com o EGTA e BAPTA-AM bloqueou completamente o efeito estimulatório na captação de glicose. Este resultado está de acordo com os relatados para o ácido oleanólico, ácido asiático e ácido maslínico que aumentam o conteúdo celular de cálcio, estimulando o influxo de Ca^{2+} extracelular ou a liberação de Ca^{2+} intracelular (Lee et al., 2002; Lee et al., 2007; Wu et al., 2011). Além disso, os resultados aqui relatados sugerem que a captação de glicose induzida pelo AU depende do influxo de cálcio através de canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo T e do tipo L (L e T-VDCC) como já descrito para o AU nas células do músculo cardíaco, bem como para a rotina no músculo esquelético (Cui et al., 2011; Kappel et al., 2013).

Além da abertura de canais de cálcio na membrana plasmática, a liberação de Ca^{2+} a partir dos estoques internos - geralmente do retículo endoplasmático (ER) - representa outro mecanismo importante envolvido no aumento da concentração de cálcio citosólico que altera o comportamento celular. Este processo pode ser induzido pelo próprio Ca^{2+} (liberação de cálcio induzida por cálcio) e/ ou por um grupo maior de mensageiros, tais como o inositol-1,4,5-trisfosfato (IP3), que estimulam ou modulam a liberação de cálcio dos estoques internos (Berridge et al., 2003). A síntese de inositol-1,4,5-trisfosfato (IP3) é acionada por uma família de enzimas de fosfolipase C, que são ativadas por diferentes mecanismos e estímulos (Brozinick et al., 2007). Há evidências de que a insulina ativa a fosfolipase C (PLC) de maneira dependente da PI3K, gerando o segundo mensageiro diacilglicerol (DAG) e IP3 de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2). O DAG ativa PKCs e o IP3 estimula a liberação de Ca^{2+} das reservas intracelulares (Lorenzo et al., 2002; Eichhorn et al., 2001; Van Epps-Fung et al., 1997). Vários

estudos sugerem que a PLC desempenha papel na translocação de GLUT4 e na captação de glicose estimulada por insulina, provavelmente, agindo através da geração de DAG e IP₃, que conduz à subsequente ativação de PKC ζ e ao aumento na [Ca²⁺] citosólico do retículo endoplasmático (Lorenzo et al., 2002; Eichhorn et al., 2001; Van Epps-Fung et al., 1997; Henriksen, et al., 1989; Wright et al., 2002; Wright et al., 2003). Os nossos resultados indicam que o efeito estimulatório do AU na captação de glicose envolve a atividade da PLC e aPKCs, provavelmente através de mecanismos dependentes de PI3K e de cálcio. Isto está de acordo com os mecanismos propostos acima pelo qual a insulina e a contração estimulam a captação de glicose. Além disso, foi demonstrado que triterpenos estimulam a atividade da PLC e PKCS, bem como a mobilização de cálcio na agregação plaquetária (Lee et al., 2007; Wang et al., 1994; Takahashi et al., 2002). Pelo que sabemos, este é o primeiro relato sobre triterpenos, especialmente AU, agindo através do PLC, aPKCs e cálcio citosólico para estimular a captação de glicose no músculo esquelético.

Considerando que o aumento na concentração intracelular de cálcio pode levar a formação do complexo cálcio-calmodulina com subsequente ativação da CaMKII (Maier et al., 2002) o envolvimento desta cinase também foi investigado na captação de glicose induzida por AU no músculo sóleo. A CaMKII é a isoforma predominante expressa no músculo esquelético e esta é ativada e auto-fosforilada pelo complexo cálcio-calmodulina (Maier et al., 2002; Wijesekara et al., 2006; Ojuka et al., 2012). A rede de sinalização da CaMKII-Ca²⁺ pode ser estabelecida como um ponto de convergência para a contração e captação de glicose mediada por insulina. É relatada a ativação de CaMKII para estimular a translocação de GLUT4 a superfície celular e a captação de glicose (Wright et al., 2009; Chin, 2004; Witczak et al., 2010; Mohankumar et al., 2012; Wright et al., 2004; Murgia et al., 2009). Adicionalmente, a CaMKII ativada também regula a expressão de GLUT4. A CaMKII é descrita por fosforilar e influenciar a ativação da via MAPK - MEK - ERK1/2 (Illario et al., 2009; Ojuka et al., 2012) e também por modular o aumento da interação do fator 2 intensificador de miócito (MEF2) e fator intensificador de GLUT4 (GEF) a seus sítios de ligação no gene do GLUT4 levando a aumento na síntese do GLUT4. Smith et al (2007 e 2008) demonstram que os níveis de mRNA e protéicos de GLUT4 são aumentados após exercício em experimentos *in vivo* e estes efeitos são inibidos na presença de KN-93, indicando que a atividade da CaMKII durante o exercício é necessário para a completa expressão de GLUT4. Nossos resultados demonstram a participação de CaMKII na captação de

glicose induzida por AU. Esta proteína é o potencial mediador para a atividade nuclear alterada pelo AU, que significativamente estimula a expressão de mRNA do GLUT4 e também incorporação de timidina no DNA. Adicionalmente, o efeito estimulatório do AU na captação de glicose envolve a via MAPKs que está de acordo ao aumento do conteúdo de GLUT4 no músculo após tratamento *in vitro*. Também, não exibe efeito citotóxico nem hipercalcêmico, mostrando assim uma fisiológica vantagem para um composto nutracêutico.

A influência de triterpenos na expressão de GLUT4 foi previamente reportada pelo nosso grupo para o ácido betulínico, ao qual regula positivamente (aumenta) o conteúdo de GLUT4 no músculo esquelético através do envolvimento da via das MAPKs e influenciando a síntese geral de proteína no músculo (Castro et al., 2014). Resultados similares foram também descritos para outros triterpenos, como o ácido paquímico, que aumenta a expressão de GLUT4 em adipócitos da linhagem 3T3-L1 após tratamento *in vitro* (Huang et al., 2010).

5. Conclusões

Em conclusão, o AU regula a homeostasia da glicose envolvendo mecanismos de secreção insulínica, com participação do cálcio em seu mecanismo de ação. O AU estimula a captação de glicose através de um “cross-talk” entre diferentes vias de sinalização, ligando vias que envolvem a participação de PI3K e MAPK com a via da Ca^{2+} -CaMKII tanto na translocação, bem como, na expressão de GLUT4 no músculo esquelético.

6. Declaração de conflito de interesse

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

7. Agradecimentos

Este estudo foi financiado pelo CNPq, CAPES; FAPESC e PPG-Bioquímica. Os autores expressam seus agradecimentos ao Gilberto Domingos Marloch e Eliana de Medeiros Oliveira (LAMEB II/ CCB-UFSC) pelo apoio técnico e agradecimento especial ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica de instalações no CCB/ UFSC. AJGC, MJSF e CPM são registradas no Programa de Pós-Graduação de Bioquímica da CCB/ UFSC.

Referências

Annerén, C. et al. Glucose intolerance and reduced islet blood flow in transgenic mice expressing the FRK tyrosine kinase under the control of the rat insulin promoter, *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 292 (2007) E1183-E1190.

Azevedo, M.F. et al. Ursolic acid and luteolin-7-glucoside improve lipid profiles and increase liver glycogen content through glycogen synthase kinase-3, *Phytother. Res.* 24 Suppl 2 (2010) S220-224.

Barros, R.P. et al. Muscle GLUT4 regulation by estrogen receptors ERbeta and ERalpha, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103 (2006) 1605-1608.

Berridge, M.J. et al. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4 (2003) 517-529.

Brozinick, J.T. et al. "Acting" on GLUT4: membrane & cytoskeletal components of insulin action, *Curr. Diabetes. Rev.* 3 (2007) 111-122.

Bruton, J.D. et al. Insulin increases near-membrane but not global Ca²⁺ in isolated skeletal muscle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96 (1999) 3281-3286.

Cartee, G.D. et al. Diverse effects of calcium channel blockers on skeletal muscle glucose transport, *Am. J. Physiol.* 263 (1992) R70-75.

Castellano, J.M. et al. Biochemical basis of the antidiabetic activity of oleanolic acid and related pentacyclic triterpenes, *Diabetes* 62 (2013) 1791-1799.

Castro, A.J. et al. Betulinic acid and 1,25(OH)₂ vitamin D₃ share intracellular signal transduction in glucose homeostasis in soleus muscle, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 48 (2014) 18-27.

Cazarolli, L.H. et al. Flavonoids: cellular and molecular mechanism of action in glucose homeostasis, *Mini. Rev. Med. Chem.* 8 (2008) 1032-1038.

Cazarolli, L.H. et al. Mechanism of action of the stimulatory effect of apigenin-6-C-(2"-O-alpha-l-rhamnopyranosyl)-beta-L-fucopyranoside on ¹⁴C-glucose uptake, *Chem. Biol. Interact.* 179 (2009) 407-412.

Cazarolli, L.H. et al. Natural and synthetic chalcones: tools for the study of targets of action - insulin secretagogue or insulin mimetic?. In: Atta-ur Rahman. (Org.). *Studies in Natural Products Chemistry* 1ed.: Elsevier, 2012, pp. 47-91.

Cazarolli, L.H. et al. Insulin signaling: a potential signaling pathway for the stimulatory effect of kaempferitrin on glucose uptake in skeletal muscle, *Eur. J. Pharmacol.* 712 (2013) 1-7.

Chen, Y. et al. A pre-docking role for microtubules in insulin-stimulated glucose transporter 4 translocation, *FEBS J.* 275 (2008) 705-712.

Chin, E.R. The role of calcium and calcium/calmodulin-dependent kinases in skeletal muscle plasticity and mitochondrial biogenesis, *Proc. Nutr. Soc.* 63 (2004) 279-286.

Choi, J.Y. et al. Isolation of betulinic acid, its methyl ester and guaiane sesquiterpenoids with protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity from the roots of *Saussurea lappa* C.B.Clarke, *Molecules* 14 (2009) 266-272.

Cui, H.Z. et al. Ursolic acid increases the secretion of atrial natriuretic peptide in isolated perfused beating rabbit atria, *Eur. J. Pharmacol.* 653 (2011) 63-69.

Damazio, R.G. et al. Antihyperglycemic activity of naphthylchalcones, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 1332-1337.

de Melo, C.L. et al. Betulinic acid, a natural pentacyclic triterpenoid, prevents abdominal fat accumulation in mice fed a high-fat diet, *J. Agric. Food. Chem.* 57 (2009) 8776-8781.

dos Santos, J.M. et al. The effect of age on glucose uptake and GLUT1 and GLUT4 expression in rat skeletal muscle, *Cell. Biochem. Funct.* 30 (2012) 191-197.

Eichhorn, J. et al. Insulin activates phospholipase C- γ 1 via a PI-3 kinase dependent mechanism in 3T3-L1 adipocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282 (2001) 615-620.

Ha, D.T. et al. Palbinone and triterpenes from Moutan Cortex (*Paeonia suffruticosa*, Paeoniaceae) stimulate glucose uptake and glycogen synthesis via activation of AMPK in insulin-resistant human HepG2 Cells, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 5556-5559.

Hardie, D.G. Organismal carbohydrate and lipid homeostasis, *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.* 4 (2012) a006031.

Henriksen, E.J. et al. Activation of glucose transport in skeletal muscle by phospholipase C and phorbol ester. Evaluation of the regulatory roles of protein kinase C and calcium, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 21536-21543.

Huang, Y.C. et al. Pachymic acid stimulates glucose uptake through enhanced GLUT4 expression and translocation, *Eur. J. Pharmacol.* 648 (2010) 39-49.

Illario, M. et al. Calcium-calmodulin-dependent kinase II (CaMKII) mediates insulin-stimulated proliferation and glucose uptake, *Cell. Signal.* 21 (2009) 786-792.

Jang, S.M. et al. Inhibitory effects of ursolic acid on hepatic polyol pathway and glucose production in streptozotocin-induced diabetic mice, *Metabolism.* 59 (2010) 512-519.

Jang, S.M. et al. Ursolic acid enhances the cellular immune system and pancreatic beta-cell function in streptozotocin-induced diabetic mice fed a high-fat diet, *Int. Immunopharmacol.* 9 (2009) 113-119.

Jayaprakasam, B. et al. Amelioration of obesity and glucose intolerance in high-fat-fed C57BL/6 mice by anthocyanins and ursolic acid in Cornelian cherry (*Cornus mas*), *J. Agric. Food. Chem.* 54 (2006) 243-248.

Jung, S.H. et al. Insulin-mimetic and insulin-sensitizing activities of a pentacyclic triterpenoid insulin receptor activator, *Biochem. J.* 403 (2007) 243-250.

Kanzaki, M. Insulin receptor signals regulating GLUT4 translocation and actin dynamics, *Endocr. J.* 53 (2006) 267-293.

Kappel, V.D. et al. Rutin potentiates calcium uptake via voltage-dependent calcium channel associated with stimulation of glucose uptake in skeletal muscle, *Arch. Biochem. Biophys.* 532 (2013) 55-60.

Krisman, C.R.; A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine, *Anal. Biochem.* 4 (1962) 17-23.

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680-685.

Lee, M.S.; Thuong, P.T. Stimulation of glucose uptake by triterpenoids from *Weigela subsessilis*, *Phytother. Res.* 24 (2010) 49-53.

Lanner, J.T. et al. Ca(2+) and insulin-mediated glucose uptake, *Curr. Opin. Pharmacol.* 8 (2008) 339-345.

Lanner, J.T. et al. The role of Ca²⁺ influx for insulin-mediated glucose uptake in skeletal muscle, *Diabetes* 55 (2006) 2077-2083.

Lee, Y.S. et al. Asiatic acid, a triterpene, induces apoptosis through intracellular Ca²⁺ release and enhanced expression of p53 in HepG2 human hepatoma cells, *Cancer. Lett.* 186 (2002) 83-91.

Lee, J.J. et al. Oleanolic acid, a pentacyclic triterpenoid, induces rabbit platelet aggregation through a phospholipase C-calcium dependent signaling pathway, *Arch. Pharm. Res.* 30 (2007) 210-214.

Liang, Z. et al. Identification of pentacyclic triterpenes derivatives as potent inhibitors against glycogen phosphorylase based on 3D-QSAR studies, *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 2011-2021.

Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods.* 25 (2001) 402-408.

Lorenzo, M. et al. PLC γ Participates in insulin stimulation of glucose uptake through activation of PKC ζ in brown adipocytes. *Exp. Cell. Res.* 278 (2002) 146-157.

Lowry, O.H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265-275.

Mahato, S.B.; Kundu, A. ^{13}C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids a compilation and some salient features. *Phytochem.* 37 (1994) 1517-1575.

Maier, L.S.; Bers, D.M. Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34 (2002) 919-939.

Miura, T. et al. Corosolic acid induces GLUT4 translocation in genetically type 2 diabetic mice, *Biol. Pharm. Bull.* 27 (2004) 1103-1105.

Mohankumar, S.K. et al. Domain-dependent modulation of insulin-induced AS160 phosphorylation and glucose uptake by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in L6 myotubes, *Cell. Signal.* 24 (2012) 302-308.

Murgia, M. et al. Multiple signalling pathways redundantly control glucose transporter GLUT4 gene transcription in skeletal muscle, *J. Physiol.* 587 (2009) 4319-4327.

Ojuka, E.O. et al. The role of CaMKII in regulating GLUT4 expression in skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 303 (2012) E322-331.

Reynolds, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy, *J. Cell. Biol.* 17 (1963) 208-212.

Salvador, J.A. et al. Ursane-type pentacyclic triterpenoids as useful platforms to discover anticancer drugs, *Nat. Prod. Rep.* 29 (2012) 1463-1479.

Schmidt, E.C. et al. Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure, *Micron.* 40 (2009) 860-869.

Silva, F.R. et al. Kaempferol and kaempferitrin: nutraceutical compounds contribute to glucose homeostasis by acting at multiple biological sites.

In: Garion Villers; Yves Fougere. (Org.). *Kaempferol: Chemistry, Natural Occurrences and Health Benefits*. 1ed. Nova science publishers, Inc., New York, 2013, pp. 1-45.

Singh, A.B. et al. Antihyperglycaemic activity of alpha-amyrin acetate in rats and db/db mice, *Nat. Prod. Res.* 23 (2009) 876-882.

Shi, L. et al. Corosolic acid stimulates glucose uptake via enhancing insulin receptor phosphorylation, *Eur. J. Pharmacol.* 584 (2008) 21-29.

Smith, J.A. et al. Exercise and CaMK activation both increase the binding of MEF2A to the Glut4 promoter in skeletal muscle in vivo, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292 (2007) E413-420.

Smith, J.A. et al. CaMK activation during exercise is required for histone hyperacetylation and MEF2A binding at the MEF2 site on the Glut4 gene, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295 (2008) E698-704.

Takahashi, K. et al. Protein kinase C activation by iridal type triterpenoids, *Biol. Pharm. Bull.* 25 (2002) 432-436.

Teodoro, T. et al. Oleanolic acid enhances insulin secretion in pancreatic beta-cells, *FEBS Lett.* 582 (2008) 1375-1380.

Van Epps-Fung, M. et al. A role for phospholipase C activity in GLUT4-mediated glucose transport, *Endocrinology* 138 (1997) 5170-5175.

Varley, H. et al. *Practical Clinical Biochemistry*, fifth ed. Heinemann IW, (eds.), London: Medical Books Ltd, 1976.

Wang, C.N. et al. C.T. Activation of human platelet phospholipases C and A2 by various oxygenated triterpenes, *Eur. J. Pharmacol.* 267 (1994) 33-42.

Wang, Z.H. et al. Anti-glycative effects of oleanolic acid and ursolic acid in kidney of diabetic mice, *Eur. J. Pharmacol.* 628 (2010) 255-260.

Wen, X. et al. Naturally occurring pentacyclic triterpenes as inhibitors of glycogen phosphorylase: synthesis, structure-activity relationships, and X-ray crystallographic studies, *J. Med. Chem.* 51 (2008) 3540-3554.

Wijsekara, N. et al. Diverse Signals Regulate Glucose Uptake into Skeletal Muscle. *Can. J. Diab.* 30 (2006) 80-88.

Witzcak, C.A. et al. CaMKII regulates contraction- but not insulin-induced glucose uptake in mouse skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298 (2010) E1150-1160.

Wright, D.C. et al. The effects of phospholipase C inhibition on insulin-stimulated glucose transport in skeletal muscle, *Metabolism* 51 (2002) 271-273.

Wright, D.C. et al. Evidence for the involvement of a phospholipase C-protein kinase C signaling pathway in insulin stimulated glucose transport in skeletal muscle, *Life. Sci.* 73 (2003) 61-71.

Wright, D.C. et al. A role for calcium/calmodulin kinase in insulin stimulated glucose transport, *Life. Sci.* 74 (2004) 815-825.

Wright, D.C. et al. Contraction- and hypoxia-stimulated glucose transport is mediated by a Ca²⁺-dependent mechanism in slow-twitch rat soleus muscle, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288 (2005) E1062-1066.

Wu, D.M. et al. Maslinic acid induces apoptosis in salivary gland adenoid cystic carcinoma cells by Ca²⁺-evoked p38 signaling pathway, *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 383 (2011) 321-330.

Zanatta, L. et al. Bouraïma-Lelong, H.; Bois, C.; Carreau, S.; Silva, F.R. Effect of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in plasma membrane targets in immature rat testis: ionic channels and gamma-glutamyl transpeptidase activity, *Arch. Biochem. Biophys.* 515 (2011) 46-53.

Zhang, W. et al. Ursolic acid and its derivative inhibit protein tyrosine phosphatase 1B, enhancing insulin receptor phosphorylation and stimulating glucose uptake, *Biochim. Biophys. Acta.* 1760 (2006) 1505-1512.

Zhang, Y.N. et al. Oleanolic acid and its derivatives: new inhibitor of protein tyrosine phosphatase 1B with cellular activities, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 8697-8705.

Zhang, L. et al. Synthesis and biological evaluation of asiatic acid derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylases, *Chem. Biodivers.* 6 (2009) 864-874.

Zhu, P. et al. Terpenoids. III: Synthesis and biological evaluation of 23-hydroxybetulinic acid derivatives as novel inhibitors of glycogen phosphorylase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 6966-6969.

5.1.1.3 Sinalização celular do 2 α ,3 β ,23-trihidroioleano-12-eno na translocação do GLUT4 no tecido adiposo

Artigo a ser submetido.

Periódico: BBA Molecular and Cell Biology of Lipids

Autores: Allisson Jhonatan Gomes Castro, Luisa Helena Cazarolli, Marisa Jádna Silva Frederico, Francieli Kanumfre de Carvalho, Moacir Geraldo Pizzolatti, Fátima Regina Mena Barreto Silva

Sinalização celular do $2\alpha,3\beta,23$ -trihidroxiolcano-12-eno na translocação do GLUT4 no tecido adiposo

Allisson Jhonatan Gomes Castro^a, Luisa Helena Cazarolli^b, Marisa Jádna Silva Frederico^a, Francieli Kanumfre de Carvalho^c, Moacir Geraldo Pizzolatti^c, Fátima Regina Mena Barreto Silva^{a*}

^aDepartamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, Cx. Postal 5069, CEP: 88040-970, Florianópolis, SC, Brazil.

^bUniversidade Federal da Fronteira Sul, Campus Universitário Laranjeiras do Sul, Laranjeiras do Sul, PR, Brazil.

^cDepartamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, Florianópolis, SC, Brazil.

*Correspondence to: Profa. Dra. Fátima Regina Mena Barreto Silva, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, UFSC. Campus Universitário, Bairro Trindade, Cx Postal 5069, CEP: 88040-970, Florianópolis, SC, Brazil. E-mail: mena.barreto@ufsc.br, Tel.: +55-48.3721.69.12/6159, Fax.: +55-48.3721.96.72.

Resumo

Neste trabalho foi estudado o efeito e o mecanismo de ação de 2 α ,3 β ,23-trihidroxi-olean-12-eno (THO) na regulação da absorção de glicose em ratos hiperglicêmicos. Para isso, foi analisado o efeito do pré-tratamento de ratos Wistar com THO em diferentes doses seguindo pela indução da hiperglicemia. Do soro desses animais foram avaliados a glicemia, a concentração de insulina, GLP-1 e LDH. Ainda, 180 minutos após a indução da hiperglicemia foi determinado o conteúdo de glicogênio hepático desses animais. Estudos de mecanismo de ação de THO na captação de glicose em tecido adiposo foi determinado através da incubação desse tecido em meio contendo ¹⁴C-deoxiglicose em presença ou não do tratamento e inibidores farmacológicos da via de translocação e síntese do GLUT4. Nesta perspectiva, também a determinação do efeito de THO na síntese e translocação do GLUT4 foi desenvolvido por meio de RT-PCR e WesternBlot. O triterpeno apresentou potente efeito antihiperglicêmico nas três doses testadas, com a dose de 10 mg/kg apresentando melhor efeito, que foi atribuído ao seu também potente efeito estimulador no aumento sérico de insulina e na deposição de glicose na forma de glicogênio hepático. THO não foi hábil em alterar a concentração sérica da incretina GLP-1. Ainda, este triterpeno (1 μ M) estimulou a absorção de glicose em tecido adiposo. Utilizando os inibidores farmacológicos específicos wortmannin, colchicina e N-etilmaleimida, observamos que THO age por um mecanismo dependente da atividade da PI3K, do tráfego vesicular e do processo geral de fusão de vesículas a membrana plasmática, indicando a participação do GLUT4 (vesículas contendo-o) na absorção de ¹⁴C-deoxiglicose mediada por THO. Apesar do uso do inibidor PD98059 não ter alterado o efeito de THO na absorção de glicose, indicando que não há a participação da via da MAPK MEK/Erk no mecanismo deste triterpeno, SB239063 (inibidor da P38 MAPK), levou a inibição do efeito de THO, o que mostra que este triterpeno poderia estar agindo via ativação e translocação de GLUT4, porém não ativando vias que levam a ações nucleares (como de síntese de GLUT4). Este efeito é comprovado pelo não aumento na quantidade de mRNA de GLUT4 nem no conteúdo total de GLUT4 analisado por RT-PCR e Westernblot, respectivamente. Ainda, o estudo do efeito de THO na translocação do GLUT4 nos mostrou que este triterpeno age de forma dependente da ativação do GLUT4, bem como da integridade de microdomínios membranares lipídicos. Portanto, concluímos que THO age estimulando a redução da hiperglicemia através de ação sobre alvos teciduais chave para o metabolismo glicídico, aumentando a secreção

insulínica, deposição de glicogênio hepático e na absorção de glicose no tecido adiposo através do estímulo da translocação do GLUT4.

Palavras-chave: Triterpenos, glicemia, GLUT4, p38MAP cinase, tecido adiposo.

Introdução

Os triterpenóides pentacíclicos pertencem a uma classe de compostos isoprenóides (com 30 carbonos) largamente distribuídos nas plantas e representam um grupo importante de produtos naturais (Jäger et al., 2009; Xu et al., 2004). A relevância farmacológica dos triterpenos está associada com suas propriedades multialvo, tais como antiinflamatória, hepatoprotetora, analgésica, antimicrobiana, antimicótica, virostática, imunomoduladora, diurética, antiespasmódica, antiaterosclerótica, antitumorais e anti-HIV, combinada com uma baixa toxicidade (Jäger et al., 2009; Xu et al., 2004). As propriedades farmacológicas dos triterpenos do tipo oleanano de interesse incluem os efeitos no metabolismo de carboidratos (Alqahtani et al., 2013; Nazaruk, Borzym-Kluczyk, 2014).

A regulação homeostática do metabolismo de combustíveis no corpo é um processo estritamente controlado. A glicose é a principal fonte de combustível metabólico do corpo, e a elevação pós-prandial no sangue é rigorosamente modulada por um equilíbrio de vários fatores. A insulina é, de longe, o elemento principal de regulação da glicemia e é secretada a partir de células β - pancreáticas induzida por glicose (Hardie, 2012). Através da ligação aos receptores em tecidos-alvo metabolicamente ativos, a insulina ativa vias de sinalização que envolve uma complexa cascata de proteína-cinases e proteínas reguladoras que conduzem os efeitos metabólicos (Kanzaki, 2006; Govers, 2014).

A principal ação da insulina é estimular o transporte de glicose nos tecidos periféricos através do GLUT4, que é expresso principalmente no músculo esquelético e cardíaco e no tecido adiposo. Em resposta a um aumento do nível de glicose sérica ocorre o aumento da secreção de insulina a partir das células β das ilhotas pancreáticas, que por sua vez permite a redistribuição de GLUT4 para a membrana plasmática, facilitando a absorção de glicose (Hardie, 2012; Kanzaki, 2006; Govers, 2014).

O aumento na exocitose do GLUT4 em resposta à insulina é acionado através de sinalização através do receptor de insulina, que induz a ativação de vias de sinalização, tais como PI3K/AKT/PKB, PKC e CAP/CBL/TC10 (Kanzaki, 2006; Govers, 2014). Além disso, a insulina diminuiu as taxas de endocitose do GLUT4 em adipócitos (Govers, 2014). Ainda, a insulina medeia um largo espectro de respostas biológicas que atuam através das MAPKs, incluindo a ativação da transcrição de genes e de modulação do crescimento e diferenciação celular específica (Kanzaki, 2006).

A desregulação de processos metabólicos, especialmente na homeostasia da glicose, pode afetar negativamente uma grande variedade de tecidos frequentemente observada na diabetes melito, uma doença metabólica crônica associada a defeitos na secreção e/ ou sensibilidade à insulina (American Diabetes Association, 2008). Várias investigações demonstram que compostos naturais, especialmente os triterpenos pentacíclicos, pode potencializar a secreção de insulina e/ ou estimular a translocação de GLUT4 e a captação de glicose (Cazarolli et al., 2008; Castellano et al., 2013; Alqahtani et al., 2013).

No presente estudo, foi avaliado o potencial antihiperlipidêmico e hipoglicêmico de um novo triterpeno pentacíclico, o trihidroxioleano (THO), isolado de *C. heterodoxus*. Além disso, os mecanismos de ação do THO na regulação da captação de glicose no tecido adiposo foram investigados por meio do monitoramento das vias insulínicas envolvidas na captação de glicose.

Materiais and Métodos

Material vegetal

Partes aéreas de *C. heterodoxus* Baillon foram coletadas no rio Pitangui (coordenadas UTM 593095 e 7231847), em Ponta Grossa, PR em abril e junho de 2010, sob a coordenação da Dra Rosemeri Segecin Moro, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, PR, Brasil. O material vegetal foi identificado pelo botânico Daniel de Barcellos Falkenberg do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina. Um voucher do espécime foi depositado no herbário FLOR e registrado com o número 37689.

Isolamento e caracterização química do 2 α ,3 β ,23-trihidroxiolean-12-eno

O triterpeno 2 α ,3 β ,23-trihidroxiolean-12-eno (THO) foi isolado e caracterizado conforme Carvalho (2013).

O 2 α , 3 β ,23-trihidroxiolean-12-eno foi isolado a partir da fração hexano do extrato hidroalcoólico bruto obtido de *C. Heterodoxus* (partes aéreas) como se segue: O extrato hidroalcoólico bruto de *C. heterodoxus* (152,51 g) foi ressuspenso em etanol (15%) e água (85%), e fracionados por extração líquido-líquido utilizando-se hexano e EtOAc a fim de produzir 29,27 g da fração de hexano, 46,60 g da fração EtOAc e 41,75 g do resíduo insolúvel.

A fração hexânica (25,44 g) foi cromatografada em coluna de gel de sílica 60 (Vetec, 0,063-0,2 mesh) e eluída com hexano em quantidades

crescentes de acetato de etila (0-100%) gerando 155 frações (125 mL cada).

As frações 115-116 (60:40 *n*-hexano-EtOAc) foram combinadas e purificadas por recristalização em CH₂Cl₂ produzindo 1,610 g de *2α,3β,23-trihidroiolean-12-eno*: coloração do cristal (CH₂Cl₂); HRMS (ESI+) *m/z*: calculado C₃₀H₅₀O₃ [M⁺Na]⁺: 481,3652; encontrado 481,3651. pf. 243,6-244,4 °C; CCD Rf 0,26 (40:60 hexano-EtOAc); IV (KBr) ν_{\max} cm⁻¹ 3461, 3376, 3323, 2972, 2943, 2915, 2877, 2857, 1644, 1462, 1379, 1056. RMN 1H (CDCl₃, ppm) δ 2,05 (m); 0,94 (m) (H-1); 3,90 (m) (H-2); 3,20 (d) *J*=8,99 (H-3); 0,96 (m) (H-5); 1,62 (m) (H-6); 1,40 (m); 0,87 (m) (H-7); 1,92 (m) (H-11); 5,19 (dd) *J*=3,95 e 3,13 (H-12); 1,25 (m) (H-15); 0,80 (m) (H-16); 1,94 (m) (H-18); 1,66 (m); 1.11 (m) (H-19); 1,22 (m) (H-21); 1,23 (m); 1,40 (m) (H-22); 4,10 (d) *J*=11,33; 3,40 (d) *J*=11,33 (H-23); 1,30 (s) (H-24); 0,97 (s) (H-25); 0,94 (s) (H-26); 1,13 (s) (H-27); 0,83 (s) (H-28); 0,88 (s) (H-29); 0,87 (s) (H-30). RMN 13C (CDCl₃, ppm) δ 46,4 (C-1); 69,1 (C-2); 85,4 (C-3); 43,2 (C-4); 55,8 (C-5); 18,4 (C-6); 32,7 (C-7); 39,8 (C-8); 47,7 (C-9); 38,1 (C-10); 23,8 (C-11); 121,3 (C-12); 145,2 (C-13); 41,7 (C-14); 26,0 (C-15); 26,8 (C-16); 32,4 (C-17); 47,1 (C-18); 46,7 (C-19); 31,1 (C-20); 34,7 (C-21); 37,1 (C-22); 65,6 (C-23); 22,9 (C-24); 17,4 (C-25); 16,7 (C-26); 26,0 (C-27); 28,4 (C-28); 33,3 (C-29); 23,6 (C-30).

Estes compostos foram previamente isolados das raízes de *Actinidia macrosperma* (DING et al., 2007) e *Commiphora merkeri* (FOURIE et al., 1989). A caracterização química do *2α,3β,23-trihidroiolean-12-eno* com uma completa atribuição dos sinais ¹H e ¹³C foi realizada por meio de análises em RMN, incluindo ¹H-¹H COSY, HMQC e HMBC e comparação com resultados descritos na literatura (Giner et al., 1989; Koops et al., 1991).

Animais

Ratos machos albinos Wistar, 50-55 dias de idade (180-210 g), foram utilizados. Os ratos foram criados em biotério e alojados em uma sala (cerca de 21 ° C) com iluminação controlada (luzes acesas 6:00-18:00 h). Os animais foram mantidos com ração, enquanto a água foi disponibilizada a vontade. Ratos em jejum foram privados de alimento durante 16 h, mas com o livre acesso à água. Todos os animais foram cuidadosamente monitorados e mantidos de acordo com o Comitê de Ética local para o Uso de Animais (CEUA-Protocolo UFSC PP00414).

Curva de tolerância oral a glicose

Ratos em jejum foram divididos em três grupos de seis animais. Grupo I, ratos hiperglicêmicos que receberam somente glicose (4 g/ kg, 8,9 M); Grupo II, ratos hiperglicêmicos que receberam o veículo, 2,5% de Tween 80; Grupo III, os ratos hiperglicêmicos que receberam THO (0,1, 1 e 10 mg/ kg). A glicemia foi medida antes de qualquer tratamento (tempo zero). Imediatamente, os ratos receberam o tratamento (veículo ou THO) e após 30 min foram sobrecarregados com glicose. A curva de tolerância à glicose foi iniciada após a sobrecarga de glicose e em seguida a glicemia foi medida a 15, 30, 60 e 180 min. Todos os tratamentos foram administrados por sonda oral. O sangue foi coletado para a determinação da glicemia pelo método da glicose-oxidase e da concentração insulina no plasma (Varley et al., 1976; Damazio et al., 2010).

Insulina sérica

A concentração sérica de insulina foi determinada por ELISA de acordo com as instruções do fabricante. Os dados detectados pelo ensaio foram de 0,2 a 10 ng/ ml. Os coeficientes de variação de intra- e inter-ensaio para a insulina foram 3,22 e 6,95, respectivamente, com um valor de sensibilidade de 0,2 ng/ mL. A concentração de insulina foi estimada por meio de medição colorimétrica a 450 nm com um leitor de placas de ELISA (Organon Teknika, Roseland, NJ, EUA). Os resultados foram expressos como ng de insulina no soro/ mL (Damazio et al., 2010).

GLP-1 sérico

Para a análise da concentração sérica de GLP-1, ratos em jejum foram divididos em dois grupos de seis animais: Grupo I, ratos hiperglicêmicos que receberam sitagliptina 10 mg/ kg (controle); Grupo II, os ratos hiperglicêmicos que receberam sitagliptina 10 mg/ kg e THO 10 mg/ kg. Sitagliptina e THO foram administradas 60 min e 30 min antes da indução da hiperglicemia (Glicose 8,9 M), respectivamente. O sangue foi coletado nos tempos 0, 15, 30 e 60 min após a indução da hiperglicemia, centrifugado e o soro obtido foi utilizado para a medida de GLP-1 por meio de ELISA, de acordo com as instruções do fabricante. A faixa de valores detectados por este ensaio foi de 4,1-1000 pM. Os coeficientes intra e inter-ensaio de variação para GLP-1 foram <5% e <12%, respectivamente, com um valor de sensibilidade de 1,5 pM. A concentração de GLP-1 foi estimada por meio de medidas de absorbância a 450 nm e 590 nm. As amostras foram analisadas em duplicada e os resultados foram expressos como pM de GLP-1 sérico (Mohamed et al., 2013).

Conteúdo de glicogênio

O fígado de ratos hiperglicêmicos e ratos hiperglicêmicos tratados com THO (0,1, 1 e 10 mg/ kg) foi removido 180 minutos após a administração oral de glicose e o conteúdo de glicogênio foi isolado a partir deste tecido e determinado como descrito por Krisman (1962). Os resultados foram expressos em mg de glicogênio/ g de tecido (Castro et al., 2014).

Estudos de captação de ^{14}C -deoxiglicose em tecido adiposo murino

Para os estudos de captação de $[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{-2-Deoxi-D-glicose}$, foi usado tecido adiposo epididimal de ratos euglicêmicos em jejum. O tecido adiposo foi dissecado, pré-incubado (30 min) e em seguida incubado (60 min) a 37 °C em tampão Krebs-Ringer-bicarbonato (KRb) com uma composição de NaCl 122 mM, KCl 3 mM, MgSO_4 1,2 mM, CaCl_2 1,3 mM, KH_2PO_4 0,4 mM, e NaHCO_3 a 25 mM, em atmosfera de O_2/CO_2 (95%: 5%, v/ v) até pH 7,4. THO (1000, 100, 10 e 1 nM) foi adicionado ao meio de incubação (60 min) na presença ou ausência de HNMPA- $(\text{AM})_3$ (100 μM), wortmannin (100 nM), colchicina (1 μM), PD 98059 (50 μM), metil- β ciclodextrina (10 mM), SB239063 (10 mM) ou N-etilmaleimida (1 mM). ^{14}C -deoxiglicose (0,1 uCi/ mL) foi adicionada a cada amostra durante o período de incubação. Os inibidores farmacológicos foram adicionados a cada amostra durante a pré e o período de incubação. As amostras foram processadas de acordo com Cazarolli et al. (2009). Para a quantificação de proteína total foi usado o método de Lowry et al. (1951). Os resultados de captação de glicose foram expressos como unidades de glicose nmol/ mg de proteína.

Eletroforese em gel de poliacrilamida e 'immunoblotting'

Para o homogeneizado total, tecido adiposo incubado *in vitro* (60 min) com THO (1 μM), foi homogeneizado numa solução de lise contendo EDTA (2 mM), Tris-HCl (50 mM, pH 6,8), SDS (4% p/ v) e a concentração total de proteína em seguida foi determinada. As frações de membrana plasmática e de citoplasma do tecido adiposo incubado na presença ou ausência de THO 1 μM (60 min, 37 ° C em KRb) foram preparadas como descrito por Nishiumi, Ashida (2007). Para a análise de eletroforese (homogeneizado total e frações), as amostras foram dissolvidas em solução contendo glicerol (40%), mercaptoetanol (5%), Tris-HCl (50 mM, pH 6,8) e aquecidas a 100°C durante 3 min.

Concentrações protéicas iguais foram aplicadas em gel de poliacrilamida (12%), separadas por SDS-PAGE de acordo com o sistema descontínuo de Laemmli (1970) e transferidas para membranas de nitrocelulose em tampão de transferência. As membranas de nitrocelulose foram incubadas durante 2 h em solução de bloqueio contendo 5% de leite em pó desnatado e em seguida incubadas por 18 h a 4 °C com anti-GLUT4 diluído em uma razão de 1: 500, anti-P38 (1:100) ou anti-pP38 (1:200). As membranas foram incubadas durante 2 h com anticorpo anti-IgG (1:1000) de rato para as membranas expostas ao anti-GLUT4 ou anti-IgG (1:1000) de coelho para as membranas expostas ao anti-P38/ anti-pP38. As bandas imunorreativas foram visualizadas utilizando o kit de quimioluminescência do substrato HRP Immobilon™ (Castro et al., 2014). A densidade das bandas foram quantificadas após escaneamento em sistema ChemiDoc™ MP e determinação da densidade óptica das bandas usando o software Image Lab versão 4.1 (Bio-Rad).

PCR em tempo real

O Ácido ribonucleico total foi extraído do tecido adiposo usando reagente de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acordo com o protocolo do fabricante. Todas as amostras de RNA estavam livres de DNA contaminante, utilizando reagentes isentos de DNA (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acordo com o protocolo do fabricante. O RNA (1 µg) foi transcrito reversamente com Superscript III (Invitrogen). A amplificação por PCR em tempo real foi realizada usando 2 µL de cDNA, primers específicos para cada gene e SYBR Green reagente (Invitrogen), em um volume final de 10 µL. O método $2^{-\Delta\text{Ct}}$ (Livak e Schmittgen, 2001) foi usado para calcular os valores ΔCt . Além disso, b-actina foi utilizada como um controle interno de carga. As seqüências de primers utilizados são as seguintes: GLUT4: senso: 5'-CGCGGCCCTCCTATGAGATAC-3'; anti-senso: 5'-CCTGAGTAGGCGCCAATGA-3' β -actina: senso: 5'-TGTTACCAACTGGGACGA-3'; anti-senso: 5'-GGGGTGTGAAGGTCTCA-3'.

Lactato desidrogenase sérica

A atividade da LDH sérica foi determinada 180 min após tratamento com THO (10 mg/Kg) de acordo com instruções do fabricante (Castro et al., 2014).

Análise estatística

Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. Análise de variância de uma e duas vias seguido de pós-teste de Bonferroni ou o

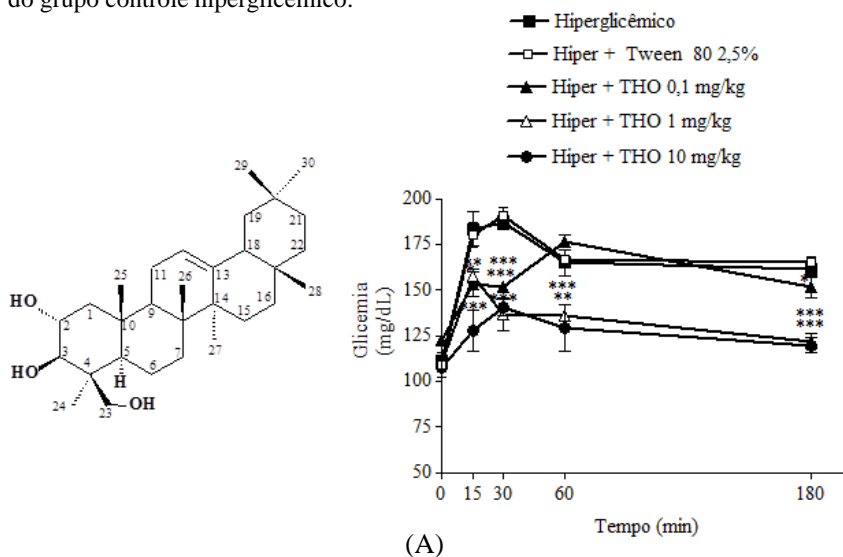
teste *t* de Student foram usados. Diferenças foram consideradas significantes quando $p \leq 0,05$.

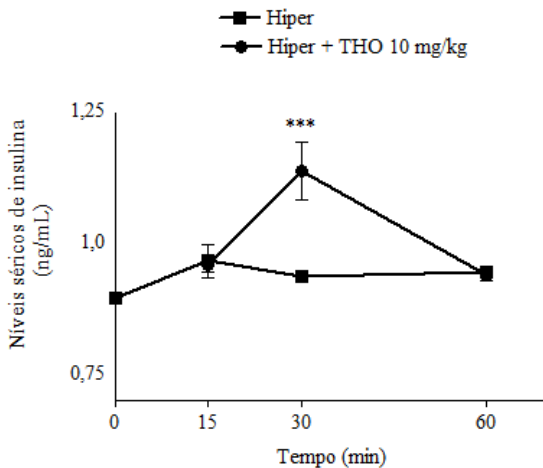
Resultados

Efeito de THO na glicemia, insulina e no GLP-1

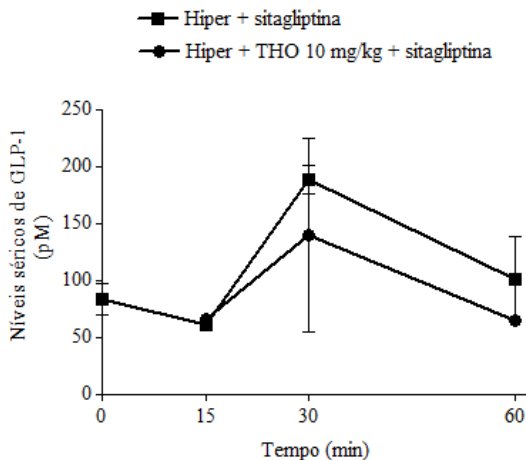
Após iniciar o teste de tolerância oral à glicose, a concentração de glicose no soro foi significativamente aumentada quando comparada com o tempo zero (figura 1A). O tratamento oral com THO resultou em melhorias significativas no perfil glicêmico dos ratos hiperglicêmicos durante o período estudado. As doses de 0,1 e 1 mg/kg apresentaram efeito hipoglicemiante rápido aos 15 e 30 min após a indução da hiperglicemia (16% e 18% para a dose de 0,1 mg/kg e 13% e de 26% a uma dose de 1 mg/kg, respectivamente) em comparação com o grupo controle. Além disso, a dose de 10 mg/kg apresentou ação antihiperglicêmica mais potente em todos os períodos de estudo (30%, 24%, 21% e 25% para 15, 30, 60 e 180 min, respectivamente) (figura 1A).

Fig. 1. Estrutura e efeito do triterpeno trihidroxioleanano (THO) na curva oral de tolerância à glicose (A), na secreção de insulina (B) e de GLP-1 (C) em ratos hiperglicêmicos. Os valores são expressos como média \pm E.P.M. com $n = 5$. Significante em *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ * $p < 0,05$ comparado ao respectivo valor do grupo controle hiperglicêmico.





(B)



(C)

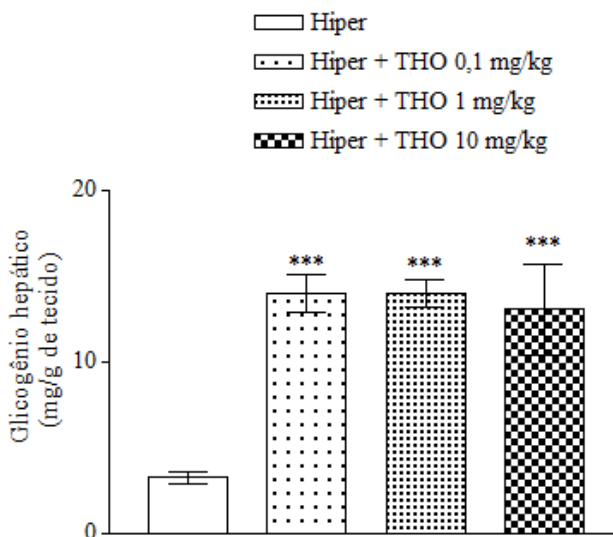
Levando-se em conta o efeito hipoglicemiante do THO após tratamento *in vivo*, foram investigados os potenciais alvos do THO na ação anti-diabética. Como pode ser observado na figura 1B a secreção de insulina induzida pela glicose foi significativamente reforçada após 30 min de tratamento oral com THO (10 mg/ kg) em ratos hiperglicêmicos, que apresentam um índice insulinogênico (II) de 0,59 ng/ mg (o valor correspondente para o controle hiperglicêmico foi de 0,45 ng/ mg). No entanto, quando a concentração sérica de hormônios intestinais relacionados com a absorção de glicose e metabolismo foi avaliada, o THO em 10 mg/ kg não apresentou influência sobre a concentração sérica

de GLP-1 (figura 1C), indicando que este composto pode agir diretamente nas células β -pancreáticas, que influenciam a secreção de insulina no soro e redução da glicemia.

Efeito do THO no conteúdo de glicogênio hepático e na captação de glicose

A fim de verificar se o THO melhora a tolerância à glicose por meio de mecanismos multifatoriais, analisamos o conteúdo de glicogênio hepático em ratos hiperglicêmicos após o tratamento oral com THO, bem como a influência na captação de glicose no tecido adiposo. A figura 2 mostra um aumento significativo no conteúdo de glicogênio hepático em ratos hiperglicêmicos tratados com as três doses de THO (0,1; 1 e 10 mg / kg), o que representa um aumento de cerca de 4 vezes no teor de glicogênio, em comparação com o grupo controle hiperglicêmico. Além disso, o THO exerce um marcante efeito estimulatório na captação de glicose *in vitro* no tecido adiposo epididimal aos 60 min de incubação. O efeito estimulatório de THO na captação de glicose foi significativo a 1 μ M e 100 nM e representam cerca de 3,8 e 2,3 vezes, em comparação com o valor basal de 60 min, respectivamente (figura 3A).

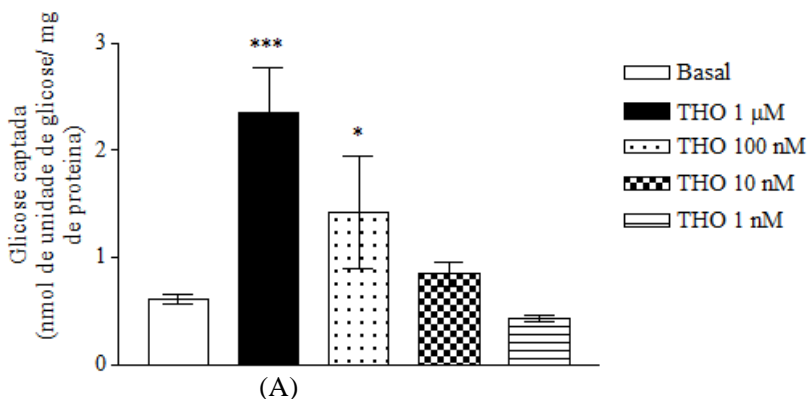
Fig. 2. Efeito do trihidroxioleanano (THO) no conteúdo hepático de glicogênio em ratos hiperglicêmicos tratados 180 min após o tratamento oral. Os valores são expressos como média \pm E.P.M. com $n=5$ para cada grupo. Significante em *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle hiperglicêmico.

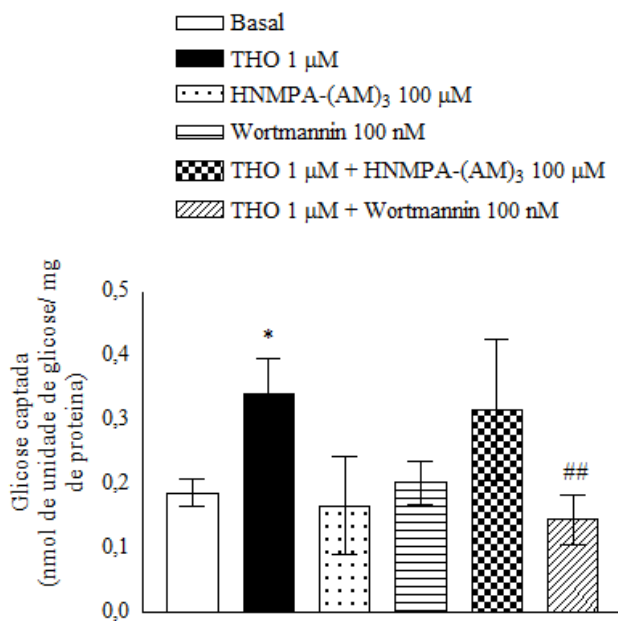


Mecanismo de ação do THO na captação de glicose no tecido adiposo epididimal

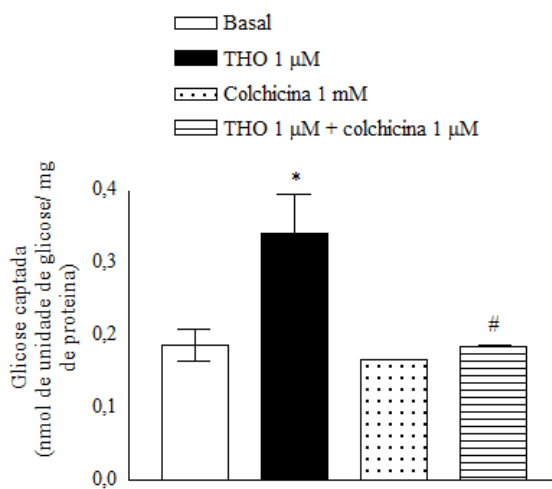
Para determinar se o efeito estimulatório do THO na captação de glicose no tecido adiposo envolve a sinalização da insulina e as vias de translocação do GLUT4, foi utilizado inibidores da via de sinalização específica da insulina, tais como a wortmannin (100 nM), um inibidor específico da PI3K, colchicina (1 μ M), um agente despolimerizante de microtúbulos, HNMPA-(AM)₃ (100 μ M), um inibidor da atividade do receptor da insulina do tipo tirosina-cinase ou N-etilmaleimida (NEM) (1 mM) (agente alquilante que inibe eventos de tráfego vesicular na membrana). Em todos os casos, as concentrações utilizadas foram as previamente ensaiadas em abordagens técnicas semelhantes (Cazarolli et al 2013; Riento et al., 1998). A figura 3B mostra que o efeito estimulatório do THO na captação de glicose não foi influenciado pela presença de HNMPA-(AM)₃, que indica que a atividade tirosina cinase do RI não parece ser essencial para a ativação completa da captação de glicose induzida pelo THO. Por outro lado, o pré-tratamento com wortmannin, colchicina e NEM depleta completamente o efeito do THO na captação de glicose no tecido adiposo (figuras 3B, 3C e 4A).

Fig. 3. Efeito de THO na captação de ¹⁴C-deoxiglicose em tecido adiposo epididimal murino (A) influência de HNMPA-(AM)₃, wortmannin (B) e colchicina (C) neste mecanismo. Grupo basal = sem tratamento. Tempo de pré-incubação = 30 min; tempo de incubação= 60 min. Os valores são expressos como média \pm E.P.M.; n = 6 em duplicata para cada grupo. Significante em * $p \leq 0,05$ e *** $p \leq 0,001$ em relação ao grupo basal e significativo em # $p \leq 0,05$ e ## $p \leq 0,01$ em relação ao grupo THO.





(B)



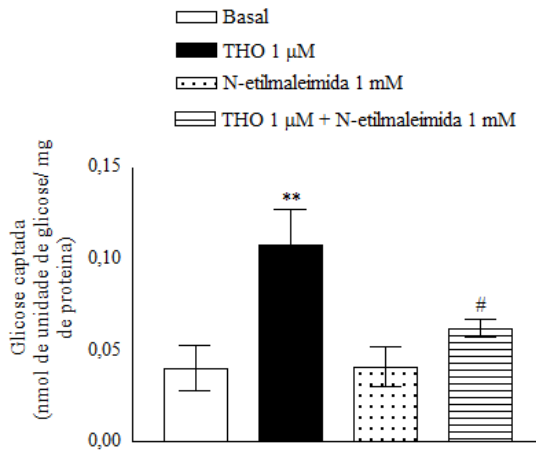
(C)

Estes resultados apontam para o envolvimento da PI3K, da integridade dos microtúbulos, bem como de mecanismos de fusão de vesículas de membrana contendo GLUT4 para a captação de glicose induzida por THO. Além disso, a inibição da captação de glicose induzida por THO pelo inibidor de p38 MAPK, SB239063 (Cazarolli et al., 2013) indica que além da via clássica de translocação do GLUT4, THO também pode exercer um efeito no processo de ativação GLUT4 para a membrana celular (figura 4B).

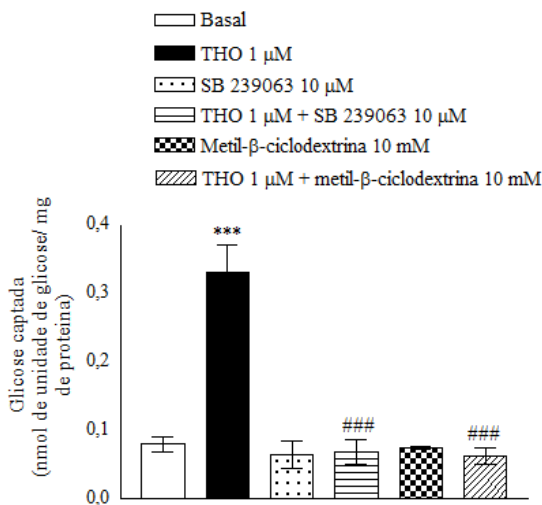
Além da clássica sinalização da insulina envolvendo as vias PI3K-PDK-PKB implicados na translocação do GLUT4, há evidências também de que uma via independente de PKB contribui para o pleno efeito da insulina na redistribuição de GLUT4 para a membrana plasmática. Vários estudos demonstram que uma via de sinalização de insulina distinta está localizada em microdomínios chamados de caveolos, regiões especializadas da membrana plasmática enriquecida em colesterol, e o rompimento das 'balsas lipídicas' pela depleção do colesterol inibe eficazmente a translocação do GLUT4 estimulada por insulina e a captação de glicose (Govers, 2014; Ros-Baró et al., 2001; Gustavsson et al., 1999; Parpal et al., 2001). A fim de avaliar se o efeito estimulatório do THO na captação de glicose envolve microdomínios lipídicos, a metil- β -ciclodextrina, um composto que induz a depleção de colesterol da membrana plasmática, foi usado. Como pode ser observado na figura 4B, o efeito do THO na captação de glicose no tecido adiposo epididimal foi completamente bloqueada na presença do inibidor.

Para avaliar se de forma semelhante à insulina, o THO também atua por mecanismos que conduz a vias nucleares, o tecido adiposo foi incubado na presença de THO mais PD98059, um inibidor farmacológico da via de MEK/ ERK. A presença de PD98059 não modificou o efeito estimulatório do THO na captação de glicose, indicando que a síntese geral de proteínas parece não ser afetada por THO (figura 5).

Fig. 4. Efeito de N-etilmaleimida (A), SB239063, metil- β -ciclodextrina (B) na ação estimulatória do THO na captação de ^{14}C -deoxiglicose em tecido adiposo epididimal. Grupo basal= sem tratamento. Tempo de pré-incubação = 30 min; tempo de incubação= 60 min. Os valores são expressos como média \pm E.P.M.; $n = 6$ em duplicata para cada grupo. Significante em $**p \leq 001$ e $***p \leq 0,001$ em relação ao grupo basal. Significante em $\#p \leq 0,05$ e $###p \leq 0,001$ em relação ao grupo THO.

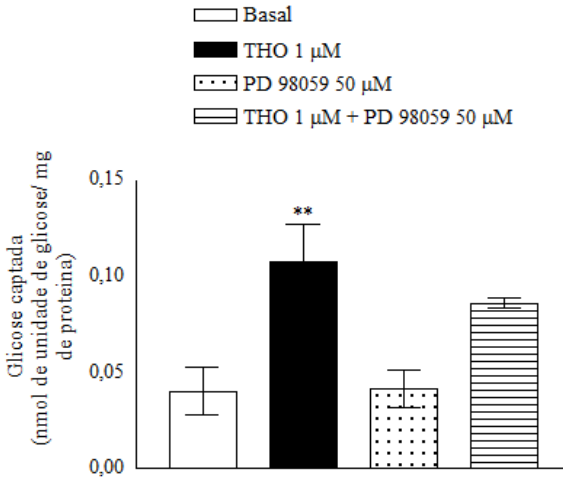


(A)



(B)

Fig. 5. Ação de PD98059 no efeito estimulatório do THO na captação de ^{14}C -deoxiglicose tecido adiposo epididimal. Grupo basal= sem tratamento. Tempo de pré-incubação= 30 min; tempo de incubação= 60 min. Os valores são expressos como média \pm E.P.M.; $n = 6$ em duplicata para cada grupo. Significante em $**p \leq 0,01$ em relação ao grupo basal.



Efeito de THO no GLUT4

A figura 6 mostra o conteúdo de GLUT4 das frações total, citosólica e de membrana plasmática de tecido adiposo incubado em presença de THO. Como pode ser observado, o THO não afetou o imunoconteúdo total de GLUT4 em tecido adiposo. Por outro lado, o conteúdo membranar de GLUT4 foi significativamente aumentado por THO em comparação com o grupo basal, sem alterações na concentração citosólica deste transportador de glicose. Além disso, foi avaliado se o THO pode modificar a expressão de mRNA do GLUT4 em tecido adiposo por meio de RT-PCR. Observou-se que THO não interferiu os níveis de mRNA do GLUT4 nesta abordagem experimental (figura 7) corroborando com os resultados apresentados nas figuras 5 e 6A. Com base nos resultados, a absorção de glicose induzida pelo THO em tecido adiposo pode ser provavelmente explicada por um aumento na translocação de GLUT4, sem afetar nem a síntese geral de proteína nem a quantidade total de GLUT4.

Fig. 6. Efeito do THO e SB239063 no imunocnteuado total de GLUT4 na fração total e nas frações citosólica e membranáar em tecido adiposo epididimal após incubação *in vitro*. Imunoblot representativo para cada grupo. Os valores são expressos como média \pm E.P.M. $n = 4$ para três experimentos independentes. Significante em $*p < 0,05$ e $***p < 0,001$ comparado com o grupo basal. Significante em $\#p < 0,05$ comparado com THO.

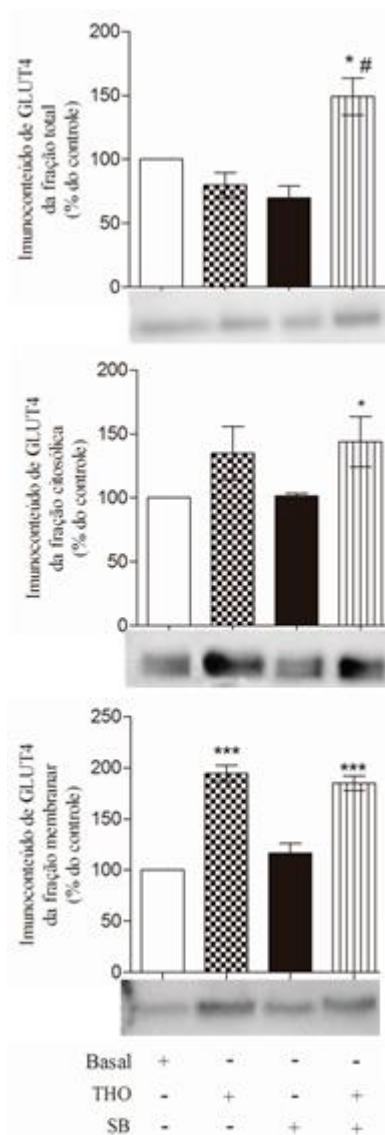
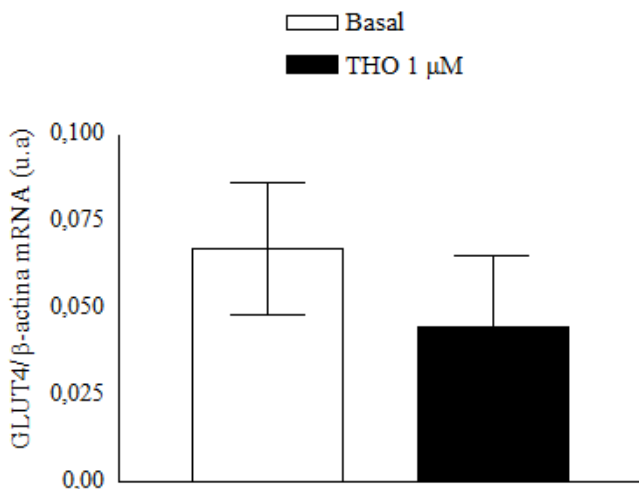


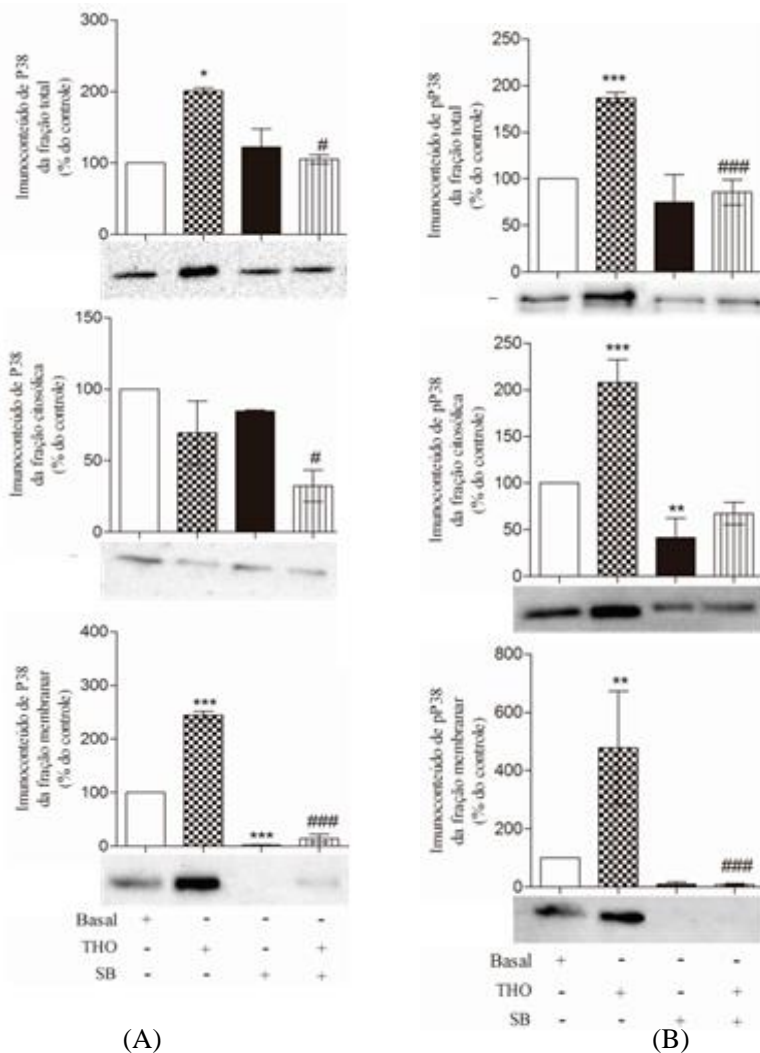
Fig 7. Efeito de THO na expressão de mRNA de GLUT4. Os valores são expressos como média \pm E.P.M. com n= 6 em triplicata para cada grupo.



Efeito do THO na P38 e pP38

As figuras 8A e 8B mostram o conteúdo de P38 e pP38 da fração total na presença de THO e SB em tecido adiposo. THO significativamente estimula a quantidade total de P38 em relação ao grupo basal, bem como a fosforilação P38. Este efeito no aumento de pP38 total pode ser explicada pela redução do P38 citosólico, quando incubados na presença de THO + SB, em comparação ao grupo THO sozinho. Deste modo, também foi observado um aumento na immunoquantidade de P38 membranar em presença de THO, bem como a inibição deste efeito quando este triterpeno foi incubado em presença de SB. Em presença de SB, este efeito estimulatório de THO na quantidade de pP38 membranar foi inibido completamente.

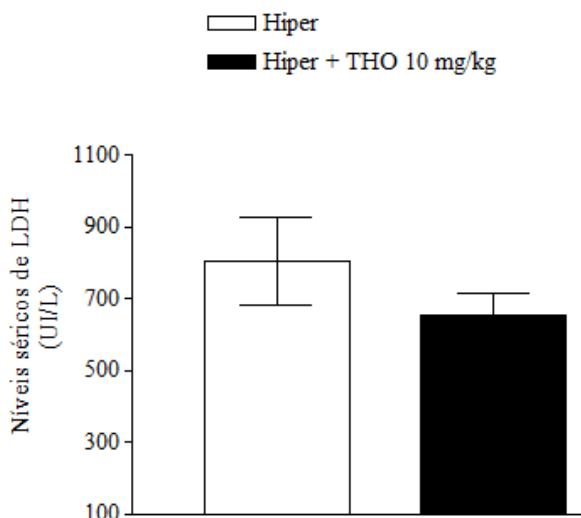
Fig. 8. Efeito do THO e SB239063 no conteúdo total de P38 (A) e pP38 (B) nas frações total, citosólica e membranar em tecido adiposo epididimal após incubação *in vitro*. Imunoblot representativo para cada grupo. Os valores são expressos como média \pm E.P.M. $n = 4$ para três experimentos independentes. Significante em $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$ comparado com o grupo basal. Significante em $\#p < 0,05$ e $###p < 0,001$ comparado com o grupo THO.



Efeito do THO na concentração sérica de LDH

A fim de verificar a potencial toxicidade deste composto, a concentração sérica de LDH foi avaliada após o tratamento oral com THO. A dose de 10 mg/ kg oralmente administrada não alterou a concentração sérica da LDH extracelular (figura 8), o que indica que nesta condição experimental a THO por via oral não causou efeitos tóxicos.

Fig. 8. Efeito de THO no LDH sérico. Valores em média \pm E.P.M. n= 5.



Discussão

Muitos metabólitos secundários de plantas presentes em frutas e vegetais podem exercer ações medicinais específicas e estes produtos podem ser explorados para vantagem terapêutica, prevenindo ou tratando doenças metabólicas como a diabetes. Os triterpenos pentacíclicos que pertencem à série dos lupanos, oleananos e ursanos exibem vários efeitos farmacológicos e bioquímicos que atuam em mecanismos de regulação da homeostase da glicose em uma grande variedade de alvos fisiológicos (Alqahtani et al., 2013; Castellano et al., 2013; Moghaddam et al., 2012; Castro et al., 2014; Sun et al., 2006). O oleanano é o tipo de triterpeno mais frequente (Alqahtani et al., 2013) e os elementos estruturais importantes são responsáveis pelas atividades biológicas desta classe, como as insaturações, grupos metil e polihidroxilação. Desta forma, foi investigado o potencial antihiperlicêmico e/ ou anti-diabético do

trihidroxioleanano (THO), um triterpeno pentacíclico oleanano que apresenta grupos hidroxila em C-2, C-3 e C-23.

O trihidroxioleanano (THO) mostrou efeito hipoglicemiante rápido e poderoso, evitando a hiperglicemia e mantendo a glicemia próxima ao euglicêmico, durante o período estudado. Este efeito pode ser explicado, em parte, pela forte estimulação da secreção de insulina induzida por glicose já aos 30 min após o tratamento com THO por via oral. Isto está de acordo com a literatura, onde vários triterpenos do tipo oleanano, ursano e lupano são descritos por aumentar a biossíntese e secreção de insulina e também melhorar a tolerância à glicose em modelos *in vivo* e *in vitro* (Yoshikawa e Matsuda, 2000; Teodoro et al., 2008; Castellano et al., 2013; Castro et al 2014). Todos estes resultados indicam que o THO pode atuar nas células- β como alvo e influenciar a síntese de insulina, a modulação da secreção de insulina e, conseqüentemente, melhorar o metabolismo da glicose periférica.

A hiperglicemia é um dos objetos de estudo mais importantes para o tratamento da diabetes (Nathan et al., 2009) e o controle da homeostase da glicose está focada na secreção e ação da insulina e, em menor grau, no glucagon. No entanto, descobertas recentes indicam um modelo mais complexo, envolvendo múltiplos órgãos e vários hormônios glicorregulatórios. Considerando que, em resposta à ingestão de alimentos as células enteroendócrinas na mucosa intestinal secretam hormônios que podem estimular a secreção de insulina do pâncreas endócrino, reduzindo a glicemia (Aronoff et al., 2004; Cho et al., 2014). São conhecidos dois hormônios incretínicos, o GLP-1 e o GIP (Aronoff et al., 2004; Cho et al., 2014). Alguns triterpenos são descritos por reduzir a glicemia em animais diabéticos através da estimulação da secreção de GLP-1 das células endócrinas L intestinais por meio da interação com receptores específicos de membrana (Liu, et al., 2013; Huang et al., 2013). Além disso, os triterpenos parecem proteger o GLP-1 de degradação por meio da inibição da DPP-4, bem como por potenciar a ação da sitagliptina nas células L (Badole et al., 2013). No presente trabalho, o tratamento oral agudo com THO não influenciou a concentração sérica de GLP-1. A ausência de efeito deste triterpeno na secreção de GLP-1 fortalece a idéia de que o THO induza o aumento da concentração sérica de insulina de forma direta nas células β -pancreáticas, modulando a síntese e secreção de insulina. Embora o THO não tenha afetado a secreção de GLP-1, o intestino delgado não pode ser excluído como um alvo potencial para a atividade, uma vez que THO diminuiu a atividade da sacarase, uma das dissacaridases intestinais envolvidas na absorção de carboidratos e metabolismo da glicose. Isto

está de acordo com os resultados apresentados por diferentes triterpenos e flavonóides, onde um dos mecanismos propostos para ação na redução da glicemia é a inibição da atividade de enzimas e absorção de carboidratos (Tiwari et al 2010; Ali et al., 2006; Hou et al., 2009; Pereira et al., 2011; Postal et al., 2014).

Em termos de economia de glicose em todo o corpo, o fígado é responsável pela remoção de cerca de 45% de glicose ingerida da circulação e a armazena em forma de glicogênio ou o metaboliza através da glicólise para minimizar a flutuação da glicemia (Moore et al., 2012). Em termos de metabolismo de glicogênio, o THO aumentou significativamente o conteúdo de glicogênio do fígado após o tratamento por via oral em ratos hiperglicêmicos. Provavelmente, este efeito pode ser mediado através de diferentes mecanismos de regulação por triterpenos como o ácido ursólico, ácido oleanólico, 3 β -taraxerol, ácido betulínico e ácido maslínico, que foram mostrados por aumentar o conteúdo de glicogênio nos diferentes tecidos e em culturas de células, através de fosforilação e ativação da PKB, bem como da fosforilação e inibição da AMPK e GSK-3 β , e estimulação da atividade de glicocinases/hexocinases e inibição da glicose-6-fosfatase e da fosforilase do glicogênio, etapa limitante da velocidade de glicogenólise. (Azevedo et al 2010; Zhang et al 2009, Wen et al 2008, Zhu et al 2009, Ha et al 2009, Liang et al 2011; Ngubane et al 2011; Sangeetha et al., 2010; Alqahtani et al., 2013; Jun et al., 2014). Portanto, o aumento da deposição de glicogênio hepático associado com a concentração de insulina no plasma mais elevada induzida por THO contribui para a redução de glicose no soro aqui observada em ratos hiperglicêmicos.

A eficácia de THO na redução das concentrações de glicose no sangue, bem como a atividade antihiperglicêmica aponta para uma ação insulínomimética deste triterpeno, como já descrito para alguns triterpenos que promovem o aumento da absorção de glicose no músculo esquelético (Miura et al., 2004; Castro et al., 2014) e em adipócitos 3T3-L1 (Jung et al., 2007; Huang et al., 2010).

Verificou-se que o THO estimulou significativamente a captação de glicose no tecido adiposo por via dependente de PI3K e da rede de actina e de microtúbulos do citoesqueleto intacto, não tendo qualquer ação dependente do receptor tirosina-cinase da insulina. A falta de efeito de THO na atividade de auto-fosforilação da tirosina do RI pode ser explicado por um perfil dose-dependente como já foi descrito para o ácido ursólico e ácido oleanólico, em adipócitos 3T3-L1 (Jung et al., 2007; Lin et al., 2008). Triterpenos como o ácido betulínico, ácido ursólico, 3 β -taraxerol, ácido oleanólico, ácido paquímico e ácido

corosólico são descritos por agir através de ambas as vias dependentes e independentes de insulina. Triterpenos aumentam a auto-fosforilação do receptor de insulina e inibem a atividade da PTP1B. Além disso, esses triterpenos estimulam a fosforilação e ativação do PI3K, IRS1, AKT e AMPK. Ainda, estes compostos estimulam a translocação de GLUT4 no tecido muscular e adiposo (Jung et al., 2007; Huang et al., 2010; Ha et al., 2009; Castro et al., 2014, Castellano et al., 2013; et Alqahtani al., 2013). Todos estes resultados apontam para uma possível ação de THO estimulando a translocação de GLUT4 no tecido adiposo, de forma semelhante para as vias clássicas de translocação estimuladas por insulina (Chang et al., 2004; Govers, 2014).

Para reforçar esta hipótese, o efeito de THO na captação de glicose envolve proteínas de compartimentos associados a GLUT4, implicados nos movimentos subcelulares das vesículas contendo GLUT4 e a fusão com a membrana plasmática (Riento et al., 1998; Govers, 2014). Demonstrou-se que a captação de glicose estimulada por insulina é mediada principalmente através do rápido movimento de GLUT4 de um compartimento intracelular para a superfície celular (Chang et al., 2004; Govers, 2014). De forma muito semelhante à insulina, descobrimos que o THO induz significativamente a translocação de vesículas intracelulares contendo GLUT4. Além disso, o aumento da captação de glicose mediado por THO foi bloqueado pelo inibidor de P38 MAPK, SB239063, em tecido adiposo. Há estudos que mostram que além de translocação, a insulina também estimula a ativação de GLUT4 para a membrana plasmática por meio de vias de sinalização que envolvem MAPK P38 (Sweeney et al, 1999; Somwar et al., 2001; Furtado et al., 2003). Recentemente, este efeito também foi demonstrado para o canferitrin, um flavonóide que estimula a captação de glicose no músculo, e ao extrato metanólico de *Lagerstroemia speciosa*, um extrato rico em triterpenóides (Keawpradub e Purintrapiban, 2009; Cazarolli et al., 2013).

A translocação de GLUT4 estimulada por THO parece ser independente da síntese de GLUT4, uma vez que o efeito estimulador de THO em captação de glicose não envolve a via da MAPK MEK-ERK, bem como este triterpeno não foi capaz de aumentar nem o conteúdo total de proteína GLUT4 nem a expressão de mRNA deste transportador de glicose no tecido adiposo, (embora alguns estudos demonstrem uma ação de alguns triterpenos no aumento da expressão do GLUT4 em adipócitos 3T3-L1 (Huang et al., 2010; Castellano et al., 2013), Gao et al (2013) e Sheng, Sun (2011)). Com base nos resultados aqui relatados, podemos supor que THO precisa da integridade da rede de tráfego vesicular/ 'docking'/ fusão para sua ação estimulante sobre a captação de glicose no

tecido adiposo, estabelecendo a translocação de GLUT4 e ativação na membrana plasmática como um dos mecanismos de ação proposto para o THO na homeostase da glicose.

Alguns estimuladores da captação de glicose em tecidos responsivos à insulina podem também aumentar a atividade intrínseca do GLUT4 por meio da sua ativação (Furtado, Poon, Klip, 2003; Turban et al., 2005.). Isto foi proposto a partir da observação de que o inibidor farmacológico da P38, o SB20358 (um piridinil imidazol), potentemente inibe o transporte de glicose em células adiposas 3T3-L1 e musculares L6, indicando o papel da proteína MAPK P38 como a ativadora do GLUT4 (Sweeney, 1999; Furtado, Poon e Klip, 2003), uma vez que foi demonstrado também que o mecanismo de ação do SB20358 não se dá por meio de ligação direta ao GLUT4 ou por algum efeito inespecífico sobre outras proteínas de vias de sinalização (fora de alvo) assim como não altera o processo de translocação nem de inserção do GLUT4 a membrana (Sweeney, 1999).

Nesta perspectiva, a completa inibição do estímulo de THO na captação de glicose em presença do inibidor de P38 associado com o significativo aumento na quantidade de P38 fosforilada (pP38) na fração membranar de tecido adiposo incubado em presença do triterpeno nos mostra uma possível ação do THO no aumento da atividade do GLUT4 (ativação). Ainda, como esperado, SB inibiu completamente a quantidade de pP38 na fração membranar, contudo não foi hábil em inibir a quantidade de GLUT4 nesta fração, corroborando o que já é relatado na literatura. Assim, o THO pode estar estimulando a migração da P38 a regiões membranares para ativar o GLUT4 e que esse aumento na atividade pode estar ocorrendo devido a fosforilação do GLUT4. Alguns autores descrevem que esta fosforilação possa ocorrer na região C-terminal no resíduo S488 (Furtado, Poon, Klip, 2003).

Estes resultados juntos denotam um efeito rápido do THO agindo por meio de mecanismos que fortemente envolvem atividade membranar, estimulando a translocação do GLUT4 e obrigatoriamente também a ativação deste transportador de glicose, sendo ainda a completa relevância da participação membranar não elucidada, com questões como local específico de ocorrência da ativação (microdomínios) e papel dos lipídeos e integridade lipídica ainda sem resposta.

É descrito na literatura que a indução da endocitose mediada por caveolo em células endoteliais resulta na ativação e fosforilação da P38 e que a ativação da P38 é crucial para a endocitose mediada por caveolae nessas células, havendo uma interação entre a P38 e a caveolina 1 (Siddiqui et al., 2007).

Galbiati et al (1999) descreve que em adipócitos, a caveolina 1 é a isoforma predominante, e que seu efeito na endocitose mediada por caveolos e expressão é inibida quando células 3T3-L1 são incubadas em presença de inibidores da MAPK P38.

Isto é corroborado pelo fato do transportador de glicose 4 no tecido adiposo estar associado a regiões remanescentes de caveolae, ocorrendo uma possível participação de caveolae no mecanismo de ação do GLUT4, baseado na observação de que frações ricas em caveolina e que vesículas intracelulares de GLUT4 continham caveolina. Contudo essa participação ainda permanece controversa uma vez que co-localização de GLUT4 e caveolina não foi detectado em preparações de adipócitos isolados ou 3T3-L1 (Ros-Baro et al., 2001).

Conclusões

Este estudo fornece explicações mecanicistas para o aumento da captação de glicose no tecido adiposo tratado com THO. Este triterpeno atua através de vários alvos celulares que envolvem as vias de translocação do GLUT4, bem como a ativação do GLUT4 na membrana plasmática. Além disso, este composto não apresenta toxicidade celular. Considerando estes resultados, THO é um candidato promissor para um novo tipo de produto natural semelhante à insulina. Embora o mecanismo de ação detalhado do THO aqui descrito, novas investigações são requeridas. Os resultados do presente trabalho fornecem evidências de uma classe de compostos com atividade semelhante à da insulina e com potencial para o tratamento da síndrome metabólica ou diabetes.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) e Programa de Pós-graduação em Bioquímica/UFSC. Os autores expressam agradecimentos ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica, CCB/UFSC. AJGC está matriculado no programa de pós-graduação em Bioquímica do CCB/UFSC.

Declaração de conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Referências

Ali, H. et al. α -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *J Ethnopharmacol*, 107:449–455, 2006.

Alqahtani, A. et al. The Pentacyclic Triterpenoids in Herbal Medicines and Their Pharmacological Activities in Diabetes and Diabetic Complications. *Current Medicinal Chemistry*, 20: 2013.

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 31: S55-S60, 2008.

Aronoff, S.L. et al. Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon. *Diabetes Spectrum*. 17, 2004.

Tiwari, A. K V. et al. Oleanolic acid - an α - Glucosidase inhibitory and antihyperglycemic active compound from the fruits of *Sonneratia caseolaris*. *Open Access Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 1: 19-23, 2010

Azevedo, M. F. et al. Ursolic acid and luteolin-7-glucoside improve lipid profiles and increase liver glycogen content through glycogen synthase kinase-3. *Phytother Res*. 24, S220-4, 2010a.

Postal, B. G. et al. Mechanism of Action of Nutraceuticals on Intestine to Ameliorate Glucose Homeostasis: Follow-up Studies by an In Situ Approach. *J Cell Sci Ther*. 5:3, 2014.

Liu, C. et al. Increased glucagon-like peptide-1 secretion may be involved in antidiabetic effects of ginsenosides). *J Endocrinol*. 217: 185-96, 2013.

Carvalho, F.K. Análise Fitoquímica e a atividade biológica de *Croton antispyhiliticus* Martius e *Croton heterodoxus* Baillon, Doctorate Thesys, Federal University of Santa Catarina, Brasil (2013) 224p.

Castellano, J. M, et al. Biochemical basis of the antidiabetic activity of oleanolic acid and related pentacyclic triterpenes. *Diabetes*, 62. 1791-9, 2013a.

Castro, A. J. G. et al. Betulinic acid and 1,25(OH)₂ vitamin D₃ share intracellular signal transduction in glucose homeostasis in soleus muscle. *Int J Biochem Cell Biol.* 48, 18-27, 2014.

Cazarolli, L. H. et al. Flavonoids: cellular and molecular mechanism of action in glucose homeostasis. *Mini Rev Med Chem.* 8, 1032-8, 2008b.

Cazarolli, L. H. et al. Mechanism of action of the stimulatory effect of apigenin-6-C-(2"-O-alpha-l-rhamnopyranosyl)-beta-L-fucopyranoside on 14C-glucose uptake. *Chem Biol Interact.* 179, 407-12, 2009.

Cazarolli, L. H. et al. Insulin signaling: a potential signaling pathway for the stimulatory effect of kaempferitrin on glucose uptake in skeletal muscle. *Eur J Pharmacol.* 712, 1-7, 2013.

Chang, L. et al. Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Molecular Medicine.* 10, 65–71, 2004.

Cho, Y.M. et al. Glucagon-Like Peptide-1: Glucose Homeostasis and Beyond. *Annu. Rev. Physiol.* 76, 535–59, 2014.

Damazio, R. G. et al. Antihyperglycemic activity of naphthylchalcones. *Eur J Med Chem.* 45, 1332-7, 2010.

Nathan, D. M. et al. Medical Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: A Consensus Algorithm for the Initiation and Adjustment of Therapy - A consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care.* 32, 193–203, 2009.

Fourie, T. G.; Snyckers, F. O.; *J. Nat. Prod.* 52, 5, 1129, 1989.

Furtado, L.M. et al. GLUT4 activation: thoughts on possible mechanism. *Acta Physiol. Scand.* 178, 287–296, 2003.

Giner, J. L. and Djerassi, C. A. *Phytochemistry*, 39, 333-335, 1995.

Govers, R. Molecular mechanisms of GLUT4 regulation in adipocytes. *Diabetes & Metabolism*, 2014.

Gustavsson, J. et al. Localization of the insulin receptor in caveolae of adipocyte plasma membrane. *FASEBJ.* 13, 1961-71, 1999.

Ha, D. T. et al. Palbinone and triterpenes from Moutan Cortex (*Paeonia suffruticosa*, Paeoniaceae) stimulate glucose uptake and glycogen synthesis via activation of AMPK in insulin-resistant human HepG2 Cells. *Bioorg Med Chem Lett* 19, 5556-9, 2009.

Hardie, D. G. Organismal carbohydrate and lipid homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4, a006031, 2012.

Hua, S. et al. Structure-activity relationships of oleanane- and ursane-type triterpenoids. *Botanical Studies.* 47, 339-368, 2006.

Hou, W. et al. Triterpene acids isolated from *Lagerstroemia speciosa* leaves as alpha-glucosidase inhibitors. *Phytother Res.* 23, 614-618, 2009.

Jäger, S. et al. Pentacyclic triterpene distribution in various plants – rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. *Molecules.*14, 2016-2031, 2009.

Jun, L. et al. Maslinic acid modulates glycogen metabolism by enhancing the insulin signaling pathway and inhibiting glycogen phosphorylase. *Chin J Nat Med.*12, 259–265, 2014.

Jung, S. H. et al. Insulin-mimetic and insulin-sensitizing activities of a pentacyclic triterpenoid insulin receptor activator. *Biochem J.* 403, 243-50, 2007.

Kanzaki, M. Insulin receptor signals regulating GLUT4 translocation and actin dynamics. *Endocr J.* 53, 267-93, 2006.

Keawpradub, N, Purintrapiban, J. Upregulation of glucose uptake in L8 myotubes by the extract from *Lagerstroemia speciosa*: a possible mechanism of action. *Maejo Int. J. Sci. Technol.* 3, 472-485, 2009.

Krisman, C. R. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. *Anal Biochem.* 4, 17-23, 1962.

Koops, A. J. et al. *Plant Science.* 74, 185-191, 1991.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680–5, 1970.

Liang, Z. et al. Identification of pentacyclic triterpenes derivatives as potent inhibitors against glycogen phosphorylase based on 3D-QSAR studies. *Eur J Med Chem*. 46, 2011–21, 2011.

Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 25, 402–8, 2001.

Lowry O.H. et al. Protein measurement with the Folinphenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193, 265–75, 1951.

Yoshikawa, M.; Matsuda, H.. Antidiabetogenic activity of oleanolic acid glycosides from medicinal foodstuffs. *BioFactors*. 13, 231–237, 2000.

Moghaddam, M. G. et al. Biological Activity of betulinic Acid: A Review. *Pharmacology & Pharmacy*. 3, 119–123, 2012.

Mohamed, N. A. et al. Effect of Sitagliptin in Combination with Glimpiride on Glycemic Control and Islet Cell Diameter/Proliferation in A Model of Type 2 Diabetic Rats. *Journal Of Pharmacy*. 3, 72–80, 2013.

Moore, M.C. et al. Regulation of hepatic glucose uptake and storage in vivo. *Advances in Nutrition*. 3, 286–294, 2012.

Nazaruk, J.; Borzym-Kluczyk, M. The role of triterpenes in the management of diabetes mellitus and its complications. *Phytochemistry Reviews*. 2014.

Ngubane, P.S. et al. The effects of *Syzygium aromaticum*-derived oleanolic acid on glycogenic enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Ren Fail*. 33, 434–439, 2011.

Nishiumi, S.; Ashida, H. Rapid preparation of a plasma membrane fraction from adipocytes and muscle cells: application to detection of translocated glucose transporter 4 on the plasma membrane. *Bioscience, Biotechnology and Bio-chemistry*. 71, 2343–6, 2007.

Parpal, S. et al. Cholesterol depletion disrupts caveolae and insulin receptor signaling for metabolic control via insulin receptor substrate-1, but not for mitogen-activated protein kinase control. *J Biol Chem.* 276, 9670-8, 2001.

Pereira, D. F. et al. Effects of flavonoids on α -glucosidase activity: potential targets for glucose homeostasis. *Nutrition.* 27, 1161-7, 2011.

Riento, K. et al. Interaction of Munc-18-2 with syntaxin 3 controls the association of apical SNAREs in epithelial cells. *J. Cell Sci.* 111, 2681-2688, 1998.

Ros-Baro, A. et al. Lipid rafts are required for GLUT4 internalization in adipose cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 12050–12055, 2001.

Badole, S. L. et al. Cycloart-23-ene-3b, 25-diol stimulates GLP-1(7–36) amide secretion in streptozotocin–nicotinamide induced diabetic Sprague Dawley rats: A mechanistic approach. *European Journal of Pharmacology* 698, 470–479, 2013.

Saltiel, A.R.; Pessin, J.E. (ed). *Mechanisms of insulin action.* Springer Science/Landes Bioscience. 1 ed.; 2007; New York, New York, USA. 214p.

Sangeetha, K.N. et al. 3beta-taraxerol of *Mangifera indica*, a PI3K dependent dual activator of glucose transport and glycogen synthesis in 3T3-L1 adipocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1800, 359-366, 2010.

Sheng, H.; Sun, H. Synthesis, biology and clinical significance of pentacyclic triterpenes: a multi-target approach to prevention and treatment of metabolic and vascular diseases. *Nat. Prod. Rep.*, 28, 543–593, 2011.

Somwar, R. et al. GLUT4 translocation precedes the stimulation of glucose uptake by insulin in muscle cells: potential activation of GLUT4 via p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem. J.* 359, 639 – 949, 2001.

Sweeney, G. et al. An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase prevents insulin-stimulated glucose transport but not glucose transporter

translocation in 3T3-L1 adipocytes and L6 myotubes. *J. Biol. Chem.* 274, 10071 – 10078, 1999.

Teodoro, T. et al. Oleanolic acid enhances insulin secretion in pancreatic beta-cells. *FEBS Lett.* 582, 1375-80, 2008.

Huang, T. et al. Role of GLP-1 in the Hypoglycemic Effects of Wild Bitter Gourd. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2013.

Miura, T. et al. Corosolic Acid Induces GLUT4 Translocation in Genetically Type 2 Diabetic Mice Toshihiro *Biol. Pharm. Bull.* 27, 1103—1105, 2004.

Xu, R. et al. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry.* 65, 261–291, 2004.

Gao, Y. et al. Ginsenoside Re reduces insulin resistance through activation of PPAR- γ pathway and inhibition of TNF- α production. *Journal of Ethnopharmacology.* 147, 509 – 516, 2013.

Huang, Y-C. et al. Pachymic acid stimulates glucose uptake through enhanced GLUT4 expression and translocation. *European Journal of Pharmacology.* 648, 39–49, 2010.

Varley, H. et al. *Practical Clinical Biochemistry.* In: Heinemann IW, (eds.). Medical Books Ltd, London, 1976.

Watson, R.T. et al. Lipid raft microdomain compartmentalization of TC10 is required for insulin signaling and GLUT4 translocation. *J Cell Biol.* 154, 829-40, 2001.

Wen, X. et al. Naturally occurring pentacyclic triterpenes as inhibitors of glycogen phosphorylase: synthesis, structure-activity relationships, and X-ray crystallographic studies. *J Med Chem.* 51, 3540-54, 2008.

Zhang, L. et al. Synthesis and biological evaluation of asiatic acid derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylases. *Chem Biodivers.* 6, 864-74, 2009.

Zhonghui, L. et al. Oleanolic acid derivative NPLC441 potently stimulates glucose transport in 3T3-L1 adipocytes via a multi-target mechanism. *biochemical pharmacology*. 76, 1251– 1262, 2008.

Zhu, P. et al. Terpenoids. III: Synthesis and biological evaluation of 23-hydroxybetulinic acid derivatives as novel inhibitors of glycogen phosphorylase. *Bioorg Med Chem Lett*. 19, 6966-9, 2009.

5.1.2 Conclusões deste capítulo

Em conclusão, AB, AU e THO regulam a homeostase da glicose através do forte estímulo da absorção periférica de glicose e por meio da potencialização da secreção insulínica. Os mecanismos insulinomimético destes triterpenos no músculo e/ou tecido adiposo envolvem a participação da via Akt-PI3K e/ ou vias dependentes de cálcio, através da ativação da CamK II. Ainda observou-se que mecanismo de ativação, translocação e síntese do GLUT4 em tecido adiposo e muscular esquelético são fatores determinantes para a ação estimulatória destes triterpenos.

Capítulo 2: Ação secretagoga

**Estudos dos efeitos e mecanismo de ação de tripterpenos na secreção
insulínica em células- β de ilhotas pancreáticas**

5.2.1 3 β -hidroxihop-22(29)eno, Fern-9(11)-eno-2 α ,3 β -diol, Ácido betulínico

A secreção insulínica é determinada pela ativação de receptores acoplados à proteína G, ativado pela interação de ligantes exógenos e endógenos, bem como pela participação de canais iônicos (K_{ATP} , CCDV-L e CIC), de forma que alguns secretagogos de insulina utilizados farmacologicamente agem de forma direta na secreção através desses mecanismos (MELONI et al. 2013; RAJAN et al. 1990; FRIDLAND et al. 2013; ALVARSSON et al. 2003).

Alguns triterpenos são descritos como fortes secretagogos de insulina (LÜ et al. 2009; CASTRO et al. 2014, 2015), contudo os seus mecanismos de ação ainda permanecem não elucidados.

Nessa perspectiva, foram estudados os mecanismos de ação dos triterpenos pentacíclicos 3 β -hidroxihop-22(29)eno, Fern-9(11)-eno-2 α ,3 β -diol (fernenodiol) e Ácido betulínico (AB) bem como o da curcumina no estímulo do influxo de cálcio e secreção de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos.

O 3 β -hidroxihop-22(29)eno (BHH) é um triterpeno do tipo hopano formado a partir da ciclização do esqualeno composto de 4 anéis de 6 membros e um de 5 membros (ALQAHTANI et al. 2013; PATOČKA, 2003).

Muitos triterpenos pentacíclicos são sintetizados à hopanos e a partir deste são convertidos a outros triterpenos intimamente relacionados, como os ferenos e isoferenos (PAN et al. 2011)

As atividades biológicas dos triterpenos do tipo hopano ainda são pouco descritas, sendo conhecida apenas suas ações antimicrobianas e antitumoral (LIU et al. 2014), sendo descrito aqui seus efeitos inéditos na homeostasia da glicose em animais hiperglicêmicos.

O ferenodiol é um triterpeno também do tipo hopano presente em grandes quantidades nas samambaias, contudo ele pode ser isolado também de várias plantas superiores, como no caso deste trabalho, do *Croton heterodoxus* (Euphorbiaceae) (OMORO; IKUSE, 1970). A literatura sobre os ferenos é escassa, com trabalhos voltados para descrição da presença e caracterização do ferenol em extratos ou frações isoladas de gramíneas, Euphorbiaceas e/ou Polypodiopsidas (XU et al. 2004; HAUKE et al. 1992), e também com ações biológicas específicas pouco caracterizadas (KHAN; GILANI, 2009; YENJITA et al. 2010). Nenhum efeito na glicemia é descrito para esse triterpeno.

5.2.1.1 O efeito agudo de 3 β -hidroxihop-22(29)eno na secreção insulínica para a homeostasia da glicose é mediado por GLP-1, canais de potássio e canais de cálcio.

Artigo Publicado.

Periódico: The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, v. 150, p. 112-122, 2015.

Autores: Allisson Jhonatan Gomes Castro, Luisa Helena Cazarolli, Gabrielle da Luz, Delsi Altenhofen, Francieli Kanumfre de Carvalho, Adair Roberto Soares dos Santos, Moacir Geraldo Pizzolatti, Fátima Regina Mena Barreto Silva.

O efeito agudo de 3 β -hidroxihop-22(29)eno na secreção insulínica para a homeostasia da glicose é mediado por GLP-1, canais de potássio e canais de cálcio.

Allisson Jhonatan Gomes Castro^a, Luisa Helena Cazarolli^b, Gabrielle da Luz^a, Delsi Altenhofen^a, Francieli Kanumfre de Carvalho^c, Adair Roberto Soares dos Santos^d, Moacir Geraldo Pizzolatti^c, Fátima Regina Mena Barreto Silva^a

^aDepartamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.

^bUniversidade Federal da Fronteira Sul, Laranjeiras do Sul, PR, Brasil.

^cDepartamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.

^dUniversidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Florianópolis, SC, Brasil

Resumo

3 β -Hidroxi-hop-22-(29)-eno (BHH) é um triterpeno com significativo efeito secretagogo mediado pelo intestino e células- β que culmina na homeostasia da glicose. Na célula- β pancreática de rato, BHH estimula a captação de glicose e o aumento do cálcio intracelular, estimulando a translocação de vesículas insulínicas para a membrana plasmática e, assim, a secreção de insulina. O objetivo do estudo foi investigar o efeito do BHH associado com o envolvimento iônico e a consequente ativação de proteínas cinases na liberação de insulina por ilhotas pancreáticas. Foi evidenciado o efeito *in vivo* do BHH na secreção de GLP-1 e insulina e, *in vitro*, estudos de transdução de sinal em ilhotas relacionados com este efeito agudo. Os resultados mostram que BHH potenciou a secreção de GLP-1 e insulina induzida por glicose e aumentou significativamente o conteúdo de glicogênio hepático após tratamento oral. Além disso, o BHH induziu a despolarização das células- β após 10 min de incubação, evidenciado pelo envolvimento dos canais de potássio (dependentes de ATP e de Ca^{2+}) estudados na presença/ ausência de glibenclamida, apamina e diazóxida. Ainda, o envolvimento dos canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L (L-CCDV) foi corroborado com o uso de nifedipina. Este estudo também fornece evidências para um "cross-talk" entre a alta concentração intracelular de cálcio, PKA e PKC na transdução de sinal do BHH, estimulando a secreção de insulina. Em conclusão, o BHH diminui a glicemia, estimula a secreção de insulina e de GLP-1 e aumenta significativamente o conteúdo de glicogênio hepático. Este novo triterpeno modula o influxo de cálcio através de canais K_{ATP} , K-Ca^{2+} e canais CCDV-L, bem como a atividade de PKA e PKC em ilhotas pancreáticas contribuem para a sinalização do BHH na atividade secretora.

Palavras-chave: Triterpenos, glicemia, insulina, pâncreas, cálcio, potássio.

1. Introdução

Os triterpenos são uma grande classe de metabólitos sintetizados e distribuídos em plantas e podem ser encontrados como ácidos livres ou agliconas. Eles estão disponíveis em um grande número de óleos essenciais, resinas e ceras e fornecem uma variedade de produtos comerciais incluindo agentes farmacêuticos (McGarvey e Croteau, 1995). Tendo em mente os benefícios dos triterpenos como compostos potentes que podem ser úteis para terapia da diabetes melito (Mei-Chin, 2012; Castro et al., 2014; Castro et al., 2015), relativamente pouco se sabe sobre o mecanismo de ação em alvos específicos envolvidos na homeostasia da glicose. Levando em consideração as estruturas, os triterpenos são agrupados principalmente em eufanos, taraxanos, hopanos, oleananos, lupanos, ursanos e bacaranos. Em plantas superiores, a presença deles depende da espécie, estação e do ambiente de cultivo (Connolly e Hill, 2000; Mei-Chin, 2012).

A glicemia é altamente regulada pela captação de glicose nos tecidos-alvo da insulina, como músculo e tecido adiposo, e pela síntese endógena de glicose pelo fígado e rins (Gerich, 2000). O controle da homeostasia da glicose pode começar no intestino, com a regulação das dissacaridasases que aumentam a disponibilidade monossacarídica para absorção, como detectado depois de tratamentos *in vivo* e *in vitro* (Yee e Fong, 1996; Pereira et al., 2011). A glicose da dieta atravessa a membrana plasmática do enterócito através do co-transportador de Na^+ /glicose (SGLT1) para dentro da célula contra o gradiente de concentração e depois por meio de um transportador de glicose (GLUT2), atravessa a membrana basolateral para o sangue (Wright et al., 2003; Silva et al., 2013). Estes dois transportadores são requeridos para cooperar com a homeostasia da glicose pós-prandial e em estados pós-absortivo (Gerich, 2000; Postal et al., 2014). Além disso, o peptídeo 1 'glucagon-like' (GLP-1), um hormônio secretado pelas células intestinais L em resposta às refeições, estimula a secreção de insulina estimulada por glicose (GSIS) e é uma das incretinas de grande interesse na pesquisa atual relacionada com o equilíbrio da glicose (Luo et al., 2013).

A glicose é o principal secretagogo fisiológico de insulina a partir de células- β pancreáticas (Komatsu et al., 2013). O aumento abrupto de glicose extracelular (de 3 mmol/ L a 22 mmol/ L) caracteriza uma secreção bifásica de insulina estimulada por glicose. A primeira fase da secreção de insulina ocorre em torno de 5-6 min após a estimulação e a segunda fase da liberação de insulina é caracterizada pelo aumento gradual do hormônio que dura mais de 60 min (Grodsky, 1972; Gerich, 2000). A hiperglicemia induz a absorção de glicose nas células β

pancreáticas e eleva a relação ATP/ADP. O ATP fecha os canais de potássio dependentes de ATP (canais K_{ATP}) e desencadeia uma despolarização que aumenta a abertura dos canais de Ca^{2+} ativados por voltagem e culmina na secreção de insulina (Speier et al., 2007). De forma geral, a alta concentração de Ca^{2+} promove a liberação de grânulos de secreção de insulina (exocitose) modulada por PKA, PKC e PLC (Easom, 2000; Skelin et al., 2010; Dolenšek et al., 2011; Dzhura et al., 2011).

Nos últimos anos, houve um crescente interesse em agentes antidiabéticos de fonte natural, especialmente aqueles derivados de plantas, por, de uma maneira geral, possuírem baixa toxicidade e poucos efeitos colaterais em comparação a medicamentos sintéticos (Cazarolli et al., 2008; Silva et al., 2013; Castro et al., 2014). Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar o papel do triterpeno BHH na glicemia e o mecanismo de ação na translocação de vesículas insulínicas e secreção de insulina pelas células β . Além disto, a avaliação da toxicidade foi realizada *in vivo* e *in vitro* ao longo do tempo experimental.

2. Materiais e métodos

2.1 Materiais

Fosfato de sitagliptina monohidratado, collagenase Tipo V, ácido 1,2-bis (2-aminofenoxi) etano-N,N,N',N'-tetracético (acetoximetil éster) (BAPTA-AM), nifedipina, apamina, diazóxida, glibenclamida, cloreto de estearoilcarnitina (ST), N-[2-(*p*-bromocinamilamino)etil]-5-isoquinolinesulfonamida (H-89) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). O kit ELISA para determinações quantitativas de insulina de rato (catalogo no. EZRMI-13K) foi obtido da Millipore (St Charles, MO, USA). O kit para determinações quantitativas do peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1) de rato (Cat. # EZGLP1T-36K) foi obtido da Millipore (St. Charles, MO; USA), [$U-^{14}C$]-2-Deoxi-D-glicose, atividade específica 9,25 GBq/mmol, [^{45}Ca]CaCl₂ (sp. act. 321 KBq/mg Ca²⁺), e o líquido de cintilação biodegradável foram obtidos da Perkin-Elmer Life e Analytical Sciences (Boston, MA, USA).

2.2. Material vegetal

2.2.1. Isolamento e caracterização química do triterpeno BHH

O triterpeno 3 β -hidroxihop-22 (29) -eno (BHH) foi isolado e caracterizado conforme Carvalho (2013).

As partes aéreas de *Croton heterodoxus* Baillon foram coletadas no refúgio do rio Pitangui, com coordenadas UTM 593095 e 7231847, na

região de Campos Gerais, Ponta Grossa, PR, em abril e junho de 2010, em parceria com o projeto "Identificação de espécies para restauração dos ecossistemas impactados pela floresta circundante da fonte Alagados", sob a coordenação de Rosemeri Segecin Moro, Universidade Estadual de Ponta Grossa, PR, Brasil. O material vegetal foi identificado pelo botânico Daniel de Barcellos Falkenberg do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina. Um espécime comprovante foi depositado no herbário FLOR e registrado com o número 37689.

O triterpeno 3 β -hidroxihop-22 (29) -eno (BHH) foi isolado a partir da fração hexânica do extrato hidroalcoólico bruto obtido de *C. heterodoxus* (partes aéreas) como se segue: O extrato hidroalcoólico bruto obtidos a partir de hastes de *C. heterodoxus* (152,51 g) foi ressuspensão em etanol (15%) e água (85%), e fracionados por extração líquido-líquido utilizando-se hexano e EtOAc, proporcionando 29,27 g da fração hexânica, 46,60 g da fração de EtOAc e 41,75 g do resíduo insolúvel. A fração hexânica (25,44 g) foi submetida à cromatografia em gel de sílica 60 e eluída com hexano e quantidades crescentes de acetato de etila (0-100%), obtendo 155 frações (125 mL cada). As frações 24-25 (hexano-EtOAc 85:15) foram combinadas e purificadas em hexano/ EtOAc-4: 1, obtendo-se 0,62 g do triterpeno BHH que foi identificado como 3 β -hidroxihop-22-(29)-eno através de detalhada análise espectral de RMN incluindo ^1H - ^1H COSY, HMQC e HMBC e comparação com resultados da literatura (Koops et al., 1991; Giner e Djerassi, 1995; Fourie e Snyckers, 1989): MM 426,72 g mol $^{-1}$; m.p 248,5 °C; Rf (tlc) 0,50 (80:20 *n*-hexano-EtOAc); IV_{KBr} ν_{max} cm $^{-1}$ 3422; 2917-2849; 1733. NMR ^1H (CDCl $_3$) δ : 1,68 (m, H-1); 0,95 (m, H-2); 3,20 (dd, $J=11,52$ and $5,27$ Hz, H-3); 0,67 (m, H-5); 1,68 (m, H-6); 2,34 (m, H-7); 1,25 (m, H-9); 2,12 (m, H-11); 1,55 (m, H-12); 1,22 (m, H-13); 1,38 (m, H-15); 0,90 (m, H-16); 0,65 (m, H-17); 2,00 (m, H-19); 1,43 (m, H-20); 1,45 (m, H-21); 1,03 (s, H-23); 0,76 (s, H-24); 0,79 (s, H-25); 0,97 (s, H-26); 0,94 (s, H-27); 0,72 (s, H-28); 4,78 (sl, H-29); 1,75 (s, H-30). NMR ^{13}C (CDCl $_3$) δ : 38,8 (C-1); 31,9 (C-2); 79,0 (C-3); 29,4 (C-4); 55,1 (C-5); 18,4 (C-6); 33,3 (C-7); 41,7 (C-8); 50,3 (C-9); 37,1 (C-10); 21,0 (C-11); 22,7 (C-12); 49,4 (C-13); 42,0 (C-14); 33,6 (C-15); 21,6 (C-16); 54,8 (C-17); 44,8 (C-18); 41,9 (C-19); 23,9 (C-20); 46,4 (C-21); 148,7 (C-22); 28,0 (C-23); 16,7 (C-24); 14,1 (C-25); 16,1 (C-26); 16,6 (C-27); 15,8 (C-28); 110,1 (C-29); 25,0 (C-30). Este composto foi previamente isolado de *Lathyrus euphorbia* (Koops et al., 1991; Giner e Djerassi, 1995) e *Rhododendron lepidotum* (Zhou et al., 2012).

2.3 Animais

Ratos machos Wistar com 50-55 dias de idade (180-210 g) foram utilizados. Os ratos foram criados em biotério e alojados em biotério setorial com ar condicionado ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), com iluminação controlada (luzes acesas 6:00-18:00 h). Os animais foram mantidos com ração (Nuvital, Nuvilab CR1, Curitiba, PR, Brasil), e água disponível à vontade. Ratos em jejum foram privados de alimento durante 16 h, mas foi permitido o livre acesso à água. Todos os animais foram cuidadosamente monitorados e mantidos de acordo com as normas do Comitê de Ética local para Uso de Animais (CEUA-Protocolo UFSC PP00414).

2.4 Curva oral de tolerância à glicose

Ratos em jejum foram divididos em três grupos de seis animais. Grupo I, ratos hiperglicêmicos que receberam glicose (4 g/ kg, 8,9 M); Grupo II, ratos hiperglicêmicos que receberam o veículo, 2,5% de Tween 80; Grupo III, os ratos hiperglicêmicos que receberam BHH (0,1; 1 e 10 mg/ kg). Ainda, ratos não submetidos a jejum foram utilizados como controle normal. A glicemia foi medida antes de qualquer tratamento (tempo zero). Imediatamente, os ratos receberam o tratamento (veículo ou BHH) e após 30 min receberam uma sobrecarga de glicose. A curva de tolerância à glicose foi iniciada apenas após a sobrecarga de glicose e, em seguida, a glicemia foi medida em 15, 30, 60 e 180 min. Todos os tratamentos foram administrados por via oral. O sangue foi coletado para determinação da glicemia pelo método da glicose-oxidase (Varley et al., 1976), e da insulina no soro.

2.5 Dosagem sérica de insulina

A concentração sérica de insulina foi determinada por ELISA, de acordo com as instruções do fabricante. O espectro de valores detectados por este ensaio foi de 0,2-10 ng/ mL. Os coeficientes de variação intra-e inter-ensaio de insulina foram 3,22 e 6,95, respectivamente, com um valor de sensibilidade de 0,2 ng/ mL. A concentração sérica de insulina foi estimada por meio de medida colorimétrica a 450 nm com um leitor de placas ELISA (Organon Teknika, Roseland, New Jersey, EUA) através de interpolação de uma curva padrão. As amostras foram analisadas em duplicata e os resultados foram expressos como ng/mL de insulina sérica (Cazarolli et al., 2009; Damazio et al., 2010).

2.6 *GLP-1 sérico*

Para análise da concentração sérica de GLP-1, os ratos em jejum foram divididos em dois grupos de seis animais: Grupo I, ratos que receberam apenas sitagliptina 10 mg/ kg (controle); e o Grupo II, ratos que receberam sitagliptina 10 mg/ kg e BHH 10 mg/ kg; Sitagliptina e BHH foram administrados 60 min e 30 min antes da indução da hiperglicemia oral (glicose 8,9 M; p.o), respectivamente. O sangue foi coletado em 0, 15, 30 e 60 min após a indução da hiperglicemia, centrifugado e o soro obtido foi utilizado para a medida de GLP-1 por ELISA, de acordo com as instruções do fabricante. A faixa de valores detectados pelo presente ensaio foi de 4,1-1000 pM. Os coeficientes de variação de intra- e inter-ensaio para o GLP-1 foram <5% e <12%, respectivamente, com um valor de sensibilidade de 1,5 pM. O nível de GLP-1 foi estimado por meio de medidas de absorvância a 450 e 590 nm. As amostras foram analisadas em duplicata e os resultados foram expressos como pM de GLP-1 sérico (Kitahara et al., 2011).

2.7 *Conteúdo de glicogênio*

O músculo sóleo de ratos hiperglicêmicos e tratados com BHH (0,1; 1 e 10 mg/ kg) ou não (controle) foi removido 180 min após a sobrecarga de glicose (4 g/ kg) e o conteúdo de glicogênio foi determinado. O glicogênio foi isolado a partir do tecido de acordo com (Krisman, 1962) e os resultados foram expressos em mg de glicogênio/ g de tecido (Castro et al., 2014).

2.8 *Isolamento de ilhotas pancreáticas*

O pâncreas de rato foi acessado por meio de incisão abdominal central. O canal biliar foi obstruído na porção de acesso duodenal (após ducto pancreático) e canulada no início do ducto colédoco (suficientemente proximal ao fígado). Tampão Krebs Ringer-bicarbonato com uma composição de NaCl 122 mM, KCl 3 mM, MgSO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 1,3 mM, KH₂PO₄ 0,4 mM, NaHCO₃ 25 mM e suplementado com HEPES (KRb-HEPES, 8 mM) foi introduzido lentamente através do ducto biliar por meio de seringa até o pâncreas estar claramente distendido. O pâncreas foi cuidadosamente removido e, em seguida, cortado em pequenas fatias (cerca de 2 x 2 mm) em placas de Petri contendo meio KRb-HEPES. Incubou-se o tecido em meio contendo KRb-HEPES suplementado com colagenase (3 mg/mL). Após a incubação, a mistura foi transferida para um tubo cônico (110 x 15 mm), ressuspensa em 10 mL de meio isento de colagenase e centrifugada à temperatura ambiente durante 3 min a 45 x g numa centrífuga excelsa

Baby (modelo 206), FANEM, São Paulo, SP, Brasil. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensão em meio KRb-HEPES fresco. Este procedimento de lavagem foi repetido cinco vezes; nas duas últimas lavagens as ilhotas foram decantadas sem centrifugação. Alíquotas (100 μ L) do sedimento final (contendo ilhotas isoladas) foram transferidas para tubos Eppendorff com o meio de incubação KRb-HEPES (Lacy e Kostianovsky, 1967; Frederico et al., 2012).

2.9 Estudos de captação de 14 C-deoxiglicose em ilhotas pancreáticas de rato

Para estudos de captação de [U- 14 C]-2-Deoxi-D-glicose foram utilizadas ilhotas pancreáticas isoladas de ratos euglicêmicos. As ilhotas foram pré-incubadas (30 min) e incubadas (tempo de tratamento) a 37 °C em tampão Krebs Ringer-bicarbonato (KRb) com uma composição de glicose 5,6 mM, NaCl 122 mM, KCl 3 mM, MgSO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 1,3 mM, KH₂PO₄ 0,4 mM, e NaHCO₃ 25 mM e borbulhado com O₂/ CO₂ (95%: 5%, v/ v) até atingir o pH 7,4. O tempo de captação de glicose na presença de BHH (10 nM) ou não (basal) foi realizado aos 10 e 30 min. 14 C-deoxiglicose (0,1 μ Ci/ mL; 0,12 nM) e BHH (10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} M) foi adicionado a cada amostra durante o período de incubação (30 min). As amostras foram processadas de acordo com (Cazarolli et al., 2009). Alíquotas foram utilizadas para a quantificação de proteína total de acordo com (Lowry et al., 1951) e os resultados foram expressos como nmol de unidades de glicose/ mg de proteína.

2.10 Ensaio de influxo de cálcio

As ilhotas isoladas foram pré-incubadas durante 60 min numa incubadora metabólica Dubnoff em tampão KRb-HEPES contendo glicose 5 mM e 45 Ca²⁺ (0,1 μ Ci/ mL) a 37 °C, pH 7,4 e gaseificada com O₂: CO₂ (95: 5; v/ v) para fim de equilibrar as concentrações intra e extracelular de 45 Ca²⁺. O tempo de incubação para estudos de influxo de cálcio na presença de BHH 100 nM ou não (basal) foi de 30, 60, 300, 600 e 900 s. Em seguida, as ilhotas foram incubadas durante 10 min em KRb-HEPES sem (basal) ou com o BHH (10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} M). Em alguns ensaios um bloqueador de canal, agonista, quelante de cálcio ou inibidores de proteína cinases foram adicionados durante os últimos 15 min de incubação, antes do tratamento e mantidos durante todo o período de incubação (ver legendas das figuras). Foram utilizados os seguintes fármacos: glibenclamida (20 μ M) (Frederico et al., 2012), apamina (0,1 μ M) (Menegaz et al., 2009), diazóxida (250 μ M) (Frederico et al., 2012), nifedipina (1 μ M) (Frederico et al., 2012; Kappel et al., 2013), BAPTA-

AM (50 μM), H-89 (10 μM) (Kappel et al., 2013), e ST (0,1 μM) (Zanatta et al., 2013). A incubação foi interrompida utilizando a técnica descrita por Batra e Sjögren (1983) com modificações (Frederico et al., 2012). Tampão gelado (1 mL com cloreto de lantânio (10 mM) a 2° C foi adicionado às amostras para interromper o fluxo de cálcio. Os tubos foram centrifugados durante 1 min a 45 x g. O sobrenadante foi conservado e as ilhotas foram lavadas duas vezes em tampão cloreto de lantânio. As ilhotas foram adicionados a tubos contendo 300 μL de NaOH 0,5 M e submetidas a digestão alcalina (100° C) durante 5 minutos. Alíquotas de 50 μL foram retiradas de cada amostra para a quantificação da radioatividade em líquido de cintilação Optiphase Hisafe III (Wallac Oy, Turku, Finlândia) em espectrômetro de cintilação líquida beta (modelo LS 6500; multi-Purpose Scintillation Counter-Beckman Coulter, Boston, EUA) e alíquotas de 5 μL foram usados para quantificação de proteína pelo método de Lowry e colaboradores (1951).

2.11 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para a observação ao microscópio eletrônico de transmissão (MET), amostras de pâncreas de rato foram incubadas na presença de BHH (100 nM) durante 5 ou 20 min, e foram fixadas por 18 horas com glutaraldeído (2,5%) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) mais sacarose (0,2 M) (Schmidt et al., 2009). O material foi pós-fixado com tetróxido de ósmio 1% durante 3 horas, desidratado em gradiente de acetona e embebidos em resina *Spurr*. Em seguida, as seções finas foram coradas com acetato de uranila seguido por citrato de chumbo de acordo com (Reynolds, 1963). Quatro réplicas foram preparadas para cada grupo experimental; duas amostras por repetição foram examinadas sob MET (Jeol JEM1011 a 80 kV) no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME, UFSC, Brasil). Foi avaliada a relação de vesículas citoplasmáticas de insulina por células β (Annerén et al., 2007).

2.12 Cálcio sérico e lactato desidrogenase

As amostras de sangue e o soro foram usadas para determinar a lactato desidrogenase (LDH) extracelular 180 minutos após o tratamento oral *in vivo* com BHH (10 mg/ kg). Solução KRb também foi utilizado para determinar a LDH extra e intracelular após 10 min de tratamento *in vitro* com BHH (100 nM). A concentração sérica de cálcio foi determinada em zero e 180 min após tratamento oral com 10 mg/ kg. A determinação do cálcio foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (Castro et al., 2014).

2.13 Dados e análises estatísticas

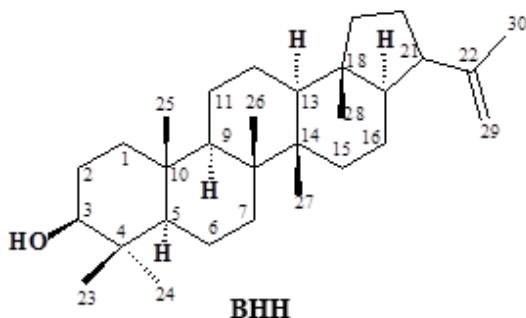
Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. análise de uma e duas vias de variância (ANOVA), seguido de pós-teste de Bonferroni ou teste *t* de Student não pareado foram utilizados para determinar diferenças significativas entre os grupos. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

3. Resultados

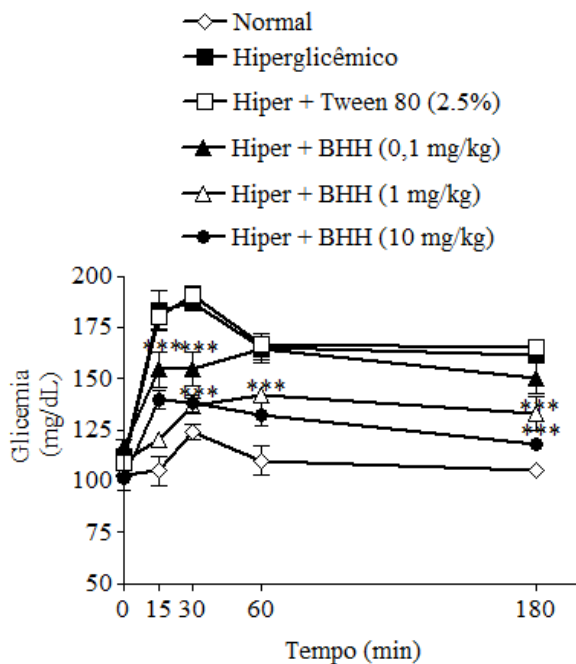
3.1 Efeito de BHH na glicemia e na secreção de GLP-1

A figura 1A mostra a estrutura de um novo triterpeno, o 3 β -hidroxihop-22 (29) -eno (BHH) e a Fig. 1B mostra o perfil da glicemia de ratos hiperglicêmicos após o tratamento oral com BHH (0,1, 1 e 10 mg/kg). O efeito agudo do composto foi capaz de diminuir significativamente a glicemia em todas as doses testadas durante o período estudado, quando comparado com o respectivo grupo basal hiperglicêmico. O efeito prolongado de BHH na redução da glicemia foi observado com as doses de 1 e 10 mg/kg do triterpeno testado, melhorando significativamente a tolerância à glicose. Como esperado, o veículo (Tween 80 2,5%) não modificou a glicemia ao longo do período de estudo quando comparado com o grupo basal hiperglicêmico e o grupo controle euglicêmico não mostrou uma mudança significativa no perfil glicêmico ao longo do período estudado. Em termos percentuais, a maior redução na glicemia detectada foi em períodos curtos (15 e 30 min), após tratamento com BHH nas doses de 0,1 e 1 mg/kg (cerca de 16% e 17% e cerca de 35% e 27%, respectivamente), sendo mantido pelo efeito rápido deste composto, a nível intestinal, uma vez que a liberação de GLP-1 foi estimulada de forma significativa aos 15 min, em comparação com o grupo basal positivo hiperglicêmico + sitagliptina (Fig. 1C).

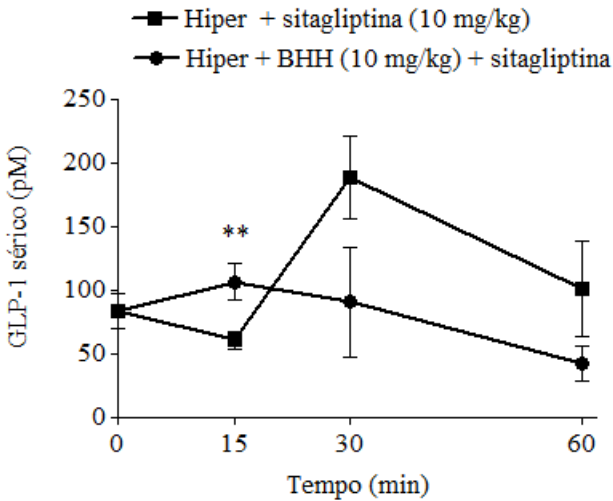
Fig. 1. Estrutura (A) efeito de BHH na curva oral de tolerância à glicose, (B) e na secreção de GLP-1 *in vivo* (C) em ratos hiperglicêmicos. Valores são expressos como média \pm E.P.M. com $n = 5$. Significante em *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$ comparado ao respectivo valor do controle hiperglicêmico.



(A)



(B)



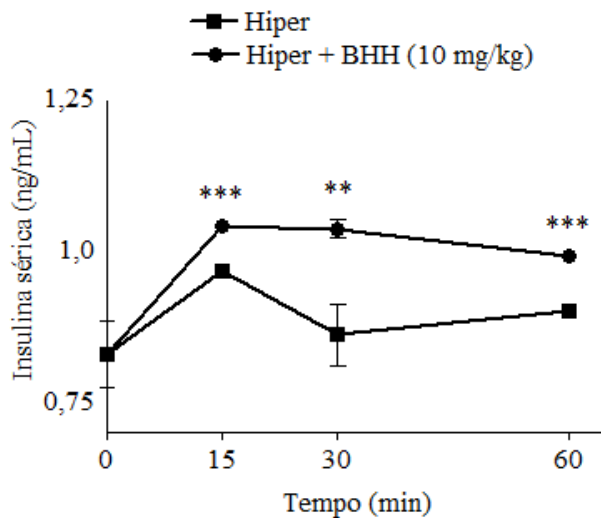
(C)

3.2 Efeito de BHH na secreção de insulina e translocação de vesículas insulínicas

Como esperado, a secreção de insulina induzida por glicose foi observada, tendo em vista o clássico efeito secretagogo da glicose, e o BHH potenciou significativamente a secreção de insulina induzida por glicose ao longo do tempo avaliado. O aumento de 8%, 20% e 10% da secreção de insulina na presença de BHH foi mantido invariável em 15, 30, 60 min, respectivamente (Fig. 2A), com um índice insulinogênico (II) de cerca de 0,56 ng/ dL (controle) e 0,754 ng/ dL (BHH).

A participação de BHH na secreção e na translocação de vesículas insulínicas para regiões membranares de células- β foi estudada através de MET. A imagem representativa na Fig. 3 mostra os grânulos de insulina acumulados em torno da membrana plasmática no grupo basal. No entanto, após as ilhotas pancreáticas serem incubadas com 100 nM de BHH durante 5 min foi observado um aumento na quantidade de grânulos de insulina liberados (cerca de 70%) quando comparado com o respectivo grupo basal hiperglicêmico. Além disso, após 20 min de incubação na presença de BHH, a secreção de grânulos contendo insulina das células β foi de cerca de 88% quando comparado com o respectivo grupo basal hiperglicêmico (Tabela 1).

Fig. 2. Efeito de BHH na concentração sérica de insulina em ratos hiperglicêmicos. Valores em média \pm E.P.M. $n=5$. Estatisticamente significativo em $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$ comparado ao grupo basal hiperglicêmico.



(A)

Fig. 3. Microscopia eletrônica de transmissão de grânulos de insulina de tecido pancreático incubado em presença de BHH em meio hiperglicêmico. Período de incubação= 5 e 20 minutos. Os quadros A e B representam os controles hiperglicêmicos; Quadros C e D representam o tecido incubado em presença de BHH.

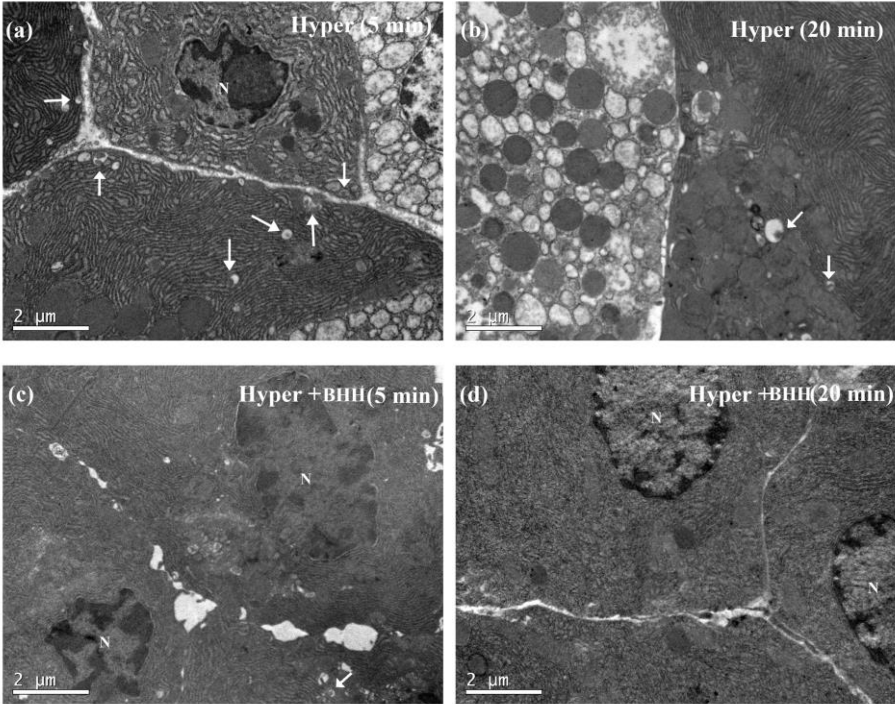


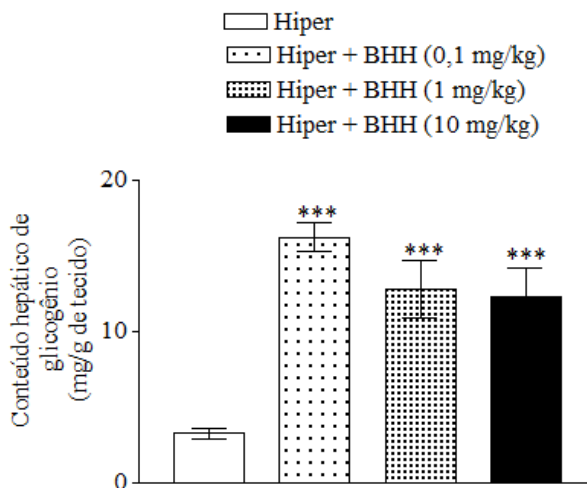
Tabela 1. Taxa de vesículas insulínicas citoplasmáticas por célula β em presença de BHH (100 nM) ou não (basal) na primeira e segunda fase da secreção de insulina. Tempo de incubação= 5 e 20 min com/sem BHH. n= 29 para o grupo basal hiperglicêmico em 5 min; n= 29 para o grupo Hiper + BHH em 5 min; n= 16 para o grupo hiperglicêmico basal em 20 min e n= 23 para o grupo hiper + BHH em 20 min. Triplicatas de cada grupo foram analisadas.

Tempo	5 min		20 min	
	Hiper	Hiper + BHH	Hiper	Hiper + BHH
Vesículas/célula	4,03	1,19	1,62	0,18

3.3 Efeito de BHH no conteúdo de glicogênio hepático

A figura 4 mostra o efeito do tratamento *in vivo* com BHH no conteúdo de glicogênio hepático. Todas as doses de BHH foram administradas por gavagem e aumentaram significativamente o conteúdo de glicogênio no fígado mensurado 3 h após o tratamento.

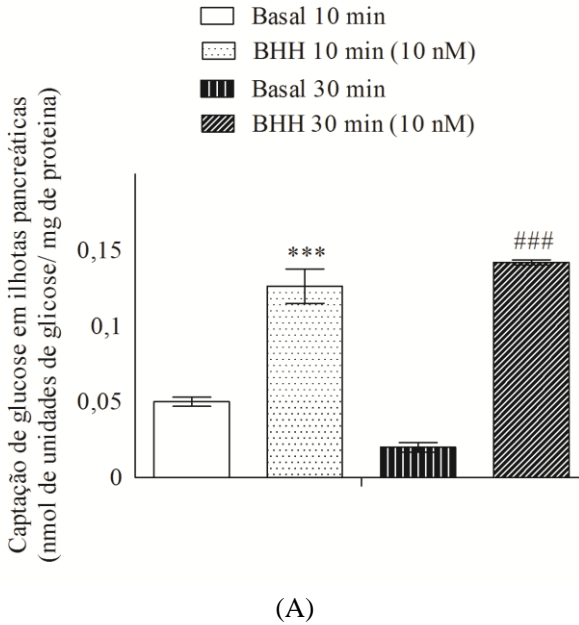
Fig. 4. Efeito de BHH no conteúdo de glicogênio hepático em ratos hiperglicêmicos 180 min após tratamento por via oral. Valores são expressos como média \pm E.P.M. n= 5 para cada grupo. Estatisticamente significante em *** $p < 0,001$ comparado ao grupo basal hiperglicêmico.

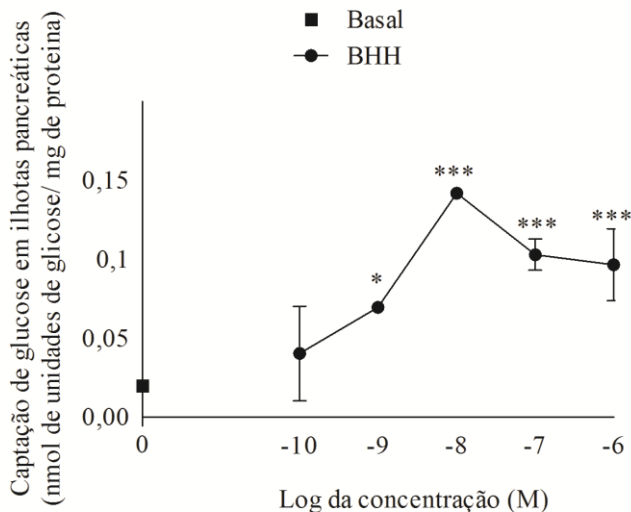


3.4 Efeito de BHH na captação de ^{14}C -deoxiglicose em ilhotas pancreáticas

O fechamento dos canais de K^+ -ATP (canais de potássio dependentes de ATP) resulta em efeito central na secreção de insulina induzida por glicose nas células β . A Fig. 5A mostra que BHH (10 nM) estimula a captação de glicose em ilhotas pancreáticas em um período de curto prazo, 10 e 30 min de incubação. Além disso, BHH exibiu uma curva de dose-resposta em forma sinusóide e foi significativa na absorção de glicose de 10^{-6} a 10^{-9} M, após 30 min de incubação (Fig. 5B).

Fig. 5. Curva e tempo (A) e concentração (B) de BHH na captação de ^{14}C -deoxiglicose em ilhotas pancreáticas de ratos. Tempo de Pré-incubação= 30 min; Tempo de incubação= 10 e/ou 30 min. Valores são expressos como média \pm E.P.M. $n=6$ para cada grupo. Estatisticamente significativo em * $p < 0,05$ e *** $p \leq 0,001$ em relação ao grupo basal 10 min e ### $p \leq 0,001$ em relação ao grupo basal 30 min.



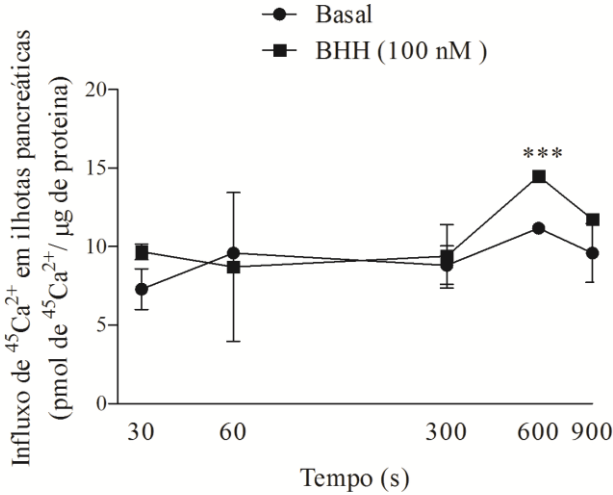


(B)

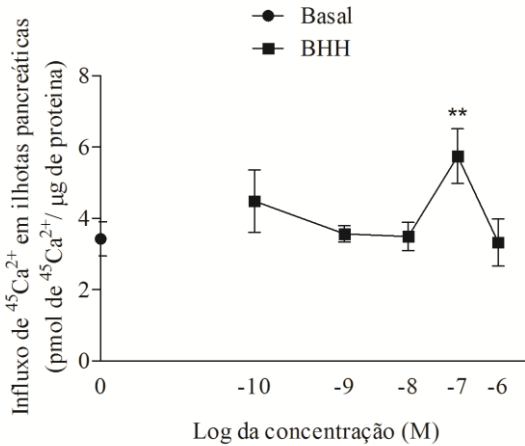
3.5 Efeito de BHH no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas

O aumento iônico intracelular de cálcio é determinante para a secreção de insulina pelas células- β . Assim, o papel de BHH no influxo de cálcio e o mecanismo de ação deste composto na secreção de insulina foram realizados em ilhotas pancreáticas isoladas. Após o equilíbrio de cálcio obtido através de 60 min de incubação da ilhota com $^{45}\text{Ca}^{2+}$, o influxo de cálcio foi então medido em 30 s e em 1, 5, 10 e 15 min, na ausência (basal) e em presença de BHH (100 nM). O efeito estimulatório do BHH no influxo de cálcio foi observado em um pico típico de cálcio em 10 min, em comparação com o respectivo grupo basal (Fig. 6A). A concentração que exibiu um grande influxo de cálcio (cerca de 68 %) foi usada para a continuação dos estudos *in vitro* (Fig. 6B).

Fig. 6. Curva tempo- (A) e concentração-resposta (B) de BHH no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas de ratos. Tempo de Pré-incubação= 60 min; tempo de incubação da curva de tempo= 30, 60, 300, 600 ou 900 s. Tempo de incubação para curva concentração resposta= 600 s. Valores são expressos como média \pm E.P.M. $n = 6$ em duplicata para cada grupo. Significante em ** $p < 0,01$ e *** $p \leq 0,001$ em relação ao grupo basal.



(A)

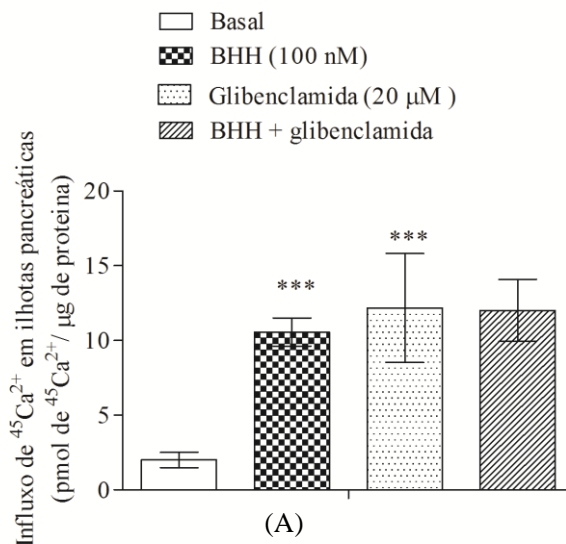


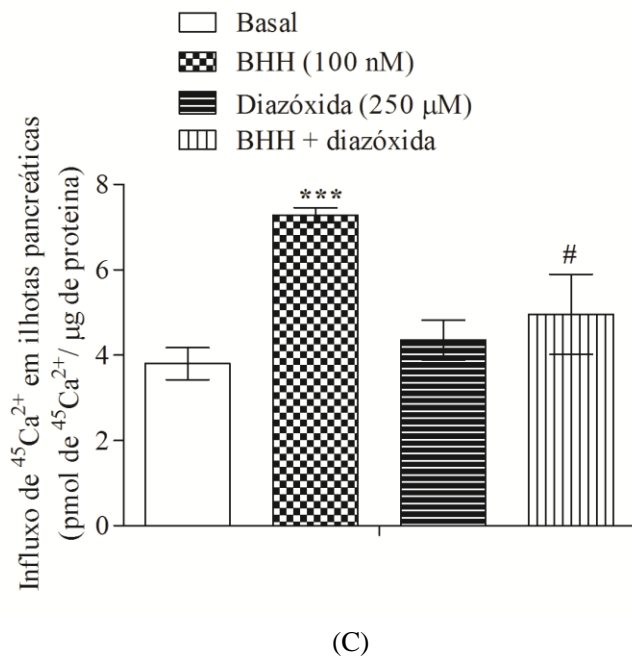
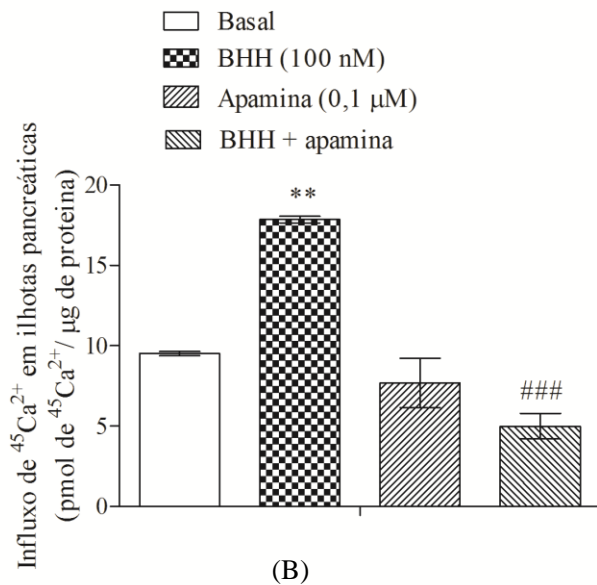
(B)

3.6 Envolvimento dos canais de potássio no efeito estimulatório do BHH no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$

Para estudar o envolvimento dos canais de K^+ no efeito estimulatório do BHH no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas, glibenclamida (20 μM), um bloqueador de canais de K_{ATP} , foi utilizado apamina (0,1 μM), um bloqueador de canais de K^+ sensíveis a Ca^{2+} e diazóxida (250 μM) (ativador de canais de potássio). Como esperado, a glibenclamida aumentou significativamente o influxo de cálcio após 10 min de incubação *in vitro*, contudo, na presença de BHH não foi observado qualquer efeito estimulatório adicional no influxo de cálcio (Fig. 7A). Ainda, a fig. 7B mostra que a apamina não alterou o influxo de cálcio basal, ocorrendo na presença de BHH a completa depleção do efeito estimulatório deste triterpeno no influxo de cálcio. Além disso, a diazóxida diminuiu significativamente o influxo de cálcio estimulado por BHH em ilhotas pancreáticas isoladas (Fig. 7C).

Fig. 7. Efeito da glibenclamida (A), apamina (B) e diazóxida (C) na ação estimulatória do BHH no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas de ratos. Grupo basal= sem tratamento. Tempo de Pré-incubação= 60 min; tempo de incubação= 10 min. Valores são expressos como média \pm E.P.M. $n= 6$ em duplicata para cada grupo. Significante em $**p \leq 0,01$ e $***p \leq 0,001$ em relação ao grupo basal. Significante em $^{\#}p \leq 0,05$ e $^{\#\#\#}p \leq 0,001$ em relação ao grupo BHH.



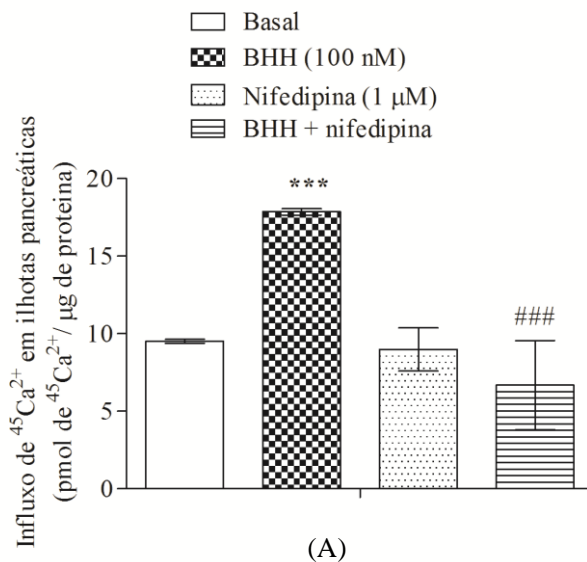


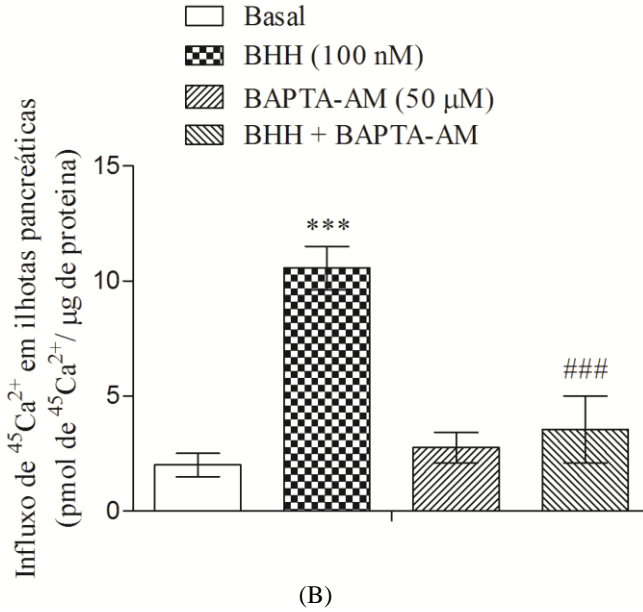
3.7 Envolvimento do cálcio no efeito estimulatório do BHH no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$

A implicação de canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo-L (L-CCDVs) no mecanismo de ação do BHH no influxo de cálcio também foi estudada. A Fig. 8A mostra que a nifedipina não alterou o nível basal de cálcio, no entanto, anula o efeito estimulatório do BHH.

Também foi analisada a influência do cálcio advindo dos estoques intracelulares no efeito estimulatório de BHH no influxo de cálcio através da utilização do quelante de cálcio intracelular, BAPTA-AM. Fig. 8B mostra que BAPTA-AM não alterou o nível basal do influxo de cálcio, contudo, o cálcio das reservas é crucial para o efeito estimulatório do BHH no influxo de cálcio.

Fig. 8. Efeito da nifedipina (A) e BAPTA-AM (B) na ação estimulatória do BHH no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas de ratos. Grupo basal= sem tratamento. Tempo de Pré-incubação= 60 min; tempo de incubação= 10 min. Valores são expressos como média \pm E.P.M. $n=6$ em duplicata para cada grupo. Significante em $***p \leq 0,001$ em reação ao grupo basal. Significante em $###p \leq 0,001$ em relação ao grupo BHH.

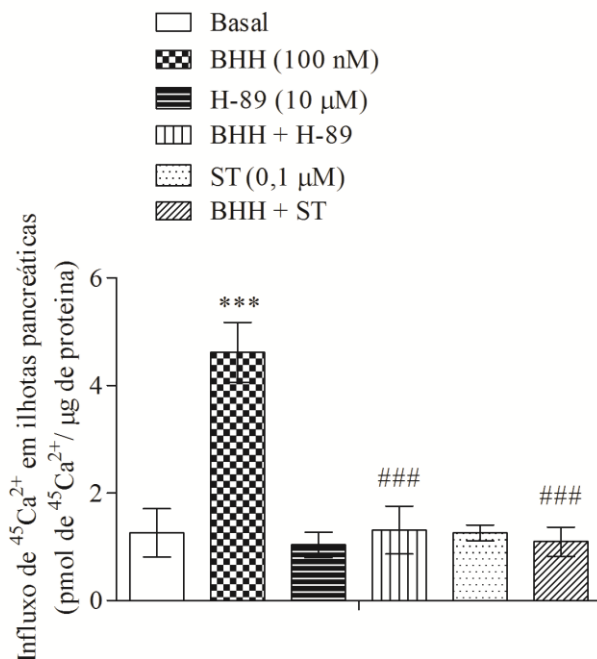




3.8 Influência das proteínas cinases A e C no efeito do BHH no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$

O envolvimento de PKA e PKC no influxo de cálcio induzido por BHH foi analisado. O tratamento das ilhotas com H-89 (inibidor da atividade catalítica da PKA) ou com ST (inibidor da atividade da PKC), anulou o efeito estimulatório do BHH no influxo de cálcio sem alterar o nível de influxo basal de cálcio (Fig. 9).

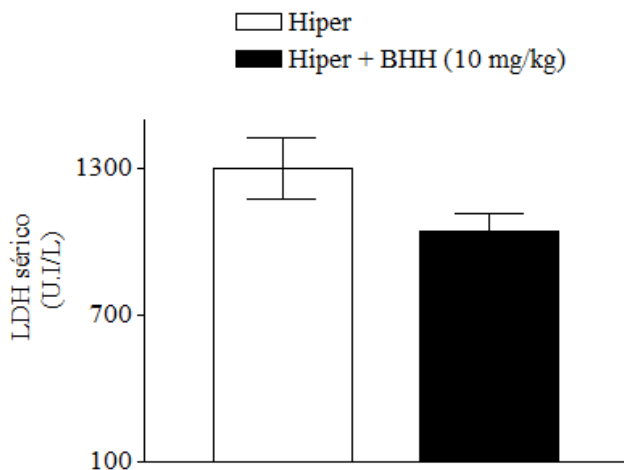
Fig. 9. Efeito de H-89 e ST na ação estimulatória do BHH no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas. Grupo basal= sem tratamento. Tempo de Pré-incubação= 60 min; tempo de incubação= 10 min. Valores são expressos como média \pm E.P.M. n= 6 em duplicata para cada grupo. Significante em *** $p \leq 0,001$ em relação ao grupo basal. Significante em ### $p \leq 0,001$ em relação ao grupo BHH



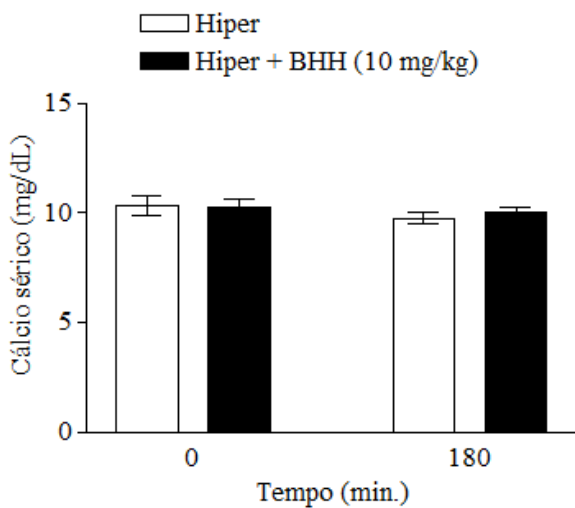
3.9 LDH e cálcio sérico

A fim de verificar a potencial toxicidade deste composto, a concentração sérica de cálcio e de LDH foram avaliados após o tratamento oral com BHH. A dose de 10 mg/ kg administrada por via oral não alterou nem a concentração sérica de LDH nem de cálcio (Fig. 10A e 10B), o que indica que nesta condição experimental, o BHH não causou efeitos tóxicos. Além disso, *in vitro*, a concentração intra (Fig. 10C) e extracelular (Figura 10D) de LDH em ilhotas pancreática foram avaliados após incubação e presença do BHH (100 nM) durante 10 min. A partir destes resultados, foi detectado que o lactato não foi acumulado em ilhotas e BHH não foi tóxico nesta condição experimental.

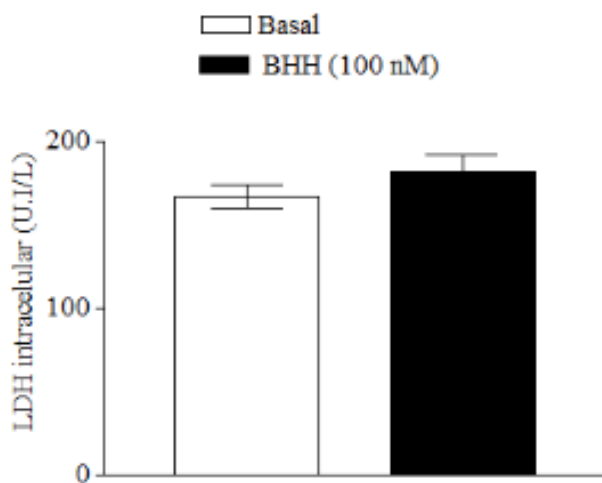
Fig. 10. Efeito do BHH na lactato desidrogenase sérica (A), cálcio (B) e concentração intra (C) e extracelular de LDH de ilhotas pancreáticas isoladas de ratos. Valores são expressos como média \pm E.P.M. $n=5$ para cada grupo.



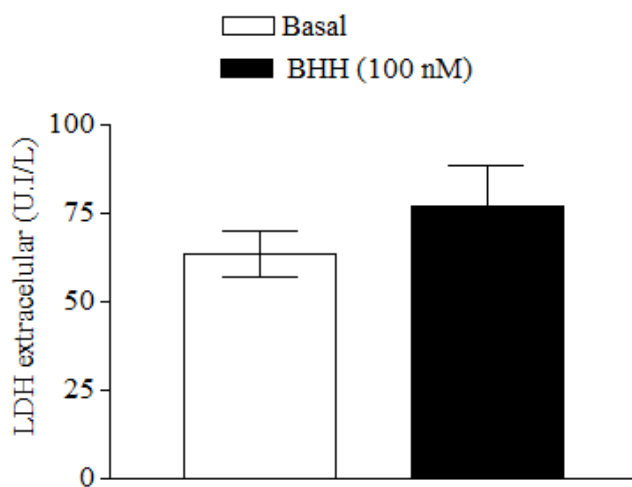
(A)



(B)



(C)



(D)

4. Discussão

O composto BHH é um novo triterpeno isolado a partir das folhas do *Croton heterodoxus*, recentemente identificado por (Carvalho, 2013). O efeito hipoglicemiante agudo de BHH por meio de tratamento oral foi caracterizado por melhorar a tolerância à glicose e a eficiência na secreção de insulina. Esse efeito na homeostasia da glicose está de acordo com o descrito para o ácido oleanólico, betulínico e ácido ursólico, mensurado através de uma abordagem similar (Teodoro et al., 2008; Singh et al., 2009; Castro et al., 2014; Castro et al., 2015). A liberação e a aumentada concentração sérica de insulina mantida durante todo o período de estudo em ratos hiperglicêmicos tratados oralmente com BHH parecem ser potenciados pela secreção de GLP-1 durante o trânsito do presente triterpeno no intestino. O aumento na concentração sérica de GLP-1 medido 15 min após tratamento com BHH pode estar relacionado com a potenciada secreção de insulina detectada de 15 a 60 min. Esse hormônio é uma potente incretina sintetizada e secretada pelas células L no intestino em resposta a refeições (Doyle e Egan, 2007). Além disso, BHH estimulou o depósito de reservas de glicogênio do fígado com efeito de curto prazo semelhante aos relatados para outros triterpenos, reforçando a sua influência no metabolismo de carboidratos (Azevedo et al., 2010; Liang et al., 2011; Castro et al., 2014; Castro et al., 2015).

Juntos, esses resultados apontam que o agente BHH nutracêutico atua aumentando a secreção de GLP-1 e insulina e diminui a concentração sérica de glicose. Além disto, ele induz a translocação de grânulos de insulina, caracterizando o efeito deste triterpeno na primeira fase da secreção de insulina. O índice insulinogênico do BHH (0,754 ng/dL) o aponta como um secretagogo de insulina útil quando comparado com o II do grupo de controle hiperglicêmico e com outros triterpenos, como do tipo lupano (ácido betulínico, II = 0,61 ng/mL), analisado em uma abordagem semelhante (Castro et al., 2014). Ainda, quando comparado com o índice insulinogênico da glibenclamida, relatado por (Frederico et al., 2012), este composto tem a vantagem de não depletar os grânulos insulínicos das células β . Levando esses resultados em consideração, observamos que o composto BHH é um interessante candidato a fármaco para a terapia da diabetes tipo 2, protegendo da hiperinsulinemia e adicional insuficiência funcional das célula β pancreática, como recentemente discutido por (Nichols e Remedi, 2012) para o estatus de hiperglicemia e por (Mascarello et al., 2014) para os novos derivados de glibenclamida.

As células β são altamente sensíveis à elevação da concentração sérica de glicose e captam eficientemente a glicose, o que leva à produção de elevada quantidade da razão ATP/ADP que afeta a atividade de canais de potássio e de cálcio (Gerich, 2000). O efeito estimulador do BHH na captação de glicose coincide com a primeira e segunda fase de secreção de insulina e está de acordo com o prolongado nível de insulina no soro e fechamento dos canais de K_{ATP} , como mostrado na fig 5A. Estes resultados estão de acordo com o padrão bifásico da secreção de insulina observado em pâncreas de rato perfundido e em indivíduos humanos em resposta à alta glicose (Curry et al., 1968; Blackard e Nelson, 1971; Yang et al., 2006).

Entre os vários tipos de canais de potássio expressos nas células β pancreáticas os mais críticos para a secreção de insulina são os canais K_{ATP} , K^+-Ca^{2+} e o canal retificador lento K_v (Dukes e Philipson, 1996). A participação dos canais K_{ATP} foi bem evidenciada por glibenclamida e estes resultados foram corroborados quando a ação de 1 foi completamente bloqueada na presença do diazóxida. Além disso, a influência de canais K^+-Ca^{2+} na transdução de sinal do BHH foi caracterizada uma vez que apamina reverteu o efeito estimulatório de BHH no influxo de cálcio. O envolvimento de ambos os tipos de canais de potássio está de acordo com diferentes tipos de compostos que são capazes de induzir a secreção de insulina e homeostasia da glicose (Doyle e Egan, 2007; Teodoro et al., 2008; Mascarello et al., 2014; Castro et al., 2015).

O abrupto aumento na concentração de cálcio intracelular (advindo do influxo e dos estoques) induzido por BHH está de acordo com os eventos iônicos caracterizados como desencadeadores da secreção celular (Colsoul et al., 2010). O envolvimento de cálcio extracelular mediado pela ativação de canais de Ca^{2+} dependentes da voltagem, principalmente do tipo L sensíveis a hidropiridina, contribui para uma concentração de cálcio intracelular localizada, que também pode ser fortemente aumentada pelo cálcio das reservas, culminando com a exocitose de vesículas insulínicas (Yang et al., 2006; Colsoul et al., 2010; Rorsman et al., 2011). Entre um grande número de triterpenos, como o ácido ursólico e ácido betulínico (ambos já estudados pelo nosso grupo), que têm mostrado efeito secretagogo de insulina e/ou insulinomimético, com papel eficaz na homeostasia da glicose, o triterpeno BHH apresenta potencial ação como agente terapêutico da diabetes, uma vez que este possui ação secretora intestinal (GLP-1) e pancreática (insulina), com a vantagem de apresentar índice insulinogênico mediano (entre a glibenclamida e glicose).

A participação de PKA e PKC na transdução de sinal do BHH nas ilhotas pancreáticas levando a liberação de grânulos de insulina é evidenciada pelo completo bloqueio do influxo de cálcio na presença de inibidores selectivos e respectivos. O papel do segundo mensageiro cAMP e PKA na secreção de insulina das células- β pancreáticas, localizadas dentro das ilhotas de Langerhans é bem conhecido (Hatakeyama et al., 2007; Chepurny et al., 2010). Além disso, o aumento de cálcio intracelular ativa as isoenzimas de PKC e a liberação de insulina. Ainda, a glicose também ativa PKC levando diretamente a liberação de insulina (Straub e Sharp, 2002; Rajagopal et al., 2014). Em acordo com os nossos trabalhos anteriores, tanto para derivados de glibenclamida ou para compostos naturais, como a rutina, foi observado uma participação significativa de cálcio extra e intracelular e também proteína cinase C na secreção de insulina em ilhotas pancreáticas de ratos por meio de abordagem semelhante (Frederico et al., 2013; Kappel et al., 2013; Mascarello et al., 2014). Além disso, o triterpeno testado não induziu toxicidade celular ou hipercalcemia após o tratamento *in vivo*.

5. Conclusões

Em um tratamento oral agudo o novo triterpeno BHH diminui a glicemia, estimula a secreção dos hormônios GLP-1 e insulina e aumenta o conteúdo de glicogênio no fígado. Além disso, o composto BHH modula cálcio intracelular (por influxo e liberação dos estoques), através de vias dependentes de canais K_{ATP} , K^+ - Ca^{2+} e CCDV-L, bem como da atividade da PKC e da PKA em ilhotas pancreáticas, esclarecendo a sinalização de BHH na atividade secretora e na contribuição para a homeostase da glicose.

6. Estado de conflito de interesse

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

7. Agradecimentos

Esses estudos foram financiados por: CNPq (Projeto# 303753/2012-9; 472071/2013-0; 400109/2014-0), CAPES (Projeto # 554/07); PPG-Bioquímica (PROAP 2012/2013). Os autores expressam agradecimentos a técnica Eliana de Medeiros Oliveira pelo suporte nos ensaios de MET e ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME/CCB-UFSC).

Referências

Annerén, C. et al. Glucose intolerance and reduced islet blood flow in transgenic mice expressing the FRK tyrosine kinase under the control of the rat insulin promoter, *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 292 (2007) E1183-E1190.

Azevedo, M.F. et al. Ursolic acid and luteolin-7-glucoside improve lipid profiles and increase liver glycogen content through glycogen synthase kinase-3, *Phytother. Res.* 24 (2010) S220-224.

Blackard, W.G.; Nelson, N.C. Portal vein insulin concentrations in diabetic subjects, *Diabetes* 20 (1971) 286-288.

Carvalho, F.K. Análise Fitoquímica e a atividade biológica de *Croton antisiphiliticus* Martius e *Croton heterodoxus* Baillon, Doctorate Theses, Federal University of Santa Catarina, Brasil (2013) 224p.

Castro, A.J. et al. Betulinic acid and 1,25(OH)₂ vitamin D₃ share intracellular signal transduction in glucose homeostasis in soleus muscle, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 48 (2014) 18-27.

Castro, A.J. et al. The mechanism of action of ursolic acid as insulin secretagogue and insulinomimetic is mediated by cross-talk between calcium and kinases to regulate glucose balance, *BBA Gen. Subj.* 1850 (2015) 51-61.

Cazarolli, L.H. et al. Flavonoids: cellular and molecular mechanism of action in glucose homeostasis, *Mini. Rev. Med. Chem.* 8 (2008) 1032-1038.

Cazarolli, L.H. et al. Mechanism of action of the stimulatory effect of apigenin-6-C-(2"-O-alpha-l-rhamnopyranosyl)-beta-L-fucopyranoside on 14C-glucose uptake, *Chem. Biol. Interact.* 179 (2009) 407-412.

Chepurny, O.G. et al. PKA-dependent potentiation of glucose-stimulated insulin secretion by Epac activator 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM in human islets of Langerhans, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298 (2010) E622-E633.

Colsou, B. et al. Loss of high-frequency glucose-induced Ca^{2+} oscillations in pancreatic islets correlates with impaired glucose tolerance in $\text{Trpm5}^{-/-}$ mice, *Proc. Natl. acad. Sci.* 107 (2010) 5208-5213.

Connolly, J.D.; Hill, R.A. Triterpenoids, *Nat. Prod. Rep.* 17 (2000) 463–482.

Curry, D.L. et al. Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas, *Endocrinology* 83 (1968) 572-584.

Damazio, R.G. et al. Antihyperglycemic activity of naphthylchalcones, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 1332-1337.

Dolenšek, J. et al. Calcium Dependencies of Regulated Exocytosis in Different Endocrine Cells, *Physiol. Res.* 60 (2011) S29-S38.

Doyle, M.; Egan, J.M. Mechanisms of action of glucagon-like peptide 1 in the pancreas, *Pharmacol. Therapeut.* 113 (2007) 546–593.

Dukes, I. D. ; Philipson, L.H. K^+ channels: generating excitement in pancreatic beta-cells, *Diabetes* 45 (1996) 845–853.

Dzhura, I. et al. Phospholipase C- ϵ links Epac2 activation to the potentiation of glucose-stimulated insulin secretion from mouse islets of Langerhans, *Islets* 3 (2011) 121-128.

Easom, R.A. Beta-granule transport and exocytosis, *Semin. Cell. Dev. Biol.* 11 (2000) 253-266.

Fourie, T.G. ; Snyckers, F.O. A Pentacyclic Triterpene with Anti-Inflammatory and Analgesic Activity from the Roots of *Commiphora merkeri*, *J. Nat. Prod.* 52 (1989) 1129-1131.

Frederico, M.J.S. et al. Acylhydrazones Contribute to Serum Glucose Homeostasis Through Dual Physiological Targets, *Curr. Top. Med. Chem.* 12 (2012) 2049-2058.

Frederico, M.J.S. et al. Antidiabetic effects of sulfonamide derivatives based on structural fragment of sulfonylureas, *Curr. Trends Med. Chem.* 7 (2013) 12-25.

Gerich, J.E. Physiology of glucose homeostasis, *Diabetes. Obes. Metab.* 2 (2000) 345–350.

Giner, J.L.; Djerassi, C.A. A reinvestigation of the biosynthesis of lanosterol in *Euphorbia lathyris*, *Phytochemistry* 39 (1995) 333-335.

Grodsky, G.M. A threshold distribution hypothesis for packet storage of insulin and its mathematical modeling, *J. Clin. Invest.* 51 (1972) 2047–2059.

Hatakeyama, H. et al. Two cAMP -dependent pathways differentially regulate exocytosis of large dense-core and *small vesicles in mouse beta-cells*, *J. Physiol.* 582 (2007) 1087–1098.

Kappel, V.D. et al. The role of calcium in intracellular pathways of rutin in rat pancreatic islets: potential insulin secretagogue effect, *Eur. J. Pharmacol.* 702 (2013) 264-268.

Kappel, V.D. et al. Rutin potentiates calcium uptake via voltage dependent calcium channel associated with stimulation of glucose uptake in skeletal muscle, *Arch. Biochem. Biophys.* 532 (2013) 55-60

Kitahara, Y. et al. Nateglinide stimulates glucagon-like peptide-1 release by human intestinal L cells via a K(ATP) channel-independent mechanism, *Biol. Pharm. Bull* 34 (2011) 671-676.

Komatsu, M. et al. Glucose-stimulated insulin secretion: A newer Perspective, *J. Diabetes. Invest.* 4 (2013) 511-516.

Koops, A.J. et al. The composition of phytosterols, latex triterpenols and wax triterpenoids in the seedling of *Euphorbia lathyris*L, *Plant Science* 74 (1991) 185-191.

Krisman, C.R. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine, *Anal. Biochem.* 4 (1962) 17-23.

Lacy, P.E.; Kostianovsky, M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas, *Diabetes* 16 (1967) 35-39.

Liang, Z. et al. Identification of pentacyclic triterpenes derivatives as potent inhibitors against glycogen phosphorylase based on 3D-QSAR studies, *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 2011-2021.

Lowry, O.H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265-275.

Luo, G. et al. Glucagon-like peptide 1 potentiates glucotoxicity-diminished insulin secretion via stimulation of cAMP-PKA signaling in INS-1E cells and mouse islets, *Int. J. Biochem. Cell. B.* 45 (2013) 483-490.

Mascarello, A. et al. Novel sulfonyl(thio)urea derivatives act efficiently both as insulin secretagogues and as insulinomimetic compounds, *Eur. J. Med. Chem.* 86 (2014) 491-501.

McGarvey, D.J.; Croteau, R. Terpenoid Metabolism, *The Plant Cell* 7 (1995) 1015-1026.

Mei-Chin, Y. Anti-glycative potential of triterpenes: A mini-review, *BioMedicine* 2 (2012) 2-9.

Batra, S.; Sjögren, C. Effect of estrogen treatment on calcium uptake by the rat uterine smooth muscle, *Life Sci.* 32 (1983) 315-319.

Menegaz, D. et al. Role of 1 α ,25(OH) $_2$ vitamin D $_3$ on alpha-[1-14C]MeAIB accumulation in immature rat testis, *Steroids* (Stoneham, MA.) 74 (2009) 264-26.

Nichols, C.G.; Remedi, M.S. The diabetic beta-cell: hyperstimulated vs. hyperexcited, *Diabetes, obesity & metabolism* 14 (2012) 129-135.

Pereira, D.F. et al. Effects of flavonoids on α -glucosidase activity: potential targets for glucose homeostasis, *Nutrition* 27 (2011) 1161-1167.

Postal, B.G. et al. Mechanism of Action of Nutraceuticals on Intestine to Ameliorate Glucose Homeostasis: Follow-Up Studies by an *in situ* Approach, *J. Cell Sci. Therap.* 5 (2014) 1-9.

Rajagopal, S. et al. Contribution of protein kinase C α in the stimulation of insulin by the down-regulation of Cav β subunits, *Endocrine* 47 (2014) 463-71.

Reynolds, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy, *J. Cell. Biol.* 17 (1963) 208-212.

Rorsman, P. et al. Electrophysiology of pancreatic beta-cells in intact mouse islets of Langerhans, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 107 (2011) 224–235.

Schmidt, E.C. et al. Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure, *Micron*. 40 (2009) 860-869.

Silva, F.R.M.B. et al. Glucose uptake: knowledge from *in vivo*, *in situ* and *in vitro* studies and health implications, in: C.C. Johnson, D.B. Williams (Eds.), *Glucose Uptake: Regulation, Signaling Pathways & Health Implications*, Nova Science Publishers, New York, 2013, pp. 45-76.

Silva, F.R. et al. Kaempferol and kaempferitrin: nutraceutical compounds contribute to glucose homeostasis by acting at multiple biological sites. In: Garion Villers; Yves Fougere. (Org.). *Kaempferol: Chemistry, Natural Occurrences and Health Benefits*. 1ed. Nova science publishers, Inc., New York, 2013, pp. 1-45.

Singh, A.B. et al. Antihyperglycaemic activity of alpha-amyrin acetate in rats and db/db mice, *Nat. Prod. Res.* 23 (2009) 876-882.

Skelin, M. et al. A. Pancreatic Beta Cell Lines and their Applications in Diabetes Mellitus Research, *ALTEX* 27 (2010) 105-113.

Speier, S. et al. Cx36-mediated coupling reduces beta-cell heterogeneity, confines the stimulating glucose concentration range, and affects insulin release kinetics, *Diabetes* 56 (2007) 1078–1086.

Straub, S.G.; Sharp, G.W. Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion, *Diabetes Metab. Res. Rev.* 18 (2002) 451-63.

Teodoro, T. et al. Oleanolic acid enhances insulin secretion in pancreatic beta-cells, *FEBS Lett.* 582 (2008) 1375-1380.

Varley, H. et al. *Practical Clinical Biochemistry*, fifth ed. Heinemann IW, (eds.), London: Medical Books Ltd, 1976.

Yang, S.N.; Berggren, P.O. The role of voltage-gated calcium channels in pancreatic b-cell physiology and pathophysiology, *Endocr. Rev.* 27 (2006) 621-676.

Yee, H.S.; Fong, N.T. A review of the safety and efficacy of acarbose in diabetes mellitus, *Pharmacotherapy* 16 (1996) 792-805.

Wright, E.M. et al. Intestinal absorption in health and disease—sugars, *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 17 (2003) 943-956.

Zanatta, A.P. et al. Rapid Responses to Reverse T3 Hormone in Immature Rat Sertoli Cells: Calcium Uptake and Exocytosis Mediated by Integrin, *Plos One* 8 (2013) e77176.

Zhou, X. et al. Chemical constituents of rhododendron lepidotum, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 37 (2012) 483-489.

5.2.1.2 Fern-9(11)-eno-2 α ,3 β -diol estimula a secreção insulínica através do fechamento de canais K_{ATP} e da ativação de canais de cálcio em condição hiperglicêmica

Artigo a ser submetido

Periódico: A definir

Autores: Allisson Jhonatan Gomes Castro, Luisa Helena Cazarolli, Gabrielle da Luz, Delsi Altenhofen, Francieli Kanumfre de Carvalho, Moacir Geraldo Pizzolatti, Fátima Regina Mena Barreto Silva.

Fern-9(11)-eno-2 α ,3 β -diol estimula a secreção insulínica através do fechamento de canais K_{ATP} e da ativação de canais de cálcio em condição hiperglicêmica

Allisson Jhonatan Gomes Castro^a, Luisa Helena Cazarolli^b, Gabrielle da Luz^a, Delsi Altenhofen^a, Francieli Kanumfre de Carvalho^c, Moacir Geraldo Pizzolatti^c, Fátima Regina Mena Barreto Silva^a

^aDepartamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.

^bUniversidade Federal da Fronteira Sul, Laranjeiras do Sul, PR, Brasil.

^cDepartamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.

Resumo

Levando-se em consideração o crescente número de indivíduos diabéticos e insulinoresistentes, associado a efeitos secundários dos hipoglicemiantes orais comumente utilizados e a grande disponibilidade de triterpenos pentacíclicos na dieta humana e descrição de significantes efeitos biológicos, o objetivo deste trabalho foi estudar o efeito antihiper-glicêmico do triterpeno pentacíclico fernenodiol e o seu mecanismo de ação secretagogo de insulina. Para isso, ratos Wistar foram tratados com 0,1; 1 e 10 mg/kg de fernenodiol e em seguida induzida a hiperglicemia através da administração oral de glicose (4 g/kg). Foram analisados a glicemia, insulina, LDH e cálcio e o conteúdo total de glicogênio hepático destes animais. Tendo em vista o intestino e o pâncreas como tecidos alvo do triterpeno testado, a porção duodenal do intestino delgado bem como o pâncreas de ratos foram utilizados para estudos *in vitro*. Foi analisada a influência do fernenodiol na atividade específica das glucosidases intestinais maltase, lactase e sacarase e as ilhotas pancreáticas isoladas e utilizadas para estudos de captação de ^{14}C -deoxiglicose e de influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em meio hiper-glicêmico em presença ou não de fernenodiol. O mecanismo de ação do triterpeno testado no influxo de cálcio foi determinado através da utilização do inibidor e ativador de K_{ATP} , glibenclamida e diazóxida, respectivamente, inibidor de canal de cálcio dependente de voltagem, a nifedipina, de quelante intracelular de cálcio (BAPTA-AM) e de H-89 e ST, respectivos inibidores das enzimas PKA e PKC. O triterpeno fernenodiol apresentou forte efeito antihiper-glicêmico com as três doses testadas, sendo isso atribuído as significantes ações secretagoga de insulina (após 30 minutos da indução da hiperglicemia, potencializando a secreção insulínica induzida por glicose), e glicogênica, estimulando a deposição de glicogênio hepático em 2,5 e 4 vezes (1 e 10 mg/kg), não apresentando efeito detectável na atividade das dissacaridases intestinais, o que denota não influenciar na absorção de glicose intestinal. Contudo, o fernenodiol apresentou significativo efeito estimulatório na captação de glicose bem como estimulou o influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas em uma concentração de 100 pM e 1 nM, respectivamente. O triterpeno testado apresenta mecanismo de ação dependente de canais de cálcio do tipo L dependentes de voltagem e canais de potássio sensíveis a ATP. Ainda, o efeito de fernenodiol também envolve a liberação de cálcio dos estoques intracelulares, o que pode estar contribuindo para a secreção insulínica de forma tardia. Ainda, o mecanismo de ação não envolve a atividade das cinases PKA e PKC. Todos esses resultados associados a não-toxicidade

e não alteração da calcemia por parte do fernenodiol mostra que este triterpeno é um potente agente antihiperglicêmico com forte efeito insulinosecretor e glicogênico, apresentando significativa perspectiva como um futuro novo fármaco para o tratamento da insulinoresistência e/ou diabetes.

Palavras-chave: Fernenodiol, hiperglicemia, secreção insulínica, triterpeno.

1 INTRODUÇÃO

A regulação da manutenção da glicemia é o principal alvo medicinal para a prevenção e tratamento de muitas doenças e problemas fisiológicos associados a hiperglicemia crônica. A glicemia é responsável por problemas como glicação de proteínas plasmáticas, processos de neuropatias associadas a diabetes e falência renal (Aronson, 2008; Lalla et al., 2000), e desta forma, atualmente todos os tecidos envolvidos com o processo de homeostasia da glicose estão sendo usados, de forma isolada ou combinados (dependendo do estágio e tipo de diabetes), como alvos farmacológicos para o tratamento da diabetes bem como da resistência à insulina, com fármacos projetados para ações teciduais específicas que vão desde o processo de absorção de glicose intestinal (Zhu et al., 2013) até a estimulação da excreção de glicose pelo tecido renal (Valentine et al., 2012). Entretanto, o estímulo da secreção insulínica e captação de glicose periférica ainda são os principais mecanismos abordados para os estudos de tratamentos de distúrbios associados com a falha no controle glicêmico.

O pâncreas é o principal tecido regulador deste controle glicêmico devido a capacidade de produzir e secretar o hormônio insulina como resposta a variações na glicemia e a outros nutrientes energéticos (diretamente proporcional). O transporte da glicose sérica por meio de transportadores do tipo GLUT2 (presente em células β -pancreáticas) com um alto K_m , garante o transporte da glicose em altas e baixas concentrações séricas desta. O ATP produzido a partir da metabolização da glicose captada é o responsável pela união de eventos bioquímicos a eletrofisiológicos, com inibição na subunidade SUR do canal de K^+ levando a despolarização celular e a entrada de cálcio na célula β , eventos limitantes para a secreção insulínica. A insulina é responsável por estimular a captação de glicose em tecidos como o adiposo, músculo esquelético e cardíaco (Cazarolli et al., 2009; Lachal et al., 1993).

A importância do pâncreas é denotada pelo fato da principal doença relacionada com deficiência na redução de índices glicêmicos, a diabetes, ser caracterizada por problemas fisiológicos e bioquímicos nas células β -pancreáticas, que se estendem desde a total destruição das células beta (DM 1) até a deficiência na secreção insulínica por problemas na via de sinalização de proteínas cinases (Evans et al., 2003) e/ou exaustão celular (Muoio e Newgard, 2008), como ocorre na DM 2 ou resistência insulínica.

O envolvimento de canais de potássio sensíveis a ATP (K_{ATP}) e canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDVs) é essencial para a

resposta das células β a variações glicêmicas, uma vez que esses canais são determinantes para a secreção insulínica (Gembal et al., 1993). A importância dos canais de K_{ATP} e CCDVs está na observação de que a inibição em resposta a ligante (sulfoniluréias, por exemplo) ou metabolização da glicose é responsável pelo efeito de disparo da secreção insulínica, que é caracterizado por um pico de secreção rápida de insulina. Quando mediado por glicose, esse processo de ativação por canais de K_{ATP} e CCDVs também é importante para iniciar uma segunda etapa chamada de “aumento/prolongamento” do sinal, embora essa ocorra por vias independentes de canais de K_{ATP} e dependentes de proteínas cinases como a PKC e/ ou PKA. Essa etapa é caracterizada pela secreção duradoura de insulina (Komatsu et al., 2013). Assim, em indivíduos normais, a secreção insulínica *in vivo* em resposta ao aumento abrupto pós-prandial da glicemia de concentrações sub (3 mmol/L) a supra-estimulatórias (11-16 mmol/L) ocorre em um perfil bifásico, com um primeiro pico de liberação em torno de 5-7 min, correspondente a mobilização de grânulos insulínicos prontos para a secreção, e um segundo pico de secreção que se ergue de forma gradual, acima de 60 min de duração, correspondendo a grânulos contendo insulina sintetizada por estímulo do agente secretagogo de insulina e/ou insulinogênico e ao estoque de reserva (Komatsu et al., 2013).

A secreção de insulina bem estabelecida em indivíduos hiperglicêmicos é muito importante para evitar a progressão da insulino-resistência a DM 2 uma vez que a insulina inibe a gliconeogênese e glicogenólise e ativa a glicogênese hepática por inibição da síntese da enzima fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK), desfosforilação da glicogênio sintase e ativação da proteína fosfatase 1 (Carvalho et al., 2002). Essas vias metabólicas são significantes contribuidores para a hiperglicemia crônica (Levinthal et al., 1999).

Em indivíduos insulino-resistentes ou diabéticos esse perfil bifásico de secreção não ocorre, bem como a sinalização desencadeada pela insulina em tecidos alvos se encontra defeituoso. Na resistência à insulina a secreção é caracterizada por um pico único (U invertido) de perfil monofásico, característico de função reduzida da célula beta (Kim et al., 2012). Ainda, ilhotas de indivíduos com DM 2 exibem uma reduzida capacidade de metabolização da glicose e secreção de insulina induzida por glicose, e isso combinado com uma baixa sensibilidade do K_{ATP} ao ATP pode levar a comprometimento da função da célula β (Ashcroft and Rorsman, 2013).

Apesar dos significantes avanços no tratamento da diabetes e resistência à insulina, esses ainda são um problema mundial e a

descoberta de novos métodos não invasivos e eficientes para o tratamento é uma constante preocupação médica e acadêmica, portanto, ter em mente o pré-tratamento oral com fármacos seguros é uma importante abordagem terapêutica para a redução da hiperglicemia, evitando a hiperglicemia e a hiperinsulinemia pós-prandial, diminuindo também a exaustão das células β -pancreáticas e progressão da resistência insulínica.

Compostos naturais que possam modular a secreção insulínica sem que haja desequilíbrio brusco na glicemia é de grande importância médica. Nesse âmbito se encontram os triterpenos naturais, produtos do metabolismo secundário de plantas presente de forma significativa na dieta humana. Com várias atividades biológicas já descritas, dentre elas, atividades antihiperglicêmica e atividade antidiabética (Fabio et al., 2014), reduzindo a glicemia de animais hiperglicêmicos bem como agindo como agentes insulínomiméticos, ação essa altamente importante para o tratamento da insulinoresistência, se estima que diariamente seja consumido 250 mg de triterpenos por indivíduos humanos, o que torna esses compostos potenciais protagonistas e/ou modelos para a síntese de novos fármacos voltados para o tratamento de doenças associadas ao mau funcionamento de rotas metabólicas envolvidas com a homeostasia glicídica, associado com a já descrita baixa-toxicidade, biocompatibilidade e abundância prospectiva (Siddique e Saleem, 2011). Desta forma o objetivo foi analisar o efeito do pré-tratamento com fernenodiol, um triterpeno inédito do tipo hopano, na glicemia de ratos Wistar hiperglicêmicos bem como o mecanismo de ação como agente insulinossecrator.

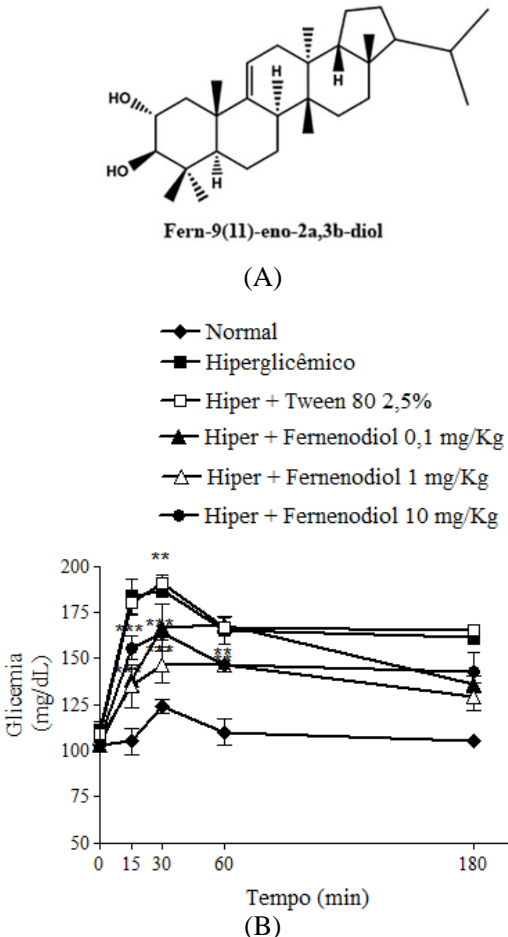
2 Resultados e discussão

2.1 Efeito sistêmico de fernenodiol na redução da hiperglicemia

O fern-9(11)-eno-2 α ,3 β -diol (Fig. 1A) é um triterpeno pentacíclico do tipo hopano que contém como funcionalização hidroxilações em C2 e C3. Esse triterpeno ainda não foi descrito na literatura, portanto, as atividades biológicas não foram caracterizadas, tais como a ação na homeostasia da glicose e na prevenção da hiperglicemia. Nesta perspectiva, ratos Wistar foram pré-tratados com fernenodiol em três doses diferentes seguido pela indução da hiperglicemia, resultando em uma redução significativa na glicemia com as três doses testadas de forma rápida (15 e 30 min), prevenindo a hiperglicemia pós-prandial de forma efetiva. A dose de 1 mg/kg apresentou melhor ação, diminuindo a concentração sérica de glicose em 26%, 21% e 11% nos respectivos tempos de 15, 30 e 60 min, quando comparado com o respectivo controle hiperglicêmico e em 19% nos 180 min após a indução da hiperglicemia.

O perfil da curva oral de tolerância à glicose destes animais tratados com fernenodiol mostra que esse triterpeno previne e/ou reduz a hiperglicemia de um modo estável, evitando picos de hiperglicemia, efeito esse significativamente importante para a preservação da célula β -pancreática (Fig. 1B).

Fig. 1. Estrutura (A) e efeito de fernenodiol na curva oral de tolerância à glicose (B) *in vivo* em ratos hiperglicêmicos. Valores são expressos como média \pm E.P.M. com $n=5$. Significante em $***p < 0,001$ e $**p < 0,01$ comparado ao respectivo valor do controle hiperglicêmico.



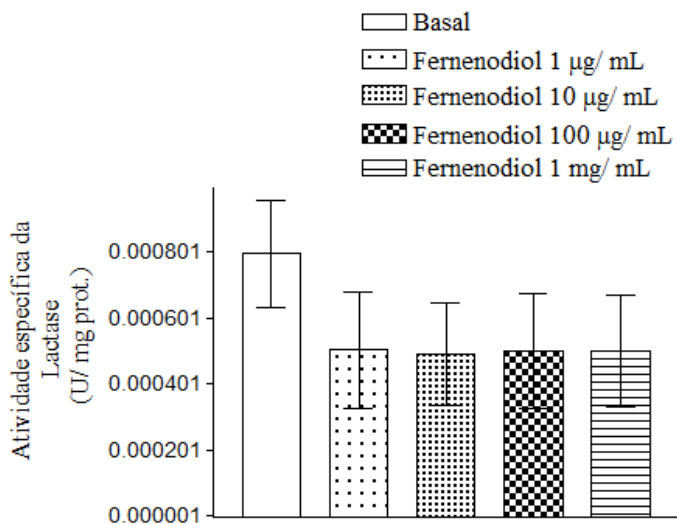
Este efeito na modulação da glicemia em animais hiperglicêmicos já é descrito para outros triterpeno de outras classes (Castro et al., 2014; 2015a 2015b) usando-se metodologia semelhante, sendo para os triterpenos do tipo fernenodiol a caracterização dessa ação na glicemia inédita. Este efeito é definitivamente associado ao triterpeno testado, uma vez que o veículo sozinho, Tween 80 (2,5%) não alterou o perfil hiperglicêmico quando comparado com o controle. Ainda, a glicemia do grupo controle euglicêmico não variou no período experimental estudado.

De forma geral, esta redução rápida na glicemia mediada por fernenodiol pode estar se dando através da inibição da absorção intestinal de glicose, por uma ação estimulatória deste triterpeno na secreção insulínica e/ ou por meio do estímulo da captação de glicose em tecidos de alto aporte glicêmico, como o tecido hepático (com concomitante redução na produção de glicose endógena) (Santos et al 2012).

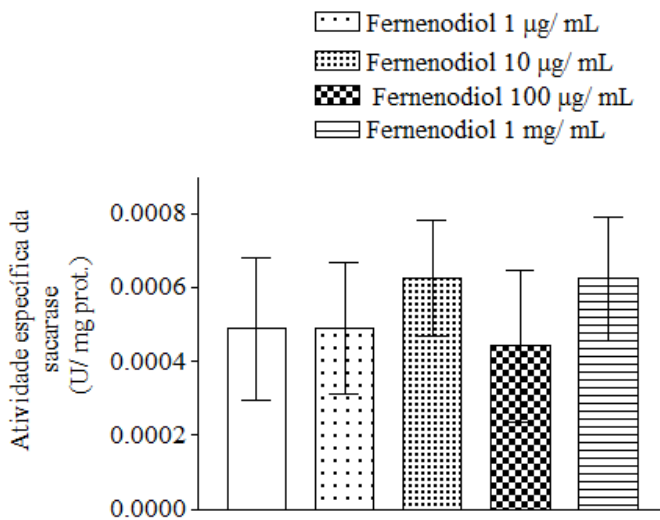
Estes mecanismos também são utilizados por alguns compostos exógenos naturais na ação modulação da glicemia, tais como flavonóides, quercetina e a rutina (Pereira et al., 2011) que fortemente inibem a atividade de α -glucosidases intestinais (maltase e sacarase) e o Kaempferol, ao qual estimula a síntese de glicogênio por através de ação dependente de GSK3 (Cazarolli et al., 2009). Ainda, alguns triterpenos são descritos por baixar o risco de animais desenvolverem diabetes devido ao reconhecido papel como inibidores da atividade da α -glucosidase e de α -amilase, comprovadamente relacionados com a estrutura do triterpenóide (Castellano et al 2013; Siddique e Saleem, 2011).

Desta forma, a fim de verificar se o processo de absorção intestinal de glicose também é um alvo para o triterpeno em análise, foram estudados os efeitos *in vitro* do fernenodiol na atividade das dissacaridases intestinais lactase (Fig. 2A), maltase (Fig. 2B) e sacarase (Fig. 2C). Os resultados mostraram que este triterpeno não altera a atividade destas enzimas sobre seus respectivos substratos, sugerindo que o composto pode agir através de um efeito pós-absortivo tecido-específico e diretamente na homeostasia da glicose sérica, provavelmente como secretagogo de insulina e/ou estimulador da captação hepática de glicose.

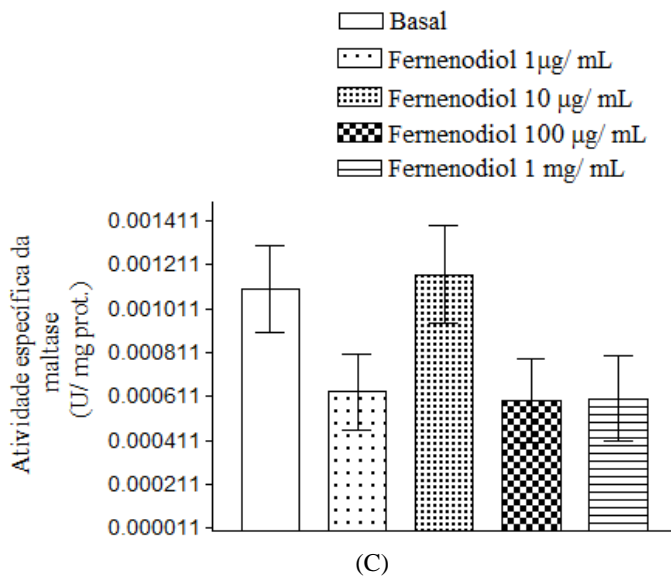
Fig. 2. Efeito *in vitro* de fernenodiol na atividade específica das glucosidases intestinais lactase (A), sacarase (B) e maltase (C). Valores são expressos como média \pm E.P.M. n= 5 para cada grupo.



(A)

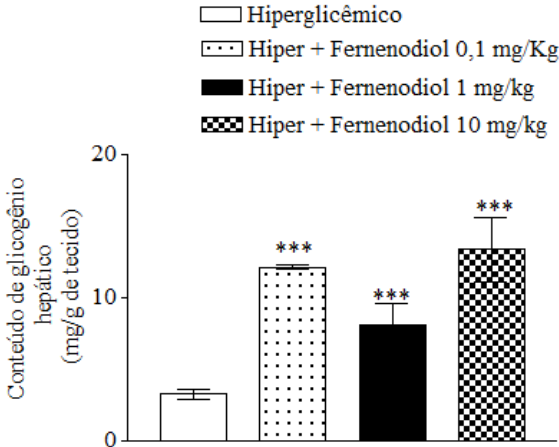


(B)



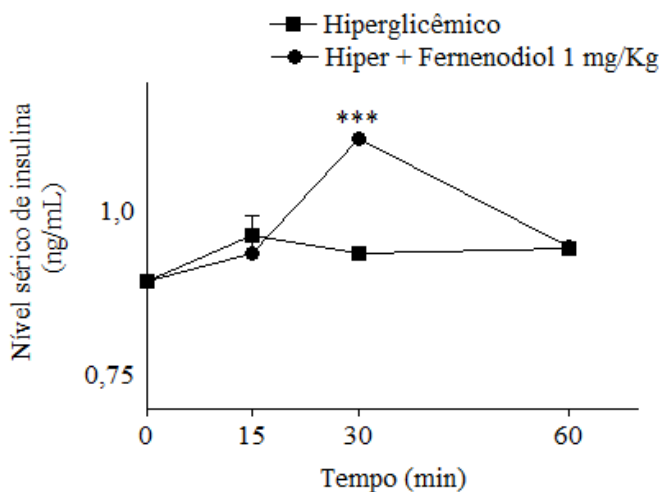
O estudo do conteúdo hepático de glicogênio de animais tratados com ferenodiol (0,1; 1 e 10 mg/kg) mostrou que este triterpeno estimula de forma extremamente significativa a deposição de glicose como glicogênio hepático com as três doses testadas quando comparado com o controle hiperglicêmico. Os efeitos foram em torno de 4; 2,5 e 4 vezes maiores com as doses de 0,1; 1 e 10 mg/kg, respectivamente, em relação ao controle (Fig. 3). Este efeito pode ser explicado pelo fato de que alguns triterpenos pentacíclicos são descritos com a capacidade de inibir a enzima glicogênio fosforilase, aumentando o depósito de glicogênio hepático e contribuindo desta forma para o tratamento da diabetes (Yu et al., 2014). A força desta inibição pode variar de acordo com quantidade e posicionamento de hidroxilas em C-2, C-3 e C-23 (diminuindo) e mais proeminente, com a ausência de moléculas ligadas, como açúcares (aumentando) (Wen et al., 2008).

Fig. 3. Efeito de fernenodiol no conteúdo de glicogênio hepático em ratos hiperglicêmicos 180 min após a indução da hiperglicemia. Valores são expressos como média \pm E.P.M. $n=5$ para cada grupo. Estatisticamente significante em $***p < 0,001$ comparado ao grupo basal hiperglicêmico.



Associado a isso, o efeito antihiperglicêmico rápido de fernenodiol 1 mg/kg pode também ser explicado pela ação secretora de insulina, onde o triterpeno testado potenciou a secreção insulínica mediada por glicose, sendo detectado esse efeito 30 min após a indução da hiperglicemia. O fernenodiol aumentou em 18% a concentração sérica de insulina em relação ao controle hiperglicêmico, com um índice insulinogênico de 0,72 mL/ mg (controle 0,55mL/ mg) (Fig. 4).

Fig. 4. Efeito de fernenodiol na concentração sérica de insulina em ratos hiperglicêmicos. Valores em média \pm E.P.M. $n= 5$ para. Estatisticamente significativo em *** $p < 0,001$ comparado ao grupo basal hiperglicêmico.



O efeito de fernenodiol na potencialização da secreção insulínica mediada por glicose também é descrito para outros triterpenos tomando abordagem semelhante, como o ácido olenólico (de Melo et al., 2010).

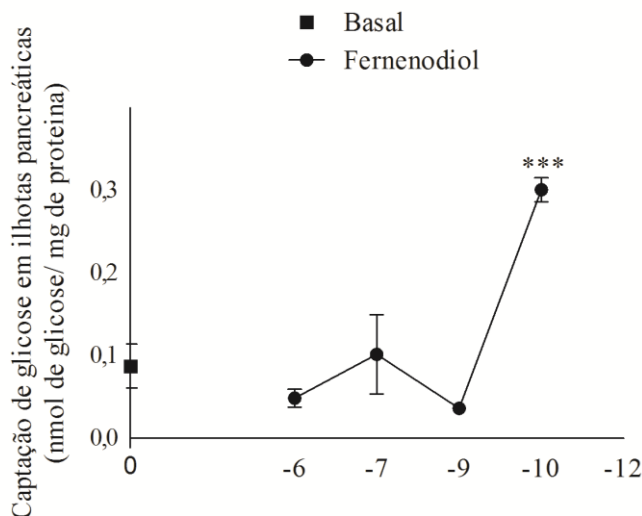
Em estado hiperglicêmico, estes fortes efeitos do fernenodiol potencializando a secreção insulínica associada com a estimulação da deposição do glicogênio hepático é extremamente importante, uma vez que a produção hepática de glicose em estado hiperglicêmico na diabetes advinda de vias gliconeogênicas e glicogenolítica é um dos principais contribuintes pela manutenção da hiperglicemia crônica. Em um modelo insulino-cêntrico, este hormônio inibe a glicogênio fosforilase por meio da estimulação da sua desfosforilação, sendo essa a principal forma de estímulo para a síntese de glicogênio hepático, já que leva à ativação e translocação da enzima glicogênio sintase (Wen et al., 2008). Ainda, o efeito clássico da insulina em aumentar a translocação do transportador de glicose do tipo 4 à membrana plasmática de tecido adiposo e muscular conduz a uma forte estimulação na captação de glicose nesses tecidos, sendo essa a maior contribuição da insulina para a redução da glicemia (Kupriyanova e Kandror, 1999). Essas informações destacam o porquê da modulação da secreção insulínica ainda ser o principal alvo de pesquisas para o tratamento de distúrbios diabéticos.

Ainda, os fármacos voltados para a ação secretagoga de insulina são uma opção para o tratamento de hiperglicemias, como a insulinoresistência e diabetes tipo 2. Contudo, o tratamento crônico com sulfoniluréias está associado a problemas secundários como a exaustão celular e consequente agravamento da resistência à insulina e/ou redução da sensibilidade celular a esses fármacos (Remedi e Nichols, 2008). Fernenodiol apresentou uma significativa e pontual estimulação e potencialização da secreção de insulina mediada por glicose com um índice insulinogênico de 3 vezes menor que o da glibenclamida ($\text{II}=1,98$, ver Frederico et al., 2012) relatado na literatura, o que indica efeito estimulatório provavelmente associado a ausência de exaustão e/ou excitabilidade celular prolongada.

2.2 Mecanismo de ação do fernenodiol na secreção de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas: captação de glicose

A glicose é o mais potente secretagogo de insulina conhecido e a entrada nas células β -pancreáticas, bem como, o futuro aumento no influxo de cálcio são os eventos limitantes para a secreção insulínica mediada por glicose (Remedi e Nichols, 2008). Nessa perspectiva, analisamos se o fernenodiol estimula a entrada de ^{14}C -deoxiglicose em ilhotas pancreáticas isoladas em meio contendo glicose (11,1 mM) (equivalente a 199,8 mg/ dL de glicose). Verificamos que este triterpeno estimula a entrada de ^{14}C -deoxiglicose em ilhotas em 15 min de incubação, na concentração de 100 pM aumentando em torno de 3,5 vezes a captação de glicose quando comparado com o controle basal na mesma condição experimental (Fig. 5).

Fig. 5. Curva de concentração do fernenodiol na captação de ^{14}C -deoxiglicose em ilhotas pancreáticas de ratos. Tempo de Pré-incubação= 30 min; Tempo de incubação= 15 min. Valores são expressos como média \pm E.P.M. $n = 6$ para cada grupo. Estatisticamente significativo em $***p \leq 0,001$ em relação ao grupo basal 15 min.

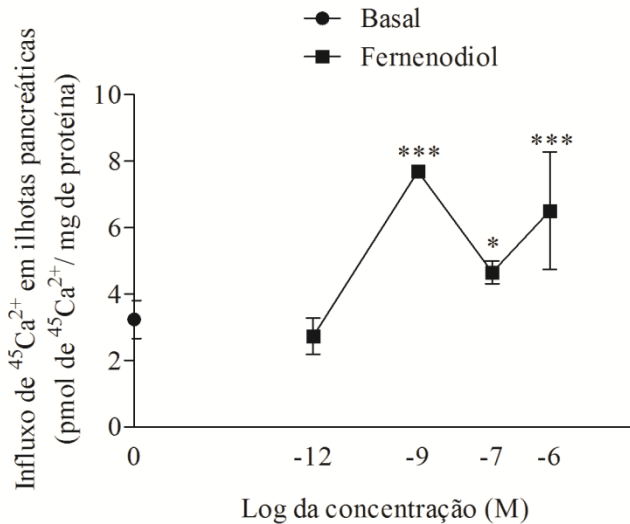


2.3 Mecanismo de ação do fernenodiol na secreção de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas: influxo de cálcio

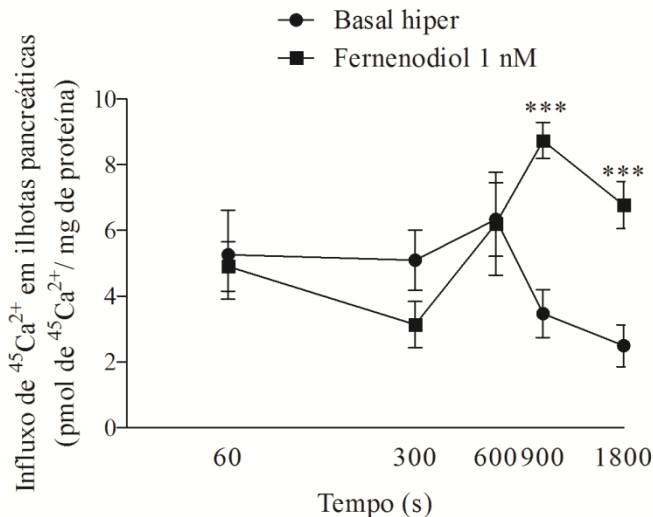
Sabendo da importância da entrada e da sinalização disparada pelo cálcio nas células β -pancreáticas para a secreção insulínica mediada por glicose, estudamos os efeitos do fernenodiol no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas incubadas em presença deste triterpeno em tampão KRb suplementado com glicose (11,1 mM) contendo ou não bloqueadores/inibidores e agonistas específicos de canais e proteínas cinases classicamente reconhecidas como relacionadas com o mecanismo e secreção insulínica. O triterpeno testado estimulou o influxo de cálcio em ilhotas isoladas de forma significativa nas concentrações de 1 μM , 100 nM e 1 nM aumentando em 2,0; 1,4 e 2,4 vezes o influxo de cálcio, respectivamente. A concentração de 1 nM foi escolhida para os subsequentes procedimentos experimentais (Fig. 6A). Analisando a curva de tempo de 1 nM do fernenodiol, observamos que este triterpeno apresentou melhor efeito estimulatório do influxo de cálcio no tempo de

15 e 30 min de incubação em relação ao respectivo controle basal (Fig. 6B). Esses significantes efeitos de 1 nM de fernenodiol no período de 15 min podem estar correlacionados com os resultados observados no aumento da concentração sérica de insulina mediada por este triterpeno 30 min após a indução da hiperglicemia (cerca de 1 h após tratamento) em animais hiperglicêmicos, bem como com o aumento da captação de glicose em ilhotas pancreáticas proeminente em 15 min de incubação em presença do triterpeno. Jing et al (2005) descreveu em estudos *in vitro* que 18 min após a estimulação com glicose já se tem o início da segunda fase de secreção insulínica, indicando que o estímulo de influxo de cálcio próximo a esse momento pode estar correlacionado com estímulo de vias metabólicas que culminam com a estabilidade e potencialização da secreção insulínica.

Fig. 6. Curva de concentração (A) e de tempo (B) do fernenodiol no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas de ratos. Tempo de Pré-incubação= 60 min; tempo de incubação da curva de tempo= 60, 300, 600, 900 e 1800 s. Tempo de incubação para curva de concentração resposta= 18000 s. Valores são expressos como média \pm E.P.M. n= 6 em duplicata para cada grupo. Significante em * $p < 0,05$ e *** $p \leq 0,001$ em relação ao grupo basal.



(A)



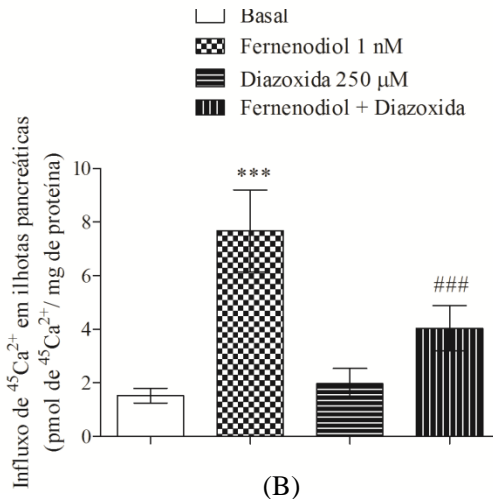
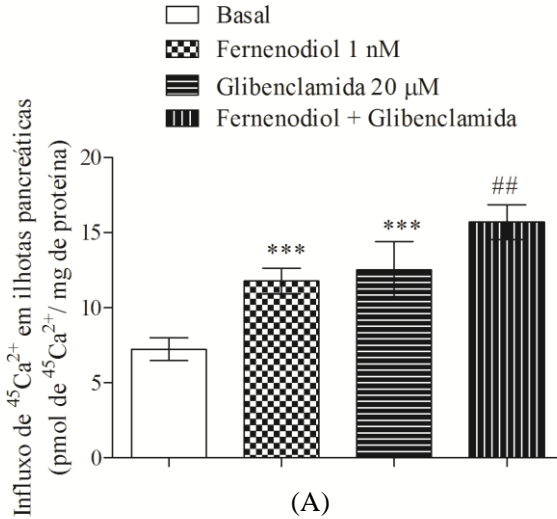
(B)

2.4 Envolvimento dos canais de potássio K_{ATP} no efeito do ferenodiol na secreção insulínica

O aumento no influxo de cálcio em resposta ao metabolismo da glicose finalizando com a secreção de insulina envolve eventos iniciais dependentes da participação de canais de potássio (Komatsu et al., 2013). Desta forma, avaliando a participação de canais de potássio dependentes de ATP no mecanismo de ação do ferenodiol (1 nM), foram utilizados o antagonista da porção regulatória do SUR1 do K_{ATP} , a glibenclamida, e o agonista do K_{ATP} , a diazóxida em tampão KRB com alta glicose. Como esperado, a glibenclamida *per se* estimulou o influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas, efeito corroborado pelo seu caracterizado efeito insulinosecretor. Além disso, o triterpeno testado prontamente também estimulou o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em relação ao controle basal. A incubação do ferenodiol em presença de glibenclamida levou a um aumento no influxo de cálcio em relação ao triterpeno testado, contudo, este resultado não foi significativo em relação ao efeito da glibenclamida, indicando que o ferenodiol pode estar agindo através do canal de K_{ATP} com uma força de estímulo (afinidade) menor do que a glibenclamida (Fig. 7A). A confirmação do envolvimento deste canal no mecanismo de ação do ferenodiol foi efetuada com a utilização de diazóxida, que bloqueou o

efeito do triterpeno de forma extremamente significativa em relação ao fernenodiol (Fig. 7B).

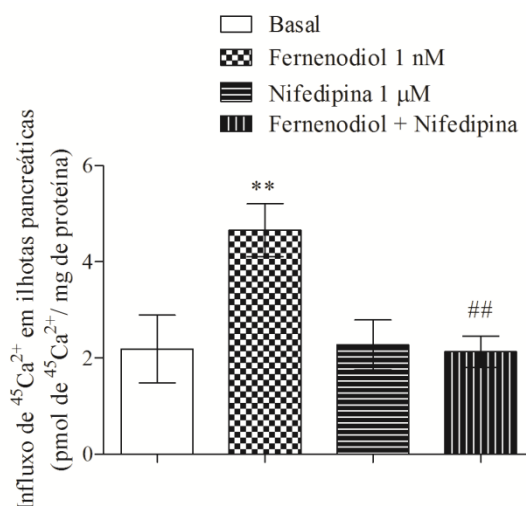
Fig. 7. Efeito da glibenclamida (A) e diazóxida (B) na ação estimulatória do fernenodiol no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas de ratos. Grupo basal = sem tratamento. Valores são expressos como média \pm E.P.M. $n = 6$ em duplicata para cada grupo. Significante em $***p \leq 0,001$ em relação ao grupo basal. Significante em $^\#p \leq 0,01$ e $^\#\#p \leq 0,001$ em relação ao grupo fernenodiol.



2.5 Mecanismos de ação de fernenodiol na secreção de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas: canais de cálcio

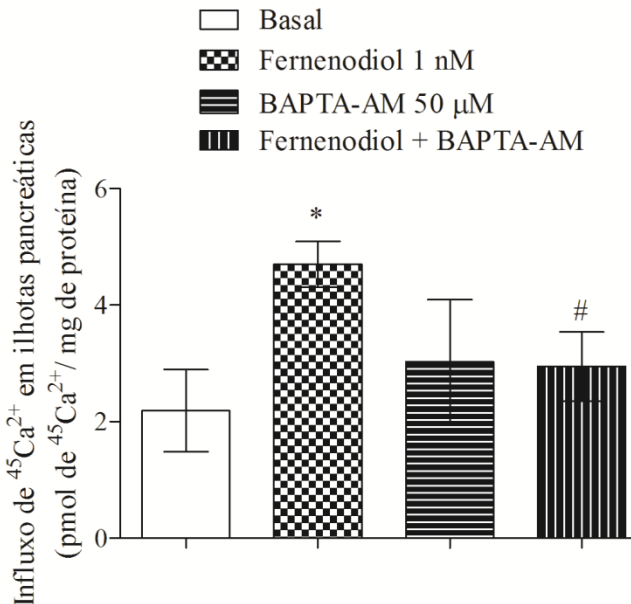
O fechamento de canais de potássio dependentes de ATP leva a abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV) devido a despolarização celular em resposta ao acúmulo iônico de potássio intracelularmente. Desta forma, é inquestionável a participação dos canais de cálcio no influxo de cálcio estimulado por fernenodiol nas ilhotas. Na perspectiva de definir se há a participação de canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L, conhecido pela predominante participação no processo de influxo de cálcio em ilhotas em resposta a despolarização celular, o fernenodiol foi incubado em presença de nifedipina, inibidor específico deste tipo de Cav. O triterpeno estimulou o influxo de cálcio em relação ao controle basal em 113%, e interessantemente a nifedipina inibiu o efeito estimulatório do fernenodiol no influxo de cálcio, bloqueando o efeito estimulatório do triterpeno, o que mostra que este triterpeno depende do íntegro funcionamento dos canais de cálcio do tipo L para o completo mecanismo de ação (Fig. 8).

Fig. 8. Efeito da nifedipina na ação estimulatória do fernenodiol no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas de ratos. Grupo basal = sem tratamento. Tempo de Pré-incubação= 60 min; tempo de incubação= 15 min. Valores são expressos como média \pm E.P.M. n= 6 em duplicata para cada grupo. Significante em $**p \leq 0,01$ em reação ao grupo basal. Significante em $##p \leq 0,01$ em relação ao grupo fernenodiol.



A fim de verificar o envolvimento de cálcio intracelular no efeito mediado por fernenodiol, ilhotas pancreáticas foram incubadas em presença do triterpeno testado com ou sem o BAPTA-AM em meio de alta glicose. Foi observado que a incubação de ilhotas pancreáticas em presença do fernenodiol e do quelante intracelular de cálcio, o BAPTA-AM, levou a inibição do efeito do triterpeno no estímulo do influxo de cálcio quando comparado com o triterpeno sozinho (Fig. 9). Este resultado indica que o efeito do fernenodiol no aumento do influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ envolve o estímulo do cálcio intracelular, bem como, provavelmente a mobilização que contribui significativamente para a secreção e manutenção prolongada da secreção insulínica. Esse resultado mostra o possível e forte papel do fernenodiol na potencialização da exocitose de vesículas insulínicas através da mobilização de cálcio intracelular.

Fig. 9. Efeito do BAPTA-AM na ação estimulatória do fernenodiol no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas de ratos. Grupo basal = sem tratamento. Tempo de Pré-incubação= 60 min; tempo de incubação= 15 min. Valores são expressos como média \pm E.P.M. $n=6$ em duplicata para cada grupo. Significante em $*p \leq 0,05$ em reação ao grupo basal. Significante em $\#p \leq 0,05$ em relação ao grupo fernenodiol.



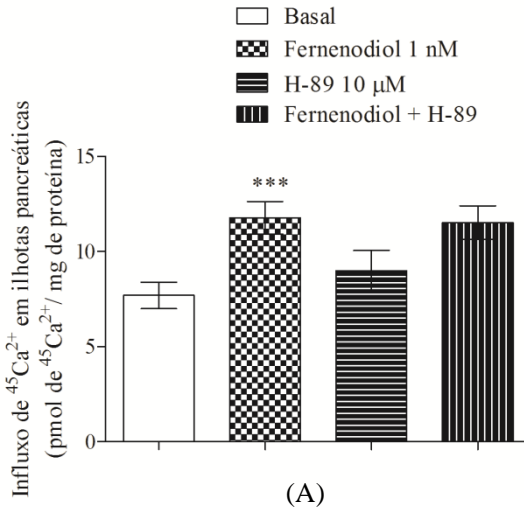
Em células β -pancreáticas três tipos de canais de Ca^{2+} contribuem para o aumento na $[\text{iCa}^{2+}]$, os canais de membrana sensíveis a voltagem (CCDV), receptores endoplasmáticos de rianodina (RyRs) e os receptores de 1,4,5-trisfosfato inositol (IP3Rs) (Chen et al., 2009), e ligantes endógenos e exógenos induzem a ativação desses canais. Entre estes estão alguns flavonóides (Kappel et al., 2013a) o TP 3 β -hidroxihopeno (Castro et al., 2015b) e incretinas como o GLP-1 (Meloni et al., 2013), mobilizam o cálcio intracelular e levam a secreção insulínica. A ativação dos receptores intracelulares presentes no retículo endoplasmático (IP3R e RYR) ocorre através de sinalização via segundo mensageiros, como o cAMP, inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3) e o próprio Ca^{2+} , cujas concentrações intracelulares se erguem em resposta ao estímulo de ligante a receptores acoplados a proteína G, (como o GLP-1 e ácido olenólico, ligante de TGR5) ou a agentes despolarizantes e ligantes que levam a abertura de Cav de membrana, respectivamente (Duboc et al., 2014). O aumento na [cAMP] leva a ativação da PKA que pode agir nos CCDVs abrindo-os, bem como o aumento na [cAMP] ativa fatores de troca de guanina nucleotídeo regulados por cAMP (Epac), sensibilizando o retículo endoplasmático à eventos de liberação de cálcio induzido por cálcio (CICR, do inglês *calcium-induced calcium release*) via receptores de IP3 e RYR. Essa sensibilização permite que cálcio advindo a partir do meio extracelular (via Cav de membrana) dispare a liberação de cálcio do RE, agindo como um estímulo direto para a exocitose da insulina (Kang et al., 2005; Choi et al 2011). Ainda a interação de ligantes a receptores acoplados a proteína G pode ativar a enzima PLC, que gera diacilglicerol e inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3) (Jones et al., 1991). IP3 liga aos receptores de inositol 1,4,5-trisfosfato no RE, finalizando a liberação de Ca^{2+} (Dou et al., 2012), bem como, diacilglicerol (DAG) ativa pode ativar PKC que age diretamente na exocitose insulínica (Kahn et al., 2006). Recentemente, o triterpeno da classe dos oleananos, o ácido olenólico, foi descrito como um ligante do TGR5, um receptor de ácidos biliares acoplados a proteína G que está presente em células beta e está relacionado com a secreção insulínica via cAMP/ Ca^{2+} (Duboc et al., 2014).

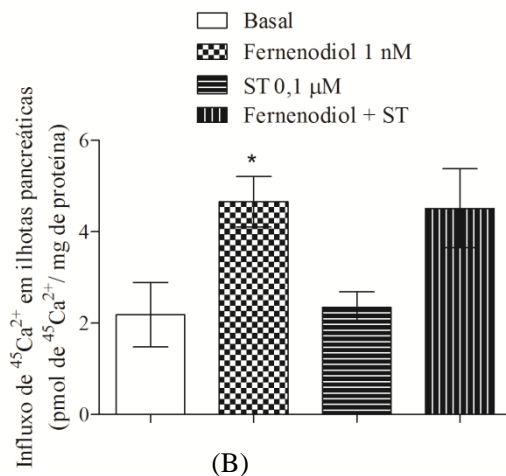
2.6 Envolvimento de cinases na sinalização do fernenodiol

O estímulo de fernenodiol no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas no período de 15 e 30 min, bem como, a ação dependente de iCa^{2+} indica um provável envolvimento deste triterpeno também na segunda fase de secreção insulínica. Nessa fase, se têm a ação de enzimas

cinases como a PKA e PKC, além de ativação por parte de intermediários do metabolismo da glicose (Nesher et al., 2002). A proteína cinase A está relacionada com a sinalização insulínica iniciada via receptores acoplados a proteína G. A PKA ativada pode agir fosforilando canais de cálcio do tipo L, ativando-os e assim estimulando o influxo de cálcio (Rorsman et al., 2012; Gao et al., 2002). A proteína cinase C está relacionada com o processo de fosforilação de proteínas de vesículas contendo insulina, ativando o processo de translocação e de fusão dessas vesículas a membrana plasmática (Uchida et al., 2007). Interessantemente, a incubação de ilhotas pancreáticas com fernenodiol em presença de H-89 ou ST, respectivos inibidores específicos de PKA e PKC, não alterou o efeito estimulatório do triterpeno testado no influxo de cálcio, mostrando que este triterpeno age independente da sinalização mediada por PKA e PKC (Fig. 10 A e B). Este resultado indica uma ação predominante do fernenodiol em eventos de disparo de secreção insulínica, que envolve a entrada de glicose nas células β e a regulação de canais iônicos.

Fig. 10. Efeito do H-89 (A) e ST (B) na ação estimulatória do fernenodiol no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas. Grupo basal= sem tratamento. Tempo de Pré-incubação= 60 min; tempo de incubação= 15 min. Valores são expressos como média \pm E.P.M. $n=6$ em duplicata para cada grupo. Significante em $***p \leq 0,001$ em relação ao grupo basal.

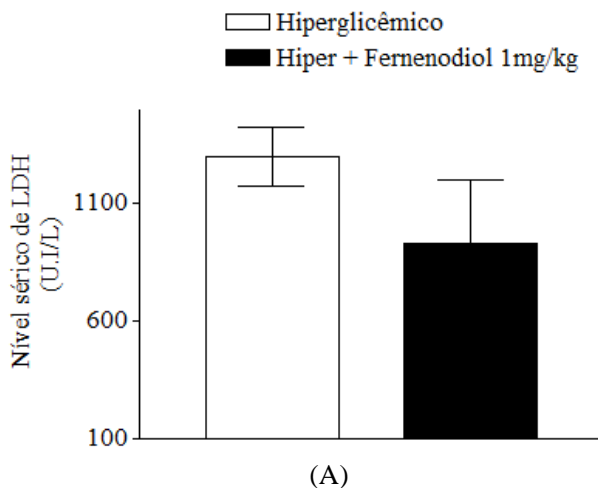


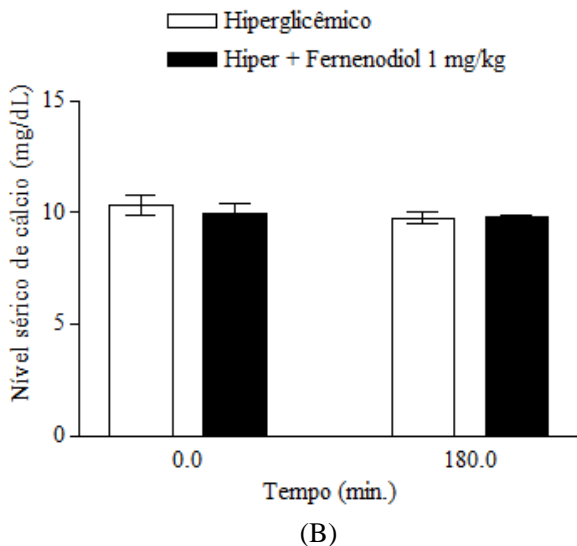


2.7 Efeito citotóxico de fernenodiol

Não foi observado diferença entre a concentração sérica de LDH (Fig. 11A) nem de cálcio (Fig. 11B) em animais hiperglicêmicos tratados com 1 mg/kg de fernenodiol e o grupo controle hiperglicêmico, denotando que, neste modelo experimental este triterpeno não apresenta nenhum efeito citotóxico.

Fig. 11. Efeito do fernenodiol na atividade da lactato desidrogenase sérica (A) e concentração de cálcio sérico (B). Valores são expressos como média \pm E.P.M. n= 5 para cada grupo.





3 Conclusões

O fernenodiol é um triterpeno pentacíclico com potente efeito anti-hiperglicêmico em baixas concentrações, efeito insulinoscretor e com mecanismo de ação envolvendo estímulo do influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas de forma dependente de canais iônicos como os canais de K_{ATP} e de cálcio sensíveis a voltagem do tipo L bem como da mobilização de cálcio intracelular. Além disso, o tratamento agudo deste triterpeno não apresenta toxicidade e não altera a homeostasia do cálcio em animais hiperglicêmicos, nesse modelo experimental. Desta forma, este triterpeno se apresenta como uma nova perspectiva com alto potencial terapêutico para o tratamento de doenças associadas com os distúrbios metabólicos da glicose.

4 Materiais e métodos

4.1 Materiais

Colagenase tipo V, ácido 1,2-bis (2-aminofenoxi) etano- N,N,N',N' -tetracético (acetoximetil éster) (BAPTA-AM), nifedipina, diazóxida, glibenclamida, cloreto de esteroilcarnitina (ST), N -[2-(*p*-bromocinamilamino)etil]-5-isoquinolinesulfonamida (H-89) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). O kit ELISA para determinações quantitativas de insulina de rato (catálogo no. EZRMI-13K) foi obtido da Millipore (St Charles, MO, USA). $[U-^{14}C]$ -2-Deoxi-D-

glicose, atividade específica 9,25 GBq/mmol, [^{45}Ca] CaCl_2 (sp. act. 321 KBq/mg Ca^{2+}), e líquido de cintilação biodegradável foram obtidos da Perkin-Elmer Life e Analytical Sciences (Boston, MA, USA).

4.2 *Material vegetal, isolamento e caracterização química do triterpeno fernenodiol*

As partes aéreas de *Croton heterodoxus* Baillon foram coletadas no refúgio do rio Pitangui, na região de Campos Gerais, Ponta Grossa, PR, em abril e junho de 2010, sob a coordenação da Dra. Rosemeri Segecin Moro, Universidade Estadual de Ponta Grossa, PR, Brasil. O material vegetal foi identificado pelo botânico Daniel de Barcellos Falkenberg do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina. Um espécime comprovante foi depositado no herbário FLOR e registrado com o número 37689.

O triterpeno fern-9(11)-eno-2 α ,3 β -diol foi isolado e caracterizado conforme Carvalho (2013). Em resumo, por meio de fracionamento líquido-líquido com acetato de etila e hexano (70:30), do extrato bruto obtido das partes aéreas de *C. heterodoxus*, obteve-se 3,74 g de fern-9(11)-eno-2 α ,3 β -diol. Após recristalização em mistura hexano: acetato de etila (70:30), o material seguiu para análise em RMN, IF e cristalografia de raio X.

4.3 *Animais*

Foram utilizados ratos machos Wistar com 50-55 dias de idade (180-210 g) mantidos em biotério com ar condicionado ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), com iluminação controlada (luzes acesas 6:00-18:00 h). Os animais foram mantidos com ração (Nuvital, Nuvilab CR1, Curitiba, PR, Brasil), e água disponível *ad libitum*. Ratos em jejum foram privados de alimento durante 16 h e livre acesso à água. Todos os animais foram cuidadosamente monitorados e mantidos de acordo com as normas do Comitê de Ética local para Uso de Animais (CEUA-Protocolo UFSC PP00414).

4.4 *Curva oral de tolerância à glicose*

Ratos em jejum foram divididos em quatro grupos de seis animais. Grupo I, ratos hiperglicêmicos que receberam glicose (4 g/ kg, 8,9 M); Grupo II, ratos hiperglicêmicos que receberam o veículo, 2,5% de Tween 80; Grupo III, os ratos hiperglicêmicos que receberam fernenodiol (0,1; 1 e 10 mg/ kg) e Grupo IV, ratos normais que não receberam tratamento algum. A glicemia foi medida antes de qualquer tratamento (tempo zero). Imediatamente, os ratos receberam o tratamento (veículo ou fernenodiol)

e após 30 min receberam uma sobrecarga de glicose. A curva de tolerância à glicose foi iniciada apenas após a sobrecarga de glicose e, em seguida, a glicemia foi medida em 15, 30, 60 e 180 min. Todos os tratamentos foram administrados por via oral. O sangue foi coletado para determinação da glicemia pelo método da glicose-oxidase (Varley e Gowenlock, 1976), e da insulina no soro.

4.5 Dosagem sérica de insulina

A concentração sérica de insulina foi determinada por ELISA 0, 15, 30 e 60 min após indução da hiperglicemia em animais pré-tratados com ferenodiol 1 mg/kg, de acordo com as instruções do fabricante. O espectro de valores detectados por este ensaio foi de 0,2-10 ng/ ml. Os coeficientes de variação intra-e inter-ensaio de insulina foram 3,22 e 6,95, respectivamente, com um valor de sensibilidade de 0,2 ng/ mL. A concentração sérica de insulina foi estimada por meio de medida colorimétrica a 450 nm com um leitor de placas ELISA (Organon Teknika, Roseland, New Jersey, EUA) através de interpolação de uma curva padrão. As amostras foram analisadas em duplicata e os resultados foram expressos como ng/ mL de insulina sérica (Cazarolli et al., 2009; Damazio et al., 2010).

4.6 Conteúdo de glicogênio

O fígado de ratos hiperglicêmicos e tratados com ferenodiol (0,1, 1 e 10 mg/ kg) ou sem (controle) foi removido 180 min após a sobrecarga de glicose (4g/ kg) e o conteúdo de glicogênio foi determinado. O glicogênio foi isolado a partir do tecido de acordo com (Krisman 1962) e os resultados foram expressos em mg de glicogênio/ g de tecido (Castro et al., 2014).

4.7 Extração e ensaios de atividade das dissacaridades intestinais

Um segmento do intestino delgado foi removido (duodeno), lavado em solução de NaCl (0,9%), pesados, cortados e homogeneizados (300 rpm) com NaCl 0,9% (400 mg de duodeno por mililitro) durante 1 min a 4° C. O extrato resultante foi centrifugado a 8000 rpm durante 8 min. O sobrenadante foi utilizado para os ensaios *in vitro* da atividade das α -glucosidases maltase, sacarase, e lactase e para a determinação da proteína total. A atividade da maltase (EC 3.2.1.20), lactase (EC 3.2.1.23), e sacarase (EC 3.2.1.48) foi determinada utilizando um kit de diagnóstico de glicose baseado no método da glicose-oxidase. Para a determinação da atividade de dissacaridades no grupo I (controle) e grupo II (tratamentos), foi utilizado um sistema de incubação contendo

sacarose, lactose, ou maltose 0,112 mM dissolvidos em tampão maleato de sódio (pH 6,0), com a enzima apropriada e com/sem fermenodiol. O sistema foi incubado durante 10 min (tratamento adicionado nos últimos 5 min) a 37° C (Dahlqvist, 1984). No final deste intervalo, 1 mL da solução de reagente de cor contendo glicose oxidase foi adicionada e incubada a 37° C durante 10 min. A absorbância foi determinada a 500 nm, e a quantificação foi baseada na atividade do padrão de glicose. Uma unidade de enzima foi determinada como a quantidade de enzima que catalisou a liberação de 1 µmol de glicose por minuto nas condições do ensaio. A atividade específica da enzima foi determinada como a atividade da enzima por mg de proteína. A concentração total de proteína foi determinada pelo método descrito em Lowry et al. (1951), utilizando albumina de soro bovino como padrão (Pereira et al., 2011).

4.8 Isolamento de ilhotas pancreáticas

O pâncreas de rato foi acessado por meio de incisão abdominal central. O canal biliar foi obstruído na porção de acesso duodenal (após ducto pancreático) e canulada no início do ducto colédoco (suficientemente proximal ao fígado). Tampão Krebs Ringer-bicarbonato com uma composição de NaCl 122 mM, KCl 3 mM, MgSO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 1,3 mM, KH₂PO₄ 0,4 mM, NaHCO₃ 25 mM e suplementado com HEPES (KRb-HEPES 8 mM) e glicose (3 mM) foi introduzido lentamente através do ducto biliar por meio de seringa até o pâncreas estar claramente distendido. O pâncreas foi suavemente removido e, em seguida, cortado em pequenas fatias (cerca de 2 x 2 mm) em placas de Petri contendo meio KRb-HEPES. Incubou-se o tecido em meio contendo KRb-HEPES suplementado com colagenase (3 mg/mL). Após a incubação, a mistura foi transferida para um tubo cônico (110 x 15 mm), ressuspensa em 10 mL de meio isento de colagenase e centrifugada à temperatura ambiente durante 3 min a 45 xg numa centrífuga excelsa Baby (modelo 206), FANEM, São Paulo, SP, Brasil. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensa em meio KRb-HEPES fresco. Este procedimento de lavagem foi repetido cinco vezes; nas duas últimas lavagens as ilhotas foram decantadas sem centrifugação. Alíquotas (100 µL) do precipitado final (contendo ilhotas isoladas) foram transferidas para tubos de Eppendorff com o meio de incubação KRb-HEPES (Lacy e Kostianovsky, 1967; Frederico et al., 2012).

4.9 Estudos de captação de ^{14}C -deoxiglicose em ilhotas pancreáticas de rato

Para estudos de captação de $[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{-2-Deoxi-D-glicose}$ foram utilizadas ilhotas pancreáticas isoladas de ratos euglicêmicos. As ilhotas foram pré-incubadas (30 min) e incubadas (tempo de tratamento) a 37°C em tampão Krebs Ringer-bicarbonato (KRb) com uma composição de: glicose 11.1 mM, NaCl 122 mM, KCl 3 mM, MgSO_4 (1,2 mM), CaCl_2 1,3 mM, KH_2PO_4 0,4 mM, e NaHCO_3 a 25 mM e borbulhado com O_2/CO_2 (95%: 5%, v/ v) até pH 7,4. O tempo de captação de glicose na presença de ferenodiol (1 nM) ou não (basal) foi de 15 min. ^{14}C -deoxiglicose (0,1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$; 0,12 nM) e ferenodiol (10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-6} M) foi adicionado a cada amostra durante o período de incubação (15 min). As amostras foram processadas de acordo com (Cazarolli et al., 2009). Alíquotas foram utilizadas para a quantificação de proteína total de acordo com (Lowry et al., 1951) e os resultados foram expressos como nmol de unidades de glicose/ mg de proteína.

4.10 Ensaio de influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$

As ilhotas isoladas foram pré-incubadas durante 60 min numa incubadora metabólica Dubnoff em tampão KRb-HEPES contendo glicose (11,1 mM) e 0,1 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ a 37°C , pH 7,4 e gaseificada com $\text{O}_2:\text{CO}_2$ (95: 5; v/ v) para fim de equilibrar as concentrações intra e extracelular de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. O tempo de incubação para estudos de influxo de cálcio na presença de ferenodiol 1 nM ou não (basal) foi de 60, 300, 600 e 900 1800 s. Em seguida, as ilhotas foram incubadas durante 15 min em KRb-HEPES sem (basal) ou com o ferenodiol (10^{-12} , 10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-6} M). Em alguns ensaios um bloqueador de canal, agonista, quelante de cálcio ou inibidores de proteína cinases foram adicionados durante os últimos 15 min de incubação, antes do tratamento e mantidos durante todo o período de incubação (ver legendas das figuras). Foram utilizados os seguintes fármacos: glibenclamida (20 μM) (Frederico et al., 2012), diazóxida (250 μM) (Frederico et al., 2012), nifedipina (1 μM) (Frederico et al., 2012; Kappel et al., 2013a), BAPTA-AM (50 μM), H-89 (10 μM) (Kappel et al., 2013b), e ST (0,1 μM) (Zanatta et al., 2013). A incubação foi interrompida utilizando a técnica descrita por (Batra e Sjögren, 1983) com modificações (Frederico et al., 2012). Tampão frio (1 mL com cloreto de lantânio (10 mM) a 2°C) foi adicionado às amostras para bloquear o fluxo de cálcio. Os tubos foram centrifugados durante 1 min a 45 xg. O sobrenadante foi conservado e as ilhotas foram lavadas duas vezes em tampão cloreto de lantânio. As ilhotas foram adicionadas a tubos contendo 300 μL de NaOH 0,5 M e submetidas a digestão alcalina

(100° C) durante 5 minutos. Alíquotas de 50 µL foram retiradas de cada amostra para a quantificação da radioatividade em líquido de cintilação Optiphase Hisafe III (Wallac Oy, Turku, Finlândia) em espectrômetro de cintilação líquida beta (modelo LS 6500; multi-Purpose Scintillation Counter-Beckman Coulter, Boston, EUA) e alíquotas de 5 µL foram usados para a quantificação de proteína pelo método de Lowry (1951).

4.11 Cálcio e lactato desidrogenase séricos

As amostras de sangue e o soro foram usadas para determinar a lactato desidrogenase (LDH) extracelular e a concentração sérica de cálcio 180 min após o tratamento oral *in vivo* com fernenodiol (1 mg/ kg). A determinação do cálcio e LDH foi realizada de acordo com Castro et al., (2014).

4.12 Dados e análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. análise de uma e duas vias de variância (ANOVA), seguido de pós-teste de Bonferroni ou teste *t* de Student não pareado foram utilizados para determinar diferenças significativas entre os grupos. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

Referências

Ali, H. et al. Alpha-Amylase Inhibitory Activity of Some Malaysian Plants Used to Treat Diabetes; with Particular Reference to *Phyllanthus Amarus*. *J Ethnopharmacol* 107, (2006): 449-55.

Aronson, D. Hyperglycemia and the Pathobiology of Diabetic Complications. In *Cardiovascular Diabetology: Clinical, Metabolic and Inflammatory Facets*, edited by Tenenbaum A Fisman EZ, 45, xi-xiii. *Adv Cardiol*. Basel: Karger, 2008.

Ashcroft, F. M.; Rorsman, P. Katp Channels and Islet Hormone Secretion: New Insights and Controversies. *Nature reviews Endocrinology* 9, (2013): 660-69.

Batra, S.; Sjögren, C. Effect of estrogen treatment on calcium uptake by the rat uterine smooth muscle. *Life Sci*. 32 (1983) 315–319.

Carvalho, F. K. Análise fitoquímica e atividade biológica de *Croton antisiphiliticus* Martius e *Croton heterodoxus* Baillon. Tese. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, Química, p. 224, 2013.

Carvalho, J. B.C. et al. Vias De Sinalização Da Insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab* 46, (2002): 419-425.

Castellano, J. M. et al. Biochemical Basis of the Antidiabetic Activity of Oleanolic Acid and Related Pentacyclic Triterpenes. *Diabetes* 62, no. 6 (2013): 1791-9.

Castro, A.J. et al. Betulinic acid and 1,25(OH)₂ vitamin D₃ share intracellular signal transduction in glucose homeostasis in soleus muscle. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 48 (2014) 18-27.

Castro, A.J. et al. The mechanism of action of ursolic acid as insulin secretagogue and insulinomimetic is mediated by cross-talk between calcium and kinases to regulate glucose balance, *BBA Gen. Subj.* 1850 (2015a) 51-61.

Cazarolli, L. H. et al. Signaling Pathways of Kaempferol-3-Neohesperidoside in Glycogen Synthesis in Rat Soleus Muscle. *Biochimie* 91, no. 7 (2009): 843-9.

Cazarolli, L. H. et al. Stimulatory Effect of Apigenin-6-C-B-L-Fucopyranoside on Insulin Secretion and Glycogen Synthesis. *European Journal of Medicinal Chemistry* 44, (2009): 4668–4673.

Cazarolli, L.H. et al. Mechanism of action of the stimulatory effect of apigenin-6-C-(2''-O-alpha-l-rhamnopyranosyl)-beta-L-fucopyranoside on ¹⁴C-glucose uptake. *Chem. Biol. Interact.* 179 (2009) 407-412.

Choi, K. J. et al. Ca²⁺-Induced Ca²⁺ Release from Internal Stores in Ins-1 Rat Insulinoma Cells. *Korean J Physiol Pharmacol* 15, (2011): 53–59.

Chen, Z. et al. Extracellular Atp-Induced Nuclear Ca²⁺ Transient Is Mediated by Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors in Mouse Pancreatic B-Cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 382, (2009): 381-4.

Dahlqvist, A. Assay of intestinal disaccharidases. *Scan. J. Clin. Lab. Invest.* 44 (1984) 169–72.

Damazio, R.G. et al. Antihyperglycemic activity of naphthylchalcones. *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 1332-1337.

de Melo, C.L. et al. Oleanolic Acid, a Natural Triterpenoid Improves Blood Glucose Tolerance in Normal Mice and Ameliorates Visceral Obesity in Mice Fed a High-Fat Diet. *Chem Biol Interact* 185, no. 1 (2010): 59-65.

Dou, H.-Q. et al. Thiopental-Induced Insulin Secretion Via Activation of Ip3-Sensitive Calcium Stores in Rat Pancreatic B-Cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 302, (2012): C796–C803.

Duboc, H. et al. The Bile Acid Tgr5 Membrane Receptor: From Basic Research to Clinical Application. *Dig Liver Dis* 46, no. 4 (2014): 302-12.

Evans, J. L. et al. Are Oxidative Stress-Activated Signaling Pathways Mediators of Insulin Resistance and B-Cell Dysfunction?. *Diabetes Care* 52, (2003): 1-8.

Fabio, G. D. et al. Triterpenoids from *Gymnema Sylvestre* and Their Pharmacological Activities. *Molecules* 19, no. 8 (2014): 10956-10981.

Frederico, M. J. S. et al. Acylhydrazones Contribute to Serum Glucose Homeostasis through Dual Physiological Targets. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 12, no. 19 (2012): 2049-2058.

Gao, Z. et al. Protein Kinase α Translocation and Insulin Secretion in Pancreatic B-Cells : Studies with Adenylate Cyclase Toxin from *Bordetella Pertussis*. *Biochem. J.* 368, (2002): 397-404.

Gembal, M. et al. Mechanisms by Which Glucose Can Control Insulin Release Independently from Its Action on Adenosine Triphosphate-Sensitive K⁺ Channels in Mouse B-Cells. *Journal of Clinical Investigation* 91, no. 3 (1993): 871-880.

Jing, X. et al. Cav2.3 Calcium Channels Control Second-Phase Insulin Release. *The Journal of Clinical Investigation.* *J. Clin. Invest.* 115, (2005): 146–154.

Jones, P. M. et al. Protein-Kinase-C and the Regulation of Insulin-Secretion from Pancreatic B-Cells. *Journal of Molecular Endocrinology* 6, no. 2 (1991): 121-127.

Kahn, S. E. et al. Mechanisms Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Nature* 444, no. 7121 (2006): 840-6.

Kang, G. et al. A Camp and Ca²⁺ Coincidence Detector in Support of Ca²⁺-Induced Ca²⁺ Release in Mouse Pancreatic B Cells. *The Journal of Physiology* 566, (2005): 173-188.

Kappel, V. D. et al. The Role of Calcium in Intracellular Pathways of Rutin in Rat Pancreatic Islets: Potential Insulin Secretagogue Effect. *Eur J Pharmacol* 702, no. 1-3 (2013a): 264-8.

Kappel, V.D. et al. Rutin potentiates calcium uptake via voltage dependent calcium channel associated with stimulation of glucose uptake in skeletal muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* 532 (2013b) 55-60.

Kim, J. Y. et al. Glucose Response Curve and Type 2 Diabetes Risk in Latino Adolescents. *Diabetes Care* 35, no. 9 (2012): 1925-30.

Komatsu, M. et al. Glucose-Stimulated Insulin Secretion: A Newer Perspective. *J Diabetes Investig* 4, no. 6 (2013): 511-6.

Krisman, C.R. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. *Anal. Biochem.* 4 (1962) 17-23.

Kupriyanova, T. A.; Kandrор, K. V. Akt-2 Binds to Glut4-Containing Vesicles and Phosphorylates Their Component Proteins in Response to Insulin. *Journal of Biological Chemistry* 274, no. 3 (1999): 1458-1464.

Lachaal, M. et al. High Km of Glut-2 Glucose Transporter Does Not Explain Its Role in Insulin Secretion. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 265, (1993): E914-E919.

Lacy, P.E.; Kostianovsky, M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 16 (1967) 35-39.

Lalla, E. et al. Hyperglycemia, Glycooxidation and Receptor for Advanced Glycation Endproducts: Potential Mechanisms Underlying Diabetic Complications, Including Diabetes-Associated Periodontitis. *Periodontol* 2000 23, (2000): 50-62.

Levinthal, G. N.; Tavill, A. S. Liver Disease and Diabetes Mellitus. *Clinical diabetes* 17, (1999).

Lowry, O.H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265-275.

Meloni, A. R. et al. Glp-1 Receptor Activated Insulin Secretion from Pancreatic Beta-Cells: Mechanism and Glucose Dependence. *Diabetes Obes Metab* 15, no. 1 (2013): 15-27.

Muoio, D. M.; Newgard, C. B. Molecular and Metabolic Mechanisms of Insulin Resistance and B-Cell Failure in Type 2 Diabetes. *molecular cell biology* 9, (2008): 193-205.

Nesher, R. et al. Beta-Cell Protein Kinases and the Dynamics of the Insulin Response to Glucose. *Diabetes* 51 Suppl 1, (2002): S68-73.

Santos, F. A. et al. Antihyperglycemic and Hypolipidemic Effects of Alpha, Beta-Amyrin, a Triterpenoid Mixture from *Protium Heptaphyllum* in Mice. *Lipids Health Dis* 11, (2012): 98.

Siddique, H. R.; Saleem, M. Beneficial Health Effects of Lupeol Triterpene: A Review of Preclinical Studies. *Life Sci* 88, no. 7-8 (2011): 285-93.

Pereira, D. F. et al. Effects of Flavonoids on Alpha-Glucosidase Activity: Potential Targets for Glucose Homeostasis. *Nutrition* 27, no. 11-12 (2011): 1161-7.

Remedi, M. S.; Nichols, C. G. Chronic Antidiabetic Sulfonylureas *in vivo*: Reversible Effects on Mouse Pancreatic B-Cells. *Plos One Medicine* 05, (2008): e206.

Rorsman, P. et al. Regulation of Calcium in Pancreatic Alpha- and Beta-Cells in Health and Disease. *Cell Calcium* 51, no. 3-4 (2012): 300-8.

Uchida, T. et al. Pkc-Delta Plays Non-Redundant Role in Insulin Secretion in Pancreatic Beta Cell. *J Biol Chem* 26, (2007): 2707-16.

Valentine, V. The Role of the Kidney and Sodium-Glucose Cotransporter-2 Inhibition in Diabetes Management. *Clinical Diabetes* 30, (2012): 151-155

Varley, H. et al. *Practical Clinical Biochemistry*. fifth ed. Heinemann IW, (eds.), London: Medical Books Ltd, 1976.

Yu, Q. et al. Pentacyclic Triterpenoids from Spikes of *Prunella Vulgaris* L. Inhibit Glycogen Phosphorylase and Improve Insulin Sensitivity in 3t3-L1 Adipocytes. *Phytother Res*, (2014).

Wen, X. et al. Naturally Occurring Pentacyclic Triterpenes as Inhibitors of Glycogen Phosphorylase: Synthesis, Structure-Activity Relationships, and X-Ray Crystallographic Studies. *J. Med. Chem.* 51, (2008): 3540–3554.

Zanatta, A. P. et al. Rapid Responses to Reverse T3 Hormone in Immature Rat Sertoli Cells: Calcium Uptake and Exocytosis Mediated by Integrin. *Plos One* 8 (2013) e77176.

Zhu, Q. et al. Comparison of the Hypoglycemic Effect of Acarbose Monotherapy in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus Consuming an Eastern or Western Diet: A Systematic Meta-Analysis. *Clin Ther* 35, (2013): 880-99.

5.2.1.3 Ácido betulínico apresenta efeito insulinosecretor dependente da modulação de canais de K_{ATP} e de cloreto.

Artigo a ser submetido

Periódico: a definir

Autores: Allisson Jhonatan Gomes Castro, Luisa Helena Cazarolli, Lizandra C. Bretanha, Moacir G. Pizzolatti, Fátima Regina M. B. Silva.

Ácido betulínico apresenta efeito insulinosecretor dependente da modulação de canais de K_{ATP} e de cloreto.

Allisson Jhonatan Gomes Castro¹, Luisa Helena Cazarolli², Lizandra C. Bretanha³, Moacir G. Pizzolatti³, Fátima Regina M. B. Silva¹

¹Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.

²Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Universitário Laranjeiras do Sul, Laranjeiras do Sul, PR, Brasil.

³Departamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.

*Correspondence to: Profa. Dra. Fátima Regina Mena Barreto Silva, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, UFSC. Campus Universitário, Bairro Trindade, Cx Postal 5069, CEP: 88040-970, Florianópolis, SC, Brazil. E-mail: mena.barreto@ufsc.br, Tel.: +55-48.3721.69.12, Fax.: +55-48.3721.96.72.

Resumo

O Ácido betulínico (AB) é um triterpeno pentacíclico com ação regulatória da homeostasia da glicose em tecido extra pancreático, estimulando a captação de glicose em tecido muscular e adiposo através do estímulo da translocação do GLUT4. Esse triterpeno é descrito também como agente secretagogo de insulina, aumentando a insulinemia o que pode explicar o potente efeito antihiperlicêmico. Entretanto o mecanismo de ação deste efeito insulinogênico do ácido betulínico ainda não está descrito, de grande importância para uma futura aplicação farmacológica deste triterpeno. O objetivo deste trabalho foi estudar o mecanismo de ação do ácido betulínico no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos, bem como, o efeito na secreção estática de insulina. Ilhotas pancreáticas de ratos Wistar machos foram isoladas com colagenase e incubadas em presença de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, ácido betulínico (100 nM, 15 min), diazóxida, nifedipina, DIDS e 9-AC e de esteroilcarnitina. Para estudar o efeito de AB na secreção estática de insulina, as ilhotas foram incubadas em presença deste triterpeno por 20 min e o meio extracelular foi utilizado para quantificação da concentração de insulina secretada. Verificamos que o AB age aumentando o influxo de cálcio por um mecanismo dependente de canais de potássio sensíveis a ATP bem como de canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L. Os canais de cloreto sensíveis a voltagem e os dependentes de cálcio também estão envolvidos no mecanismo de ação do AB, provavelmente devido a um estímulo indireto do triterpeno através da entrada e aumento da concentração intracelular de cálcio, bem como da ativação de proteínas cinases, como a PKC, que também é mandatória para o estímulo de ácido betulínico no influxo de cálcio. O ácido betulínico também estimulou a secreção estática de insulina em ilhotas pancreáticas, corroborando os resultados de mecanismo de ação obtidos. Podemos concluir que o ácido betulínico estimula a secreção insulínica através da ativação de mecanismos eletrofisiológicos, como o fechamento de canais de potássio e abertura de canais de cálcio e de cloreto, provavelmente devido ao efeito de despolarização celular associado a efeitos metabólico-bioquímicos, ativando PKC, assegurando assim a secreção insulínica.

Palavras-Chave: Ácido betulínico, triterpeno pentacíclico, canais cloreto, insulina

1 Introdução

Os terpenos são isoprenóides formados por seis unidades de isopreno (C_5H_8)₆ derivados do ácido mevalônico (Nagegowda, 2010). Alguns triterpenos pentacíclicos são descritos por apresentarem diversas ações biológicas, em especial na homeostasia da glicose, como o ácido oleanólico, reduzindo a glicemia e agindo como agente antidiabético, aumentando a insulina sérica e a translocação do GLUT4 (Lee et al., 2002; Alqahtani et al., 2013). Contudo o mecanismo de ação da maioria dos triterpenos na secreção insulínica, em especial do ácido betulínico que apresenta potente efeito insulinoscretor e antihiperiglicêmico não está completamente elucidado.

Importantes alvos de ação destes compostos para o processo de secreção de insulina são os canais iônicos, hoje unanimemente aceitos como essenciais para a regulação da concentração glicêmica e tratamento da diabetes. Classicamente, a entrada da glicose nas células β -pancreáticas é seguida pelo seu metabolismo, promovendo o fechamento dos canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP}). A resultante redução na condutância do potássio leva à despolarização da membrana com subsequente abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV). O aumento no influxo de cálcio através dos CCDVs leva ao aumento na concentração de cálcio citoplasmático que, por sua vez, eventualmente ativa o sistema efetor responsável pela exocitose de grânulos de insulina (Gembal et al., 1993), que incluem proteínas cinases e outros canais iônicos, como os canais de cloreto (Xu et al., 2014; Capurro et al., 2014). Os canais de potássio, cálcio e cloreto são de grande importância fisiológica e celular, uma vez que estes acoplam o metabolismo bioquímico e a atividade elétrica celular (Glukhov et al., 2013).

Os vários tipos de canais de cloreto apresentam distribuição e função diferencial, que incluem transporte transepitelial de sais, excitabilidade elétrica, regulação do volume celular e compensação necessária da carga para acidificação de compartimento intracelular (Matulef et al., 2008), sendo esse último essencial para o processo de secreção insulínica em resposta a mudanças elétricas e a ativação após estímulo de ligante a receptor específico (Deriy et al., 2009).

Em relação a homologia, os canais de cloreto são agrupados em três diferentes classes: CIC-0,1,2, Ka e Kb, que são predominantes na membrana plasmática, e os das classes 2 e 3 (CIC-3,4,5 e CIC-6,7), apresentando principalmente função em membranas intracelulares (vesiculares). O CIC-3 é um canal descrito por apresentar um papel

crítico na acidificação de vesículas devido a presença de uma bomba eletrogênica prótonica do tipo V (H^+ -ATPase). A geração de potencial positivo dentro da vesícula com diferença de potencial através da membrana poderá limitar o grau de acidificação que pode ser conseguido pela bomba, sendo esse processo importante para vários propósitos, dentre outras, modulação da atividade de enzimas, processamento pró-hormônios e tráfego vesicular propiciado pelo gradiente eletroquímico de próton (Thevenod, 2002). Ainda, a acidificação intragranular ocorre em um estágio relativamente tardio na biogênese dos grânulos secretórios, sendo isso essencial para a conversão do pró-hormônio, como insulina, em hormônio (Hutton, 1989).

Os canais de cloreto ativados por cálcio (CaCCs) são encontrados na membrana plasmática de diversos tecidos, e a abertura destes canais leva a despolarização da membrana celular seguido pela abertura de canais de cálcio sensíveis a voltagem. Os estimuladores dos CaCCs ainda são pouco conhecidos, contudo se sabe que este pode ser ativado pelo aumento da concentração de cálcio intracelular ativado por um agonista, após liberação de cálcio dos estoques internos e por cinases, como a CamKII (Berg, et al., 2012). Esses canais também estão envolvidos com a secreção de eletrólitos, excitabilidade neuronal, contração muscular e, devido ao seu efeito de despolarização celular, potencialmente com a exocitose vesicular (Tian et al., 2011). Desta forma, por estarem diretamente envolvidos com a secreção insulínica, problemas com o funcionamento destes canais estão relacionados com o desenvolvimento da diabetes, de forma indireta, via problemas metabólicos na célula beta, ou direta por mutações em canais K , Ca^{2+} e Cl^- (Proks e Lippiat, 2006), sendo assim alvos e/ou potenciais agentes para o tratamento da diabetes (Yao, 2006).

A diabetes melito e resistência insulínica são desordens que requerem cuidados rigorosos e com controle a partir do uso de medicação específica, como a administração de insulina exógena (diabetes tipo 1) ou de hipoglicemiantes orais (diabetes tipo 2 e/ou insulinoresistência) que agem principalmente estimulando a secreção insulínica (Rigobelo, 2011). Contudo, bem como, já é descrito, o tratamento crônico com hipoglicemiantes orais trazem efeitos adversos, como o uso crônico de sulfonilureas, fármaco mais comumente administrado, pode levar à futura falha da célula β e reduzida secreção de insulina (Remedi e Nichols, 2008). Portanto, alternativas da utilização de novas substâncias exógenas, como compostos provenientes de plantas medicinais e metabólitos de compostos naturais, se tornaram uma prática cada vez mais difundida. Porém, o tratamento pode ser prejudicial ao paciente devido à falta de

comprovação científica da ação e do mecanismo de atuação destas substâncias.

Nesta perspectiva e sabendo que o AB é um triterpeno com potente ação antihiperlipidêmica que age tanto como secretagogo de insulina e/ou agente insulinomimético via PI3K, MAPK e tradução de mRNA de GLUT4 no músculo e sem efeito citotóxico, o objetivo do presente trabalho foi estudar o mecanismo de ação de ácido betulínico na secreção insulínica em ilhotas pancreáticas.

2 Materiais e Métodos

2.1 Materiais

Colagenase tipo V, nifedipina, diazóxida, cloreto de estearoilcarnitina (ST), ácido carboxílico 9-atraceno, ácido 4,4-diisotilcianatoistilbeno-2,2-disulfônico (DIDS) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). O kit ELISA para determinações quantitativas de insulina de rato (catálogo no. EZRMI-13K) foi obtido da Millipore (St Charles, MO, USA). [^{45}Ca] CaCl_2 (sp. act. 321 KBq/mg Ca^{2+}) e líquido de cintilação biodegradável foram obtidos da Perkin-Elmer Life e Analytical Sciences (Boston, MA, USA).

2.2 Isolamento e caracterização química do triterpeno AB

O ácido betulínico foi isolado e caracterizado como descrito em Castro e colaboradores (2014). *Rosmarinus officinalis* L. foi coletado em Santo Amaro da Imperatriz, estado de Santa Catarina, Brasil, e identificado pelo Dr. Daniel de Barcelos Falkenberg (Departamento de Botânica, UFSC). Um voucher do espécime (No. 34,918) foi depositado no herbário do departamento de Botânica, UFSC, Santa Catarina, Brasil. O extrato hidroalcolólico de partes aéreas do *R. officinalis* L. foi obtido como descrito por Machado et al. (2009). O AB foi identificado por análise em IR, MS e NMR.

2.3 Animais

Ratos machos Wistar com 50-55 dias de idade (180-210 g) foram utilizados. Os ratos foram criados em biotério e alojados em biotério setorial com ar condicionado (21 ± 2 °C), com iluminação controlada (luzes acesas 6:00-18:00 h). Os animais foram mantidos com ração (Nuvital, Nuvilab CR1, Curitiba, PR, Brasil), e água a vontade. Todos os animais foram cuidadosamente monitorados e mantidos de acordo com as

normas do Comitê de Ética local para Uso de Animais (CEUA-Protocolo UFSC PP00414).

2.4 Isolamento de ilhotas pancreáticas

O pâncreas de rato euglicêmico foi acessado por meio de incisão abdominal central. O canal biliar foi obstruído na porção de acesso duodenal (após ducto pancreático) e canulada no início do ducto colédoco (suficientemente proximal ao fígado). Tampão Krebs Ringer-bicarbonato com uma composição de NaCl 122 mM, KCl 3 mM, MgSO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 1,3 mM, KH₂PO₄ 0,4 mM, NaHCO₃ 25 mM e suplementado com HEPES (KRb-HEPES 8 mM) foi introduzido lentamente através do ducto biliar por meio de seringa até o pâncreas ficar claramente distendido. O pâncreas foi suavemente removido e, em seguida, cortado em pequenas fatias (cerca de 2 x 2 mm) em placas de Petri contendo meio KRb-HEPES. Incubou-se o tecido em meio contendo KRb-HEPES suplementado com colagenase (3 mg/mL). Após a incubação, a mistura foi transferida para um tubo cônico (110 x 15 mm), ressuspensa em 10 mL de meio isento de colagenase e centrifugada à temperatura ambiente durante 3 min a 45 xg numa centrífuga excelsa Baby (modelo 206), FANEM, São Paulo, SP, Brasil. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensa em meio KRb-HEPES fresco. Este procedimento de lavagem foi repetido cinco vezes; nas duas últimas lavagens as ilhotas foram decantadas sem centrifugação. Alíquotas (100 µL) do sedimento final (contendo ilhotas isoladas) foram transferidas para tubos de Eppendorff com o meio de incubação KRb-HEPES (Lacy e Kostianovsky, 1967; Frederico et al., 2012).

2.5 Ensaio de influxo de ⁴⁵Ca²⁺

As ilhotas isoladas foram pré-incubadas durante 60 min numa incubadora metabólica Dubnoff em tampão KRb-HEPES contendo glicose (5,6 mM) e ⁴⁵Ca²⁺ (0,1 µCi/ mL) a 37 °C, pH 7,4 e gaseificada com O₂: CO₂ (95: 5; v/ v) para fim de equilibrar as concentrações intra e extracelular de ⁴⁵Ca²⁺. O tempo de incubação para estudos de influxo de cálcio na presença de AB 100 nM ou não (basal) foi de 30, 60, 300, 600 e 900 s. Em seguida, as ilhotas foram incubadas durante 15 min em KRb-HEPES sem (basal) ou com o AB (10⁻¹², 10⁻⁹ e 10⁻⁷ M). Em alguns ensaios um bloqueador, ativador de canal ou inibidores de proteína cinases foram adicionados durante os últimos 15 min de incubação, antes do tratamento e mantidos durante todo o período de incubação. Foram utilizados os seguintes fármacos: diazóxida (250 µM) (Frederico et al., 2012), nifedipina (1 µM) (Frederico et al., 2012; Kappel et al., 2013),

DIDS (200 μM) (Anazawa et al., 2010; Zanatta et al., 2013a), 9-AC (1 μM) (Zanatta et al., 2013b) e esteroilcarnitina (ST) (0,1 μM) (Zanatta et al 2013). A incubação foi interrompida utilizando a técnica descrita por (Batra e Sjögren, 1983) com modificações (Frederico et al., 2012). Tampão frio (1 mL com cloreto de lantânio (10 mM) a 2° C foi adicionado às amostras para bloquear o fluxo de cálcio. Os tubos foram centrifugados durante 1 min a 45 xg. O sobrenadante foi conservado e as ilhotas foram lavadas duas vezes em tampão cloreto de lantânio. As ilhotas foram adicionados a tubos contendo 300 μL de NaOH 0,5 M e submetidas a digestão alcalina (100° C) durante 5 min. Alíquotas de 50 μL foram retiradas de cada amostra para a quantificação da radioatividade em líquido de cintilação Optiphase Hisafe III (Wallac Oy, Turku, Finlândia) em espectrômetro de cintilação líquida beta (modelo LS 6500; multi-Purpose Scintillation Counter-Beckman Coulter, Boston, EUA) e alíquotas de 5 μL foram usados para quantificação de proteína pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951).

2.6 Estudo da secreção estática de insulina

Para estudos de secreção estática de insulina foram utilizadas ilhotas pancreáticas isoladas de ratos euglicêmicos. As ilhotas (alíquota de 0,5 mL) foram pré-incubadas (60 min) e incubadas (tempo de tratamento) a 37 °C em tampão Krebs Ringer-bicarbonato (KRb) com composição de glicose 5,6 mM, NaCl 122 mM, KCl 3 mM, MgSO₄ (1,2 mM), CaCl₂ 1,3 mM, KH₂PO₄ 0,4 mM, e NaHCO₃ 25 mM e borbulhado com O₂/ CO₂ (95%: 5%, v/ v) até pH 7,4. O tempo de incubação na presença de 100 nM de AB ou não (basal) foi de 20 min. Ao final da incubação uma alíquota do meio de incubação foi utilizada para quantificação da insulina secretada através de ELISA. A quantidade total de proteína do meio de incubação e das ilhotas foi determinada de acordo com (Lowry et al., 1951) e os resultados foram expressos como ng de insulina/ μg de proteína.

3 Dados e análises estatísticas

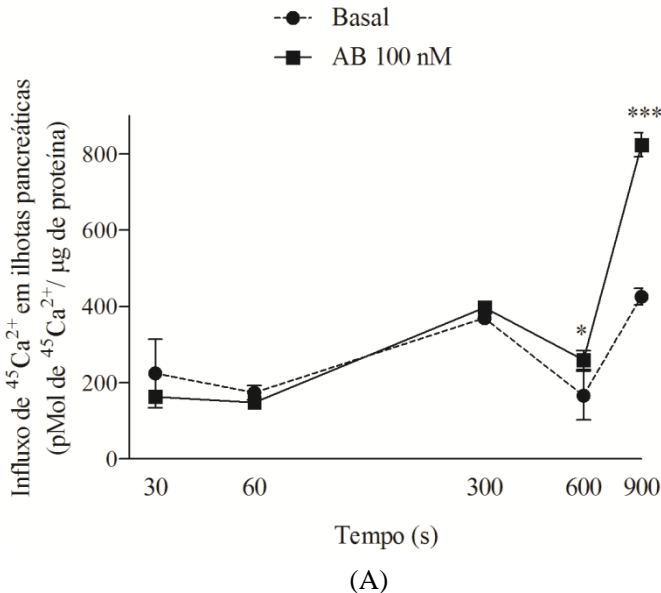
Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. análise de uma e duas vias de variância (ANOVA), seguido de pós-teste de Bonferroni ou teste *t* de Student não pareado foram utilizados para determinar diferenças significativas entre os grupos. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

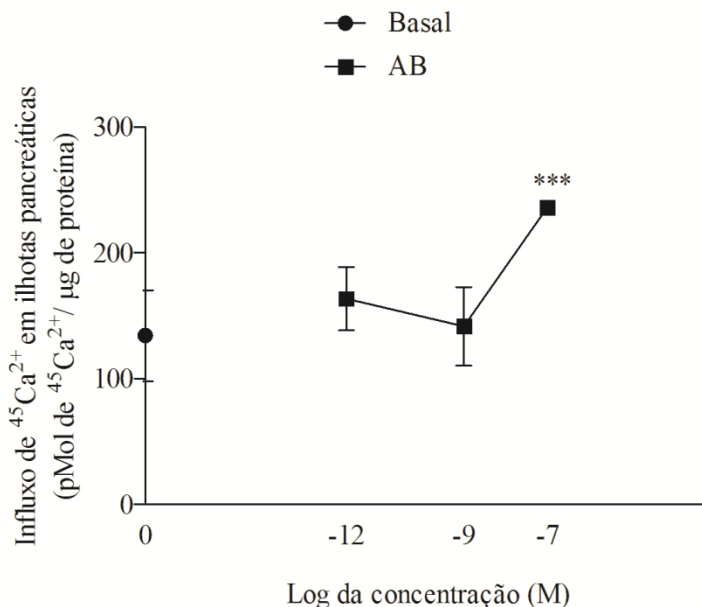
4 Resultados

4.1 Efeito de AB no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas

O aumento intracelular de cálcio é determinante para a secreção de insulina pelas células- β . Portanto, foram estudados o estímulo de AB no influxo de cálcio e o mecanismo de ação deste composto na secreção de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas. Após o equilíbrio de cálcio (60 min de incubação da ilhota com $^{45}\text{Ca}^{2+}$), foi medido o influxo de cálcio nos tempos de 30 s e em 1, 5, 10 e 15 min, na ausência (basal) e em presença de AB (100 nM). Foi observado um efeito estimulatório de AB no influxo de cálcio, com um pico de cálcio em 15 min de incubação, em comparação com o respectivo grupo basal (Fig. 1A). Ainda, a concentração de 100 nM (10^{-7}) exibiu melhor efeito estimulatório no influxo de cálcio (cerca de 1,8 vezes), sendo esta utilizada para a continuação dos estudos *in vitro* (Fig. 1B).

Fig. 1. Curva de tempo (A) e de concentração-resposta (B) do AB no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas de ratos. Tempo de Pré-incubação= 60 min; tempo de incubação da curva de tempo= 30, 60, 300, 600 ou 900 s. Tempo de incubação para curva concentração-resposta= 900 s. Valores são expressos como média \pm E.P.M. n= 6 em duplicata para cada grupo. Significante em * $p < 0,05$ e *** $p \leq 0,001$ em relação ao grupo basal.



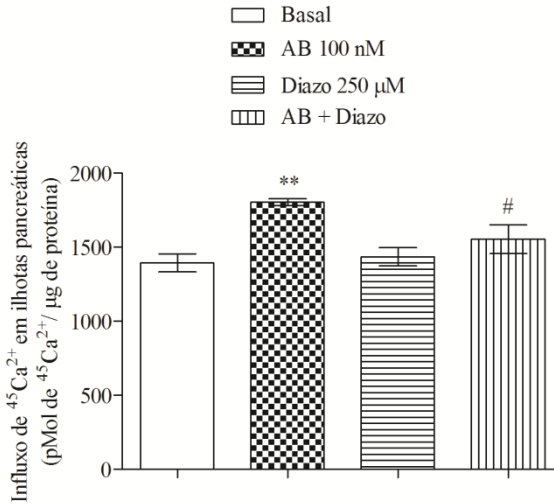


(B)

4.2 Canais K_{ATP} e o mecanismo de ação do AB no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas

Estudando o envolvimento dos canais de K^+ no efeito estimulatório do AB no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas, diazóxida (250 μM), ativador de canais de K_{ATP} foi incubado na ausência ou presença de AB. Como esperado, a diazóxida não alterou o influxo de cálcio após 15 min de incubação *in vitro*, contudo, este ativador inibiu a estimulação de AB no influxo de cálcio (Fig. 2).

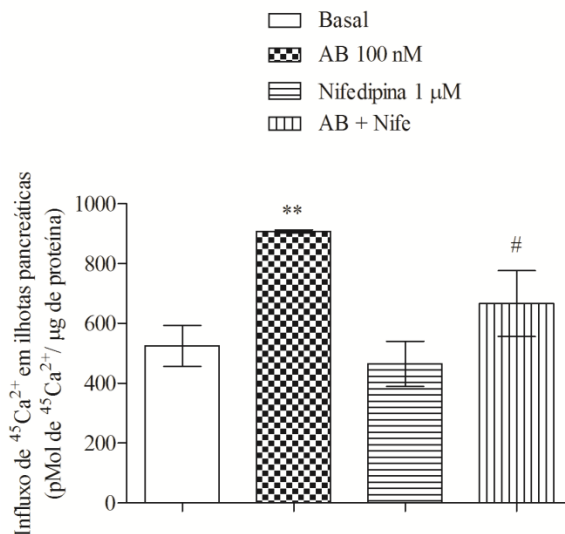
Fig. 2. Efeito da diazóxida na ação estimulatória do AB no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas de ratos. Grupo basal= sem tratamento. Tempo de Pré-incubação= 60 min; tempo de incubação= 15 min. Valores são expressos como média \pm E.P.M. $n = 6$ em duplicata para cada grupo. Significante em $**p \leq 0,01$ em relação ao grupo basal. Significante em $\#p \leq 0,05$ em relação ao grupo AB.



4.3 Envolvimento dos canais de cálcio no mecanismo de ação do AB no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas

A implicação de canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L (L-CCDVs) no mecanismo de ação do AB no influxo de cálcio também foi estudada. Fig. 3 mostra que a nifedipina não alterou o nível basal de cálcio, no entanto, anula parcialmente o efeito estimulatório do AB.

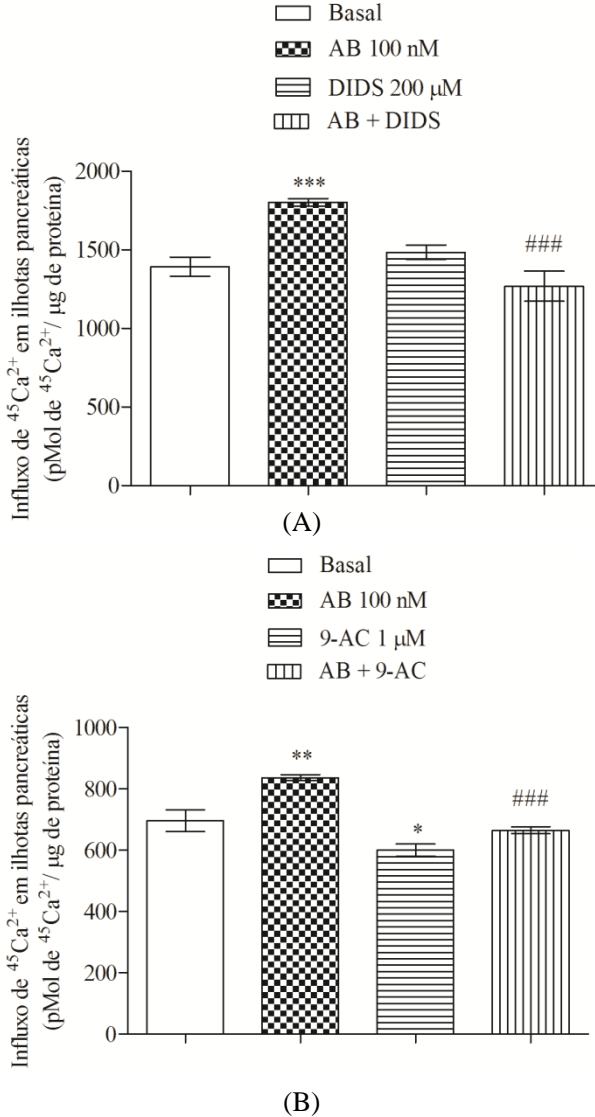
Fig. 3. Efeito da nifedipina na ação estimulatória do AB no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas de ratos. Grupo basal= sem tratamento. Tempo de Pré-incubação= 60 min; tempo de incubação= 15 min. Valores são expressos como média \pm E.P.M. n= 6 em duplicata para cada grupo. Significante em $**p \leq 0,01$ em reação ao grupo basal. Significante em $\#p \leq 0,05$ em relação ao grupo AB.



4.4 Envolvimento dos canais de cloreto no mecanismo de ação do AB no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas

Para definir o envolvimento dos canais de cloreto dependentes de voltagem (CIC) e canais de cloreto ativado por cálcio (CaCC), o AB foi incubado em presença de DIDS (200 μM) e 9-AC (1 μM), respectivamente. O AB estimulou o influxo de cálcio em relação ao controle basal em 30 %, e interessantemente ambos DIDS e 9-AC inibiram completamente o efeito estimulatório de AB no influxo de cálcio, levando próximo ao influxo basal (Fig. 4A e B).

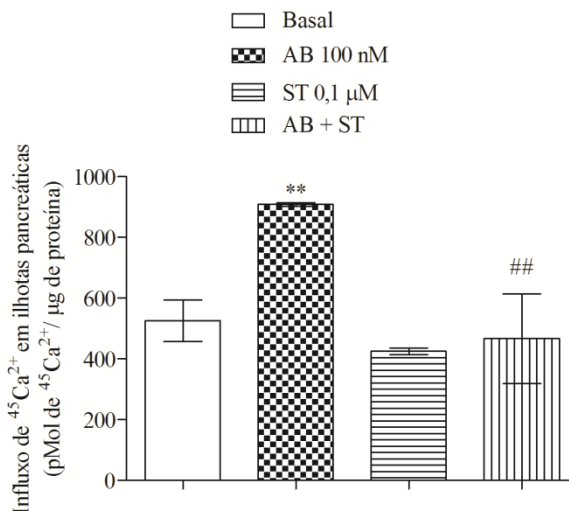
Fig. 4. Efeito do (A) DIDS e do (B) 9-AC na ação estimulatória do AB no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas. Grupo basal= sem tratamento. Tempo de Pré-incubação= 60 min; tempo de incubação= 15 min. Valores são expressos como média \pm E.P.M. $n=6$ em duplicata para cada grupo. Significante em $*p \leq 0,05$; $*p \leq 0,01$ e $***p \leq 0,001$ em relação ao grupo basal. Significante em $###p \leq 0,001$ em relação ao grupo AB.



4.5 Participação da proteína cinase C no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ estimulado por AB

O envolvimento de PKC no influxo de cálcio induzido por AB foi analisado. O tratamento das ilhotas com ST (inibidor da atividade da PKC) anulou o efeito estimulatório do AB no influxo de cálcio sem alterar o nível de influxo basal de cálcio (Fig. 5).

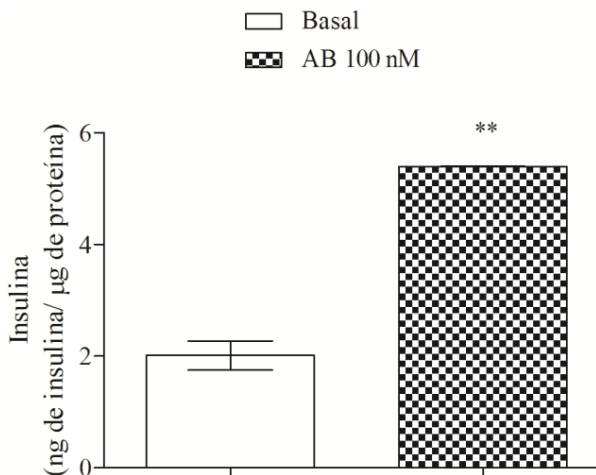
Fig. 5. Efeito da ST na ação estimulatória do AB no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas de ratos. Grupo basal= sem tratamento. Tempo de Pré-incubação= 60 min; tempo de incubação= 15 min. Valores são expressos como média \pm E.P.M. n= 6 em duplicata para cada grupo. Significante em $**p \leq 0,01$ em reação ao grupo basal. Significante em $^{\#}p \leq 0,01$ em relação ao grupo AB.



4.6 Estudo do efeito do AB na secreção estática de insulina

O triterpeno AB estimulou a secreção estática de insulina em ilhotas pancreáticas. O AB (100 nM) estimulou a secreção em 2,7 vezes em 20 min de incubação (Fig. 6).

Fig. 6. Efeito do AB na secreção estática de insulina em ilhotas pancreáticas de ratos. Grupo basal= sem tratamento. Tempo de Pré-incubação= 60 min; tempo de incubação= 20 min. Valores são expressos como média \pm E.P.M. n= 6 em duplicata para cada grupo. Significante em $**p \leq 0,01$ em reação ao grupo basal.



5 Discussão

O efeito antihiperlicêmico do ácido betulínico (ácido (3β)-3-hidroxi-lup-20(29)-en-28-oico), bem como, o mecanismo de ação insulinomimético em tecido muscular esquelético já é descrito, estimulando a captação de glicose através do aumento da translocação do GLUT4 por meio de vias de sinalização dependente de cinases como a PI3K e as MAPKs MEK-ErK. Ainda, o AB também é descrito como agente insulinoscretor em animais hiperlicêmicos tratados *in vivo* (Castro et al., 2014; de Melo et al., 2009). Contudo, mesmo com estes potentes efeitos biológicos na regulação da homeostase da glicose, o mecanismo de ação do AB na secreção insulínica ainda não está caracterizado.

O influxo de cálcio em células β-pancreáticas é fator determinante para a secreção insulínica. Compostos que possam estimular esse influxo de forma direta ou indireta são potenciais agentes secretagogos de insulina e, desta forma, antidiabéticos.

O estímulo do AB no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas com 15 min de incubação corrobora seu significativo efeito já descrito na potencialização da secreção insulínica mediada por glicose *in vivo* após

30 min de indução da hiperglicemia (Castro et al., 2014). Esse estímulo no influxo de cálcio mostra que o AB estimula a secreção insulínica por vias clássicas semelhante a da glicose, envolvendo canais de potássio dependente de ATP (K_{ATP}) e de cálcio sensível a voltagem (CCDV) sendo isso comprovado pela utilização do ativador farmacológico de canais K_{ATP} , a diazóxida.

A inibição do estímulo do AB no influxo de cálcio com diazóxida mostra que este triterpeno pode apresentar ação modulatória nos canais K_{ATP} (inibindo ou estimulando vias que levam a isso), o que é significativamente eficaz para uma futura secreção insulínica. Essa abordagem é utilizada para o mais comum tratamento atual da diabetes melito tipo 2 e insulinoresistência: as sulfonilureias se ligam a porção regulatória SUR1 do canal, inibindo o efluxo de potássio. Ainda, o K_{ATP} também pode ser inibido por ligação do ATP a subunidade K_{IR} 6.2, o canal responsável pela retificação interna, pela simples troca do complexo Mg^{2+} -ADP (ativador) pelo ATP (Campbell et al., 2003). As bases do mecanismo regulatório das sulfas no fechamento dos canais de potássio ainda não estão completamente elucidadas, sendo isso essencial para a determinação do mecanismo secretagogo de outras moléculas insulinogênicas.

Uma interação entre o AB e o K_{ATP} ainda não foi descrito, contudo, outros triterpenos apresentam capacidade de estimular a entrada de glicose nas ilhotas pancreáticas em 15 e 30 min de tratamento, semelhantemente ao tempo de estímulo de influxo de cálcio do AB, o que pode estar inibindo de forma indireta o canal de potássio (Castro et al., 2015a, 2015b).

Esse efeito do AB dependente de K_{ATP} somado a inibição da ação estimulante deste triterpeno no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas com nifedipina sugere que esse triterpeno atua estimulando a despolarização celular seguida de ativação dos canais de cálcio sensíveis à voltagem, similarmente como ocorre no mecanismo mediado por glicose (McTaggart et al., 2010). Entretanto, foi observada uma inibição parcial no efeito do AB com a nifedipina, o que denota uma provável participação de outros canais iônicos envolvidos no influxo de cálcio e/ou secreção insulínica, como canais de cálcio do tipo T ou canais de cloreto (Rorsman, 2012; Deriy et al., 2009).

O aumento na concentração de cálcio intracelular [iCa^{2+}] ativa a maquinaria exocitótica e a secreção de insulina pelas células β -pancreáticas pode ser potencializada devido a ativação de canais que respondem ao cálcio como ativador, tais como os canais de cloreto e as

vias intracelulares mediadas por cinases (Xu et al., 2014; Capurro et al., 2014).

O envolvimento dos canais de cloreto na secreção insulínica ainda não está bem esclarecido, contudo observação de que o principal secretagogo de insulina, a glicose, é descrita por estimular a secreção insulínica e a atividade elétrica mesmo quando o canal K_{ATP} está ativado pela diazóxida, indicando a existência de mecanismos de secreção insulínica envolvendo eventos eletrofisiológicos na célula β independente de canais de potássio (Best, 2005; Proks e Lippiat, 2006). Também, sulfonilureas estimulam a secreção insulínica via ativação direta da maquinaria exocitótica envolvendo a ativação de canais de cloreto do tipo 3 (CLC-3), denotando uma significativa participação destes canais como mediador insulinogênico bem como um potencial alvo para o tratamento da resistência à insulina e diabetes (Best, 2005; Proks e Lippiat, 2006).

Interessantemente, verificamos que o mecanismo de ação do AB também é dependente da atividade dos canais de cloreto sensíveis a voltagem (CICs) e de canais de cloreto dependentes de cálcio (CaCCs), o que significativamente denota que a estimulação do AB no influxo de cálcio é fortemente comprometido com a garantida secreção de insulina ativa. Em um modelo de secreção insulínica induzida por glicose, a estimulação dos CICs e CaCCs pode ocorrer através de ação independente dos canais K_{ATP} , por ativação de cinases como a PKC e a PKCamII, que agem sobre o CLC-3 e o CaCC, ativando-os respectivamente e/ou, devido ao estímulo do influxo de cálcio. Contudo, nenhum mecanismo de ação de um triterpeno em canais de cloreto foi descrito na literatura, sendo desta forma, esse o primeiro relato (Jentsch, et al., 2002; Duan et al., 1999).

Os resultados descritos acima utilizando os inibidores 9-AC e nifedipina corroboram o envolvimento dos canais de cloreto ativados por cálcio no efeito estimulatório de AB, tendo em vista que a atividade de canais de cálcio sensíveis a voltagem levando ao influxo de cálcio do meio extracelular para o intracelular, a liberação de cálcio dos estoques intracelulares através de sinalização via inositol 1,4,5trifosfato (IP3), a ligação a receptores acoplados a proteína G e ativação da proteína cinase dependente de cálcio-calmodulina (CamKII) fortemente ativam os CaCCs. O estímulo do AB no influxo de cálcio após 15 min de incubação também é compatível com o modelo de estimulação destes canais induzido por glicose, ao qual é descrita como ativadora de CaCCs conduzindo ao efluxo de cloreto e culminando com a secreção insulínica através de uma maneira tempo-dependente (lenta ativação), o que pode denotar a ação destes canais em mecanismos tardios de secreção

insulínica, como a segunda fase. Ainda, esses resultados são corroborados pela observação de que a inibição de canais de cloreto leva também a inibição tanto da atividade elétrica quanto da secreção insulínica induzida por glicose, bem como pela descrição de que o AB interage com receptores TGR5 acoplados a proteína G em ilhotas pancreáticas, associados com exocitose de grânulos de insulina e que outros triterpenos agem (ácido ursólico) agem em tecido muscular regulando a homeostasia da glicose de forma dependente de CamKII (Jentsch, et al., 2002; Best, 2005; Huang et al., 2012; Verkman e Galletta, 2009; Fuller et al., 2001; Genet et al., 2010; Castro et al., 2015).

Ainda a importância do AB ativando os canais de cloreto presentes na membrana plasmática e em membrana vesicular, em especial o CIC-3, está no significativo papel deste canal na secreção de insulina, o qual promove a translocação, acidificação, maturação vesicular e ativação do pró-hormônio insulina (Deriy et al., 2009; Hutton, 1989).

Em alguns tecidos e células pancreáticas e não-pancreáticas os canais de cloreto e cálcio são fortemente regulados por proteínas cinases, ativando-os através de fosforilação. As proteínas cinase C, PKA, proteína cinase dependente de cálcio-calmodulina, PI3K e proteínas tirosino cinases são relatadas por estarem envolvidas com esse processo (Duan et al., 1999; Camerino et al., 2014; Capurro et al., 2014). Ainda, a interação de triterpenos com receptores ligados a secreção insulínica, como o TGR5, para o AB (Genet et al., 2010), bem como a sinalização mediada pela glicose em ilhotas pode levar a ativação de proteínas cinases, como a PKC, que potencializa e sustentam a secreção insulínica após repolarização celular e leva a vias de síntese de insulina caracterizando a segunda fase de secreção (Nesher et al., 2002). Portanto, compostos que possam levar a ativação de proteínas cinases são de grande interesse farmacológico para o tratamento de terapias relacionadas à glicemia. A proteína cinase C é um significativo efetivador desta potencialização, uma vez que ela fosforila proteínas Munc18, presente na membrana plasmática, ativando-a para a ligação a proteína de vesículas contendo insulina, syntaxina-4, propiciando a translocação destas vesículas e o processo de fusão com a membrana plasmática (Jewell et al., 2010). Os processos iniciais para a secreção insulínica (interação com o receptor e despolarização celular e entrada de cálcio) são chave para a secreção insulínica, a potencialização dos processos finais (translocação e fusão vesicular) é igualmente importante para uma rápida resposta a elevações glicêmicas pós-prandiais rápidas, protegendo os tecidos insulino independentes contra picos glicêmicos (Hanefeld e Temelkova-Kurktschiev, 2002). Nesta perspectiva, a ação do AB dependente de PKC

mostra que este triterpeno pode estar regulando a secreção insulínica de forma ampla, o que é respaldado por sua forte e rápida redução na glicemia de animais hiperglicêmicos. Esta é a primeira descrição de ação do AB dependente de PKC em ilhotas pancreáticas, apesar de outros triterpenos já serem descritos com este mecanismo em ilhotas, como o 3 β -hidroxihop-22 (29) -eno (Castro et al 2015b), e em tecido muscular esquelético em vias relacionadas com a translocação do GLUT4, como o ácido ursólico (Castro et al 2015a). Todos esses efeitos são corroborados pelo forte aumento na secreção estática de insulina de ilhotas incubadas em presença de AB 100 nM por 20 min.

6 Conclusões

A elucidação do mecanismo de ação do ácido betulínico na secreção insulínica é de grande importância farmacológica. O efeito deste triterpeno depende da atividade de canais de K_{ATP} , CCDV-L, CIC e CaCC, bem como da enzima PKC, o que explica a potente ação insulinogênica do AB, assegurando a secreção insulínica e determinando seu forte efeito antihiperglicêmico.

Referências

- Alqahtani, A. et al. "The Pentacyclic Triterpenoids in Herbal Medicines and Their Pharmacological Activities in Diabetes and Diabetic Complications". *Current Medicinal Chemistry*, 20 (2013), 4.
- Anazawa, T. et al. "Improved Pancreatic Islet Yield and Function with a Chloride Channel Blocker During Collagenase Digestion." *Supplement to Transplantation* 90, (2010).
- Batra, S.; Sjogren, C. "Effect of Estrogen Treatment on Calcium Uptake by the Rat Uterine Smooth Muscle." *Life Sci* 32, no. 4 (1983): 315-9.
- Berg, J. et al. "Ca²⁺-Activated Cl⁻ Channels at a Glance." *J Cell Sci* 125, (2012): 1367-1371.
- Best, L. "Glucose-Induced Electrical Activity in Rat Pancreatic Beta-Cells: Dependence on Intracellular Chloride Concentration." *J Physiol* 568, no. Pt 1 (2005): 137-44.

Camerino, G. M. et al. Protein Kinase C Theta (Pkc θ) Modulates the Clc-1 Chloride Channel Activity and Skeletal Muscle Phenotype: A Biophysical and Gene Expression Study in Mouse Models Lacking the Pkc θ . *Pflügers Arch - Eur J Physiol*, (2014).

Campbell, J. D. et al. Potassium Channel Regulation. *EMBO Rep* 4, (2003): 1038–1042.

Capurro, V. et al. Functional Analysis of Acid-Activated Cl Channels: Properties and Mechanisms of Regulation. *Biochim Biophys Acta* 1848, no. 1PA (2014): 105-114.

Castro, A.J. et al. Betulinic acid and 1,25(OH) $_2$ vitamin D $_3$ share intracellular signal transduction in glucose homeostasis in soleus muscle, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 48 (2014) 18-27.

Castro, A.J. et al. The mechanism of action of ursolic acid as insulin secretagogue and insulinomimetic is mediated by cross-talk between calcium and kinases to regulate glucose balance, *BBA Gen. Subj.* 1850 (2015a) 51-61.

Castro, A.J. et al. O efeito agudo de 3 β -hidroxihop-22(29)eno na secreção insulínica para a homeostase da glicose é mediado por GLP-1, canais de potássio e canais de cálcio. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* (submetido). XX, (2015b) XX-XX.

de Melo, C. L. et al. Betulinic Acid, a Natural Pentacyclic Triterpenoid, Prevents Abdominal Fat Accumulation in Mice Fed a High-Fat Diet. *J Agric Food Chem* 57, no. 19 (2009): 8776-81.

Deriy, L. V. et al. The Granular Chloride Channel ClC-3 Is Permissive for Insulin Secretion. *Cell Metab* 10, (2009): 316–323.

Duan, D. et al. A Serine Residue in Clc-3 Links Phosphorylation-Dephosphorylation to Chloride Channel Regulation by Cell Volume. *J Gen Physiol* 113, no. 1 (1999): 57-70.

Frederico, M.J.S. et al. Acylhydrazones Contribute to Serum Glucose Homeostasis through Dual Physiological Targets. *Curr. Top. Med. Chem* 12, (2012): 2049-2058.

Fuller, C. M. et al. Ca^{2+} -Activated Cl^- Channels: A Newly Emerging Anion Transport Family. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 443, (2001): S107–S110.

Gembal, M. et al. Mechanisms by Which Glucose Can Control Insulin Release Independently from Its Action on Adenosine Triphosphate-Sensitive K^+ Channels in Mouse B-Cells. *Journal of Clinical Investigation* 91, no. 3 (1993): 871-880.

Genet, C. et al. Structure-Activity Relationship Study of Betulinic Acid, a Novel and Selective Tgr5 Agonist, and Its Synthetic Derivatives: Potential Impact in Diabetes. *J. Med. Chem.* 53, (2010): 178–190.

Glukhov, A. V. et al. Functional roles of K_{ATP} channel subunits in metabolic inhibition. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 62 (2013): 90–98.

Hanefeld, M.; Temelkova-Kurktschiev, T. Control of Post-Prandial Hyperglycemia--an Essential Part of Good Diabetes Treatment and Prevention of Cardiovascular Complications. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 12, no. 2 (2002): 98-107.

Huang, F. et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. Lxxxv: Calcium-Activated Chloride Channels. *Pharmacol Rev* 64, (2012): 1–15.

Hutton, J. C. The Insulin Secretory Granule. *Diabetologia* 32, (1989): 271-281.

Jentsch, T. J. et al. Molecular Structure and Physiological Function of Chloride Channels. *Physiol Rev* 82, no. 2 (2002): 503-68.

Jewell, J. L. et al. Exocytosis Mechanisms Underlying Insulin Release and Glucose Uptake: Conserved Roles for Munc18c and Syntaxin 4. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298, (2010): R517–R531.

Kappel, V. D. et al. The Role of Calcium in Intracellular Pathways of Rutin in Rat Pancreatic Islets: Potential Insulin Secretagogue Effect. *Eur J Pharmacol* 702, no. 1-3 (2013): 264-8.

Lacy, P. E.; Kostianovsky, M. Method for the Isolation of Intact Islets of Langerhans from the Rat Pancreas. *Diabetes* 16, no. 1 (1967): 35-9.

Lee, Y.S. et al. Asiatic acid, a triterpene, induces apoptosis through intracellular Ca²⁺ release and enhanced expression of p53 in HepG2 human hepatoma cells, *Cancer. Lett.* 186 (2002) 83-91.

Lowry, O. H. et al. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 193, no. 1 (1951): 265-75. Proks, P.; Lippiat, J. D. Membrane Ion Channels and Diabetes. *Current Pharmaceutical Design* 12, (2006): 485-501.

Machado, D.G. et al. Pizzolatti, M.G. et al. Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: involvement of the monoaminergic system. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 33 (2009), 642–650.

Matulef, K. et al. Discovery of Potent Clc Chloride Channel Inhibitors. *ACS Chem Biol* 3, no. 7 (2008): 419-28.

Nagegowda, D.A. Plant volatile terpenoid metabolism: biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation. *FEBS Lett* 16, (2010): 2965-73.

Nesher, R. et al. Beta-Cell Protein Kinases and the Dynamics of the Insulin Response to Glucose. *Diabetes* 51 Suppl 1, (2002): S68-73.

Remedi, M. S.; Nichols, C. G. Chronic Antidiabetic Sulfonylureas *in vivo*: Reversible Effects on Mouse Pancreatic B-Cells. *PLoS Medicine* 5, (2008): 1473-1485.

Rigobelo, E. C. Diabetes – Damages and Treatments. Published by Intech: InTech, 2011.

Rorsman, P. et al. Regulation of Calcium in Pancreatic Alpha- and Beta-Cells in Health and Disease. *Cell Calcium* 51, no. 3-4 (2012): 300-8.

Taggart, J. S. M. et al. The Role of the K_{ATP} Channel in Glucose Homeostasis in Health and Disease: More Than Meets the Islet. *J Physiol* 588, (2010): 3201–3209.

Thévenod, F. Ion Channels in Secretory Granules of the Pancreas and Their Role in Exocytosis and Release of Secretory Proteins. *Am J Physiol Cell Physiol* 283, (2002): C651–C672.

Tian, Y. et al. Calmodulin-Dependent Activation of the Epithelial Calcium-Dependent Chloride Channel Tmem16a. *FASEB J* 25, no. 3 (2011): 1058-68.

Verkman, A. S.; Galiotta, L. J. V. Chloride Channels as Drug Targets. *Nature reviews Drug Discovery* 8, (2009).

Xu, Z. et al. Mapping of Long-Range Ins Promoter Interactions Reveals a Role for Calcium-Activated Chloride Channel Ano1 in Insulin Secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, no. 47 (2014): 16760-5.

Yao, X. Ion Channels as Targets for Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Trends In Bio/Pharmaceutical Industry* 2, (2006).

Zanatta, A. P. et al. Integrin Participates in the Effect of Thyroxine on Plasma Membrane in Immature Rat Testis. *Biochim Biophys Acta* 1830, no. 3 (2013a): 2629-37.

Zanatta, A. P.; Zanatta, L.; Goncalves, R.; Zamoner, A.; Silva, F.R.M.B. Rapid Responses to Reverse T3 Hormone in Immature Rat Sertoli Cells: Calcium Uptake and Exocytosis Mediated by Integrin. *Plos One* 8, (2013b).

5.2.2 Conclusões deste capítulo

O potente efeito antihiperglicêmico dos triterpenos 3 β -hidroxihop-22(29)eno (**BHH**), fern-9(11)-ene-2 α ,3 β -diol (**fernenodiol**) e ácido betulínico (**AB**) estão associados a significativa ação secretagoga de insulina, com os três agindo por mecanismo de ação semelhante, estimulando significativamente o influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas isoladas, bem como agindo de forma dependente de canais de potássio sensíveis a ATP e de cálcio dependente de voltagem do tipo L. Ainda, todos os três triterpenos agem provavelmente ativando vias comprometidas com ambas as fases de secreção insulínica (primeira e segunda fases), através da mobilização do cálcio intracelular e/ou ativação de proteínas cinases. Hidroxilações e presença de outros grupos funcionais nos triterpenos são extremamente significante para os efeitos destes compostos, e desta forma, provavelmente as diferenças nos mecanismos de ação dos triterpenos testados podem estar relacionadas a suas variações estruturais e de funcionalizações, com BHH possuindo hidroxilação em C3, fernenodiol com duas hidroxilações (C2 e C3) e o AB com um ácido carboxílico em C28 e uma hidroxilação em C3.

Efeitos extrapancreáticos em tecidos essencialmente voltados para a homeostasia da glicose (intestino e fígado para BHH, fígado para fernenodiol e músculo esquelético para o AB) também foram observados com esses compostos. Esses resultados associados com a caracterização da não-toxicidade no período experimental demonstra um potencial papel destes triterpenos como futuros fármacos seguros para o tratamento de distúrbios associados com a homeostasia da glicose.

6 DISCUSSÃO

Os triterpenos pentacíclicos são uma classe de metabólitos secundários de plantas sintetizados a partir do mevalonato, precursor do squaleno, molécula que configura o núcleo esteróidal desta classe de compostos, bem como da vitamina D₃ e do colesterol (KIM; KARADENIZ, 2012; NORMAN; SILVA, 2001). Os TPs vêm recebendo destaques significativos em relação a seus potentes efeitos biológicos.

Apesar da forte apolaridade, os triterpenos testados apresentam grupos funcionais polares que determinam suas ações biológicas e diferenças de efeito (KIM; KARADENIZ, 2012). O ácido betulínico possui um ácido carboxílico em C28 e uma hidroxilação em C3, configuração compartilhada pelo ácido ursólico, contudo, diferentemente do AB, o AU possui apenas uma metilação em C29 e uma em C30. O triterpeno trihidroxioleanano é constituído por hidroxilações em C2, C3 e C23 e metilações em C29 e C30 enquanto o BHH possui somente uma hidroxilação presente em C3 e o fernenodiol duas hidroxilações, uma em C2 e outra em C3. Estas diferenças em grau de polaridade e presença ou não de hidroxilações em carbonos específicos (como C2 e C3) são críticos para os efeitos biológicos dos triterpenos descritos neste trabalho bem como determinação do tecido alvo (KIM; KARADENIZ, 2012).

Todos os triterpenos estudados (ácido betulínico, ácido ursólico, trihidroxioleanano, 3 β -hidroxihopeno e fernenodiol) mostraram forte efeito antihiperlglicêmico e os mecanismos que determinam esse efeito foram parcialmente elucidados. Os triterpenos testados apresentaram ações em tecido pancreático e tecidos extrapancreáticos, através da estimulação da secreção de insulina, aumento na captação de glicose pancreática, e em tecido adiposo e muscular, extremamente importantes para a secreção insulínica e redução da glicemia, respectivamente, e também por meio de estímulo da secreção de incretinas e deposição de glicogênio hepático e muscular.

Todos os triterpenos testados melhoraram a tolerância à glicose de ratos hiperlglicêmicos. Este efeito pode ser explicado em parte pela ação destes triterpenos em potencializar a secreção insulínica em períodos de 15 e/ou 30 min ou até mesmo estendendo-se para 60 min (para o BHH, provavelmente devido a sua ação em estimular a secreção de GLP-1, o que estaria prolongando a secreção de insulina nesses animais e demonstrando que o intestino é alvo de deste triterpeno, diferentemente do THO, que não apresentou efeito algum sobre as dissacaridasas intestinais nem o THO sobre a secreção de GLP-1), bem como por estimular o depósito de glicogênio hepático e muscular e a absorção de

glicose e tecidos insulinoresponsivo, como músculo esquelético e tecido adiposo.

Os triterpenos ácido betulínico e ursólico estimularam o depósito de glicogênio muscular, o que indica uma significativa ação insulinomimética destes compostos, enquanto os triterpenos trihidroxioleanano, BHH e fernenodiol apresentaram significativa ação estimulatória do depósito de glicogênio hepático, associado ao potente efeito secretor de insulina, denotando predomínio de mecanismos insulinosecretores.

O estudo do efeito insulinomimético do AU, AB e THO em músculo esquelético (AU e AB) e tecido adiposo (THO) mostrou que todos três triterpenos apresentaram mecanismo de ação dependente da PI3K e da integridade microtubular, indicando forte papel ativador de vias de translocação de GLUT4, e, em especial, com o THO que não estimula a síntese de GLUT4, mas a age de forma dependente da ativação do deste transportador de glicose via proteína P38 por mecanismos que envolvem a fusão de vesículas à membrana e a integridade de microdomínios membranares contendo colesterol. O ácido ursólico estimulou ambas translocação e síntese de GLUT4 por via dependente de PI3K e de sinalização mediada pelo cálcio (via PLC e PKC α II), enquanto o AB age estimulando a translocação do GLUT4 por um mecanismo tempo- dependente, o que pode estar associado a um efeito de alteração no ciclo endocitose/exocitose deste transportador de glicose.

A vitamina D₃, que possui origem parental (esqualeno) em comum com os triterpenos, já é descrita por apresentar efeito insulino secretor e por melhorar a insulinoresistência em ratos e humanos (PITTAS et al., 2006). Seu mecanismo de ação no músculo esquelético se mostrou semelhante em parte como o do AU e AB, através de sua clássica via de ação genômica, influenciando somente a síntese total de GLUT4.

O fernenodiol, 3 β -hidroxihopeno e AB apresentaram significativa efeito secretor de insulina, estimulando o influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas em período de segunda fase (10 min), e com mecanismo de ação semelhante, com todos esses três triterpenos apresentando ação dependente de canais de potássio sensíveis a ATP e canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L, bem como dos estoques intracelulares de cálcio. Entretanto, somente o BHH age por um mecanismo dependente de ambas proteína cinase C e A. Fernenoidol possui um mecanismo predominantemente dependente de canais iônicos, sem agir por meio de proteínas cinases (em meio de alta concentração de glicose) e AB, além de agir por um mecanismo de sinalização envolvendo somente a proteína

cinase A, seu mecanismo também necessita da atividade de canais de cloreto e canais de cloreto sensíveis ao cálcio.

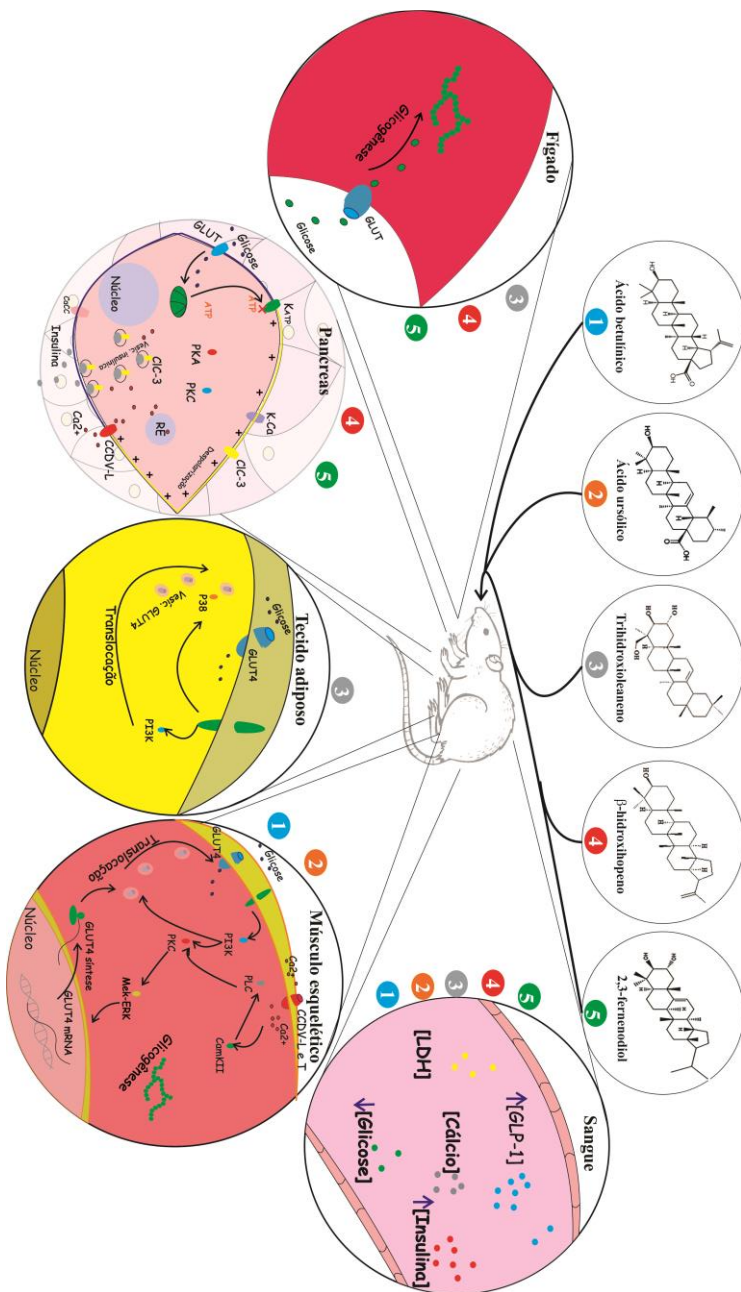
Todos esses efeitos somados a ações na secreção de GLP-1 (atualmente, um dos principais alvos para o tratamento da insulinoresistência) e conteúdo de glicogênio muscular e hepático fortalecem o potente efeito dos triterpenos pentacíclicos na homeostasia da glicose e a potencial ação farmacológica para o tratamento da insulinoresistência e dos dois tipos mais comuns de diabetes, 1 e 2 (FIG 8).

7 CONCLUSÕES

- ✓ Todos os triterpenos testados apresentaram efeito antihiperlicêmico, estimulação da secreção de insulina e GLP-1 e aumentam o conteúdo de glicogênio muscular e/ou hepático em ratos hiperlicêmicos após tratamento *in vivo*;
- ✓ A 1,25 (OH)₂ D₃, o ácido betulínico e ácido ursólico estimulam a captação de [U-¹⁴C]-2-Deoxi-D-glicose *in vitro* no músculo esquelético, o trihidroxioleanano efetua este efeito no tecido adiposo e o 3-hidroxiopano e Fernenodiol estimulam a captação de [U-¹⁴C]-2-Deoxi-D-glicose *in vitro* em ilhotas pancreáticas de ratos;
- ✓ O mecanismo do ácido ursólico no GLUT4 ocorre através do estímulo da síntese mRNA deste transportador de glicose no músculo esquelético;
- ✓ O ácido betulínico e ursólico estimulam a síntese e translocação de GLUT4 por vias dependentes de PI3K *in vitro* e *in vivo* no músculo esquelético de ratos normoglicêmicos.
- ✓ A vitamina 1,25 (OH)₂ D₃ estimula a síntese de GLUT4 por vias dependentes das MAPK e síntese geral de proteínas *in vitro* no músculo esquelético de ratos normoglicêmicos.
- ✓ THO estimula a translocação e ativação de GLUT4 por vias dependentes de PI3K, P38 e pP38 *in vitro* e tecido adiposo de ratos normoglicêmicos.
- ✓ O mecanismo de ação do AU na captação de glicose em tecido muscular esquelético ocorre de forma dependente de proteínas cinases, como a fosfolipase C (PLC), proteína cinase C (PKC), MAP cinases (MEK-ERK) e proteína cinase dependente de cálcio-calmodulina II (PKCam II).
- ✓ O THO age estimulando a translocação de GLUT4 e captação de glicose em tecido adiposo de forma dependente do processo de fusão vesicular.

- ✓ Os triterpenos 3 β -hidroxihopeno Fernenodiol e AB estimulam a secreção de vesículas insulínicas em ilhotas pancreáticas isoladas de rato, agindo através do aumento do influxo de cálcio de forma dependente de canais de potássio sensíveis a ATP (K_{ATP}) e canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L (L-CCDV);
- ✓ O mecanismo de ação de AB no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas e secreção de insulina é dependente também dos canais de cloreto;
- ✓ As proteínas cinase A e C estão envolvidas no mecanismo de ação do 3 β -hidroxihopeno e AB no estímulo do influxo de cálcio e secreção de insulina;
- ✓ O AB estimula a secreção estática de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas;
- ✓ Todos os triterpenos testados não apresentam efeitos citotóxicos nem alteram a concentração sérica de cálcio após tratamento *in vivo* em ratos hiperglicêmicos.

Fig 8. Efeito e mecanismo de ação dos triterpenos ácido betulínico, ácido ursólico, trihidroxioleanano, β -hidroxihopano e fernenodiol na homeostasia da glicose em ratos hiperglicêmicos.



REFERÊNCIAS

- ABDEL AZIZ, M.T. et al. The effect of curcumin on insulin release in rat-isolated pancreatic islets. **Angiology** v. 61, p. 557-66, 2010.
- AGATI, G. et al. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. **Plant Sci**, v. 196, p. 67-76, 2012.
- AIKEN, C., CHEN, C. H. Betulinic acid derivatives as HIV-1 antivirals. **TRENDS in Molecular Medicine**, v. 11, 2005.
- AJALA, O., ENGLISH, P., PINKNEY, J. Systematic review and meta-analysis of different dietary approaches to the management of type 2 diabetes. **Am J Clin Nutr**, v. 97, p. 505–16, 2013.
- ALBERTON, E.H. et al., Influence of chalcone analogues on serum glucose levels in hyperglycemic rats. **Chem Biol Interact**. v. 15, p. 355-62, 2008.
- ALQAHTANI, A. et al. The pentacyclic triterpenoids in herbal medicines and their pharmacological activities in diabetes and diabetic complications. **Curr Med Chem**, v. 20, p. 908-31, 2013.
- ALVARSSON, M. et al., Beneficial effects of insulin versus sulphonylurea on insulin secretion and metabolic control in recently diagnosed type 2 diabetic patients. **Diabetes Care**. v. 26, p. 2231-7, 2003.
- ALZAIM, M, WOOD, R.J. Vitamin D and gestational diabetes mellitus. **Nutr Rev**, v. 71, p. 158-67, 2013.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 32, p. S62–S67, 2009.
- ARNER, P. Insulin resistance in type 2 diabetes: role of fatty acids. **Diabetes Metab Res Ver**, v. 18, p. S5-9, 2002.
- AYYANAR, M., SUBASH-BABU, P., IGNACIMUTHU, S. Syzygium cumini (L.) Skeels., a novel therapeutic agent for diabetes: folk medicinal and pharmacological evidences. **Complement Ther Med**, v. 21, p. 232-43, 2013.

BAGLIN, I. et al. A review of natural and modified betulinic, ursolic and echinocystic acid derivatives as potential antitumor and anti-HIV agents. **Mini Rev Med Chem**, v. 3, p. 525-39, 2003.

BARBOSA, J.H.P.; OLIVEIRA, S.L.; SEARA, L.T. O Papel dos Produtos Finais da Glicação Avançada (AGEs) no Desencadeamento das Complicações Vasculares do Diabetes. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 52, p. 6, 2008.

BEASER, R. S., HORTON, E. S., ZINMAN, B. Diabetes and Intestinal Incretin Hormones: A New Therapeutic Paradigm. **Faculty and Disclosures**. 2004.

BRASIL.

<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=29793
> Acesso em 27.07.13.

BELVIS, A.G. et al. Can primary care professionals' adherence to Evidence Based Medicine tools improve quality of care in type 2 diabetes mellitus? A systematic review. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 85, p. 119-31, 2009.

BEST, L. et al. Curcumin induces electrical activity in rat pancreatic b-cells by activating the volume-regulated anion channel. **biochemical pharmacology**. v. 73, p. 1768–1775, 2007.

BHONDE, R. et al. Isolated islets in diabetes research. **Indian J Med Res**, v. 125, p. 425-440, 2007.

BOGAN, J.S. McKEE, A.E., LODISH, H.F. Insulin-responsive compartments containing GLUT4 in 3T3-L1 and CHO cells: regulation by amino acid concentrations. **Mol Cell Biol**, v. 21, p. 4785-806, 2001.

BOSCO, D. et al. Unique Arrangement of a- and b-Cells in Human Islets of Langerhans. **Diabetes**, v. 59, 2010.

BROSNAN, J.T. Comments on metabolic needs for glucose and the role of gluconeogenesis. **Eur J Clin Nutr**, v. 53, p. S107-11, 1999.

BUFFET, A. et al. Increased plasma β -hydroxybutyrate levels during the fasting test in patients with endogenous hyperinsulinemic hypoglycaemia. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 33, p. 13-20, 2012.

CAMER, D., YU, Y., SZABO, A., HUANG, X-F. The molecular mechanisms underpinning the therapeutic properties of oleanolic acid, its isomer and derivatives for type 2 diabetes and associated complications. **Mol. Nutr. Food Res.** v. 58, p. 1750–1759, 2014.

CARDENAS, C., QUESAD, A. R., MEDINA, M. A. Effects of ursolic acid on different steps of the angiogenic process. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 320, p. 402–408, 2004.

CASTELLANO, J.M. et al., Biochemical Basis of the Antidiabetic Activity of Oleanolic Acid and Related Pentacyclic Triterpenes. **Diabetes**, v. 62, p. 1791-1799, 2013.

CASTRO, A.J. et al. Betulinic acid and 1,25(OH)₂ vitamin D₃ share intracellular signal transduction in glucose homeostasis in soleus muscle. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.** v. 48, p. 18-27, 2014.

CASTRO, A.J. et al. The mechanism of action of ursolic acid as insulin secretagogue and insulinomimetic is mediated by cross-talk between calcium and kinases to regulate glucose balance, **BBA Gen. Subj.** v. 1850, p. 51-61, 2015.

CAVALIER, E. et al. Vitamin D and type 2 diabetes mellitus: where do we stand? **Diabetes Metab.** v. 37, p. 265-72, 2011.

CAZAROLLI, L. H. et al. Flavonoids: prospective drug candidates. **Mini - Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 1429-1440, 2008.

CAZAROLLI, L. H., et al. Mechanism of action of the stimulatory effect of apigenin-6-C-(2"-O-alpha-l-rhamnopyranosyl)-beta-L-fucopyranoside on 14C-glucose uptake. **Chem. Biol. Interact.** v. 179, p. 407-412, 2009.

CAZAROLLI, L. H. et al. Insulin signaling: A potential signaling pathway for the stimulatory effect of kaempferitrin on glucose uptake in skeletal muscle. **Eur J Pharmacol**, v. 15, p. 1-3, 2013.

CERF, M. E. High fat diet modulation of glucose sensing in the beta-cell. **Med Sci Monit**, v. 13, p. 12-7, 2007.

CHAKHTOURA, M., AZAR, S. T. The Role of Vitamin D Deficiency in the Incidence, Progression, and Complications of Type 1 Diabetes Mellitus. **International Journal of Endocrinology**, v. 2013, p. 1-10, 2013.

CHENG, S.Y. et al. Oleanane-type triterpenoids from the leaves and twigs of *Fatsia polycarpa*. **J Nat Prod**, v. 26, p. 1744-50, 2011.

CHEW, A.; HARRIS, S.S. Does vitamin D affect timing of menarche? **Nutr Rev**, v. 71, p. 189-93, 2013.

CICHEWICZ, R.H.; KOUZI, S. A.; Chemistry, Biological Activity, and Chemotherapeutic Potential of Betulinic Acid for the Prevention and Treatment of Cancer and HIV Infection. **Medicinal Research Reviews**, v. 24, p. 90-114, 2004.

CLINE, J. Calcium and vitamin d metabolism, deficiency, and excess. **Top Companion Anim Med**, v. 27, p. 159-64, 2012.

CRAIG, M.E. et al. Diabetes care, glycemic control, and complications in children with type 1 diabetes from Asia and the Western Pacific Region. **J Diabetes Complications**, v. 21, p. 280-7, 2007.

CSUK, R. et al. Synthesis of Antitumor-Active Betulinic Acid-Derived Hydroxypropargylamines by Copper-Catalyzed Mannich Reactions. **Arch. Pharm. Chem. Life Sci**, v. 000, p. 1–15, 2013.

DAILEY, G.E. et al. Impact of diabetes duration on hypoglycaemia in patients with type 2 diabetes treated with insulin glargine or NPH insulin. **Diabetes Obes Metab**, 2013.

DAMAZIO, R.G. et al. Antihyperglycemic activity of naphthylchalcones. **Eur J Med Chem**, v. 45, p. 1332-7, 2010.

DEEB, K.K., TRUMP, D.L., JOHNSON, C.S. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. **Nature Reviews cancer**. v. 7, p. 684-700, 2007.

DeFURIA, J. et al. B cells promote inflammation in obesity and type 2 diabetes through regulation of T-cell function and an inflammatory cytokine profile. **PNAS**, v. 11, 2013.

DEGENHARDT, J., KÖLLNER, T.G. GERSHENZON, J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. **Phytochemistry**, v. 70, p. 1621-37, 2009.

Del PRATO, S. Loss of early insulin secretion leads to postprandial hyperglycaemia. **Diabetologia**, v. 46, p. 2-8, 2003.

DESMAËLE, D.; GREF, R.; COUVREUR, P. Squalenoylation: a generic platform for nanoparticulate drug delivery. **J Control Release**, v. 20, p. 609-18, 2012.

DING, C. et al. Horizons in Nutritional Science Vitamin D signalling in adipose tissue. **British Journal of Nutrition**, v. 108, p. 1915–1923, 2012.

ELLIS, H. Anatomy of the pancreas and the spleen. **Surgery**, v. 31, p. 6, 2013.

ERBAĞCI, A.B. et al. Mediators of inflammation in children with type I diabetes mellitus: cytokines in type I diabetic children. **Clin Biochem**, v. 34, p. 645-50, 2001.

FARINA, C., PINZA, M., PIFFERI, G. Synthesis and anti-ulcer activity of new derivatives of glycyrrhetic, oleanolic and ursolic acids. **Farmaco**, v. 53, p. 22-32, 1998

FOLADOR, P. et al. Potential insulin secretagogue effects of isovitexin and swertisin isolated from *Wilbrandia ebracteata* roots in non-diabetic rats. **Fitoterapia**, v. 81, p. 1180-7, 2010.

FREDERICO, M.J. et al. Acylhydrazones contribute to serum glucose homeostasis through dual physiological targets. **Curr Top Med Chem**, v. 12, p. 2049-58, 2012.

FRIDLAND, L.E., et al. Ion channels and regulation of insulin secretion in human β -cells: a computational systems analysis. **Islets**, v. 5, p. 1-15, 2013.

FELBER, J.P., GOLAY, A. Pathways from obesity to diabetes. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 26, p. S39-45, 2002.

FERREIRA, D. S. et al. In vivo activity of ursolic and oleanolic acids during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. **Experimental Parasitology**, v. 134, p. 455–459, 2013.

FLAGG, T. P. et al. Muscle K_{ATP} Channels: Recent Insights to Energy Sensing and Myoprotection. **Physiol Rev**, v. 90, p. 799–829, 2010.

FRIGHETTO, R.T.S. et al. Analytical, Nutritional and Clinical Methods Isolation of ursolic acid from apple peels by high speed counter-current chromatography. **Food Chemistry**, v. 106, p. 767–771, 2008.

FULDA, S. Modulation of Apoptosis by Natural Products for Cancer Therapy. **Planta Med**, v. 76, p. 1075-1079, 2010.

FUNGA, M. et al. Effect of glucagon-like peptide-1 (7–37) on beta-cell function after islet transplantation in type 1 diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 74, p. 189–193, 2006.

GAUTAM, A., JACHAK, S. M. Recent Developments in AntiInflammatory Natural Products. **Medicinal Research Reviews**, v. 29, p. 767-820, 2009.

GEMBAL, M. et al. Mechanisms by Which Glucose Can Control Insulin Release Independently from Its Action on Adenosine Triphosphate-sensitive K^+ Channels in Mouse B Cells. **J. Clin. Invest**, v. 91, p. 871-880, 1993.

GENTILE, N.T.; SIREN, K. Glycemic control and the injured brain. **Emerg Med Clin North Am**, v. 27, p. 151-69, 2009.

GLUKHOV, A. V. et al. Functional roles of K_{ATP} channel subunits in metabolic inhibition. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 62, p. 90–98, 2013.

GRECO, D.S. Endocrine causes of calcium disorders. **Top Companion Anim Med**, v. 27, p. 150-5, 2012.

GRILLO, M.L. et al., Testosterone rapidly stimulates insulin release from isolated pancreatic islets through a non-genomic dependent mechanism. **Horm. Metab. Res.** v. 37, 662-665, 2005.

GRUNDY, S.M. Obesity, Metabolic Syndrome, and Cardiovascular Disease. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, p. 2595–2600, 2004.

GURUVAYOORAPPAN, C., KUTTAN, G. β -Carotene down-regulates inducible nitric oxide synthase gene expression and induces apoptosis by suppressing bcl-2 expression and activating caspase-3 and p53 genes in B16F-10 melanoma cells. **Nutrition Research**, v. 27, p. 336-342, 2007.

HARADA, N., INAGAKI, N. Role of sodium-glucose transporters in glucose uptake of the intestine and kidney. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 3, p. 352–353, 2012.

HAUKE, E. et al. Novel triterpene-derived hydrocarbons of the arborane/fernane series in sediments: Part II. **Geochimica et Cosmochimica Acta**. v. 56, p. 3595-3602, 1992.

HERMAN, M.A. et al. A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism. **Nature**, v. 19, p. 333-8, 2012.

HERRING, R., JONES, R.H., RUSSELL-JONES, D.L. Hepatoselectivity and the evolution of insulin. **Diabetes Obes Metab**, 2013

HSU, H-Y.; YANG, J-J.; LINB, C-C. Comparisons of geniposidic acid and geniposide on antitumor and radioprotection after sublethal irradiation. **Cancer Letters**, v. 113, p. 31-37, 1997.

HUOPIO, H. et al. K_{ATP} channels and insulin secretion disorders. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 283, p. E207–E216, 2002.

IKEDA, Y.; MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H.; Ursolic acid: an anti- and pro-inflammatory triterpenoid. **Mol Nutr Food Res**, v. 52, p. 26-42, 2008.

ILLARIO, M. et al. Calcium-calmodulin-dependent kinase II (CaMKII) mediates insulin-stimulated proliferation and glucose uptake. **Cell Signal**, v. 21, p. 786-92, 2009.

ISHII, H. et al. Glucose-incretin interaction revisited. **Endocr J**, v. 58, p. 519-25, 2011.

JACOBSON, D. A. et al., Calcium-activated and voltage-gated potassium channels of the pancreatic islet impart distinct and complementary roles during secretagogue induced electrical responses. *J Physiol.* v. 588, p. 3525–3537, 2010.

JANG, S.M. et al. Ursolic acid enhances the cellular immune system and pancreatic beta-cell function in streptozotocin-induced diabetic mice fed a high-fat diet. **Int Immunopharmacol**, v. 9, p. 113-9, 2009.

JANICSAK, G. et al. Study of the oleanolic and ursolic acid contents of some species of the Lamiaceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, p. 392-396, 2006.

KAHN, S. E., HULL, R. L., UTZSCHNEIDER, K. M. Review Article Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, p. 840-846, 2006.

KHAN, A., GILANI, A. Antispasmodic and bronchodilator activities of *Artemisia vulgaris* are mediated through dual blockade of muscarinic receptors and calcium influx. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 126, p. 480-486, 2009.

KAJIKAWA, M. et al. An insulinotropic effect of vitamin D analog with increasing intracellular Ca^{2+} concentration in pancreatic β -cells through nongenomic signal transduction. **Endocrinology**, v. 140, p. 4706-4712, 1999.

KAMP, T. J., HELL, J. W. Regulation of Cardiac L-Type Calcium Channels by Protein Kinase A and Protein Kinase C. **Circ Res**, v. 87, p. 1095-1102, 2000.

KANZAKI, M., PESSIN, J.E. Signal integration and the specificity of insulin action. **Cell Biochem Biophys**, v. 35, p. 191-209 2001.

KAPPEL, V.D. et al. Involvement of GLUT-4 in the stimulatory effect of rutin on glucose uptake in rat soleus muscle. **J Pharm Pharmacol**, v. 65, p. 1179-86, 2013.

KAPPEL, V. D. et al. The role of calcium in intracellular pathways of rutin in rat pancreatic islets: potential insulin secretagogue effect. **European Journal of Pharmacology**, v. 702, p. 264-268, 2013.

KAZMI, I. et al. Anti-diabetic potential of ursolic acid stearyl glucoside: A new triterpenic glycosidic ester from *Lantana camara*. **Fitoterapia**, v. 83, p. 142–146, 2012.

KIM, S.K., KARADENIZ, F. Biological importance and applications of squalene and squalane. **Adv Food Nutr Res**, v. 65, p. 223-33, 2012.

KOSTER, J. C., PERMUTT, M. A., NICHOLS, C. G. Diabetes and Insulin Secretion The ATP-Sensitive K⁺ Channel (K_{ATP}) Connection. **Diabetes**, v. 54, 2005.

KOTA, S.K. et al. Effect of vitamin D supplementation in type 2 diabetes patients with pulmonary tuberculosis. **Diabetes Metab Syndr**, v.5, 85-9, 2011.

KOUIDRAT, Y.; et al. Increased advanced glycation end-products (AGEs) assessed by skin autofluorescence in schizophrenia. **Journal of Psychiatric Research**, v. 47, p. 1044-1048, 2013.

KRANIU, G.N., CAMERON-SMITH, D.; HARGREAVES, M. Acute exercise and GLUT4 expression in human skeletal muscle: influence of exercise intensity. **J Appl Physiol**, v. 101, p. 934-7, 2006.

KRISMAN, C.R. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. **Analytical Biochemistry**, v. 4, p. 7–23, 1962.

KULKARNI, R. N. The islet-cell. The International Journal of **Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, p. 365–371, 2004.

KUPRIYANOVA, T.A., KANDROR, K.V. Akt-2 binds to Glut4-containing vesicles and phosphorylates their component proteins in response to insulin. **J Biol Chem**, v. 15, p. 1458-64, 1999.

KUZUYA, T. et al. Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 55, p. 65-85, 2002.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-5, 1970.

LAMOUNIER-ZEPTEP, V., EHRHART-BORNSTEIN, M., BORNSTEIN, S. R. Insulin resistance in hypertension and cardiovascular disease. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 20, p. 355-367, 2006.

LANNER, J.T. et al. Ca(2+) and insulin-mediated glucose uptake. **Curr Opin Pharmacol**, v. 8, p. 339-45, 2008.

LASZCZYK, M. N. Pentacyclic Triterpenes of the Lupane, Oleanane and Ursane Group as Tools in Cancer Therapy. **Planta Med**, v. 75, p. 1549-1560, 2009.

LEE, Y. S. et al. Asiatic acid, a triterpene, induces apoptosis through intracellular Ca²⁺ release and enhanced expression of p53 in HepG2 human hepatoma cells. **Cancer Lett**, v. 1, p. 83-91, 2002.

LEHNEN, A. M. et al. Changes in the GLUT4 Expression by Acute Exercise, Exercise Training and Detraining in Experimental Models. **J Diabetes Metab**, v. 10, p. 2155-6156, 2012.

LENEY, S.E., TAVARÉ, J.M. The molecular basis of insulin-stimulated glucose uptake: signalling, trafficking and potential drug targets. **J Endocrinol**, v. 203, p. 1-18, 2009.

LETO, D., SALTIEL, A. R. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nature Reviews*. **Molecular Cell Biology**, v. 13, 2012.

LEYSENS, C., VERLINDEN, L., VERSTUYF, A. Antineoplastic effects of 1,25(OH)₂D₃ and its analogs in breast, prostate and colorectal cancer. **Endocrine-Related Cancer**, v. 20, p. R31–R47, 2013.

LI, Y. et al. Voltage-gated potassium channel Kv1.3 regulates GLUT4 trafficking to the plasma membrane via a Ca²⁺-dependent mechanism. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 290, p. C345–C351, 2006.

LINDSBERG, P. J., ROINE, R.O. Hyperglycemia in Acute Stroke. **Stroke**, v. 35, p. 363-364, 2004.

LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **J Ethnopharmacol**, v. 1, p. 57-68, 1995.

LIU C. et al. Two new 2,3-seco-hopane triterpene derivatives from *Megacodon stylophorus* and their antiproliferative and antimicrobial activities. **Planta Med.** v. 80, p. 936-41, 2014.

LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the Folinphenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**. v. 193, p. 265–75, 1951.

LÜ, H., et al. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of the total triterpene acid fraction from *Folium Eriobotryae*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 122, p. 486–491, 2009.

MAH, E., BRUNO, R.S. Postprandial hyperglycemia on vascular endothelial function: mechanisms and consequences. **Nutr Res**, v. 32, p. 727-40, 2012.

MASTRACCI, T. L., SUSSEL, L. The endocrine pancreas: insights into development, differentiation, and diabetes. **WIREs Dev Biol**, 2012.

McCARTY, M. F. PKC-mediated modulation of L-type calcium channels may contribute to fat-induced insulin resistance. **Medical Hypotheses**. v. 66, p. 824–831, 2006.

MEDINA, R.A., OWEN, G.I. Glucose transporters: expression, regulation and cancer. **Biol Res**, v. 35, p. 9-26, 2002.

MELONI, A.R. et al. GLP-1 receptor activated insulin secretion from pancreatic β -cells: mechanism and glucose dependence. **Diabetes Obes Metab.** v. 15, p. 15-27, 2013.

MENEGAZ, D. et al. Rapid responses to thyroxine in the testis: active protein synthesis-independent pathway. **Molecular and Cellular Endocrinology.** v. 26, p. 128-134, 2006.

MENEGAZ, D. et al. Role of $1\alpha,25(\text{OH})_2$ vitamin D₃ on α -[1-14C]MeAIB accumulation in immature rat testis. **Steroids,** v. 74, p. 264–269, 2009.

MENEGAZ, D. et al. $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D₃ stimulation of secretion via chloride channel activation in Sertoli cells. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology,** v. 74, p. 264-269, 2010.

MÎINEA, C. P. et al. AS160, the Akt substrate regulating GLUT4 translocation, has a functional Rab GTPase-activating protein domain. **Biochem J,** v.1, p. 87–93, 2005.

MISAWA, N. Pathway engineering for functional isoprenoids. **Curr Opin Biotechnol,** v. 22, p. 627-33, 2011.

MOHANKUMAR, S.K., TAYLOR, C. G., ZAHRADKA, P. Domain-dependent modulation of insulin-induced AS160 phosphorylation and glucose uptake by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in L6 myotubes. **Cellular Signalling,** v. 24, p. 302–308, 2012.

MOREIRA, E.D. et al. Venezuelan Diabetes Investigators' Group. Glycemic control and its correlates in patients with diabetes in Venezuela: results from a nationwide survey. **Diabetes Res Clin Pract,** v. 87, p. 407-14, 2010.

MORGAN, B.J., CHAI, S.Y., ALBISTON, A.L. GLUT4 associated proteins as therapeutic targets for diabetes. **Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov,** v. 5, p. 25-32, 2011.

MOTTA, P. M. et al. Histology of the Exocrine Pancreas. **Microscopy research and technique,** v. 37, p. 384–398, 1997.

MURGIA, M. et al. Multiple signalling pathways redundantly control glucose transporter *GLUT4* gene transcription in skeletal muscle. **J Physiol**, v. 1, p. 4319–4327, 2009.

NA, L.X. et al. Curcumin improves insulin resistance in skeletal muscle of rats. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**. v. 21, p. 526-33, 2011.

NAGEGOWDA, D.A. Plant volatile terpenoid metabolism: biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation. **FEBS Lett**, v. 16, p. 2965-73, 2010.

NICHOLS, C. G. K_{ATP} Channels as molecular sensors of cellular metabolism. **Nature**, v. 440, p. 470-476, 2006.

NISHIUMI, S., ASHIDA, H. Rapid preparation of a plasma membrane fraction from adipocytes and muscle cells: application to detection of translocated glucose transporter 4 on the plasma membrane. **Bioscience. Biotechnology and Bio-chemistry**. v. 71, p. 2343–6, 2007.

NOKHODCHI, A. et al. The effect of terpene concentrations on the skin penetration of diclofenac sodium. **Int J Pharm**, v. 20, p. 97-105, 2007.

NORDLIE, R.C., FOSTER, J.D., LANGE, A.J. Regulation of glucose production by the liver. **Annu Rev Nutr**, v. 19, p. 379-406, 1999.

NORMAN, A. W. Receptors for $1\alpha,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$: Past, Present, and Future. **Journal Of Bone And Mineral Research**, v. 13, 1998.

NORMAN, A.W., SILVA, F.R. Structure function studies: identification of vitamin D analogs for the ligand-binding domains of important proteins in the vitamin D-endocrine system. **Rev Endocr Metab Disord**, v. 2, p. 229-38, 2001.

NORMAN, A.W. et al. A specific binding protein/receptor for $1,25$ -dihydroxy D_3 is present in an intestinal caveolae membrane fraction. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 298, p. 414–419, 2002.

NORMAN, A.W. Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. **Endocrinology**, v. 147, p. 5542-8, 2006.

NORMAN, A.W. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. **Am J Clin Nutr**, v. 88, p. 491S-499S, 2008.

NORMAN, A.W., BOUILLON, R. Vitamin D nutritional policy needs a vision for the future. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 235, p. 1034-45, 2010.

OHARA-IMAIZUMI, M., NAGAMATSU, S. Insulin Exocytotic Mechanism by Imaging Technique. **J. Biochem**, v. 140, p. 1–5, 2006.

OJUKA, E.O., GOYARAM, V., SMITH, J.A. The role of CaMKII in regulating GLUT4 expression in skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 303, p. E322-31, 2012.

OKAMURA, W.H. et al. Conformationally restricted mimics of vitamin D rotamers. **Steroids**, v. 66, p. 239-47, 2001.

O'MALLEY, D.; HARVEY, J. Insulin Activates Native and Recombinant Large Conductance Ca^{2+} -Activated Potassium Channels via a Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Process. *Molecular Pharmacology*. v. 65, p. 1352-63. 2004.

OMORO, T., IKUSE, M. Triterpenoids of the gramineae. **Phytochemistry**. v. 9, p. 2137- 2148, 1970.

OVESNA, Z., KOZICS, K., SLAMENOV, D. Protective effects of ursolic acid and oleanolic acid in leukemic cells. **Mutation Research**, v. 600, p. 131–137, 2006.

PAGLIUCA, F.W., MELTON, D.A. How to make a functional β -cell. **Development**, v. 140, p. 2472-83, 2013.

PAN, C., et al. Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of Plants from the Genus *Adiantum*: A Review. **Trop J Pharm Res**. v. 10, p. 681, 2011.

PATOČKA, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine Signification. **Journal of Applied Biomedicine**. v.1, p. 7–12, 2003.

PHARMA, S.A.M. et al. Understanding Type 1 Diabetes: Etiology and Models. **Diabetes**, v. 37, p. 269-276, 2013.

PIETROPAOLO, M. et al. Primer: Immunity and Autoimmunity. **Diabetes**, v. 57, p. 2872–2882, 2008.

PITTAS, A.G. et al. Vitamin D and Calcium Intake in Relation to Type 2 Diabetes in Women. **Diabetes Care**, v. 29, p. 650–656, 2006.

POLLIER, J., GOOSSENS, A. Oleanolic acid. **Phytochemistry**, v. 77, p. 10-5, 2012.

PYRAMA, R. et al. Chronic kidney disease and diabetes. **Maturitas**, v. 71, p. 94–103, 2012.

RAGHAVAN, V.A. Insulin Resistance and Atherosclerosis. **Heart Failure Clin**, v.8, p. 575–587, 2012.

RAJAN, A.S. et al. Ion channels and insulin secretion. *Diabetes Care*. v. 13, p. 340-63, 1990.

REITER, C. E., GARDNER, T.W. Functions of insulin and insulin receptor signaling in retina: possible implications for diabetic retinopathy. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 22, p. 545–562, 2003.

REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **J. Cell. Biol.** v. 17, p. 208-212, 1963.

ROBERTSON, R.P. et al. Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. **Diabetes**, v. 52, p. 581-7, 2003.

SALVADOR, J.A. et al. Ursane-type pentacyclic triterpenoids as useful platforms to discover anticancer drugs. **Nat Prod Rep**, v. 29, p. 1463-79, 2012.

SAND, CV; VIEIRA, TO; OLIVEIRA, TB; WILHELM FILHO, D; SILVA FRMB; PASA, TB. Influence of oral glutamine and glucose on markers of oxidative stress in a paraquat rat model. *e-SPEN*. **The**

European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism, v. 2, p. 63-67, 2007

SANDHIYA, S., DKHAR, S. A. Potassium channels in health, disease & development of channel modulators. **Indian J Med Res**, v. 129, p. 223-232, 2009.

SANO, H. et al. Insulin-stimulated GLUT4 protein translocation in adipocytes requires the Rab10 guanine nucleotide exchange factor Dennd4C. **J Biol Chem**, v. 13, p. 16541-5, 2011.

SEMENKOVICH, C. F. Insulin resistance and atherosclerosis. **J Clin Invest**, v.116, p. 1813–1822, 2006.

SHANMUGAMA, M. K. et al. Ursolic acid in cancer prevention and treatment: Molecular targets, pharmacokinetics and clinical studies. **Biochemical Pharmacology**, v. 85, p.1579–1587, 2013.

SHANMUGAM, M.K. et al., Oleanolic acid and its synthetic derivatives for the prevention and therapy of cancer: Preclinical and clinical evidence. **Cancer Letters**, v. 346, p. 206–216, 2014.

SIDDIQUE, H.R.; SALEEM, M. Beneficial health effects of lupeol triterpene: a review of preclinical studies. **Life Sci**, v. 14, p. 285-93, 2011.

SILVA, F.R. et al. Kaempferol and kaempferitrin: nutraceutical compounds contribute to glucose homeostasis by acting at multiple biological sites. In: Garion Villers; Yves Fougere. (Org.). Kaempferol: Chemistry, Natural Occurrences and Health Benefits. 1ed.New York: **Nova science publishers, Inc.**, 2013, v. 1, p. 1-45.

SILVA, F.R. et al. Glucose uptake: knowledge from in vivo, *in situ* and *in vitro* studies and health implications. In: Carter C. Johnson and Davis B. Williams. (Org.). Glucose Uptake: Regulation, Signaling Pathways and Health Implications. 1^{ed}.New York: **nova science publishers, INC.**, 2013, v. 1, p. 1-44, 2013.

STRAUB, S.G.; SHARP, G.W. Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 18, p. 451-63, 2002.

SUN, H. et al. Structure-activity relationships of oleanane- and ursanetype triterpenoids. **Botanical Studies**, v. 47, p. 339-368, 2006.

TAKADA, K. et al. Ursolic acid and oleanolic acid, members of pentacyclic triterpenoid acids, suppress TNF-induced E-selectin expression by cultured umbilical vein endothelial cells. **Phytomedicine**, v. 17, p. 1114–1119, 2010.

TAKIISHI, T. et al. Vitamin D and Diabetes. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 39, p. 419–446, 2010.

TAKIKAWA, M., KURIMOTO, Y., TSUDA, T. Curcumin stimulates glucagon-like peptide-1 secretion in GLUTag cells via Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II activation. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 435, p. 165-70, 2013.

TALAEI, A., MOHAMADI, M., ADGI, Z. The effect of vitamin D on insulin resistance in patients with type 2 diabetes. **Diabetol Metab Syndr**, v. 26, p. 8, 2013.

THORENS, B. Glucose sensing and the pathogenesis of obesity and type 2 diabetes. **Int J Obes (Lond)**, v. 32, p. S62-71, 2008.

THORENS, B.; MUECKLER, M. Glucose transporters in the 21st Century. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 298, p. E141-5, 2010.

TREEBAK, J.T. et al. AMPK-mediated AS160 phosphorylation in skeletal muscle is dependent on AMPK catalytic and regulatory subunits. **Diabetes**, v. 55, p. 2051-8, 2006.

TOMÁS, E. et al. Hyperglycemia and insulin resistance: possible mechanisms. **Ann N Y Acad Sci**, v. 967, p. 43-51, 2002.

TOMLINSON, S. The Investigation of Hypercalcaemia. **Metab. Bone Dis. & Re. Res**, v. 2, p. 161-165, 1980.

TORRES, N.; NORIEGA, L.; TOVAR, A.R. Nutrient modulation of insulin secretion. **Vitam Horm**, v. 80, p. 217-44, 2009.

TUOMILEHTO, J. et al. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. **N Engl J Med**, v. 3, p. 1343-50, 2001.

WANG, Z-H. et al. Anti-glycative effects of oleanolic acid and ursolic acid in kidney of diabetic mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 628, 255–260, 2010.

WEBSTER I. et al. AMP kinase activation and glut4 translocation in isolated cardiomyocytes. **Cardiovasc J Afr**, v. 21, p. 72-8, 2010.

WEISS, F. U. New advances in pancreatic cell physiology and pathophysiology. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 22, p. 3–15, 2008.

WIJESEKARA, N. et al. Diverse Signals Regulate Glucose Uptake into Skeletal Muscle. **Canadian Journal of Diabetes**, v. 30, p. 80-88, 2006.

WING, R. R. et al. Benefits of Modest Weight Loss in Improving Cardiovascular Risk Factors in Overweight and Obese Individuals With Type 2 Diabetes. **Diabetes Care**, v. 34, p. 1481–1486, 2011.

WITCZAK, C.A. et al. CaMKII regulates contraction- but not insulin-induced glucose uptake in mouse skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 298, p. E1150-60, 2010.

WOOD, I.S., TRAYHURN, P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. **Br J Nutr**, v.89, p. 3-9, 2003.

XU, R. et al. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. **Phytochemistry**. v. 65, p. 261–291, 2004.

YAMAGISHI, S-I.; Role of advanced glycation end products (AGEs) and receptor for AGEs (RAGE) in vascular damage in diabetes. **Experimental Gerontology**, v. 46, p. 217–224, 2011.

YAMAGISHI, S-I.; et al. Role of advanced glycation end products (AGEs) and oxidative stress in vascular complications in diabetes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1820, p. 663–671, 2012.

YANG, L. Et al. Protective role of the vitamin D receptor. **Cell Immunol**, v. 279, p. 160-6, 2012.

YANG, S. et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel betulinic acid derivatives. **Chem Cent J**, v. 6, p. 141, 2012.

YANG, S-N., BERGGREN, P-O. The role of voltage-gated calcium channels in pancreatic B-cell physiology and pathophysiology. **Endocrine Reviews**, v. 27, p. 621–676, 2006.

YE, W-C. et al. Oleanane saponins from *Gymnema sylvestre*. **Phytochemistry**, v. 53, p. 893-899, 2000.

YENJITA, P. et al. Fungicidal activity of compounds extracted from the pericarp of *Areca catechu* against *Colletotrichum gloeosporioides in vitro* and in mango fruit. **Postharvest Biology and Technology**. v. 55, p. 129–132, 2010.

YIN, M-C. Anti-glycative potential of triterpenes: A mini-review. **BioMedicine**, v. 2, p. 2–9, 2012.

YIP, M.F. CaMKII-mediated phosphorylation of the myosin motor Myo1c is required for insulin-stimulated GLUT4 translocation in adipocytes. **Cell Metab**, v. 8, p. 384-98, 2008.

YOON, J.W., JUN, H.S. Autoimmune destruction of pancreatic beta cells. **Am J Ther**, v. 12, p. 580-91, 2005.

ZANATTA, L. et al., Insulinomimetic Effect of Kaempferol 3-Neohesperidoside on the Rat Soleus Muscle. **Journal of Natural Products**. v. 71, p. 532–535, 2008.

ZANATTA, L. et al. Effect of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 in plasma membrane targets in immature rat testis: ionic channels and gamma-glutamyl transpeptidase activity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 515, p. 46-53, 2011.

ZANATTA, A.P. et al. Integrin participates in the effect of thyroxine on plasma membrane in immature rat testis. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1830, p. 2629-2637, 2013.

ZHAO, F-Q., KEATING, A.F. Functional Properties and Genomics of Glucose Transporters. **Curr Genomics**, v. 8, p. 113–128, 2007.

ANEXO A – Artigos publicados

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 48 (2014) 18–27



Contents lists available at ScienceDirect

The International Journal of Biochemistry
& Cell Biologyjournal homepage: www.elsevier.com/locate/biocielBetulinic acid and 1,25(OH)₂ vitamin D₃ share intracellular signal transduction in glucose homeostasis in soleus muscle

Allisson Jhonatan Gomes Castro^a, Marisa Jádna Silva Frederico^a, Luisa Helena Cazarolli^b, Lizandra Czermainski Bretanha^c, Luciana de Carvalho Tavares^c, Ziliani da Silva Buss^d, Márcio Ferreira Dutra^e, Ariane Zamoner Pacheco de Souza^a, Moacir Geraldo Pizzolatti^c, Fátima Regina Mena Barreto Silva^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

^b Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Universitário Laranjeiras do Sul, Laranjeiras do Sul, PR, Brazil

^c Departamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

^d Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

^e Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 March 2013

Received in revised form 6 November 2013

Accepted 26 November 2013

Available online 5 December 2013

Keywords:

Terpenes

Rosmarinus officinalis

Glycemia

GLUT4

1,25-D₃

ABSTRACT

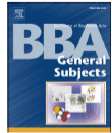
The effect of betulinic acid on glycemia and its mechanism of action compared with 1,25(OH)₂ vitamin D₃ in rat muscle were investigated. Betulinic acid improved glycemia, induced insulin secretion and increased the glycogen content and glucose uptake in muscle tissue. Additionally, the integrity of both PI3K and the cytoskeleton is necessary for the stimulatory action of betulinic acid in glucose uptake. The genomic effect was apparent, since cycloheximide and PD98059 nullified the stimulatory effect of betulinic acid on glucose uptake. Therefore, although this compound did not modify the DNA transcription, the protein translation was significantly improved. Also, betulinic acid increased the GLUT4 immunocontent and its translocation was corroborated by GLUT4 localization at the plasma membrane (after 180 min). On the other hand, the effect of 1,25(OH)₂ vitamin D₃ on glucose uptake is not mediated by PI3K and microtubule activity. In contrast, the nuclear activity of 1,25(OH)₂ vitamin D₃ is necessary to trigger glucose uptake. In addition, the increased DNA transcription and GLUT4 immunocontent provide evidence of a mechanism by which 1,25(OH)₂ vitamin D₃ contributes to glycemia. In conclusion, betulinic acid acts as an insulin secretagogue and insulinomimetic agent via PI3K, MAPK and mRNA translation and partially shares the genomic pathway with 1,25(OH)₂ vitamin D₃ to upregulate the GLUT4. In summary, betulinic acid regulates glycemia through classical insulin signaling by stimulating GLUT4 synthesis and translocation. In addition, it does not cause hypercalcemia, which is highly significant from the drug discovery perspective.

© 2014 Published by Elsevier Ltd.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbagen

The mechanism of action of ursolic acid as insulin secretagogue and insulinomimetic is mediated by cross-talk between calcium and kinases to regulate glucose balance



Allisson Jhonatan Gomes Castro^a, Marisa Jádna Silva Frederico^a, Luisa Helena Cazarolli^b, Camila Pires Mendes^a, Lizandra Czermainski Bretanha^c, Éder Carlos Schmidt^d, Zenilda Laurita Bouzon^d, Veronica Aiceles de Medeiros Pinto^e, Cristiane da Fonte Ramos^e, Moacir Geraldo Pizzolatti^c, Fátima Regina Mena Barreto Silva^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

^b Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Universitário Laranjeiras do Sul, Laranjeiras do Sul, PR, Brazil

^c Departamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

^d Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

^e Departamento de Anatomia, Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 May 2014

Received in revised form 23 September 2014

Accepted 3 October 2014

Available online 13 October 2014

Keywords:

Calcium
Secretagogue
GLUT4
Hyperglycemia
Insulin
Triterpene

ABSTRACT

Background: The effect of *in vivo* treatment with ursolic acid (UA) on glycemia in hyperglycemic rats and its mechanism of action on muscle were studied.

Methods: The UA effects on glycemia, glycogen, LDH, calcium and on insulin levels were evaluated after glucose tolerance curve. The β -cells were evaluated through the transmission electron microscopy. UA mechanism of action was studied on muscles through the glucose uptake with/without specific insulin signaling inhibitors. The nuclear effect of UA and the GLUT4 expression on muscle were studied using thymidine, GLUT4 immunocent, immunofluorescence and RT-PCR.

Results: UA presented a potent antihyperglycemic effect, increased insulin vesicle translocation, insulin secretion and augmented glycogen content. Also, UA stimulates the glucose uptake through the involvement of the classical insulin signaling related to the GLUT4 translocation to the plasma membrane as well as the GLUT4 synthesis. These were characterized by increasing the GLUT4 mRNA expression, the activation of DNA transcription, the expression of GLUT4 and its presence at plasma membrane. Also, the modulation of calcium, phospholipase C, protein kinase C and PKCaM II is mandatory for the full stimulatory effect of UA on glucose uptake. UA did not change the serum LDH and serum calcium balance.

Conclusions: The antihyperglycemic role of UA is mediated through insulin secretion and insulinomimetic effect on glucose uptake, synthesis and translocation of GLUT4 by a mechanism of cross-talk between calcium and protein kinases.

General significance: UA is a potential anti-diabetic agent with pharmacological properties for insulin resistance and diabetes therapy.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

ANEXO B – Artigos aceitos para publicação

Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 150 (2015) 112–122



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jsmb

Acute effect of 3 β -hidroxihop-22(29)ene on insulin secretion is mediated by GLP-1, potassium and calcium channels for the glucose homeostasis



Allisson Jhonatan Gomes Castro^a, Luisa Helena Cazarolli^b,
Francieli Kanumfre de Carvalho^c, Gabrielle da Luz^a, Delsi Altenhofen^a,
Adair Roberto Soares dos Santos^d, Moacir Geraldo Pizzolatti^c,
Fátima Regina Mena Barreto Silva^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Bairro Trindade, Cx. Postal 5069, CEP 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

^b Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Universitário Laranjeiras do Sul, Laranjeiras do Sul, PR, Brazil

^c Departamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Bairro Trindade, Florianópolis, SC, Brazil

^d Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Campus Universitário, Bairro Trindade, Florianópolis, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 November 2014

Received in revised form 5 March 2015

Accepted 17 March 2015

Available online 2 April 2015

Keywords:

Triterpenes
Glycaemia
Insulin
Pancreas
Calcium
Potassium

ABSTRACT

The effect of 3 β -hidroxihop-22(29)ene (3-BHO) on insulin and glucagon-like peptide 1 (GLP-1) secretion as well as the mechanism of action of the compound in pancreatic islet on glucose homeostasis was investigated. The data from *in vivo* treatment show that 3-BHO significantly reduces the hyperglycemia by increasing the insulin and GLP-1 secretion, as well as by accumulating hepatic glycogen in hyperglycemic rats. In rat pancreatic β -cell, 3-BHO stimulates the glucose uptake, insulin vesicles translocation to the plasma membrane and thus the insulin secretion through the involvement of potassium channels (ATP- and Ca²⁺-dependent K⁺ channels) and calcium channels (L-type voltage-dependent calcium channels (L-VDCC)). Furthermore, this study also provides evidence for a crosstalk between intracellular high calcium concentration, PKA and PKC in the signal transduction of 3-BHO to stimulate insulin secretion. In conclusion, 3-BHO diminishes glycaemia, stimulates GLP-1 secretion and potentiates insulin secretion and increase hepatic glycogen content. Moreover, this triterpene modulates calcium influx characterizing ATP-K⁺, Ca²⁺-K⁺ and L-VDCC channels-dependent pathways as well as PKA and PKC activity in pancreatic islets underlying the signaling of 3-BHO for the secretory activity and contribution on glucose homeostasis.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

ANEXO C – Artigos publicados como co-autor em trabalhos relacionados ao tema em estudo



Original Communication

Antidiabetic effects of sulfonamide derivatives based on structural fragment of sulfonylureas

Marisa Jádna Silva Frederico¹, Alessandra Mascarello², Allisson Jhonatan Gomes Castro¹, Camila Pires Mendes¹, Virgínia Demarchi Kappel¹, Luisa Helena Cazarolli³, Ziliani da Silva Buss⁴, Taisa Regina Stumpf², Rosendo Augusto Yunes², Ricardo José Nunes² and Fátima Regina Mena Barreto Silva^{1,*}

¹Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Campus Universitário, Bairro Trindade, Cx. Postal 5069, CEP: 88040-970, Florianópolis, SC,

²Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Campus Universitário, Bairro Trindade, CEP: 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil,

³Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Universitário Laranjeiras do Sul, Bairro Vila Alberti, CEP 85303-775, Laranjeiras do Sul, PR, Brazil, ⁴Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, Campus Universitário, Bairro Trindade, CEP: 88040-970, Florianópolis, SC, Brazil



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>

Original article

Novel sulfonyl(thio)urea derivatives act efficiently both as insulin secretagogues and as insulinomimetic compounds



Alessandra Mascarello ^a, Marisa Jádna Silva Frederico ^b, Alisson Jhonathan Gomes Castro ^b, Camila P. Mendes ^b, Márcio Ferreira Dutra ^c, Viviane Mara Woehl ^d, Rosendo Augusto Yunes ^a, Fátima Regina Mena Barreto Silva ^{b,*}, Ricardo José Nunes ^{a,**}

^a Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Campus Trindade, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

^b Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Campus Trindade, Cx. Postal 5069, 88040-970 Florianópolis, SC, Brazil

^c Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Centro de Ciências Biológicas, Campus Trindade, 88040-970 Florianópolis, SC, Brazil

^d Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Ciências Morfológicas, Centro de Ciências Biológicas, Campus Trindade, Cx. Postal 5069, 88040-970 Florianópolis, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 February 2014

Received in revised form

2 September 2014

Accepted 3 September 2014

Available online 6 September 2014

Keywords:

Sulfonylthioureas

Diabetes

Glibenclamide

Insulinomimetic

ABSTRACT

Glibenclamide is widely used in the management of non-insulin dependent diabetes mellitus, but numerous risks limit its use in therapy. In the search for novel structures that are safer and more efficient than glibenclamide, we obtained new chemical analogs based on bioisosterism, through the treatment of benzenesulfonamide derivatives with isothiocyanates and isocyanates, affording (thio)ureas with good yield. We also verified the hypoglycemic activity, through an *in vivo* approach. Most of these synthesized compounds improved glucose tolerance, and the mechanism of action of the best compound (7) suggests that its effect is mediated by insulin secretion, while its hypoglycemic action is triggered by glucose uptake involving GLUT4 expression and translocation through PI-3K and PKA activity and active *de novo* protein synthesis in skeletal muscle. Taking all these factors together, sulfonylthiourea 7 acts as an insulin secretagogue and insulinomimetic agent on glucose homeostasis, and does not exhibit toxicity in acute treatment.

© 2014 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Acylhydrazones Contribute to Serum Glucose Homeostasis Through Dual Physiological Targets

Marisa Jádna Silva Frederico¹, Allisson Jhonatan Gomes Castro¹, Alessandra Mascarello², Camila Pires Mendes¹, Virgínia Dermachi Kappel¹, Taisa Regina Stumpf², Paulo Cesar Leal², Ricardo José Nunes², Rosendo Augusto Yunes² and Fátima Regina Mena Barreto Silva^{1,*}

¹Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Campus Universitário, Bairro Trindade, Cx. Postal 5069, CEP: 88040-970, Florianópolis, SC, Brazil; ²Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Campus Universitário, Bairro Trindade, CEP: 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

Abstract: In this study the *in vivo* and *in vitro* antidiabetic effects of four acylhydrazone derivatives were investigated in rats. The secretagogue action, oral glucose tolerance, insulinogenic index and mechanism of action of these acylhydrazones in relation to calcium uptake in pancreatic islets were studied. Also, the insulinomimetic effect on glycemia in diabetic rats was verified. Of the acylhydrazones studied, **1** and **4** were able to increase glucose tolerance in an acute time-course. A powerful secretagogue effect was exhibited by **1** and glibenclamide with an insulinogenic index around 3.9 and 1.3-fold higher than that of the hyperglycemic group, respectively. Moreover, an acute and dose-dependent effect of glibenclamide and **1** on calcium uptake in pancreatic islets was observed. The rapid stimulatory effect of **1** on calcium uptake seems to be mediated, at least in part, by ATP-dependent K⁺ channels (K⁺-ATP) since the stimulatory effect of **1** was similar to that observed for glibenclamide but was not potentiated by sulphonylurea. Furthermore, both extracellular and calcium from stocks mediate the signal transduction of stimulatory effect of **1** on calcium uptake which may contribute to insulin secretion. In addition, the insulinomimetic effect of **1** was evidenced through the level of serum glucose lowering in alloxan-induced diabetic rats. Also, **1** induced a significant increase in glycogen content *in vivo* and glucose uptake in soleus muscle *in vitro*. The results of this study indicate dual physiological targets for the acylhydrazone **1**, i.e., pancreatic islets and skeletal muscle, as a result of insulin secretagogue and insulinomimetic action.

Keywords: Acylhydrazones, calcium, insulinomimetic, glucose, glycemia, pancreas, secretagogue, skeletal muscle.

ANEXO D – Capitulo de livro publicado

Silva, F.R.M.B.; Frederico, M.J.S.; **Castro, A.J.G.** ; Luz, G. ; Altenhofen, D.; Cazarolli, L.H. **Glucose Uptake: Knowledge from *In Vivo, In Situ* and *in vitro* Studies and Health Implications.** In: Carter C. Johnson; Davis B. Williams. (Org.). **Glucose Uptake: Regulation, Signaling Pathways and Health Implications.** 1ed. New York: NOVA SCIENCE PUBLISHERS, INC, v. 1, p. 1-44, 2013.

