



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

ANNA KAROLINE DA SILVA CHAGAS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ESCULETINA SOBRE A CAPTAÇÃO DE GLICOSE
EM MIÓCITOS L6 INDUZIDOS À RESISTÊNCIA INSULÍNICA POR TNF- α**

Recife
2025

ANNA KAROLINE DA SILVA CHAGAS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ESCULETINA SOBRE A CAPTAÇÃO DE GLICOSE
EM MIÓCITOS L6 INDUZIDOS À RESISTÊNCIA INSULÍNICA POR TNF- α**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Farmácia da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial para
obtenção do título de bacharel em
Farmácia.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Maria Bernadete de Sousa Maia

Coorientador (a): MSc. Wyndly Daniel Cardoso Gaião

Recife

2025

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Chagas, Anna Karoline da Silva.

Avaliação do efeito da esculetina sobre a captação de glicose em miócitos L6 induzidos à resistência insulínica por TNF-alfa / Anna Karoline da Silva Chagas. - Recife, 2025.

47 p. : il.

Orientador(a): Maria Bernadete de Sousa Maia

Coorientador(a): Wyndly Daniel Cardoso Gaião

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Farmácia - Bacharelado, 2025.

Inclui referências, apêndices, anexos.

1. Esculetina. 2. Compostos cumarínicos. 3. Resistência insulínica. 4. Diabetes mellitus. 5. Miócitos. 6. TNF-alfa. I. Maia, Maria Bernadete de Sousa . (Orientação). II. Gaião, Wyndly Daniel Cardoso . (Coorientação). IV. Título.

610 CDD (22.ed.)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA



Aprovada em: 26 / 02 / 2025_____.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
gov.br MARIA BERNADETE DE SOUSA MAIA
Data: 17/03/2025 14:11:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Maria Bernadete de Sousa Maia
(Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Documento assinado digitalmente
gov.br MARINA MARIA BARBOSA DE OLIVEIRA
Data: 11/03/2025 11:59:49-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Ma. Marina Maria Barbosa de Oliveira
(Presidente e Examinadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Documento assinado digitalmente
gov.br ERYVELTON DE SOUZA FRANCO
Data: 14/03/2025 03:24:23-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Eryvelton de Souza Franco
(Examinador)
Universidade Federal de Pernambuco

Ma. Vera Kaissa Souza Santos Bacelar
(Suplente)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho à minha querida avó, Ana Maria, cuja sabedoria e amor moldaram quem sou. Mesmo ausente fisicamente, sua presença vive em mim, guiando meus passos. Que esta conquista seja reflexo dos valores que me ensinou e da luz que sempre irradiou.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, expresso minha mais profunda gratidão a **Deus** e à **Nossa Senhora**, por me concederem a força, a sabedoria e a fé necessárias para percorrer esta jornada. Foi a luz e a orientação divinas que me sustentaram e guiaram, permitindo que eu superasse cada desafio e chegasse à conclusão deste trabalho. Sou imensamente grata por essa bênção e inspiração que me acompanharam em cada etapa.

À minha **família**, meu alicerce e maior fonte de força e inspiração, agradeço por me ensinarem a correr atrás dos meus sonhos com integridade, respeito ao próximo e honestidade. Em especial, à minha mãe, **Sandra Maria**, ao meu avô, **José Raimundo**, à minha tia, **Simoni Maria**, e ao meu irmão, **José Eduardo**, por todo o amor, dedicação e sacrifício que tornaram possível a realização deste trabalho. Seu amor incondicional, palavras de incentivo, paciência e presença constante foram fundamentais para que eu superasse os momentos difíceis e seguisse em frente. Esta conquista é nossa, e espero, um dia, retribuir todo o apoio que recebi.

Aos **integrantes do Laboratório de Farmacologia de Produtos Bioativos (LFPB)**, minha gratidão pela colaboração, direta ou indireta, que foi essencial para minha trajetória. Um agradecimento especial à **professora Maria Bernadete**, por abrir as portas da pesquisa para mim e por sempre incentivar meu crescimento acadêmico e profissional. Também sou imensamente grata a **Eryvelton Franco**, cujo conhecimento e orientações contribuíram significativamente para minha evolução como profissional.

Ao meu **co-orientador e amigo, Wyndly Daniel**, que me acompanhou de perto durante todos os anos de pesquisa na graduação, compartilhando conhecimentos, experiências e apoio inestimável. Sem sua orientação e dedicação, eu não teria conseguido passar por essa etapa. Sou imensamente grata por sua paciência, incentivo e por acreditar no meu potencial, mesmo nos momentos em que eu mesma duvidei. À **Kaissa Souza**, minha primeira **preceptora e amiga** que permaneceu ao meu lado com amor e lealdade durante toda essa trajetória. Sou profundamente grata por sua amizade e por tudo que fez para me ajudar a chegar até aqui.

Aos **membros do Laboratório de Biofísica de Membranas e Células-Tronco Dr. Oleg Krasilnikov (LBM-CT)**, agradeço pela parceria, disponibilidade de recursos e suporte técnico durante a realização dos experimentos. A colaboração de todos foi fundamental para o desenvolvimento desta pesquisa.

À **Laerte Souza**, minha sincera gratidão pela parceria que construímos desde o início desta jornada. Sua amizade, colaboração e apoio tornaram essa caminhada mais leve e significativa. Obrigada por estar ao meu lado nos momentos desafiadores e por compartilhar das conquistas. Agradeço também ao **Hugo Gomes**, por compartilhar comigo a jornada da iniciação científica. Seu apoio e dedicação foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho e para o meu crescimento durante essa trajetória.

Aos meus **amigos**, que transformaram momentos de felicidade em memórias inesquecíveis e, principalmente, que estiveram ao meu lado nos momentos de maior vulnerabilidade. Vocês me mostraram que a amizade verdadeira vai além das risadas e das comemorações; é no colo das dificuldades que se constrói uma família. E foi assim que nos tornamos uma: com amor, apoio incondicional e lealdade que nunca faltou. À **Brena Marla, Deiwson Mendonça, Dhebora Barcelos e Gabriel Alexandre**, minha eterna gratidão. À **Laryssa Nascimento, Henrique Araújo e José Luiz**, agradeço por todo o carinho e pelo apoio constante. Vocês estiveram presentes nos detalhes que fizeram toda a diferença ao longo desta jornada. Sua presença foi fundamental, especialmente nos momentos mais desafiadores.

Aos meus **colegas de turma**, que, direta ou indiretamente, contribuíram para que eu chegasse até aqui, e aos meus **professores**, por cada ensinamento e por serem referências inspiradoras em minha trajetória acadêmica. Cada um de vocês foi parte essencial desta jornada, e sou imensamente grata pelo apoio, colaboração e conhecimento que compartilharam, tornando esta conquista possível.

Por fim, ao meu **namorado, Luiz Guilherme**, por estar ao meu lado com seu amor, apoio, paciência e incentivo, que foram essenciais nos momentos em que o cansaço e a insegurança tentaram me desanimar. Obrigada por me lembrar, sempre que duvidei, da minha força e capacidade. Seu abraço foi refúgio, suas palavras, conforto, e sua presença tornou essa caminhada mais leve e infinitamente mais especial.

RESUMO

O diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) é uma doença metabólica de alta prevalência, caracterizada por resistência insulínica associada a complicações graves, como doenças cardiovasculares e neuropatias, além de representar um importante custo para o sistema de saúde. A busca por terapias inovadoras e eficazes é essencial, especialmente diante das limitações dos tratamentos convencionais. A esculetina, um composto cumarínico com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, apresenta potencial terapêutico promissor ao atuar nos mecanismos moleculares envolvidos na resistência insulínica. Este estudo teve como objetivo avaliar a capacidade da esculetina em restaurar a captação de glicose em miócitos L6 com resistência insulínica induzida por TNF- α , além de investigar sua citotoxicidade. O estudo utilizou cultivos de miócitos L6 diferenciados, que foram expostos ao TNF- α para induzir resistência insulínica. A citotoxicidade da esculetina foi avaliada pelo ensaio colorimétrico de MTT, enquanto a captação de glicose foi quantificada por meio do marcador fluorescente 2-NBDG. Os resultados demonstraram que a esculetina não apresentou efeitos citotóxicos nas concentrações testadas e promoveu um aumento significativo na captação de glicose em células resistentes à insulina, especialmente nas concentrações de 75 e 100 μ M. Esses dados sugerem que a esculetina modula as vias relacionadas ao processo inflamatório que repercutem sobre o estresse oxidativo. Diante do exposto, propõe-se que a esculetina é um composto promissor para o manejo do DM2, com potencial para melhorar o metabolismo glicêmico e prevenir complicações metabólicas. Embora os resultados com a esculetina sejam encorajadores, são necessários estudos adicionais *in vivo* e, posteriormente, ensaios clínicos para viabilizar sua aprovação para uso terapêutico em humanos, vinculada à apresentação de uma inovação terapêutica economicamente viável.

Palavras-chave: Esculetina; diabetes mellitus; mioblastos L6.

ABSTRACT

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a highly prevalent metabolic disease characterized by insulin resistance associated with serious complications such as cardiovascular diseases and neuropathies, besides representing a significant cost to the healthcare system. The search for innovative and effective therapies is essential, especially given the limitations of conventional treatments. Esculetin, a coumarin compound with antioxidant and anti-inflammatory properties, shows promising therapeutic potential by targeting molecular mechanisms involved in insulin resistance. This study aimed to evaluate esculetin's ability to restore glucose uptake in TNF- α -induced insulin-resistant L6 myocytes and investigate its cytotoxicity. Differentiated L6 myocyte cultures exposed to TNF- α were used to induce insulin resistance. Esculetin cytotoxicity was assessed using the MTT colorimetric assay, while glucose uptake was quantified using the fluorescent marker 2-NBDG. Results demonstrated that esculetin had no cytotoxic effects at tested concentrations and significantly increased glucose uptake in insulin-resistant cells, especially at 75 and 100 μ M concentrations. These findings suggest that esculetin modulates pathways related to inflammation impacting oxidative stress. In conclusion, esculetin is proposed as a promising compound for managing T2DM, with potential to improve glycemic metabolism and prevent metabolic complications. While these results are encouraging, further in vivo studies and subsequent clinical trials are necessary to facilitate its approval for therapeutic use in humans, linked to the presentation of economically viable therapeutic innovation.

Keywords: Esculetin; diabetes mellitus; L6 myoblasts.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2	20
Figura 2 –	Mecanismo da resistência insulínica induzida por TNF- α	21
Figura 3 –	Cumarina	23
Figura 4 –	Esculetina	25
Figura 5 –	Fotomicrografia dos mioblastos e miócitos L6	32
Figura 6 –	Percentual de viabilidade celular em miócitos L6 expostos à esculetina (5, 10, 25, 50, 75, 100 μ M)	34
Figura 7 -	Percentual de captação do marcador fluorescente 2-NBDG pelos miócitos com resistência insulínica expostos à esculetina (5, 10, 25, 50, 75, 100 μ M)	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPK	Proteína Quinase Ativada por AMP
ANOVA	Análise de Variância
CB	Azul de Coomassie
DCNT	Doenças Crônicas Não Transmissíveis
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DM1	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DMEM	Meio Eagle Modificado de Dulbecco
DMG	Diabetes <i>mellitus</i> Gestacional
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOC2B	Proteína contendo dois domínios tipo C2 beta
ERK1/2	Proteína Quinase Regulada por Sinal Extracelular
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ESC	Esculetina
GLUT4	Transportador de Glicose 4
HE	Hematoxilina e Eosina
HO-1	Heme Oxigenase-1
IDF	International Diabetes Federation
IKK β	Inibidor da Quinase do Fator kappa beta
IMC	Índice de Massa Corporal

IRS-1	Substrato do Receptor de Insulina 1
JNK	c-Jun N-terminal Quinase
KLF3	Fator de transcrição tipo Krüppel 3
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MCRI	Miócitos com Resistência Insulínica expostos à insulina
MEF2A	Fator de Potencialização de Miócitos 2A
Mito-Esc	Esculetina Mitocondrial
MSRI	Miócitos sem Resistência Insulínica expostos à insulina
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
Nrf2	Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2
PI3K	Fosfatidilinositol-3 quinase
PKC	Proteína quinase C
PIMT	Proteína-L-isoaspartato O-metiltransferase
RI	Resistência insulínica
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SFB	Soro fetal bovino
SIRT1	Sirtuína 1
sTNF- α	Fator de necrose tumoral alfa solúvel
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TNFR1	Receptor 1 do fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Objetivos.....	14
1.1.1 Geral.....	14
1.1.2 Específicos.....	14
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
2.1 Diabetes <i>mellitus</i>	15
2.2 Resistência Insulínica e Diabetes <i>mellitus</i> Tipo 2.....	17
2.3 Compostos cumarínicos.....	21
2.4 Esculetina.....	22
2.5 Relevância dos estudos em miócitos L6.....	24
3 METODOLOGIA.....	26
3.1 Obtenção da esculetina.....	26
3.2 Determinação da captação de glicose pelos miócitos.....	26
3.2.1 Cultura e diferenciação das células L6 (mioblastos).....	26
3.2.2 Citotoxicidade.....	27
3.2.3 Modelo de resistência insulínica in vitro.....	27
3.3 Análise estatística.....	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1 Avaliação da morfologia dos mioblastos após diferenciação.....	30
4.2 Avaliação da citotoxicidade da esculetina em miócitos.....	31
4.3 Avaliação da captação de glicose em miócitos L6 com resistência insulínica induzida por TNF- α	33
5 CONCLUSÕES.....	37
REFERÊNCIAS.....	38

1 INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é uma das doenças crônicas mais prevalentes no mundo, afetando aproximadamente 537 milhões de adultos em 2021, com projeções de atingir 700 milhões até 2045 (IDF, 2021). Essa condição metabólica, caracterizada pela resistência à insulina (RI), está associada a complicações graves, como doenças cardiovasculares, neuropatias, retinopatias e esteatose hepática, que impactam significativamente a qualidade de vida dos pacientes e representam um fardo econômico considerável para os sistemas de saúde. Estima-se que os custos globais com o DM2 ultrapassem US\$ 490 bilhões até 2030 (He *et al.*, 2024; Młynarska *et al.*, 2025), destacando a necessidade de terapias inovadoras e eficazes.

A resistência à insulina desempenha um papel central no desenvolvimento e na fisiopatologia do DM2. Em indivíduos saudáveis, o músculo esquelético é responsável por 75-80% da absorção de glicose durante a hiperinsulinemia, enquanto os tecidos adiposo e hepático contribuem de forma menos significativa (Honka *et al.*, 2018). Uma resposta inadequada à insulina nesses tecidos geralmente precede o surgimento da RI sistêmica, levando progressivamente ao DM2. Esse processo resulta no aumento da produção hepática de glicose e na redução da captação de glicose pelo músculo, fígado e tecido adiposo (Galicia-Garcia *et al.*, 2020).

No músculo esquelético, a RI é reconhecida como um dos principais fatores extra-pancreáticos envolvidos no desenvolvimento do DM2. Em condições fisiológicas normais, a insulina desempenha um papel crucial ao estimular a síntese de glicogênio e promover a captação de glicose plasmática pelas células. No entanto, alterações genéticas, como mutações que reduzem a expressão do receptor de insulina ou do transportador de glicose GLUT4, bem como defeitos nas vias de sinalização intracelulares, podem prejudicar significativamente a capacidade de absorção de glicose pelo tecido muscular. Esse comprometimento leva ao acúmulo de glicose no sangue, resultando em hiperglicemia, uma característica central do DM2 (Galicia-Garcia *et al.*, 2020).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) está intimamente associado à resistência à insulina. O TNF- α compromete a sinalização insulínica ao reduzir a expressão da proteína IRS-1, um componente chave dessa via, e interferir na

síntese de transportadores de glicose dependentes de insulina. Além disso, o TNF- α ativa proteínas quinases inflamatórias, intensificando os prejuízos à sinalização da insulina. A RI mediada pelo TNF- α envolve a ativação de reguladores negativos e vias inflamatórias, consolidando seu papel no desenvolvimento do DM2 (Li *et al.*, 2017; Alipourfard *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2022)..

Nesse contexto, os compostos cumarínicos têm ganhado destaque devido ao seu potencial terapêutico e benefícios à saúde humana (Prabakaran *et al.*, 2013). A esculetina (6,7-dihidroxicumarina), uma cumarina presente em plantas como *Artemisia scoparia* e *Citrus limonia*, tem sido investigada por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antidiabéticas. Estudos em modelos animais demonstram que a esculetina estimula a secreção de insulina, melhora a tolerância à glicose e protege células endoteliais do estresse oxidativo causado pela hiperglicemia, prevenindo complicações vasculares do DM2 (Ojo *et al.*, 2015; Ansari *et al.*, 2022). Além disso, sua capacidade de modular vias bioquímicas complexas, como a sinalização da insulina e a redução da inflamação, reforça seu potencial como alternativa terapêutica no manejo do DM2 (Niisato *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2022).

As terapias baseadas na esculetina também apresentam um impacto econômico relevante. Ao reduzir os custos associados ao tratamento do DM2 e suas complicações, como doenças cardiovasculares e neuropatias, a esculetina pode contribuir para a sustentabilidade dos sistemas de saúde. Com projeções de que os gastos globais com diabetes ultrapassem US\$ 490 bilhões até 2030 (IDF, 2011), intervenções precoces e eficazes, como a esculetina, têm o potencial de mitigar esse aumento, reduzindo a necessidade de tratamentos dispendiosos e hospitalizações frequentes. Dessa forma, a esculetina surge não apenas como uma alternativa terapêutica promissora, mas também como uma estratégia para aliviar o fardo financeiro imposto pelo DM2 aos sistemas de saúde (Keckley, 2018).

Diante desse cenário, este estudo justifica-se pela necessidade de explorar alternativas terapêuticas inovadoras e seguras para o manejo do DM2, com destaque para a esculetina, um composto natural com propriedades antidiabéticas promissoras. A esculetina tem demonstrado potencial para modular a captação de glicose e reduzir complicações associadas à resistência insulínica, tornando-se um candidato relevante para investigação. Utilizando miócitos L6 como modelo celular, o trabalho busca avaliar não apenas a eficácia da esculetina na melhoria da captação

de glicose, mas também sua segurança, por meio da análise de citotoxicidade. Esses dados são fundamentais para compreender o perfil terapêutico da esculetina e abrir caminho para futuras pesquisas que possam consolidar seu uso no tratamento do DM2 e suas complicações.

1.1 Objetivos

1.1.1 Geral

Avaliar o efeito da esculetina sobre a captação de glicose em miócitos L6 induzidos à resistência insulínica.

1.1.2 Específicos

- Avaliar a citotoxicidade da esculetina em miócitos;
- Avaliar a morfologia dos mioblastos após diferenciação;
- Induzir resistência insulínica por meio do TNF-alfa em miócitos;
- Determinar o efeito da esculetina sobre a captação de glicose em miócitos com resistência insulínica.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Diabetes *mellitus*

O diabetes *mellitus* (DM) integra um conjunto de enfermidades metabólicas caracterizadas por hiperglicemia crônica, resultante de falhas na secreção de insulina, na ação da insulina ou em ambos os processos (Naveed, 2022). Distúrbios metabólicos em carboidratos, lipídios e proteínas evidenciam a importância da insulina como um hormônio anabólico (Komalasari; Arif Pristianto, 2023). A reduzida produção de insulina para atingir uma resposta adequada e/ou a resistência à insulina nos tecidos-alvo, principalmente nos músculos esqueléticos, tecido adiposo e, em menor medida, no fígado, ao nível dos receptores de insulina, são fatores determinantes dessas anomalias metabólicas (Liao *et al.*, 2023).

No que se refere à epidemiologia, o DM tornou-se uma condição de saúde globalmente reconhecida, com sua prevalência aumentando de forma consistente em todos os países, independentemente do nível de desenvolvimento econômico (Lovic *et al.*, 2023). No entanto, de maneira alarmante, cerca de 50% das pessoas com diabetes desconhecem seu diagnóstico (Lenters-Westra; English, 2018). Segundo o *IDF Diabetes Atlas (2021)*, a prevalência global de diabetes foi estimada em 537 milhões de indivíduos em 2021, com projeções de aumento para 643 milhões até 2030 e 783 milhões até 2045. No Brasil, dados recentes indicam que 12,2 milhões de pessoas, o equivalente a aproximadamente 7% da população, são afetadas pela doença (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2023).

Quanto ao diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1), trata-se de uma doença autoimune caracterizada pela destruição das células β pancreáticas, levando à deficiência absoluta de insulina. Representa cerca de 5 a 10% dos casos de diabetes, sendo mais comum em crianças e adolescentes (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2023). Sua patogênese envolve uma resposta imunológica inadequada contra as células das ilhotas pancreáticas, embora os mecanismos exatos ainda não estejam completamente elucidados (Burrack; Martinov; Fife, 2017). Clinicamente, manifesta-se por sintomas clássicos como polidipsia, poliúria, polifagia e perda de peso acentuada, podendo evoluir para cetoacidose diabética, uma complicação aguda grave (Kharroubi; Darwish, 2015).

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é a forma mais prevalente da doença, correspondendo a mais de 90% dos casos de diabetes em todo o mundo. Em 2021, sua prevalência global foi estimada em 10,5%, com projeções de aumento significativo nos próximos anos (*IDF, 2021*). Essa condição está diretamente associada a fatores de risco como obesidade, sedentarismo e envelhecimento, que contribuem para o desenvolvimento e a progressão da doença (*Galicia-Garcia et al., 2020*). Um dos principais mecanismos fisiopatológicos do DM2 é a resistência à insulina, que prejudica a captação de glicose pelos tecidos periféricos, resultando em hiperglicemia crônica (*Shoelson et al., 2006*).

Além disso, o DM2 está frequentemente associado a complicações graves, como doenças cardiovasculares, neuropatias e esteatose hepática, que impactam significativamente a qualidade de vida dos pacientes (*Tsalamandris et al., 2019*). Além dos prejuízos à saúde, a doença também gera um elevado custo socioeconômico, decorrente de tratamentos contínuos, internações hospitalares e perda de produtividade, impondo um peso considerável tanto para os indivíduos quanto para os sistemas de saúde (*Rohm et al., 2022*).

No contexto do diabetes *mellitus* gestacional (DMG), essa condição é caracterizada por hiperglicemia diagnosticada durante a gravidez, com prevalência variando entre 3% e 7% (*Gonçalves et al., 2006*). Os principais fatores de risco incluem obesidade, idade materna avançada e histórico familiar de diabetes (*Galtier, 2010*). Além do DMG, existem formas menos comuns de diabetes, como aquelas relacionadas a defeitos genéticos na função das células β , doenças pancreáticas (por exemplo, pancreatite crônica) e uso de medicamentos específicos, como glicocorticóides (*Sociedade Brasileira de Diabetes, 2023*).

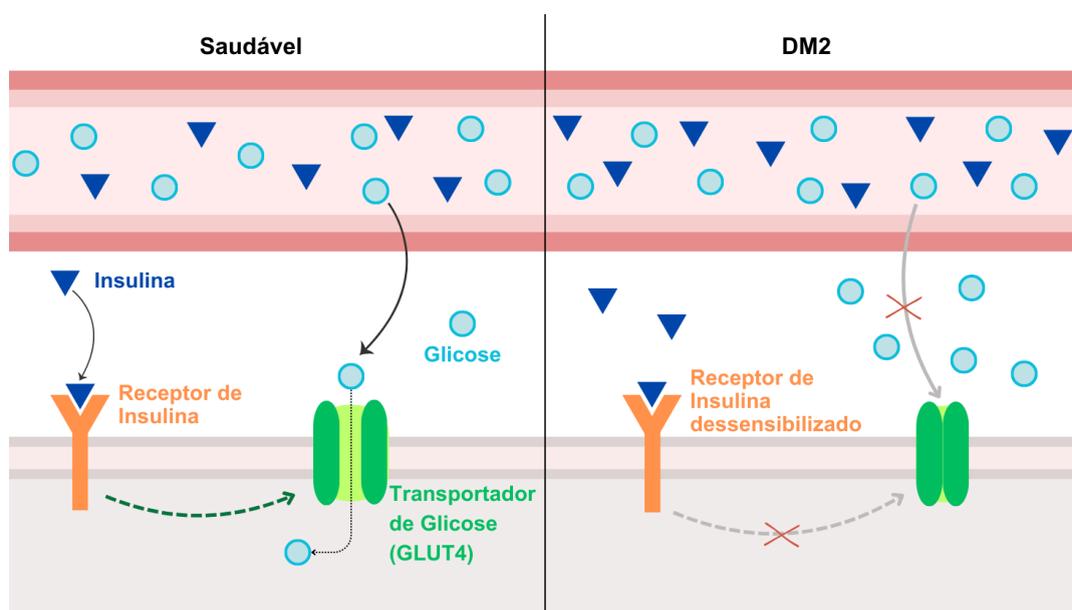
É importante ressaltar que o diagnóstico precoce de todas as formas de diabetes é crucial para prevenir ou retardar complicações como distúrbios microvasculares e macrovasculares, que resultam em retinopatia, nefropatia, neuropatia, doença coronariana, doença cerebrovascular e doença arterial periférica. O diabetes tem sido responsabilizado, entretanto, por contribuir para agravos, direta ou indiretamente, no sistema musculoesquelético, no sistema digestório, na função cognitiva e na saúde mental, além de ser associado a diversos tipos de câncer (*Sociedade Brasileira de Diabetes, 2023*).

2.2 Resistência Insulínica e Diabetes *mellitus* Tipo 2

A resistência à insulina (RI) é uma condição metabólica caracterizada pela redução da sensibilidade dos tecidos-alvo à ação da insulina, mesmo diante de concentrações normais ou elevadas do hormônio. Esse fenômeno compromete a homeostase glicêmica, levando à hiperglicemia crônica e a alterações no metabolismo lipídico, como a hiperlipidemia. A RI está fortemente associada ao aumento do risco de complicações cardiovasculares e de outras desordens metabólicas, ampliando significativamente o impacto clínico e econômico de doenças como o diabetes mellitus tipo 2 (Chandrasekaran; Weiskirchen, 2024; Chaoji, 2023).

Do ponto de vista bioquímico, a RI resulta de múltiplos fatores que comprometem a resposta dos tecidos à insulina. Entre esses fatores, a inflamação crônica e a lipotoxicidade desempenham papéis centrais, promovendo um ambiente de estresse metabólico que prejudica a sinalização da insulina. A ativação de vias pró-inflamatórias, como JNK e NF- κ B, leva à fosforilação de resíduos serina/treonina no IRS-1, reduzindo sua capacidade de transduzir o sinal da insulina. Além disso, a disfunção mitocondrial prejudica a homeostase energética celular, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que exacerbam o estresse oxidativo e a inflamação, agravando ainda mais a resistência insulínica (Krzymien; Ladyzynski, 2024)

A insulina desempenha um papel crucial na regulação da captação de glicose pelos tecidos, especialmente no músculo esquelético, fígado e tecido adiposo. O transportador de glicose GLUT4, altamente expresso em células musculares e adiposas, é um dos mediadores-chave desse processo. Quando a insulina se liga ao seu receptor na superfície celular, ocorre uma cascata de sinalização que promove a translocação do GLUT4 da reserva intracelular para a membrana plasmática, facilitando a captação de glicose pela célula. Contudo, em estados de RI, há uma disfunção dessa via de sinalização, reduzindo significativamente a captação de glicose pelo tecido e exacerbando o quadro hiperglicêmico (Singh et al., 2022). Esse mecanismo é ilustrado na Figura 1, que destaca a fisiopatologia do DM2 e o papel da resistência à insulina.

Figura 1 – Diabetes *mellitus* tipo 2

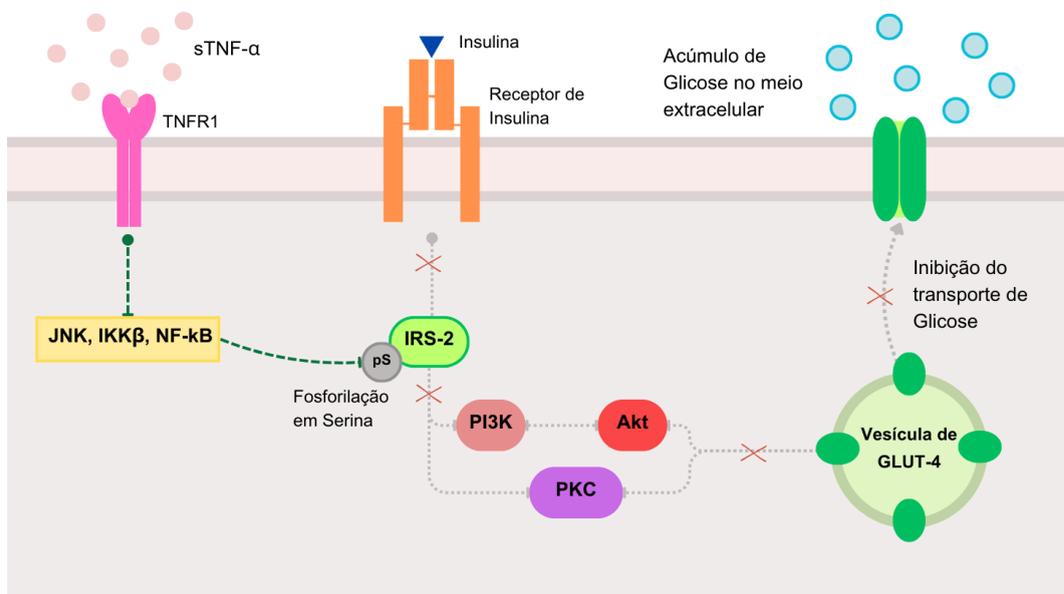
Fonte: A autora (2025). Criado com Canva.com.

A inflamação crônica de baixo grau, comum em indivíduos obesos, é um fator central no desenvolvimento da resistência à insulina. O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), secretado principalmente por adipócitos hipertrofiados e macrófagos, desempenha um papel crucial na disfunção metabólica ao interferir na sinalização da insulina. Esse processo ocorre principalmente pela ativação do receptor do fator de necrose tumoral 1 (TNFR1), que é estimulado pela forma solúvel do TNF- α (sTNF- α), desencadeando vias inflamatórias como Jun N-terminal quinase (JNK), I κ B quinase beta (IKK β) e fator nuclear kappa B (NF- κ B). Como resultado, há a fosforilação do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) em resíduos de serina, em vez de tirosina, o que reduz a eficiência da sinalização da insulina (Hadid; Alassaf; Abed, 2024; Yang *et al.*, 2018). Esse mecanismo é ilustrado na Figura 2, que destaca a atuação do TNF- α na RI.

No tecido muscular, o TNF- α compromete a ação da insulina ao ativar vias pró-inflamatórias que interferem negativamente sobre a translocação dos transportadores de glicose, com isso reduzindo a internalização de glicose na célula (Nandipati; Subramanian; Agrawal, 2017). No fígado, a RI prejudica a supressão da produção de glicose, reduz a síntese de glicogênio e aumenta a lipogênese, contribuindo para a hiperglicemia de jejum e a esteatose hepática. Já no tecido adiposo, ela reduz a capacidade de armazenamento de lipídios, intensificando a

liberação de ácidos graxos livres e agravando a dislipidemia associada ao DM2 (Chandrasekaran; Weiskirchen, 2024; Chaoji, 2023).

Figura 2 – Mecanismo da resistência insulínica induzida por TNF- α



Fonte: A autora (2025). Criado com Canva.com.

O DM2 é uma das principais Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) e representa um desafio global para a saúde pública, dada sua prevalência crescente. De acordo com o IDF Diabetes Atlas, 10^a edição (2021), o DM2 é a forma mais comum da doença, correspondendo a mais de 90% dos casos no mundo. A prevalência global do diabetes (incluindo os tipos 1 e 2) em adultos de 20 a 79 anos foi estimada em 10,5% (537 milhões de pessoas) em 2021, com projeções de aumento para 11,3% em 2030 e 12,2% em 2045. Entre os principais fatores de risco associados ao DM2 estão a obesidade, o sedentarismo, o envelhecimento, o histórico familiar de diabetes e determinantes socioeconômicos, como o acesso limitado à educação e aos serviços de saúde (Galicia-Garcia et al., 2020).

A resistência à insulina constitui um dos mecanismos centrais na fisiopatologia do DM2. Em condições normais, o músculo esquelético é responsável por aproximadamente 75-80% da captação de glicose durante a hiperinsulinemia (Ferrannini *et al.*, 2018). Contudo, em estados de RI, essa captação é substancialmente reduzida, comprometendo a homeostase glicêmica. No fígado, a resistência à insulina prejudica a síntese de glicogênio, falha em suprimir a produção

hepática de glicose e aumenta a lipogênese, promovendo a deposição de gordura hepática.

Paralelamente, a obesidade e os processos inflamatórios crônicos associados desempenham papel fundamental na RI, com a liberação de citocinas e adipocinas pró-inflamatórias que intensificam esse quadro (Tsalamandris *et al.*, 2019). Alterações no metabolismo lipídico também são determinantes na gênese da resistência à insulina, com destaque para o acúmulo de diacilgliceróis intracelulares e o aumento na atividade da proteína quinase C, que comprometem a sinalização insulínica (Kojta; Chacinska; Blachnio-Zabielska, 2020).

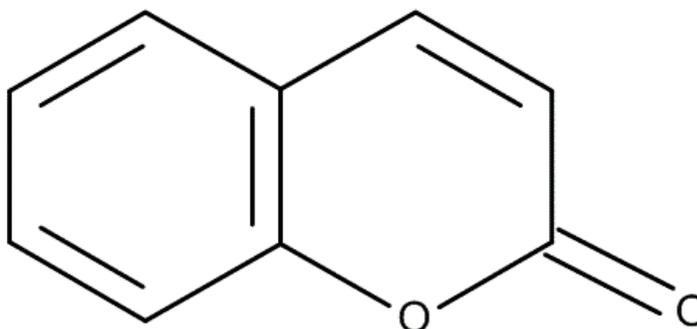
O DM2 está associado a uma ampla variedade de complicações crônicas que afetam significativamente a qualidade de vida dos pacientes e impõem um alto custo ao sistema de saúde. Entre as principais complicações estão as doenças cardiovasculares, como infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral e insuficiência cardíaca, que são a principal causa de mortalidade nesses indivíduos. As neuropatias também são frequentes, levando a dores crônicas, perda de sensibilidade nos membros inferiores e aumento do risco de úlceras e amputações. Ademais, a resistência à insulina contribui para o acúmulo de gordura no fígado, levando à esteatose hepática não alcoólica, que pode evoluir para fibrose e cirrose (Castro *et al.*, 2014; Tsalamandris *et al.*, 2019).

Os custos relacionados ao diabetes mellitus tipo 2 são expressivos e evidenciam o impacto significativo dessa doença na saúde pública e na economia global. Esses custos incluem tanto despesas diretas, como consultas médicas regulares, medicamentos de uso contínuo, exames diagnósticos e internações hospitalares – muitas vezes associadas a complicações graves, como doenças cardiovasculares e insuficiência renal – quanto despesas indiretas, que abrangem perdas significativas de produtividade, absenteísmo, aposentadorias precoces e mortalidade prematura. Esse cenário gera um impacto econômico relevante para indivíduos, famílias, empresas e governos. Estudos recentes apontam que o DM2 e suas complicações consomem uma parcela considerável dos orçamentos de saúde, especialmente em países de baixa e média renda, onde a infraestrutura para prevenção, diagnóstico precoce e tratamento permanece insuficiente (Rohm *et al.*, 2022).

2.3 Compostos cumarínicos

Os compostos de cumarina, amplamente reconhecidos por sua estrutura química composta por um anel de benzeno fusionado a uma estrutura α -piranona (Figura 3), destacam-se por sua ocorrência natural em várias famílias de plantas, como Apiaceae, Rutaceae e Oleaceae. Esses metabólitos secundários estão presentes em alimentos como nozes, sementes e frutas, bem como em bebidas como chá e vinho, refletindo sua abundância na dieta humana (Jebir; Mustafa, 2022). Além de sua relevância como componentes dietéticos, as cumarinas possuem um amplo espectro de propriedades farmacológicas, consolidando seu papel tanto na medicina tradicional quanto na pesquisa biomédica moderna.

Figura 3 – Cumarina



Fonte: Sigma (2025).

As propriedades antioxidantes das cumarinas são atribuídas à sua capacidade de neutralizar espécies reativas de oxigênio (EROs), protegendo as células contra danos oxidativos. Esses compostos também apresentam efeitos anti-inflamatórios por meio da inibição de citocinas pró-inflamatórias e vias moleculares associadas, como NF- κ B e MAPK (proteína quinase ativada por mitógenos), que desempenham papéis críticos em processos inflamatórios sistêmicos (Husain *et al.*, 2022; Sharifi-Rad *et al.*, 2021). No contexto de doenças metabólicas, como o diabetes mellitus tipo 2 (DM2), as cumarinas demonstram atividades antidiabéticas promissoras. Estudos sugerem que esses compostos podem melhorar a sinalização da insulina, aumentar a captação de glicose pelos

tecidos periféricos e regular a homeostase glicêmica, reduzindo a hiperglicemia e a resistência à insulina (Husain *et al.*, 2022).

Além disso, as cumarinas exercem um efeito protetor sobre as células β -pancreáticas, mitigando o estresse oxidativo e a inflamação local, que são fatores contribuintes para a disfunção e apoptose dessas células. Tais propriedades tornam as cumarinas candidatas valiosas para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas voltadas para a preservação da função pancreática no DM2 (Husain *et al.*, 2022). Os derivados sintéticos de cumarinas têm atraído atenção crescente devido ao seu potencial para superar as limitações dos compostos naturais, apresentando maior potência biológica, estabilidade química e seletividade farmacológica. Esses derivados são alvo de intensa investigação para o desenvolvimento de novos medicamentos destinados ao manejo de doenças metabólicas e outras condições relacionadas (Bhagat; Bansode, 2024; Younes; Mustafa, 2024).

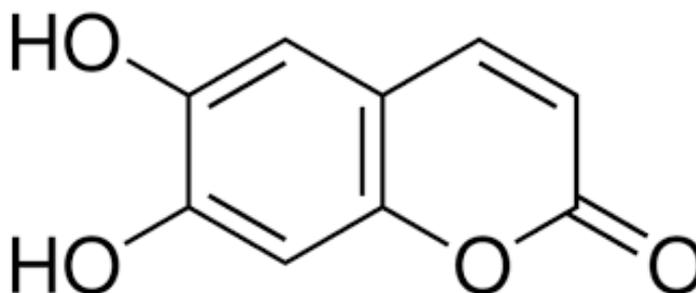
A relevância das cumarinas na medicina moderna é amplamente reconhecida, refletindo-se em sua integração na farmacopéia de diferentes culturas ao longo da história. Esses compostos são amplamente utilizados no tratamento de uma variedade de condições, incluindo doenças inflamatórias, cardiovasculares e metabólicas, devido às suas propriedades terapêuticas versáteis. Além disso, pesquisas contemporâneas têm aprofundado a compreensão dos mecanismos de ação das cumarinas, destacando sua capacidade de modular processos biológicos complexos, como a regulação da inflamação, o controle do estresse oxidativo e a modulação do metabolismo lipídico e glicêmico. O crescente corpo de evidências científicas reforça a importância desses compostos como agentes promissores no desenvolvimento de terapias inovadoras e eficazes para diversas patologias (Sharifi-Rad *et al.*, 2021).

2.4 Esculetina

A esculetina (Figura 4), quimicamente conhecida como 6,7-dihidroxicumarina, é um composto fenólico natural amplamente distribuído em diversas espécies vegetais, incluindo *Sonchus grandifolius* e *Aesculus turbinata*. Essa substância pertence à classe das cumarinas e se destaca por suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, que têm despertado interesse na pesquisa farmacológica

voltada para o manejo de doenças metabólicas, como o diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (Garg *et al.*, 2022a; Garg *et al.*, 2022b).

Figura 4 – Esculetina



Fonte: Sigma (2025).

Estudos experimentais têm mostrado que a esculetina exerce efeitos benéficos no DM2, especialmente em modelos pré-clínicos. Ela melhora a resistência à insulina e a tolerância à glicose, aspectos essenciais na fisiopatologia do DM2. Esses efeitos estão ligados à sua ação em vias de sinalização celular. A esculetina ativa a via do Nrf2, que é fundamental na defesa antioxidante celular, promovendo a expressão de enzimas protetoras como heme oxigenase-1 (HO-1) e glutathiona peroxidase (Garg *et al.*, 2022a; Mao *et al.*, 2015). Além disso, ao inibir o NF- κ B, a esculetina reduz processos inflamatórios crônicos que agravam a resistência à insulina e complicações vasculares no diabetes (Zhang *et al.*, 2022).

Além disso, a esculetina apresenta uma ação protetora importante sobre a função endotelial, o que é fundamental para prevenir complicações cardiovasculares associadas ao diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Sua capacidade de reduzir o estresse oxidativo nas células endoteliais e de modular o metabolismo lipídico contribui para a manutenção da integridade das paredes vasculares, diminuindo o risco de aterosclerose e outras doenças cardiovasculares comuns em pacientes diabéticos. Esses efeitos fazem da esculetina um potencial agente terapêutico para proteger a saúde cardiovascular em pessoas com DM2 (Garg *et al.*, 2022a).

Embora estudos pré-clínicos demonstrem resultados promissores, ainda é necessário realizar ensaios clínicos para confirmar a segurança, eficácia, dosagem ideal e possíveis efeitos adversos da esculetina em humanos. Esses estudos também devem investigar interações medicamentosas e a viabilidade econômica de

seu uso terapêutico (Zhang *et al.*, 2022). Dado o impacto global do DM2 e os altos custos associados ao tratamento de suas complicações, a esculetina se destaca como uma molécula promissora para o desenvolvimento de novas terapias, com o potencial de reduzir os encargos econômicos da saúde pública (Garg *et al.*, 2022a).

2.5 Relevância dos estudos em miócitos L6

Os miócitos L6 têm se consolidado como um modelo experimental amplamente utilizado no estudo da captação de glicose e da resistência à insulina, especialmente no contexto do DM2. Esses miócitos, derivados de células musculares de ratos, possuem a capacidade de diferenciar-se em fibras musculares multinucleadas e, conseqüentemente, mimetizar características funcionais do músculo esquelético humano. Essa característica é de extrema relevância, pois o músculo esquelético desempenha um papel central no metabolismo da glicose, sendo responsável por aproximadamente 80% da captação de glicose estimulada pela insulina (Fu *et al.*, 2024; Zhang *et al.*, 2019).

Na resistência à insulina, o comprometimento da captação de glicose pelo músculo esquelético está associado à desregulação de vias moleculares cruciais, incluindo a sinalização do receptor de insulina e a translocação do transportador de glicose GLUT4 para a membrana plasmática. Estudos utilizando miócitos L6 têm permitido a identificação de proteínas-chave envolvidas nesses processos, como o fator de transcrição tipo Krüppel 3 (KLF3), que regula a expressão de GLUT4, e a proteína contendo dois domínios tipo C2 beta (DOC2B), que participa da exocitose de GLUT4 mediada por insulina. A modulação dessas proteínas tem demonstrado efeitos benéficos na sensibilidade à insulina e na eficiência da captação de glicose, oferecendo insights valiosos sobre potenciais alvos terapêuticos para o tratamento do DM2 (Fu *et al.*, 2024; Zhang *et al.*, 2019).

Além disso, os miócitos L6 têm sido utilizados para avaliar os efeitos de compostos bioativos e agentes farmacológicos que visam restaurar a homeostase metabólica. Intervenções com substâncias como o resveratrol e o malato de cromo têm se mostrado eficazes na reativação de vias de sinalização da insulina, promovendo a translocação de GLUT4 e melhorando a captação de glicose. O resveratrol, conhecido por suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, atua através da ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), enquanto o

malato de cromo, um suplemento dietético, influencia diretamente a sensibilidade à insulina e o metabolismo glicídico (Vlavcheski *et al.*, 2020; Feng *et al.*, 2018).

Os avanços obtidos com o uso dos miócitos L6 como modelo experimental têm contribuído significativamente para a compreensão dos mecanismos subjacentes à resistência à insulina no músculo esquelético (Vlavcheski *et al.*, 2020; Feng *et al.*, 2018). Além de reforçarem o papel crítico do músculo esquelético no controle glicêmico, esses avanços também abrem caminhos para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas inovadoras. A capacidade desse modelo de replicar aspectos fisiológicos e patológicos do músculo esquelético humano torna-o uma ferramenta indispensável na pesquisa sobre o DM2 e outras desordens metabólicas.

3 METODOLOGIA

3.1 Obtenção da esculatina

Foi realizada a compra da esculatina (Sigma®) para a execução dos testes utilizados neste estudo.

3.2 Determinação da captação de glicose pelos miócitos

3.2.1 Cultura e diferenciação das células L6 (mioblastos)

Este estudo caracteriza-se como experimental *in vitro*, desenvolvido com o intuito de investigar os efeitos da esculatina no consumo de glicose em células musculares. Para tanto, utilizou-se a linhagem celular L6, derivada de mioblastos de rato e obtida do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). O cultivo celular foi realizado conforme o protocolo descrito na literatura (Yin *et al.*, 2020), utilizando meio modificado de Dulbecco (DMEM; Gibco®), enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco®) e 1% de uma solução de penicilina e estreptomicina (Gibco®), visando garantir condições ideais para proliferação e manutenção celular. A incubação foi realizada em estufa com atmosfera controlada, contendo 5% de CO₂ e temperatura constante de 37°C, simulando as condições fisiológicas ideais para o crescimento celular. O monitoramento diário das culturas permitiu avaliar a confluência das células, que foram subcultivadas ao atingirem aproximadamente 80% de confluência, sendo então semeadas em placas de seis poços (1×10⁵ células por poço) para a realização dos experimentos subsequentes.

Para induzir a diferenciação das células L6 em miotubos (células multinucleadas semelhantes às fibras musculares), as culturas foram mantidas em meio DMEM suplementado com 2% de soro de cavalo e 0,25 µM de dexametasona por um período de 7 dias, conforme protocolos previamente estabelecidos e validados na literatura (Han; Yang; Kao, 2017; Son; Wu, 2019). A diferenciação foi confirmada por meio de avaliação morfológica, utilizando técnicas de coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) e Coomassie Blue (CB). As células foram fixadas com paraformaldeído a 10% e depois coradas em dois momentos distintos: no tempo zero (antes da indução da diferenciação) e no sétimo dia (após a diferenciação).

Todos os procedimentos foram conduzidos em triplicata, garantindo a confiabilidade dos resultados obtidos. As fotomicrografias foram adquiridas por uma câmera (MOTICAN2000, MOTIC, BR) acoplada a um microscópio invertido (LEICA, DM IL, USA). A barra de escala foi adicionada nas fotomicrografias utilizando o software ImageJ (versão 1.54). As fotomicrografias foram importadas para o programa e a barra de escala foi então inserida de acordo com as especificações de tamanho relativas ao aumento utilizado.

3.2.2 Citotoxicidade

A análise da viabilidade celular foi realizada com base na atividade mitocondrial das células, utilizando a técnica colorimétrica do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) (MOSMANN, 1983). Para o experimento, células L6 foram cultivadas em placas de 96 poços (1×10^3 células/poço) e expostas à esculetina (ESC, Sigma [®]) nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 75 ou 100 μ M. Como grupo veículo foi utilizado o solvente dimetilsulfóxido (DMSO) 0,2% em meio DMEM. Após 24 horas de incubação, 20 μ L do corante MTT (5 mg/mL) foram adicionados a cada poço, seguidos por uma incubação de 4 horas a 37 °C, em atmosfera de 5% CO₂. Em seguida, o meio de cultura foi completamente removido, e 100 μ L de DMSO foram adicionados para solubilizar os cristais de formazan, um sal de coloração azul resultante da redução do MTT pela desidrogenase mitocondrial. A leitura da absorbância foi realizada por espectrofotometria em um leitor automático de microplacas (Varioskan Flash, Thermo Scientific), utilizando espectrofotômetro UV-Vis com comprimento de onda ajustado para 595 nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e os valores médios de densidade óptica das células tratadas com água deionizada foram utilizados como referência para o controle positivo (100% de viabilidade celular).

3.2.3 Modelo de resistência insulínica *in vitro*

No presente estudo, foram utilizados oito grupos experimentais, divididos em células sem resistência insulínica e células com resistência insulínica induzida. Para induzir a RI, foi empregado um modelo experimental validado por Kain *et al.* (2015), no qual as células foram expostas a 20 ng/mL de TNF- α por 24 horas. Esse

protocolo mimetiza as alterações metabólicas observadas em condições de resistência insulínica, como a redução na captação de glicose e a disfunção na sinalização da insulina. Os grupos experimentais foram organizados da seguinte forma:

1. Controle positivo: células sem resistência insulínica + insulina (MSRI);
2. Controle negativo: células com resistência insulínica + insulina (MCRI);
3. Células com resistência insulínica + insulina + esculetina (5 μM);
4. Células com resistência insulínica + insulina + esculetina (10 μM);
5. Células com resistência insulínica + insulina + esculetina (25 μM);
6. Células com resistência insulínica + insulina + esculetina (50 μM);
7. Células com resistência insulínica + insulina + esculetina (75 μM);
8. Células com resistência insulínica + insulina + esculetina (100 μM) .

Para avaliar a captação de glicose, foi utilizado o marcador fluorescente 2-NBDG (2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)Amino)-2-Desoxiglicose) (Thermo Fisher). Após os tratamentos, as células foram incubadas com uma solução contendo insulina (100 nM) e 2-NBDG (100 μM) por uma hora, em condições controladas de temperatura e CO_2 . Em seguida, as células foram lisadas com 500 μL de solução tampão fosfato monobásico e dibásico, contendo 1% (v/v) de Triton X-100, sob agitação constante a 200 RPM por 10 minutos. Após a lise, 100 μL do lisado foram transferidos para placas pretas de 96 poços.

A fluorescência do 2-NBDG foi quantificada utilizando um leitor de microplacas (Varioskan® Flash, Thermo Scientific), com comprimentos de onda de excitação e emissão de 435 nm e 528 nm, respectivamente. O método de leitura de placa foi baseado na detecção de fluorescência, onde a intensidade do sinal foi proporcional à quantidade de 2-NBDG internalizado pelas células. A eficiência da captação de glicose foi determinada com base na intensidade da fluorescência do 2-NBDG: quanto maior a captação de glicose pelas células, maior a fluorescência detectada, e vice-versa. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, garantindo a confiabilidade e a reprodutibilidade dos resultados.

3.3 Análise estatística

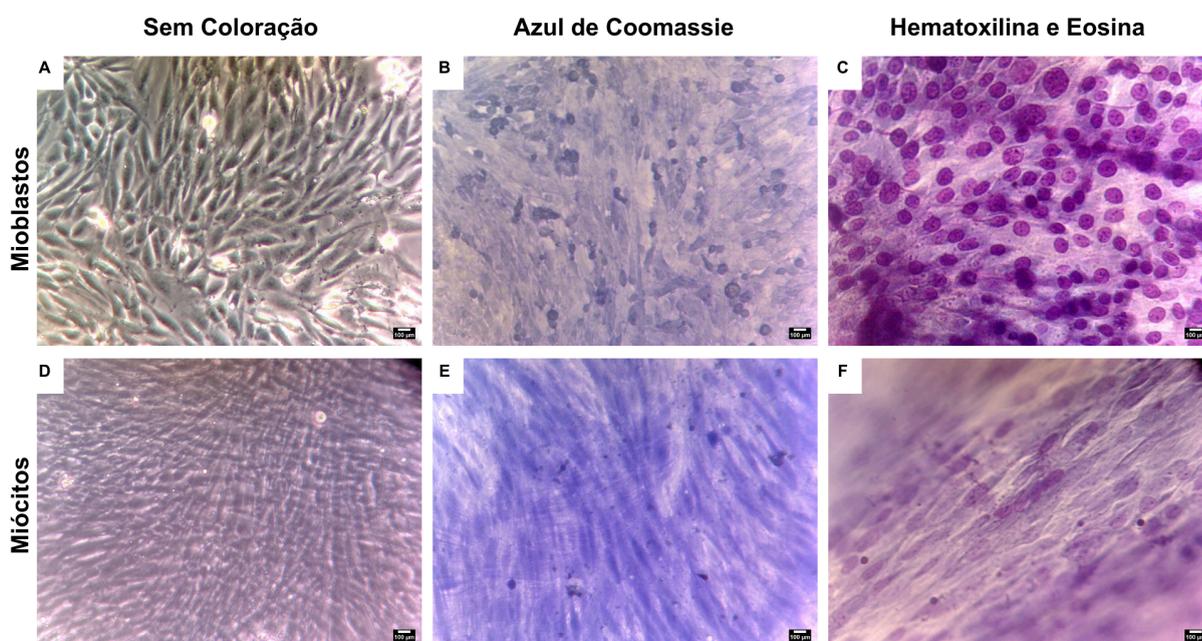
Os resultados foram expressos por média \pm desvio padrão da média e, para fins estatísticos, sendo considerada a significância mínima de 0,05 ($p < 0,05$). Os dados paramétricos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) com aplicação de pós-teste de Turkey. Os dados foram analisados estatisticamente pelo programa Origin (Pro), Version 2016. OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da morfologia dos mioblastos após diferenciação

Foi conduzida a etapa de cultura e diferenciação da linhagem celular L6, permitindo observar alterações morfológicas associadas à maturação celular. Como mostrado na Figura 5A, os mioblastos (células com morfologia fibroblastóide) foram diferenciados em miócitos (células em formato de fuso, mais alongadas do que os mioblastos – Figura 5D). Foi evidenciada a ocorrência de mudança morfológica em mais de 90% dos mioblastos. Na Figura 5C e F pode-se observar as células coradas com Hematoxilina e Eosina, no tempo 0 e 7 dias após a indução da diferenciação. Nota-se a presença de células uninucleadas na Figura 5C, diferentemente na Figura 5F que há presença de células multinucleadas. Já na figura 5B, fica evidente a menor intensidade do corante Azul de Coomassie nas células no tempo zero comparativamente ao tempo de sete dias de indução da diferenciação celular (Figura 5E), evidenciando maior conteúdo protéico na formação de miócitos.

Figura 5 – Fotomicrografia dos mioblastos L6 e miócitos diferenciados



Legenda: A-C: mioblastos no tempo 0; D-F: miócitos: células diferenciadas após 7 dias. Ampliação de 100x. Fonte: A autora (2025).

Esses achados demonstram a eficácia do protocolo de diferenciação proposto por Yin et al. (2020) e reforçam a relevância da linhagem celular L6 como um modelo experimental robusto para estudos em biologia muscular, metabolismo energético e regeneração tecidual. De acordo com Yin et al. (2020), durante o processo de diferenciação, as células L6 desenvolvem características estruturais e funcionais semelhantes às das fibras musculares esqueléticas, incluindo a formação de fibras multinucleadas e a expressão de transportadores de glicose, como o GLUT4. Esse transportador desempenha um papel crucial na resposta ao estímulo de insulina, sendo essencial para a captação de glicose. A diferenciação em miotubos funcionalmente maduros torna a linhagem L6 um modelo celular altamente adequado para investigações sobre a captação de glicose, a sinalização da insulina e outros aspectos do metabolismo energético, contribuindo significativamente para avanços na compreensão de doenças metabólicas e processos regenerativos.

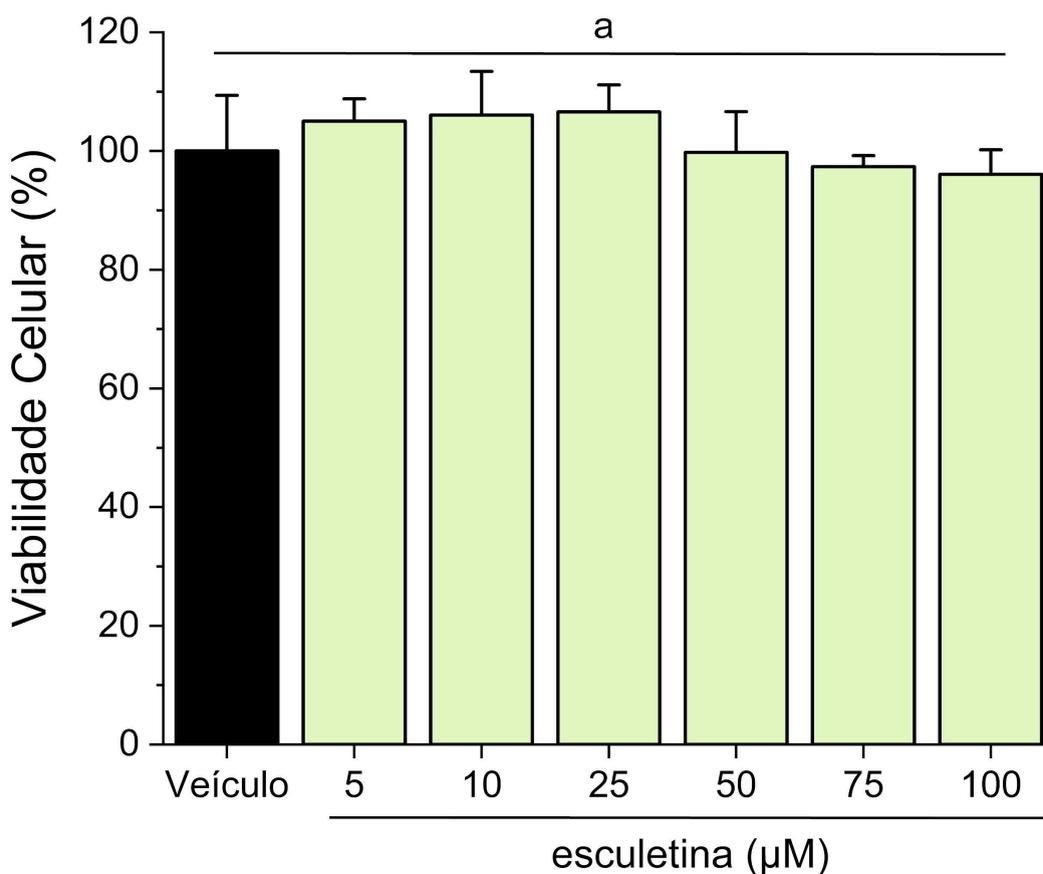
4.2 Avaliação da citotoxicidade da esculetina em miócitos

A avaliação da viabilidade celular na linhagem L6 foi conduzida utilizando o ensaio MTT, com o objetivo de investigar o impacto da esculetina em diferentes concentrações (5, 10, 25, 50, 75 ou 100 μM) após 24 horas de exposição. Esse procedimento permitiu mensurar alterações potenciais na atividade metabólica das células tratadas. Os resultados indicaram que não houve redução estatisticamente significativa na viabilidade celular em nenhuma das concentrações testadas, sugerindo que a esculetina não exerce efeitos citotóxicos relevantes dentro desse intervalo de dosagens. Essa constatação fortalece a segurança potencial do composto, conforme ilustrado na Figura 6, que demonstra a preservação da integridade celular, mesmo em concentrações elevadas.

O ensaio MTT, amplamente utilizado na literatura científica e descrito por Kumar *et al.* (2018) como uma técnica consagrada para a avaliação da citotoxicidade celular e da funcionalidade mitocondrial. A metodologia se baseia na conversão do corante amarelo MTT em cristais roxos de formazan pelas desidrogenases mitocondriais, um processo dependente da atividade metabólica de células viáveis. A precisão desse método torna-o uma ferramenta eficaz para monitorar a viabilidade celular e os parâmetros metabólicos. Estudos adicionais, como os de Van Meerloo *et al.* (2010), ressaltam a elevada sensibilidade do ensaio,

capaz de detectar alterações sutis na atividade metabólica e identificar sinais precoces de estresse celular, mesmo na ausência de citotoxicidade manifesta. Esses aspectos tornam o ensaio MTT um método robusto e valioso para estudos de segurança e efeitos celulares em modelos experimentais.

Figura 6 – Percentual de viabilidade celular em miócitos L6 expostos à esculetina (5, 10, 25, 50, 75, 100 μM)



Legenda: Os dados representam experimentos em triplicata para cada concentração testada. Na condição experimental, as células foram submetidas a diferentes concentrações da esculetina (5, 10, 25, 50, 75 ou 100 μM). O grupo controle foi considerado como 100% de células viáveis. Barras com letra minúsculas diferentes são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Fonte: A autora (2025).

A avaliação da viabilidade celular é um parâmetro essencial para determinar a segurança e os efeitos biológicos de compostos bioativos. No presente estudo, a esculetina não apresentou citotoxicidade significativa na linhagem celular L6, mesmo em concentrações elevadas (100 μM), conforme evidenciado pelo ensaio MTT. Esses achados contrastam com os resultados obtidos por He *et al.* (2018), que analisaram a viabilidade celular da esculetina em cardiomioblastos H9c2

(cardiomioblastos) utilizando o ensaio WST-1. Nesse estudo, os autores observaram que concentrações entre 5 e 20 μM não afetaram a viabilidade celular, enquanto 40 μM reduziram significativamente a viabilidade, além de demonstrarem um efeito protetor contra danos induzidos por hipóxia/reoxigenação.

As diferenças observadas podem ser atribuídas ao tipo celular utilizado, uma vez que mioblastos (linhagem L6) e cardiomioblastos (linhagem H9c2) apresentam metabolismos distintos e respostas celulares específicas ao estresse oxidativo. Além disso, o método analítico empregado por He *et al.* (2018), o ensaio WST-1, baseia-se na conversão do sal de tetrazólio WST-1 em formazan solúvel, cuja quantidade é diretamente proporcional à atividade mitocondrial celular. Esse método difere do MTT, que gera um precipitado insolúvel, exigindo uma etapa adicional de solubilização antes da leitura espectrofotométrica.

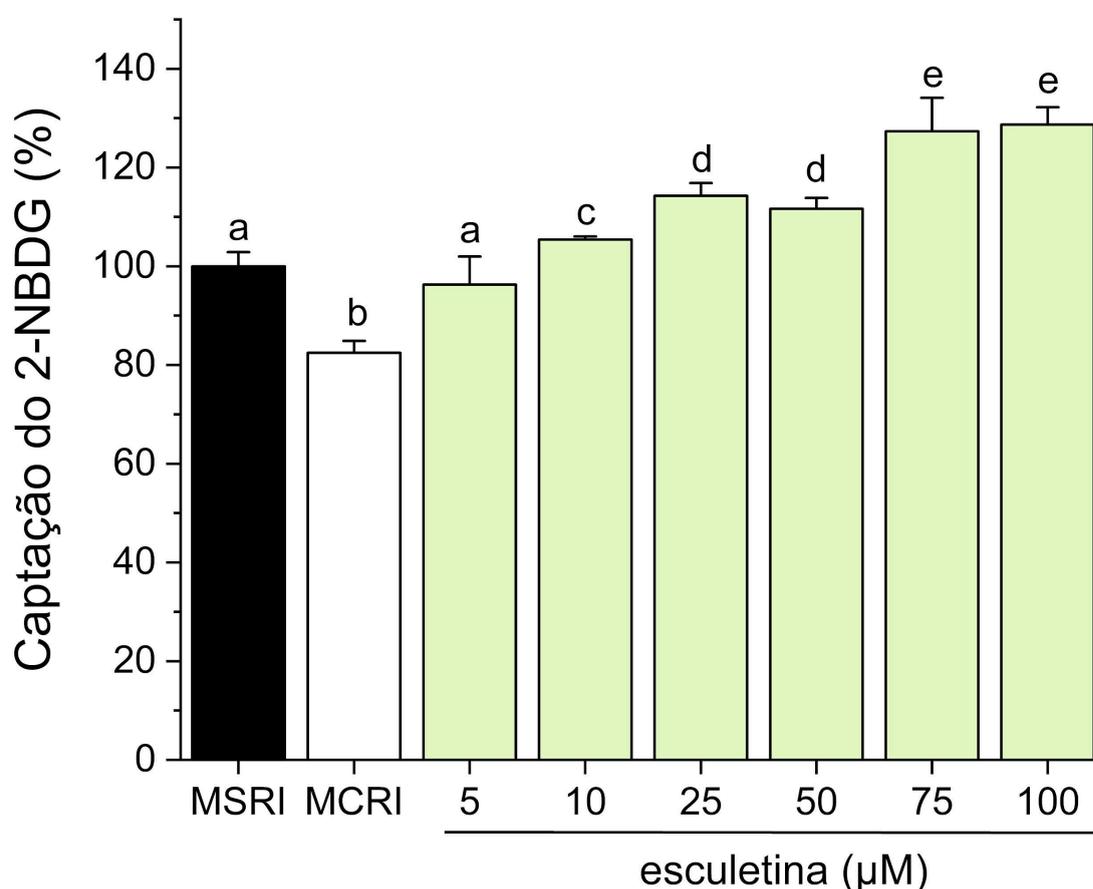
Diante dessas considerações, os resultados sugerem que a esculetina apresenta um perfil seguro para células L6 nas condições avaliadas, sem evidências de toxicidade significativa. No entanto, seus efeitos em contextos de estresse celular, como situações de estresse oxidativo ou disfunção mitocondrial, ainda precisam ser investigados de forma mais aprofundada. Estudos adicionais são necessários para elucidar o potencial terapêutico da esculetina e sua aplicação em diferentes modelos celulares e condições fisiológicas.

4.3 Avaliação da captação de glicose em miócitos L6 com resistência insulínica induzida por TNF- α

A avaliação da captação de glicose em miócitos L6 com resistência insulínica induzida por TNF- α revelou uma redução significativa na captação de 2-NBDG, um marcador fluorescente análogo à glicose, conforme demonstrado na Figura 7. No grupo com resistência à insulina (MCRI), observou-se uma diminuição de $17,53 \pm 2,4$ na captação de 2-NBDG em comparação ao grupo controle sem resistência à insulina (MSRI). Essa redução sugere que o TNF- α pode interferir na sinalização da insulina, comprometendo a ativação de proteínas essenciais da cascata de sinalização e, conseqüentemente, reduzindo a captação de glicose pelas células musculares.

Esses achados reforçam a confiabilidade do modelo experimental, demonstrando sua eficácia na reprodução dos efeitos da resistência insulínica induzida por TNF- α . Esse modelo, portanto, se estabelece como uma ferramenta robusta para futuras investigações dos mecanismos moleculares envolvidos em distúrbios metabólicos. Ademais, sua aplicabilidade se estende à avaliação de potenciais agentes terapêuticos direcionados à restauração da sensibilidade à insulina, o que pode contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens no tratamento da resistência insulínica e suas complicações associadas.

Figura 7 – Percentual de captação do marcador fluorescente 2-NBDG pelos miócitos com resistência insulínica expostos à esculetina (5, 10, 25, 50, 75 ou 100 μ M)



Legenda: Os dados representam experimentos em triplicata para cada condição testada. Na condição experimental, os miócitos com resistência insulínica foram expostos à insulina e a diferentes concentrações da esculetina (5, 10, 25, 50, 75 ou 100 μ M). MSRI= Miócitos sem Resistência Insulínica expostos à insulina; MCRI: Miócitos com Resistência Insulínica expostos à insulina. Barras com letra minúsculas diferentes são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Fonte: A autora (2025).

Esse efeito está em concordância com os achados de Kain *et al.* (2015), que demonstraram que o TNF- α compromete a captação de glicose ao reduzir a expressão de GLUT4 e MEF2A (fator de potencialização de miócitos 2A). Ambos os estudos indicam que essa citocina inflamatória ativa vias de sinalização, como ERK1/2 e JNK, promovendo a fosforilação de IRS-1 em resíduos de serina e inibindo a translocação de GLUT4 para a membrana plasmática. No entanto, enquanto o presente estudo se concentra na avaliação funcional da captação de glicose, Kain *et al.* aprofundam os mecanismos moleculares envolvidos, destacando o papel da proteína PIMT (proteína-L-isoaspartato O-metiltransferase) na repressão transcricional de GLUT4. Em conjunto, esses achados reforçam a influência do TNF- α na resistência insulínica e evidenciam alvos potenciais para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Após a exposição dos grupos com resistência à insulina (RI) a diferentes concentrações de esculetina, observou-se, conforme ilustrado na Figura 7, um aumento estatisticamente significativo na captação do 2-NBDG em todos os grupos (5, 10, 25, 50, 75 e 100 μ M), quando comparados ao grupo controle (MCRI). Esse aumento sugere que a esculetina pode desempenhar um papel importante na modulação da captação de glicose em condições de resistência à insulina, que é uma característica central do diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Em particular, os grupos tratados com concentrações de 75 e 100 μ M de esculetina destacaram-se, apresentando um aumento expressivo de 46,23% \pm 2,96 na captação do marcador fluorescente, o que sugere uma ação potencialmente mais eficaz dessas doses em melhorar a função do transporte de glicose.

Os resultados obtidos estão em consonância com os de Singuru *et al.* (2024), que demonstraram, em camundongos db/db, que a esculetina atenua a resistência à insulina e aumenta a captação de glicose em adipócitos e células hepáticas, por meio da ativação da via AMPK/SIRT1 (proteína quinase ativada por AMP e sirtuína 1), além de reduzir complicações metabólicas, como aterosclerose e inflamação vascular. Esses achados reforçam o potencial terapêutico da esculetina no manejo do DM2, sugerindo sua capacidade de modular positivamente o metabolismo energético celular por mecanismos análogos aos descritos.

Outro aspecto relevante é o potencial impacto econômico da esculetina no tratamento do DM2. Dado o alto custo associado ao manejo do diabetes e suas complicações, a esculetina pode representar uma alternativa terapêutica mais

acessível e economicamente viável. Conforme destacado por Zhang *et al.* (2023), intervenções com compostos bioativos, como a esculetina, podem reduzir significativamente os custos com medicamentos e complicações relacionadas ao DM2, especialmente em sistemas de saúde com recursos limitados. Portanto, além de seus benefícios clínicos, a esculetina pode contribuir para a sustentabilidade dos sistemas de saúde, aliviando o fardo econômico associado ao tratamento do diabetes. A adoção de terapias baseadas em compostos bioativos, como a esculetina, pode, portanto, representar uma estratégia promissora para reduzir os gastos em saúde e melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

No entanto, é importante ressaltar que os resultados obtidos *in vitro* podem não captar completamente a complexidade do tecido muscular humano e do metabolismo glicêmico em organismos vivos. Portanto, estudos adicionais em modelos animais e ensaios clínicos são necessários para confirmar a eficácia e segurança da esculetina em humanos. Além disso, é fundamental investigar a farmacocinética, a biodisponibilidade e possíveis interações medicamentosas da esculetina, bem como determinar as doses terapêuticas ideais.

5 CONCLUSÕES

- A esculetina apresenta baixa citotoxicidade, refletindo a sua possível segurança terapêutica;
- Diferenciação da linhagem L6 foi eficaz, com mais de 90% das células apresentando características de miócitos maduros;
- A esculetina aumentou a captação de glicose em miócitos com resistência insulínica, principalmente em altas concentrações;
- Potencial fitofármaco a ser utilizado no tratamento da DM2, direcionando para uma possível terapia complementar e/ou alternativa;
- Estudos adicionais, incluindo in vivo e clínicos, são necessários para confirmar sua eficácia, segurança e viabilidade econômica em humanos.

REFERÊNCIAS

ABLER, A.; SMITH, J. A.; RANDAZZO, P. A.; *et al.* Genistein differentially inhibits postreceptor effects of insulin in rat adipocytes without inhibiting the insulin receptor kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 6, p. 3946–3951, 1992.

Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925819506172>>. Acesso em: 9 mar. 2024.

ALIPOURFARD, Iraj; DATUKISHVILI, Nelly; MIKELADZE, Davit. TNF- α Downregulation Modifies Insulin Receptor Substrate 1 (IRS-1) in Metabolic Signaling of Diabetic Insulin-Resistant Hepatocytes. **Mediators of Inflammation**, v. 2019, p. e3560819, 2019. Disponível em:

<<https://www.hindawi.com/journals/mi/2019/3560819/>>. Acesso em: 9 mar. 2024.

ANSARI, Prawej; CHOUDHURY, Samara T.; SEIDEL, Veronique; *et al.* Therapeutic Potential of Quercetin in the Management of Type-2 Diabetes Mellitus. **Life**, v. 12, n. 8, p. 1146, 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2075-1729/12/8/1146>>. Acesso em: 6 mar. 2024.

BHAGAT, Priya P.; BANSODE, Tanaji N. Coumarin Derivatives: Pioneering New Frontiers in Biological Applications. **Current Organic Chemistry**, v. 29, n. 10, p. 794–813, 2024. Disponível em: <<https://www.eurekaselect.com/article/144158>>. Acesso em: 22 jan. 2025.

BURRACK, Adam L.; MARTINOV, Tijana; FIFE, Brian T. T Cell-Mediated Beta Cell Destruction: Autoimmunity and Alloimmunity in the Context of Type 1 Diabetes. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, 2017. Disponível em:

<<https://www.frontiersin.org/journals/endocrinology/articles/10.3389/fendo.2017.00343/full>>. Acesso em: 9 mar. 2024.

CASTRO, Ana Valeria B.; KOLKA, Cathryn M.; KIM, Stella P.; *et al.* Obesity, insulin resistance and comorbidities ? Mechanisms of association. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 58, n. 6, p. 600–609, 2014. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302014000600600&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 15 jan. 2025.

CHANDRASEKARAN, Preethi; WEISKIRCHEN, Ralf. Cellular and Molecular Mechanisms of Insulin Resistance. **Current Tissue Microenvironment Reports**, v. 5, n. 3, p. 79–90, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s43152-024-00056-3>

>. Acesso em: 14 jan. 2025.

CHAOJI, Sunanda Ashutosh. Insulin Resistance. **Vidarbha Journal of Internal Medicine**, v. 33, n. 1, p. 27–31, 2023. Disponível em:

<<https://vjim.org/insulin-resistance/>>. Acesso em: 14 jan. 2025.

Diretriz da Sociedade Brasileira de Diabetes - Ed. 2023. Diretriz da Sociedade Brasileira de Diabetes - Ed. 2023. Disponível em: <<https://diretriz.diabetes.org.br>>. Acesso em: 9 mar. 2024.

FENG, Weiwei; DING, Yangyang; ZHANG, Weijie; *et al.* Chromium malate alleviates high-glucose and insulin resistance in L6 skeletal muscle cells by regulating glucose uptake and insulin sensitivity signaling pathways. **BioMetals**, v. 31, n. 5, p. 891–908, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10534-018-0132-4>>. Acesso em: 14 jan. 2025.

FERRANNINI, Ele; IOZZO, Patricia; VIRTANEN, Kirsi A; *et al.* Adipose tissue and skeletal muscle insulin-mediated glucose uptake in insulin resistance: role of blood flow and diabetes. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 108, n. 4, p. 749–758, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002916522029896>>. Acesso em: 15 jan. 2025.

FU, Shuying; GONG, Xiaocheng; LIANG, Keying; *et al.* KLF3 impacts insulin sensitivity and glucose uptake in skeletal muscle. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 327, n. 5, p. C1219–C1235, 2024. Disponível em: <<https://journals.physiology.org/doi/10.1152/ajpcell.00085.2024>>. Acesso em: 14 jan. 2025.

GALICIA-GARCIA, Unai; BENITO-VICENTE, Asier; JEBARI, Shifa; *et al.* Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 6275, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/21/17/6275>>. Acesso em: 9 mar. 2024.

GALTIER, F. Definition, epidemiology, risk factors. **Diabetes & metabolism**, v. 36, n. 6 Pt 2, p. 628–651, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.diabet.2010.11.014>>. Acesso em: 9 mar. 2024.

GAO, Kunyan. Analysis of factors influencing the prevalence of type 2 diabetes mellitus. **Theoretical and Natural Science**, v. 50, p. 110–117, 2024. Disponível em: <<https://www.ewadirect.com/proceedings/tns/article/view/16846>>. Acesso em: 29 dez. 2024.

GARG, Sourbh Suren; GUPTA, Jeena; SAHU, Debasis; *et al.* Mechanistic insights into the biochemical and pharmacological profile of esculetin. [s.l.]: **BIOLOGY**, 2022a. Disponível em: <<https://www.preprints.org/manuscript/202208.0468/v1>>. Acesso em: 6 mar. 2024.

GARG, Sourbh Suren; GUPTA, Jeena; SAHU, Debasis; *et al.* Pharmacological and Therapeutic Applications of Esculetin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 20, p. 12643, 2022b. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/23/20/12643>>. Acesso em: 6 mar. 2024.

GLASS, Christopher K.; OLEFSKY, Jerrold M. Inflammation and Lipid Signaling in the Etiology of Insulin Resistance. **Cell Metabolism**, v. 15, n. 5, p. 635–645, 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413112001374>>. Acesso em: 14 fev. 2025.

GONÇALVES, Regina Helena Pires; MIRANDA, Elaine Toscano; ZAIA, José Eduardo; *et al.* Species diversity of yeast in oral colonization of insulin-treated

diabetes mellitus patients. **Mycopathologia**, v. 162, n. 2, p. 83–89, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11046-006-0038-5>>. Acesso em: 9 mar. 2024.

HADID, Khalil Amjad; ALASSAF, Fawaz A.; ABED, Mohammed Najim. Mechanisms and Linkage of Insulin Signaling, Resistance, and Inflammation. **Iraqi Journal of Pharmacy**, v. 21, n. 1, p. 1–8, 2024. Disponível em: <https://iph.uomosul.edu.iq/article_181624.html>. Acesso em: 14 jan. 2025.

HAMEED, Iqra; MASOODI, Shariq R; MIR, Shahnaz A; *et al.* Type 2 diabetes mellitus: From a metabolic disorder to an inflammatory condition. **World Journal of Diabetes**, v. 6, n. 4, p. 598–612, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4434080/>>. Acesso em: 9 mar. 2024.

HAN, Der-Sheng; YANG, Wei-Shiung; KAO, Tung-Wei. Dexamethasone Treatment at the Myoblast Stage Enhanced C2C12 Myocyte Differentiation. **International Journal of Medical Sciences**, v. 14, n. 5, p. 434–443, 2017. Disponível em: <<http://www.medsci.org/v14p0434.htm>>. Acesso em: 22 mar. 2025.

HE, Ke-Jie; WANG, Haitao; XU, Jianguang; *et al.* Global burden of type 2 diabetes mellitus from 1990 to 2021, with projections of prevalence to 2044: a systematic analysis across SDI levels for the global burden of disease study 2021. **Frontiers in Endocrinology**, v. 15, p. 1501690, 2024. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2024.1501690/full>>. Acesso em: 27 fev. 2025.

HE, Ya; LI, Chen; MA, Qiaoya; *et al.* Esculetin inhibits oxidative stress and apoptosis in H9c2 cardiomyocytes following hypoxia/reoxygenation injury. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 501, n. 1, p. 139–144, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X18309926>>. Acesso em: 19 fev. 2025.

HONKA, Miikka-Juhani; LATVA-RASKU, Aino; BUCCI, Marco; *et al.* Insulin-stimulated glucose uptake in skeletal muscle, adipose tissue and liver: a positron emission tomography study. **European Journal of Endocrinology**, v. 178, n. 5, p. 523–531, 2018. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ejendo/article/178/5/523/6655377>>. Acesso em: 9 mar. 2024.

HUSAIN, Ansari Asif; HUSAIN, Ansari Sajjad; GAWHALE, Nandkishor Dinkarrao; *et al.* An Overview of Natural and Synthetic Coumarin Derivatives as Potential Antidiabetic Agents. **Journal of Pharmaceutical Negative Results**, p. 739–744, 2022. Disponível em: <<https://pnrjournal.com/index.php/home/article/view/2434>>. Acesso em: 22 jan. 2025.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. *IDF Diabetes Atlas – 10th edition.* 2021. Disponível em: <https://diabetesatlas.org/atlas/tenth-edition/>. Acesso em: 27 fev. 2025.

JEBIR, Rahma M.; MUSTAFA, Yasser F. Natural Coumarin-Lead Compounds: A Review of Their Medicinal Potentials. **Iraqi Journal of Pharmacy**, v. 18, n. 2, p.

139–161, 2022. Disponível em: <https://iphr.uomosul.edu.iq/article_170404.html>. Acesso em: 14 jan. 2025.

KAIN, Vasundhara; KAPADIA, Bandish; VISWAKARMA, Navin; *et al.* Co-activator binding protein PIMT mediates TNF- α induced insulin resistance in skeletal muscle via the transcriptional down-regulation of MEF2A and GLUT4. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 15197, 2015. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/srep15197>>. Acesso em: 19 jan. 2025.

KAWANO, Atsutoshi; NAKAMURA, Hiromichi; HATA, Shu-ichi; *et al.* Hypoglycemic effect of aspalathin, a rooibos tea component from *Aspalathus linearis*, in type 2 diabetic model db/db mice. **Phytomedicine**, v. 16, n. 5, p. 437–443, 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711308002213>>. Acesso em: 9 mar. 2024.

KECKLEY, Paul. The Cost and Impact of Type 2 Diabetes: Policy Recommendations for a Growing Public Health Epidemic. **Food & Nutrition Journal**, 2018. Disponível em: <<https://www.gavinpublishers.com/article/view/the-cost-and-impact-of-type-2-diabetes-policy-recommendations-for-a-growing-public-health-epidemic>>. Acesso em: 29 dez. 2024.

KILLILEA, Terrance. Long-term consequences of type 2 diabetes mellitus: economic impact on society and managed care. **The American journal of managed care**, v. 8, n. 16 Suppl, p. S441-9, 2002. Disponível em: <<https://europepmc.org/article/med/12408407>>. Acesso em: 29 dez. 2024.

KHARROUBI, Akram T; DARWISH, Hisham M. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. **World Journal of Diabetes**, v. 6, n. 6, p. 850–867, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4478580/>>. Acesso em: 9 mar. 2024.

KOJTA, Iwona; CHACIŃSKA, Marta; BŁACHNIO-ZABIELSKA, Agnieszka. Obesity, Bioactive Lipids, and Adipose Tissue Inflammation in Insulin Resistance. **Nutrients**, v. 12, n. 5, p. 1305, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2072-6643/12/5/1305>>. Acesso em: 9 mar. 2024.

KOMALASARI, Dwi Rosella; ARIF PRISTIANTO. Peningkatan Pengetahuan tentang Cara Melakukan Latihan Fisik atau Olah Raga yang Aman Bagi Penderita Diabetes Mellitus. **Warta LPM**, p. 207–217, 2023. Disponível em: <<https://journals2.ums.ac.id/index.php/warta/article/view/1247>>. Acesso em: 9 mar. 2024.

KOSTOVA, I.; BHATIA, S.; GRIGOROV, P.; *et al.* Coumarins as antioxidants. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 25, p. 3929–3951, 2011.

KRZYMIEN, Janusz; LADZYNSKI, Piotr. Insulin resistance: Risk factors, diagnostic approaches and mathematical models for clinical practice, epidemiological studies, and beyond. **Biocybernetics and Biomedical Engineering**, v. 44, n. 1, p. 55–67, 2024. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0208521623000761>>. Acesso em: 27 fev. 2025.

KUMAR, Priti; NAGARAJAN, Arvindhan; UCHIL, Pradeep D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2018, n. 6, p. pdb.prot095505, 2018. Disponível em: <<http://cshprotocols.cshlp.org/content/2018/6/pdb.prot095505>>. Acesso em: 19 jan. 2025.

LEE, Hyun-Ah; LEE, Jung-Kyung; HAN, Ji-Sook. Betulinic acid improves TNF- α -induced insulin resistance by inhibiting negative regulator of insulin signalling and inflammation-activated protein kinase in 3T3-L1 adipocytes. **Archives of Physiology and Biochemistry**, p. 1–8, 2022. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13813455.2022.2120503>>. Acesso em: 9 mar. 2024.

LENTERS-WESTRA, Erna; ENGLISH, Emma. Evaluation of Four HbA1c Point-of-Care Devices Using International Quality Targets: Are They Fit for the Purpose? **Journal of Diabetes Science and Technology**, v. 12, n. 4, p. 762–770, 2018. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1932296818785612>>. Acesso em: 9 mar. 2024.

LI, Wenjing; YANG, Xiaoyan; ZHENG, Tao; *et al.* TNF- α stimulates endothelial palmitic acid transcytosis and promotes insulin resistance. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 44659, 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/srep44659>>. Acesso em: 9 mar. 2024.

LIAO, Helen Ziqing; LIANG, Yanting; WANG, Ye; *et al.* Molecular Pathology and Therapeutic Strategies of Type 2 Diabetes. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets**, v. 23, n. 11, p. 1392–1399, 2023. Disponível em: <<https://www.eurekaselect.com/article/130268>>. Acesso em: 9 mar. 2024.

LOVIC, Dragan; PIPERIDOU, Alexia; ZOGRAFOU, Ioanna; *et al.* The Growing Epidemic of Diabetes Mellitus. **Current Vascular Pharmacology**, v. 18, n. 2, p. 104–109, 2023. Disponível em: <<https://www.eurekaselect.com/article/97860>>. Acesso em: 9 mar. 2024.

MAO, Gennian; ZHANG, Shiyun; SONG, Huihui; *et al.* ChemInform Abstract: Synthesis, Biological Activities and Therapeutic Properties of Esculetin and Its Derivatives. **ChemInform**, v. 46, n. 43, p. chin.201543261, 2015. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/chin.201543261>>. Acesso em: 14 jan. 2025.

MAX, S. R.; KONAGAYA, M.; KONAGAYA, Y. Glucocorticoid actions on L6 muscle cells in culture. *In*: [s.l.: s.n.], 1986. Disponível em: <<https://www.semanticscholar.org/paper/Glucocorticoid-actions-on-L6-muscle-cells-in-Max-Konagaya/ea91d7392d906066dc6caf987eeb75086f277b51>>. Acesso em: 28 fev. 2025.

MIRANDA-MASSARI, Jorge R.; RODRÍGUEZ-GÓMEZ, José R.; GONZÁLEZ, Michael J.; *et al.* Metabolic Correction in Patients Sample with Diabetes: Clinical Outcomes and Costs Reductions. **International journal of diabetes research**, v. 5, n. 5, p. 92–101, 2016. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5604848/>>. Acesso em: 29 dez. 2024.

MŁYNARSKA, Ewelina; CZARNIK, Witold; DZIEŻA, Natasza; *et al.* Type 2 Diabetes Mellitus: New Pathogenetic Mechanisms, Treatment and the Most Important Complications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 3, p. 1094, 2025. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/26/3/1094>>. Acesso em: 27 fev. 2025.

NAJMANOVÁ, Iveta; DOSEDĚL, Martin; HRDINA, Radomír; *et al.* Cardiovascular effects of coumarins besides their antioxidant activity. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 9, p. 830–849, 2015.

NANDIPATI, Kalyana C.; SUBRAMANIAN, Saravanan; AGRAWAL, Devendra K. Protein kinases: mechanisms and downstream targets in inflammation-mediated obesity and insulin resistance. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 426, n. 1, p. 27–45, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11010-016-2878-8>>. Acesso em: 15 jan. 2025.

NAVEED, Asif. Diabetes Mellitus: A Metabolic Disorder and its Screening Approaches. **Pakistan Journal of Health Sciences**, p. 01–01, 2022. Disponível em: <<https://www.thejas.com.pk/index.php/pjhs/article/view/59>>. Acesso em: 9 mar. 2024.

NIISATO, Naomi; MARUNAKA, Yoshinori. Therapeutic potential of multifunctional myricetin for treatment of type 2 diabetes mellitus. **Frontiers in Nutrition**, v. 10, p. 1175660, 2023. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2023.1175660/full>>. Acesso em: 6 mar. 2024.

OJO, Opeolu O.; SRINIVASAN, Dinesh K.; OWOLABI, Bosede O.; *et al.* Esculentin-2ChA-Related Peptides Modulate Islet Cell Function and Improve Glucose Tolerance in Mice with Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance. **PLOS ONE**, v. 10, n. 10, p. e0141549, 2015. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0141549>>. Acesso em: 7 mar. 2024.

PATIL, Sachin Rangrao; CHAVAN, Ajinkya Balasaheb; PATEL, Ansar Mansur; *et al.* A Review on Diabetes Mellitus its Types, Pathophysiology, Epidemiology and its Global Burden. **Journal for Research in Applied Sciences and Biotechnology**, v. 2, n. 4, p. 73–79, 2023. Disponível em: <<https://jrasb.com/index.php/jrasb/article/view/284>>. Acesso em: 29 dez. 2024.

PIROT, Pierre; CARDOZO, Alessandra K.; EIZIRIK, Décio L. Mediators and mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, p. 156–165, 2008. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/abem/a/3yJDQ8KBFnyxX4rB94jqBTj/>>. Acesso em: 9 mar. 2024.

PRABAKARAN, Dhamodaran; ASHOKKUMAR, Natarajan. Protective effect of esculetin on hyperglycemia-mediated oxidative damage in the hepatic and renal tissues of experimental diabetic rats. **Biochimie**, v. 95, n. 2, p. 366–373, 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908412004087>>. Acesso em: 7 mar. 2024.

RIBOLDI, Bárbara P.; LUFT, Vivian C.; DE CASTILHOS, Cristina D.; *et al.* Glucose and triglyceride excursions following a standardized meal in individuals with diabetes: ELSA-Brasil study. **Cardiovascular Diabetology**, v. 14, n. 1, p. 21, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12933-015-0181-8>>. Acesso em: 9 mar. 2024.

SHARIFI-RAD, Javad; CRUZ-MARTINS, Natália; LÓPEZ-JORNET, Pía; *et al.* Natural Coumarins: Exploring the Pharmacological Complexity and Underlying Molecular Mechanisms. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, n. 1, p. 6492346, 2021. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2021/6492346>>. Acesso em: 14 jan. 2025.

SHOELSON, Steven E.; LEE, Jongsoo; GOLDFINE, Allison B. Inflammation and insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 7, p. 1793–1801, 2006. Disponível em: <<https://www.jci.org/articles/view/JCI29069>>. Acesso em: 9 mar. 2024.

SINGH, Atamjit; GHAI, Nikhita; BEDI, Preet Mohinder Singh. Molecular Mechanisms Involved in Insulin Resistance: Recent Updates and Future Challenges. *In: Evolving Concepts in Insulin Resistance*. [s.l.]: IntechOpen, 2022. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/chapters/82197>>. Acesso em: 14 jan. 2025.

SINGURU, Gajalakshmi; PULIPAKA, Sriravali; SHAIKH, Altab; *et al.* Mitochondria targeted esculetin administration improves insulin resistance and hyperglycemia-induced atherosclerosis in db/db mice. **Journal of Molecular Medicine**, v. 102, n. 7, p. 927–945, 2024. Disponível em: <<https://link.springer.com/10.1007/s00109-024-02449-1>>. Acesso em: 14 fev. 2025.

SON, Myoungjin; WU, Jianping. Egg white hydrolysate and peptide reverse insulin resistance associated with tumor necrosis factor- α (TNF- α) stimulated mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in skeletal muscle cells. **European Journal of Nutrition**, v. 58, n. 5, p. 1961–1969, 2019. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00394-018-1753-7>>. Acesso em: 22 mar. 2025.

TIEN, Yun-Chen; LIAO, Jung-Chun; CHIU, Chuan-Sung; *et al.* Esculetin Ameliorates Carbon Tetrachloride-Mediated Hepatic Apoptosis in Rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 6, p. 4053–4067, 2011. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/12/6/4053>>. Acesso em: 7 mar. 2024.

TSALAMANDRIS, Sotirios; ANTONOPOULOS, Alexios S.; OIKONOMOU, Evangelos; *et al.* The Role of Inflammation in Diabetes: Current Concepts and Future Perspectives. **European Cardiology Review**, v. 14, n. 1, p. 50–59, 2019.

Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6523054/>>. Acesso em: 15 jan. 2025.

VAN MEERLOO, Johan; KASPERS, Gertjan J. L.; CLOOS, Jacqueline. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. *In*: CREE, Ian A. (Org.). **Cancer Cell Culture: Methods and Protocols**. Totowa, NJ: Humana Press, 2011, p. 237–245. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20>. Acesso em: 19 jan. 2025.

VASU, Srividya; MCGAHON, Mary K; MOFFETT, R Charlotte; *et al.* Esculentin-2CHa(1–30) and its analogues: stability and mechanisms of insulinotropic action. **Journal of Endocrinology**, v. 232, n. 3, p. 423–435, 2017. Disponível em: <<https://joe.bioscientifica.com/view/journals/joe/232/3/423.xml>>. Acesso em: 7 mar. 2024.

VIANNA, Damiana R.; BUBOLS, Guilherme; MEIRELLES, Gabriela; *et al.* Evaluation of the Antioxidant Capacity of Synthesized Coumarins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 6, p. 7260–7270, 2012. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/13/6/7260>>. Acesso em: 9 mar. 2024.

VIEIRA NETA, Francisca Adrielle; CRISÓSTOMO, Vicente Lima; CASTRO, Régia Christina Moura Barbosa; *et al.* **Avaliação do perfil e dos cuidados no pré-natal de mulheres com diabetes mellitus gestacional**. 2014. Disponível em: <<http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/10657>>. Acesso em: 9 mar. 2024.

VLAVCHESKI, Filip; DEN HARTOGH, Danja J.; GIACCA, Adria; *et al.* Amelioration of High-Insulin-Induced Skeletal Muscle Cell Insulin Resistance by Resveratrol Is Linked to Activation of AMPK and Restoration of GLUT4 Translocation. **Nutrients**, v. 12, n. 4, p. 914, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2072-6643/12/4/914>>. Acesso em: 14 jan. 2025.

WHITSON, Peggy A.; STUART, Charles A.; HULS, M. Helen; *et al.* Dexamethasone effects on creatine kinase activity and insulin-like growth factor receptors in cultured muscle cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 140, n. 1, p. 8–17, 1989. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.1041400103>>. Acesso em: 28 fev. 2025.

YANG, Sujuan; WANG, Julie; BRAND, David Douglass; *et al.* Role of TNF–TNF Receptor 2 Signal in Regulatory T Cells and Its Therapeutic Implications. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2018.00784/full>>. Acesso em: 20 fev. 2025.

YIN, Qiong; BRAMELD, John M.; PARR, Tim; *et al.* Leucine and mTORc1 act independently to regulate 2-deoxyglucose uptake in L6 myotubes. **Amino Acids**, v. 52, n. 3, p. 477–486, 2020. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00726-020-02829-0>>. Acesso em: 21 jan. 2025.

YOUNES, Areej Hazem; MUSTAFA, Yasser Fakri. Plant-Derived Coumarins: A Narrative Review of Their Structural and Biomedical Diversity. **Chemistry & Biodiversity**, v. 21, n. 6, p. e202400344, 2024. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbdv.202400344>>. Acesso em: 22 jan. 2025.

ZHANG, Jing; OH, Eunjin; MERZ, Karla E.; *et al.* DOC2B promotes insulin sensitivity in mice via a novel KLC1-dependent mechanism in skeletal muscle. **Diabetologia**, v. 62, n. 5, p. 845–859, 2019. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1007/s00125-019-4824-2>>. Acesso em: 14 jan. 2025.

ZHANG, Linlin; XIE, Qingxuan; LI, Xiaofang. Esculetin: A review of its pharmacology and pharmacokinetics. **Phytotherapy Research**, v. 36, n. 1, p. 279–298, 2022.

Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ptr.7311>>. Acesso em: 6 mar. 2024.

ZHU, Jing-Jing; JIANG, Jian-Guo. Pharmacological and Nutritional Effects of Natural Coumarins and Their Structure-Activity Relationships. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 62, n. 14, p. e1701073, 2018.