



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GIULIANA REGINA BIAZI

**EFEITOS DA INTERLEUCINA 6 SOBRE A
NEOGLICOGÊNESE, AÇÃO SUPRESSIVA DA INSULINA NA
GLICOGENÓLISE E SENSIBILIDADE PERIFÉRICA À
INSULINA**

Londrina
2022



Sociedade Brasileira de Fisiologia
SBFis



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

**PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA**

GIULIANA REGINA BIAZI

**EFEITOS DA INTERLEUCINA 6 SOBRE A NEOGLICOGÊNESE,
AÇÃO SUPRESSIVA DA INSULINA NA GLICOGENÓLISE E
SENSIBILIDADE PERIFÉRICA À INSULINA**

Londrina - Paraná
2022

GIULIANA REGINA BIAZI

**EFEITOS DA INTERLEUCINA 6 SOBRE A
NEOGLICOGÊNESE, AÇÃO SUPRESSIVA DA INSULINA NA
GLICOGENÓLISE E SENSIBILIDADE PERIFÉRICA À
INSULINA**

Trabalho submetido ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Helenir Medri de Souza.

Londrina
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

B579e Biazi, Giuliana Regina.
Efeitos da interleucina 6 (IL6) sobre a neoglicogênese, ação supressiva da insulina na glicogenólise e sensibilidade periférica à insulina / Giuliana Regina Biazi. - Londrina, 2022.
51 f. : il.

Orientador: Helenir Medri de Souza.
Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2022.
Inclui bibliografia.

1. Citocina - Tese. 2. AMPc - Tese. 3. Resistência à insulina - Tese. 4. Perfusão de fígado - Tese. I. Souza, Helenir Medri de. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

CDU 574

GIULIANA REGINA BIAZI

**EFEITOS DA INTERLEUCINA 6 SOBRE A
NEOGLICOGÊNESE, AÇÃO SUPRESSIVA DA INSULINA NA
GLICOGENÓLISE E SENSIBILIDADE PERIFÉRICA À
INSULINA**

Trabalho submetido ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof^a. Dr.^a Helenir Medri de Souza
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr. Ernane Torres Uchôa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Maria Fernanda Rodrigues Graciano
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Mirian Ayumi Kurauti
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Prof. Dr. Roberto Barbosa Bazotte
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Londrina, 29 de abril de 2022

BIAZI, Giuliana Regina. **Efeitos da interleucina 6 sobre a neoglicogênese, ação supressiva da insulina na glicogenólise e sensibilidade periférica à insulina.** 2022. 51 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

A interleucina 6 (IL6) é uma citocina que, além da sua função imunomoduladora, está envolvida com diversas respostas biológicas em vários tecidos, desempenhando importantes funções homeostáticas. Esta citocina exerce uma variedade de efeitos metabólicos, desempenhando importante função na regulação do metabolismo de lipídeos, proteínas e carboidratos, especialmente na homeostase da glicose. No entanto, o aumento crônico de IL6, como ocorre em doenças inflamatórias (diabetes tipo 2 e câncer), tem sido associado a vários distúrbios metabólicos, incluindo anormalidades no metabolismo da glicose. Embora alguns efeitos metabólicos da IL6 estão bem estabelecidos, seu efeito na neoglicogênese é controverso e sobre a ação da insulina no catabolismo do glicogênio estimulado pela adenosina monofosfato cíclica (AMPc) é desconhecido. Os objetivos principais deste estudo foram investigar os efeitos da IL6 sobre a neoglicogênese hepática a partir de vários precursores de glicose (alanina, piruvato e glutamina) e sobre a ação supressiva da insulina na glicogenólise hepática estimulada pelo AMPc em ratos. Os efeitos da IL6 na sensibilidade periférica à insulina também foram avaliados. Para estes propósitos, a IL6 foi administrada endovenosamente nos ratos. Uma (1) hora depois foram avaliadas a neoglicogênese e a glicogenólise, em perfusão de fígado *in situ*, e a sensibilidade periférica à insulina, por meio do teste de tolerância à insulina (ITT). A injeção endovenosa de IL6 aumentou a produção hepática de glicose a partir da alanina, sem alterar a produção de piruvato, lactato e ureia. A injeção de IL6 também aumentou a produção hepática de glicose a partir do piruvato e da glutamina. Além disso, a IL6 diminuiu o efeito inibitório da insulina na produção hepática de glicose e glicogenólise estimuladas pelo AMPc. Adicionalmente, a IL6 reduziu a constante de desaparecimento da glicose (kITT) no plasma, durante o ITT. Em conclusão, a IL6 agudamente (1 hora) aumentou a neoglicogênese a partir de vários precursores de glicose (alanina, piruvato e glutamina) e diminuiu o efeito supressivo da insulina na glicogenólise estimulada pelo AMPc e a sensibilidade periférica à insulina. Os resultados sugerem um papel importante da IL6 na patogênese da resistência hepática e periférica à insulina e no aumento da liberação hepática de glicose (neoglicogênese e glicogenólise) em doenças inflamatórias, tais como o diabetes tipo 2 e câncer.

Palavras-chave: citocina; AMPc; resistência à insulina; perfusão de fígado.

BIAZI, Giuliana Regina. **Effects of interleukin 6 (IL6) on gluconeogenesis, insulin suppressive action on glycogenolysis and peripheral insulin sensitivity.** 2022. 51 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

ABSTRACT

Interleukin 6 (IL6) is a cytokine that, in addition to its immunomodulatory function, is involved in several biological responses in various tissues, performing important homeostatic functions. This cytokine exerts a variety of metabolic effects, playing an important role in the regulation of lipid, protein and carbohydrate metabolism, especially in glucose homeostasis. However, the chronic increase of IL6, as occurs in inflammatory diseases (type 2 diabetes and cancer), has been associated with several metabolic disorders, including abnormalities in glucose metabolism. Although some metabolic effects of IL6 are well established, its effect on gluconeogenesis is controversial and on the action of insulin on glycogen catabolism stimulated by cyclic adenosine monophosphate (cAMP) is unknown. The main objectives of this study were to investigate the IL6 effects on hepatic gluconeogenesis from various glucose precursors (alanine, pyruvate and glutamine) and on insulin suppressive action in the cAMP-stimulated hepatic glycogenolysis in rats. The IL6 effects on peripheral insulin sensitivity were also evaluated. For these purposes, IL6 was administered intravenously to the rats. One (1) hour later, gluconeogenesis and glycogenolysis were evaluated in *in situ* liver perfusion, and peripheral insulin sensitivity using the insulin tolerance test (ITT). Intravenous injection of IL6 increased hepatic glucose production from alanine, without changing pyruvate, lactate and urea production. IL6 injection also increased hepatic glucose production from pyruvate and glutamine. Furthermore, IL6 decreased the insulin inhibitory effect on hepatic glucose production and glycogenolysis stimulated by cAMP. Additionally, IL6 reduced the plasma glucose disappearance constant (kITT) during ITT. In conclusion, IL6 acutely (1 hour) increased gluconeogenesis from several glucose precursors (alanine, pyruvate, and glutamine) and decreased the insulin suppressive effect on cAMP-stimulated glycogenolysis and peripheral insulin sensitivity. The results suggest an important role for IL6 in the pathogenesis of hepatic and peripheral insulin resistance and in the enhancement of hepatic glucose release (gluconeogenesis and glycogenolysis) in inflammatory diseases such as type 2 diabetes and cancer.

Key words: cytokine; cAMP; insulin resistance; liver perfusion.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Efeitos da interleucina 6 (IL6) sobre a ação supressiva da insulina nas vias hepáticas liberadoras de glicose (glicogenólise e neoglicogênese)	15
Figura 2 - Efeito da interleucina 6 (IL6) na produção hepática de glicose (neoglicogênese) a partir da alanina	24
Figura 3 - Efeito da interleucina 6 (IL6) na produção hepática de piruvato a partir da alanina	25
Figura 4 - Efeito da interleucina 6 (IL6) na produção hepática de lactato a partir da alanina	26
Figura 5 - Efeito da interleucina 6 (IL6) na produção hepática de ureia a partir da alanina	27
Figura 6 - Efeito da interleucina 6 (IL6) na produção hepática de glicose (neoglicogênese) a partir do piruvato	28
Figura 7 - Efeito da interleucina 6 (IL6) na produção hepática de glicose (neoglicogênese) a partir da glutamina	29
Figura 8 - Efeito da interleucina 6 (IL6) sobre a ação supressiva da insulina na produção hepática de glicose estimulada pelo AMPc	31
Figura 9 - Efeito da interleucina 6 (IL6) sobre a ação da insulina na produção hepática de lactato em presença do AMPc	32
Figura 10 - Efeito da interleucina 6 (IL6) sobre a ação da insulina na produção hepática de piruvato em presença do AMPc	33
Figura 11 - Efeito da interleucina 6 sobre a ação supressiva da insulina na glicogenólise estimulada pelo AMPc.	34
Figura 12 - Efeito da interleucina 6 (IL6) sobre a glicemia e constante de desaparecimento da glicose durante o teste de tolerância à insulina	35

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Protocolos de perfusão para avaliação do efeito da IL6 na neoglicogênese hepática..... 20
- Tabela 2** - Protocolos de perfusão para avaliação do efeito da IL6 na ação supressiva da insulina na glicogenólise estimulada pelo AMPc..... 21

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Adenilato ciclase
AGL	Ácido graxo livre
AKT	Proteína quinase B
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina trifosfato
AUC	Área sob a curva
EPM	Erro padrão da média
G6Pase	Glicose 6-fosfatase
IL1	Interleucina 1
IL6	Interleucina 6
KH	Tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato
PBS	Salina tamponada com fosfato
PDE3B	Fosfodiesterase 3B
PDK1	Proteína quinase dependente de fosfoinosítídeos
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
pH	Potencial hidrogeniônico
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5 trisfosfato
PI3K	proteína quinase 3
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
SOCS3	Proteína supressora de sinalização de citocina 3
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVO	18
3	MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1	QUÍMICOS	19
3.2	ANIMAIS E ADMINISTRAÇÃO DE IL6	19
3.3	PERFUSÃO DE FÍGADO <i>IN SITU</i> PARA AVALIAÇÃO DA NEOGLICOGÊNESE E GLICOGENÓLISE	19
3.4	TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT) PARA AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE PERIFÉRICA À INSULINA	21
3.5	PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS	22
3.6	PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS	22
4	RESULTADOS	23
4.1	EFEITOS DA IL6 NA NEOGLICOGÊNESE	23
4.2	EFEITOS DA IL6 SOBRE A AÇÃO SUPRESSIVA DA INSULINA NA GLICOGENÓLISE	30
4.3	EFEITOS DA IL6 NA SENSIBILIDADE PERIFÉRICA À INSULINA	35
5	DISCUSSÃO	36
6	CONCLUSÃO	41
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1. INTRODUÇÃO

A interleucina 6 (IL6) é uma citocina pró-inflamatória multifuncional que modula uma variedade de respostas biológicas, incluindo respostas imune, inflamatória, de fase aguda, hematopoiética e metabólica, desempenhando importantes funções homeostáticas (MIHARA et al., 2012; TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014; GARBERS et al., 2018).

A IL6 é sintetizada por muitos tipos celulares, como macrófagos, monócitos, linfócitos, células endoteliais, fibroblastos, adipócitos, miócitos e hepatócitos, e pode ter efeitos em diversos tipos de células (proteína pleiotrópica), por meio de ações autócrinas, parácrinas e endócrinas (TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014).

Os efeitos da IL6 são mediados por duas vias de sinalização: clássica e de trans-sinalização (CHEN et al., 2019). Na via clássica a IL6 se liga ao receptor transmembrana (IL6-R_m), enquanto na via de trans-sinalização a IL6 se liga a forma solúvel do receptor (IL6-R_s). Os complexos IL6-R_m ou IL6-R_s desencadeiam a homodimerização de proteínas gp130 (transdutoras de sinal) e a consequente ativação de JAK (janus quinases). JAK ativada induz a fosforilação de proteínas STAT (transdutores de sinais e ativadores de transcrição), como a STAT3, e a sua dimerização e translocação para o núcleo para regular a transcrição de genes alvo (BASTARD et al., 2006) (Figura 1).

A ativação de uma via de sinalização (clássica) ou de outra (trans-sinalização) reflete diferenças nas respostas da IL6, sendo as respostas inflamatórias atribuídas à ativação da via de trans-sinalização (GARBERS; APARICIO-SIEGMUND; ROSE-JOHN, 2015). Estudos mostram que o bloqueio da via de trans-sinalização diminui o quadro pró-inflamatório sem afetar os efeitos da IL6 na homeostase metabólica (via clássica) (GREENHILL et al., 2011; ROSE-JOHN, 2012; KRAAKMAN et al., 2016; AKBARI; HASSAN-ZADEH, 2018; GARBERS; ROSE-JOHN, 2018; ROBINSON et al., 2020).

A IL6, embora tradicionalmente conhecida por sua função imunomoduladora, também modula o metabolismo de lipídeos, proteínas e carboidratos, exercendo uma variedade de efeitos metabólicos (GHANEMI; ST-AMAND, 2018).

A IL6 estimula a lipólise, aumenta a oxidação de ácidos graxos livres (AGLs) e reduz a atividade da lipase de lipoproteína em cultura de adipócitos (TRUJILLO et al., 2004, PETERSEN et al., 2005). A IL6 também aumenta a oxidação de AGLs em músculo incubado (BRUCE; DYCK, 2004) e em cultura de miotubos (AL-KHALILI et al., 2006; CAREY et al., 2006). Em consistência, a infusão (*in vivo*) de IL6 estimula a lipólise, aumenta a concentração circulante e a oxidação de AGLs e inibe a lipogênese (STOUTHARD et al., 1995; LYNGSO; SIMONSEN; BULOW, 2002; VAN HALL et al., 2003; PETERSEN et al., 2005), sugerindo efeito catabólico da IL6 no metabolismo lipídico.

Outros estudos mostram que a IL6 encurtou a meia-vida de proteínas de vida longa e aumenta a atividade do proteassoma 26S (componente da via proteolítica ubiquitina proteassoma) e das catepsinas (enzimas da via proteolítica lisossomal) em cultura de miotubos, sugerindo papel proteolítico da IL6 (EBISUI et al., 1995).

A IL6 também estimula a glicogênio fosforilase (enzima-chave da glicogenólise) (KANEMAKI et al., 1998) e a glicogenólise em hepatócitos isolados (VAARTJES et al., 1990) e em cultura de hepatócitos (RITCHIE, 1990), evidenciando seu efeito catabólico no metabolismo do glicogênio. Em acordo, camundongos portadores de tumor secretor de IL6 apresentam menor conteúdo de glicogênio no fígado (METZGER et al., 1997) e a administração de IL6 diminui o glicogênio hepático (LIENENLUKE; CHRIST, 2007) e aumenta a glicemia (STOUTHARD et al., 1995; TSIGOS et al., 1997b).

Com relação a neoglicogênese hepática, foi verificado que a IL6 estimula diretamente a produção de glicose a partir do lactato em cultura de hepatócitos (BLUMBERG et al., 1995; FRITSCHÉ et al., 2010), sem afetar a expressão da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e glicose 6-fosfatase (G6Pase), enzimas-chave da neoglicogênese (FRITSCHÉ et al., 2010). Também foi observado que a administração de IL6, assim como a IL6 liberada do músculo, durante exercício intenso e prolongado, aumenta o conteúdo hepático de RNAm da PEPCK (BANZET et al., 2009), sugerindo aumento da neoglicogênese.

Entretanto, outros estudos mostram efeito inibitório da IL6 na neoglicogênese. A IL6 previne o aumento de RNAm da PEPCK durante a fase inicial de jejum (LIENENLUKE; CHRIST, 2007) e atenua a expressão da PEPCK

induzida por glucagon (CHRIST et al., 1994) e dexametasona/adenosina monofosfato cíclica (AMPc) (INOUE et al., 2004) em cultura de hepatócitos. A inoculação de tumor secretor de IL6 também reduz o RNAm da G6Pase, sem afetar a atividade da PEPCK hepática (METZGER et al., 1997).

Adicionalmente, há estudos mostrando ausência de efeito da IL6 na neoglicogênese. A IL6 não afetou a neoglicogênese a partir do lactato (VAARTJES et al., 1990; TANAKA et al., 2018) em cultura de hepatócitos. Em outro estudo, a falta de IL6 em camundongos deficientes desta citocina (IL6^{-/-}) não reduziu a liberação hepática de glicose durante o jejum (FRITSCHE et al., 2010). Portanto, não há consenso sobre os efeitos da IL6 na neoglicogênese, a qual pode ser devida aos diferentes protocolos utilizados nos estudos.

Além dos efeitos metabólicos diretos da IL6, esta citocina pode ter efeitos indiretos sobre o metabolismo, modulando a ação de alguns hormônios. A infusão de IL6 aumenta a concentração plasmática de glucagon, cortisol e hormônio de crescimento (PETERSEN et al., 2005; TSIGOS et al., 1997a; TSIGOS et al., 1997b). Essas alterações hormonais, juntamente com a resistência à insulina induzida pela IL6, podem resultar em estimulação da lipólise, proteólise, glicogenólise e neoglicogênese (LUNDHOLM; HOLM; SCHERSTÉN, 1978; COPELAND et al., 1987; TAYEK, 1992; ROFE et al., 1994).

Com relação a resistência à insulina, elevações crônicas de IL6, promovidas por tumores secretores de IL6 (METZGER et al., 1997), ou a produção aumentada de IL6, causada por inflamação de baixo grau (CAI et al. 2005), resultam em resistência à insulina. Em corroboração, a IL6 inibe a sinalização e ação da insulina em hepatócitos isolados, em linhagens celulares de hepatócitos (HepG2) e no fígado (SENN et al., 2003; KIM; HIGASHIMORI; PARK, 2004; KLOVER et al., 2005; KIM et al., 2008). Foi também mostrado que a IL6 induz resistência à insulina em cultura de adipócitos (LAGATHU et al., 2003; ROTTER et al., 2003). Além disso, anticorpos neutralizantes para IL6 aumentam a sensibilidade à insulina em camundongos resistentes à insulina (ob/ob) (KLOVER et al., 2005), reforçando a relação entre a elevação de IL6 e resistência à insulina.

O mecanismo exato de interação entre a IL6 e a via de sinalização da insulina ainda não está claramente elucidado, mas parece envolver aumento de

proteínas supressoras de sinalização de citocinas (SOCS) e/ou ativação de tirosina fosfatases (BASTARD et al., 2006; FIGLER et al., 2011).

No hepatócito (Figura 1), a IL6 por ativação da via JAK/STAT (GLUND; KROOK, 2008), aumenta a expressão gênica de SOCS3, uma proteína que atua como regulador negativo da sinalização de citocinas e que parece ser um potente inibidor da sinalização da insulina. Em acordo, a administração de IL6 em camundongos induz a transcrição de SOCS3 nos hepatócitos (SENN et al., 2003). A IL6 também aumenta a expressão de SOCS3 em cultura de adipócitos (LAGATHU et al., 2003).

A SOCS3 (Figura 1) se associa com o receptor de insulina reduzindo sua autofosforilação, e conseqüentemente, a fosforilação da tirosina do substrato 1 do receptor de insulina (IRS1), a associação do IRS1 com a subunidade p85 da proteína quinase 3 (PI3K), a conversão de fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PIP2) para fosfatidilinositol 3,4,5 bisfosfato (PIP3), a ativação da proteína quinase dependente de fosfoinosítídeos (PDK1) e a fosforilação/ativação da AKT (proteína quinase B) (SENN et al., 2002). A redução da fosforilação da AKT diminui a transmissão do sinal da insulina e os seus efeitos metabólicos (CARVALHEIRA et al., 2002).

A AKT desempenha papel central na sinalização da insulina em vários tecidos. No hepatócito (Figura 1), a redução da fosforilação da AKT, por interferências negativas na via de sinalização da insulina, como a resistência à insulina induzida pela IL6, diminui a atividade da fosfodiesterase 3B (PDE3B), a enzima que degrada o AMPc, o segundo mensageiro do glucagon (CARVALHEIRA et al., 2002). Isso resulta em aumento de AMPc intracelular e conseqüentemente em ativação da proteína quinase dependente de AMPc (PKA).

A PKA-ativada por AMPc induz a fosforilação/ativação da glicogênio fosforilase (enzima-chave da glicogenólise), aumentando o catabolismo do glicogênio (EXTON, 1987; RAMNANAN et al., 2011). A PKA-ativada por AMPc também induz a fosforilação/ativação da enzima bifuncional e conseqüentemente a ativação da frutose-1,6-bisfosfatase (Fru-1,6-Pase), enzima-chave da neoglicogênese, estimulando a neoglicogênese (PILKIS; GRANNER, 1992). Adicionalmente, a PKA-ativada por AMPc promove a fosforilação/inibição da piruvato quinase, diminuindo a conversão do fosfoenolpiruvato para piruvato, o que

aumenta a concentração do fosfoenolpiruvato e assim a neoglicogênese (PILKIS; GRANNER, 1992; SHARABI et al., 2015). Portanto, o aumento de AMPc intracelular, promovido por resistência à insulina induzida por IL6, estimula a glicogenólise e neoglicogênese, aumentando a liberação hepática de glicose e glicemia (PILKIS & GRANNER, 1992) (Figura 1).

Nas células adiposas e musculares, a redução da fosforilação da AKT, promovida pela resistência à insulina, reduz a translocação de transportadores de glicose GLUT4 para a membrana plasmática, efeito que diminui a captação periférica de glicose e aumenta a glicemia (SALTIEL; KHAN, 2001; CARVALHEIRA et al., 2002). Foi reportado que a IL6 reduz a fosforilação de IRS1 e AKT e a expressão de GLUT4 em cultura de adipócitos, efeitos que resultam em redução da captação de glicose e da lipogênese (LAGATHU et al., 2003).

Entretanto, no músculo esquelético, a IL6 não antagoniza a ação da insulina (KLOVER et al., 2005), embora KIM e colaboradores (2004) observaram resistência à insulina no músculo após tratamento com IL6. Pelo contrário, a IL6 aumenta a ação da insulina em cultura de células de músculo esquelético (WEIGERT et al., 2005, AL-KHALILI et al., 2006), efeito que aumenta o GLUT4 na membrana e a captação de glicose. Portanto, a IL6 parece ter efeitos distintos nos diferentes tecidos, induzindo resistência à insulina no fígado e tecido adiposo e aumentando a sensibilidade à insulina no músculo esquelético.

A síntese de IL6 é precisamente regulada por mecanismos transcricionais e pós-transcricionais (TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014). A síntese de IL6 aumenta em situações como: a) estresse metabólico causado por exercício físico intenso e prolongado (STEENSBERG et al., 2000); b) estresse infeccioso causado por bactérias, fungos e vírus e c) estresse inflamatório causado por doenças inflamatórias e injúria tecidual (lesões e traumas) (TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014).

É sugerido que a IL6 sintetizada e liberada pelas células musculares, durante exercício intenso e prolongado, aumentaria a captação e oxidação de glicose e AGLs pelo músculo em atividade, via efeitos autócrinos (GLUND; KROOK, 2008). A IL6 liberada pelo músculo também aumentaria a disponibilidade de substratos energéticos (glicose e AGLs) para a contração muscular, via efeitos no fígado (estimulação da glicogenólise) e tecido adiposo (estimulação da lipólise),

desempenhando papel importante na capacidade de execução de exercício e manutenção da normoglicemia (GLUND; KROOK, 2008).

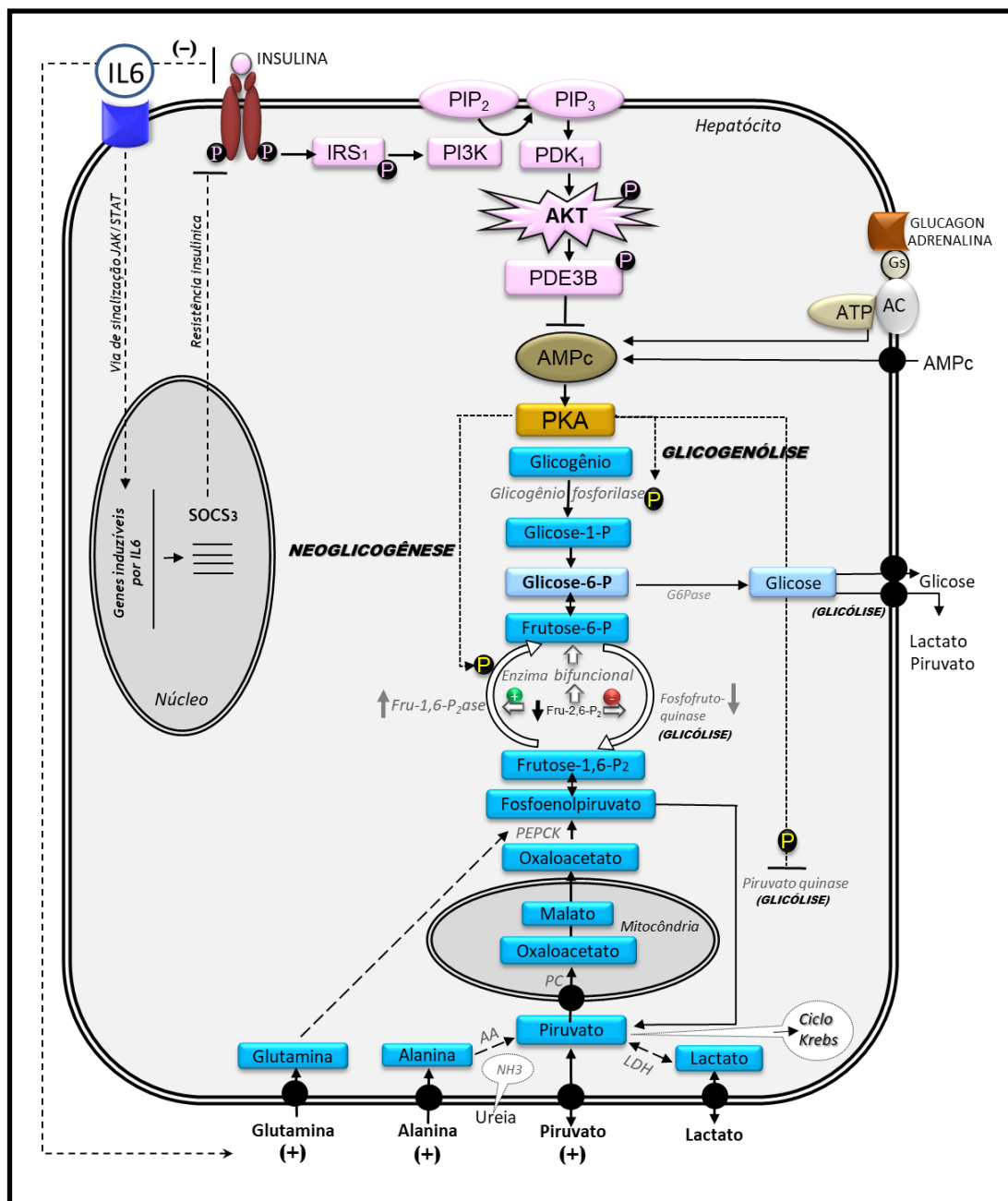


Figura 1. Efeitos da interleucina 6 (IL6) sobre a ação supressiva da insulina nas vias hepáticas liberadoras de glicose (glicogenólise e neoglicogênese). AA, alanina aminotransferase; AC, adenilato ciclase; AKT, proteína quinase B; AMPc, adenosina monofosfato cíclica; ATP, adenosina trifosfato; Fru-2,6-P₂ase, frutose-2,6-bisfosfatase; G6Pase, glicose 6-fosfatase; Gs, proteínas G; IRS1, substrato do receptor de insulina 1; JAK/STAT, janus quinases/ transdutores de sinais e ativadores de transcrição; LDH, lactato desidrogenase; NH₃, amônia; P, fosfato; PC, piruvato carboxilase; PDE3B, fosfodiesterase 3B; PDK1, proteína quinase dependente de fosfoinositídeos; PEPCCK, fosfoenolpiruvato carboxiquinase; PI3K, fosfatidilinositol 3-quinase; PIP₂, fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato; PIP₃, fosfatidilinositol 3,4,5 trisfosfato; PKA, proteína quinase dependente de AMPc; SOCS3, supressor da sinalização de citocina 3; (+), estimulação; (- ou), inibição.

O aumento da síntese de IL6 durante o estresse infeccioso ou inflamatório é importante para a mobilização de substratos, como glicose, AGLs e/ou aminoácidos, requeridos por tecidos e órgãos, contribuindo para a adaptação e/ou defesa do organismo (homeostase). Os macrófagos, monócitos e linfócitos são as principais fontes de IL6 no estresse infeccioso ou inflamatório (TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014).

A síntese aumentada de IL6, nas diversas situações de estresse (metabólico, infeccioso ou inflamatório), diminui quando a homeostase do organismo é restaurada, sendo, portanto, transitória.

A síntese desregulada e contínua de IL6 tem sido associada a algumas anormalidades metabólicas presentes em doenças inflamatórias, como o diabetes tipo 2 quando associado à obesidade e o câncer (GOYDOS et al., 1998; ADLER et al., 1999; TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014; AKBARI; HASSAN-ZADEH, 2018).

A síntese aumentada de IL6 em obesos, por adipócitos e macrófagos infiltrados no tecido adiposo (TRUJILLO et al., 2004), parece ser um dos fatores indutores de resistência à insulina, ou seja, um dos elos de ligação na associação entre obesidade e diabetes tipo 2 (HOTAMISLIGIL, 2006; TILG; MOSHEN, 2006; AKBARI; HASSAN-ZADEH, 2018). Foi observado que o aumento de IL6, causado por inflamação de baixo grau, como ocorre na obesidade, resultou em camundongos com fenótipo diabético, o qual foi revertido com anticorpos neutralizantes para IL6 (CAI et al., 2005). Em corroboração, a neutralização da IL6 com anticorpos melhora a ação hepática da insulina em camundongos geneticamente obesos (KLOVER et al., 2005). Além disso, a administração crônica de IL6 em camundongos, em concentração semelhante a presente em indivíduos obesos, causa resistência hepática à insulina (KLOVER et al., 2003).

Além do aumento da glicogenólise, a resistência à insulina também causa aumento acentuado da neoglicogênese, uma das principais alterações que contribuí para a hiperprodução hepática de glicose e hiperglicemia de jejum no diabetes tipo 2 (MAGNUSSON et al., 1992).

Em portadores de câncer, a síntese aumentada de IL6 pelo sistema imune, em resposta à presença do tumor, poderia também estar associada a resistência à insulina (LUNDHOLM; HOLM; SCHERSTÉN, 1978; TAYEK, 1992; ROFE et al.,

1994; ARGILÉS; LOPEZ-SORIANO, 2001; HONORS; KINZIG, 2012; DE FATIMA SILVA et al., 2017), e ao aumento da glicogenólise (HIRAI; ISHIKO; TISDALE, 1997; VICENTINO et al., 2002; CASSOLLA et al., 2011) e da neoglicogênese (WATERHOUSE; JEANPRETRE; KEILSON, 1979; LUNDHOLM et al., 1982), frequentemente observados em animais e humanos com câncer.

Além disso, o aumento de IL6 é apontado como um dos mediadores da intensa lipólise e proteólise em portadores de câncer (MUELLER et al., 2016; PORPORATO, 2016), a qual resulta em severa perda de massa adiposa, muscular e corpórea (caquexia) (STRASSMANN et al., 1992). Foi mostrado que o aumento de IL6, produzido por tumor secretor desta citocina, causa perda de peso (METZGER et al., 1997) e o tratamento com anticorpo neutralizante para IL6 ou para o receptor de IL6 reverte a caquexia em camundongos portadores de adenocarcinoma de cólon (FUJITA et al., 1996; STRASSMANN et al., 1992).

Em síntese, a literatura mostra que alguns efeitos da IL6 estão bem estabelecidos e que o aumento crônico desta citocina está associado a anormalidades metabólicas presentes em algumas doenças inflamatórias, tais como o diabetes tipo 2 e câncer. Entretanto, outros efeitos metabólicos da IL6 necessitam de investigação.

Considerando que o efeito da IL6 na neoglicogênese hepática é controverso e que, apesar do efeito bem conhecido da IL6 na indução de resistência hepática à insulina, ainda não há estudos, até onde conhecemos, avaliando o efeito desta citocina sobre a ação supressiva da insulina na glicogenólise estimulada pelo AMPc, seguem os objetivos do presente trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral:

Investigar os efeitos da IL6 sobre a neoglicogênese, a ação supressiva da insulina na glicogenólise e a sensibilidade periférica à insulina em ratos.

2.2 Específicos:

Avaliar os efeitos da administração endovenosa de IL6 sobre:

- 2.2.1 A neoglicogênese a partir de alanina, piruvato e glutamina, em estudos de perfusão de fígado *in situ*;
- 2.2.2 A ação supressiva da insulina na glicogenólise estimulada pelo AMPc, em estudos de perfusão de fígado *in situ*;
- 2.2.3 A sensibilidade periférica à insulina, por meio do teste de tolerância à insulina (ITT);

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Químicos

A IL6 foi adquirida da Peprotech (Ribeirão Preto, Brasil), a insulina regular (Humalog®) da Eli Lilly do Brasil Ltda (Rio de Janeiro, Brasil), o AMPc da Sigma Chemical Co. (St Louis, USA). Os sais do líquido de perfusão, os precursores neoglicogênicos e os demais reagentes foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St Louis, USA), Merck & Co. (Darmstad, Germany), Reagen (Rio de Janeiro, Brasil) ou Laborclin (Pinhais/PR, Brasil). Os kits utilizados para as dosagens de glicose, piruvato, lactato e uréia foram obtidos da Ebram (Belenzinho/SP, Brasil).

3.2 Animais e administração de IL6

Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comissão de Ética no Uso de Animais da UEL (CEUA/UEL, nº de registro 15825.2018.49). Os ratos foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina e mantidos no Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas, em gaiolas coletivas, a uma temperatura de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ e com ciclo claro/escuro de 12 horas. Foram utilizados ratos machos adultos da linhagem Wistar (220-230 g), com livre acesso à água e alimentados à vontade com ração Nuvilab®. Para avaliação da neoglicogênese os ratos foram submetidos a 24 horas de privação alimentar para retirar a interferência do conteúdo do glicogênio hepático na análise dos resultados. Nos demais experimentos foram utilizados ratos alimentados.

A administração de IL6 (10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) nos ratos, previamente sedados com anestesia inalatória, consistiu na injeção endovenosa (veia peniana) de 200 μl de uma solução de salina tamponada (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 8,1 mM, 1,76 mM, KH_2PO_4 e albumina sérica bovina 0,1%), pH 7,4, contendo 2 μg IL6. Ratos controles foram injetados com 200 μl de solução de salina tamponada (veículo), no lugar da IL6. A IL6 ou veículo foram sempre administrados no mesmo horário (às 8 horas) para minimizar variações circadianas. Todos os experimentos foram realizados 1 hora depois da administração de IL6 (às 9 horas).

3.3 Perfusão de fígado *in situ* para avaliação da neoglicogênese e glicogenólise

Os animais foram pesados e submetidos à técnica de perfusão de fígado

in situ (KELMER-BRACHT et al., 1984). No sistema de perfusão, o líquido de perfusão, tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (KH: NaCl 115 mM, NaHCO₃ 25 mM, KCl 5,8 mM, Na₂SO₄ 1,2 mM, MgCl₂ 1,18 mM, NaH₂PO₄ 1,2 mM e CaCl₂ 2,5 mM), é impulsionado pela bomba peristáltica até o oxigenador de membrana. Nesse local o líquido é saturado com O₂:CO₂ (95%:5%), aquecido a 37 °C e seu pH passa de 7,6 para pH 7,4. O líquido de perfusão deixa o oxigenador de membrana, passa pelo capta-bolhas e se desloca em direção à cânula a ser inserida na veia porta.

Para a perfusão do fígado, os ratos previamente pesados, foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg.Kg⁻¹) pela via intraperitoneal. Os ratos anestesiados foram submetidos à laparotomia para exposição do fígado e canulação da veia porta. Imediatamente após a introdução da cânula na veia porta, os vasos abdominais abaixo do fígado foram seccionados para permitir o seu dessangramento. Em seguida, a veia cava acima do diafragma foi ocluída para desviar o líquido de perfusão para a veia cava abaixo do fígado, a qual foi canulada para a coleta do líquido efluente do fígado. Logo após, o fluxo através do fígado foi ajustado para valores que permitissem sua oxigenação adequada (4 mL.min⁻¹. g⁻¹ de fígado).

Os fígados foram perfundidos durante 20 minutos iniciais com o tampão KH para estabilização do consumo de oxigênio. Depois disso, os fígados foram submetidos a um dos protocolos de perfusão esquematizados adiante (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Protocolos de perfusão para avaliação do efeito da IL6 na neoglicogênese hepática:

Ratos com 24 horas de privação alimentar		
0-10 min	10-40 ou 10-80 min	40-60 ou 80-100 min
KH	KH + alanina (2,5 mM) KH + piruvato (2,0 mM) KH + glutamina (2,5 mM)	KH

*KH=Krebs/Henseleit

Tabela 2. Protocolos de perfusão para avaliação do efeito da IL6 na ação supressiva da insulina na glicogenólise estimulada pelo AMPc:

Ratos alimentados		
0-10 min	10-25 min	25-50 min
KH	KH + AMPc (3 μ M)	KH + AMPc (3 μ M) ou KH + AMPc (3 μ M) + insulina (20 μ U. mL ⁻¹)

*KH= Krebs/Henseleit

Durante a perfusão, amostras do líquido efluente do fígado foram coletadas, em intervalos de 2 minutos, para determinação das concentrações de glicose, lactato e/ou piruvato.

Ao final dos experimentos, os fígados foram retirados e pesados para a quantificação das produções de glicose, lactato, piruvato e ureia por grama de fígado. A neoglicogênese corresponde a glicose produzida pelo fígado durante a infusão dos precursores de glicose (alanina, piruvato ou glutamina) (DE SOUZA et al., 2015). A glicogenólise foi calculada pela soma da produção de glicose + $\frac{1}{2}$ da soma da produção de piruvato + lactato (DE MORAIS, et al., 2012). As áreas sob as curvas (AUCs) da produção de glicose, lactato, piruvato e ureia foram calculadas nos intervalos indicados nas legendas das figuras, tomando como valor basal a média dos dois últimos pontos que antecedem a curva.

3.4 Teste de tolerância à insulina (ITT) para avaliação da sensibilidade periférica à insulina

A resposta glicêmica para a insulina foi avaliada por meio do ITT. Neste teste, a insulina regular (0,25 UI.kg⁻¹) foi administrada na veia cava inferior em ratos anestesiados com tiopental (50 mg.kg⁻¹). Amostras de sangue para avaliação da glicemia foram coletadas da veia cava inferior nos tempos 0 (basal), 5, 10, 15 e 30 minutos após a administração de insulina. A constante de desaparecimento da glicose no plasma (kITT), um indicador da sensibilidade periférica a insulina, foi calculada a partir da regressão linear dos valores da glicemia obtidos entre 5 a 15 minutos após a administração de insulina, intervalo onde ocorre a fase linear de queda da glicemia (BONORA et al., 1989; SERAPHIM; NUNES; MACHADO, 2001).

3.5 Procedimentos analíticos

As concentrações de glicose no plasma e perfusado hepático (BERGMEYER; BERNT, 1974) e as de piruvato (CZOK; LAMPRECHT, 1974), lactato (GUTMAN; WAHLEFELD, 1974) e ureia (GUTMANN; BERGMEYER, 1974) no perfusado hepático foram medidas por métodos enzimáticos padronizados.

3.6 Procedimentos estatísticos

A distribuição normal (testes de Shapiro-Wilk) e a homogeneidade das variâncias (testes de Brown Forsythe) foram testadas e testes estatísticos apropriados (ANOVA seguido por Newman-Keuls ou teste *t* de Student) foram empregados para análise dos resultados. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média e um nível de significância de 5% ($p < 0,05$) foi adotado.

4. RESULTADOS

4.1 Efeitos da IL6 na neoglicogênese

Os valores basais de produção de glicose, antes da infusão dos precursores neoglicogênicos (0-10 min), foram baixos (inferiores a $0,2 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) e refletem o baixo conteúdo de glicogênio presente no fígado dos ratos submetidos a 24 horas de privação alimentar. Esta condição é necessária para diminuir a interferência da produção de glicose originária da glicogenólise, daquela proveniente da infusão dos precursores neoglicogênicos (Figuras 2A, 6A e 7A).

A infusão de alanina (2,5 mM) no fígado, no intervalo entre 10 e 40 minutos, aumentou a produção de glicose nos ratos que receberam a injeção de IL6 ou veículo (controle), 1 hora antes da perfusão (Figura 2A). Entretanto, a produção de glicose a partir da alanina (neoglicogênese) foi maior ($p < 0.05$) nos ratos que receberam IL6 do que nos ratos controles (Figura 2A), como evidenciado pelas AUCs (Figura 2B).

A infusão de alanina (2,5 mM) no fígado também aumentou as produções de piruvato (Figura 3A), lactato (Figura 4A) e ureia (Figura 5A). Entretanto, as produções destes metabólitos foram semelhantes entre os ratos que receberam IL6 e controles, como evidenciado pelas AUCs (Figuras 3B, 4B e 5B).

A infusão de piruvato (2,0 mM) no fígado, entre 10 e 40 minutos da perfusão, também aumentou a produção de glicose nos ratos que receberam IL6 ou veículo (controle) (Figura 6A). A produção de glicose a partir do piruvato também foi maior ($p < 0.05$) nos ratos que receberam IL6 do que nos controles (Figura 6A), como evidenciado pelas AUCs (Figura 6B).

A infusão de glutamina (2,5 mM), entre 10 e 80 minutos, também aumentou a produção de glicose no fígado dos ratos que receberam IL6 ou veículo (controle) (Figura 7A). Similarmente à alanina e ao piruvato, o aumento da produção de glicose foi maior ($p < 0.05$) nos ratos que receberam IL6 do que nos ratos controles, como mostrado pelas AUCs (Figura 7B).

As produções de glicose, piruvato, lactato e ureia dos ratos que receberam IL6 ou veículo (controles) retornaram gradativamente em direção aos valores basais após o término da infusão dos precursores neoglicogênicos (Figuras 2A a 7A).

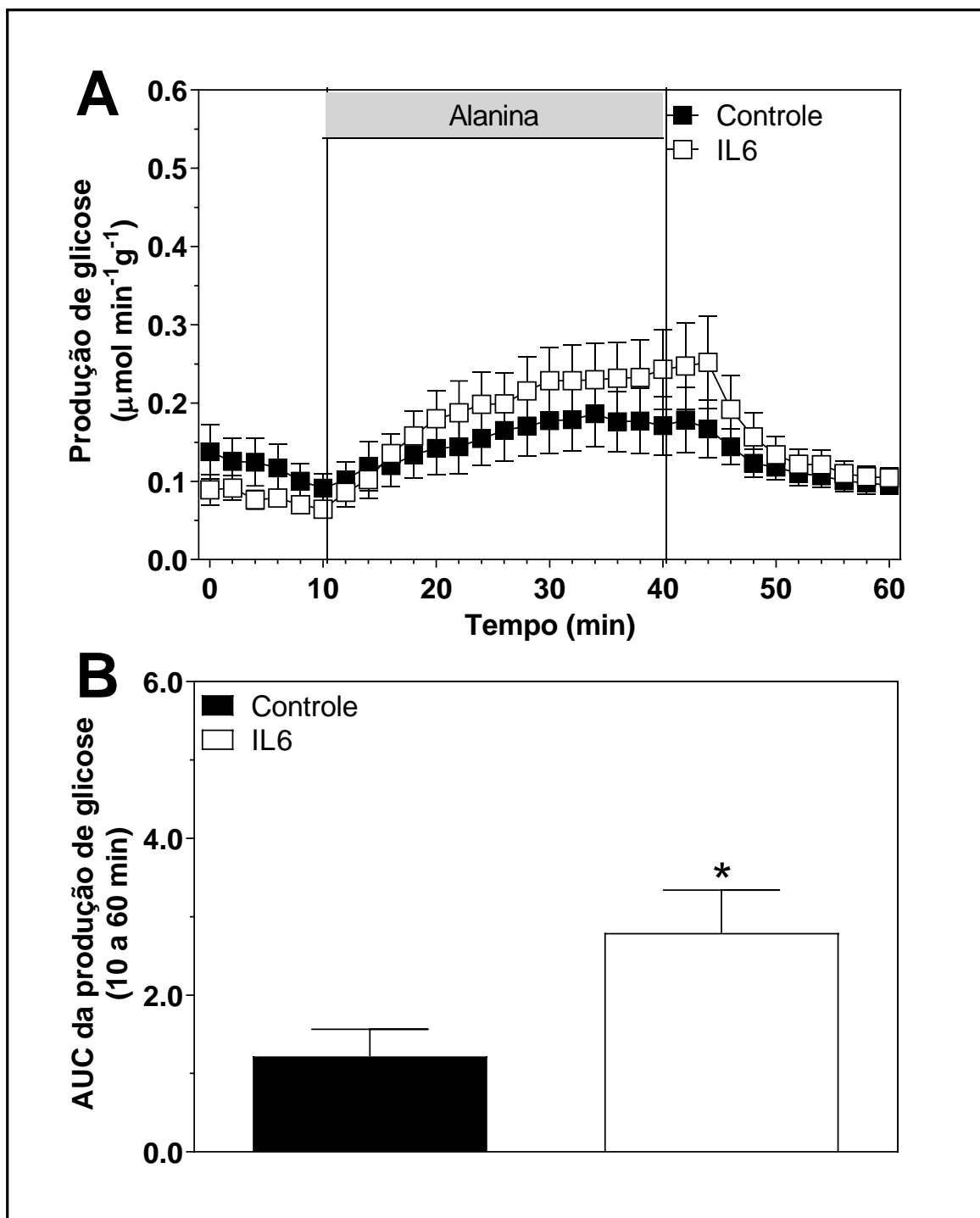


Figura 2. Efeito da interleucina 6 (IL6) na produção hepática de glicose (neoglicogênese) a partir da alanina (A) e as áreas sob as curvas (AUC) (B). Fígados de ratos com 24 h de privação alimentar foram submetidos a perfusão 1 h após a administração endovenosa de IL6 (10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) ou veículo (Controle). Alanina (2,5 mM) foi infundida entre 10-40 min. Os dados são a média \pm SEM de 8 experimentos. ** $p < 0,01$ vs controle (Teste t de Student não pareado).

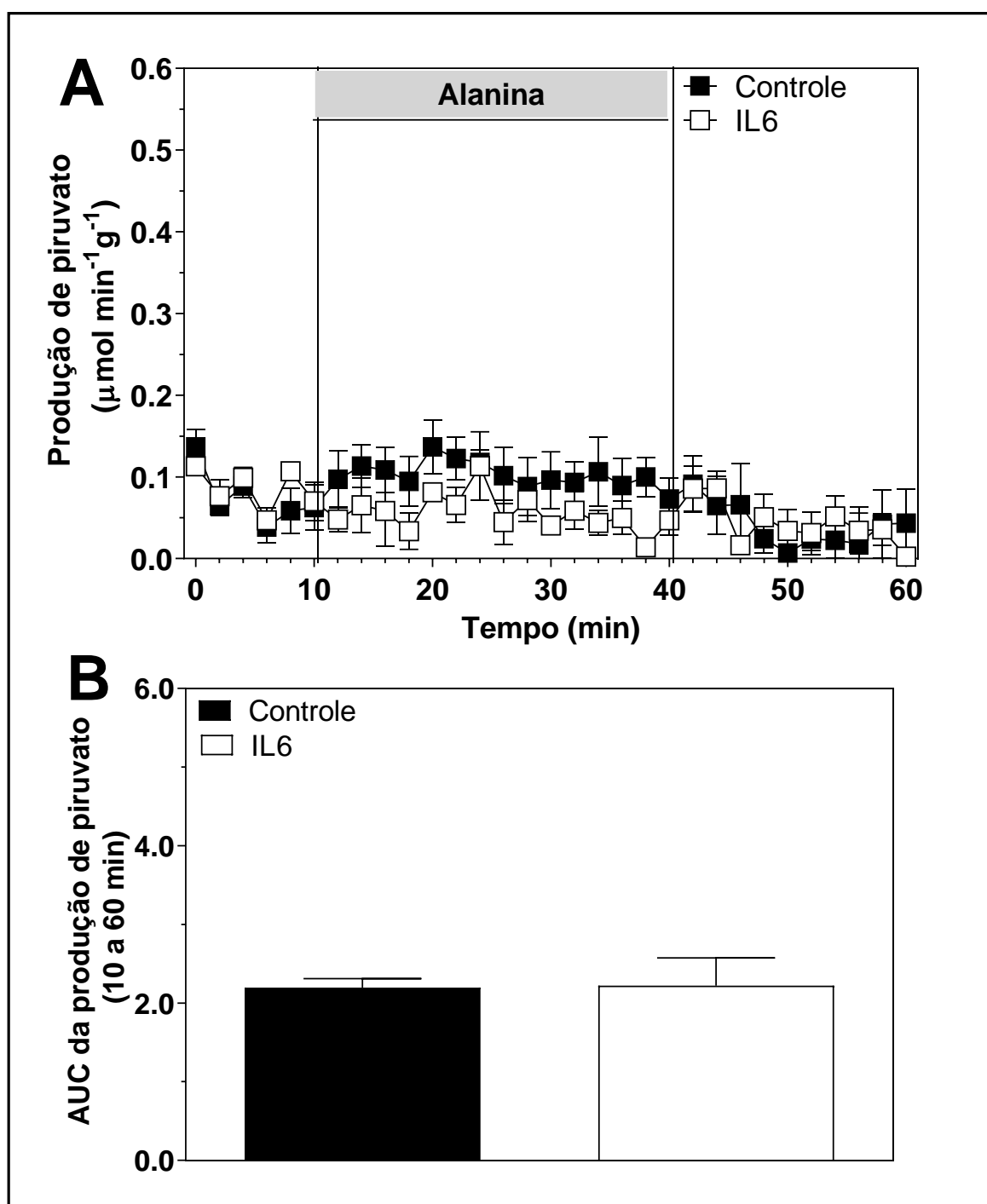


Figura 3. Efeito da interleucina 6 (IL6) na produção hepática de piruvato a partir da alanina (A) e as áreas sob as curvas (AUC) (B). Fígados de ratos com 24 h de privação alimentar foram submetidos a perfusão 1 h após a administração endovenosa de IL6 (10 $\mu\text{g/Kg}$) ou veículo (Controle). Alanina (2,5 mM) foi infundida entre 10-40 min. Os dados são a média \pm SEM de 4 experimentos (Teste t de Student não pareado).

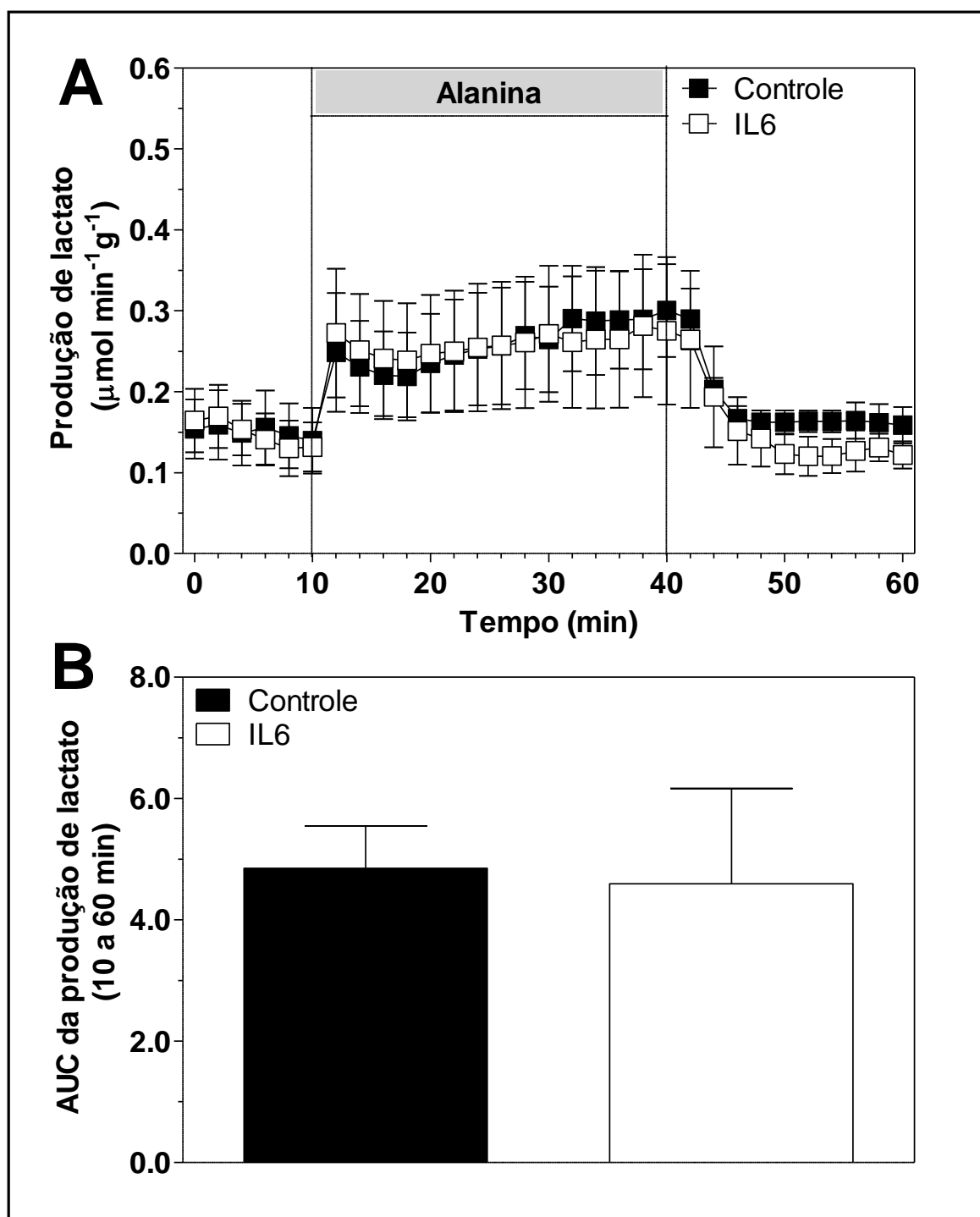


Figura 4. Efeito da interleucina 6 (IL6) na produção hepática de lactato a partir da alanina (A) e as áreas sob as curvas (AUC) (B). Fígados de ratos com 24 h de privação alimentar foram submetidos a perfusão 1 h após a administração endovenosa de IL6 (10 $\mu\text{g/Kg}$) ou veículo (Controle). Alanina (2,5 mM) foi infundida entre 10-40 min. Os dados são a média \pm SEM de 4 experimentos (Teste t de Student não pareado).

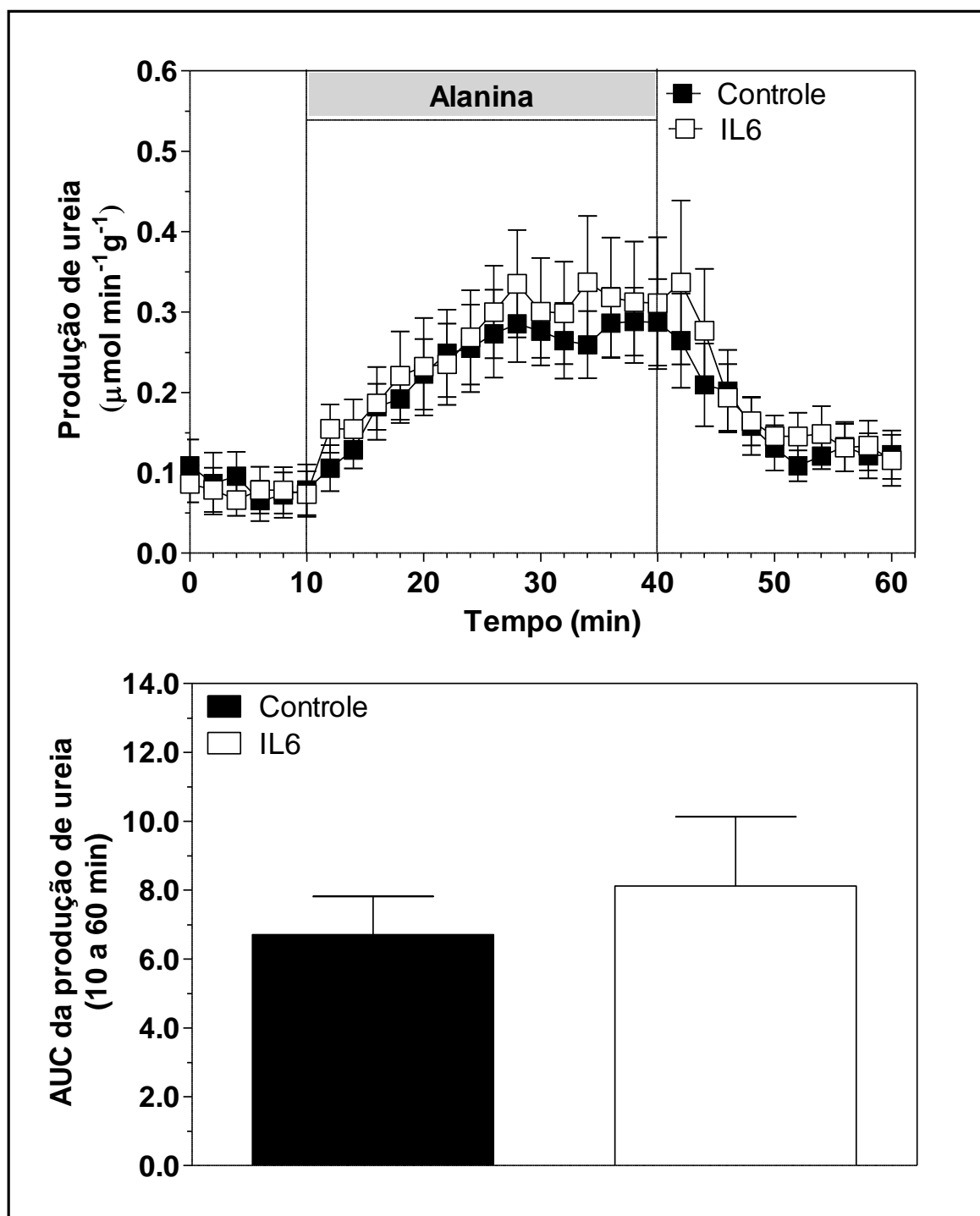


Figura 5. Efeito da interleucina 6 (IL6) na produção hepática de ureia a partir da alanina (A) e as áreas sob as curvas (AUC) (B). Fígados de ratos com 24 h de privação alimentar foram submetidos a perfusão 1 h após a administração endovenosa de IL6 (10 $\mu\text{g/Kg}$) ou veículo (Controle). Alanina (2,5 mM) foi infundida entre 10-40 min. Os dados são a média \pm SEM de 8 experimentos (Teste t de Student não pareado).

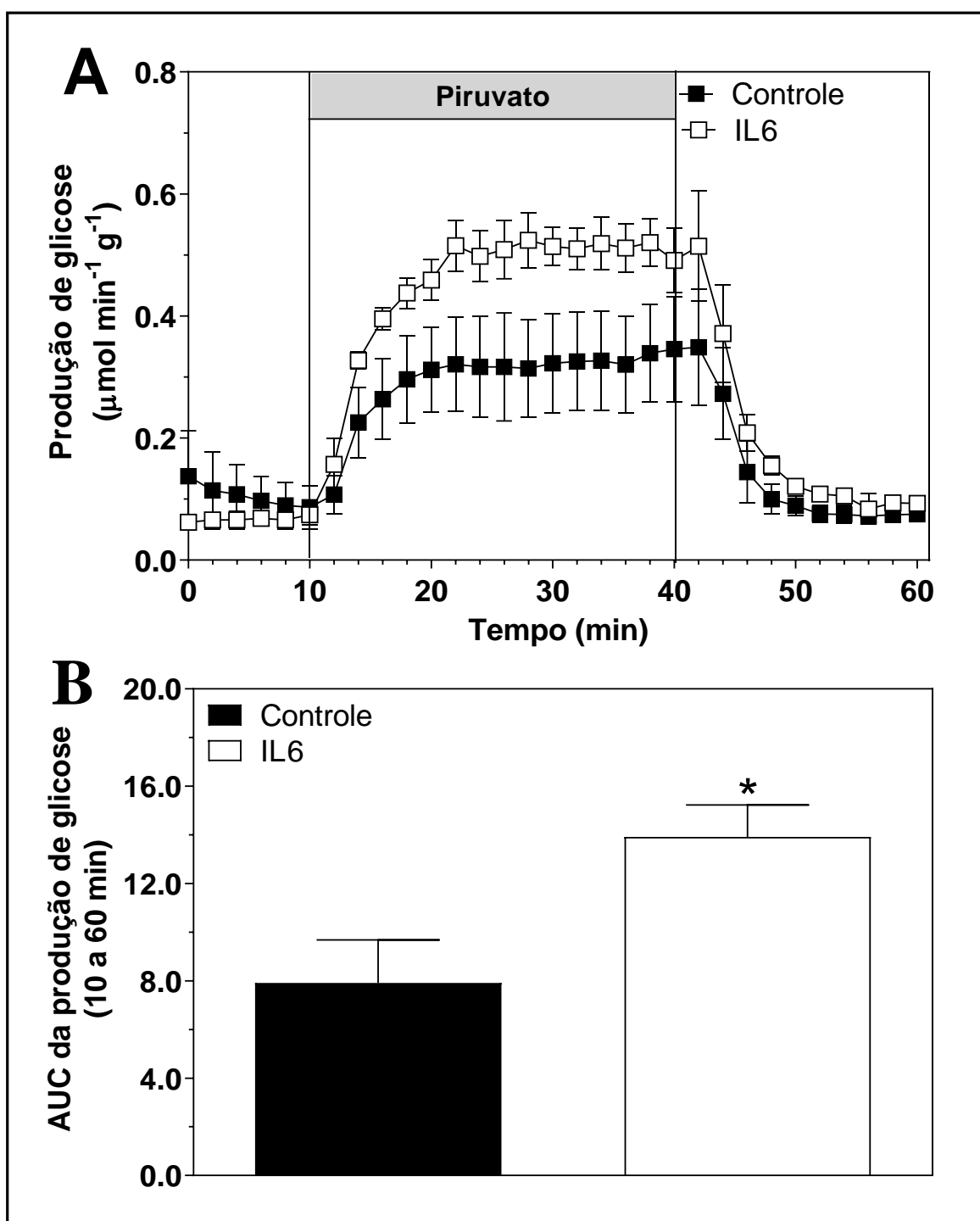


Figura 6. Efeito da interleucina 6 (IL6) na produção hepática de glicose (neoglicogênese) a partir do piruvato (A) e as áreas sob as curvas (AUC) (B). Fígados de ratos com 24 h de privação alimentar foram submetidos a perfusão 1 h após a administração endovenosa de IL6 (10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) ou veículo (Controle). Piruvato (2,0 mM) foi infundido entre 10-40 min. Os dados são a média \pm SEM de 4 experimentos. * $p < 0,05$ vs controle (Teste t de Student não pareado).

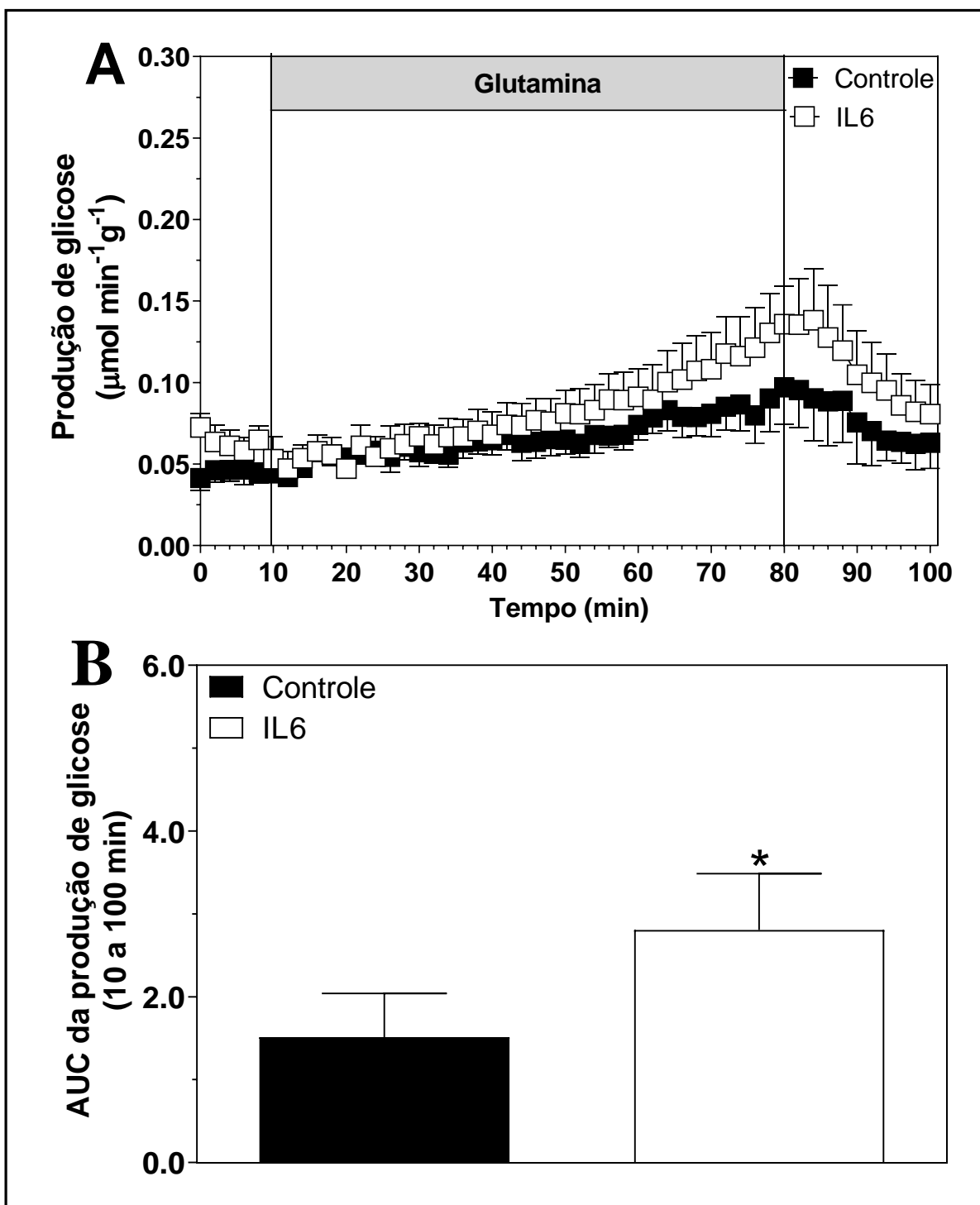


Figura 7. Efeito da interleucina 6 (IL6) na produção hepática de glicose (neoglicogênese) a partir da glutamina (A) e as áreas sob as curvas (AUC) (B). Fígados de ratos com 24 h de privação alimentar foram submetidos a perfusão 1 h após a administração endovenosa de IL6 (10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) ou veículo (Controle). Glutamina (2,5 mM) foi infundida entre 10-40 min. Os dados são a média \pm SEM de 4-5 experimentos. * $p < 0,05$ vs controle (Teste t de Student não pareado).

4.2 Efeitos da IL6 sobre a ação supressiva da insulina na glicogenólise

Os valores basais de produção de glicose, entre 0 e 10 minutos do período de perfusão, foram altos (próximos a $1,5 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) e refletem o alto conteúdo de glicogênio presente no fígado dos ratos alimentados (Figura 8A). Esta condição é necessária para avaliar o efeito de agentes glicogenolíticos, como o AMPc.

A infusão de baixa dose de AMPc ($3 \mu\text{M}$) no fígado, de 10 a 24 minutos do período de perfusão, estimulou igualmente a produção de glicose em todos os grupos (AUCs não mostradas). A infusão hepática de insulina ($20 \mu\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$), junto com o AMPc ($3 \mu\text{M}$), de 24 aos 50 minutos, diminuiu ($p < 0.05$) a produção de glicose estimulada pelo AMPc (Figura 8A), como mostrado pelas AUCs (Figura 8B). A administração endovenosa de IL6, 1 hora antes da perfusão do fígado, diminuiu ($p < 0.05$) o efeito inibitório da insulina sobre a produção de glicose estimulada pelo AMPc (Figura 8A), como evidenciado pelas AUCs (Figura 8B).

A infusão de AMPc no fígado, de 10 aos 24 minutos, promoveu alterações discretas na produção de lactato (Figura 9A) em todos os grupos e não alterou a produção de piruvato (Figura 10A) (AUCs não mostradas). A infusão de insulina, junto com o AMPc, de 24 aos 50 minutos, diminuiu ($p < 0.05$) a produção de lactato (Figura 9A) e não alterou a produção de piruvato (Figura 10A), como mostrado pelas respectivas AUCs (Figuras 9B e 10B). A administração endovenosa de IL6, 1 hora antes da perfusão do fígado, diminuiu ($p < 0.05$) o efeito inibitório da insulina sobre a produção de lactato (Figura 9A) e não alterou a produção de piruvato (Figura 10A), como evidenciado pelas respectivas AUCs (Figuras 9B e 10B).

A infusão de AMPc no fígado, de 10 a 24 minutos, estimulou igualmente a glicogenólise em todos os grupos (AUCs não mostradas). A infusão de insulina, junto com o AMPc, de 24 aos 50 minutos, diminuiu ($p < 0.05$) a glicogenólise estimulada pelo AMPc (Figura 11A), como mostrado pelas AUCs (Figura 11B). A administração endovenosa de IL6, 1 hora antes da perfusão do fígado, diminuiu ($p < 0.05$) o efeito supressivo da insulina sobre a glicogenólise estimulada pelo AMPc (Figura 11A), como evidenciado pelas AUCs (Figura 11B).

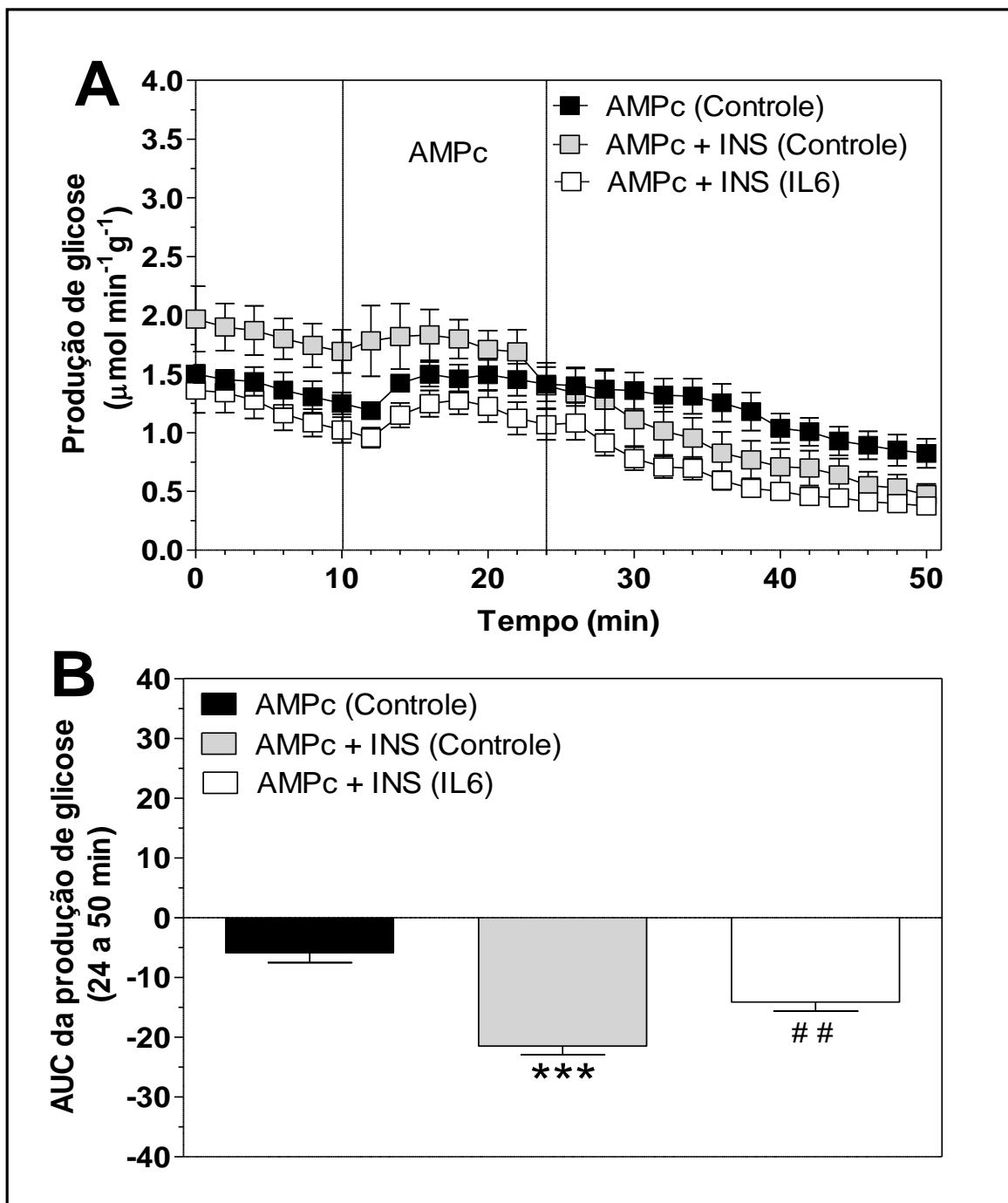


Figura 8. Efeito da interleucina 6 (IL6) sobre a ação supressiva da insulina (INS) na produção hepática de glicose estimulada pela adenosina monofosfato cíclica (AMPc) (A) e as áreas sob as curvas (AUC) (B). Fígado de ratos alimentados foram submetidos a perfusão 1 h após a administração endovenosa de IL6 (10 $\mu\text{g/kg}$) ou veículo (Controle). AMPc (3 μM) foi infundido entre 10-24 min. AMPc (3 μM) ou AMPc (3 μM) + INS (20 $\mu\text{U. mL}^{-1}$) foram infundidos entre 24-50 min. Os dados são as médias \pm SEM de 4-7 experimentos. *** $p < 0,001$ vs AMPc e ## $p < 0,01$ vs AMPc + INS (Anova One-Way seguido por Newman-Keuls).

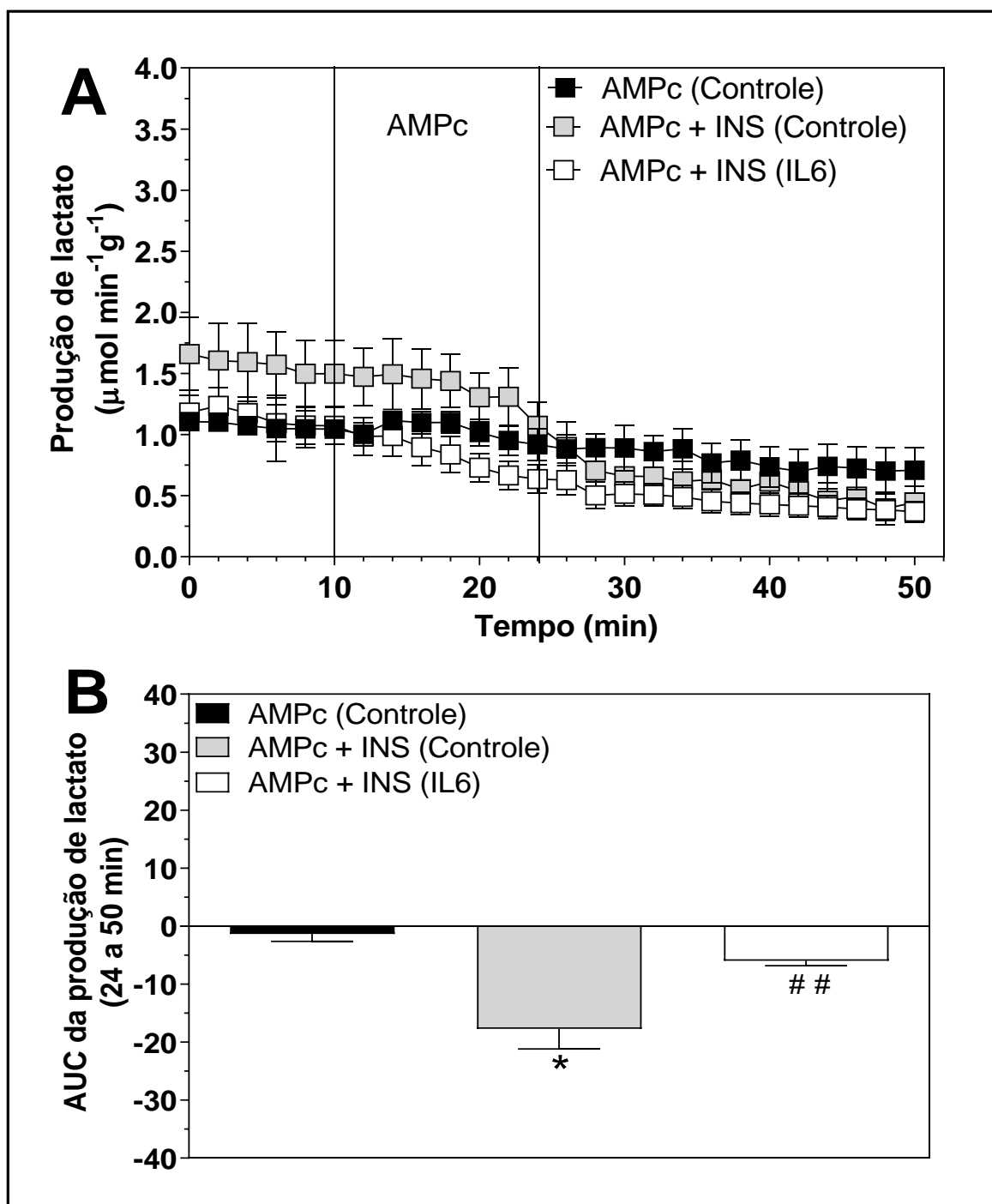


Figura 9. Efeito da interleucina 6 (IL6) sobre a ação da insulina (INS) na produção hepática de lactato em presença da adenosina monofosfato cíclica (AMPc) (A) e as áreas sob curvas (AUC) (B). Fígado de ratos alimentados foram submetidos a perfusão 1 h após a administração endovenosa de IL6 (10 $\mu\text{g/kg}$) ou veículo (Controle). AMPc (3 μM) foi infundido entre 10-24 min. AMPc (3 μM) ou AMPc (3 μM) + INS (20 $\mu\text{U. mL}^{-1}$) foram infundidos entre 24-50 min. Os dados são as médias \pm SEM de 4-8 experimentos. * $p < 0,05$ vs AMPc e ## $p < 0,05$ vs AMPc + INS (Anova One-Way seguido por Newman-Keuls).

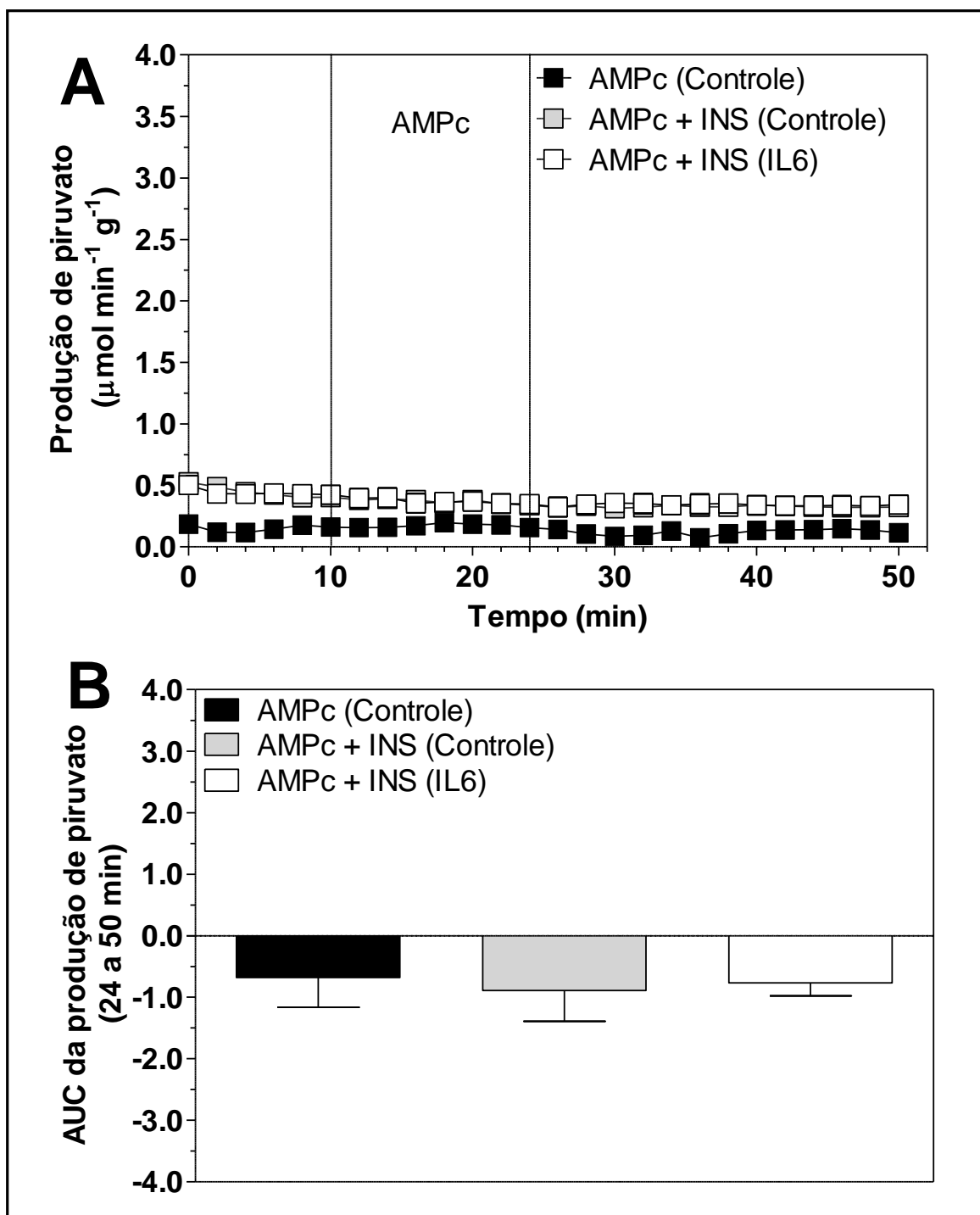


Figura 10. Efeito da interleucina 6 (IL6) sobre a ação da insulina (INS) na produção hepática de piruvato em presença da adenosina monofosfato cíclica (AMPc) (A) e as áreas sob curvas (AUC) (B). Fígado de ratos alimentados foram submetidos a perfusão 1 h após a administração endovenosa de IL6 (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ou veículo (Controle). AMPc (3 μM) foi infundido entre 10-24 min. AMPc (3 μM) ou AMPc (3 μM) + INS (20 $\mu\text{U. mL}^{-1}$) foram infundidos entre 24-50 min. Os dados são as médias \pm SEM de 4-8 experimentos (Anova One-Way seguido por Newman-Keuls).

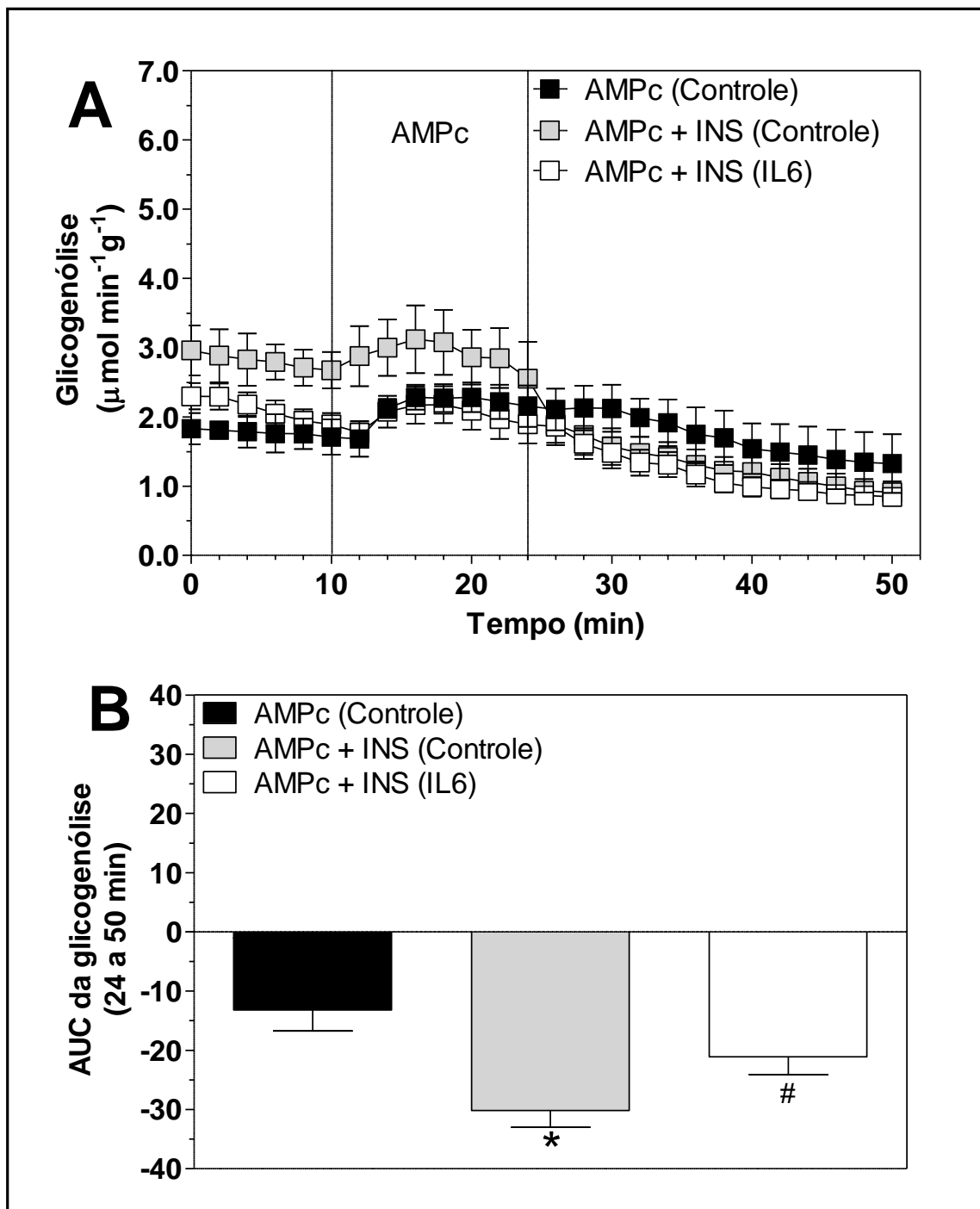


Figura 11. Efeito da interleucina 6 (IL6) sobre a ação supressiva da insulina (INS) na glicogenólise estimulada pela adenosina monofosfato cíclica (AMPc) (A) e as áreas sob as curvas (AUC) (B). Fígado de ratos alimentados foram submetidos a perfusão 1 h após a administração endovenosa de IL6 (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ou veículo (Controle). AMPc (3 μM) foi infundido entre 10-24 min. AMPc (3 μM) ou AMPc (3 μM) + INS (20 $\mu\text{U. mL}^{-1}$) foram infundidos entre 24-50 min. Os dados são as médias \pm SEM de 4-8 experimentos. * $p < 0,05$ vs AMPc e # $p < 0,05$ vs AMPc + INS (Anova One-Way seguido por Newman-Keuls).

4.3 Efeitos da IL6 na sensibilidade periférica à insulina

A administração endovenosa de insulina (0,25 U/kg) reduziu gradualmente a glicemia dos ratos controles e dos ratos que receberam IL6, 1 hora antes da realização do ITT. Entretanto, os ratos que receberam IL6 apresentaram menor ($p<0.05$) resposta periférica à insulina do que os ratos controles (Figura 12A), como evidenciado pelas KITTs (Figura 12B).

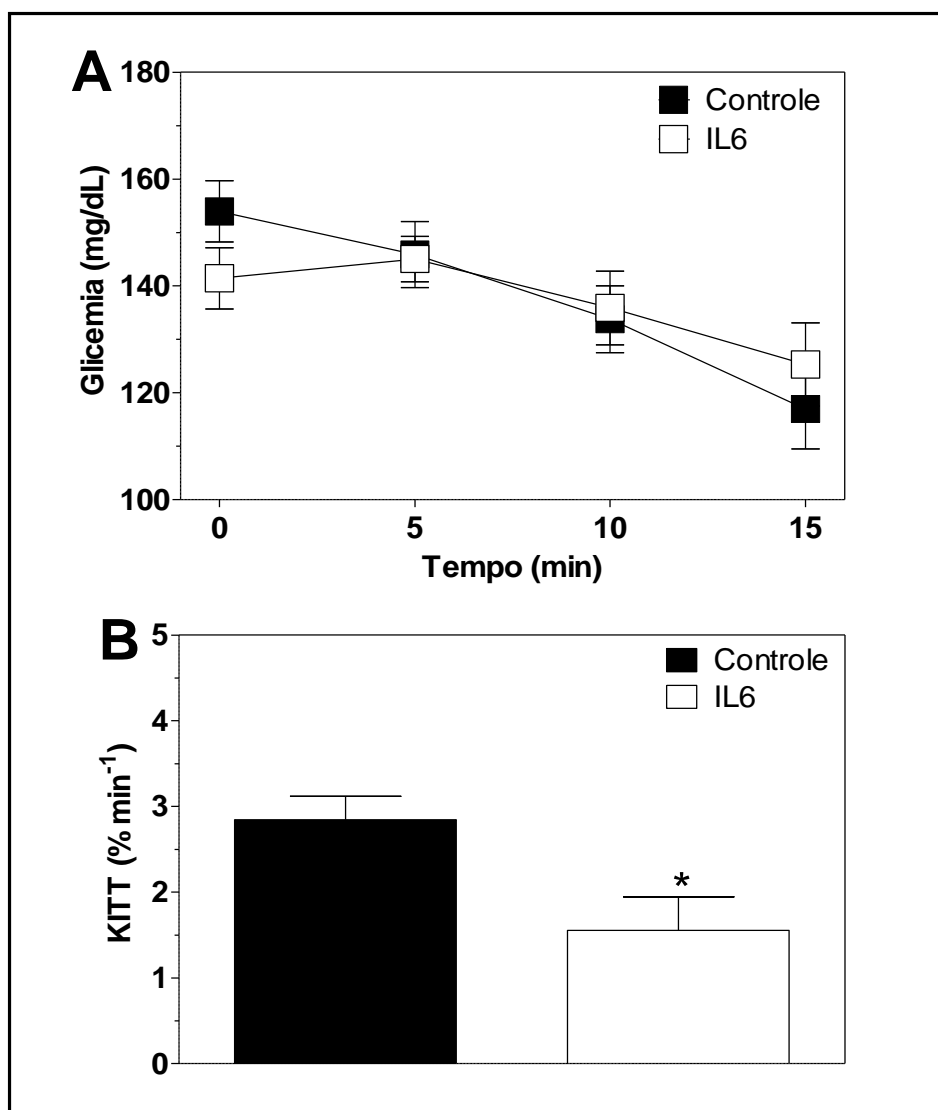


Figura 12. Efeito da interleucina 6 (IL6) sobre a glicemia (A) e constante de desaparecimento da glicose (kITT) (B) durante o teste de tolerância a insulina (ITT). O ITT foi realizado em ratos alimentados, 1 h após a administração endovenosa de IL6 (10 μ g/kg) ou veículo (Controle). A glicemia foi avaliada em 0 (basal), 5, 10 e 15 minutos após a administração endovenosa de insulina (0,25 U/kg). Os dados são a média \pm SEM de 6-7 experimentos. * $p<0,05$ vs controle (Teste t de Student não pareado).

5. DISCUSSÃO

Os principais achados do presente estudo, resumidos na Figura 1, mostram que a IL6 agudamente aumentou a neoglicogênese a partir de vários precursores de glicose e diminuiu a ação supressiva da insulina na glicogenólise, efeitos que resultaram em aumento da liberação hepática de glicose.

A via de administração da IL6 (endovenosa), assim como a dose (10 µg/Kg) e o tempo (1 hora) após a sua administração para a realização dos experimentos, foram baseados em nossos (DA ROCHA et al., 2013; DA ROCHA et al., 2014) e em outro estudo prévio (KELMER-BRACHT et al., 2006). Nestes estudos, a administração endovenosa de citocinas pró-inflamatórias (TNF α e/ou IL1) afetou o metabolismo hepático (KELMER-BRACHT et al., 2006; DA ROCHA et al., 2013; DA ROCHA et al., 2014), enquanto sua infusão direta no fígado em perfusão não alterou parâmetros metabólicos hepáticos (KELMER-BRACHT et al., 2006).

Diferente da infusão direta de citocinas no fígado em perfusão (*in situ*), a injeção endovenosa (*in vivo*) permite avaliar, além dos efeitos diretos, os efeitos indiretos destas moléculas, mediados por exemplo, por alterações na concentração e/ou ação de hormônios reguladores do metabolismo hepático.

No presente estudo, a injeção endovenosa de IL6 aumentou a produção hepática de glicose a partir da alanina, sem afetar a produção de piruvato, lactato e ureia, evidenciando que seu efeito estimulatório na neoglicogênese não envolveu estimulação da alanina aminotransferase, a enzima que converte a alanina em piruvato (Figura 1).

Em consistência, a administração endovenosa de IL6 também aumentou a produção de glicose a partir do piruvato e da glutamina, sugerindo que o efeito estimulatório da IL6 na neoglicogênese pode ter envolvido a estimulação de enzimas-chave que catalisam reações depois da entrada da glutamina na via, como a PEPCK, a frutose-1,6-bisfosfatase (Fru-1,6-P₂ase) e a G6Pase, ou seja, enzimas neoglicogênicas que catalisam passos pós-mitocondriais (Figura 1).

A PEPCK e a G6Pase são enzimas reguladas por mecanismos de longo-prazo, enquanto a Fru-1,6-P₂ase é regulada por mecanismos de longo e de curto prazo. A regulação de longo-prazo ocorre dentro de horas e envolve alteração na expressão gênica das enzimas (concentração), enquanto a regulação de curto-

prazo ocorre dentro de segundos a minutos e envolve alteração na atividade das enzimas (cinética), por meio de modulação covalente (fosforilação) e da concentração de efetores alostéricos (PILKIS; GRANNER, 1992).

O aumento da neoglicogênese a partir da alanina, piruvato e glutamina, 1 hora após a administração de IL6, mostra que seu efeito estimulatório foi de curto-prazo, indicando que pode ter sido mediado por aumento na atividade da Fru-1,6-P₂ase (enzima regulada a curto-prazo), mas não na expressão gênica da Fru-1,6-P₂ase, PEPCK e G6Pase (regulação a longo-prazo).

Em corroboração, a IL6 também aumentou a neoglicogênese a partir do lactato em cultura de hepatócitos (BLUMBERG et al., 1995; FRITSCHÉ et al., 2010). Entretanto, diferente dos nossos resultados, o efeito estimulatório da IL6 foi de longo-prazo, observado somente para hepatócitos incubados com IL6 por 24 horas, mas não por 1 ou 4 horas, sugerindo que a IL6 estimulou a neoglicogênese por aumentar a expressão, mas não a atividade de enzimas neoglicogênicas (BLUMBERG et al., 1995). Estes estudos, em cultura de hepatócitos, também mostram que o efeito estimulatório da IL6 na neoglicogênese foi direto (BLUMBERG et al., 1995; FRITSCHÉ et al., 2010).

Em nosso estudo, o efeito estimulatório de curto-prazo da IL6 na neoglicogênese a partir da alanina, do piruvato e da glutamina pode ter sido indireto, mediado por aumento na concentração de hormônios que estimulam esta via metabólica, como o glucagon. Foi mostrado que a IL6 aumentou a concentração circulante de glucagon (PETERSEN et al., 2005; TSIGOS et al., 1997a), e encontra-se bem estabelecido que o glucagon aumenta agudamente a neoglicogênese (PILKIS; GRANNER, 1992).

O efeito de curto prazo do glucagon na neoglicogênese ocorre por aumento de AMPc intracelular, por meio da ativação da adenilato ciclase, a enzima que converte o ATP em AMPc. O AMPc gerado ativa a proteína quinase dependente de AMPc (PKA), a qual fosforila a enzima bifuncional, que por sua vez reduz a concentração intracelular da frutose-2,6-bisfosfato (Fru-2,6-P₂), um potente efector alostérico inibitório da Fru-1,6-P₂ase, aumentando a atividade da Fru-1,6-P₂ase (enzima-chave da neoglicogênese). A redução da Fru-2,6-P₂, a qual é também um potente efector alostérico estimulatório da fosfofrutoquinase, diminui a atividade desta enzima glicolítica conversora da Frutose-6-P em Fru-1,6-P₂, aumentando a

disponibilidade da Frutose-6-P para ser convertida em glicose, e assim a neoglicogênese. A PKA ativada por AMPc também fosforila/inibe a piruvato quinase (enzima glicolítica), diminuindo a conversão do fosfoenolpiruvato em piruvato, efeito que aumenta a disponibilidade de fosfoenolpiruvato para ser convertido em glicose, amplificando o efeito estimulatório do glucagon na neoglicogênese (PILKIS; GRANNER, 1992) (Figura 1).

Adicionalmente, o efeito estimulatório de curto-prazo da IL6 na neoglicogênese a partir da alanina, do piruvato e da glutamina pode ter sido mediado por resistência hepática à insulina (efeito indireto), como sugerem os resultados do presente estudo.

A resistência à insulina no fígado diminui a transdução do sinal insulínico (IRS1/PI3K/AKT/PBE3B), reduzindo a degradação do AMPc pela PDE3B (CARVALHEIRA et., 2002). Isso amplifica o efeito estimulatório do glucagon, e também da adrenalina, hormônios geradores de AMPc, na neoglicogênese (PILKIS; GRANNER, 1992) (Figura 1). Vale ressaltar que o glucagon e a adrenalina são hormônios contrarreguladores, secretados em resposta a redução da glicemia, e que a neoglicogênese foi avaliada, em nossos estudos, em ratos com 24 horas de privação alimentar.

Embora esteja bem estabelecido que a IL6 induz resistência à insulina no fígado, nenhum estudo avaliou, até onde conhecemos, o efeito da IL6 na ação supressiva da insulina sobre o catabolismo do glicogênio estimulado pelo AMPc (segundo mensageiro do glucagon e da adrenalina).

Aqui nós mostramos, pela primeira vez, que a administração endovenosa de IL6, 1 hora antes da perfusão de fígado, não alterou o efeito estimulatório do AMPc na glicogenólise, mas reduziu significativamente o efeito supressivo da insulina na glicogenólise estimulada pelo AMPc, revelando efeito agudo da IL6 na indução de resistência à insulina.

Em corroboração, estudos mostraram que a IL6 inibiu a transdução do sinal insulínico e a ação da insulina em linhagens celulares de hepatocarcinoma humano (células HepG2), por aumentar a expressão de SOCS3 (SENN et al., 2003), por meio da via JAK/STAT (GLUND; KROOK, 2008). A SOCS3 se associa ao receptor de insulina, diminuindo sua autofosforilação e a fosforilação do IRS1 (SENN et al., 2003), interferindo negativamente na via de sinalização da insulina

(IRS1/PI3K/AKT). Em consistência, foi reportado que a infusão contínua de IL6 causou resistência hepática à insulina por reduzir a autofosforilação do receptor de insulina e a fosforilação da tirosina do IRS1 (KLOVER et al., 2003), enquanto a depleção sistêmica de IL6 melhorou a ação hepática da insulina em camundongos obesos (KLOVER et al., 2005). Adicionalmente, foi observado a infusão de IL6 reduziu a atividade da PI3K e causou resistência à insulina em hepatócitos e no músculo esquelético de camundongo (KIM; HIGASHIMORI; PARK, 2004). Além disso o tratamento *in vitro* de células HepG2 com IL6 induziu resistência hepática à insulina (KIM et al., 2008).

A IL6, além de aumentar a glicogenólise indiretamente, por meio de indução de resistência hepática à insulina, também pode aumentar a glicogenólise indiretamente, via aumento do glucagon (PETERSEN et al., 2005; TSIGOS et al., 1997a), ou diretamente, uma vez que estimulou a glicogênio fosforilase e glicogenólise em hepatócitos isolados e em cultura de hepatócitos (RITCHIE, 1990, VAARTJES et al., 1990; KANEMAKI et al., 1998).

Em consistência com a resistência hepática a insulina induzida pela IL6, observada no presente estudo, a administração endovenosa de IL6, 1 hora antes da realização do ITT, reduziu a constante de desaparecimento da glicose no sangue (kITT), evidenciando resistência periférica à insulina.

Em acordo, a administração crônica de IL6 (KLOVER et al., 2003), assim como o aumento de IL6 causado por tumores secretores de IL6 (METZGER et al. 1997) ou por inflamação (CAI et al., 2005), resultaram em resistência à insulina. Além disso, a IL6 reduziu a fosforilação do IRS1 e da AKT, assim como a expressão de GLUT4 em cultura de adipócitos, efeitos que resultaram em redução da captação de glicose (LAGATHU et al., 2003). Em consistência, a injeção subcutânea de IL6 em humanos aumentou a agudamente (1 hora) a glicemia (TSIGOS et al., 1997b).

Em síntese, nossos resultados mostram que a IL6, por induzir resistência à insulina, pode aumentar a neoglicogênese e a glicogenólise e, desse modo, estar envolvida na etiologia do aumento da liberação hepática de glicose em doenças inflamatórias, como o diabetes tipo 2 e o câncer. Estes resultados apontam a IL6 como um potencial alvo terapêutico para o tratamento das anormalidades no metabolismo hepático da glicose em doenças inflamatórias.

Neste contexto, alguns estudos reportaram efeitos benéficos de anticorpos neutralizantes para IL6 na ação hepática da insulina (KLOVER et al., 2005) e na reversão do fenótipo diabético em camundongos (CAI et al., 2005). Anticorpos neutralizantes para IL6 também foram benéficos no controle glicêmico em pacientes com e sem diabetes tipo 2 (LEHRSKOV; CHRISTENSEN, 2019).

Assim, é possível que tratamentos que reduzam os efeitos da IL6, possam diminuir a hiperprodução hepática de glicose e hiperglicemia associada ao diabetes tipo 2, um fator de risco para complicações e óbitos.

Similarmente, a neutralização da IL6 poderia reduzir o aumento da liberação hepática de glicose em portadores de câncer, a principal fonte de energia para o crescimento do tumor.

Nossos resultados abrem perspectivas de novos estudos nesta linha de investigação.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, a administração endovenosa de IL6 agudamente (1 hora) aumentou a neoglicogênese a partir de vários precursores de glicose e diminuiu a ação supressiva da insulina na glicogenólise estimulada pelo AMPc e a sensibilidade periférica à insulina, sugerindo um papel importante desta citocina na patogênese da resistência à insulina e no aumento da liberação hepática de glicose (neoglicogênese e glicogenólise) em doenças inflamatórias, como no diabetes tipo 2 e câncer.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, H. L.; MCCURDY, M. A.; KATTAN, M. W.; TIMME, T. L.; SCARDINO, P. T.; THOMPSON, T. C. Elevated levels of circulating interleukin-6 and transforming growth factor- β 1 in patients with metastatic prostatic carcinoma. *Journal of Urology*, v. 161, p. 182–187, 1999.

AKBARI, M.; HASSAN-ZADEH, V. IL-6 signalling pathways and the development of type 2 diabetes. *Inflammopharmacology*, v. 26, n. 3, p. 685-698, 2018.

AL-KHALILI, L.; BOUZAKRI, K.; GLUND, S.; LONNQVIST, F.; KOISTINEN, H.A.; KROOK, A. Signalling specificity of interleukin-6 action on glucose and lipid metabolism in skeletal muscle. *Molecular Endocrinology*, v. 20, p. 3364–3375, 2006.

ARGILÉS, J. M.; LÓPEZ-SORIANO, F. J. Insulin and cancer (Review). *International Journal of Oncology*, v. 18, n. 4, p. 683-687, 2001.

BANZET, S.; KOULMANN, N.; SIMLER, N.; SANCHEZ, H.; CHAPOT, R.; SERRURIER, B.; PEINNEQUIN, A.; BIGARD, X. Control of gluconeogenic genes during intense/prolonged exercise: hormone-independent effect of muscle-derived IL-6 on hepatic tissue and PEPCK mRNA. *Journal Applied Physiology*, v. 107, n. 6, p. 1830-1839, 2009.

BASTARD, J. P.; MAACHI, M.; LAGATHU, C.; KIM, M. J.; CARON, M.; VIDAL, H.; CAPEAU, J.; FEVE, B. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *European Cytokine Network*, v. 17, p. 4-12, 2006.

BERGMAYER, H. U.; BERNT, E. Determination of glucose with glucose-oxidase and peroxidase. In: Bergmeyer H. U. (Editor), *Methods of Enzymatic Analysis*, Academic Press, New York, 2: 1205-1215, 1974.

BLUMBERG, D.; HOCHWALD, S.; BRENNAN, M.F.; BURT, M. Interleukin-6 stimulates gluconeogenesis in primary cultures of rat hepatocytes. *Metabolism: Clinical and Experimental*, v. 44, n. 2, p. 145-146, 1995.

BONORA, E.; MOGHETTI, P.; ZANCANARO, C., CIGOLINI, M.; QUERENA, M.; CACCIATORI, V.; CORGNATI, A.; MUGGEO, M. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 68, n. 2, p. 374-378, 1989.

BRUCE, C.R.; DYCK, D.J. Cytokine regulation of skeletal muscle fatty acid metabolism: effect of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha. *American Journal Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 287, p. E616–E621, 2004.

CAI, D.; YUAN, M.; FRANTZ, D. F.; MELENDEZ, P. A.; HANSEN, L.; LEE, J.; SHOELSON, S. E. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nature Medicine*, v. 11, p. 183–190, 2005.

CAREY, A.L.; STEINBERG, G.R.; MACAULAY, S.L.; THOMAS, W.G.; HOLMES, A. G.; RAMM, G.; PRELOVSEK, O.; HOHNEN-BEHRENS, C.; WATT, M. J.; JAMES, D. E.; KEMP, B. E.; PEDERSEN, B. K.; FEBBRAIO, M. A. IL-6 increases insulin stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMPK. *Diabetes*, v. 55, p. 2688–2697, 2006.

CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de sinalização da insulina. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 46, n. 4, p. 419-425, 2002.

CASSOLLA, P.; MOREIRA, C.C.L.; LIBONI, T.F.; ZAIA, C.T.B.V.; BORBA-MURAD, G.R.; SOUZA, H.M. Changes in blood metabolic parameters during the development of Walker-256 tumor induced cachexia in rats are not caused by decreased food intake. *Celular Biochemistry and Function*, v. 30, n. 1, p. 1-6, 2011.

CHEN, W.; YUAN, H.; CAO, W.; WANG, T.; YU, H.; FU, Y.; JIANG, B.; ZHOU, H.; GUO, H.; ZHAO, X. Blocking interleukin-6 trans-signaling protects against renal fibrosis by suppressing STAT3 activation. *Theranostics*, v. 9, n. 14, p. 3980–3991, 2019.

COPELAND, G. P.; LEINSTER, S. J.; DAVIS, J. C.; HAPKIN, L. J. Insulin resistance in patients with colorectal cancer. *Journal of Surgery*, v. 74, p. 1031-1036, 1987.

CHRIST B.; NATH, A.; HEINRICH, P. C.; JUNGERMANN, K. Inhibition by recombinant human interleukin-6 of the glucagon-dependent induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase and of the insulin-dependent induction of glucokinase gene expression in cultured rat hepatocytes: regulation of gene transcription and messenger RNA degradation. *Hepatology*, v. 20, p. 1577–1583, 1994.

CZOK, R.; LAMPRECHT, W. Pyruvate, phosphoenolpyruvate and D-glycerate-2-phosphate. In: BERGMAYER, H. U. *Methods of enzymatic analysis*. New York: Academic Press, 1446-1448, 1974.

DA ROCHA, A.F.; LIBONI, T.F. MOREIRA, C.C.; MIKSZA, D.R DE SOUZA, C.O.; SILVA, F.F.; BORBA-MURAD, G.R.; BAZOTTE, R.B.; DE SOUZA, H.M. Inhibitory effect of tumor necrosis factor α on gluconeogenesis in perfused rat liver. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 375, p. 89-96, 2013.

DA ROCHA, A.F.; LIBONI, T.F.; KURAUTI, M.A.; DE SOUZA, C.O.; MIKSZA, D.R.; MOREIRA, C.C.; BORBA-MURAD, G.R.; BAZOTTE, R.B.; DE SOUZA, H.M. Tumor necrosis factor alpha abolished the suppressive effect of insulin on hepatic glucose production and glycogenolysis stimulated by cAMP. *Pharmacological Reports*, v. 66, p. 380-385, 2014.

DE FATIMA-SILVA, F.; ORTIZ-SILVA, M.; DE SOUZA-GALIA, W.B.; CASSOLLA, P.; GRACIANO, M.F.; ZAIA, C.T.; ZAIA, D.; CARPINELLI, Â.R.; DA SILVA, F.G.; DE SOUZA, H.M. Pioglitazone improves insulin sensitivity and reduces weight loss in Walker-256 tumor-bearing rats. *Life Sciences*, v. 171, n. 1, p. 68-74, 2017.

DE MORAIS, H.; CASSOLLA, P.; MOREIRA, C.C.; BÔAS S. K.; BORBA-MURAD, G.R.; BAZOTTE, R.B.; DE SOUZA, H.M. Decreased response to cAMP in the

glucose and glycogen catabolism in perfused livers of Walker-256 tumor-bearing rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 368, n. 1-2, p. 9-16, 2012.

DE SOUZA, C.O.; KURAUTI, M.A.; SILVA F.D.; DE MORAIS, H.; CURI, R.; HIRABARA, S.M.; ROSA-NETO, J.C.; DE SOUZA, H.M. Celecoxib and ibuprofen restore the ATP content and the gluconeogenesis activity in the liver of Walker-256 tumor-bearing rats. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 36, n. 4, p. 1659–1669, 2015.

EBISUI, C.; TSUJINAKA, T.; MORIMOTO, T.; KAN, K.; IJIMA, S.; YANO, M.; KOMINAMI, E.; TANAKA, K.; MONDEN, M. Interleukin-6 induces proteolysis by activating intracellular proteases (cathepsins B and L, proteasome) in C2C12 myotubes. *Clinical Science*, v. 89, n. 4, p. 431-439, 1995.

EXTON, J.H. Mechanisms of hormonal regulation of hepatic glucose metabolism. *Diabetes Metabolism Research and Reviews*, v. 3, n. 1, p. 163–183, 1987.

FIGLER, R. A.; WANG, G.; SRINIVASAN, S.; JUNG, D.Y.; ZHANG, Z.; PANKOW, J. S.; RAVID, K.; FREDHOLM, B.; HEDRICK, C. C.; RICH, S. S.; KIM, J. K.; LANOUE, K. F.; LINDEN, J. Links between insulin resistance, adenosine A2B receptors, and inflammatory markers in mice and humans. *Diabetes*, v. 60, p. 669–679, 2011.

FRITSCHÉ, L.; HOENE, M.; LEHMANN, R.; ELLINGSGAARD, H.; HENNIGE, A. M.; POHL, A. K.; HÄRING, H. U.; SCHLEICHER, E. D.; WEIGERT, C. IL-6 deficiency in mice neither impairs induction of metabolic genes in the liver nor affects blood glucose levels during fasting and moderately intense exercise. *Diabetologia*, v. 53, n. 8, p. 1732-1742, 2010.

FUJITA, T.; TSUJINAKA, T.; YANO, M.; EBISUI, C.; SAITO, H.; KATSUME, A.; AKAMATSU, K.; OHSUGI, Y.; SHIOZAKI, H.; MONDEN, M. Anti-interleukin-6 receptor antibody prevents muscle atrophy in colon-26 adenocarcinoma-bearing mice with modulation of lysosomal and ATP-ubiquitin-dependent proteolytic pathways. *International Journal of Cancer*, v. 68, p. 637-643, 1996.

GARBERS, C.; APARICIO-SIEGMUND, S.; ROSE-JOHN, S. The IL-6/gp130/STAT3 signaling axis: recent advances towards specific inhibition. *Current Opinion in Immunology*, v. 34, p. 75–82, 2015.

GARBERS, C.; HEINK, S.; KORN, T.; ROSE-JOHN, S. Interleukin-6: designing specific therapeutics for a complex cytokine. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 17, n. 6, p. 395-412, 2018.

GARBERS, C.; ROSE-JOHN, S. Dissecting Interleukin-6 Classic- and Trans-Signaling in Inflammation and Cancer. *Inflammation and Cancer: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, v. 1725, p. 127-140, 2018.

GHANEMI, A.; ST-AMAND, J. Interleukin-6 as a “metabolic hormone”. *Cytokine*, v. 112, p. 132-136, 2018.

GLUND, S.; KROOK, A. Role of interleukin-6 signalling in glucose and lipid metabolism. *Acta Physiologica*, v. 192, p. 37-48, 2008.

GOYDOS, J. S.; BRUMFIELD, A. M.; FREZZA, E.; BOOTH, A.; LOTZE, M. T.; CARTY, S. E. Marked elevation of serum interleukin-6 in patients with cholangiocarcinoma: validation of utility as a clinical marker. *Annals of Surgery*, v. 227, p. 398–404, 1998.

GREENHILL, C.J.; ROSE-JOHN, S.; LISSILAA, R.; FERLIN, W.; ERNST, M.; HERTZOG, P.J.; MANSELL, A.; JENKINS, B.J. IL-6 Trans-Signaling Modulates TLR4-Dependent Inflammatory Responses via STAT3. *The Journal of Immunology*, v.186, p. 1199-1208, 2011.

GUTMANN, I.; BERGMAYER, H. U. Determination of urea, indicator reaction with phenol and hypochlorite. In: BERGMAYER, H. U, *Methods of Enzymatic Analysis*, Academic Press, New York, p. 1790-1798, 1974.

GUTMANN, I.; WAHLEFELD, W. L-(+)-Lactate. Determination with lactate dehydrogenase and NAD. In: Bergmeyer H. U. (Editor), *Methods of Enzymatic Analysis*, Academic Press, New York, p. 1464-1472, 1974.

HIRAI, K.; ISHIKO, O.; TISDALE, M. Mechanism of depletion of liver glycogen in cancer cachexia. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, v. 241, n. 1, p. 49–52, 1997.

HONORS, M.A.; KINZIG, K.P. The role of insulin resistance in the development of muscle wasting during cancer cachexia. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, v. 3, n. 1, p. 5-11, 2012.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, v. 444, p. 860-867, 2006.

INOUE, H.; OGAWA, W.; OZAKI, M.; HAGA, S.; MATSUMOTO, M.; FURUKAWA, K.; HASHIMOTO, N.; KIDO, Y.; MORI, T.; SAKAUE, H.; TESHIGAWARA, K.; JIN, S.; IGUCHI, H.; HIRAMATSU, R.; LEROITH, D.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; KASUGA, M. Role of STAT-3 in regulation of hepatic gluconeogenic genes and carbohydrate metabolism in vivo. *Nature Medicine*, v. 10, p. 168–174, 2004.

KANEMAKI, T.; KITADE, H.; KAIBORI, M.; SAKITANI, K.; HIRAMATSU, Y.; KAMIYAMA, Y.; ITO, S.; OKUMURA, T. Interleukin 1 β and interleukin 6, but not tumor necrosis factor α , inhibit insulin-stimulated glycogen synthesis in rat hepatocytes. *Hepatology*, v. 27, p. 1296–1303, 1998.

KELMER-BRACHT, A. M.; ISHII, E. L.; ANDRADE, P. V .M.; BRACHT, A. Construção de aparelho de perfusão de fígado para estudos de regulação do metabolismo e de mecanismos de ação de drogas. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, v. 27, n. 4, p. 419-438, 1984.

KELMER-BRACHT, A.M.; BROETTO-BIAZZON, A.C.; SÁ-NAKANISHI, A.B.; ISHII-IWAMOTO, E.L.; BRACHT, A. Low doses of tumour necrosis factor α and interleukin 1 β diminish hepatic gluconeogenesis from alanine *in vivo*. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, v. 99, p. 335-339, 2006.

KIM, H. J.; HIGASHIMORI, T.; PARK, S. Y. Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action *in vivo*. *Diabetes*, v. 53, n. 4, p. 1060-1067, 2004.

KIM, J.H.; KIM, J.E.; LIU, H.Y.; CAO, W.; CHEN, J. Regulation of interleukin-6-induced hepatic insulin resistance by mammalian target of rapamycin through the STAT3-SOCS3 Pathway. *The Journal of biological chemistry*, v. 283, p. 708-715, 2008.

KLOVER, P. J.; CLEMENTI, A. H.; MOONEY, R. A. Interleukin-6 depletion selectively improves hepatic insulin action in obesity. *Endocrinology*, v. 146, n. 8, p. 3417-3427, 2005.

KLOVER, P. J.; ZIMMERS, T.A.; KONIARIS, L. G.; MOONEY, R. A. Chronic exposure to interleukin-6 causes hepatic insulin resistance in mice. *Diabetes*, v. 52, p. 2784-2789, 2003.

KRAAKMAN, M.J.; KAMMOUN, H.L.; ALLEN, T.L.; DESWAERTE, V.; HENSTRIDGE, D.C.; ESTEVEZ, E.; MATTHEWS, V.B.; NEILL, B.; WHITE, D.A.; MURPHY, A.J.; PEIJS, L.; YANG, C.; RISIS, S.; BRUCE, C.R.; DU, X.; BOBIK, A.; LEE-YOUNG, R.S.; KINGWELL, B.A.; VASANTHAKUMAR, A.; SHI, W.; KALLIES, A.; LANCASTER, G.I.; ROSE-JOHN, S.; FEBBRAIO, M.A. Blocking IL-6 trans-Signaling Prevents High-Fat Diet-Induced adipose tissue macrophage recruitment but does not improve insulin resistance. *Cell Metabolism*, v. 21, p. 403-416, 2015.

LAGATHU, C.; BASTARD, J. P.; AUCLAIR, M.; MAACHI, M.; CAPEAU, J.; CARON, M. Choraonic interleukin-6 (IL6) treatment increased IL6 secretion and induced insulin resistance in adipocyte: prevention by rosiglitazone. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 311, p. 372-379, 2003.

LEHRSKOV, L.L.; CHRISTENSEN, R.H. The role of interleukin-6 in glucose homeostasis and lipid metabolism. *Seminars in Immunopathology*, v. 41, p. 491-499, 2019.

LIENENLUKE, B.; CHRIST, B. Impact of interleukin-6 on the glucose metabolic capacity in rat liver. *Histochemistry and Cell Biology*, v. 128, p. 371-377, 2007.

LUNDHOLM, K.; HOLM, G.; SCHERSTEN, T. Insulin resistance in patients with cancer. *Cancer Research*, v. 38, p. 4665-4670, 1978.

LUNDHOLM, K.; EDSTROM, S.; KARLBERG, I.; EKMAN, L.; SCHERSTEN, T. Glucose turnover, gluconeogenesis from glycerol, and estimation of net glucose cycling in cancer patients. *Cancer*, v. 50, n. 6, p. 1142-1150, 1982.

LYNGSO, D.; SIMONSEN, L.; BULOW, J. Metabolic effects of interleukin-6 in human splanchnic and adipose tissue. *Journal of Physiology*, v. 543, p. 379-386, 2002.

MAGNUSSON, I.; ROTHMAN, D. L.; KATZ, L. D.; SHULMAN, R. G.; SHULMAN, G. I. Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes mellitus: a ^{13}C nuclear magnetic resonance study. *Journal of Clinical Investigation*, v. 90, p. 1323–1327, 1992.

METZGER, S.; GOLDSCHMIDT, N.; BARASH, V.; PERETZ, T.; DRIZE, O.; SHILYANSKY, J.; SHILONI, E.; CHAJEK-SHAUL, T. Interleukin-6 secretion in mice is associated with reduced glucose-6-phosphatase and liver glycogen levels. *American Journal of Physiology*, v. 273, p. E262–E267, 1997.

MIHARA, M.; HASHIZUME, M.; YOSHIDA, H.; SUZUKI, M.; SHIINA, M. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clinical Science*, v. 122, n. 4, p. 143-159, 2012.

MUELLER, T. C.; BACHMANN, J.; PROKOPCHUK, O.; FRIESS, H.; MARTIGNONI, M. E. Molecular pathways leading to loss of skeletal muscle mass in cancer cachexia - can findings from animal models be translated to humans? *BMC cancer*, v. 16, n. 1, p. 75, 2016.

PETERSEN, E.W.; CAREY, A.L.; SACCHETTI, M.; STEINBERG, G.R.; MACAULAY, S.L.; FEBBRAIO, M.A.; PEDERSEN, B.K. Acute IL-6 treatment increases fatty acid turnover in elderly humans in vivo and in tissue culture in vitro. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 288, p. E155–E162, 2005.

PILKIS, S.J.; GRANNER, D.K. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annual Review Of Physiology*, v. 54, n. 1, p. 885–909, 1992.

PORPORATO, P. E. Understanding cachexia as a cancer metabolism syndrome. *Oncogenesis*, v. 5, p. e200, 2016.

RAMNANAN, C.J.; EDGERTON, D.S.; KRAFT, G.; CHERRINGTON, A.D. Physiologic action of glucagon on liver glucose metabolism. *Diabetes Obesity and Metabolism*, v. 13, n. 1, p. 118–125, 2011.

RITCHIE, D. G. Interleukin 6 stimulates hepatic glucose release from prelabeled glycogen pools. *American Journal of Physiology*, v. 258, p. E57-64, 1990.

ROBINSON, R.; SRINIVASAN, M.; SHANMUGAM, A.; WARD, A.; GANAPATHY, V.; BLOOM, J.; SHARMA, A.; SHARMA, S. Interleukin-6 trans-signaling inhibition prevents oxidative stress in a mouse model of early diabetic retinopathy. *Redox Biology*, v. 34, p. 2213-2317, 2020.

ROFE, A. M.; BOURGEOIS, C. S.; COYLE, P.; TAYLOR, A.; ABDI, E. A. Altered insulin response to glucagon in weight-losing cancer patients. *Anticancer Research*, v. 14, n. 2B, p. 647-650, 1994.

ROSE-JOHN, S. IL-6 Trans-Signaling via the Soluble IL-6 Receptor: Importance for the Pro-Inflammatory Activities of IL-6. *International Journal of Biological Sciences*, v. 8, p. 1237-1247, 2012.

ROTTER, V.; NAGAEV, I.; SMITH, U. Interleukin-6 (IL6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor- α , overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *Journal Biological Chemistry*, v. 278, p. 45777-45784, 2003.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, v. 414, p. 799-806, 2001.

SENN, J. J.; KLOVER, P. J.; NOWAK, I. A.; MOONEY, R. A. Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes*, 51: 3391-3399, 2002.

SENN, J. J.; KLOVER, P. J.; NOWAK, I. A.; ZIMMERS, T. A.; KONIARIS, L. G.; FURLANETTO, R. W.; MOONEY, R. A. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potent dependent insulin resistance in hepatocytes. *Journal Biological Chemistry*, v. 278, p. 13740-13746, 2003.

SERAPHIM, P. M.; NUNES, M. T.; MACHADO, U. F. GLUT4 protein expression in obese and lean 12-month-old rats: insights from different types of data analysis. *Brazilian Journal Medicine Biology Research*, v. 34, p. 1353-1362, 2001.

SHARABI, K.; TAVARES, C.D.J.; RINES, A.K.; PUIGSERVER, P. Molecular pathophysiology of hepatic glucose production. *Molecular Aspects Medicine*, v. 46, p. 21-33, 2015.

STEENSBERG, A.; VAN-HALL, G.; OSADA, T.; SACCHETTI, M.; SALTIN, B.; KLARLUND-PEDERSEN, B. Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. *Journal of Physiology*, v. 529, n. 1, p. 237–242, 2000.

STOUTHARD, J. M.; ROMIJN, J. A.; VAN DER POLL, T.; ENDERT, E.; KLEIN, S.; BAKKER, P. J.; VEENHOF, C. H.; SAUERWEIN, H. P. Endocrinologic and metabolic effects of interleukin-6 in humans. *American Journal Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 268, p. E813–E819, 1995.

STRASSMANN G.; FONG, M.; KENNEY, J.S.; JACOB, C.O. Evidence for the involvement of interleukin 6 in experimental cancer cachexia. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 89, p. 1681–1684, 1992.

TANAKA, H.; NISHIKAWA, Y.; FUKUSHIMA, T.; TANIGUCHI, A.; FUJITA, Y.; TSUDA, K.; INAGAKI, N.; HOSOKAWA, M. J. Lipopolysaccharide inhibits hepatic gluconeogenesis in rats: the role of immune cells. *Journal of Diabetes Investigation*, v. 9, p. 494–504, 2018.

TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. IL6 in inflammation, immunity and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 6, n. 10, p. a016295, 2014.

TAYEK, J. A. A review of cancer cachexia and abnormal glucose metabolism in humans with cancer. *Journal of the American College of Nutrition*, v. 11, p. 445–456, 1992.

TILG, H.; MOSHEN, A. R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology*, v. 6, p. 772-783, 2006.

TRUJILLO, M.E.; SULLIVAN, S.; HARTEN, I.; SCHNEIDER, S. H.; GREENBERG, A. S.; FRIED, S. K. Interleukin-6 regulates human adipose tissue lipid metabolism and leptin production in vitro. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 89, p. 5577-5582, 2004.

TSIGOS, C.; PAPANICOLAOU, D. A.; DEFENSOR, R.; MITSIADIS, C. S.; KYROU, I.; CHROUSOS, G. P. Dose effects of recombinant human interleukin-6 on pituitary hormone secretion and energy expenditure. *Neuroendocrinology*, v. 66, p. 54-62, 1997a.

TSIGOS, C.; PAPANICOLAOU, D. A., KYROU, I.; DEFENSOR, R.; MITSIADIS, C. S.; CHROUSOS, G. P. Dose-dependent effects of recombinant human interleukin-6 on glucose regulation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 82, n.12, p. 4167-4170, 1997b.

VAARTJES, W. J.; DE HAAS, C. G. M.; HOUWELING, M. Acute effects of interleukin 1 and 6 on intermediary metabolism in freshly isolated rat hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 169, p. 623-628, 1990.

VAN-HALL, G.; STEENSBERG, A.; SACCHETTI, M.; FISCHER, C.; KELLER, C.; SCHJERLING, P.; HISCOCK, N.; MOLLER, K.; SALTIN, B.; FEBBRAIO, M. A.; PEDERSEN, B. K. Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 88, p. 3005-3010, 2003.

VICENTINO, C.; CONSTANTIN, J.; STECANELLA, L.A.; BRACHT, A.; YAMAMOTO, N.S. Glucose and glycogen catabolism in perfused livers of Walker-256 tumor-bearing rats and the response to hormones. *Pathophysiology*, v. 8, n. 3, p. 175-182, 2002.

WATERHOUSE, C.; JEANPRETRE, N.; KEILSON, J. Gluconeogenesis from alanine in patients with progressive malignant disease. *Cancer Research*, v. 39, n. 6, p. 1968-1972, 1979.

WEIGERT, C.; HENNIGE, A. M.; BRODBECK, K.; HARING, H.U.; SCHLEICHER, E. D. Interleukin-6 acts as insulin sensitizer on glycogen synthesis in human skeletal muscle cells by phosphorylation of Ser473 of Akt. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 289, p. E251-E257, 2005.

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
OF. CIRC. CEUA Nº 173/2018
Londrina, 08 de outubro de 2018.
Prezado (a) professor (a)

Certificamos que o projeto intitulado: "Avaliação do efeito da IL6 sobre a neoglicogênese, resposta insulínica e via de sinalização da insulina" protocolo CEUA nº 15825.2018.49 sob a responsabilidade de **Helenir Medri de Souza**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/Uel), em **05/10/2018**.

Este projeto tem por objetivo investigar os efeitos da IL6 sobre a neoglicogênese hepática, resposta hepática e periférica à insulina e via de sinalização da insulina, em ratos. Grau de invasividade=3

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa científica
Vigência da autorização	15/01/2019 a 15/12/2021
Espécie/ linhagem/ raça	Rato heterogênico/ Wistar
Nº de animais	240
Peso/ Idade	200-230g/ 7 semanas
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina
Amostras a serem coletadas	Sangue, Fígado, Músculo gastrocnêmio e Tecido adiposo retroperitoneal

Cumprir orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/Uel anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição, para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente.

Maria Fernanda R. Graciano
 Profa. Dra. Maria Fernanda Rodrigues Graciano
 Coordenadora da CEUA/Uel

Hmo.(a) Sr.(a)
Prof. (a) Dr (a), Helenir Medri de Souza
 Responsável pelo projeto
 Departamento de Ciências Fisiológicas/CCB

C/C para o Biotério Central/CCB
 C/C para a Chefia do Depto de Ciências Fisiológicas/CCB
 C/C para a Direção de Centro do CCB