DANIELLA ESTEVES DUQUE GUIMARÃES

**CÉLULA MUSCULAR ESQUELÉTICA
RESISTENTE À INSULINA APRESENTA RESPOSTA
ALTERADA À IL-6 NO METABOLISMO DE
CARBOIDRATO, MAS NÃO NO DE LIPÍDIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências

São Paulo
2012

DANIELLA ESTEVES DUQUE GUIMARÃES

**CÉLULA MUSCULAR ESQUELÉTICA RESISTENTE À
INSULINA APRESENTA RESPOSTA ALTERADA À IL-6
NO METABOLISMO DE CARBOIDRATO, MAS NÃO NO
DE LIPÍDIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração:
Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Ubiratan
Fabres Machado

Versão corrigida: A versão original encontra-se arquivada no setor de comunicação do ICB.

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Duque-Guimarães, Daniella Esteves

Célula muscular esquelética resistente à insulina apresenta resposta alterada à IL-6 no metabolismo de carboidrato mas não no de lipídio / Daniella Esteves Duque Guimarães. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Ubiratan Fabres Machado.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Fisiopatologia do Diabetes Mellitus: regulação do metabolismo energético por citocinas.

Versão do título para o inglês: Insulin-resistant skeletal muscle cell shows altered response to IL-6 on carbohydrate metabolism but not on lipid metabolism.

Descritores: 1. Interleucina-6 2. Metabolismo 3. Diabetes Mellitus 4. Músculo esquelético I. Machado, Ubiratan Fabres II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB09/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Daniella Esteves Duque Guimarães.

Título da Tese: Célula muscular esquelética resistente à insulina apresenta resposta alterada à IL-6 no metabolismo de carboidrato mas não no de lipídio.

Orientador(a): Ubiratan Fabres Machado.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 443/11 referente ao projeto intitulado: "*Efeitos a curto e longo prazo da interleucina-6 no metabolismo energético em células musculares resistentes à insulina*" sob a responsabilidade de **Daniella Esteves Duque Guimarães**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 15 de fevereiro de 2011.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEPSH. 034.11

PMAZ/mcgn

São Paulo, 29 de março de 2011.

Prezada Senhora,

Informo que sua solicitação datada de 17.03.2011, referente ao Projeto:
"Efeitos a curto e longo prazo da interleucina-6 no metabolismo energético em células musculares resistentes a insulina" foi considerada isenta de parecer desta Comissão, com a ressalva que seja instruída na tese que parte das amostras foi obtida de pacientes de outro país, com aprovação do Comitê de Ética de origem.

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilma Sra.

DANIELLA ESTEVES DUQUE GUIMARÃES
Departamento de Fisiologia e Biofísica
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

**Aos meus pais, Francisco e Sylvana
pelo amor, dedicação e apoio em toda a
minha vida.**

“A ciência pode estabelecer limites ao conhecimento, mas não deve estabelecer limites para a imaginação.”

Bertrand Russell

Agradecimentos

Ao querido orientador Prof Ubiratan, meu profundo agradecimento pela confiança, paciência e grande oportunidade que tanto contribuíram para o meu aprendizado. Acima de tudo por ser um profissional exemplar do ponto de vista ético, científico e humanitário.

A Prof Anna Krook pela sua fundamental contribuição, sabedoria, confiança, disponibilidade e constante estímulo ao meu aprimoramento científico.

A Prof Juleen Zierath por ter me recebido em seu laboratório, pelos inúmeros ensinamentos, pelo constante estímulo científico e pelo apoio durante meu período de doutorado sanduíche no Instituto Karolinska.

Ao pesquisador assistente Lake, pela paciência, ensinamentos e valiosa ajuda.

As queridas técnicas do laboratório Maristela e Helayne pela frequente ajuda no que fosse necessário.

A querida Kelse, pessoa iluminada e muito solidária que apareceu no meu caminho e tornou possível o meu desejo de um dia ser doutora pela USP.

Aos grandes amigos Ana Bárbara, Camilo, Raquel, Rosana e Silvania por todos os momentos em que passamos juntos e por nunca desistirem de me mostrar o caminho mais sensato. Por serem o motivo da minha felicidade em São Paulo enquanto eu não estava trabalhando no laboratório.

Aos amigos do ICB, Maíra, Guilherme, Robinson, Aline, Patricia, Ana Claudia, Milano, Paulo, Dani Furuya que conviveram comigo e compartilharam alegrias e momentos de dificuldade durante esse período.

A todos os colegas do laboratório de Fisiologia Integrada do Instituto Karolinska, em especial aos queridos Emmani, Lubna, Margareta, Dorit, Rasmus e Isabelle.

As amigas brasileiras sempre presentes no meu dia a dia sueco, Thais, Carol e Greicy, por todos os momentos divididos. Em especial à Thais, pelo enorme apoio desde o início.

Ao Zé Maria e Paloma por sempre contribuírem para a solução de questões burocráticas.

As meus queridos amigos, irmão e primas que embora não façam parte do ambiente acadêmico, sempre me acompanham e torcem pelo meu sucesso profissional.

Ao meu querido Risto, por ter tantas qualidade e fazer a minha vida mais feliz a cada dia.

A Universidade de São Paulo que tornou possível a realização desse trabalho.

A FAPESP, CAPES por terem me dado credibilidade e apoiado financeiramente essa tese.

RESUMO

Duque-Guimarães DE. Célula muscular esquelética resistente à insulina apresenta resposta alterada à IL-6 no metabolismo de carboidrato, mas não no de lipídio. [Tese (Doutorado em Fisiologia Humana)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2012.

Em geral, o desenvolvimento da resistência à insulina está associado à ativação crônica de vias inflamatórias. A interleucina-6 (IL-6) possui uma dupla função na modulação da sensibilidade à insulina com evidências indicando tanto aumento como redução na ação da insulina. Além disso, a IL-6 também é produzida e secretada pelo músculo esquelético durante o exercício, onde é geradora de um imediato e positivo efeito na sensibilidade à insulina. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito da exposição de IL-6 durante 1 hora e 24 horas no metabolismo energético de células musculares esqueléticas resistentes à insulina. Em cultura primária de células musculares de indivíduos saudáveis, 1 hora de exposição à IL-6 aumentou a síntese de glicogênio e a captação de glicose, o que não foi observado em células musculares de indivíduos diabéticos tipo 2, e parece envolver as proteínas Jak2 e Stat3. Diferentemente, a IL-6 aumentou a oxidação de ácido graxo em células de ambos os grupos, saudáveis e diabéticos tipo 2. Em células musculares da linhagem L6, a IL-6 durante 24 horas reduziu a síntese de glicogênio e a captação de glicose em condições normais, o que não foi observado em células induzidas à resistência à insulina por exposição ao palmitato. Estas respostas parecem estar relacionadas à redução na fosforilação induzida pela IL-6 da Jak2, Stat3 e Akt. No entanto, no metabolismo lipídico, a IL-6 aumentou oxidação de ácido graxo tanto em células L6 normais como resistentes à insulina, o que pode estar relacionado com o aumento da fosforilação de ACC observado. Sendo assim, o presente estudo demonstra que em células musculares normais a IL-6 induz efeitos opostos no metabolismo de carboidratos, de acordo com o tempo de exposição: a utilização de glicose aumenta após 1 hora, mas diminui após 24 horas; porém, no metabolismo lipídico a IL-6 aumenta a oxidação de ácido graxo tanto em 1 como em 24 horas. Por outro lado, os resultados evidenciam que células musculares resistentes à insulina são parcialmente resistentes à IL-6: nestas células o efeito da IL-6 está abolido no metabolismo de carboidrato, enquanto permanece efetivo no metabolismo lipídico.

Palavras-chaves: IL-6. Metabolismo. Músculo esquelético. Resistência à insulina.

ABSTRACT

Duque-Guimarães DE. Insulin-resistant skeletal muscle cell shows altered response to IL-6 on carbohydrate metabolism but not on lipid metabolism. [Ph.D. Thesis (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2012.

Chronic activation of inflammatory pathways triggers insulin resistance. Interleukin 6 (IL-6) has a dual role in modulating insulin sensitivity with evidence for this cytokine as both an enhancer and inhibitor of insulin action. IL-6 is produced and secreted by skeletal muscle during exercise, and has a positive effect on skeletal muscle insulin sensitivity. Thus, the aim of this study was to investigate the effect of IL-6 exposure for 1 hour and 24 hours on energy metabolism of insulin-resistant skeletal muscle cells. In primary cultured skeletal muscle cells from healthy individuals, 1 hour of exposure to IL-6 increased glycogen synthesis and glucose uptake, which was not observed in skeletal muscle cells of type 2 diabetic subjects, and appears to involve JAK2 and STAT3 proteins. In contrast, IL-6 increased fatty acid oxidation in cells from both groups, healthy and type 2 diabetes. On the other hand, in skeletal muscle cell line L6, IL-6 for 24 hours reduced glycogen synthesis and glucose uptake in normal conditions, which was not observed in insulin-resistant L6 cells. These responses seem to be related to a decrease in phosphorylation induced by IL-6 of Jak2, Stat3, and Akt. In contrast, on lipid metabolism, IL-6 increased fatty acid oxidation in both normal and insulin-resistant L6 cells, which may be related to increased phosphorylation of ACC observed. Therefore, this study demonstrates, in normal skeletal muscle cells, IL-6 induces opposite effects on the glucose metabolism, according to the time of exposure: the glucose utilization increases after 1 hour, but decreases after 24 hours, but on lipid metabolism, IL-6 increases fatty acid oxidation both in 1 hour and in 24 hours. On the other hand, the results suggest that insulin-resistant skeletal muscle cells are partially resistant to IL-6. On these cells, the effect of IL-6 is abolished on the glucose metabolism, while remaining effective on lipid metabolism.

Key words: Interleukin-6. Metabolism. Skeletal muscle. Insulin resistance.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Diabetes Mellitus	14
1.2 Fisiopatologia do Diabetes Mellitus tipo 2	15
1.3 Resistência Periférica à Insulina.....	16
1.4 Ácidos Graxos e Resistência à Insulina	18
1.5 Músculo Esquelético e Resistência à Insulina.....	19
1.6 Inflamação e Resistência à Insulina	21
1.7 Interleucina-6 (IL-6)	22
1.8 IL-6 e Músculo Esquelético.....	25
2 OBJETIVO.....	27
2.1 Estratégias Experimentais	27
3 METODOLOGIAS	28
3.1 Cultura de Células	28
3.1.1 <i>Cultura primária de célula muscular esquelética humana</i>	<i>28</i>
3.1.2 <i>Cultura de célula muscular esquelética da linhagem L6 (rato)</i>	<i>30</i>
3.2 Solução de palmitato conjugada à albumina	31
3.3 Captação de Glicose	32
3.3.1 <i>Cultura primária de célula muscular humana.....</i>	<i>32</i>
3.3.2 <i>Cultura de célula muscular esquelética da linhagem permanente L6 (rato).....</i>	<i>33</i>
3.4 Síntese de Glicogênio	33
3.5 Oxidação de ácido graxo	34
3.6 Extração de proteínas e Western Blot.....	34
3.7 Extração do RNA e PCR em tempo real.....	35
3.8 Ensaio imunoenzimático – ELISA.....	36
3.9 Grau de metilação do DNA.....	37
3.10 Análise estatística.....	38
ESTUDO 1.	39
4 RESULTADOS	40
4.1 Captação de glicose em células musculares esqueléticas de indivíduos não diabéticos e diabéticos tipo 2, suplementadas ou não com IL-6.....	40
4.2 Síntese de glicogênio em células musculares esqueléticas de indivíduos não diabéticos e diabéticos tipo 2, suplementadas ou não com IL-6	41
4.3 Oxidação de ácido graxo em células musculares esqueléticas de indivíduos não diabéticos e diabéticos tipo 2, suplementadas ou não com IL-6	42
4.4 Fosforilação de possíveis proteínas envolvidas na via de sinalização da IL-6 em células musculares esqueléticas de indivíduos não diabéticos e diabéticos tipo 2, suplementadas ou não com IL-6.....	43
4.5 Expressão do RNAm de IL-6, receptor de IL-6 e receptor GP130 em cultura primária de células musculares esqueléticas de indivíduos não diabéticos e diabéticos tipo 2	47
4.6 Expressão do RNAm de IL-6, receptor de IL-6 e receptor GP130 em biópsias de músculo esquelético de indivíduos saudáveis e diabéticos tipo 2	48
4.7 Secreção de IL-6 em cultura de células musculares esqueléticas de indivíduos saudáveis (NDM) e diabéticos tipo 2 (DMT2)	49
4.8 Concentração sérica de IL-6 de indivíduos não diabéticos e diabéticos tipo 2	50

4.9 Grau de metilação na região promotora dos genes IL-6, receptor de IL-6 e receptor GP130	51
5 DISCUSSÃO	54
ESTUDO 2.	60
6 RESULTADOS	61
6.1 Síntese de Glicogênio com diferentes concentrações de palmitato em células musculares esqueléticas da linhagem L6	61
6.2 Síntese de Glicogênio com diferentes concentrações de IL-6 em células musculares esqueléticas da linhagem L6	62
6.3 Captação de glicose em células musculares esqueléticas da linhagem L6 resistentes ou não a insulina, suplementadas ou não com IL-6	63
6.4 Síntese de glicogênio em células musculares esqueléticas da linhagem L6 resistentes ou não a insulina, suplementadas ou não com IL-6	64
6.5 Oxidação de ácido graxo em células musculares da linhagem L6 resistentes ou não a insulina, suplementadas ou não com IL-6	65
6.6 Fosforilação de possíveis proteínas envolvidas na via de sinalização da IL-6 em células musculares esqueléticas da linhagem L6 resistentes ou não à insulina, suplementadas ou não com IL-6	66
6.7 Expressão do RNAm do GLUT4 em células musculares esqueléticas da linhagem L6 resistentes ou não à insulina, suplementadas ou não com IL-6	71
6.8 Expressão do conteúdo total de proteína GLUT4 em células musculares esqueléticas da linhagem L6 resistentes ou não à insulina, suplementadas ou não com IL-6	72
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
9 CONCLUSÃO	79
9.1 Em célula muscular esquelética de humanos, a IL-6 durante 1 hora promoveu:	79
9.2 Em célula muscular esquelética de rato da linhagem permanente L6, a IL-6 durante 24 horas promoveu:	79
REFERÊNCIAS	81
ANEXO	Error! Bookmark not defined.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes Mellitus

Uma epidemia de diabetes mellitus (DM) está em curso. Aproximadamente 7% da população entre 20 e 79 anos de idade têm a doença atualmente, e 80% dessas pessoas vivem em países em desenvolvimento. Em países desenvolvidos representa a quarta principal causa de morte. Estimativas indicam que em 2030, 552 milhões de pessoas estarão com diabetes mellitus (IDF, 2009).

O aumento da prevalência de diabetes representa um grave problema para a saúde humana, pois propicia o desenvolvimento de sérias complicações como a nefropatia, retinopatia, neuropatia e doenças cardiovasculares (ADA, 2006). Além disso, o diabetes tem um custo econômico muito elevado para a sociedade de todos os países atingidos (Brandle et al, 2003; Hogan et al, 2003).

O diabetes mellitus é conhecido como uma desordem metabólica de múltipla etiologia caracterizada por crônica hiperglicemia com distúrbios no metabolismo de carboidratos, lípidios e proteínas, decorrentes de defeitos na secreção e/ou ação da insulina (WHO, 1999).

Muitos fatores são conhecidos por contribuir para o desenvolvimento do diabetes mellitus e suas complicações. Estão incluídos nessa lista, fator perinatal, genético, dietético, estilo de vida, idade e obesidade (Singh et al, 2004). Pesquisas demonstram que o desencadeamento de um contexto inflamatório também está envolvido no desenvolvimento da doença e seus desdobramentos. Processos inflamatórios são associados com diabetes tipo 1 e tipo 2, apesar de etiologia distinta entre os dois tipos de diabetes (CDC, 2005). Diabetes tipo 1 é frequentemente desenvolvido na infância ou juventude e surge a partir de uma destruição autoimune das células das ilhotas pancreáticas levando a perda da produção de insulina (Gross et al, 2002). De outro modo, o diabetes tipo 2 é a forma mais comum da doença e ocorre principalmente em adultos, embora a prevalência em pessoas jovens esteja aumentando em conjunto com a obesidade infantil. A maioria dos indivíduos com essa forma de diabetes é obesa e, em geral, o excesso de peso torna-se um importante fator causador ou responsável pelo agravamento da doença. O Diabetes tipo 2 é caracterizado por uma desordem na secreção e/ou ação da insulina. Em geral, em indivíduos diabéticos do tipo 2 a secreção de insulina é insuficiente para compensar a resistência à insulina, ou mesmo para atender uma ação insulínica essencialmente normal (Hamman, 1992; Ozcan et al, 2004; Tuomilehto et al, 2001).

1. 2 Fisiopatologia do Diabetes Mellitus tipo 2

Para uma melhor compreensão da fisiopatologia do Diabetes tipo 2, torna-se importante o conhecimento dos mecanismos fisiológicos envolvidos na regulação da homeostase glicêmica.

De acordo com a literatura, a glicemia, definida como a concentração de glicose no sangue, é estabelecida pela razão de entrada e remoção da glicose da circulação. Essa concentração de glicose no sangue é derivada principalmente de três Fontes: 1) absorção intestinal após a alimentação; 2) efluxo hepático de glicose decorrente da glicogenólise (degradação das reservas de glicogênio hepático) e da gliconeogênese (síntese de glicose principalmente a partir de substratos não glicídicos como lactato, aminoácidos e glicerol); e 3) captação de glicose por todos os tipos celulares do organismo (Machado et al, 2008).

Durante as primeiras 8-12 horas de jejum, a glicogenólise representa o principal mecanismo envolvido na disponibilidade de glicose na circulação. O aumento da concentração de glucagon, e a diminuição dos níveis de insulina facilitam esse processo e promovem o aparecimento da glicose na circulação. Em períodos mais longos de jejum, o principal mecanismo que mantém a glicemia é a gliconeogênese, processo que ocorre predominantemente no fígado, mas também no rim, e também induzido pela diminuição da insulina e pelo aumento do glucagon. Assim, insulina e glucagon são potentes reguladores do metabolismo da glucose. Além da insulina e glucagon, outros hormônios glicoreguladores como amilina, peptídeo semelhante ao glucagon tipo 1 (GLP-1), polipeptídeo liberador de insulina dependente de glicose (GIP), epinefrina, cortisol e hormônio do crescimento (GH) também participam do controle das concentrações de glicose em uma estreita faixa de variação (Cryer, 1992).

A insulina é um hormônio polipeptídico anabólico produzido pelas células beta do pâncreas, cuja síntese e secreção ocorrem principalmente com o aumento dos níveis circulantes de glicose após as refeições. Sinais neurais autonômicos indicativos da ingestão de carboidratos e alimentação rica em aminoácidos são fatores que também ativam a secreção de insulina. Nesse contexto encontram-se também as incretinas, que são hormônios produzidos pelo trato gastrointestinal na presença de nutrientes. O GIP e o GLP-1 são as duas principais incretinas e, dessa forma, possuem função primordial no estímulo e biossíntese de insulina de modo dependente de glicose (Girard, 2008). A insulina age em vários tecidos periféricos, especialmente em músculo, fígado e tecido adiposo. Seus efeitos metabólicos imediatos incluem: aumento da captação de glicose, principalmente no tecido muscular e

adiposo, aumento da síntese de proteínas, triglicerídeo e glicogênio, bem como bloqueio da produção hepática de glicose (via diminuição da gliconeogênese e glicogenólise), da lipólise e da proteólise. Além disso, a insulina tem efeitos tardios na expressão de genes e síntese protéica, assim como na proliferação e na diferenciação celulares. Outras funções da insulina incluem o aumento da produção de óxido nítrico no endotélio, a inibição da apoptose e aumento da sobrevivência celular (Joshi et al, 2007; Rasmussen et al, 1990).

No período pós-prandial, hormônios intestinais, como o GLP-1, são liberados e estimulam a secreção de insulina pelo pâncreas e inibem o esvaziamento gástrico, além de suprimir a liberação de glucagon. Essa elevação na razão insulina/glucagon, combinada à participação do sistema nervoso central em resposta a sinais periféricos (como os hormonais), reduz a produção endógena de glicose pelo fígado e estimula a captação de glicose pelos tecidos periféricos como o músculo esquelético e tecido adiposo. Esse conjunto de respostas fisiológicas limita o aumento da glicemia pós-prandial e favorece o retorno da glicemia ao valor basal (Sandoval et al, 2009).

No diabetes mellitus tipo 2, a função das células beta pancreática está alterada no estado pós-prandial, o que é evidenciado pela perda da resposta rápida da secreção de insulina após uma refeição. Ocorre também uma resistência periférica à ação da insulina. Assim, a fisiopatologia do diabetes tipo 2 passa a ser caracterizada pela combinação de uma série de fatores que incluem a resistência à insulina no fígado, músculo e tecido adiposo, um progressivo declínio da massa e da função das células beta pancreáticas e um defeito na supressão dos níveis de glucagon, aumentando a produção hepática de glicose (Aronoff et al, 2004).

1.3 Resistência Periférica à Insulina

Em condições fisiológicas, a glicemia se mantém constante com pequenas variações entre jejum e estado alimentado. Essa limitada faixa de variação é mantida por um delicado balanço entre sensibilidade à insulina e sua secreção.

A resistência à insulina é definida como a incapacidade dos tecidos periféricos alvos da insulina responderem normalmente às concentrações circulantes desse hormônio, resultando assim em uma diminuição da ação biológica do hormônio nesses tecidos. Como consequência, as células betas pancreáticas aumentam sua capacidade secretória, a fim de evitar a hiperglicemia. Após esse período de compensação, em geral, ocorre o desenvolvimento da intolerância à glicose apesar da elevada concentração de insulina

plasmática. A sobrecarga da função secretória das células beta do pâncreas desencadeia a falência dessas células, a qual resulta na diminuição da secreção de insulina. Esse processo está fortemente relacionado com o desenvolvimento do diabetes tipo 2, o qual é o resultado da combinação desses dois fatores: resistência à insulina e prejuízo da função secretória das células beta do pâncreas (figura 1) (Kahn et al, 2006; Petersen, Shulman, 2002).

A maioria dos estudos sugere que a resistência à insulina seja o resultado de defeitos na sinalização insulínica. Tratando-se de ações celulares, a resistência insulínica pode ser atribuída à diminuição do número de receptores ou sua afinidade pela insulina, alterações na transdução do sinal pelo receptor, alterações no processo de fosforilação de proteínas envolvidas na sinalização e alterações em outros eventos citoplasmáticos pós-receptor. Redução na atividade do receptor tirosina cinase e no transporte de glicose, diminuição da atividade da glicogênio sintase e do estímulo da piruvato desidrogenase são alguns desses eventos que podem ocorrer durante o processo do desenvolvimento e instalação da resistência a insulina (Pessin, Saltiel, 2000; Petersen, Shulman, 2006).

Diversos outros fatores também são descritos como relacionados ao desenvolvimento da resistência à insulina, incluindo alterações gênicas (Mercado et al, 2002), aumento na produção das espécies reativas de oxigênio (Houstis et al 2006), estresse do retículo endoplasmático (Nakatani et al, 2005) e inflamação em adipócitos associada ao aumento da secreção de adipocinas (citocinas secretadas pelo tecido adiposo) pró-inflamatórias. Além disso, o excesso de tecido adiposo gera um aumento de ácidos graxos livres na corrente sanguínea, o qual também se relaciona ao desenvolvimento da resistência à insulina. A alteração no padrão de secreção dos adipócitos causa prejuízos diretos em tecidos periféricos dependentes de insulina como o músculo e o fígado (Scherer, 2006; Wellen, Hotamisligil, 2005).

Figura 1 - Relação entre secreção de insulina pelas células β do pâncreas e sensibilidade à insulina

Fonte: Adaptado de Kahn et al (2006).

1.4 Ácidos Graxos e Resistência à Insulina

Ácidos graxos são uma importante Fonte de energia para muitos tecidos, incluindo o músculo esquelético, o qual é também indicado como o principal sítio de manifestação da resistência à insulina. Em geral, indivíduos com alto risco de desenvolver diabetes tipo 2 e modelos experimentais de resistência à insulina (induzido por dieta) apresentam uma elevada concentração de ácidos graxos livres na circulação (Shafrir, Raz, 2003). Além disso, a resistência à insulina, sistêmica ou muscular, pode se desenvolver também em indivíduos saudáveis após uma aguda elevação na concentração de ácidos graxos causada por infusão intralípida (Kraegen et al, 2001).

Há mais de 50 anos, Randle e colaboradores demonstraram, utilizando coração e diafragma de rato, que ácidos graxos podem induzir resistência insulínica através do ciclo glicose-ácido graxo. Eles hipotetizaram que o aumento na oxidação de ácidos graxos causado por elevação intramitocondrial das razões de acetil-coa/coa e NADH/NAD⁺, com subsequente inativação da piruvato desidrogenase resulta em aumento das concentrações de citrato intracelular que inibem assim a atividade da fosfofrutoquinase, a enzima chave no controle da glicólise. Isso leva ao aumento da concentração da glicose-6-fosfato que, em seguida, inibe a atividade da hexoquinase II, resultando em uma aumentada concentração de

glicose intracelular e com isso, redução na captação de glicose (Randle et al, 1963). Entretanto, Shulman e colaboradores apontaram que o principal fator para o desenvolvimento da resistência à insulina causada por excesso de ácido graxo é o acúmulo intracelular de lipídios e seus intermediários como diacilglicerol ou ceramidas em órgãos como o músculo e o fígado (Perseghin et al, 2003; Roden et al, 1996).

A literatura demonstra que aumento de diacilglicerol provoca ativação da PKC- θ e PKC- ϵ em músculo e fígado, respectivamente, o que resulta em diminuição da fosforilação em tirosina de IRS1/IRS2 e redução na atividade de PI3K, prejudicando assim a cascata de sinalização da insulina. No músculo, essas alterações geram diminuição na utilização de glicose (síntese de glicogênio) pela reduzida translocação do transportador de glicose (GLUT4) para a membrana plasmática em resposta à insulina. Similarmente, no fígado, a consequência aparece na diminuição da síntese do glicogênio hepático devido a redução na atividade da glicogênio sintase, além de aumento da gliconeogênese (Erion, Shulman, 2010).

Além disso, a proteína PKC é conhecida como ativadora da via inflamatória do IKK/I κ B/NF κ B, a qual está relacionada à perda de sensibilidade à insulina em tecidos como adiposo, muscular e hepático (Barma et al, 2009). Em geral, NF κ B permanece no citoplasma ligado ao inibidor proteico I κ B. A ativação dessa via ocorre através da fosforilação de I κ B por IKK, que ao ser fosforilado torna-se susceptível a sua degradação e assim desliga-se do NF κ B. Com isso, o fator de transcrição NF κ B é liberado para o núcleo onde regula a expressão de diversos genes que participam do processo inflamatório, atua como repressor da transcrição gênica de GLUT4 (Silva et al, 2005) e participa de *cross-talk* com outros fatores transcricionais como o PPAR γ , o qual regula a transcrição de genes relacionados à manutenção da sensibilidade a insulina e homeostase energética (Remels et al, 2009).

1.5 Músculo Esquelético e Resistência à Insulina

O músculo esquelético é quantitativamente o mais importante tecido envolvido na captação de glicose por estímulo da insulina, sendo de grande importância na manutenção da glicemia pós prandial (DeFronzo et al, 1981), além de ser o principal sítio de resistência à insulina em indivíduos diabéticos tipo 2 (Petersen, Shulman, 2002).

De acordo com a literatura, há uma relação entre a proporção do tipo de fibra muscular e condições como a obesidade, resistência à insulina e/ou hipertensão. Em humanos, assim como na maioria dos mamíferos, o músculo esquelético é composto de ambos os tipos de fibra, oxidativa (de contração lenta) e glicolítica (de contração rápida). As

fibras do tipo oxidativa são mais sensíveis e responsivas à insulina que as fibras glicolíticas. Além disso, as fibras de contração lenta são caracterizadas pela alta capacidade oxidativa e baixo potencial glicolítico, comparadas às fibras de contração rápida. Considerando essas diferenças metabólicas, torna-se mais clara a compreensão sobre como alterações do tipo de fibra muscular podem contribuir para o fenótipo do diabetes. Por outro lado, estudos revelam que a distribuição do tipo de fibra muscular é bastante heterogênea entre indivíduos, e que fatores genéticos e ambientais (como o grau de atividade contrátil) são determinantes para o estabelecimento da composição do músculo esquelético (Jensen et al, 2007; Oberbach et al, 2006; Tanner et al, 2002).

O transporte de glicose do meio extracelular para o intracelular pelas células musculares é o ponto crítico para a captação de glicose. As proteínas que medeiam esse processo pertencem à classe dos transportadores de glicose (GLUT) e são responsáveis por transferir a glicose a favor do seu gradiente de concentração, por difusão facilitada. Os GLUTs foram descritos na literatura como essenciais para a manutenção da homeostase glicêmica, e no tecido muscular essa ação é mediada pelos GLUT1 e GLUT4. O GLUT1 é descrito como a isoforma responsável pelo transporte de glicose no estado basal enquanto a isoforma GLUT4 aumenta o transporte de glicose em resposta à insulina e contração (Krammer et al, 2006; Marshall 2001; Martin et al, 2006).

No estado de repouso, a maior quantidade de GLUT4, isoforma sensível à ação da insulina, está estocada em vesículas intracelulares e após estímulo é agudamente translocado para a membrana plasmática. (Machado, 1998; Kahn, 1996). Esse mecanismo é de fundamental importância no aumento da captação de glicose no período pós-prandial (Slot et al, 1991).

A ligação da insulina ao seu receptor aciona a transdução do sinal insulínico através do qual este hormônio exerce seus efeitos biológicos nas células, induzindo o deslocamento das vesículas para a superfície celular, e aumentando a quantidade de GLUT4 na membrana plasmática.

O receptor da insulina (IR) pertence a uma família de receptores de fatores de crescimento. É uma glicoproteína de membrana composta por duas sub-unidades alfa e duas sub-unidades beta ligadas por pontes dissulfeto. A insulina liga-se à sub-unidade alfa, extracelular, levando a uma alteração conformacional que retira a ação inibitória da unidade alfa sobre a unidade beta, a qual se autofosforila em resíduos de tirosina. Uma vez ativa, a sub-unidade beta fosforila substratos do receptor de insulina (IRS), que contém múltiplos sítios de fosforilação em tirosina. Pelo menos 12 substratos para o IR já foram identificados

(IRS1 a 6, Gab-1, Shc 1 a 3, p62, APS), sendo IRS-1 e IRS-2 os mais diretamente relacionados à resistência à insulina (Björnholm, Zierath 2005).

Os IRSs fosforilados associam-se a PI3K (fosfatidil inositol -3 quinase), uma proteína que participa de forma importante na translocação do transportador de glicose (GLUT4) para a superfície da célula. A PI3K é formada por uma subunidade regulatória, fosforilada pelo IRS, e uma subunidade catalítica, que fosforila fosfatidil-inositóis (PI) de membrana, formando fosfatidil-inositol 3,4,5 trifosfato (PIP3), que faz regulação alostérica de PDK (kinase dependente de fosfoinositídeo). Essa, por sua vez, fosforila PKC (proteína kinase C atípica) e PKB (proteína kinase B ou Akt), as quais também podem interagir diretamente com IRS-1. A fosforilação do substrato de Akt (AS160) facilita a translocação de GLUT4 para a membrana, auxiliando a entrada de glicose na célula. Assim, a glicose intracelular é rapidamente fosforilada pela hexoquinase e direcionada para as vias oxidativas ou de síntese. Portanto, a ativação da via IRS-PI3K-AKT torna-se crucial para a manutenção do metabolismo da glicose no músculo esquelético (Björnholm, Zierath 2005). Estudos demonstram que outras vias de sinalização intracelular podem interferir nesta via clássica de sinalização da insulina, gerando uma resposta diminuída do músculo esquelético à insulina, contribuindo para o desenvolvimento da resistência insulínica sistêmica.

Por outro lado, diversos mecanismos têm sido propostos para explicar o transporte de glicose por meio da contração muscular. Os mais descritos são a ativação da AMPK (*AMP-activated protein kinase*) e o aumento da concentração de cálcio citoplasmático (Musi, Goodyear, 2003; Rose et al., 2006; Zheng et al, 2001).

O desequilíbrio na expressão de GLUT4 ou em seu mecanismo de translocação foi indicado como fator relacionado ao surgimento da resistência insulínica, a qual ocorre na obesidade e/ou diabetes tipo 2 (Shepherd, Kahn, 1999).

1.6 Inflamação e Resistência à Insulina

Nos últimos anos, muitas pesquisas estão direcionadas para o papel do processo inflamatório na resistência à insulina e na relação com o desenvolvimento e progressão do diabetes tipo 2 (Luca, Olefsky, 2008). A literatura científica indica que a obesidade é associada a um processo inflamatório e, assim, ao desenvolvimento da resistência insulínica (Hotamisligil, 1993). Aumento em marcadores inflamatórios foram detectados em indivíduos aparentemente saudáveis que, mais tarde, tornaram-se diabéticos do tipo 2, sugerindo que a inflamação inicie durante o primeiro estágio do desenvolvimento da doença, no qual, em

geral, ocorre um prejuízo na tolerância à glicose (Greenfield, Campbell, 2006). Índios Pima (população caracterizada pela alta prevalência de diabetes tipo 2) que apresentam uma alta concentração sanguínea de células do sistema imune são mais propícios a tornarem-se diabéticos do que aqueles que mostram uma concentração baixa de células imunológicas (Lillioja et al, 1988).

Estudos em humanos resistentes à insulina revelam uma clara associação entre a ativação crônica de vias de sinalização inflamatória e diminuição da sensibilidade à insulina. No caso do tecido adiposo, a sua expansão provoca hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos. Com o aumento das células adiposas, a vascularização torna-se prejudicada, gerando uma situação de hipóxia no tecido e por consequência liberação de citocinas e outros sinais pró-inflamatórios. Nesse contexto, quimiocinas localmente secretadas atraem macrófagos para o tecido adiposo, onde eles se infiltram ao redor de adipócitos em apoptose, estimulam a chegada de outros monócitos (pré-macrófagos) e secretam mais citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e IL-6 (IL-6). Tais citocinas participam de uma série de eventos que prejudicam a sensibilidade à insulina. Assim, esses sinais são amplificados causando, eventualmente, uma resistência insulínica sistêmica (Ye et al, 2009; Xu et al, 2003).

Vale ressaltar que a ativação do processo inflamatório associado à resistência a insulina não é exclusivo do tecido adiposo. Em geral, o mesmo processo ocorre no tecido hepático, onde é possível localizar inúmeros macrófagos além do acúmulo de lipídios intracelular e secreção de citocinas. Apesar de a inflamação hepática contribuir para o desenvolvimento da resistência à insulina secundária no músculo esquelético, esse não é o principal mecanismo pelo qual o processo inflamatório atua nesse tecido. De acordo com a literatura, há uma forte relação entre inflamação crônica e músculo esquelético resistente à insulina. Entre as possíveis explicações, pode-se citar: a infiltração de células inflamatórias no tecido muscular; geração e secreção de citocinas pró inflamatórias pelo próprio músculo esquelético e presença de diversos componentes do sistema imune inato como receptores para citocinas do tipo Toll (TLRs) (Wei et al, 2008).

1.7 Interleucina-6 (IL-6)

IL-6 é uma citocina pleitrópica que possui importantes funções na regulação da resposta imune, inflamação e hematopoiese. Pode ser definida também com uma molécula de sinalização intercelular, tradicionalmente associada ao controle e coordenação na resposta

imune, sendo primordialmente secretada por macrófagos e linfócitos em resposta a lesão ou infecção (Heinrich et al, 2003). É uma proteína de baixo peso molecular, que age de forma local e sistêmica gerando uma variedade de respostas fisiológicas também relacionadas às funções endócrinas e metabólicas (Papanicolaou, 2000). Diversos outros tipos celulares, além do macrófago e linfócito, são responsáveis pela secreção desta citocina, entre eles células: endotelial, beta pancreática, hepatócito, muscular esquelética e lisa, astrócito, da microglia e adipócito (Akira et al, 1993; Fried et al, 1998; Nagaraju et al, 1998).

A transdução do sinal intracelular da IL-6 inicia-se com a ligação à subunidade α do seu receptor de membrana (IL-6R) ou a uma versão solúvel, clivada, do receptor de membrana, que está presente no plasma (sIL-6R). Interessantemente, a associação de IL-6 com o sIL-6R α é capaz de desencadear a resposta biológica da interleucina em células que expressam a glicoproteína de membrana (GP130). Este tipo de ativação, que se denomina *trans signalling*, permite que todos os tipos celulares sejam capazes de responder ao complexo IL-6/sIL-6R. Após a ligação de IL-6/IL-6R ocorre uma associação com GP130, e após formação desse complexo o sinal intracelular é disparado. Os efeitos intracelulares da IL-6 são induzidos principalmente através da ativação da via JAK/STAT, onde o heterodímero IL-6R-GP130 ativa principalmente a janus quinase 2 (JAK2), que após ser fosforilada, ativa o transdutor de sinal e ativador de transcrição STAT-3 (Figura 2). STATs são conhecidas como indutoras das proteínas supressoras de sinalização de citocinas (SOCS) assim como interferem na expressão de inúmeras outras proteínas. SOCS 3 atua como mediador do feedback negativo na sinalização de IL-6 além de afetar a sinalização insulínica, como por exemplo, alterando a ativação do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) (Heinrich et al, 1998; Lebrun, Van Obberghen, 2008).

Após a IL-6 ser considerada uma adipocina pró-inflamatória cujo tecido adiposo pode contribuir com até 35 % de sua concentração basal na circulação, a literatura passou a indicar que tal fato seja uma possível explicação para a positiva correlação entre a sua concentração plasmática, a obesidade e o diabetes tipo 2 (Kern et al, 2001). Além disso, animais tratados cronicamente com IL-6 desenvolvem resistência hepática à insulina, assim como animais knockout para SOCS-3 hepático, uma proteína que reprime a sinalização de IL-6, apresentam obesidade e resistência insulínica sistêmica. Ainda no mesmo estudo, a sinalização insulínica no músculo foi afetada, sugerindo que a deleção do gene SOCS-3 hepático modula a sensibilidade à insulina em outros órgãos. Recentemente, um estudo demonstrou que após IL-6 ser expressa cronicamente no fígado, ou após célula beta pancreáticas serem

suplementadas por 24 horas com a citocina, ocorre um aumento na secreção de insulina estimulada por glicose em ambos os modelos. Esses resultados sugerem que o aumento da concentração de IL-6, o qual ocorre no estágio inicial da obesidade e durante o choque séptico, esteja envolvido no desenvolvimento da hiperinsulinemia, frequentemente desenvolvida nessas condições (Suzuki, 2011). No entanto, outro grupo demonstrou que a administração de IL-6 ou a elevada concentração desta citocina em resposta ao exercício, estimulou a secreção de GLP-1 pelas células intestinais, e com isso o aumento da produção de insulina pelas células beta pancreáticas, melhorando a glicemia (Ellingsgaard et al, 2011).

Em relação ao efeito da IL-6 em adipócitos, a maior parte dos estudos demonstrou que a citocina provoca efeitos negativos na sensibilidade à insulina, embora também tenha estudo que mostrou aumentada captação de glicose pelo tecido adiposo de indivíduos submetidos a infusão de IL-6 (Lagathu et al, 2003; Lyngso et al, 2002; Rotter et al, 2003). Em hepatócitos, estudos em roedores *in vivo* e em cultura de célula humana mostraram que, através da via JAK/STAT, a IL-6 foi capaz de reduzir o estoque de glicogênio pela diminuição da glicogeniogênese e aumento da glicogenólise (Senn et al, 2002; Kim et al, 2004). Além disso, um elegante estudo utilizando animais knockout para IL-6 demonstrou o desenvolvimento de obesidade e intolerância a glicose nesses animais, o que foi parcialmente revertido após tratamento com IL-6. Recentemente, outro grupo de pesquisadores demonstrou que animais transgênicos que mantinham uma concentração elevada de IL-6 na circulação exibiram um aumento na ação da leptina central, com favorecimento da homeostase glicêmica, protegendo-os de obesidade induzida por dieta (Sadagurski et al, 2010).

Sendo assim, embora IL-6 seja mais conhecida como uma citocina pró-inflamatória, a literatura também apresenta dados consistentes sobre efeitos anti-inflamatórios benéficos ao organismo desta interleucina.

Figura 2 - Principal mecanismo de ação da IL-6

Fonte: Adaptado de Ahmed et al (2007).

1.8 IL-6 e Músculo Esquelético

Há alguns anos, foi demonstrado que a IL-6 pode ser considerada um “fator do exercício”. Esta citocina, que é produzida e liberada no músculo esquelético em resposta ao exercício físico, exerce seus efeitos em outros órgãos e, atualmente, pode também ser chamada de “miocina”. Neste sentido, assim como foi estabelecido o termo adipocina, o termo miocina pode ser utilizado para as citocinas e outros peptídeos que são produzidos e liberados pelas fibras musculares (Pedersen, Febbraio, 2008). A descoberta sobre a capacidade do músculo esquelético secretar IL-6 durante a atividade contrátil desencadeou uma série de questionamentos sobre a função da IL-6 no metabolismo energético, uma vez que foi criado um paradoxo. Por um lado, a IL-6 é secretada pelo músculo esquelético no período logo após a realização de exercício onde a ação da insulina está aumentada, no entanto, por outro lado, a IL-6 é associada a obesidade e ao desenvolvimento da resistência à insulina sistêmica e no músculo esquelético.

Combinado aos efeitos benéficos da IL-6 associados ao exercício, essa citocina está também envolvida com indução de proliferação de células satélites, as quais são células quiescentes precursoras de novos miotubos, que auxiliam na regeneração e hipertrofia muscular (Serrano et al, 2008). Além disso, participa do estímulo e manutenção do aumento

da concentração de cálcio intracelular, o qual é componente crucial para a resposta adaptativa do tecido muscular esquelético ao exercício (Weigert et al, 2007).

No entanto, tratamentos crônicos com IL-6 em músculo esquelético provocaram redução na captação de glicose estimulada por insulina e na fosforilação de proteínas envolvidas na cascata de sinalização insulínica (Nieto-Vazquez et al, 2008). Experimentos *in vitro* e *in vivo* com suplementação de IL-6, a curto prazo, mostraram aumento na captação de glicose e oxidação de ácidos graxos em músculo esquelético, principalmente via ativação de AMPK, que é um importante evento que ocorre na contração muscular (Al-Khalili et al, 2006; Carey et al, 2006; Glund et al, 2007). AMPK é um sensor celular de energia que se ativa quando os níveis de ATP diminuem (e os de AMP aumentam). Uma vez ativada, AMPK desliga processos que consomem energia como síntese de ácido graxo ou proteína e, por outro lado, promove processos que produzem energia, como o transporte de glicose, inclusive ativando fatores transcricionais que regulam a expressão do gene do GLUT4 e oxidação de ácidos graxos. Ativação de AMPK promove transporte de glicose via mecanismo independente de insulina tanto em músculos saudáveis como em resistentes à insulina (Hayashi et al, 1998; Musi et al, 2001).

Atualmente, os efeitos da IL-6 na resistência à insulina ainda não estão completamente elucidados. Muito da controvérsia relacionada à função da IL-6 no metabolismo parece ser resultado de comparações inapropriadas de efeitos agudos em um determinado tecido com efeitos crônicos em outros tecidos. As funções e os efeitos metabólicos da IL-6 demonstram ser tecido e contexto-específico.

Sendo assim, embora sejam facilmente encontrados na literatura estudos com suplementação crônica ou aguda de IL-6 em músculo esquelético saudável, estudos que avaliem a ação da IL-6 a curto ou longo prazo em células musculares resistentes à insulina são inexistentes.

Com isso, o presente estudo hipotetiza que a exposição por 1 hora à IL-6 provoque efeitos benéficos no metabolismo lipídico e carboidrato, contribuindo para o aumento da sensibilidade a insulina em células musculares esqueléticas de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2. Por outro lado, hipotetiza-se que a exposição por 24 horas à IL-6, em células musculares resistentes à insulina, desencadeie um efeito ainda mais deletério sobre o metabolismo energético que o observado em células musculares normo tolerante à glicose.

2 OBJETIVO

Investigar o efeito da exposição à IL-6, por 1 hora, no metabolismo da célula muscular esquelética de indivíduo normo tolerante à glicose e diabético tipo 2; e por 24 horas, no metabolismo da célula da linhagem L6 (muscular esquelética de rato) normo tolerante à glicose ou resistente à insulina (indução por palmitato).

2.1 Estratégias Experimentais

Estudo 1. Investigar em célula muscular esquelética de indivíduo normo tolerante à glicose (não diabético) ou diabético tipo 2, tratada ou não com IL-6 por 1 hora (curta duração):

- A captação de glicose;
- A síntese de glicogênio;
- A oxidação de ácido graxo;
- A fosforilação e a expressão de possíveis proteínas envolvidas na sinalização da IL-6: STAT3, JAK2, AKT, AMPK α ;
- A secreção de IL-6;
- A expressão (RNAm) de IL-6, receptor da interleucina 6 e co-receptor da IL-6 (GP130);
- O grau de metilação no gene da IL-6, receptor da IL-6 e co-receptor da IL-6 (GP130).

Estudo 2. Investigar em célula muscular esquelética da linhagem L6 (rato) saudável ou resistente à insulina (induzido por palmitato), tratada ou não com IL-6 por 24 horas (longa duração):

- A captação de glicose;
- A síntese de glicogênio;
- A oxidação de ácido graxo;
- A fosforilação e a expressão de possíveis proteínas envolvidas na sinalização da IL-6: STAT3, JAK2, AKT, AMPK α , ACC;
- A expressão (RNAm e proteína) de GLUT4.

3 METODOLOGIAS

3.1 Cultura de Células

3.1.1 Cultura primária de célula muscular esquelética humana

Foram obtidas biópsias de músculo esquelético vasto lateral de indivíduos saudáveis (n=18) e diabéticos tipo 2 (n=13). As características dos indivíduos que originaram a cultura primária de células musculares humanas são apresentadas na tabela 1. Indivíduos em tratamento com insulina e com doença cardíaca coronária sintomática foram excluídos do estudo. O tempo médio desde o diagnóstico de diabetes tipo 2 foi de 5 anos. Alguns dos indivíduos que participaram do estudo foram tratados com metformina (n=3), sulfoniluréia (n=4), beta bloqueador (n=5) e medicamentos para dislipidemia (n=6). Nesses indivíduos, foi aplicada anestesia local (cloridrato de lidocaína 5 mg/ml) após jejum noturno de 12 horas. Em ambos os casos, as biópsias foram coletadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) frio suplementado com 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml estreptomicina. As biópsias foram dissecadas em solução com antifúngico para exclusão de adipócitos e tecido conectivo aderidos ao tecido muscular. Após, foram transferidas para a solução de digestão (colagenase IV, tripsina, albumina bovina, penicilina e estreptomicina em meio DMEM contendo 20 % de soro fetal bovino e antifúngico) e incubadas a 37 °C com agitação durante 20 minutos. Em seguida, o sobrenadante contendo células satélites foi coletado e adicionado em DMEM 20% de soro. Esse passo foi repetido mais uma vez e após o novo sobrenadante ser adicionado ao antigo já em meio DMEM 20% de soro, foi realizada centrifugação por 10 minutos à 1000 rpm. O pellet de células foi ressuscitado em 5 ml do mesmo tipo de meio e incubado em uma placa de petri por 1 hora para aderência e assim exclusão de células não miogênicas. O sobrenadante da placa foi então, transferido para uma placa e incubado à 37 °C com troca de meio a cada 2 dias. Após atingir confluência de 80 % foi tripsinizado para distribuição em novas placas e esperado a confluência de 80 % novamente, o período de diferenciação foi iniciado com meio DMEM 2 %. Passados 7 dias, os tratamentos do estudo 1 foram realizados (Figura 3). Este estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto Karolinska, Suécia.

Tabela 1. Características dos indivíduos que originaram a cultura primária de célula muscular esquelética humana

Características dos Indivíduos	NDM		DMT2	
	Média	EPM	Média	EPM
N (masculino)	18	-	13	-
Idade (ano)	60.17	1.19	61.38	1.37
IMC (Kg/m ²)	27.50	0.45	29.77*	1.04
Circunferência da cintura (cm)	102.33	1.78	105.69	2.26
Glicemia plasmática de jejum (mM)	5.16	0.11	7.79***	0.52
Glicemia após 2h sobrecarga (mM)	6.49	0.21	14.75***	1.14
HbA1c (%)	4.58	0.10	6.55***	0.32
Insulina (pM)	49.33	5.55	51.72	12.70
Colesterol total (mM)	5.62	0.35	4.69	0.30
LDL (mM)	3,64	0,27	2,59**	0,18
HDL (mM)	1.69	0.10	1.25**	0.08
Triglicerídeo (mM)	1.44	0.31	1.67	0.33

IMC, índice de massa corporal; HbA1c, hemoglobina glicada; LDL, lipoproteína de baixa densidade; HDL, lipoproteína de alta densidade. Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Figura 3 - Procedimento experimental do estudo 1 com cultura primária de célula muscular esquelética de indivíduos não diabéticos (NDM) e diabéticos tipo 2 (DMT2)

Fonte: Duque-Guimarães (2012).

3.1.2 Cultura de célula muscular esquelética da linhagem L6 (rato)

Foram utilizadas células musculares da linhagem permanente L6, provenientes do banco mundial de células ATCC (*American Type Culture Collection*). Alíquotas de células foram colocadas em frascos contendo meio de propagação α MEM (Invitrogen) suplementado com 10 % de Soro Fetal Bovino-SFB (Cultilab) e 10.000 UI/mL de penicilina + 10 mg/mL de estreptomicina (Mitsumoto, Klip, 1992). Permaneceram em incubadora a 5% de CO₂ e 37 °C até atingirem confluência de cerca de 80 %, quando, então, o meio foi substituído por meio de diferenciação contendo α MEM (1000 mg/L) + SFB 2 %. Após 7 dias de diferenciação os tratamentos do estudo 2 foram realizados (Figura 4).

3.2 Solução de palmitato conjugada à albumina

Inicialmente foi preparada uma solução estoque de 5 mM de palmitato e a partir dessa foram feitas diluições para tratar as células com a concentração desejada no momento do tratamento. Para isso, foram preparadas uma solução 10 % de albumina bovina livre de ácido graxo (Sigma A8806) em meio de cultura α MEM e uma solução de 0,1 M NaOH. O ácido palmítico (Sigma P5585) foi dissolvido na solução de NaOH na temperatura de 70 °C durante 10 minutos para concentração final de uma solução de palmitato à 20 mM. A solução de albumina também foi aquecida à 50 °C e após, ambas as soluções (ácido palmítico e albumina) foram misturadas para obtenção da solução de palmitato 5 mM conjugada à albumina. Todos os ensaios do estudo 2 utilizaram 250 μ M de solução de palmitato conjugada à 0,3 % de albumina (com exceção da curva dose-resposta onde foram incluídas outras concentrações da solução de palmitato). Então, amostras utilizadas como controles ou apenas estimuladas com IL-6 receberam adição de 0,3 % de albumina no meio de cultura durante o mesmo período.

Figura 4 - Procedimento experimental do estudo 2 com cultura de célula muscular esquelética de rato da linhagem L6, resistente ou não à insulina.

Fonte: Duque-Guimarães (2012).

3.3 Captação de Glicose

3.3.1 Cultura primária de célula muscular humana

O soro foi retirado do meio de cultura das células 6 horas antes do experimento. Ao iniciar o tratamento, as células foram estimuladas por IL-6 (25 ng/ml) ou veículo (0,1 % de albumina) por 1 hora com ou sem insulina por 30 minutos (120 nM) e incubadas à 37 °C. Após, as células foram lavadas com PBS e a solução com 2-deoxi-glicose marcada com ³H (meio livre de glicose, 10 mM de 2-deoxi-glicose não radioativa e ³H- 2-deoxi-glicose 1 mCi/ml) foi adicionado e houve incubação de 30 minutos à 37 °C. Em seguida, as células foram lavadas rapidamente 4 vezes com PBS frio e solubilizadas com SDS 0,03 %. Foram homogeneizadas durante 1 hora à temperatura ambiente com agitação e após a lise, foram adicionadas ao líquido de cintilação para quantificação. A concentração de proteína total de cada amostra foi quantificada por Bradford para normalização do resultado final.

3.3.2 Cultura de célula muscular esquelética da linhagem permanente L6 (rato)

O soro foi retirado do meio de cultura das células 6 horas antes do experimento. Ao iniciar o tratamento, as células foram estimuladas por IL-6 (25 ng/ml) e palmitato (250 μ M) por 24 horas com ou sem insulina (120 nM) por 20 minutos e incubadas à 37 °C. Após, as células foram lavadas 3 vezes com solução salina HEPES (140 mM NaCl, 20 mM HEPES-Na pH 7.4, 5 mM KCl, 2,5 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂) em temperatura ambiente e incubadas com solução de transporte (solução salina HEPES, 10 μ M 2-deoxi-Glicose, 2.0 μ Ci/ml ³H 2-deoxi-Glicose) por 15 minutos à 37 °C. Em seguida, lavadas rapidamente com solução fria de parar a reação (0.9 % Salina + 25 mM Glicose) por 3 vezes e solubilizadas com SDS 0,03 %. Foram homogeneizadas durante 1 hora à temperatura ambiente com agitação e após a lise, foram adicionadas ao líquido de cintilação para quantificação. A concentração de proteína total de cada amostra foi quantificada por Bradford para normalização do resultado final.

3.4 Síntese de Glicogênio

O soro foi retirado do meio de cultura das células 6 horas antes do experimento. Ao iniciar o tratamento, o meio livre de soro foi renovado e as células foram estimuladas por IL-6 (25 ng/ml) por 1 hora (estudo 1) ou por palmitato (250 μ M) e IL-6 (25 ng/ml) por 24 horas (estudo 2). No caso das curvas dose-resposta para palmitato ou IL-6 no estudo 2, o procedimento realizado foi o mesmo, apenas foram utilizadas diferentes doses de palmitato ou IL-6 no momento do tratamento. As células foram estimuladas previamente com insulina (120 nM) por 30 minutos à 37 °C e em seguida, foi adicionado 50 μ l/mL da solução de glicose marcada (5 μ l isótopo + 45 μ l meio livre de soro e glicose) em cada placa e incubado por 90 minutos à 37 °C. Após, células foram lavadas com PBS frio três vezes e solubilizadas em 0,03 % de solução SDS. Foram homogenizadas por 1 hora em agitação, o carreador de glicogênio foi adicionado e cada amostra foi colocada em banho-maria em forno à 100 °C por 2 horas. Em seguida, foi adicionado etanol 98 % para precipitar o glicogênio e permaneceu durante 12 horas na temperatura de -20 °C. As amostras foram centrifugadas à 4 °C para formação do *pellet* o qual contém o glicogênio e lavadas com etanol 70 % e centrifugadas novamente. O *pellet* foi solubilizado em H₂O destilada por 12 horas em temperatura ambiente e usado para quantificação em líquido de cintilação. A concentração de proteína total de cada amostra foi quantificada por Bradford para normalização do resultado final.

3.5 Oxidação de ácido graxo

O soro foi retirado do meio de cultura das células 6 horas antes do experimento. Ao iniciar, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com PBS estéril. O novo meio que continha palmitato marcado com ^3H , conjugado à albumina, livre de ácido graxo, foi adicionado às células com incubação durante 6 horas. A insulina (120 nM) por 30 minutos e IL-6 (25 ng/ml) por 1 hora (estudo 1) foram adicionadas ao meio com palmitato marcado na primeira hora da incubação. No caso do estudo 2, o palmitato (250 μM) e IL-6 (25 ng/ml) foram adicionados 18 horas antes da troca para o meio com palmitato marcado e após foram novamente adicionados por mais 6 horas, completando ao total, 24 horas de tratamento. Em seguida, carvão previamente dissolvido e purificado com TRIS-HCL ph 7,5 foi adicionado as amostras com incubação por 30 minutos em temperatura ambiente. As amostras com carvão foram centrifugadas a 13000 rpm por 15 min e depois o sobrenadante límpido, livre de carvão, foi cuidadosamente retirado e colocado no líquido de cintilação para quantificação. A concentração de proteína total de cada amostra foi quantificada por Bradford para normalização do resultado final.

3.6 Extração de proteínas e Western Blot

As proteínas totais foram primeiramente extraídas utilizando o sobrenadante após centrifugação das amostras em solução de homogeneização (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, MgCl_2 1 mM, EDTA 1mM, Na pirofosfato 5 mM, NaF 10 mM, Triton X-100 1 %, Glicerol 10 %, Tris ph 7.8 20 mM, Leupeptina 1 $\mu\text{g/ml}$, Aprotinina 1 $\mu\text{g/ml}$) e a concentração foi determinada pelo método de Bradford. Para avaliar o grau de fosforilação e expressão de proteínas em cultura primária de células musculares e da linhagem L6 foi utilizada a técnica de western blot. Este método consistiu em quatro etapas fundamentais: SDS-PAGE – o qual envolve um sistema descontínuo de dois géis contínuos (gel de empacotamento e gel de separação). Antes da aplicação, as amostras foram fervidas por 4 min. A eletroforese começou com a corrida no gel de empacotamento sob voltagem constante em 70 mV até que ocorreu o empacotamento da amostra, o que pode ser observado na transição dos géis. Posteriormente, foi aplicada uma corrente constante de 100 mV para a corrida no gel de separação por 2 horas. Transferência eletroforética: após a separação das frações protéicas no gel de poliacrilamida foi realizada a sua transferência eletroforética para uma membrana de nitrocelulose Hybond-ECL (Amersham, Buckinghamshire, UK), sob corrente constante de

100 mV, por 1 hora, a 4 °C, em tampão Tris-Cl (12,5 mM), glicina (95 mM), metanol 20 %, pH 8,3. A qualidade da transferência foi verificada corando-se o gel com corante Ponceau (Biosystems, Brasil). Imunodeteção por quimioluminescência (ECL): Inicialmente fez-se o bloqueio inespecífico das membranas em leite desnatado 5 % diluído em PBS 1X pH 7,2 [NaCl 0,8 %; Na₂HPO₄.(12H₂O) 0,115 %; KCl 0,02 %; KH₂PO₄ 0,02 %] por 1 hora. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo primário (1:1000) em PBS 1X por 12 horas a 4 °C, sob agitação. Após a incubação as membranas foram submetidas a várias lavagens: 2 lavagens rápidas com 10 mL de solução de lavagem (0,1 % Tween 20); 1 lavagem de 15 minutos com solução de lavagem, sobre o agitador; 3 lavagens com solução de lavagem, 5 minutos cada. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário com HRP (Horse Radish Peroxidase) (1:10.000) em PBS 1X (BSA 5 %) por 1 hora, sob agitação e temperatura ambiente. Por fim, as amostras foram novamente lavadas: 2 lavagens rápidas com solução de lavagem; 1 lavagem com solução de lavagem por 15 minutos; 4 lavagens de 5 minutos cada com solução de lavagem. Para a detecção das bandas, as membranas foram incubadas com as soluções de detecção 1 e 2 na proporção 1:1, por 1 minuto (0,125 mL/cm²). Em seguida, as membranas foram expostas a filmes de RX (Hyperfilm - Amersham, Buckinghamshire, UK), por um tempo variável de 15 segundos à 30 minutos. Após esse período o filme foi revelado com solução reveladora e reforçadora GBX e solução fixadora e reforçadora GBX (Kodak Brasileira, São Paulo, BR). Densitometria Óptica: A intensidade dos “blots” foi avaliada por densitometria óptica, utilizando-se o programa (imlD - Pharmacia Biotech, Uppsala, SW) e o resultado numérico foi expresso em unidade arbitrária (UA).

3.7 Extração do RNA e PCR em tempo real

Amostras de cultura primária de células musculares, de biópsia de tecido muscular e de cultura da linhagem L6, após o tratamento, quando necessário, foram processadas pelo método Trizol para obtenção de um concentrado de RNA total a partir do qual apenas 1 ug foi submetido à reação de transcrição reversa com *primers* randômicos. Para isto, foi adicionado em cada amostra tampão da enzima (50 mM de Tris-HCl pH 8,3, 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂), DTT (10 mM), mistura de dNTPs (0,5mM cada), primers randômicos (150 ng), inibidor de RNase (40 U) e a enzima SuperScript II (200 U; Invitrogen, EUA), em volume final de 20 uL. As reações foram incubadas por 50 min à 42°C, seguida de aquecimento à 70 °C por 15 minutos para desnaturação da enzima. Após obtenção do DNAc

das amostras por retro transcrição reversa, utilizou-se a técnica de PCR em tempo real, utilizando aparelho ABI Prism 7500 e kit comercial TaqMan Universal PCR Master Mix, ambos da Applied Biosystems. Cada reação foi constituída 12,5 µL de volume final. 6,25 µL de tampão universal PCR master mix, 0,5 µL (10mM) da solução contendo iniciadores para IL-6, IL-6R, GP130, GLUT4, β 2µG ou GAPDH e sonda, 3,25 µL de água deionizada e 2,5 µL de amostra de DNAc. A amplificação foi feita utilizando a seguinte ciclagem: 50 °C/2 min, 95 °C/10 min e 50 ciclos de 95 °C/15 s e 60 °C/1 min. A mistura contendo iniciadores e sonda para GLUT4 foi sintetizada por encomenda à empresa Applied Biosystems. Tabela com sequência dos primers utilizados:

Tabela 2 - Oligonucleotídeos (*primers*) utilizados na técnica de PCR em tempo real para determinar o nível de expressão dos diferentes genes

Genes	Primer 5' (forward)	Primer 3' (reverse)
IL-6	TAGCCGCCCCACACAGACAG	GGGTGTTGTTTACGGTCGG
IL-6 receptor	CATTGCCATTGTTCTGAGGTTC	CTGTAGTCGTTATGTCTGATGA
GP130	CATGCTTTGGGTGGAATGGAC	CATCAACAGGAAGTTGGTCCC
GLUT4	AGAGTGCCTGAAACCAGAGG	CAGTCAGTCATTCTCATCTGGC
B2MG	GGAGGGCATCCAGCGTACTCC	CGGATTGATGAAACCCAGACAC
GAPDH	GCAGGGGGGAGCCAAAAGGG	GAAACTGCGACCCCGACCGT

3.8 Ensaio imunoenzimático – ELISA

A concentração de IL-6 presente no meio onde as células musculares estavam sendo cultivadas durante estímulo ou não com insulina e sérica foi determinada por ensaio imunoenzimático ELISA, utilizando kit comercial para análise de IL-6 em humanos (Invitrogen, USA), baseado na técnica direta de sanduíche. Para determinar a concentração de IL-6 nas amostras foram utilizados padrões e 100 µL de meio ou soro e 100 µL de solução de anticorpo monoclonal de camundongo anti-IL-6 conjugado com peroxidase. Após incubar 1 hora em temperatura ambiente, a placa foi lavada 4 vezes. Acrescentou-se 200 µL de substrato da peroxidase e incubou-se novamente durante 20 minutos em temperatura ambiente. Posterior a esta etapa, a reação foi interrompida com solução de parada e foi medida a absorbância a 450 nm em um leitor de placas (Asys Hitech). As concentrações de

IL-6 foram calculadas a partir de curva-padrão normalizada pela concentração de proteína total encontrada nas mesmas amostras.

3.9 Grau de metilação do DNA

O grau de metilação dos genes IL-6, IL6R e GP130 foi investigado com o uso do MethylMiner™ Methylated DNA Enrichment Kit (Invitrogen, UK) o qual possibilita o isolamento do DNA metilado para quantificação por PCR em tempo real. O DNA metilado, a partir do fracionamento do DNA genômico, inicia o processo de isolamento através da ligação à proteína que contém domínio de ligação a metil-CpG (MBD). Essa proteína após a ligação ao DNA metilado se acopla às beads magnéticas de estreptavidina através da afinidade por biotina. Posterior ao completo isolamento dos fragmentos de DNA metilados, esses são eluídos para quantificação pela técnica de PCR em tempo real. Sendo assim, células musculares humanas a partir da cultura primária foram diferenciadas e após 7 dias, foram lavadas com PBS e o DNA extraído por kit comercial (Quiagen). Após, as amostras foram quantificadas em Nanodrop para obtenção de 1 µg de DNA. Em seguida o DNA foi adicionado à solução enzimática contendo enzima de restrição ALU I e incubado durante 12 horas à 37 °C com leve agitação. O seguinte passo consistiu de limpeza do DNA já fragmentado pela enzima. As amostras foram misturadas à resina e passaram por mini-colunas com sistema a vácuo. Após, foi adicionado isopropanol 80 % às mini-colunas e essas foram centrifugadas por 2 minutos para remoção completa do isopropanol. Foram adicionados 50 µL de H₂O previamente aquecida (65-70 °C) nas mini-colunas seguida de centrifugação para eluição do DNA purificado. Novamente o DNA foi quantificado utilizando aparelho Nanodrop. Foi feita a preparação das *beads* as quais foram ressuspensas e lavadas 3 vezes. A proteína MBD foi adicionada às *beads* e houve incubação por 1 hora em temperatura ambiente com agitação. Foram lavadas por mais 3 vezes com solução de lavagem e o DNA foi adicionado à elas iniciando o kit comercial (MethylMiner™ Methylated DNA Enrichment Kit). As amostras foram homogeneizadas em temperatura ambiente com agitação durante 1 hora. Com a ajuda de *racker* magnética foi possível separar as *beads* do líquido e assim, descartá-lo. As amostras foram mais uma vez lavadas e depois, eluídas em solução com alta concentração de sal (2000 mM NaCl) para obtenção da fração de DNA metilado. As amostras foram homogeneizadas por 3 minutos e após o uso da *racker* magnética, as amostras eluídas foram separadas das *beads* e armazenadas em gelo, o mesmo passo foi repetido mais uma vez para separação total das

beads. Glicogênio, acetato de sódio e etanol foram adicionados às amostras e após, incubado em temperatura -80 °C por 2 horas. Em seguida, centrifugado 15 minutos à 13000 rpm e o sobrenadante foi removido cuidadosamente. Foi adicionado etanol 70 % e centrifugado por 5 minutos. Esse procedimento foi repetido mais uma vez para remoção residual total. Assim, o pellet foi seco em temperatura ambiente por 5 minutos e depois ressuspendido em 60 µL de H₂O livre de DNase. O ultimo passo para quantificação da porção metilada de DNA foi realizado através da técnica de PCR em tempo real utilizando as amostras de DNA obtidas previamente. Tabela com seqüência dos primers utilizados:

Tabela 3 - Oligonucleotídeos (*primers*) utilizados para quantificação da porção metilada na região promotora de diferentes genes

Genes	Primer 5' (forward)	Primer 3' (reverse)
IL-6	CACAGAAGAACTCAGATGACTGG	CAGGCTAGAATTTAGCGTTCCA
IL-6R	GGGCAGCATAGGCTTTCTTA	AAACGGTTTGGACTTTGCAG
GP130	GGGGAACCCTTCGATCTAGT	GGGACCTAGGCGCTGATT
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC	CAGAGTTAAAAGCAGCCCTGGT

3.10 Análise estatística

Foi utilizado ANOVA uma ou duas vias para comparação entre três ou mais grupos com pós-teste Bonferroni. Uma vez que o pós-teste não especifica a diferença entre os exatos grupos no caso da ANOVA duas vias, o teste *t-Student* para amostras não pareadas ou pareadas foi também aplicado. A análise estatística foi feita com auxílio do programa GraphPad Prism®. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

ESTUDO 1.

Efeito da exposição de IL-6 por 1 hora no metabolismo energético de células musculares esqueléticas de indivíduos saudáveis (não diabéticos mellitus - NDM) ou diabéticos tipo 2 (diabéticos mellitus tipo 2 - DMT2)

4 RESULTADOS

Os resultados mais relevantes do estudo 1 estão resumidos na tabela 4 nas considerações finais (página 78).

4.1 Captação de glicose em células musculares esqueléticas de indivíduos não diabéticos e diabéticos tipo 2, suplementadas ou não com IL-6

A Figura 5 mostra o gráfico dos resultados obtidos por meio do ensaio de captação de glicose em células musculares esqueléticas de indivíduos não diabéticos e diabéticos tipo 2 suplementadas com IL-6 (25 ng/ml) por 1 hora. Foi observado o aumento significativo na captação de glicose sem estímulo de insulina e após estímulo com insulina nas células suplementadas com IL-6 do grupo NDM. Não foi observada diferença significativa no grupo DMT2 após suplementação com IL-6 com ou sem estímulo de insulina. Os grupos NDM e DMT2 aumentaram a captação de glicose significativamente após estímulo com insulina. Não foi observada diferença significativa entre os grupos NDM e DMT2 no estado basal ou após estímulo com insulina.

Figura 5 - Captação de glicose em células musculares esqueléticas de indivíduos saudáveis (NDM) e diabéticos tipo 2 (DMT2) suplementadas ou não com IL-6 (25 ng/ml) por 1 hora

Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM (n = 7). *p<0,05; **p<0,01 relativo ao basal NDM; +p<0,05 relativo ao respectivo basal.

Fonte: Duque-Guimarães (2012).

4.2 Síntese de glicogênio em células musculares esqueléticas de indivíduos não diabéticos e diabéticos tipo 2, suplementadas ou não com IL-6

A Figura 6 mostra o gráfico dos resultados obtidos por meio do ensaio de síntese de glicogênio em células musculares esqueléticas de indivíduos não diabéticos e diabéticos tipo 2 suplementadas ou não com IL-6 (25 ng/ml) por 1 hora. Foi observado aumento significativo na síntese de glicogênio sem estímulo de insulina e após estímulo com insulina nas células suplementadas com IL-6 do grupo NDM. Não foi observada diferença significativa no grupo DMT2 após suplementação com IL-6 com ou sem estímulo de insulina. Os grupos NDM e DMT2 aumentaram a síntese de glicogênio significativamente após estímulo com insulina. Não foi observada diferença significativa entre os grupos NDM e DMT2 no estado basal ou após estímulo com insulina.

Figura 6 - Síntese de Glicogênio em células musculares esqueléticas de indivíduos saudáveis (NDM) e diabéticos tipo 2 (DMT2) suplementadas ou não com IL-6 (25 ng/ml) por 1 hora

Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM (n = 6). *p<0,05; ***p<0,001 relativo ao basal NDM; +p<0,05 relativo ao respectivo basal. Fonte: Duque-Guimarães (2012).

4.3 Oxidação de ácido graxo em células musculares esqueléticas de indivíduos não diabéticos e diabéticos tipo 2, suplementadas ou não com IL-6

A Figura 7 mostra o gráfico dos resultados obtidos por meio do ensaio de oxidação de ácido graxo em células musculares esqueléticas de indivíduos saudáveis (NDM) e diabéticos tipo 2 (DMT2) suplementadas ou não com IL-6 (25 ng/ml) por 1 hora. Foi observado o aumento significativo na oxidação de ácido graxo nas células suplementadas com IL-6 dos grupos NDM e DMT2. Não foi observada diferença significativa na oxidação de ácido graxo entre os grupos NDM e DMT2 suplementados com IL-6.

Figura 7 - Oxidação de ácido graxo em células musculares esqueléticas de indivíduos saudáveis (NDM) e diabéticos tipo 2 (DMT2) suplementadas ou não com IL-6 (25 ng/ml) por 1 hora

Os valores estão expressos como média ± EPM (n =6). *p<0,05; ***p<0,001 relativo ao respectivo basal.

Fonte: Duque-Guimarães (2012).

4.4 Fosforilação de possíveis proteínas envolvidas na via de sinalização da IL-6 em células musculares esqueléticas de indivíduos não diabéticos e diabéticos tipo 2, suplementadas ou não com IL-6

A Figura 8 mostra o gráfico dos resultados obtidos na fosforilação de JAK2 por meio da técnica de Western Blot em células musculares esqueléticas de indivíduos saudáveis (NDM) e diabéticos tipo 2 (DMT2) suplementadas ou não com IL-6 (25 ng/ml, 20 min) com ou sem estímulo de insulina (60 nM, 20 min). Foi observado aumento significativo no conteúdo de JAK2 fosforilada em tirosina 1007 nas células suplementadas com IL-6 do grupo NDM. Não foi observada diferença significativa de pJAK2 no grupo DMT2 após suplementação com IL-6.

Figura 8 - Conteúdo de JAK2 fosforilada em tirosina 1007 em células musculares esqueléticas de indivíduos saudáveis (NDM) e diabéticos tipo 2 (DMT2)

Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM (n = 7). *p < 0,05. No alto, imagem dos blots referentes à pJAK2, à proteína JAK2 e à GAPDH.

Fonte: Duque-Guimarães (2012).

A Figura 9 mostra o gráfico dos resultados obtidos na fosforilação de STAT3 por meio da técnica de Western Blot em células musculares esqueléticas de indivíduos saudáveis (NDM) e diabéticos tipo 2 (DMT2) suplementadas ou não com IL-6 (25 ng/ml, 20 min) com ou sem estímulo de insulina (60 nM, 20 min). Foi observada diminuição significativa do conteúdo de STAT3 fosforilada em tirosina 705 no grupo DMT2 após suplementação de IL-6. A imagem do blot referente ao conteúdo de STAT3 fosforilada só foi possível ser quantificada nos grupos estimulados com IL-6.

Figura 9 - Conteúdo de STAT3 fosforilada em tirosina 705 em células musculares esqueléticas de indivíduos saudáveis (NDM) e diabéticos tipo 2 (DMT2)

Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM ($n = 7$), * $p < 0,05$. No alto, imagem dos blots referentes à Pstat3, à proteína STAT3 e à GAPDH.
Fonte: Duque-Guimarães (2012).

A Figura 10 mostra o gráfico dos resultados do conteúdo de AKT fosforilada em serina 473 por meio da técnica de Western Blot em células musculares esqueléticas de indivíduos saudáveis (NDM) e diabéticos tipo 2 (DMT2) suplementadas ou não com IL-6 (25 ng/ml, 20 min) com ou sem estímulo de insulina (60nM, 20 min). Não foi observada diferença significativa do conteúdo de AKT fosforilada em serina 473 nos grupos NDM e DMT2 após suplementação com IL-6. A imagem do blot referente ao conteúdo de AKT fosforilada só foi possível ser quantificada nos grupos estimulados com insulina

Figura 10 - Conteúdo de AKT fosforilada em serina 473 em células musculares esqueléticas de indivíduos saudáveis (NDM) e diabéticos tipo 2 (DMT2)

Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM ($n = 7$). $p > 0,05$. No alto, imagem dos blots referentes à pAKT, à proteína AKT e à GAPDH.
Fonte: Duque-Guimarães (2012).

A Figura 11 mostra o gráfico dos resultados obtidos do conteúdo de AMPK α fosforilada em treonina 172 por meio da técnica de Western Blot em células musculares esqueléticas de indivíduos saudáveis (NDM) e diabéticos tipo 2 (DMT2) suplementadas ou não com IL-6 (25 ng/ml, 20 min) com ou sem estímulo de insulina (60 nM, 20 min). Não foi observada diferença significativa do conteúdo de AMPK α fosforilada em treonina 172 nos grupos NDM e DMT2 após suplementação com IL-6.

Figura 11 - Conteúdo de AMPK α fosforilada em treonina 172 em células musculares esqueléticas de indivíduos saudáveis (NDM) e diabéticos tipo 2 (DMT2)

Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM (n =7). $p > 0,05$. No alto, imagem dos blots referentes à pAMPK α , à proteína AMPK α e à GAPDH.
Fonte: Duque-Guimarães (2012).

4.5 Expressão do RNAm de IL-6, receptor de IL-6 e receptor GP130 em cultura primária de células musculares esqueléticas de indivíduos não diabéticos e diabéticos tipo 2

A Figura 12 A, B e C mostra os gráficos dos resultados obtidos por meio da técnica de PCR em tempo real em células musculares esqueléticas de indivíduos saudáveis (NDM) e diabéticos tipo 2 (DMT2). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

Figura 12 - Expressão do RNAm da IL-6 (A), receptor de IL-6 (IL-6R, B) e receptor GP130 (C) em células musculares esqueléticas de indivíduos saudáveis (NDM) e diabéticos tipo 2 (DMT2)

Resultados estão apresentados como gene alvo/ $\beta 2\mu\text{G}$ (RNAm). Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM ($n = 7$). $p > 0,05$.

Fonte: Duque-Guimarães (2012).

4.6 Expressão do RNAm de IL-6, receptor de IL-6 e receptor GP130 em biópsias de músculo esquelético de indivíduos saudáveis e diabéticos tipo 2

A Figura 13 A, B e C mostra os gráficos dos resultados obtidos por meio da técnica de PCR em tempo real em biópsias de músculo esquelético de indivíduos saudáveis e diabéticos tipo 2. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

Figura 13 - Expressão do RNAm da IL-6 (A), IL-6 receptor (IL-6R, B) e receptor GP130 (C) em biópsias de músculo esquelético de indivíduos saudáveis e diabéticos tipo 2

Resultados estão apresentados como gene alvo/ $\beta 2\mu G$ (RNAm). Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM ($n = 6$). $p > 0,05$.

Fonte: Duque-Guimarães (2012).

4.7 Secreção de IL-6 em cultura de células musculares esqueléticas de indivíduos saudáveis (NDM) e diabéticos tipo 2 (DMT2)

A Figura 14 mostra o gráfico dos resultados da secreção de IL-6, avaliada por meio da técnica de ELISA, por células musculares esqueléticas de indivíduos saudáveis (NDM) e diabéticos tipo 2 (DMT2) cultivadas com ou sem o estímulo de insulina. Não foi observada diferença significativa na secreção de IL-6 entre os grupos NDM e DMT2.

Figura 14 - Secreção de IL-6 em cultura de células musculares esqueléticas de indivíduos saudáveis (NDM) e diabéticos tipo 2 (DMT2) estimuladas ou não com insulina (20 min, 60 nM)

Os valores estão expressos como média ± EPM (n=6). p>0,05.
Fonte: Duque-Guimarães (2012).

4.8 Concentração sérica de IL-6 de indivíduos não diabéticos e diabéticos tipo 2

A Figura 15 mostra o gráfico dos resultados obtidos por meio da técnica de ELISA utilizando o soro de indivíduos não diabéticos e diabéticos tipo 2. Não foi observada diferença significativa na concentração sérica de IL-6 entre os grupos NDM e DMT2.

Figura 15 - Concentração sérica de IL-6 em indivíduos não diabéticos (NDM) e diabéticos tipo 2 (DMT2)

Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM (n =21-26). $p > 0,05$.

Fonte: Duque-Guimarães (2012).

4.9 Grau de metilação na região promotora dos genes IL-6, receptor de IL-6 e receptor GP130

A Figura 16 mostra os gráficos dos resultados obtidos por meio de kit que analisa o grau de metilação de regiões do DNA (Methylminer Kit, Invitrogen) e PCR em tempo real. No presente estudo foi analisado as regiões promotoras referente aos genes IL-6, receptor de IL-6 e receptor GP130 em células musculares esqueléticas de indivíduos saudáveis (NDM) e diabéticos tipo 2 (DMT2). Não foram observadas diferenças significativas no grau de metilação entre os grupos NDM e DMT2 em relação aos três genes investigados. A Figura 18 A e B demonstra, em ambos os grupos (NDM e DMT2), a hipermetilação significativa no DNA da região promotora do gene do receptor de IL-6 comparada ao grau de metilação da região promotora dos outros dois genes estudados (IL-6 e GP130).

Figura 16 - Grau de metilação na região promotora do DNA referente aos genes do IL-6, receptor de IL-6 e receptor GP130 em cultura de células musculares esqueléticas de indivíduos saudáveis (NDM) e diabéticos tipo 2 (DMT2)

Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM ($n=7$). $p>0,05$.
Fonte: Duque-Guimarães (2012).

Figura 17 - Grau de metilação na região promotora do DNA referente aos genes do IL-6, receptor de IL-6 e receptor GP130 em cultura de células musculares esqueléticas de indivíduos saudáveis (NDM - A) e diabéticos tipo 2 (DMT2 - B)

Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM (n =7). *** $p < 0,001$ relativo aos genes IL-6 e receptor GP130.

Fonte: Duque-Guimarães (2012).

5 DISCUSSÃO

A sinalização de IL-6 gera impacto em diferentes processos biológicos. Além de participar ativamente no processo inflamatório, a IL-6 tem efeitos no metabolismo energético o que parece ser tecido e contexto-específico. A maioria das evidências indica que a elevação de IL-6 causa resistência hepática à insulina (Kim et al, 2004; Klover et al, 2003; Senn et al, 2002), além de impedir a diferenciação e sensibilidade insulínica no tecido adiposo (Rotter et al, 2003). No entanto, a IL-6 apresenta efeitos contrários no músculo esquelético (Al-Khalili et al 2006; Carey et al, 2006) o qual é quantitativamente o mais importante tecido envolvido na captação de glicose por estímulo da insulina, sendo o maior responsável na manutenção da glicemia pós prandial (DeFronzo et al., 1981). IL-6 induz a atividade das células satélites, proporcionando assim, estímulo para aumento da massa muscular (Serrano et al, 2008). Além disso, em indivíduos saudáveis, a secreção de IL-6 pelo músculo esquelético durante a realização de exercício demonstra ter importante função na manutenção da glicemia (Pedersen et al, 2004). Sugere-se que a IL-6 liberada por indução do exercício facilite o aporte adequado de nutrientes para o músculo em uma situação de necessidade. Sendo assim, a IL-6 parece fazer parte dos mecanismos sob os quais o exercício desencadeia um aumento na sensibilidade à insulina.

Dentro deste contexto de contradição sobre os efeitos da IL-6 no metabolismo, no presente estudo, avaliou-se os efeitos da IL-6, após 1 hora de exposição, sobre o metabolismo energético em cultura primária de células musculares de indivíduos saudáveis e diabéticos do tipo 2. Considerando que a literatura indica IL-6 como um fator liberado pelo músculo esquelético durante o exercício, favorecendo a sensibilidade a insulina em indivíduos saudáveis, tornou-se fundamental a investigação em indivíduos diabéticos do tipo 2. Uma vez que, caso essa citocina produza efeitos semelhantes aos encontrados no músculo esquelético de indivíduos saudáveis após um curto período de exposição; a IL-6 tornar-se-ia um importante componente no auxílio do controle da homeostase glicêmica em indivíduos diabéticos do tipo 2.

No entanto, surpreendentemente, observou-se neste estudo que, embora a suplementação de IL-6 tenha favorecido o aumento da captação de glicose e síntese de glicogênio em células musculares de indivíduos saudáveis, tanto no estado basal como no estimulado por insulina, o mesmo não foi visto em células musculares de indivíduos diabéticos do tipo 2. Al-Khalili e colaboradores, em 2006, após realizarem estudo semelhante embora apenas com cultura de células musculares de indivíduos saudáveis, demonstraram

que além da suplementação aguda de IL-6 aumentar a captação de glicose e síntese de glicogênio induzidas pela insulina, a interleucina, comparada ao efeito da insulina, foi responsável por uma redução em 50 % na produção de lactato muscular (Al-Khalili et al, 2006). Isto sugere que, em resposta a IL-6, o músculo esquelético redireciona a utilização do substrato para estoque na forma de glicogênio. Outro estudo que investigou o efeito da IL-6, realizado apenas com biópsias de músculo esquelético humano saudável, demonstrou um aumento modesto do transporte e oxidação de glicose, assim como na glicogeniogênese muscular (Glund et al, 2007).

Pela primeira vez, o presente estudo mostrou que, em células musculares de diabéticos do tipo 2, não há efeito estimulatório da IL-6, após 1 hora, sobre a captação de glicose e síntese de glicogênio estimuladas por insulina. Este resultado sugere que as células musculares dos diabéticos do tipo 2 sejam resistentes à IL-6. Baseando-se na literatura sobre a complexa fisiopatologia do diabetes tipo 2, é possível observar que indivíduos diabéticos não mantêm o mesmo padrão de resposta às moléculas relacionadas com a homeostasia glicêmica, como o observado em sujeitos saudáveis. Outras moléculas secretadas, como o GIP, o qual é uma incretina estimuladora da secreção de insulina pelas células beta pancreáticas, também mostram efeitos reduzidos em pacientes diabéticos tipo 2 comparado àqueles que apresentam uma tolerância normal à glicose (Nauck et al, 1986; Meier, Nauck, 2010).

Em relação à oxidação lipídica, não foi encontrada diferença entre células musculares esqueléticas de indivíduos saudáveis ou diabéticos tipo 2, na resposta à IL-6. Ambas aumentaram a oxidação de ácidos graxos após estímulo desta interleucina. Com isso, pode-se observar que a resistência à IL-6 desenvolvida pelas células musculares dos indivíduos diabéticos do tipo 2 é parcial, não se manifestando na oxidação lipídica. Segundo a literatura, a transcrição de IL-6 durante o exercício, por exemplo, é estimulada pelo baixo nível de glicogênio muscular (Keller et al, 2001) e a ingestão de carboidratos durante a prática de atividade física diminui a concentração plasmática de IL-6 (Febbraio et al, 2003) sugerindo que essa citocina possa ser regulada pela disponibilidade energética. Além disso, investigações anteriores mostraram que a infusão com IL-6 aumenta a lipólise e a oxidação de ácidos graxos em humanos *in vivo* (Van Hall et al, 2003; Wolsk et al, 2010) e que animais deficientes em IL-6 desenvolvem obesidade e tornam-se intolerantes à glicose (Wallenius et al, 2002). Com isso, a IL-6 pode ser vista como um sensor energético. Nesse sentido, de acordo com os resultados encontrados nesse estudo sobre o aumento na oxidação lipídica

muscular, sugere-se que a IL-6 também regule o metabolismo energético do músculo esquelético de indivíduos diabéticos tipo 2, através de sua atuação no metabolismo lipídico.

A fim de esclarecer porque células musculares de indivíduos diabéticos do tipo 2 são parcialmente resistentes à IL-6, a via JAK/STAT foi investigada. A fosforilação de JAK2 foi aumentada expressivamente após suplementação de IL-6 em células musculares saudáveis, o que não foi observado em células musculares de diabéticos do tipo 2. Além disso, houve uma redução na fosforilação de STAT3 em células musculares diabéticas, comparadas com células musculares saudáveis, após estímulo com IL-6. Estes resultados contribuem para a compreensão da resistência parcial à IL-6 em células musculares de indivíduos diabéticos do tipo 2, uma vez que nas células musculares destes indivíduos, a principal via de sinalização da IL-6 está comprometida e com isso impossibilitada de desencadear os efeitos no metabolismo de carboidratos, como os observados em células musculares de indivíduos saudáveis. Outra proteína avaliada no presente estudo foi a AMPK α , visto que IL-6 é considerada reguladora da atividade de AMPK em músculo e tecido adiposo (Kelly et al, 2009; Ruderman et al, 2006). Kelly e colaboradores, em 2004, mostraram que animais knockout para IL-6, aos três meses de idade, apresentaram redução na fosforilação de AMPK α e ACC em torno de 80 % em músculo esquelético (Kelly et al, 2004). No presente estudo, após exposição de IL-6 por 1 hora, não foi possível comprovar um aumento significativo na fosforilação de AMPK α nos dois grupos estudados, embora ambos apresentassem um padrão de resposta similar ao encontrado na oxidação de ácido graxo. Como já bem documentado, a ativação de AMPK α , por exemplo, no exercício, é de fundamental importância para o desencadeamento de ações efetivas no metabolismo da glicose e de lipídios, a fim de manter a homeostase energética (Jorgensen et al, 2006; Osler, Zierath, 2008).

Com a intenção de compreender se os efeitos da IL-6 no metabolismo da glicose interferem, também, na via de sinalização insulínica, investigou-se a fosforilação em serina da Akt em ambas as células musculares, normo tolerantes à glicose e diabéticas tipo 2. Não foi encontrado, após suplementação de IL-6, um aumento da fosforilação de Akt em ambos os grupos. A literatura não é clara sobre a participação da AKT na sinalização de IL-6 em células musculares assim como o presente estudo também não se mostrou eficiente em elucidar completamente essa questão. Em um estudo com cultura primária de células musculares humanas, assim como em outro estudo com células musculares de rato, a exposição à IL-6 aumentou a atividade da PI3K e fosforilação de PKB/Akt (Al-Khalili et al, 2006; Weigert et al, 2005). Em contraste, em biópsias de músculos esqueléticos incubados

com IL-6 não foi encontrado aumento em PI3K nem na fosforilação de PKB/Akt (Glund et al, 2007). Nieto-Vasquez e colaboradores, em 2008, investigaram qual a participação da Akt, assim como da AMPK, na sinalização de IL-6, utilizando inibidores destas proteínas. O efeito estimulatório de IL-6 (após 3 horas de tratamento) na captação de glicose foi completamente abolido pelo inibidor de AMPK, o composto C. No entanto, após o uso de *wortmannin*, um inibidor de Akt, a captação de glicose continuou aumentada nas células musculares C2C12 utilizadas no experimento (Nieto-Vasquez et al, 2008). Adicionalmente, Carey e colaboradores, em 2006, apesar de terem encontrado aumento da captação de glicose e translocação do GLUT4 após suplementação aguda de IL-6 em células musculares da linhagem L6, não encontraram evidências que demonstrassem efeitos isolados da IL-6 em proteínas da via de sinalização da insulina (Carey et al, 2006). No estudo mencionado, após estímulo com insulina, a fosforilação do IRS-1 em tirosina, e a associação de IRS-1 com a subunidade catalítica p85 da PI3K, não foram afetadas pelo tratamento com IL-6 enquanto houve um modesto aumento, não significativo, da fosforilação em serina da Akt, assim como o encontrado no presente estudo.

Segundo a literatura, IL-6 é rapidamente liberada na circulação sanguínea em resposta ao exercício e o aumento da citocina é variável, em função da duração e intensidade do exercício assim como da massa muscular. Nos últimos anos, pesquisadores têm demonstrado que a expressão (RNAm) de IL-6 é regulada pela contração muscular e a atividade transcricional também é expressivamente aumentada pelo exercício. Além disso, fibras musculares contraídas aumentam a expressão proteica de IL-6 e sua secreção pelo músculo esquelético durante o exercício (Febbraio, Pedersen, 2002; Pedersen, Febbraio, 2005; Pedersen, Fisher, 2007). No presente estudo, avaliou-se a concentração sérica de IL-6 mas não foi observado um aumento significativo da concentração em indivíduos diabéticos tipo 2 comparada a de indivíduos normo tolerantes à glicose. Uma elevação poderia ser esperada, uma vez que, nos últimos anos, estudos demonstraram que o diabetes do tipo 2 está associado a uma inflamação sistêmica subclínica (Solinas et al, 2007), a qual envolve alteração na regulação do sistema imune inato, do qual a citocina IL-6 faz parte ativamente (Kopf et al, 1994). A fim de se ter uma melhor compreensão sobre a secreção de IL-6 especificamente pelo músculo esquelético em repouso, a interleucina foi quantificada utilizando o meio de cultura onde as células musculares estavam sendo mantidas após diferenciação. Não foi encontrado aumento na secreção de IL-6 pelos miotubos originados a partir dos indivíduos diabético tipo 2, comparados aos de indivíduos saudáveis. Provavelmente, a falta de

diferença estatística encontrada nestes resultados deve-se a grande variação no grupo diabético tipo 2, possivelmente, por ser um grupo heterogêneo às respostas metabólicas.

Recentemente, muito tem se investigado sobre epigenética, definida pela literatura como o estudo de mudanças fenotípicas e genotípicas causadas por mecanismos que não alteram a sequência de DNA. Em geral, efeitos epigenéticos são consequência de uma complexa interação entre fatores genéticos e ambientais que pode se pronunciar em qualquer fase da vida, passar de uma geração celular para outra (herança mitótica) e/ou entre gerações da espécie (herança meiótica) (Bird, 2007; Feng et al, 2010; Holliday, 1990; Reik et al, 2001). Sendo assim, alterações epigenéticas podem ter uma importante função no aumento da incidência de diabetes do tipo 2 e de suas complicações (Muhonen, Holthofer, 2009). Os mecanismos epigenéticos que ajudam a explicar como DNAs idênticos podem proporcionar fenótipos diferentes, incluem principalmente metilação de DNA, modificação de histonas e microRNAs (Feng et al, 2010; Rodenhiser, Mann, 2006). O presente estudo investigou o grau de metilação do DNA referente à região promotora dos genes IL-6, receptor de IL-6 e GP130 em células musculares de indivíduos saudáveis e diabéticos do tipo 2. Sabe-se que hipometilação do DNA na região promotora do gene de interesse permite a ligação normal de fatores de transcrição e com isso a transcrição do gene. Por outro lado, a hipermetilação se caracteriza por reprimir a expressão gênica, via inibição da ligação de fatores transcricionais, ou por meio de proteínas específicas que se ligam a regiões metiladas do DNA recrutando co-repressores e histona deacetilase (enzima que favorece a condensação da cromatina impedindo a ligação de fatores transcricionais). No presente estudo, embora não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos, referente ao grau de metilação dos genes avaliados; curiosamente, a região promotora do receptor de IL-6 apresentou um maior percentual de metilação do DNA em ambos os grupos, comparado à região promotora dos outros dois genes incluídos no estudo. Uma possível razão seria a influência de outros fatores como a idade e ou o sobrepeso indicado pelo IMC dos indivíduos incluídos no estudo, os quais são fatores ambientais passíveis de causar alterações epigenéticas em genes relacionados ao metabolismo energético. No entanto, embora a literatura demonstre que a concentração do receptor de IL-6 do tipo clivado circulante apresente um aumento em condições de obesidade e idade avançada; não foi encontrado estudo específico o qual relaciona a expressão desse receptor no músculo esquelético com o sobrepeso ou idade, o que dificulta possíveis especulações sobre o grau de metilação do DNA referente ao gene do receptor de IL-6 nesse contexto. Em combinação à análise do grau de metilação do DNA, investigou-se a expressão dos mesmos genes, IL-6, receptor de IL-6 e GP130 em células

musculares e músculo esquelético isolado de indivíduos saudáveis e diabéticos tipo 2. Não foi encontrada diferença significativa na expressão gênica (RNAm) de IL-6, do receptor de IL-6 e de GP130 em músculo esquelético ou em células musculares entre os grupos. Vale ressaltar que a expressão do receptor de IL-6, na cultura de células musculares, foi visivelmente menor que a dos outros dois genes incluídos no estudo, em ambos os grupos (NDM e DMT2), o que coincide com o aumentado grau de metilação na região promotora do gene do receptor de IL-6 encontrado nessa mesma amostragem. Possivelmente, alterações na expressão dos genes IL-6, receptor IL-6 e GP130 entre células musculares normo tolerantes à glicose ou diabéticas poderiam ser melhor avaliadas com a inclusão da resposta ao exercício, uma vez que, a contração muscular é um fator estimulante do aumento da expressão gênica de IL-6 e receptor de IL-6 e tal resposta poderia ser dada de forma diferente pelos grupos.

Este é o primeiro estudo demonstrando que células musculares de diabéticos tipo 2 apresentam resistência parcial à IL-6, o que pode impedir a melhora da sensibilidade à insulina nestes indivíduos por essa citocina. Embora tenha sido encontrado resistência à citocina no metabolismo de carboidrato nas células musculares diabéticas tipo 2, com possível envolvimento da fosforilação de JAK/STAT; o efeito exercido no metabolismo lipídico se manteve eficaz. Sendo assim, os efeitos da IL-6 após curto período de exposição, como ocorre com a realização de exercício, contribuem apenas parcialmente para a melhora da sensibilidade à insulina no diabetes tipo 2, visto que células musculares de indivíduos diabéticos tipo 2 apresentam uma resposta alterada à IL-6.

ESTUDO 2.

Efeito da exposição de IL-6 por 24 horas no metabolismo energético de células musculares de rato da linhagem L6 resistentes ou não à insulina (induzido por palmitato).

6 RESULTADOS

Os resultados mais relevantes do estudo 2 estão resumidos na tabela 4 nas considerações finais (página 78).

6.1 Síntese de Glicogênio com diferentes concentrações de palmitato em células musculares esqueléticas da linhagem L6

A Figura 18 mostra a síntese de glicogênio em células musculares da linhagem L6 na presença de diferentes concentrações de palmitato (0, 100, 200, 250, 300, 400 e 500 μM) por 24 horas. Foi observada redução significativa na síntese de glicogênio a partir da concentração de 100 μM de palmitato, comparado ao controle (zero de palmitato), sob estímulo com insulina ou basal. Foi determinado que a dose de μM de suplementação com palmitato seria a utilizada para a indução de resistência à insulina nos demais ensaios do estudo 2, uma vez que essa foi a primeira dose que reduziu a síntese de glicogênio com significância $p < 0,001$ após estímulo com insulina.

Figura 18 - Síntese de glicogênio em células musculares esqueléticas da linhagem L6 na presença de diferentes concentrações de palmitato (0, 100, 200, 250, 300, 400 e 500 μM)

Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM ($n = 5$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ relativo ao controle após estímulo com insulina. +++ $p < 0,001$ relativo ao controle basal. \$\$ $p < 0,01$; \$\$\$ $p < 0,001$ relativo ao respectivo basal.

Fonte: Duque-Guimarães (2012).

6.2 Síntese de Glicogênio com diferentes concentrações de IL-6 em células musculares esqueléticas da linhagem L6

A Figura 19 mostra a síntese de glicogênio em células musculares esqueléticas da linhagem L6 na presença de diferentes concentrações de IL-6 (0, 5, 25 e 50 ng/ml) por 24 horas. Foi observada redução significativa na síntese de glicogênio a partir da concentração de 5ng/ml de suplementação com IL-6 comparado ao controle (zero de IL-6) sob estímulo com insulina ou basal. Assim, após a obtenção desse resultado, foi determinado que a dose de 25 ng/ml de suplementação com IL-6 seria a utilizada nos demais ensaios incluídos no estudo 2, uma vez que essa foi a primeira dose que reduziu a síntese de glicogênio com significância $p<0,01$ após estímulo com insulina.

Figura 19 - Síntese de glicogênio em células musculares esqueléticas da linhagem L6 na presença de diferentes concentrações de IL-6 (0, 5, 25 e 50 ng/ml)

Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM ($n=4$). * $p<0,05$; ** $p<0,01$ relativo ao controle após estímulo com insulina. + $p<0,05$; ++ $p<0,01$ relativo ao controle basal. \$\$ $p<0,01$; \$\$\$ $p<0,001$ relativo ao respectivo basal.

Fonte: Duque-Guimarães (2012).

6.3 Captação de glicose em células musculares esqueléticas da linhagem L6 resistentes ou não a insulina, suplementadas ou não com IL-6

A Figura 20 mostra a captação de glicose por células musculares esqueléticas da linhagem L6 resistentes ou não à insulina, suplementadas ou não com IL-6 (25 ng/ml) por 24 horas. Foi observada redução significativa na captação de glicose após estímulo com insulina nas células suplementadas com IL-6 do grupo sem indução de resistência à insulina por palmitato. Não foi observado efeito significativo da IL-6 no grupo resistente à insulina (RI) com ou sem estímulo de insulina, relativo ao seu respectivo controle. Interessantemente, na condição basal, a IL-6 exacerbou o efeito repressor do palmitato (RI). Este grupo (RI- basal + IL-6) apresentou redução com significância $p < 0,01$ em relação ao grupo basal controle (sem palmitato e sem IL-6).

Figura 20 - Captação de glicose em células musculares esqueléticas da linhagem L6 resistentes ou não à insulina, suplementadas ou não com IL-6 (25 ng/ml) por 24 horas

Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM ($n = 5$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ relativo ao controle após estímulo com insulina. + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$ relativo ao controle basal. \$ $p < 0,05$; \$\$ $p < 0,01$ relativo ao respectivo basal.

Fonte: Duque-Guimarães (2012).

6.4 Síntese de glicogênio em células musculares esqueléticas da linhagem L6 resistentes ou não a insulina, suplementadas ou não com IL-6

A Figura 21 mostra a síntese de glicogênio em células musculares esqueléticas da linhagem L6 resistentes ou não à insulina, suplementadas ou não com IL-6 (25 ng/ml) por 24 horas. Foi observada redução significativa na síntese de glicogênio após estímulo com insulina nas células suplementadas com IL-6 do grupo sem indução de resistência a insulina por palmitato. Não foi observada diferença significativa no grupo resistente à insulina após suplementação com IL-6 com ou sem estímulo de insulina. Entretanto, tanto na condição basal, como na estimulada por insulina, a síntese foi significativamente menor no grupo resistente à insulina, quando comparada ao respectivo grupo controle não tratado com palmitato.

Figura 21 - Síntese de Glicogênio em células musculares esqueléticas da linhagem L6 resistentes ou não à insulina (induzido por palmitato), suplementadas ou não com IL-6 (25 ng/ml) por 24 horas

Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM (n = 5). **p<0,01 relativo ao controle após estímulo com insulina. +p<0,05; ++p<0,01 relativo ao controle basal. \$p<0,05; \$\$p<0,01; \$\$\$p<0,001 relativo ao respectivo basal.

Fonte: Duque-Guimarães (2012).

6.5 Oxidação de ácido graxo em células musculares da linhagem L6 resistentes ou não a insulina, suplementadas ou não com IL-6

A Figura 22 mostra a oxidação de ácido graxo em células musculares da linhagem L6 resistentes ou não a insulina (induzido por palmitato), suplementadas ou não com IL-6 (25 ng/ml) por 24 horas. Foi observado aumento significativo na oxidação de ácido graxo nas células suplementadas com IL-6, comparado ao controle. No grupo resistente à insulina, foi observado aumento após suplementação de IL-6. Entretanto, foi observada redução na oxidação por células resistentes à insulina, tanto na condição basal como sob estímulo com IL-6.

Figura 22 - Oxidação de ácido graxo em células musculares esqueléticas da linhagem L6 resistentes ou não à insulina (induzido por palmitato), suplementadas ou não com IL-6 (25 ng/ml) por 24 horas

Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM ($n = 5$). ** $p < 0,01$ relativo ao respectivo controle. ++ $p < 0,01$ relativo ao controle (sem indução de resistência à insulina). \$\$ $p < 0,01$ relativo ao controle após estímulo com IL-6 (sem indução de resistência à insulina).

Fonte: Duque-Guimarães (2012).

6.6 Fosforilação de possíveis proteínas envolvidas na via de sinalização da IL-6 em células musculares esqueléticas da linhagem L6 resistentes ou não à insulina, suplementadas ou não com IL-6

A Figura 23 mostra o conteúdo de JAK2 fosforilada em células musculares da linhagem L6 resistentes ou não à insulina, suplementadas ou não com IL-6 (25 ng/ml) por 24 horas. Foi observado o aumento na fosforilação de JAK2 em tirosina 1007 no grupo suplementado com IL-6 comparado ao seu respectivo controle. Não foi observada diferença significativa após suplementação de IL-6 no grupo resistente à insulina, induzido por palmitato. No entanto, foi observada redução significativa no grupo de células resistentes à insulina após estímulo com IL-6 comparado ao grupo controle após suplementação dessa citocina.

Figura 23 - Conteúdo de JAK2 fosforilada em tirosina 1007 em células musculares esqueléticas da linhagem L6 resistentes ou não a insulina (induzido por palmitato), suplementadas ou não com IL-6 (25 ng/ml) por 24 horas

Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM ($n = 5$). ** $p < 0,01$ relativo ao controle. +++ $p < 0,001$ relativo ao controle após estímulo com IL-6 (sem indução de resistência à insulina). No alto, imagem dos blots referentes à pJAK2, à proteína JAK2 e à GAPDH.

Fonte: Duque-Guimarães (2012).

A Figura 24 mostra o conteúdo de STAT3 fosforilada em tirosina 705 em células musculares esqueléticas da linhagem L6 resistentes ou não a insulina, suplementadas com IL-6 (25 ng/ml) por 24 horas. Foi observada redução na fosforilação de STAT3 no grupo resistente à insulina (RI) comparado ao grupo não resistente (controle). A imagem do blot referente à fosforilação de STAT3 só foi possível ser quantificada nos grupos estimulados com IL-6.

Figura 24 - Conteúdo de STAT3 fosforilada em tirosina 705 em células musculares esqueléticas da linhagem L6 resistentes ou não à insulina, suplementadas com IL-6 (25 ng/ml) por 24 horas

Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM ($n = 5$). *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle exposto à IL-6. No alto, imagem dos blots referentes à pSTAT3, à proteína STAT3 e à GAPDH. Fonte: Duque-Guimarães (2012).

A Figura 25 mostra o conteúdo de Akt fosforilada em serina 473 em células musculares esqueléticas da linhagem L6 resistentes ou não à insulina, suplementadas ou não com IL-6 (25 ng/ml) por 24 horas, sempre sob estímulo à insulina. Foi observada redução na fosforilação de Akt em ambos os grupos suplementados com IL-6 comparado ao controle (sem indução de resistência à insulina). Além disso, foi observada redução significativa no grupo controle resistente à insulina comparado ao grupo controle sem indução de resistência à insulina. Não foi observada diferença significativa no grupo resistente à insulina, após suplementação de IL-6. A imagem do blot referente à fosforilação de Akt só foi possível ser quantificada nos grupos estimulados com insulina.

Figura 25 - Conteúdo de Akt fosforilada em serina 473 em células musculares esqueléticas da linhagem L6 resistentes ou não à insulina (induzido por palmitato), suplementadas ou não com IL-6 (25 ng/ml) por 24 horas

Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM ($n = 4$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle sob estímulo à insulina. + $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (sem indução de resistência à insulina) sob estímulo à IL-6. No alto, imagem dos blots referentes à pAkt, à proteína AKT e à GAPDH.

Fonte: Duque-Guimarães (2012).

A Figura 26 mostra o conteúdo de AMPK fosforilada em treonina 172 em células musculares esqueléticas da linhagem L6 resistentes ou não à insulina, suplementadas ou não com IL-6 (25 ng/ml) por 24 horas. Foi observado aumento na fosforilação de AMPK α em células sem indução de RI, mas suplementadas com IL-6, comparadas ao seu respectivo controle. Além disso, foi observado aumento significativo do grupo controle com indução de RI, comparado ao grupo controle sem indução de RI. Porém, não foi observado efeito significativo da IL-6 no grupo resistente à insulina, relativo ao seu respectivo controle, embora este tenha sido significativamente maior que o controle sem indução de RI por palmitato.

Figura 26 - Conteúdo de AMPK fosforilada em treonina 172 em células musculares esqueléticas da linhagem L6 resistentes ou não à insulina (induzido por palmitato), suplementadas ou não com IL-6 (25 ng/ml) por 24 horas

Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM (n = 5). ***p < 0,001 em relação ao grupo controle (sem indução de resistência à insulina). No alto, imagem dos blots referentes à pAMPK α , à proteína AMPK α e à GAPDH.

Fonte: Duque-Guimarães (2012).

A Figura 27 mostra o conteúdo da acetil-coa carboxilase (ACC) fosforilada em serina 79 em células musculares esqueléticas da linhagem L6 resistentes ou não à insulina, suplementadas ou não com IL-6 (25 ng/ml) por 24 horas. Foi observado aumento na fosforilação de ACC nos grupos suplementados com IL-6 sem e com resistência à insulina. Além disso, foi observada diferença significativa entre os controles com indução de RI por palmitato e sem indução de RI. Além disso, foi observada diferença significativa entre os grupos expostos à IL-6.

Figura 27 - Conteúdo de ACC fosforilada em serina 79 em células musculares esqueléticas da linhagem L6 resistentes ou não a insulina (induzido por palmitato), suplementadas ou não com IL-6 (25 ng/ml) por 24 horas.

Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM (n = 5). **p<0,01; ***p<0,001 em relação ao controle (sem indução de resistência à insulina). ++p<0,01 em relação ao controle (sem indução de resistência à insulina) após estímulo com IL-6. \$\$p<0,01 em relação ao controle resistente à insulina. No alto, imagem dos blots referentes à pACC, à proteína ACC e à GAPDH.

Fonte: Duque-Guimarães (2012).

6.7 Expressão do RNAm do GLUT4 em células musculares esqueléticas da linhagem L6 resistentes ou não à insulina, suplementadas ou não com IL-6

A Figura 28 mostra o conteúdo de RNA do GLUT4 em células musculares esqueléticas da linhagem L6 resistentes ou não à insulina (induzido por palmitato), suplementadas ou não com IL-6 (25 ng/ml) por 24 horas. Não foram observadas diferenças significativas na expressão do RNA do GLUT4 entre os grupos.

Figura 28 - Expressão do RNAm do GLUT4 em células musculares esqueléticas da linhagem L6 resistentes ou não a insulina (induzido por palmitato), suplementadas ou não com IL-6 (25 ng/ml) por 24 horas

Resultados estão apresentados como GLUT4 normalizado por GAPDH (RNAm). Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM ($n=5$). $p>0,05$.

Fonte: Duque-Guimarães (2012).

6.8 Expressão do conteúdo total de proteína GLUT4 em células musculares esqueléticas da linhagem L6 resistentes ou não à insulina, suplementadas ou não com IL-6.

A Figura 29 mostra o gráfico do resultado do conteúdo total de proteína GLUT4 em células musculares da linhagem L6 resistentes ou não à insulina (induzido por palmitato), suplementadas ou não com IL-6 (25 ng/ml) por 24 horas. Não foram observadas diferenças significativas na expressão de GLUT4 entre os grupos.

Figura 29 - Conteúdo total de proteína GLUT4 em células musculares esqueléticas da linhagem L6 resistentes ou não à insulina (induzido por palmitato), suplementadas ou não com IL-6 (25 ng/ml) por 24 horas

Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM ($n = 5$). $p > 0,05$. No alto, imagem dos blots referentes à GLUT4 e à GAPDH.

Fonte: Duque-Guimarães (2012).

7 DISCUSSÃO

A IL-6 é descrita como uma citocina pró-inflamatória que pode contribuir na resistência à insulina de tecidos periféricos, quando produzida em excesso pelo tecido adiposo, assim como no processo inflamatório crônico que acompanha a obesidade e a sua progressão para o diabetes do tipo 2 (Kern et al, 2001; Pradhan et al, 2001). Entretanto, a IL-6 é também expressa pelo músculo esquelético durante o exercício, com efeitos metabólicos positivos que podem modular a ação da insulina (Pedersen, Febbraio, 2008). Deste modo, por ser uma citocina de atuação complexa no organismo, o esclarecimento de suas funções exige cautela e não pode ser compreendido de forma generalizada. Além de provocar diferentes efeitos em diferentes tecidos, sendo contexto e tecido-específica, a literatura mostra que esta citocina parece atuar com efeitos opostos em função do tempo de tratamento (Nieto-Vasquez et al, 2008).

Embora estudos indiquem que IL-6 cronicamente presente na circulação provoque efeitos deletérios na sensibilidade insulínica e na homeostase energética, Sadagurski e colaboradores, em 2010, realizaram um elegante estudo demonstrando que a super-expressão de IL-6 em animais reduz o consumo alimentar e promove gasto energético, com redução da adiposidade, diminuição dos níveis de insulina e melhora da tolerância à glicose, confirmando que IL-6 promove uma melhora da sensibilidade insulínica sistêmica, especialmente em animais que se alimentavam de uma dieta rica em gordura (Sadagurski et al, 2010). Assim, dentro deste contexto de contradição dos efeitos da IL-6 no metabolismo, e já conhecendo os efeitos a curto prazo desta citocina em células musculares de humanos, este segundo estudo avaliou o efeito da IL-6 durante 24 horas no metabolismo energético em célula muscular esquelética de rato (linhagem L6) saudável ou resistente à insulina (indução por palmitato).

A literatura indica que a suplementação com palmitato no músculo esquelético é eficiente na indução da resistência à insulina (Pimenta et al, 2008). Alkhateeb e colaboradores, em 2007, mostraram em um estudo com até 18 horas de incubação com palmitato, que tal indução foi provocada por dois mecanismos. A fase inicial atuou na alteração da sinalização da insulina por acúmulo de lipídios intracelular com prejuízo na translocação de GLUT4; enquanto na fase posterior, a presença de palmitato interferiu na atividade intrínseca de GLUT4 independente de qualquer outra alteração causada pelo acúmulo lipídico intramuscular na sinalização insulínica (Alkhateeb et al, 2007). Como

indicado pela literatura, o excesso de ácidos graxos disponíveis na circulação pode levar a indução da resistência à insulina. Além disso (ácido graxo como causa de resistência), a resistência à insulina, per se, leva a aumento dos níveis de ácidos graxos circulantes (Boden et al, 2002; Roden et al, 2004). Sendo assim, no presente estudo, escolheu-se o excesso de ácido graxo como modelo de resistência à insulina in vitro. Primeiramente, foi realizada curva dose-resposta para síntese de glicogênio a fim de determinar qual seria a dose ideal de palmitato que pudesse gerar resistência à insulina. Estabeleceu-se 250 μ M de palmitato como a dose a ser utilizada em todos os outros ensaios incluídos no estudo. Além disso, realizou-se curva dose-resposta para síntese de glicogênio, a partir da qual se estabeleceu 25 ng/ml como a dose de IL-6 geradora de efeito no metabolismo da glicose em células musculares saudáveis. Com isso, passou-se a utilizar essa dose da citocina nos ensaios para comparação com efeitos em células resistentes à insulina, foco do presente estudo.

Ao se investigar a captação de glicose e a síntese de glicogênio, encontrou-se um prejuízo nas células musculares saudáveis, após incubação com IL-6 durante 24 horas. No entanto, em células musculares resistentes à insulina, a IL-6 não intensificou ou reverteu o prejuízo na captação de glicose e síntese de glicogênio, ou seja, não houve efeito. Esse resultado pode ser consequência de um mecanismo de proteção da célula muscular, uma vez que essa já apresenta um prejuízo no metabolismo da glicose decorrente do desenvolvimento da resistência à insulina. Como já esperado, as células musculares resistentes à insulina, sem estímulo com IL-6, apresentaram resposta diminuída na captação de glicose e síntese de glicogênio, visto que estes ensaios são parâmetros indicadores de sensibilidade à insulina. Os resultados em células musculares saudáveis estão de acordo com outro estudo no qual foi demonstrado que exposição crônica a IL-6 prejudica a captação de glicose estimulada por insulina, assim como a translocação de GLUT 4 em células musculares da linhagem C2C12 além de miotubos neonatais (Nieto-Vasquez et al, 2008). No entanto, este estudo mostrou-se ser o primeiro a investigar os efeitos da IL-6 durante 24 horas em células musculares resistentes à insulina.

O fato de não ter sido encontrado alteração após estímulo com IL-6 nas células musculares resistentes à insulina na captação de glicose e síntese de glicogênio induziu a investigação quanto ao efeito da suplementação de IL-6 na oxidação de ácidos graxos nestas células. Neste sentido, foi observado efeito estimulatório da IL-6 na oxidação lipídica nas células musculares saudáveis assim como nas resistentes à insulina. Bruce e Dick, em 2004, já demonstraram que IL-6 estimula a oxidação de ácidos graxos em músculo esquelético (Bruce, Dick, 2004). Outro estudo reportou que infusão de IL-6 em humanos aumentou a

lipólise e a oxidação lipídica de forma generalizada, e que tais efeitos não são indiretos, através da alteração de hormônios lipolíticos como adrenalina e glucagon (Van Hall et al, 2003), ou ainda cortisol e hormônio do crescimento (GH) (Petersen et al, 2005).

Em geral, a capacidade de oxidação de ácido graxo é reduzida no estado de resistência à insulina e o aumento da sensibilidade à insulina é associado à elevação na taxa de oxidação de ácidos graxos. Um dos principais distúrbios na obesidade, a qual é caracterizada pelo aumento de ácidos graxos livres na circulação, é o prejuízo na capacidade do músculo esquelético de oxidar lipídios (Hulver et al, 2003; Kim et al 2000). Este defeito torna-se um componente crítico nas complicações da obesidade, visto que a redução da oxidação lipídica pode favorecer o acúmulo de lipídio intracelular o qual se relaciona fortemente com a resistência à insulina (Savage et al, 2007). De acordo com Pimenta e colaboradores, em 2008, a exposição prolongada do músculo esquelético ao palmitato provoca efeitos deletérios, reduzindo a capacidade de oxidação de lipídios, com propensão ao acúmulo de lipídios intracelular (Pimenta et al, 2008); no presente estudo, as células musculares resistentes à insulina, por indução com palmitato, tiveram uma diminuição na capacidade de oxidação de ácidos graxos, comparadas às células saudáveis. Entretanto, o efeito estimulatório da IL-6 manteve-se preservado.

Com a intenção de melhor compreender o efeito da IL-6 após exposição de 24 horas, principalmente, nas células musculares resistentes à insulina, investigaram-se as proteínas envolvidas na principal via de sinalização desta citocina. Encontrou-se uma redução da fosforilação de STAT3 no grupo resistente à insulina comparado ao grupo saudável, após estímulo com IL-6. Adicionalmente, apenas as células musculares saudáveis responderam ao estímulo de IL-6, com aumento da fosforilação de JAK2. Não foi encontrado efeito da suplementação de IL-6 na fosforilação desta proteína em células musculares resistentes à insulina. Este resultado demonstrou que, após estímulo com IL-6, a principal via de sinalização (JAK/STAT) foi ativada, e a transdução do sinal intracelular ocorreu normalmente em células musculares saudáveis. No entanto, a mesma via se mostrou prejudicada em células musculares resistentes à insulina, tornando-se uma possível explicação para a falta de resposta à captação de glicose e síntese de glicogênio apresentada por estas células, após estímulo com IL-6.

Considerando o foco deste estudo na resistência à insulina, tornou-se importante avaliar se IL-6 interfere na via de sinalização da insulina. A fosforilação da Akt foi investigada em ambas as células musculares, saudáveis ou resistentes, após estímulo com IL-6. A fosforilação da Akt, importante na regulação do metabolismo energético (Whiteman et

al, 2002), não se alterou com a IL-6 nas células musculares resistentes à insulina, embora estas células já tenham apresentado redução importante nesta atividade, independente do estímulo com a citocina. No entanto, a suplementação de IL-6 reduziu a fosforilação desta proteína nas células musculares saudáveis. Assim, juntamente com a redução obtida na captação de glicose e síntese de glicogênio, constata-se que a suplementação com IL-6 por 24 horas, assim como palmitato, causa resistência à insulina nas células musculares da linhagem L6. Entretanto, IL-6 e palmitato não mostraram efeito aditivo sobre o metabolismo de carboidrato e a sinalização da insulina.

Seguindo o interesse de aprofundar o conhecimento sobre os efeitos da IL-6 no metabolismo da glicose da célula muscular resistente à insulina, a expressão de GLUT4 o qual é o responsável pelo transporte de glicose estimulado por insulina no músculo esquelético, foi investigada. Curiosamente, não foi encontrada diferença na expressão (RNAm e proteína) deste transportador no presente estudo; embora outros componentes envolvidos no processo inflamatório, como NF- κ B e PPAR, sejam reguladores da expressão de GLUT4 (Silva et al, 2005; Wu et al, 1998). No entanto, em concordância com esse resultado, outras adipocinas como resistina e adiponectina também não alteraram o conteúdo de GLUT4 em células musculares esqueléticas ao serem investigadas previamente (dados não mostrados) embora já esteja descrito na literatura seus efeitos na translocação desse transportador de glicose (Ceddia et al, 2005; Fan et al, 2007).

Alguns estudos foram realizados com a intenção de verificar o efeito da IL-6 no metabolismo lipídico, e, assim como o presente estudo, revelaram que a citocina exerce uma importante função lipolítica, com estímulo da oxidação de ácidos graxos (Van Hall et al, 2003). Sendo a AMPK uma proteína que participa ativamente na regulação da homeostase energética, estimulando a oxidação de ácidos graxos assim como a captação de glicose em músculo esquelético (Merrill et al, 1997; Kahn et al, 2005), investigou-se a sua fosforilação nas células musculares saudáveis e resistentes à insulina, após estímulo com IL-6. Foi encontrado um aumento da fosforilação de AMPK α nas células musculares saudáveis tanto em resposta à IL-6 como em resposta ao palmitato. No entanto, não houve efeito aditivo da IL-6 e do palmitato. Importante ressaltar que o palmitato, independente de IL-6, apresentou um aumento na fosforilação desta proteína, apesar de ter reduzido a oxidação lipídica. Com isso, após exposição por 24 horas, não houve efeito da IL-6 na fosforilação de AMPK α nas células resistentes à insulina (induzido por palmitato).

A fim de aprofundar um pouco mais a compreensão dos efeitos após 24 horas de suplementação de IL-6 no metabolismo lipídico, além de AMPK, a fosforilação de ACC foi

investigada. Normalmente, a fosforilação de AMPK provoca fosforilação de ACC a qual inativa a enzima e diminui a produção de malonil-CoA. Com isso, libera o efeito inibitório exercido por malonil-CoA na carnitina palmitoil-CoA transferase 1 (CPT-1) e promove assim, o transporte de ácidos graxos de cadeia longa para a mitocôndria para início da beta-oxidação (Kahn et al, 2005). Ao se investigar a fosforilação de ACC no presente estudo, encontrou-se um aumento nas células musculares saudáveis, após estímulo com IL-6, o que coincide com o aumento da fosforilação de AMPK α e o aumento da oxidação de ácidos graxos nestas células. No entanto, curiosamente, foi encontrado um aumento na fosforilação de ACC também nas células resistentes à insulina, possivelmente pelo desencadeamento de outras alterações intracelulares. Por outro lado, o aumento da fosforilação de ACC após estímulo com IL-6 está de acordo com o efeito desta citocina na oxidação de lipídica em células musculares esqueléticas resistentes à insulina. Importante ressaltar que estas células musculares que são resistentes à insulina já apresentaram aumento na fosforilação de ACC mesmo sem estímulo de IL-6, sugerindo-se que a ativação da ACC não foi suficiente para neutralizar o efeito supressor na oxidação lipídica, causado pela exposição prolongada de palmitato.

Este é o primeiro estudo demonstrando que a suplementação por 24 horas de IL-6 provoca um aumento na oxidação lipídica sem gerar efeito deletério adicional ao metabolismo da glicose em células musculares resistentes à insulina. Sugere-se que células musculares resistentes à insulina apresentem também, resistência parcial à IL-6, por prejuízo na sua principal via de sinalização (JAK/STAT). No entanto, em células musculares saudáveis, houve resposta à exposição prolongada de IL-6, com prejuízo no metabolismo da glicose e desenvolvimento de resistência à insulina via JAK2/STAT3. Além disso, houve favorecimento da oxidação pelo metabolismo lipídico. Possivelmente, este aumento da oxidação de ácidos graxos possa ser um modo de compensação pelo prejuízo causado ao metabolismo da glicose, em uma tentativa de recuperação da sensibilidade à insulina pelas células musculares, visto que a redução do acúmulo intracelular de lipídios favorece este processo.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os principais efeitos da IL-6, após 1 hora e 24 horas de exposição no metabolismo de células musculares esqueléticas humanas e de ratos, saudáveis ou resistentes à insulina, estão resumidos na tabela 4.

Tabela 4. Resumo dos efeitos da IL-6 no metabolismo de células musculares esqueléticas saudáveis ou resistentes à insulina

	Célula muscular esquelética humana		Célula muscular esquelética de rato (L6)	
	(1 hora de exposição à IL-6)		(24 horas de exposição à IL-6)	
	NDM	DMT2	NRI	RI
Captação de glicose	↑↑	—	↓	—
Síntese de glicogênio	↑↑	—	↓	—
Oxidação de ácido graxo	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
Fosforilação de JAK2	↑↑	—	↑↑	—
Fosforilação de STAT3	↑↑↑	↑↑	↑↑↑	↑↑
Fosforilação de ACC	Não realizado	Não realizado	↑↑	↑↑

NDM, não diabético mellitus; DMT2, diabético mellitus tipo 2; NRI, não resistente à insulina; RI, resistente à insulina.

A partir do observado nos dois estudos aqui apresentados, em células musculares esqueléticas normais, a IL-6 induz efeitos opostos no metabolismo de carboidratos, de acordo com o tempo de exposição: a utilização de glicose aumenta após 1 hora, mas diminui após 24 horas; porém no metabolismo lipídico a IL-6 aumenta a oxidação de ácido graxo tanto em 1 como em 24 horas. No entanto, os efeitos dessa citocina em células musculares esqueléticas resistentes à insulina, em ambos os tempos de exposição, demonstram ser abolidos no metabolismo de carboidrato, devido a um prejuízo na via de sinalização JAK/STAT. Por outro lado, o efeito da IL-6 em células musculares resistentes à insulina manteve-se preservado no metabolismo lipídico, o que pode ser consequência do aumento da fosforilação da ACC induzido pela IL-6 de forma semelhante tanto em células L6 normais como em células L6 resistentes à insulina.

9 CONCLUSÃO

No presente estudo, observou-se que:

9.1 Em célula muscular esquelética de humanos, a IL-6 durante 1 hora promoveu:

- aumento na captação de glicose e síntese de glicogênio nas células de indivíduos saudáveis, no estado basal e estimulado com insulina, o que não foi observado em células de indivíduos diabéticos tipo 2;

- aumento na oxidação de ácidos graxos em células musculares de ambos os indivíduos saudáveis e diabéticos tipo 2;

- aumento no conteúdo da proteína JAK2 fosforilada em células de indivíduos saudáveis, o que não foi observado em células de indivíduos diabéticos tipo 2, além de redução no conteúdo fosforilado de STAT3 nas células de indivíduos diabéticos tipo 2.

9.2 Em célula muscular esquelética de rato da linhagem permanente L6, a IL-6 durante 24 horas promoveu:

- redução da captação de glicose e da síntese de glicogênio, no estado estimulado com insulina, em células saudáveis, o que não foi observado em células resistentes à insulina por palmitato;

- aumento na oxidação de ácidos graxos em ambas as células, saudáveis e resistentes à insulina por palmitato;

- aumento no conteúdo da proteína JAK2 fosforilada em células saudáveis, o que não foi observado em células resistentes à insulina por palmitato, além de redução no conteúdo fosforilado de STAT3 nas células resistentes à insulina;

- redução no conteúdo da proteína AKT fosforilada sob estímulo insulínico em células saudáveis, o que não foi observado em células resistentes à insulina por palmitato;

- aumento no conteúdo da proteína AMPK α fosforilada em células saudáveis, o que não foi observado em células resistentes à insulina por palmitato;

- aumento no conteúdo da proteína ACC fosforilada em ambas as células, saudáveis e resistentes à insulina.

Com base nos resultados destacados acima, conclui-se que células musculares esqueléticas resistentes à insulina possuem uma resposta alterada à IL-6. Células musculares resistentes à insulina são parcialmente resistentes à IL-6: o efeito permanece efetivo no metabolismo lipídico, porém é abolido no metabolismo de carboidrato, independente do tempo de exposição. Adicionalmente, o prejuízo na via de sinalização JAK/STAT parece ser o principal mecanismo envolvido na ausência de efeitos da IL-6 no metabolismo de carboidrato nessas células.

REFERÊNCIAS *

Ahmed B, Tschen JA, Cohen PR, Zaki MH, Rady PL, Tying SK, Corringham RE, Kurzrock R. Cutaneous castleman's disease responds to anti interleukin-6 treatment. *Mol Cancer Ther.* 2007;6(9):2386–90.

Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol.* 1993;54:1-78.

Al-Khalili L, Bouzakri K, Glund S, Heikki F, Koistinen A, Krook A. Signaling Specificity of Interleukin-6 Action on Glucose and Lipid Metabolism in Skeletal Muscle. *Mol Endocrinol.* 2006;20(12):3364-3375.

Alkhateeb H, Chabowski A, Glatz JF, Luiken JJ, Bonen A. Two phases of palmitate induced insulin resistance in skeletal muscle: Impaired GLUT4 translocation in followed by a reduced GLUT4 intrinsic activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007; 293:E783–E793.

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2006; 29:S43–S48.

Aronoff SL, Berkowitz K, Shreiner B, Want L. Glucose metabolism and regulation: beyond insulin and glucagon. *Diabetes Spectr.* 2004;17(3):183-190.

Barma P, Bhattacharya S, Bhattacharya A, Kundu R, Dasgupta S, Biswas A, Bhattacharya S, Roy SS, Bhattacharya S. Lipid induced overexpression of NF-kappaB in skeletal muscle cells is linked to insulin resistance. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1792(3):190-200.

Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature.* 2007;447:396–398.

Björnholm M, Zierath JR. Insulin signal transduction in human skeletal muscle: identifying the defects in Type II diabetes. *Biochem Soc Trans.* 2005;33:354-357.

Boden G. Interaction between free fatty acids and glucose metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2002;5:545–549.

Brandle M, Zhou H, Smith BR, Marriott D, Burke R, Tabaei BP, Brown MB, Herman WH. The direct medical cost of type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2003;26:2300–2304.

Bruce CR, Dyck DJ. Cytokine regulation of skeletal muscle fatty acid metabolism: effect of interleukin-6 and tumor necrosis factor- α *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004;287:E616-E621

Carey AL, Steinberg GR, Macaulay L, Thomas WG, Holmes AG, Ramm G, Prelovsek O, Hohnen-Behrens C, Watt M, James DE, Kemp BE, Pedersen BK, Febbraio MA. Interleukin-6 Increases Insulin-Stimulated Glucose Disposal in Humans and Glucose Uptake and Fatty Acid Oxidation In Vitro via AMP-Activated Protein Kinase. *Diabetes* 2006;55:2688–2697.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Ceddia RB, Somwar R, Maida A, Fang X, Bikopoulos G, Sweeney G. Globular adiponectin increases GLUT4 translocation and glucose uptake but reduces glycogen synthesis in rat skeletal muscle cells. *Diabetologia*. 2005;48(1):132-9.

(CDC) Center for Disease Control and Prevention. National diabetes fact sheet. United States, 2005. Disponível em: <http://apps.nccd.cdc.gov/DDTSTRS/template/ndfs_2005.pdf> Acesso em : 30 maio 2011.

Cryer PE. Glucose Homeostasis and Hypoglycemia. In: Williams Textbook of Endocrinology, 10th Edition. Philadelphia. 2003;1585-1618

DeFronzo RA, Jacot E, Jequier E, Maeder E, Wahren J, Felber JP. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes*. 1981;30:1000–1007.

Ellingsgaard H, Hauselmann I, Schuler B, Habib AM, Baggio LL, Meier DT, Eppler E, Bouzakri K, Wueest S, Muller YD, Hansen AM, Reinecke M, Konrad D, Gassmann M, Reimann F, Halban PA, Gromada J, Drucker DJ, Gribble FM, Ehses JA, Donath MY. Interleukin-6 enhances insulin secretion by increasing glucagon-like peptide-1 secretion from L cells and alpha cells. *Nat Med*. 2011;17:1481–1489.

Erion DM, Shulman GI. Diacylglycerol mediated insulin resistance *Nature Med*. 2010;16:400–402.

Fan HQ, Gu N, Liu F, Fei L, Pan XQ, Guo M, Chen RH, Guo XR. Prolonged exposure to resistin inhibits glucose uptake in rat skeletal muscles. *Acta Pharmacol Sin*. 2007;28(3):410-6.

Febbraio MA, Pedersen BK. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *FASEB J*. 2002;16:1335–1347.

Febbraio MA, Steensberg A, Keller C, Starkie RL, Nielsen HB, Krustup P, Ott P, Secher NH, Pedersen BK. Glucose ingestion attenuates interleukin-6 release from contracting skeletal muscle in humans. *J Physiol*. 2003;549(2):607–612.

Feng S, Jacobsen SE, Reik W. Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science*. 2010;330(6004):622-7.

Fernandez-Real JM, Ricart W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr Rev* 2003; 24:278–301

Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998; 83: 847–850.

Girard J. The incretins: From the concept to their use in the treatment of type 2 diabetes. Part A: Incretins: Concept and physiological functions. *Diabetes Metab*. 2008;34:550-559.

Glund S, Deshmukh A, Long YC, Moller T, Koistinen HA, Caidahl K, Zierath JR, Krook A. Interleukin-6 Directly Increases Glucose Metabolism in Resting Human Skeletal Muscle. *Diabetes*. 2007;56:1630–1637.

Greenfield JR, Campbell LV. Relationship between inflammation, insulin resistance and type 2 diabetes: 'cause or effect'? *Curr Diabetes Rev*. 2006;2(2):195-211.

Gross JL, Silveiro SP, Camargo JL, Reichelt AJ, Azevedo MJ. Diabetes melito: diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2002;46:16-26.

Hamman RF. Genetic and environmental determinants of non-insulindependent diabetes mellitus (NIDDM). *Diabetes Metab Rev*. 1992;8:287-338.

Hayashi T, Hirshman F, Kurth EJ, Winder WW, Goodyear LJ. Evidence for 5 AMP-Activated Protein Kinase Mediation of the Effect of Muscle Contraction on Glucose Transport. *Diabetes*. 1998;47:1369–1373.

Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*. 2003;15(374):1-20.

Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J*. 1998;334:297-314.

Hogan P, Dall T, Nikolov P; American Diabetes Association. Economic costs of diabetes in the US in 2002. *Diabetes Care*. 2003;26:917–932.

Holliday R. DNA Methylation and Epigenetic Inheritance. *Methods*. 2002;27(2):179-183.

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993;259:87–91.

Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature*. 2006;440:944-948.

Hulver MW, Berggren JR, Cortright RN, Dudek RW, Thompson RP, Pories WJ, MacDonald KG, Cline GW, Shulman GI, Dohm GL, Houmard JA. Skeletal muscle lipid metabolism with obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;284:E741–E747.

International Diabetes Federation: Diabetes Atlas. Brussels, International Diabetes Federation, 2009. Disponível em: <<http://www.idf.org/diabetesatlas/>>. Acesso em: 30 maio 2011.

Jensen CB, Storgaard H, Madsbad S, Richter EA, Vaag AA. Altered Skeletal Muscle Fiber Composition and Size Precede Whole-Body Insulin Resistance in Young Men with Low Birth Weight. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(4):1530-1534.

Jørgensen SB, Richter EA, Wojtaszewski JFP. Role of AMPK in skeletal muscle metabolic regulation and adaptation in relation to exercise. *J Physiol*. 2006;1(574):17–31.

Joshi SR, Parikh RM, Das AK. Insulin: History, Biochemistry, Physiology and Pharmacology. *J Assoc Physicians India*. 2007; 55,Suppl:19-25.

Kahn BB. Glucose transport: pivotal step in insulin action. *Diabetes*. 1996;45:1644-1654.

Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: Ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab*. 2005;1:15–25.

Kahn ST, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 2006;444:840-846.

Keller C, Steensberg A, Pilegaard H, Osada T, Saltin B, Pedersen BK, Neufer PD. Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content. *FASEB J*. 2001;15(14):2748-2750.

Kelly M, Keller C, Avilucea PR, Keller P, Luo Z, Xiang X, Giralt M, Hidalgo J, Saha AK, Pedersen BK, Ruderman NB. AMPK activity is diminished in tissues of IL-6 knockout mice: the effect of exercise. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;23;320(2):449-54.

Kelly M, Gauthier MS, Saha AK, Ruderman NB. Activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) by Interleukin-6 in rat skeletal muscle: Association with changes in cAMP, energy state, and endogenous fuel mobilization. *Diabetes*. 2009;58(9):1953-1960.

Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001;280:E745–E751.

Kim JY, Hickner RC, Cortright RL, Dohm GL, Houmard JA. Lipid oxidation is reduced in obese human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000;279:E1039–E1044.

Kim HJ, Higashimori T, Park SY, Choi H, Dong J, Kim YJ, Noh HL, Cho YR, Cline G, Kim YB, Kim JK: Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo. *Diabetes*. 2004;53:1060–1067.

Klover PJ, Zimmers TA, Leonidas G, Koniaris R, Mooney A. Chronic Exposure to Interleukin-6 Causes Hepatic Insulin Resistance in Mice. *Diabetes*. 2003;52:2784–2789.

Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T, Zinkernagel R, Bleuthmann H, Kohler G. Impaired immune and acute- phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature*. 1994;368:339-342.

Kraegen EW, Cooney GJ, Ye J, Thompson A. Triglycerides, fatty acids and insulin resistance—hyperinsulinemia. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2001;109:S516-S526.

Kramer HF, Witczak CA, Fuji N, Jessen N, Taylor EB, Arnolds DE, Sakamoto K, Hirshman MF, Goodyear LJ. Distinct signals regulate AS160, phosphorylation in response to insulin, AICAR, and contraction in mouse skeletal muscle. *Diabetes*. 2006;55:2067-2076.

Lagathu C, Bastard JP, Auclair M, Maachi M, Capeau J, Caron M: Chronic interleukin-6 (IL-6) treatment increased IL-6 secretion and induced insulin resistance in adipocyte: prevention by rosiglitazone. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;311:372–379.

Lebrun P, Van Obberghen E. SOCS proteins causing trouble in insulin action. *Acta Physiologica.* 2008;192(1):29-36.

Lillioja S, Mott DM, Howard BV, Bennett PH, Yki-Järvinen H, Freymond D, Nyomba BL, Zurlo F, Swinburn B, Bogardus C. Impaired glucose tolerance as a disorder of insulin action. Longitudinal and cross-sectional studies in Pima Indians. *N Engl J Med.* 1988;318:1217–1225.

Luca C, Olefsky J. Inflammation and Insulin resistance. *FEBS Lett.* 2008;582(1):97–105.

Lyngso D, Simonsen L, Bulow J. Metabolic effects of interleukin-6 in human splanchnic and adipose tissue. *J Physiol.* 2002;543:379 –386.

Machado UF. Transportadores de glucose. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 1998, 42(6):413-421.

Machado UF, Carpinelli AR, Zechin HG, Saad MJA. Pâncreas Endócrion. In: Margarida de Mello Aires. *Fisiologia.* 3a ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.p.1032-1050.

Marshall BA, Ren JM, Johnson DW, Gibbs EM, Lillquist JS, Soeller WC, Holloszy JO, Mueckler M. Germline manipulation of glucose homeostasis via alteration of glucose transporter levels in skeletal muscle. *J Biol Chem.* 1993;268:18442-18445.

Martin OJ, Lee A, McGraw TE. GLUT4 Distribution between the plasma membrane and the intracellular compartments is maintained by an insulin modulated bipartite dynamic mechanism. *J Biol Chem.* 2006;281:484-490.

Meier JJ, Nauck MA. Is the diminished incretin effect in type 2 diabetes just an epiphenomenon of impaired beta cell function? *Diabetes.* 2010;59(5):1117-25.

Merrill GF, Kurth EJ, Hardie DG, Winder WW. AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1997;273:E1107–E1112.

Mercado MM, McLenithan JC, Silver KD, Shuldiner AR. Genetics of insulin resistance. *Curr Diabetes Rep.* 2002;2(1):83-95.

Muhonen P, Holthofer H. Epigenetic and microRNA-mediated regulation in diabetes. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24(4):1088-1096.

Musi N, Fujii N, Hirshman MF, Ekberg I, Froberg S, Ljungqvist O, Thorell A, Goodyear LJ. AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Is Activated in Muscle of Subjects With Type 2 Diabetes During Exercise. *Diabetes.* 2001;50(5):921-927.

Musi N, Goodyear LJ. AMP-activated protein kinase and muscle glucose uptake. *Sca Physiol Soc.* 2003;178:337-345.

Nagaraju K, Raben N, Merritt G, Loeffler L, Kirk K, Plotz P. A variety of cytokines and immunologically relevant surface molecules are expressed by normal human skeletal muscle cells under proinflammatory stimuli. *Clin Exp Immunol*. 1998;113:407-414.

Nakatani Y, Kaneto H, Kawamori D, Yoshiuchi K, Hatazaki M, Matsuoka T, Ozawa K, Hori M, Yamasaki Y, Matsuhisa M. Involvement of Endoplasmic Reticulum Stress in Insulin Resistance and Diabetes. *J Biol Chem*. 2005; 280(1):847–851.

Nieto-Vazquez I, Fernandez-Veledo S, Alvaro C, Lorenzo M. Dual Role of Interleukin-6 in Regulating Insulin Sensitivity in Murine Skeletal Muscle. *Diabetes*. 2008;57:3211–3221.

Oberbach A, Bossenz Y, Lehmann S, Niebauer J, Adams V, Paschke R, Schon MR, Bluher M, Punkt K. Altered fiber distribution and fiber-specific glycolytic and oxidative enzyme activity in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2006; 29:895–900.

Osler ME, Zierath JR. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase regulation of fatty acid oxidation in skeletal muscle. *Endocrinology*. 2008;149(3):935-41.

Özcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Özdelen E, Tuncman G, Görgün C, Glimcher LH, Hotamisligil GS. Endoplasmic Reticulum Stress Links Obesity, Insulin Action, and Type 2 Diabetes. *Science*. 2004;306(5695):457-461.

Papanicolaou DA. Interleukin-6: The Endocrine Cytokine. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(3):1331-1333.

Pedersen BK, Steensberg A, Fischer C, Keller C, Keller P, Plomgaard P, Wolsk-Petersen E, Febbraio M. The metabolic role of IL-6 produced during exercise: is IL-6 an exercise factor? *Proc Nutr Soc*. 2004;63(2):263-7.

Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an Endocrine Organ: Focus on Muscle-Derived Interleukin-6. *Physiol Rev*. 2008;1379–1406.

Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle-derived interleukin-6-a possible link between skeletal muscle, adipose tissue, liver, and brain. *Brain Behav Immun*. 2005;19(5):371-6.

Pedersen BK, Fischer CP. Beneficial health effects of exercise--the role of IL-6 as a myokine. *Trends Pharmacol Sci*. 2007; 28(4):152-6.

Perseghin J, Petersen K, Shulman GI. Cellular mechanism of insulin resistance: potential links with inflammation. *Int J Obes*. 2003;27:S6–S1.

Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest*. 2000; 106(2):165–169.

Petersen KF, Shulman GI. Pathogenesis of skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *The Am J Cardiol*. 2002;90(Suppl1):11-18.

Petersen KF, Shulman GI. Etiology of insulin resistance. *Am J Med*. 2006;119(5Suppl1):S10-6.

Petersen EW, Carey AL, Sacchetti M, Steinberg GR, Macaulay SL, Febbraio MA, Pedersen BK. Acute IL-6 treatment increases fatty acid turnover in elderly humans in vivo and in tissue culture in vitro. *Am J Physiol*. 2005;288(1):E155-E162.

Pimenta AS, Gaidhu MP, Habib S, So M, Fediuc S, Mirpourian, Musheev M, Curi R, Ceddia RB. Prolonged Exposure to Palmitate Impairs Fatty Acid Oxidation Despite Activation of AMP-Activated Protein Kinase in Skeletal Muscle Cells. *J Cell Physiol*. 2008;217:478–485.

Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-Reactive Protein, Interleukin 6, and Risk of Developing Type 2 Diabetes Mellitus. *JAMA*. 2001;286(3):327-334.

Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet*. 1963;1(7285):785–9.

Rasmussen H, Zawulich KC, Ganesan S, Calle R, Zawulich WS. Physiology and pathophysiology of insulin secretion. *Diabetes Care*. 1990;13(6):655-666.

Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*. 2001;10(5532):1089-93.

Remels AH, Langen RC, Gosker HR, Russell AP, Spaapen F, Voncken JW, Schrauwen P, Schols AM. PPARgamma inhibits NF-kappaB-dependent transcriptional activation in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;297(1):E174-83.

Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, Shulman GI. Mechanism of Free Fatty Acid-induced Insulin Resistance in Humans *J Clin Invest*. 1996;97:2859–2865.

Roden M. How free fatty acids inhibit glucose utilization in human skeletal muscle. *News Physiol Sci*. 2004;19:92–96.

Rodenhiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMAJ*. 2006;174:341-8.

Rose AJ, Kiens B, Richter EA. Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase expression and signalling in skeletal muscle during exercise. *J Physiol*. 2006;574(3):889–903.

Rotter V, Nagaev I, Smith U. Interleukin-6 (IL-6) 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. *J Biol Chem*. 2003;278(46):45777–45784.

Ruderman NB, Keller C, Richard AM, Saha AK, Luo Z, Xiang X, Giralt M, Ritov V, Menshikova EV, Kelley DE, Hidalgo J, Pedersen BK, Kelly M. Interleukin-6 regulation of AMP-activated protein kinase potential role in the systemic response to exercise and prevention of the metabolic syndrome. *Diabetes*. 2006;55(Suppl2):S48-S54.

Sadagurski M, Norquay L, Farhang J, D'Aquino K, Copps K, White MF. Human IL-6 enhances leptin action in mice. *Diabetologia*. 2010;53:525–535.

Sandoval DA, Obici S, Seeley RJ. Targeting the CNS to treat type 2 diabetes. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8:386-398.

Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiol Rev.* 2007; 87:507–520.

Scherer PS. Adipose Tissue: From Lipid Storage Compartment to Endocrine Organ. *Diabetes.* 2006;55:1537-1545.

Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Mooney RA. Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes.* 2002;51:3391–3399.

Serrano AL, Baeza-Raja B, Perdiguero E, Jardí M, Muñoz-Cánoves P. Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. *Cell Metab.* 2008;7(1):33-44.

Shafir E, Raz I. Diabetes: mellitus or lipids? *Diabetologia.* 2003;46:433-440.

Shepherd PR, Kahn BB. Glucose transporters and insulin action. *N Engl J Med.* 1999;341:248-257.

Silva JL, Giannocco G, Furuya DT, Lima GA, Moraes PA, Nachef S, Bordin S, Britto LR, Nunes MT, Machado UF. NF-kappaB, MEF2A, MEF2D and HIF1-a involvement on insulin- and contraction-induced regulation of GLUT4 gene expression in soleus muscle. *Mol Cell Endocrinol.* 2005;240(30):82-93.

Singh R, Shaw J, Zimmet P. Epidemiology of childhood type 2 diabetes in the developing world. *Pediatr Diabetes.* 2004;5:154-168.

Solinas G, Vilcu C, Neels JG, Bandyopadhyay GK, Luo JL, Naugler W, Grivennikov S, Wynshaw-Boris A, Scadeng M, Olefsky JM, Karin M. JNK1 in hematopoietically derived cells contributes to diet-induced inflammation and insulin resistance without affecting obesity. *Cell Metab.* 2007;6(5):386-97.

Suzuki T, Imai J, Yamada T, Ishigaki Y, Kaneko K, Uno K, Hasegawa Y, Ishibara H, Oka Y, Katagiri H. Interleukin-6 Enhances Glucose-Stimulated Insulin Secretion From Pancreatic β -Cells Potential Involvement of the PLC-IP₃–Dependent Pathway. *Diabetes.* 2011;60(2):537-547.

Tanner CJ, Barakat HA, Dohm GL, Pories WJ, MacDonald KG, Cunningham PR, Swanson MS, Houmard JA. Muscle fiber type is associated with obesity and weight loss. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;282:E1191–E1196.

Tuomilehto J, Lindström J, Eriksson JG, Valle TT, Hämäläinen H, Ilanne-Parikka P, Keinänen-Kiukaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Rastas M, Salminen V, Uusitupa M; Finnish Diabetes Prevention Study Group. Prevention of Type 2 Diabetes Mellitus by Changes in Lifestyle among Subjects with Impaired Glucose Tolerance. *N Engl J Med.* 2001;344:1343-1350.<http://www.nejm.org/toc/nejm/344/18/>

Van Hall G, Steensberg A, Sacchetti M, Fischer C, Keller C, Schjerling P, Hiscock N, Møller K, Saltin B, Febbraio MA, Pedersen BK. Interleukin-6 Stimulates Lipolysis and Fat Oxidation in Humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:3005-3010.

Weigert C, Hennige AM, Brodbeck K, Haring HU, Schleicher ED: Interleukin-6 acts as insulin sensitizer on glycogen synthesis in human skeletal muscle cells by phosphorylation of Ser473 of Akt. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005;289:E251 –E257.

Wallenius V, Wallenius K, Ahren B, Rudling M, Dickson SL, Ohlsson C, Jansson JO. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat Med*. 2002;8(1):75-9.
Wellen KE, Hotamisligil, GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1111–1119.

Wei Y, Chen K, Whaley-Connell AT, Stump CS, Ibdah JA, Sowers J. Skeletal muscle insulin resistance: role of inflammatory cytokines and reactive oxygen species. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;294: R673–R680.

Whiteman EL, Cho H, Birnbaum M. Role of Akt/protein kinase B in metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2002;13(10):444-451.

Wolsk E, Mygind H, Grøndahl TS, Pedersen BK, van Hall G. IL-6 selectively stimulates fat metabolism in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;299(5):E832-40.

World Health Organization: Definition, Diagnosis and Classification of Diabete Mellitus and its Complications: Report of a WHO Consultation. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Geneva, World Health Org., 1999. Disponível em: <http://www.staff.ncl.ac.uk/philip.home/who_dmgs.pdf> Acesso em: 30 maio 2011.

Wu Z, Xie Y, Morrison RF, Bucher NL, Farmer SR. PPARgamma induces the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 in the absence of C/EBPalpha during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes. *J Clin Invest*. 1998;101(1): 22–32.

Ye J. Emerging Role of Adipose Tissue Hypoxia in Obesity and Insulin Resistance. *Int J Obes*. 2009;33(1):54–66.

Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*. 2003;112:1821–1830.

Zheng D, MacLean PS, Pohnert SC, Knight JB, Olson AL, Winder WW, Dohm GL. Regulation of muscle GLUT-4 transcription by AMP-activated protein kinase. *J Appl Physiol*. 2001;91(3):1073-1083.