



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**

Campus de Araçatuba
Departamento de Ciências Básicas

Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

RAFAEL DIAS ASTOLPHI

**AVALIAÇÃO DO SINAL INSULÍNICO EM RATOS
ADULTOS COM LESÃO PERIAPICAL**

Araçatuba-SP

2013



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**

Campus de Araçatuba

Departamento de Ciências Básicas

Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

RAFAEL DIAS ASTOLPHI

**AVALIAÇÃO DO SINAL INSULÍNICO EM RATOS
ADULTOS COM LESÃO PERIAPICAL**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Odontologia do
Campus de Araçatuba - Universidade
Estadual Paulista "Júlio de Mesquita
Filho" - UNESP, para obtenção do
título de "Mestre em Ciências
Fisiológicas".

Orientadora: Prof^a. Adj. Doris Hissako
Sumida

Araçatuba-SP

2013

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Astolphi, Rafael Dias.
A856a Avaliação do sinal insulínico em ratos adultos com lesão periapical / Rafael Dias Astolphi. - Araçatuba : [s.n.], 2013
91 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Dra. Doris Hissako Sumida
Coorientadora: Prof. Dr. Luciano Tavares Angelo Cintra

1. Doenças periapicais 2. Resistência à insulina 2. Ratos
3. Inflamação 4. Proteínas substratos do receptor de insulina
5. Diabetes mellitus tipo 2 I. T.

CDD 612

Dados Curriculares

Nascimento: 15.02.1985, Birigui – São Paulo.

Filiação: Isabel Aparecida Dias de Sousa Astolphi
Wagner Solweig Fernandes Astolphi

2006/2010: Curso de Graduação em Medicina Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, *campus* de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp.

2011/2013: Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia do *Campus* de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp.

Dedicatória

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Wagner Solweig Fernandes Astolphi e Isabel Aparecida Dias de Sousa Astolphi, pelo amor, paciência, incentivo, confiança, apoio às minhas escolhas e pelos esforços realizados para a minha educação, uma herança ímpar.

Aos meus irmãos Lucas Dias Astolphi e Tiago Dias Astolphi pelo incentivo, sinceridade e amizade. Apesar de não estarmos o tempo todo juntos, sempre penso em vocês.

À Chitara, pela companhia desde os tempos do meu ensino médio.

Aos meus amigos e familiares, que sempre me incentivaram e me apoiaram, em todos os momentos.

Agradecimentos Especiais

À força espiritual que sempre está comigo.

À minha orientadora Doris Hissako Sumida, pela sua orientação, idealização deste projeto, ensinamentos transmitidos durante nossas conversas, grande incentivo e confiança a mim depositada.

Ao Kevin Bruce Hall, pela força, incentivo, risadas compartilhadas e companheirismo.

À amiga e colega de mestrado Aline Pedro de Melo Yamamoto, pelos conselhos, aventuras divididas e risadas compartilhadas.

Ao meu irmão Tiago Dias Astolphi e ao meu amigo Adelson Soares Aguiar, que cederam seus lares para que eu ficasse hospedado durante as disciplinas cursadas na Universidade de São Paulo (USP) *campus* da Capital.

À minha co-orientada Mariane Machado Curbete, pela grande ajuda a este projeto, pela amizade sincera, por todos os conselhos vindos à hora certa e pela paz que sempre transmitiu.

Ao Caio Luz, pela grande contribuição e amizade.

À equipe do Laboratório de Endocrinologia do Departamento de Ciências Básicas, pela grande ajuda e incentivo. Neste espaço, agradeço especialmente aos veteranos Fernando Chiba Yamamoto, Natália Helena Colombo e Daisy Jaqueline Shirakashi pelos ensinamentos valiosos na rotina do nosso laboratório e na confecção dos artigos.

Agradecimentos

À Universidade Estadual Paulista (Unesp) e ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas pela oportunidade em realizar o Curso de Mestrado em Ciências Fisiológicas.

À Diretora da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Unesp, Prof^a. Adj. Ana Maria Pires Soubhia e ao Vice-Diretor Prof. Titular Wilson Roberto Poi, pelo apoio.

Aos amigos e colegas do nosso Laboratório de Endocrinologia, pelo agradável convívio: Max Sander de Oliveira da Mota, Annelise Katrine Carrara Prieto, Alana Carvalho de Oliveira, Viviane Clície da Silva, Maria Sara de Lima Coutinho, Patrícia Juvêncio Dias, Cleidiel Aparecido Lemos, Natália Magalhães, Jéssica Bonilha, Nayara Rodrigues Alves, Renato Felipe e Luis Paulo Ribeiro.

Ao Prof. Dr. Luciano Tavares Angelo Cintra pela co-orientação e ensinamentos transmitidos. Estendo os agradecimentos também à equipe do Laboratório de Endodontia (alunos de pós- graduação, graduação e funcionários) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA/Unesp) pela contribuição com este trabalho.

Ao Prof. Dr. Edilson Ervolino da FOA/Unesp pela contribuição com as imagens histopatológicas.

Às professoras Dr^a. Sandra Helena Penha de Oliveira e Dr^a. Cristina Antoniali Silva pela contribuição com as válidas sugestões fornecidas no Exame Geral de Qualificação. À coordenadora do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Dornelles, pelos auxílios e trabalhos cabíveis.

À professora Dr^a. Suely Regina Mogami Bomfim e à equipe do Laboratório Clínico Veterinário do Hospital Veterinário “Luís Quintiliano de Oliveira” (alunos de pós-graduação, residentes e funcionários), da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA/Unesp) pela colaboração com o ensaio lipídico e de glicose.

Ao Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira e à funcionária Devani Mariano Pinheiro, do Laboratório de Endocrinologia da FMVA/Unesp, pelo auxílio durante a dosagem de insulinemia.

Ao Prof. Titular Wilson Galhego Garcia, da FOA/UNESP, pelas conversas motivadoras, sempre regadas por cultura, artes e filosofia.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo apoio financeiro imprescindível e à PROPG-Unesp (Pró-Reitoria de Pós-Graduação da Unesp) que proporcionaram os recursos necessários para o desenvolvimento deste trabalho, bem como a divulgação de seus resultados pelo Brasil e pelo mundo.

A todos os professores e discentes do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da FOA/Unesp, pelos ensinamentos ministrados, empréstimos de laboratório, equipamentos e pela ótima convivência.

Aos funcionários e estimados amigos da Biblioteca, Izamar da Silva Freitas, Ana Claudia Martins Grieger Manzatti, Claudio Hideo Matsumoto, Ana Paula Rimoli de Oliveira, Denise Haruyo Nakamura, Ivone Rosa de Lima Munhoz, Luis Claudio Sedlacek, Luzia Anderlini e Maria Claudia de Castro Benez, sempre prontos para nos ajudar.

Aos funcionários da Seção Técnica de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão (STAEPE), Samuel Aparecido Patim, Renato Gomes de Oliveira, Maurício Hiromi Tutumi, Patrick Santos Nogueira da Silva e Reinaldo Inácio Mendes, pelos constantes auxílios nas apresentações.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Foa/Unesp, Valéria Queiroz Marcondes Zagatto, Cristiane Regina Lui Mattos, Diogo Reatto, Liliam Sayuri Mada e Marina Midori Sakamoto Hawagoe, pelo excelente trabalho, atenção dispensada e grande disposição em atender.

Aos funcionários do Setor de Biotério, Alan Roge Senerine Carvalho, Camilo Roberto Venancio e João Batista Alves Correa, pela atenção e presteza no atendimento.

À Aline David Silva, aluna de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP), *campus* da Capital, por sempre sanar minhas indagações científicas.

A todos os professores e funcionários da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA/Unesp) e da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA/Unesp), pela ajuda e atenção que me dispensaram desde a graduação.

“(...) Doze vozes gritavam, cheias de ódio, e eram todos iguais. Não havia dúvida, agora, quanto ao que sucedera à fisionomia dos porcos. As criaturas de fora olhavam de um porco para um homem, de um homem para um porco e de um porco para um homem outra vez; mas já se tornara impossível distinguir, quem era homem, quem era porco.”

- A Revolução dos Bichos, de George Orwell (Reino Unido, 1945).

ASTOLPHI, R.D. Avaliação do sinal insulínico em ratos adultos com lesão periapical. 2013. 91 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2013.

RESUMO

Patologias na cavidade oral podem gerar efeitos deletérios em diversos sistemas do organismo. Nesse sentido, a presença de bactérias nas polpas dentárias pode provocar lesão periapical (LP) e gerar inflamação, culminando na produção de citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e a interleucina-6 (IL-6), que podem atingir a circulação sistêmica e causar a resistência insulínica (IR) em órgãos responsivos à insulina. A IR é definida como a diminuição da resposta de tecidos periféricos à ação da insulina, e indivíduos com esta característica são predispostos a desenvolver diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Tendo conhecimento de que as citocinas inflamatórias podem gerar alteração no sinal insulínico (SI), tornou-se primordial investigar a possibilidade de um processo inflamatório local, como a LP “per se”, causar IR em indivíduos não diabéticos. Para tanto, foram utilizados ratos Wistar (02 meses de idade), divididos em dois grupos: ratos com LP induzida em primeiro molar superior direito, empregando-se broca em aço carbono dotada de esfera na extremidade com 0,1 mm de diâmetro e ratos-controle (CN). Após 30 dias de indução, realizaram-se os experimentos: 1) coleta de sangue (n=10) e obtenção de plasma para análise das concentrações de glicose, insulina, colesterol total, colesterol HDL (HDL-C), colesterol LDL (LDL-C), colesterol VLDL (VLDL-C), triglicérides, TNF- α e interleucina-6 (IL-6); 2) teste de tolerância à insulina (ITT) para a avaliação da sensibilidade à insulina (n=10); 3) avaliação do grau de fosforilação em tirosina da pp185 (IRS-1/IRS-2) e dos conteúdos de receptor insulínico beta (R β) e de substrato do receptor insulínico-1 (IRS-1) em tecido adiposo branco periepididimal, muscular esquelético e hepático (n=7). A partir dos resultados pôde-se observar que os ratos com LP apresentaram: 1) redução (p<0.05) na sensibilidade à insulina; 2) nenhuma alteração nas concentrações plasmáticas de glicose, insulina, colesterol total, HDL-C, LDL-C, VLDL-C e triglicérides; 3) aumento nas concentrações plasmáticas de TNF- α , mas nenhuma

alteração nas concentrações de IL-6; 4) diminuição ($p < 0,05$) no grau de fosforilação em tirosina da subunidade beta do receptor de insulina ($R\beta$) após estímulo insulínico em tecido adiposo branco e fígado; 5) diminuição ($p < 0,05$) no grau de fosforilação em tirosina da pp185 (IRS-1/IRS-2), após o estímulo insulínico, no tecido adiposo branco e muscular esquelético, mas sem alteração no fígado; 6) nenhuma alteração nos conteúdos de $R\beta$ e de IRS-1 nestes tecidos. Com base nesses resultados, podemos inferir que o aumento de TNF- α em ratos com LP pode ter ocasionado a alteração no sinal insulínico e na sensibilidade à insulina. O presente trabalho reforça a importância da prevenção da LP no intuito de prevenir a IR e as alterações sistêmicas que eventualmente podem ser geradas devido a esta alteração.

Palavras-chave: Doenças periapicais. Resistência à insulina. Inflamação. Proteínas substratos do receptor de insulina. Ratos. Diabetes mellitus tipo 2.

ASTOLPHI, R.D. **Evaluation of insulin signaling in male rats with induced periapical lesion.** 2013. 91 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2013.

ABSTRACT

Oral cavity's pathologies may cause deleterious effects in different body systems. The presence of bacteria in dental pulp may cause periapical lesion (PL) and generate inflammation, culminating in the production of inflammatory cytokines including tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6). These cytokines can reach the systemic circulation and may cause insulin resistance (IR) in insulin-responsive tissues. IR is defined as a decreased response of peripheral tissues to insulin action, and individuals with this metabolic state are predisposed to develop type 2 diabetes mellitus (T2DM). Knowing that the inflammatory cytokines may generate alterations in insulin signal, it becomes essential to investigate the possibility of a local inflammatory process as the PL "per se" cause insulin resistance in non-diabetic individuals. Therefore, the purpose of this study was to determine whether PL can cause changes in the initial phase of insulin signaling and in insulin sensitivity in non-diabetic rats. For this purpose, Wistar rats (two-month-old) were used in the present study. The animals were divided into two groups: 1) group with induced PL in right first upper molars by using a dental handpiece (spot size 0.1 mm); 2) control group (CN). After 30 days post induction, experiments were carried out: 1) blood collection (n = 10) obtaining plasma for glucose, insulin, total cholesterol, HDL cholesterol (HDL-C), triglycerides, LDL cholesterol (LDL-C), VLDL cholesterol (VLDL-C), TNF- α and IL-6 analyses; 2) insulin tolerance test (ITT) for evaluating insulin sensitivity (n = 10); 3) assessment of pp185 (IRS-1 / IRS-2) tyrosine phosphorylation and insulin receptor-beta (R β) and insulin receptor substrate-1 (IRS-1) content in periepididymal white adipose tissue, skeletal muscle and liver. Observation of results in rats with induced LP showed: 1) reduction (p<0.05) in insulin sensitivity; 2) no change in glucose, total cholesterol, HDL-C, LDL-C, VLDL-C and triglycerides plasmatic concentrations; 3) increase in TNF- α plasmatic concentration, but no changes in IL-6 plasma levels; 4) decrease (p < 0.05) in tyrosine phosphorylation of the insulin receptor beta-subunit (R β) after insulin stimulation in white adipose tissue and liver; 5) decrease (p<0.05) in pp185 (IRS-

1/IRS-2) tyrosine phosphorylation status after insulin stimulation in white adipose tissue and skeletal muscle, but no change in liver, 6) no change in R β and IRS-1 content in these tissues. Based on these results, it could be inferred that the increase in TNF- α in PL rats may have caused the change in insulin signaling and insulin sensitivity. In addition, this study reinforces the importance of endodontic disease prevention to prevent insulin resistance and systemic changes that may be generated due to this alteration.

Keywords: Periapical diseases. Insulin resistance. Inflammation. Insulin receptor Substrate proteins. Rats. Type 2 diabetes mellitus.

Lista de Figuras

- Figura 1** **As vias de sinalização insulínica.** O receptor de insulina é uma tirosina quinase que se autofosforila e catalisa a fosforilação de proteínas intracelulares como as proteínas IRS, Shc e Cbl. Após a fosforilação essas proteínas se ligam a outras moléculas de sinalização por meio de seus domínios SH2, resultando na ativação de vias de sinalização intracelular como a via da PI 3-quinase, a cascata da MAPK e a ativação do TC10 via CAP/Cbl. Essas vias regulam o transporte de glicose, a síntese de glicogênio, lipídeos e proteínas, coordenando e integrando o metabolismo intermediário (CARVALHEIRA *et al.*, 2002). 26
- Figura 2** Esquema representativo da metodologia utilizada neste trabalho. 36
- Figura 3** Fotomicrografias de molar saudável (controle-CN) e molar com lesão periapical (LP) após 30 dias. Em A e B são exibidos aspectos normais da inserção periodontal na região periapical. C e D representam vista panorâmica de molar com LP, evidenciando abertura coronária (asterisco), necrose pulpar e lesão periapical estabelecida, com presença de infiltrado inflamatório. Abreviaturas e símbolos: setas pretas, infiltrado inflamatório; d, dentina; dp, polpa dental; ab, osso alveolar; pl, ligamento periodontal; *, abertura coronária realizada por broca. 44
- Figura 4** Peso corpóreo dos ratos-controle (CN) e ratos com lesão periapical (LP) durante 30 dias. Os valores são expressos como média \pm EPM, n = 45

	11.	
Figura 5	Ingestão alimentar de ratos-controle (CN) e ratos com lesão periapical (LP) durante 30 dias. Os valores são expressos como média \pm EPM, n=11.	45
Figura 6	Velocidade de desaparecimento da glicose (Kiit) em ratos do grupo controle (CN) e do grupo com lesão periapical (LP). Os animais foram submetidos ao teste de tolerância à insulina (0,75U / kg de peso corpóreo) e as amostras foram coletadas nos tempos 0 (basal), 4, 8, 12, 16 minutos após a injeção de insulina. O Kitt foi calculado como descrito em materiais e métodos e os valores são expressos como média \pm EPM, n = 10. *p<0,05 para CN vs. LP.	47
Figura 7	Avaliação do grau de fosforilação em tirosina da subunidade beta do receptor de insulina (R β) antes (-) e após (+) o estímulo insulínico no tecido adiposo branco periepididimal (A, B) e fígado (C, D) de ratos-controle (CN) e de ratos com lesão periapical (LP). Em A e C autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 μ g). β -actina foi utilizada como controle. Em B e D, valores do grau de fosforilação em tirosina do RI, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média \pm EPM, n=6. * p<0,05 insulina (-) vs. insulina (+); † p<0,05 CN (+) vs. LP (+).	49
Figura 8	Avaliação do conteúdo da subunidade β do receptor de insulina (R β) no tecido adiposo branco periepididimal (A, B), músculo gastrocnêmio (C, D) e fígado (E, F) de ratos-controle (CN) e de ratos com lesão periapical (LP). Em A, C e E autorradiografia típica: quantidades iguais de	50

proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 µg). β-actina foi utilizada como controle. Em B, D e F, valores do conteúdo do Rβ, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média ± EPM, n=6.

Figura 9 Avaliação do grau de fosforilação em tirosina da pp185 (IRS-1/IRS-2) antes (-) e após (+) o estímulo insulínico no tecido adiposo branco periepídídimo (A, B), músculo gastrocnêmio (C, D) e fígado (E, F) de ratos-controle (CN) e de ratos com lesão periapical (LP). Em A, C e E autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 µg). β-actina foi utilizada como controle. Em B, D e F, valores do grau de fosforilação em tirosina da pp185, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média ± EPM, n=6. * p<0,05 insulina (-) vs. insulina (+); † p<0,05 CN (+) vs. LP (+).

51

Figura 10 Avaliação do conteúdo do IRS-1 no tecido adiposo (A, B), músculo gastrocnêmio (C, D) e fígado (E, F) de ratos-controle (CN) e de ratos com lesão periapical (LP). Em A, C e E autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 µg). Em B, D e F, valores do conteúdo do IRS-1, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média ± EPM, n=6.

52

Lista de Tabelas

Tabela 1	Glicemia, Insulinemia e Lipidemia em jejum dos ratos-controle (CN) e ratos com lesão periapical (LP)	45
Tabela 2	Concentrações plasmáticas de TNF- α e IL-6 nos ratos-controle (CN) e ratos com lesão periapical (LP)	47

Lista de Abreviaturas

- AMPK: Proteína quinase ativada por AMP
- AS160: Substrato da AKT de 160 kDa
- Akt/PKB: Proteína quinase B
- Akt/PKB α : Proteína quinase B-alfa
- Akt/PKB β : Proteína quinase B-beta
- Akt/PKB γ : Proteína quinase B-gama
- Cbl: *Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene*
- CN: Grupo controle
- cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementar
- dl: Decilitro
- DM: *Diabetes Mellitus* ou melito
- DM1: Diabetes Mellitus tipo 1
- DM2: Diabetes Mellitus tipo 2
- DP: Doença periodontal
- DTT: Ditioneitol
- EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EPM: Erro padrão da média
- F: Fígado
- G: Gastrocnêmio
- GLUT4: Proteína transportadora de glicose-4
- g: Grama
- HDL-C: Lipoproteína de alta densidade
- IFN- γ : Interferon-gama
- IGF-1: Fator de crescimento relacionado à insulina
- IgG: Imunoglobulina G
- IL-1 α : Interleucina-1 alfa
- IL-1 β : Interleucina-1 beta
- IL-6: Interleucina-6
- IL-8: Interleucina-8
- IL-18: Interleucina-18
- IR: *Insulin resistance* (Resistência insulínica)

- R β : Subunidade beta do receptor insulínico
- IRS: Substrato do receptor de insulina
- IRS-1: Substrato-1 do receptor de insulina
- IRS-2: Substrato-2 do receptor de insulina
- IRS-3: Substrato-3 do receptor de insulina
- IRS-4: Substrato-4 do receptor de insulina
- ITT: Teste endovenoso de tolerância à insulina
- kg: Quilograma
- kDa: Kilodalton
- Kitt: Velocidade de decaimento da glicose
- L: Litro
- LDL-C: Lipoproteínas de baixa densidade
- LP: Lesão periapical
- LPS: Lipopolissacarídeos
- MAPK: Proteína quinase ativada por Ras-mitógeno
- M: Músculo esquelético gastrocnêmio
- mg: Miligrama
- mL: Mililitro
- μ L: Microlitro
- mm: Milímetro
- mM: Milimolar
- μ m: Micrometro
- M: Molar
- mmol: Milimol
- MMP: Metaloproteinase de matriz
- MMP9: Metaloproteinase de matriz 9
- mV: Milivolt
- nm: Nanômetro
- NO: Óxido Nítrico
- OMS: Organização Mundial de Saúde
- pp185: IRS-1/IRS-2
- p110: Subunidade catalítica da PI3K

- p85: Subunidade regulatória da PI3K
- PI: Fosfatidilinositol
- PI-4P: Fosfatidilinositol 4-fosfato
- PI-4,5P2: Fosfatidilinositol 4,5-difosfato
- PIP3: Fosfoinosítido fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
- PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinase
- PDK1: Proteína quinase- 1 dependente de fosfoinosítido
- PKC: Proteína quinase
- PKC ζ/λ : Proteína quinase zeta e lambda
- PPAR γ : Proliferadores de peroxissoma gama
- PRK-1 ou PKN: PKC relacionada à quinase-1
- PTP1B: Proteína tirosina fosfatase 1B
- RI: Receptor insulínico
- RPM: Rotações por minuto
- SDS: Dodecil sulfato de sódio
- SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida em dodecil sulfato de sódio
- SH2: Domínios com homologia a “Src 2”
- SH3: Domínios com homologia a “Src 3”
- Shc: *Src homology collagen*
- SI: Sinal insulínico
- Src: Família de proteína tirosina quinase originalmente identificada por homologia com a proteína oncogênica PP60 (v-Src) do vírus do sarcoma de *rous*.
- SK6 ou p70S6k: Proteína serina/treonina quinase-6
- SOCS: Supressor da sinalização de citocinas
- SOCS1: Supressor da sinalização de citocinas-1
- SOCS3: Supressor da sinalização de citocinas-3
- SB: Solução basal
- TAB: Tecido adiposo branco
- TEMED: Tetrametil etilenodiamina
- TC10: *Small guanosine 5'-triphosphate (GTP) binding protein*
- TLRs: Receptores Toll-like

- TLR-4: Receptor Toll-like 4
- TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa
- Tris: Hidroximetil aminometano
- TZD: Tiazolidinedionas
- U: Unidade "rack"
- V: Volt
- VLDL-C: Lipoproteínas de muito baixa densidade

Sumário

1	INTRODUÇÃO	22
2	OBJETIVOS	34
3	MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1	Animais	35
3.2	Análise histopatológica	37
3.3	Determinação da glicemia	37
3.4	Determinação da insulinemia	38
3.5	Determinação da concentração plasmática de colesterol total	38
3.6	Determinação da concentração plasmática do colesterol HDL	39
3.7	Determinação da concentração plasmática dos triglicérides	39
3.8	Determinação da concentração plasmática do LDL-C e VLDL-C	40
3.9	Teste intravenoso de tolerância à insulina (ITT) curto	40
3.10	Concentrações plasmáticas de citocinas	40
3.11	Avaliação do grau de fosforilação em tirosina da subunidade beta do receptor de insulina (R β) e do substrato do receptor de insulina pp185 (IRS-1/IRS-2)	41
3.11.1	Preparação das amostras para “Western blotting”	41
3.11.2	“Western blotting”	41
3.12	Análise estatística	43
4	RESULTADOS	44
4.1	Análise histológica da inflamação	45
4.2	Peso corpóreo e ingestão alimentar	45
4.3	Concentrações plasmáticas de glicose e insulina	46
4.4	Lipidemia	46
4.5	Teste intravenoso de tolerância à insulina (ITT) curto	47
4.6	Concentrações plasmáticas de TNF- α e IL-6	48
4.7	Avaliação do grau de fosforilação em tirosina da subunidade beta do receptor de insulina (R β) no tecido adiposo branco periepididimal e fígado	49
4.8	Avaliação do conteúdo do R β no músculo esquelético gastrocnêmio, tecido adiposo branco periepididimal e fígado	50

4.9	Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina pp185 (IRS-1/IRS-2) no músculo esquelético gastrocnêmio, tecido adiposo branco periepídicimo e fígado	51
4.10	Avaliação do conteúdo do substrato do receptor de insulina IRS-1 no músculo esquelético gastrocnêmio, tecido adiposo branco periepídicimo e fígado	52
5	DISCUSSÃO	53
6	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS	69
	ANEXOS	90

1 INTRODUÇÃO

O conceito de que a infecção em estruturas dentárias atuava apenas localmente foi mantido durante muito tempo, porém, devido aos recentes estudos que comprovaram a associação da inflamação local com manifestações sistêmicas deletérias (BARNETT, 2006), este conceito não é mais tido como verdadeiro. Pioneiramente, Miller (1891) realizou estudo clássico ressaltando a associação entre infecções orais e doenças sistêmicas, incentivando então a execução de outros experimentos que evidenciassem essa inter-relação.

Pesquisas recentes demonstraram a associação de doença periodontal (DP), patologia intimamente semelhante à lesão periapical (LP) em termos de imunopatologia (STASHENKO *et al.*, 1998), e o aumento na incidência de diversas alterações sistêmicas, como por exemplo, arteriosclerose, doenças cardiovasculares e respiratórias, osteoporose e *diabetes mellitus* (IACOPINO; CUTLER, 2000; QURESHI *et al.*, 2005; SCANNAPIECO *et al.*, 2003). Contudo, em relação à associação entre lesão LP e possíveis manifestações sistêmicas, a literatura mostra-se escassa, revelando a necessidade de se abordarem melhor os efeitos das lesões endodônticas. Apesar de alguns estudos comprovarem a relação entre a presença de LP e alterações sistêmicas diversas (MATTILA *et al.*, 1989; SYRJÄNEN *et al.*, 1989), pouco é discutido acerca do efeito desta lesão oral sobre o sinal insulínico (SI) (BAIN *et al.*, 2009). Portanto, faz-se necessária a investigação para determinar a existência de uma possível conexão entre LP e efeitos sobre o SI em tecidos diversos (ASTOLPHI *et al.*, 2012).

O *diabetes mellitus* ou melito (DM) é grupo heterogêneo de doenças metabólicas caracterizado por hiperglicemia crônica devido à falta da ação insulínica (SAAD; ZECCHIN, 2011; THE COMMITTEE... 2010). Segundo a *Japan Diabetes Society* (THE COMMITTEE... 2010) esse mecanismo para a falta de ação hormonal presente no DM pode incluir a secreção insuficiente de insulina de maneira absoluta ou relativa (classificada como DM tipo-1 ou DM1) ou resistência insulínica (IR) em tecidos (classificada como DM tipo-2 ou DM2). Na forma mais comum da doença, o DM2, as etiologias ainda não estão totalmente estabelecidas. Nesse sentido, sabe-se que pode haver um componente genético, ainda mal definido, e que a obesidade, a inatividade física e o envelhecimento desencadeiam ou aceleram o aparecimento dessa patologia. O DM2 pode ter caráter poligênico, no qual os polimorfismos

possivelmente facilitam a instalação da IR, bem como a conseqüente redução de massa das células beta (β) pancreáticas (SAAD; ZECCHIN, 2011).

Vários processos patogênicos também podem estar envolvidos no desenvolvimento do DM, englobando eventos desde destruição autoimune das células beta do pâncreas com conseqüente deficiência na produção de insulina até anormalidades que resultam em IR (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012). Nos últimos anos houve grande progresso na definição das características clínicas de indivíduos que desenvolveram o DM2, bem como em alterações moleculares envolvidas na patogênese dessa forma de diabetes (SAAD; ZECCHIN, 2011). Sabe-se que em longo prazo, a hiperglicemia crônica causada pelo DM2 pode estar associada à disfunção e falência de diferentes órgãos, especialmente os olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012). A hiperglicemia crônica do paciente com DM2, também chamada de glicotoxicidade, mesmo que discreta, agrava a IR e diminui a secreção de insulina. Entretanto, o mecanismo preciso deste processo não está bem estabelecido, dificultando a investigação da sequência patogênica no DM2 (SAAD; ZECCHIN, 2011). Além disso, o indivíduo com DM2 pode desenvolver alteração no metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídios (apresentando baixos níveis de colesterol HDL e altos níveis de triglicérides), além de neuropatia, microangiopatia, desordens oftálmicas (incluindo cegueira), nefropatia, doenças do sistema geniturinário, arteriosclerose, osteólise, aumento do tempo de cicatrização de feridas, risco de infecções, complicações na gestação, aumento no risco de amputação dos membros, ocorrência de infarto e derrame (BORGREVE *et al.*, 2003; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2011; JENSEN; DECKERT, 1992; LÖE, 1993; PATTERSON; ANDRIOLE, 1997; TAYLOR *et al.*, 1998; VLASSARA; PALACE, 2002;)

Adicionalmente, o conceito de lipotoxicidade também é utilizado para explicar a patogênese do DM2. Os autores que propagam esta teoria sugerem que a elevação dos níveis de ácidos graxos livres (AGL) séricos e no meio intracelular induz alterações na secreção e ação da insulina, que podem predispor o desenvolvimento do DM2 (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011). Pelo uso de análogo de glicose marcada (2-deoxiglicose-H3), é possível demonstrar que a IR pode ocorrer após indução da obesidade por meio de dietas hiperlipídicas, promovendo alteração no SI e IR de diversos órgãos, como o fígado e o músculo. Nesse caso, a

captação celular de glicose encontra-se prejudicada (KRAEGEN *et al.*, 1991; OAKES *et al.*, 1997). Nos últimos anos também se pôde observar que a IR e o DM2 estão associados à ativação do sistema imune inato, manifestada por elevação dos níveis circulantes de marcadores inflamatórios. Nesse sentido, as citocinas pró-inflamatórias induzem IR bem como alterações na secreção deste hormônio. Por enquanto, sabe-se que o tecido adiposo é capaz de produzir algumas citocinas (TNF- α , IL-6) que, então, podem ativar o sistema imune e desencadear a IR (SAAD; ZECCHIN, 2011).

O DM evolui de maneira acelerada em todo o mundo, inclusive no Brasil, podendo acometer cerca de 20% das pessoas com mais de 65 anos de idade nos próximos 10 anos e atingir aproximadamente 366 milhões de pessoas até 2030 (WILD *et al.*, 2004; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012). Em 2011, esta patologia foi considerada uma pandemia, influenciando o ônus social e econômico e desafiando os sistemas de saúde mundialmente (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012; DE GROOT *et al.*, 2001; MATTHEWS; MATTHEWS, 2011; PIYA *et al.*, 2010). Além disso, sabe-se que o crescimento emergente do DM é impulsionado por efeitos combinados do envelhecimento populacional, níveis crescentes de obesidade e sedentarismo (VAN DIEREN *et al.*, 2010). Neste contexto, o Brasil encontra-se entre os 10 países com mais casos confirmados de DM no mundo, evidenciando a importância dos estudos envolvendo esta patologia (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2003).

Estudos realizados na China, Canadá, Estados Unidos da América e Europa indicam que intervenções que visem alterar o estilo de vida no mundo podem prevenir o início do DM em pessoas consideradas de alto risco (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2003). Logo, sabe-se que a modificação do estilo de vida sedentário, a prática frequente de exercícios físicos, o cessamento do tabagismo, a perda de peso e a utilização de medicamentos como metformina (que diminui problemas cardiovasculares), tiazolidinedionas - TZD (que melhoram o SI e diminuem a glicemia) e inibidores do sistema renina-angiotensina aldosterona (RAAS, que diminuem a produção de óxido nítrico), são medidas fundamentais para melhorar o SI, ou prevenir a IR (WANG *et al.*, 2004).

Naturalmente, as células dos mamíferos necessitam de captar glicose, sendo que grande parte da glicose circulante no estado pós-absortivo é captada por órgãos não dependentes da insulina, entre eles o cérebro (50%) e os órgãos esplênicos

(25%). Já o restante (25%) é utilizado em tecidos sensíveis à insulina, principalmente músculo esquelético (DEFRONZO, 1997), que representa aproximadamente 40% da massa corporal total (SMITH; MUSCAT, 2005).

A insulina é um hormônio polipeptídico anabólico produzido pelas células beta pancreáticas, cuja síntese é ativada pelo aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos, principalmente após as refeições. Seus efeitos metabólicos imediatos incluem: aumento da captação de glicose, principalmente nos tecidos muscular e adiposo, aumento da síntese proteica, ácidos graxos e glicogênio, bem como bloqueio da lipólise, da proteólise e da produção hepática de glicose (via diminuição da neoglicogênese e glicogenólise) (SAAD; ZECCHIN, 2011). Além disso, a insulina tem efeitos na expressão de genes, assim como na proliferação e diferenciação celulares, prevenção de apoptose celular e o controle da ingestão alimentar. Este hormônio age em vários tecidos periféricos por meio das interações com receptores celulares específicos (SAAD; ZECCHIN, 2011). O receptor insulínico (RI) é uma molécula receptora específica para a insulina e localiza-se na membrana plasmática de várias células, incluindo miócitos, adipócitos e hepatócitos. Quando o RI é ativado pela insulina, desencadeia-se uma cascata de fosforilações e desfosforilações que causam diversos efeitos metabólicos, dentre eles, a captação de glicose (KAPLAN, 1984) (Figura 1).

O RI está presente em praticamente todos os tecidos dos mamíferos, com concentrações que variam de 40 receptores nos eritrócitos circulantes até mais de 200.000 receptores nas células adiposas e hepáticas (WHITE *et al.*, 1985). Foram constatadas em células humanas e de roedores que o receptor insulínico possui peso molecular de aproximadamente 480 kDa e é heterotetramétrico, ou seja, possui quatro subunidades: duas subunidades alfa (α) e duas subunidades beta (β), ligadas por pontes dissulfeto e interagindo de maneira que, na ausência de insulina, a subunidade α inibe a atividade tirosina quinase da subunidade β (BAJAJ *et al.*, 1987; KASUGA *et al.*, 1982a, 1982b; MASSAGUE *et al.*, 1980; PATTI; KAHN, 1998; ULLRICH; SCHLESSINGER, 1990). Em 1985, foram reportados os clones de dois diferentes grupos de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) do RI. Este estudo permitiu aventar que as subunidades do RI apresentavam possível atividade tirosina quinase autofosforilativa (EBINA *et al.*, 1985). A partir dessa descoberta, pôde-se afirmar que as subunidades do RI pertencem a uma subfamília de

receptores tirosina quinase, à qual também pertence o fator de crescimento relacionado à insulina (IGF-I), altamente homólogo ao RI (PATTI; KAHN, 1998).

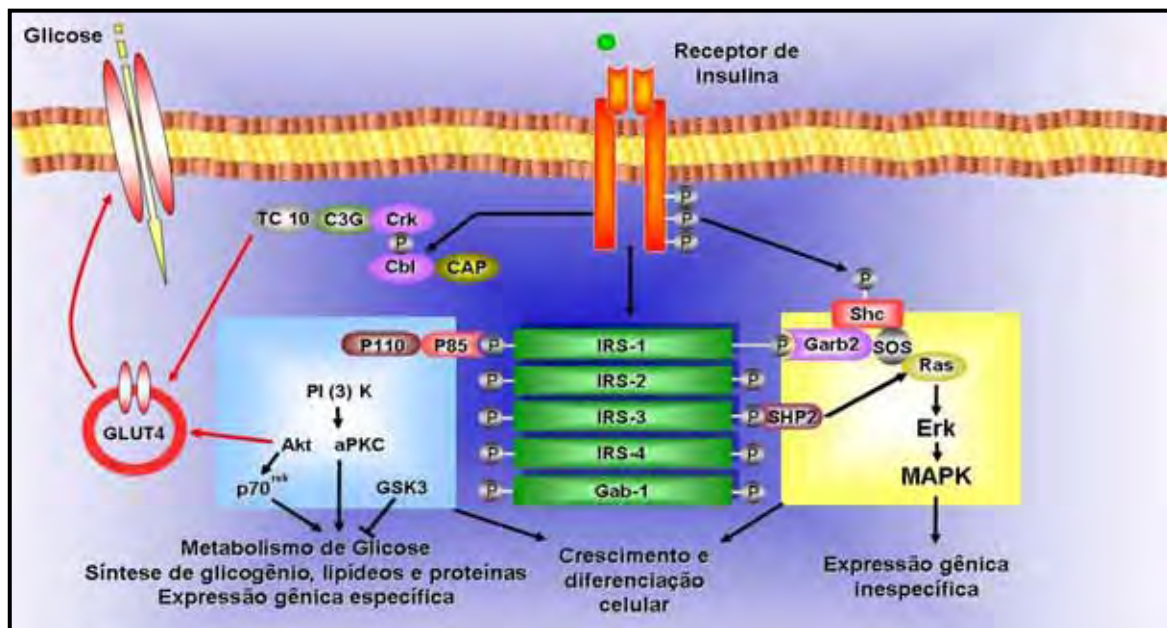


FIGURA 1 - As vias de sinalização insulínica. O receptor de insulina é uma tirosina quinase que se autofosforila e catalisa a fosforilação de proteínas intracelulares, como as proteínas substrato do receptor de insulina (IRS). Após a fosforilação, essas proteínas se ligam a outras moléculas de sinalização por meio de seus domínios SH2, resultando na ativação de vias de sinalização intracelular como a via da PI3K, que, entre outras funções, regula o transporte de glicose (CARVALHEIRA *et al.*, 2002).

A subunidade α do receptor insulínico é inteiramente extracelular e contém o sítio de ligação da insulina, com peso molecular aproximado de 135 kDa. Já a subunidade β do receptor insulínico ($R\beta$) é uma proteína transmembrânica e possui peso molecular próximo de 95 kDa (KASUGA *et al.*, 1982a, 1982b). A ligação da insulina à subunidade α permite o cessamento da inibição à subunidade β , fazendo com que esta subunidade adquira atividade quinase, com consequente alteração de conformação e autofosforilação, aumentando ainda mais a sua atividade tirosina quinase (PATTI; KAHN, 1998). A partir deste processo, a subunidade β funciona como transdutora do SI e torna-se capaz de fosforilar substratos intracelulares do receptor de insulina (IRS) em resíduos de tirosina (KASUGA *et al.*, 1982a, 1982b).

Na literatura, são descritos pelo menos dez substratos intracelulares de receptores quinase, sendo quatro identificados como IRS. O primeiro substrato foi relatado em 1985, descrito como pp185 devido à sua mobilidade eletroforética em

gel de poliacrilamida (WHITE *et al.*, 1985). Posteriormente, Sun *et al.* (1991) clonaram esta proteína e nomearam-na de substrato-1 do receptor de insulina ou IRS-1. Em 1994 foi identificada outra proteína, com 190 kDa, que demonstrou ser rapidamente fosforilada em tirosina devido à ação da insulina, sendo denominada de IRS-2 (ARAKI *et al.*, 1994; SUN *et al.*, 1995; TAMEMOTO *et al.*, 1994). Embora altamente homólogas, as proteínas IRS possuem funções complementares, ao invés de redundantes. Nesse sentido, descobriu-se que o camundongo *knockout* para IRS-1 apresenta IR e retardo de crescimento, mas não é hiperglicêmico (ARAKI *et al.*, 1994; TAMEMOTO *et al.*, 1994). Este fato pode ser explicado porque o IRS-2 compensaria parcialmente a ausência de IRS-1, o que explicaria o fenótipo destes animais com IR, mas sem hiperglicemia (ARAKI *et al.*, 1994; TAMEMOTO *et al.*, 1994). Já o camundongo *knockout* para o IRS-2 foi gerado por Withers *et al.* (1998) e apresenta fenótipo diferente do camundongo *knockout* para o IRS-1: hiperglicemia acentuada devido à ação insulínica anormal nos tecidos e à falência da atividade secretória das células β pancreáticas devido à redução significativa da massa destas células. As funções dos IRS-3 e IRS-4 são menos elucidadas, mas alguns dados sugerem que estes substratos podem atuar como reguladores negativos dos IRS-1 e IRS-2 (TSURUZOE *et al.*, 2001). Porém, como os camundongos *knockout* de IRS-3 e IRS-4 têm crescimento e metabolismo de glicose semelhantes aos camundongos selvagens (FANTIN *et al.*, 2000), destacam-se os IRS-1 e IRS-2 devido à sua função essencial na transmissão do SI, sendo que a fosforilação destes substratos em tirosina permite o efeito pleiotrópico da insulina (HABER *et al.*, 2001). Posteriormente, Cai *et al.* (2003) descobriram dois novos substratos do receptor de insulina, o IRS-5 e o IRS-6, que não possuem capacidade em associar-se à enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), fundamental para a continuidade do SI envolvido na captação de glicose. Portanto, pode-se afirmar que os diferentes IRS possuem funções distintas nas células, provavelmente devido às variações da quantidade destes substratos nos tecidos, da localização intracelular e da atividade intrínseca de cada substrato (ARAKI *et al.*, 1994; TAMEMOTO *et al.*, 1994).

Os IRS podem apresentar sítios de fosforilação com domínios tirosina de ordem YMXM ou YXXM, onde Y significa tirosina, M simboliza metionina e X representa um aminoácido qualquer (CHEATHAM; KAHN, 1995; WHITE, 1997; WHITE; KAHN, 1994). A fosforilação em tirosina das proteínas IRS cria sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios homólogos às Src-2 e 3

(SH2/SH3), específicos para fosfotirosina. Dentre as proteínas que apresentam SH2 e SH3, destaca-se a PI3K (HABER *et al.*, 2001; FOLLI *et al.*, 1992). A PI3K contém dois sítios SH2, um sítio SH3 (SYRJÄNEN *et al.*, 1989) e é classificada como serina/treonina quinase com função importante no transporte de glicose estimulado pela insulina (FARESE, 2001; MÁRTON, 2004; MATTILA *et al.*, 1989). Além do envolvimento no SI, evidências sugerem que a PI3K também desempenha papel central em outras respostas celulares, incluindo crescimento e diferenciação celular (CARPENTER; CANTLEY, 1996; TOKER; CANTLEY, 1997), síntese e degradação de carboidratos, lipídios e proteínas (HOLMAN; KASUGA, 1997; NAVÉ *et al.*, 1996), ativação das plaquetas (RITTENHOUSE, 1996), organização do citoesqueleto, motilidade celular (CARPENTER; CANTLEY, 1996; TOKER; CANTLEY, 1997) e transporte de membrana (DE CAMILLI *et al.*, 1996; HOLMAN; KASUGA, 1997).

A PI3K foi originalmente identificada como um dímero composto de uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade regulatória (p85). A ligação dos sítios YMXM e YXXM ao domínio SH2 da subunidade p85 da PI3K ativa o domínio catalítico associado da subunidade p110 presente nesta proteína quinase (WHITE; KAHN, 1994) e, conseqüentemente, um domínio catalítico é ativado, acionando-se a fosforilação do fosfatidilinositol (PI), do fosfatidilinositol-4-fosfato (PI-4P) e do fosfatidilinositol-4,5-difosfato (PI-4,5P2) (MÁRTON, 2004; MATTILA *et al.*, 1989), sendo este convertido à fosfoinosítideo fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato ou PIP3 (CHOU *et al.*, 1998; LE GOOD *et al.*, 1998). Por sua vez, a proteína PIP3 ativada pode induzir a ativação de outros polímeros, entre eles, a proteína quinase-1 dependente de fosfoinosítideo (PDK1). A PDK1 controla: a fosforilação da proteína quinase C nas isoformas zeta (ζ) e lambda (λ) (PKC ζ/λ) (CHOU *et al.*, 1998; LE GOOD *et al.*, 1998), a fosforilação da PKC-relacionada à quinase-1 (PRK-1 ou PKN) e a fosforilação da proteína quinase B (PKB ou Akt) (ALESSI *et al.*, 1997; COFFER; WOODGETT, 1991; FARESE, 2001). Três isoformas de Akt/PKB ativadas pela fosforilação em treonina e serina podem ser identificadas: Akt/PKB α é a isoforma principal, ativada pela insulina no músculo e no fígado e a Akt/PKB β que, juntamente com a Akt/PKB α , coordena o SI em adipócitos. A isoforma Akt/PKB γ não tem ativação insulínica comprovada em miócitos, hepatócitos ou adipócitos, embora seja ativada pela insulina na maioria dos modelos de cultura celular (WALKER *et al.*, 1998).

As proteínas PKC e Akt/PKB atuam juntamente à PI3K no transporte de glicose para a célula, por meio de controle da translocação do transportador de glicose-4 responsivo à insulina (GLUT4), que parte do retículo endoplasmático em direção à membrana plasmática quando na ativação estimuladora do SI (FARESE, 2001). Já na ausência do estímulo hormonal ou na ocorrência de estímulo inibidor, a maior porção do GLUT4 encontra-se em vesículas citoplasmáticas (DANDONA *et al.*, 2004; HOTAMISLIGIL *et al.*, 1996). Além de fosforilar a Akt/PKB, há evidências de que a PDK-1 seja capaz de, em resposta à insulina, fosforilar isoformas atípicas da PKC ζ/λ envolvidas na síntese proteica e no transporte de GLUT4 para a membrana celular a fim de promover a captação de glicose. Isso permite aventar que o transporte de glicose pode ser mediado por diferentes vias de sinalização intracelular (Akt e PKC ζ/λ). Essa diversidade de sinalização pode proporcionar mecanismos compensatórios em casos de mutações afetando a Akt/PKB ou isoformas da PKC (SAAD; ZECCHIN, 2011).

O mecanismo exato enredado na origem da alteração no SI em indivíduos com IR não está elucidado em sua totalidade (DANDONA *et al.*, 2004; HOTAMISLIGIL *et al.*, 1996; TSUKUMO *et al.*, 2007; WAKI; TONTONOZ, 2007). Sabe-se que determinadas infecções locais podem exercer papel inibitório no mecanismo molecular do SI e, tanto a LP como a DP, são consideradas patologias orais inflamatórias com capacidade para produzir citocinas com poder migratório para a circulação sistêmica (ASTOLPHI *et al.*, 2012; BAIN *et al.*, 2009; SOSKOLNE; KLINGER, 2001; ZHANG *et al.*, 2011).

A inflamação periapical advém da LP, que ocorre como consequência de vários insultos à polpa do dente, incluindo a infecção, traumas físicos, fatores iatrogênicos e, inclusive, terapia endodôntica mal sucedida (STASHENKO *et al.*, 1998). Quando induzida por meio de broca, esta inflamação representa uma resposta do sistema imune contra microrganismos que invadem e destroem a polpa dentária (STASHENKO *et al.*, 1994). Nesse sentido, existem vários caminhos que permitem a invasão da polpa por bactérias, sendo que o processo cariogênico corresponde ao principal meio pelo qual os microrganismos adentram o canal pulpar (STASHENKO *et al.*, 1998). Mesmo quando não há exposição do canal, a própria periodontite pode acarretar em contaminação do tecido pulpar e gerar pulpíte encapsulada, ou seja, sem exposição de polpa. Entretanto, quando há exposição, a polpa é rapidamente invadida por microrganismos da cavidade oral (BAGG *et al.*,

2006; BRUNO *et al.*, 2009). Primeiramente, ocorre contaminação predominantemente por microrganismos aeróbios facultativos e, após mudança microbiana devido ao ambiente pulpar, prevalecem os microrganismos anaeróbios gram-negativos (BARTHEL *et al.*, 1997; SUNDQVIST, 1992). A parede celular dos microrganismos gram-negativos possui endotoxinas denominadas lipopolissacarídeos (LPS) compostas por polissacarídeos, lipídeos e proteínas (RAETZ, 1993; WOLFF, 1973).

A regulação imune da inflamação periapical é extremamente complexa e envolve fatores derivados do hospedeiro, incluindo componentes imunológicos como, por exemplo, anticorpos, sistema complemento, citocinas, metabólitos do ácido araquidônico e neuropeptídeos (STASHENKO *et al.*, 1998). É importante considerar que a resposta inflamatória e o subsequente processo de reparo tecidual em polpas dentárias podem ser influenciados por diversos fatores como, por exemplo, o tipo e a duração da infecção (HAHN *et al.*, 1989; HAHN; LIEWEHR, 2007), lesões traumáticas dentárias (BRUNO *et al.*, 2009) e mudanças relacionadas à idade (TRANASI *et al.*, 2009). Massler e Pawlak (1977) relataram pioneiramente que pacientes com polpas inflamadas e não expostas apresentam dor aguda severa. Entretanto, os dentes com polpas expostas, contaminadas e necróticas podem gerar dor em menor intensidade, já que não há acúmulo de gases pressionando terminações nervosas sensíveis à dor (MASSLER; PAWLAK, 1977).

O tratamento da LP consiste em controlar a microbiota e restabelecer as condições necessárias para permitir a correta execução das funções vitais da polpa (BERGENHOLTZ; SPÅNGBERG, 2004). Segundo Consolaro (2008), o sucesso do tratamento endodôntico de dentes com necrose pulpar e LP crônica pode variar de 60 a 70%, nos quais costuma ocorrer regressão da lesão ao longo de alguns meses após o tratamento. O processo de ossificação e reorganização tecidual periodontal apical inicia-se assim que o tratamento endodôntico adequado é concluído. Após esse processo, espera-se que o exsudato inflamatório seja reabsorvido em alguns dias pelas células inflamatórias juntamente com restos teciduais, celulares e microbianos. Então, em dias ou semanas, as células inflamatórias dão lugar às células jovens e proliferantes advindas dos tecidos vizinhos, como o ligamento periodontal e o endóstio. Estima-se que, ao longo de 3 a 4 semanas, o tecido esteja em franco processo de reorganização estrutural e o componente inflamatório

reduzido a pequenos focos com a finalidade de limpeza destas regiões (CONSOLARO, 2008).

De acordo com a intensidade, duração do evento iniciador e tipo de modelo experimental, a LP pode se desenvolver de maneira crônica ou aguda (Márton e Kiss, 2000). Stashenko *et al.* (1994) revelaram que a LP exposta em todos os molares de ratos da linhagem “Sprague-Dawley” expande-se rapidamente nos primeiros 7 a 20 dias após a indução (fase aguda) e desacelera a partir deste período (fase crônica). Já em um estudo utilizando ratos “Wistar” não diabéticos com LP induzida por meio de exposição pulpar em primeiro e segundo molares superiores direitos, relata-se que esta lesão, após duas semanas, inicia sua fase crônica (BAIN *et al.*, 2009). Sabe-se que os tipos celulares presentes na LP são compostos principalmente por neutrófilos (STASHENKO *et al.*, 1994; YAMASAKI *et al.*, 1994), macrófagos (HAMACHI *et al.*, 1995; STASHENKO *et al.*, 1994), mistura de linfócitos T e B (STASHENKO *et al.*, 1994; TELES *et al.*, 1997), mastócitos (DE OLIVEIRA RODINI *et al.*, 2004), osteoclastos, osteoblastos e fibroblastos (STASHENKO *et al.*, 1994). Segundo Okiji *et al.* (1992) a polpa dental saudável já contém ampla variedade de células imunocompetentes. Porém, durante uma agressão patogênica na polpa decorrente de lesão mecânica, o número dessas células é significativamente aumentado (LUISSI *et al.*, 2004). Nesse caso, é também expresso amplo número de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α (ZHANG *et al.*, 2011), IL-6 (BAIN *et al.*, 2009; BARKHORDAR *et al.*, 1999), IL-1 β (BAIN *et al.*, 2009; MATSUMOTO *et al.*, 1998), IL-1 α (BAIN *et al.*, 2009), IL-8 (GUO *et al.*, 2000) e óxido nítrico (NO) (FELACO *et al.*, 2000). Estas moléculas e citocinas, apesar de terem sido identificadas em exsudatos de tecidos periapicais, podem atingir a circulação geral (ASTOLPHI *et al.*, 2012; BAIN *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2011).

Ao serem disseminadas para a circulação geral, as citocinas podem afetar diversos órgãos (MÁRTON *et al.*, 1988; MÁRTON; KISS, 2000) e, se interferirem negativamente com o SI, podem desencadear a IR (ASTOLPHI *et al.*, 2012; BAIN *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2011) e acarretar na diminuição da fosforilação em tirosina dos IRS, levando à redução da ativação da PI3K (SALTIEL; KAHN, 2001).

É válido ressaltar que a hipótese de que a inflamação pode contribuir para o desenvolvimento da IR teve origem em 1993 com a descoberta de que o tecido adiposo é capaz de produzir o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), uma citocina pró-inflamatória produzida pelas células do sistema imune, mas que, nos casos de

obesidade, pode ser secretada pelos tecidos adiposos subcutâneo e visceral (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1993). A partir deste trabalho, surgiram outros estudos em humanos e animais indicando que a citocina TNF- α age como regulador central no desenvolvimento de IR (FERNÁNDEZ-REAL *et al.*, 1998; HOTAMISLIGIL *et al.*, 1993; HOTAMISLIGIL *et al.*, 1996; MONTANI *et al.*, 2002; UYSAL *et al.*, 1997). Seguindo esta linha de raciocínio, sabe-se que camundongos *knockout* para TNF- α permanecem sensíveis à insulina mesmo quando obesos (UYSAL *et al.*, 1997). Ainda, a infusão de TNF- α leva à redução da autofosforilação do receptor insulínico e inibição subsequente da fosforilação dos IRS (FEINSTEIN *et al.*, 1993; HOTAMISLIGIL *et al.*, 1996; KRODER *et al.*, 1996). Já a neutralização do receptor para TNF- α (TNFR) por meio de imunoglobulinas G (IgG) em ratos obesos pode resultar em melhora do SI (CHEUNG *et al.*, 1998; HOTAMISLIGIL *et al.*, 1993). O TNF- α pode induzir fosforilação dos IRS em serina (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1996; KANETY *et al.*, 1995), fazendo com que a fosforilação destes substratos em tirosina fique comprometida, ocasionando a diminuição da transdução do SI (SHOELSON *et al.*, 2003). Sabe-se que, ao contrário da fosforilação em tirosina, a fosforilação em serina bloqueia a sinalização insulínica (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1996). Evidências também sugerem que o TNF- α está associado à baixa expressão de RNA mensageiro do GLUT4 em tecido adiposo, redução da expressão de IRS-1 (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1996; STEPHENS; PEKALA, 1991;) e diminuição da expressão do receptor insulínico, ocasionando diminuição do SI (CINTRA *et al.*, 2008). Na obesidade, além do TNF- α , o aumento da massa de tecido adiposo está associado também à superprodução de interleucina-6 (IL-6) e diminuição de adiponectina, correlacionadas ao aumento e diminuição da IR, respectivamente (ALDHAHI; HAMDY, 2003).

Hansen *et al.* (1998) estudaram possíveis alterações advindas da obesidade, em algumas vias da cascata de sinalização insulínica de músculos epitotrocleares de ratos e comprovaram que, após oito semanas, há redução na translocação de GLUT4 tanto mediada pela insulina como pela contração muscular, sugerindo que há correlação positiva entre obesidade e alteração do SI (HANSEN *et al.*, 1998). Em contrapartida, o exercício físico pode diminuir a circulação sérica dessas citocinas pelo fato de reduzir a massa de tecido adiposo e, portanto, diminuir o risco do desenvolvimento da IR (STARKIE *et al.*, 2003). Para corroborar, outro estudo, realizado em humanos e roedores obesos, demonstra que o grupo exercitado

apresentou diminuição na contagem das citocinas TNF- α e IL-6 (PETERSEN; PEDERSEN, 2005). Além disso, atividades físicas promovem o aumento da adiponectina, que, como citado anteriormente, está associada com a melhora da sensibilidade à insulina (ALDHAHI; HAMDY, 2003). Assim como o TNF- α , a IL-6 também tem sido relacionada ao desenvolvimento de IR. Níveis plasmáticos de IL-6 correlacionam-se positivamente com a obesidade e, conseqüentemente, IR em humanos (KERN *et al.*, 2001; VOZAROVA *et al.*, 2001). Além disso, os níveis elevados de IL-6 também podem reduzir o SI por meio de inibição na translocação do GLUT4 (STRASSMANN *et al.*, 1993).

Considerando que a LP é um problema de saúde pública que requer cada vez mais estudos a fim de elucidar seus efeitos (BAIN *et al.*, 2009), a investigação acerca da possível ligação entre esta doença endodôntica e a saúde sistêmica torna-se um dos aspectos mais importantes estudados pela comunidade científica médica e odontológica (DEMMER *et al.*, 2010; SEGURA-EGEA *et al.*, 2012), pois irá contribuir para um melhor entendimento da relação LP, IR e DM2 (FERNÁNDEZ-REAL; PICKUP, 2012). Dessa forma, é imprescindível que os agentes da saúde atentem para o tratamento das doenças localizadas, como a LP que, como comprovado em estudos anteriores, podem agravar o quadro clínico do paciente (ZHANG *et al.*, 2011). Portanto, considerando que existe ligação entre a circulação bucal e a geral, pode-se questionar se as lesões periapicais podem ativar a resposta inflamatória a ponto de gerar repercussões sistêmicas e, assim, aumentar o risco do surgimento de outras patologias, como, por exemplo, a IR, que está intimamente relacionada com o DM2.

2 OBJETIVOS

Sabendo-se que o processo inflamatório pode ocasionar alteração no sinal insulínico (SI), tornou-se fundamental averiguar se um processo inflamatório local, como a LP “per si”, é capaz de alterar o SI e causar efeitos advindos desta possível alteração. Portanto, no presente projeto foram avaliados: 1) glicemia; 2) insulinemia; 3) colesterolemia e triacilgliceridemia; 4) concentração plasmática de TNF- α e IL-6; 5) resistência à insulina; 6) grau de fosforilação em tirosina da subunidade beta do receptor insulínico (R β); 7) grau de fosforilação em tirosina da pp185 (IRS-1/IRS-2) em músculo esquelético gastrocnêmio (G), tecido adiposo branco (TAB) periepídimal e fígado (F); 8) conteúdos de R β em G, TAB e F e conteúdo de IRS-1 em G e F.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 48 ratos Wistar (230g), mantidos em ambiente de 12/12 horas de claro e escuro (período claro iniciado às 7h) e temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Os ratos foram divididos em dois grupos: 1) ratos controle, sem LP; 2) ratos com lesão pulpar (LP) (Figura 2). O trabalho está de acordo com os Princípios Éticos em Uso de Animais e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (protocolo FOA-0471/11).

Os animais do grupo LP foram anestesiados com associação de Cloridrato de Quetamina (10%, 80mg/ kg de peso corpóreo, intraperitoneal) e Xilazina (2%, 10 mg/ kg de peso corpóreo, intraperitoneal), e a LP foi induzida por meio de orifício realizado em 1º molar superior direito com auxílio de broca em aço carbono (Broca Long Neck - Maillefer, Dentsply, Terezópolis, RJ, Brasil) dotada de esfera na extremidade com 0,1mm de diâmetro, acoplada à caneta de baixa rotação. Salientamos que a exposição pulpar realizada por meio da abertura da cavidade pulpar com brocas normalmente não induz à dor. Em trabalho recente, Bain *et al.* (2009) publicaram que não há diferença nos níveis de cortisol entre ratos saudáveis e aqueles com LP, indicando ausência de estresse decorrente de uma possível hiperalgesia. O fator fundamental para não tornar o processo agudo é a cavidade pulpar permanecer realmente aberta e livre de detritos, como pelos e ração. Por isso, os animais foram acompanhados diariamente. Após a indução da LP, foram avaliados, três vezes por semana, a ingestão de ração e o peso corporal dos ratos de ambos os grupos. Após 30 dias da indução da LP, os experimentos foram realizados. Todos os procedimentos experimentais foram realizados em ratos LP e CN submetidos a uma privação alimentar prévia de 14 horas e anestesiados com tiopental sódico (Thiopentax® - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, Brasil, 3%, 5mg/ 100g peso corpóreo, intraperitoneal).

Coletou-se sangue dos animais (n=10) do grupo CN e LP por punção intracardíaca. As amostras de sangue foram transferidas para tubos de plástico heparinizados e centrifugadas (4000 rpm, 4°C , 15 minutos). O plasma obtido foi aliquoteado e armazenado à -70°C até o dia da avaliação das concentrações plasmáticas de glicose, insulina, colesterol total, colesterol HDL (HDL-C), triglicérides, TNF- α e IL-6. Em seguida os animais foram eutanasiados por dose

excessiva do anestésico tiopental sódico (Thiopentax[®] - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, Brasil, 3%, 5mg/ 100g peso corpóreo, intraperitoneal).

Outro grupo de ratos (n=8) CN e LP foi submetido ao teste endovenoso de tolerância à insulina (ITT). Em seguida, os animais foram eutanasiados por dose anestésica excessiva de tiopental sódico (Thiopentax[®] - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, Brasil, 3%, 5mg/ 100g peso corpóreo, intraperitoneal).

Por último, um grupo de ratos (n=6) CN e LP foram utilizados para quantificar, em tecidos responsivos à insulina: 1) o grau de fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina (pp185 - IRS-1/IRS-2), após estímulo insulínico; 2) os conteúdos do receptor de insulina (R β) e de IRS-1. Nestes experimentos, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (Thiopentax[®] - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, Brasil, 3%, 5mg/ 100g peso corpóreo, intraperitoneal), realizando-se em seguida: laparotomia mediana, com retirada de amostras dos tecidos antes e após a injeção de 1,5 U de insulina regular (intravenosa pela veia porta) em tempos variáveis (30 segundos para fígado, 90 segundos para o gastrocnêmio e 120 segundos para o tecido adiposo branco periepídidimo), seguindo protocolo de acordo com Saad *et al.* (1993). Em seguida, os animais foram eutanasiados por dose anestésica excessiva utilizando tiopental sódico (Thiopentax[®] - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, Brasil, 3%, 5mg/ 100g peso corpóreo, intraperitoneal).

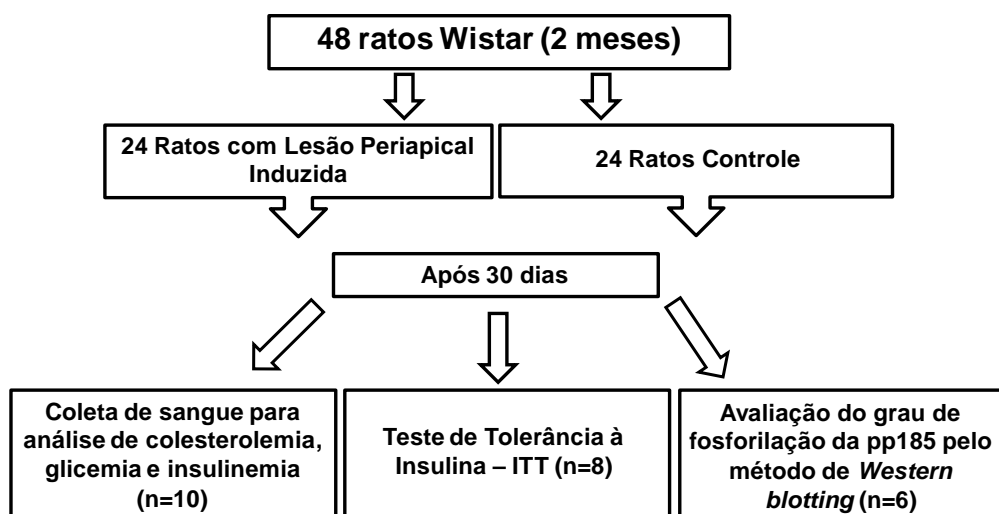


FIGURA 2 - Esquema representativo da metodologia utilizada no presente trabalho.

3.2 Análise histopatológica

Para a análise histopatológica, 05 animais de cada grupo (LP e CN) foram selecionados aleatoriamente, 30 dias após a exposição pulpar. As hemimaxilas direitas foram retiradas e embebidas em formaldeído 4% por 48 horas. Após a desmineralização com EDTA 18% (aproximadamente 01 mês), as amostras foram embebidas em parafina. Foram feitos cortes sequenciais com 6- μ m de espessura dos aspectos mesial-distal de todo o primeiro molar superior direito, e os cortes foram corados com hematoxilina e eosina. Estudos morfológicos foram realizados na área periapical.

3.3 Determinação da glicemia (método de glicose-oxidase)

A glicemia foi determinada pelo método da glicose-oxidase, um método enzimático específico para quantificação de glicose (Enzymatic glucose, ANALISA Diagnóstica, Belo Horizonte, Brasil). Neste teste, a glicose é oxidada enzimaticamente pela glicose oxidase, gerando ácido glucônico e água oxigenada (H_2O_2). A H_2O_2 , em presença de peroxidase, produz a ligação oxidativa do fenol com a 4-aminoantipirina, dando origem a um composto róseo-avermelhado (quinonimina), com máximo de absorção em 505 nm de comprimento de onda.

Para a dosagem de glicemia foram utilizados 10 μ L da amostra de plasma ou de padrão (100 mg/dl) e 1,0 mL de reagente enzimático. Essa solução foi bem homogeneizada e colocada em banho-maria a 37°C durante 15 minutos. As absorbâncias do teste e do padrão foram determinadas em 505 nm, acertando o zero com o branco.

Cálculos

Glicose (mg/dl) = (Absorbância do teste \div Absorbância do padrão) x 100

Glicose (mmol/L) = mg/dl x 0,0556

3.4 Determinação de insulinemia

A insulinemia foi quantificada pelo método de radioimunoensaio – RIE (Coat-A-Count, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, EUA). Em resumo, trata-se de uma reação de competição entre antígenos (insulina fria e insulina marcada) para ligação a um anticorpo específico. Essa reação obedece à lei da ação de massas. Portanto, quanto mais insulina fria presente, ocorrerá maior formação do complexo

insulina fria-anticorpo, acarretando em queda na quantidade de complexo insulina marcada-anticorpo.

3.7 Determinação da concentração plasmática de colesterol total

A concentração plasmática de colesterol total foi determinada pelo método de colesterol oxidase (Katal Biotecnológica Ind. Com. Ltda., Belo Horizonte, Brasil), que é um método enzimático específico desta análise, na qual os ésteres de colesterol da amostra são hidrolisados pela colesterol esterase, produzindo colesterol livre. Este, em presença da colesterol oxidase e de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio que, pela ação da peroxidase em presença de fenol e 4-aminoantipirina, produz um composto róseo avermelhado (quinonimina) com máximo de absorção em 500 nm.

Para a dosagem de colesterol total foram utilizados 10 µL da amostra ou de padrão e 1,0 mL de reagente enzimático. Essa solução foi homogeneizada e colocada em banho-maria a 37°C durante 10 minutos. As absorbâncias do teste e do padrão foram determinadas em 500 nm acertando o zero com o branco.

Cálculos

Colesterol (mg/dL) = (Absorbância do Teste ÷ Absorbância do Padrão) x 200

Colesterol (mmol/L) = mg/dL x 0,0259

3.5 Determinação da concentração plasmática do Colesterol HDL

A determinação da concentração plasmática do colesterol HDL (HDL-C) foi realizada por um método enzimático de precipitação, específico para esta análise (Katal Biotecnológica Ind. Com. Ltda., Belo Horizonte, Brasil). O conjunto Colesterol HDL é um sistema que se destina à separação do colesterol ligado à fração HDL no plasma sanguíneo. A mistura ácido fosfotúngstico/cloreto de magnésio precipita os quilomicrons e as lipoproteínas de baixa densidade (LDL-C) e muito baixa densidade (VLDL-C) sem alterar a solubilidade das lipoproteínas de alta densidade (HDL-C). Após centrifugação, recolhe-se o líquido sobrenadante que contém a fração HDL-C cujo colesterol é determinado enzimaticamente.

Para a dosagem de HDL-C foram utilizados 100 µL da amostra ou de padrão e 1,0 mL de reagente de cor. Essa solução foi bem homogeneizada e colocada em

banho-maria a 37°C durante 10 minutos. As absorvâncias do teste e do padrão são determinadas em 500 nm acertando o zero com o branco.

Cálculos

Colesterol HDL(mg/dL) = (Absorbância do Teste ÷ Absorbância do Padrão) x 40*

*OBS: O valor 40 leva em conta a diluição do soro na etapa de precipitação.

3.6 Determinação da concentração plasmática dos triglicérides

A concentração plasmática dos triglicérides foi determinada pelo método enzimático da glicerol-P-oxidase, específico para quantificação de triglicérides (Katal Biotecnológica Ind. Com. Ltda., Belo Horizonte, Brasil). No presente método, os triglicérides do plasma são hidrolisados pela lipase lipoproteica, produzindo glicerol livre. Este é fosforilado pela glicerol quinase, cujo produto sofre a ação da glicerol-P-oxidase, a qual, em presença de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio, sob a ação da peroxidase em presença de um reagente fenólico (p-clorofenol) e 4-aminoantipirina, produz um composto róseo avermelhado (quinonimina), com máximo de absorção em 500 nm.

Para a dosagem dos triglicérides, foram utilizados 10 µL da amostra ou de padrão e 1,0 mL de reagente de cor. Essa solução foi homogeneizada e colocada em banho-maria a 37°C durante 10 minutos. As absorvâncias do teste e do padrão são determinadas em 500 nm acertando o zero com o branco.

Cálculos

Triglicérides (mg/dl) = (Absorbância do Teste ÷ Absorbância do Padrão) x 200

Triglicérides (mmol/L) = mg/dL x 0,0113

3.7 Determinações das concentrações plasmáticas do LDL-C e VLDL-C

Os valores do colesterol VLDL e colesterol LDL foram obtidos pela equação de Friedewald *et al.* (1972):

Cálculos

VLDL-C (mg/dl) = (Triglicérides (mg/dl)/ 5)

LDL-C (mg/dl) = Colesterol total – (Colesterol HDL + Colesterol VLDL)

3.8 Teste endovenoso de tolerância à insulina (ITT) curto:

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (Thiopentax[®] - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, Brasil, 3%, 5mg/ 100g peso

corpóreo, intraperitoneal). Então, realizou-se a injeção de insulina (Novolin[®], Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca) pela veia peniana ministrada na dose de 0,75U/ kg de peso corpóreo. Amostras de sangue foram colhidas (por secção da cauda) nos tempos: 0 (antes da injeção hormonal), 4, 8, 12, 16 minutos após a injeção de insulina e, em todos os tempos, a glicemia foi mensurada por meio de um monitor de glicemia (Accu-Chek Advantage, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). A velocidade de desaparecimento da glicose (Kitt) foi calculada pela fórmula $\text{Ln}^2/t_{1/2}$. O $t_{1/2}$ da glicose foi calculado de acordo com Bonora *et al.* (1989) a partir da inclinação da curva de regressão mínima durante a fase linear de declínio da concentração plasmática de glicose, ou seja $t_{1/2} = \text{Ln}^2/\text{coeficiente de } x$. Sabe-se que, quanto menor o valor de Kitt, menor é a sensibilidade insulínica.

3.9 Concentrações plasmáticas de citocinas

As concentrações plasmáticas de TNF- α e IL-6 foram determinadas pelo método de *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) com a utilização de kits, seguindo as instruções dos fabricantes. Os kits comerciais utilizados foram respectivamente Biosource International, Camarillo, EUA (para mensurar o TNF- α) e BD Biosciences, San Diego, EUA; Biovador, Heidelberg, Alemanha (para mensurar o IL-6).

3.10 Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina pp185 (IRS-1/IRS-2) e dos conteúdos de R β e de IRS-1

3.10.1 Preparação das amostras para “Western blotting”

Imediatamente após a extração, os tecidos foram homogeneizados em Polytron (24000 rpm durante 10 segundos) em 2 mL de tampão de extração (Tris 100 mM pH 7,5; EDTA 10 mM; SDS 1%; NaF 100 mM; Pirofosfato de Na 10 mM; Ortovanadato de Na 10 mM; 0,1mg/mL Aprotinina) e mantidos em banho-maria (100 °C) durante 10 minutos, transferidos para gelo e, então, centrifugados a 16000g durante 40 minutos (à 4 °C). Do sobrenadante foram retiradas alíquotas para determinação da concentração protéica pelo método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay - Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) e para estoque em tampão

desenvolvido por Laemmli (1970) (azul de bromofenol 0,1%; SDS 10 %; fosfato de sódio 1M pH 7,0; glicerol 50%; DTT 15%).

3.10.2 “Western blotting”

- **“SDS-PAGE”** - (*Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis*):

A primeira etapa do “Western blotting” consistiu na submissão das amostras (185 µg de proteína em cada poço) a uma corrida eletroforética em gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE). Através deste método, foi possível separar proteínas de acordo com seu peso molecular, sem que as unidades protéicas fossem perdidas, permitindo estudos posteriores nessas frações protéicas. Foi utilizado o método desenvolvido por Laemmli (1970) e modificado por Garfin (1990), o qual envolve um sistema descontínuo de dois géis contíguos, mas diferentes em sua composição: o gel de “stacking” (3,39% T, 2,7% C - acrilamida 3,3%; bisacrilamida 0,09%; Tris 25 mM, pH 8,9; EDTA 2,0 mM; SDS 0,1%; TEMED 0.111%; Persulfato de amônio 0,27%) e o gel de resolução (6,16% T, 2,7% C - acrilamida 6%; bisacrilamida 0,16%; Tris 388 mM, pH=6,7; EDTA 2,1 mM; SDS 0,1%; TEMED 0.115%; Persulfato de amônio 0,17%; glicerol 10%). Na montagem, o gel de resolução ficou sob o gel de “stacking”, com orientação vertical, num sistema de câmaras que manteve as porções superiores e inferiores do gel em contato com um tampão de corrida (Tris 50 mM; glicina 375 mM; SDS 0,1%; EDTA 1,8 mM).

No gel de “stacking” foram aplicadas as amostras solubilizadas em tampão de Laemmli. Imediatamente antes da aplicação, as amostras foram fervidas por 4 minutos. A eletroforese foi realizada em equipamento para minigel da *Bio Rad* (Mini-Protean, Bio Rad Laboratories, Richmond, CA. EUA), e começou com a corrida no gel de “stacking” sob voltagem constante em 30 mV até que ocorresse o empacotamento da amostra, o que pôde ser observado na transição dos géis. Posteriormente foi aplicada voltagem constante de 100 V para a corrida no gel de resolução, durante aproximadamente 2 horas.

Juntamente com as amostras, sempre foi colocado um padrão de proteínas de conhecidos pesos moleculares (marcadores).

- **Transferência eletroforética**

Após a separação das frações protéicas no gel de poliacrilamida, foi feita a transferência eletroforética dessas frações para uma membrana de nitrocelulose Hybond-C Super (GE Healthcare Buckinghamshire, Germany).

A transferência foi realizada sob voltagem constante de 100 V, durante 2 horas, à 4°C, utilizando-se o tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, SDS 0,02%).

- **“Immunoblotting”**

Após a transferência eletroforética, foi iniciado o processo de imunodeteção de proteínas específicas, desenvolvido por Kruger e Hammond (1988). A membrana de nitrocelulose foi, primeiramente, incubada na presença de solução bloqueadora (solução basal - SB - NaCl 150 mM; Tris 10 mM; "Tween" 20 0,02%; pH 7,2 - acrescida de 5% de leite desnatado em pó - 0% de gordura) durante 2 horas à temperatura ambiente, e então, lavada com solução basal por três sessões de 10 minutos cada. Em seguida, a membrana foi incubada em solução (SB + 3% de leite desnatado em pó - 0% de gordura) contendo os anticorpos antifosfotirosina (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, EUA), ou anti-IRS-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, EUA) ou anti-R β (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, EUA) por 4 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizadas três lavagens com solução basal, e as membranas foram incubadas em solução (SB + 1% de leite desnatado em pó - 0% de gordura) com segundo anticorpo contendo peroxidase de “horseradish” (“kit’ de quimioluminescência – ECL – GE Healthcare Buckinghamshire, Alemanha), durante 1 hora em temperatura ambiente. Novamente, foram realizadas 3 lavagens das membranas de nitrocelulose com solução basal, com duração de 10 minutos cada lavagem. Após estes procedimentos, as membranas foram levadas até uma câmara escura, onde foi adicionado 1 ml de cada solução de detecção 1 e 2 (do kit de ECL - GE Healthcare Buckinghamshire, Alemanha), e incubou-se por 1 minuto. Por fim, foi drenado o excesso de reagente e a membrana de nitrocelulose foi exposta a filme de RX (Hyperfilm ECL– GE Healthcare Buckinghamshire, Alemanha) dentro de um cassete para autorradiografia (GE Healthcare Buckinghamshire, Alemanha) à prova de luz, durante 10 minutos, em temperatura ambiente. O filme foi processado com solução

reveladora e reforçadora GBX (Kodak Brasileira, São Paulo, Brasil) e solução fixadora e reforçadora GBX (Kodak Brasileira, São Paulo, Brasil).

A intensidade dos "blots" foi avaliada por densitometria óptica, utilizando-se o programa *Scion Image* (Scion Image-Release Beta 3b, NIH, Frederick, MD, EUA).

3.11 Análise Estatística

Duas análises estatísticas foram realizadas:

1) Para o sinal insulínico:

A normalidade do conjunto de dados analisados foi verificada. As análises estatísticas foram realizadas por análise de variância, seguida pelo teste de correção de Tukey quando a análise de variância sugeriu uma diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas com os programas estatísticos BioEstat 5.0 (BioEstat 5.0, Pará, Brasil) e SAS (SAS System, v. 9.2. SAS Institute Inc, Cary, North Carolina, USA).

2) Para a análise das concentrações plasmáticas do peso corpóreo, ingestão alimentar, glicose em jejum, insulina, citocinas, ensaios lipídicos e valores do K_{itt} :

As análises estatísticas foram analisadas pelo teste t de Student. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Todos os valores foram apresentados como média \pm EPM.

4 RESULTADOS

4.1 Análise histológica da inflamação

Os ratos CN apresentaram aspectos normais da inserção periodontal na região periapical. Por outro lado, observou-se orifício na região coronária causado pela broca, necrose pulpar e lesão periapical estabelecida, com presença de infiltrado inflamatório, nos cortes histológicos obtidos 30 dias após a indução da pulpíte experimental em ratos com lesão periapical (LP) (Figura 3).

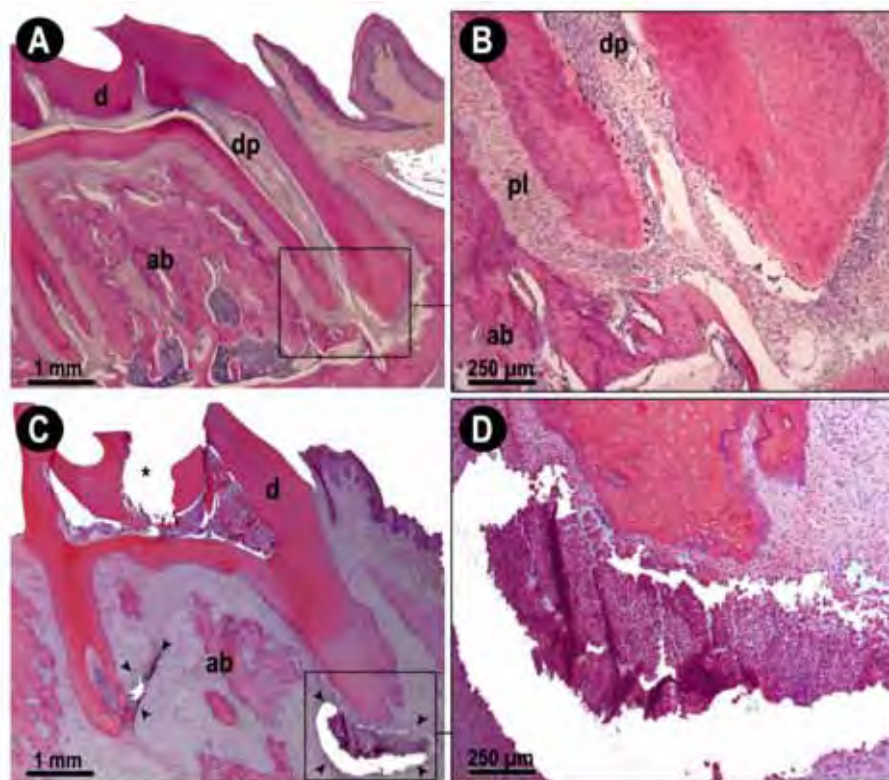


FIGURA 3 - Fotomicrografias de molar saudável (controle-CN) e molar com lesão periapical (LP) após 30 dias. Em A e B são exibidos aspectos normais da inserção periodontal na região periapical. C e D representam vista panorâmica de molar com LP, evidenciando abertura coronária (asterisco), necrose pulpar e lesão periapical estabelecida, com presença de infiltrado inflamatório, desorganização do ligamento periodontal e extensa área de reabsorção óssea. Abreviaturas e símbolos: setas pretas, infiltrado inflamatório; d, dentina; dp, polpa dental; ab, osso alveolar; pl, ligamento periodontal; *, abertura coronária realizada por broca.

4.2 Peso corpóreo e ingestão alimentar:

Os ratos com LP não apresentaram diferença tanto no peso corpóreo (Figura 4) como na ingestão alimentar (Figura 5) em relação aos ratos CN, desde a indução da lesão periapical até a realização dos experimentos.

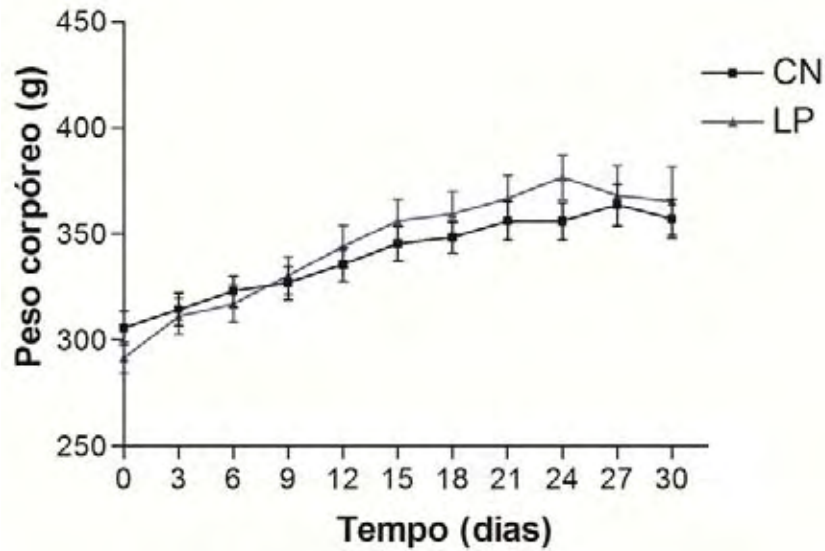


FIGURA 4 - Peso corpóreo dos ratos-controle (CN) e ratos com lesão periapical (LP) durante 30 dias. Os valores são expressos como média \pm EPM, n = 10.

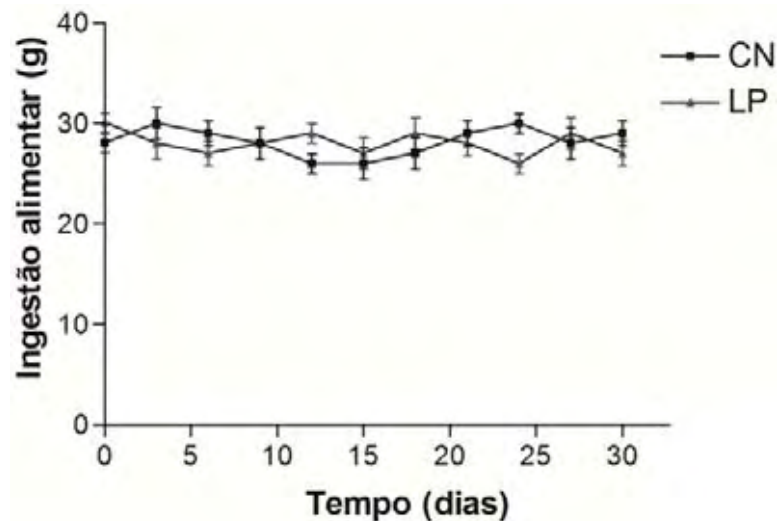


FIGURA 5 - Ingestão alimentar de ratos-controle (CN) e ratos com lesão periapical (LP) durante 30 dias. Os valores são expressos como média \pm EPM, n=10.

4.3 Glicemia, Insulinemia e Lipidemia em jejum

Não foram observadas diferenças nas concentrações plasmáticas de glicemia, insulinemia, colesterol total, triglicérides, colesterol HDL, colesterol LDL e Colesterol VLDL nos ratos do grupo LP em relação aos ratos do grupo CN (Tabela 1).

Tabela 1 - Glicemia, Insulinemia e Lipidemia em jejum dos ratos-controle (CN) e ratos com lesão periapical (LP)

	CN	LP
Glicemia (mg/dL)	121,4 ± 7,46	119,2 ± 5,13
Insulinemia (μIU/mL)	9,824 ± 3,20	9,479 ± 4,96
Colesterol Total (mg/dl)	68,79 ± 3,84	61,50 ± 2,02
Triglicérides (mg/dl)	77,29 ± 8,98	61,14 ± 12,76
Colesterol HDL (mg/dl)	19,86 ± 1,30	17,57 ± 0,72
Colesterol LDL (mg/dl)	33,31 ± 2,30	33,17 ± 2,64
Colesterol VLDL (mg/dl)	15,46 ± 1,80	12,23 ± 2,55

Valores expressos como média ± EPM, n=10.

4.4 Teste de tolerância à insulina (ITT)

Calculou-se a taxa de desaparecimento da glicose (Kitt) durante o teste de tolerância à insulina (ITT). O grupo LP apresentou uma taxa de decaimento da glicose (Kitt) menor ($p < 0.05$) em relação ao grupo CN (Figura 6).

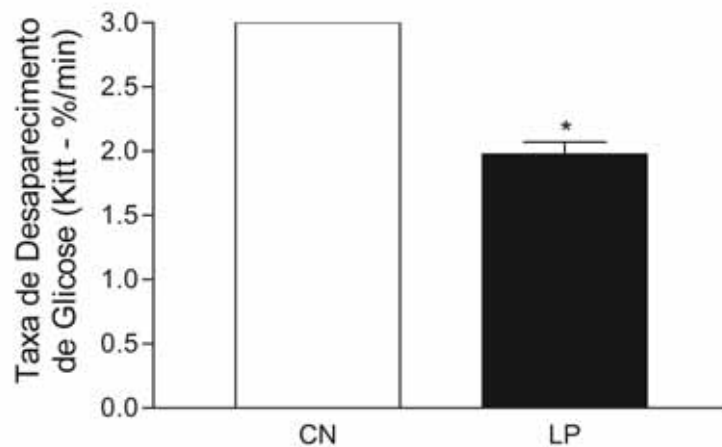


FIGURA 6 - Velocidade de desaparecimento da glicose (Kitt) em ratos do grupo controle (CN) e do grupo com lesão periapical (LP). Os animais foram submetidos ao teste de tolerância à insulina (0,75U / kg de peso corpóreo) e as amostras foram coletadas nos tempos 0 (basal), 4, 8, 12, 16 minutos após a injeção de insulina. O Kitt foi calculado como descrito em Materiais e Métodos e os valores são expressos como média \pm EPM, $n = 10$. * $p < 0,05$ para CN vs. LP.

4.5 Concentrações plasmáticas de TNF- α e IL-6

Em relação às citocinas estudadas, observou-se aumento apenas nas concentrações plasmáticas de TNF- α no grupo LP em relação ao CN. As concentrações plasmáticas de IL-6 não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 2 - Concentrações plasmáticas de TNF- α e IL-6 nos ratos-controle (CN) e ratos com lesão periapical (LP)

	CN	LP
TNF- α (pg/ml)	4,61 \pm 0,55	7,19 \pm 0,62*
IL-6 (pg/ml)	10,86 \pm 0,44	11,44 \pm 0,31

Valores expressos como média \pm EPM, n=8. *p< 0,05 CN vs. LP.

4.6 Avaliação do grau de fosforilação em tirosina da subunidade beta do receptor de insulina (R β) no tecido adiposo branco periepídidimo e fígado

Em análise intragrupos, observou-se aumento no grau de fosforilação em tirosina do RI após o estímulo insulínico com relação ao estado basal tanto em tecido adiposo branco como em fígado. Em análise intergrupos, após estímulo insulínico, o grau de fosforilação em tirosina do RI foi reduzido ($p < 0.05$) no grupo LP em relação ao grupo CN em ambos os tecidos (Figura 7).

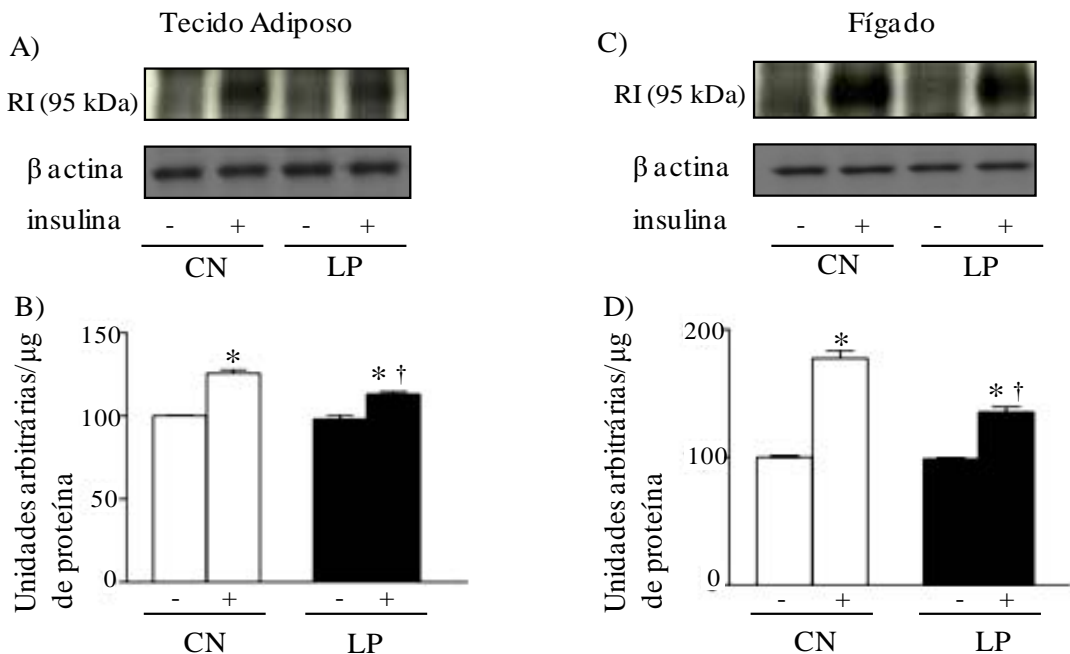


FIGURA 7 - Avaliação do grau de fosforilação em tirosina da subunidade beta do receptor de insulina (R β) antes (-) e após (+) o estímulo insulínico no tecido adiposo branco periepídidimo (A, B) e fígado (C, D) de ratos-controle (CN) e de ratos com lesão periapical (LP). Em **A** e **C** autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 μ g). β -actina foi utilizada como controle. Em **B** e **D**, valores do grau de fosforilação em tirosina do RI, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média \pm EPM, n=6.

* $p < 0,05$ insulina (-) vs. insulina (+);

† $p < 0,05$ CN (+) vs. LP (+).

4.7 Avaliação do conteúdo do receptor de insulina - subunidade β ($R\beta$) no tecido adiposo branco periepídidimo, músculo esquelético gastrocnêmio e fígado

Não houve diferença no conteúdo de $R\beta$ entre os grupos CN e LP em todos os tecidos estudados (Figura 8).

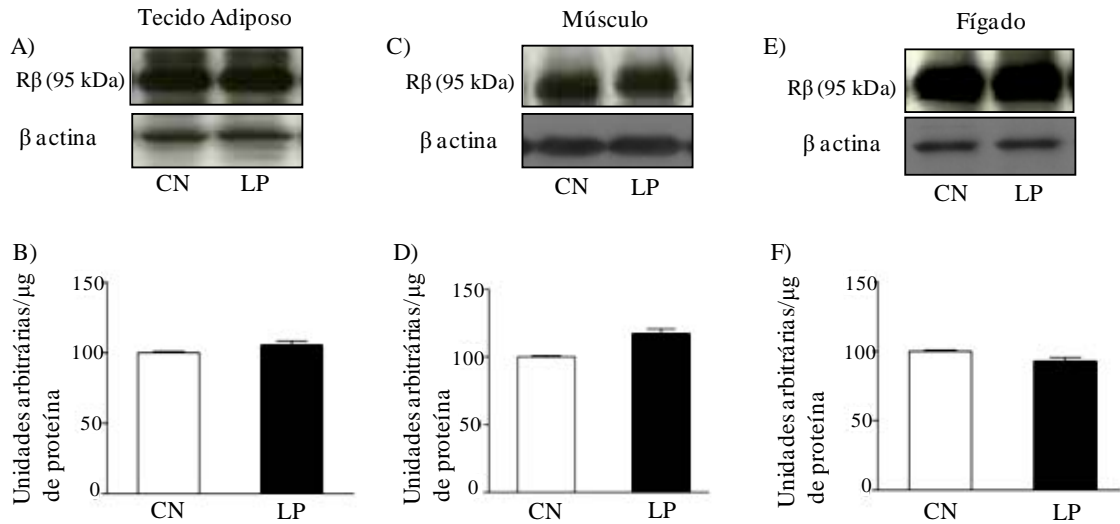


FIGURA 8 - Avaliação do conteúdo da subunidade β do receptor de insulina ($R\beta$) no tecido adiposo branco periepídidimo (A, B), músculo gastrocnêmio (C, D) e fígado (E, F) de ratos-controle (CN) e de ratos com lesão periapical (LP). Em **A, C e E** autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 μ g). β -actina foi utilizada como controle. Em **B, D e F**, valores do conteúdo do $R\beta$, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média \pm EPM, $n=6$.

4.8 Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina pp185 (IRS-1/IRS-2) no tecido adiposo branco periepídidimo, músculo esquelético gastrocnêmio e fígado

Em análise intragrupos, observou-se aumento no grau de fosforilação em tirosina da pp185 após o estímulo insulínico com relação ao estado basal entre todos os tecidos estudados. Já em análise intergrupos, após estímulo insulínico, o grau de fosforilação em tirosina da pp185 foi reduzido ($p < 0.05$) no grupo LP em relação ao grupo CN nos tecidos adiposo e muscular. Contudo, esta alteração no sinal insulínico não foi observada no fígado (Figura 9).

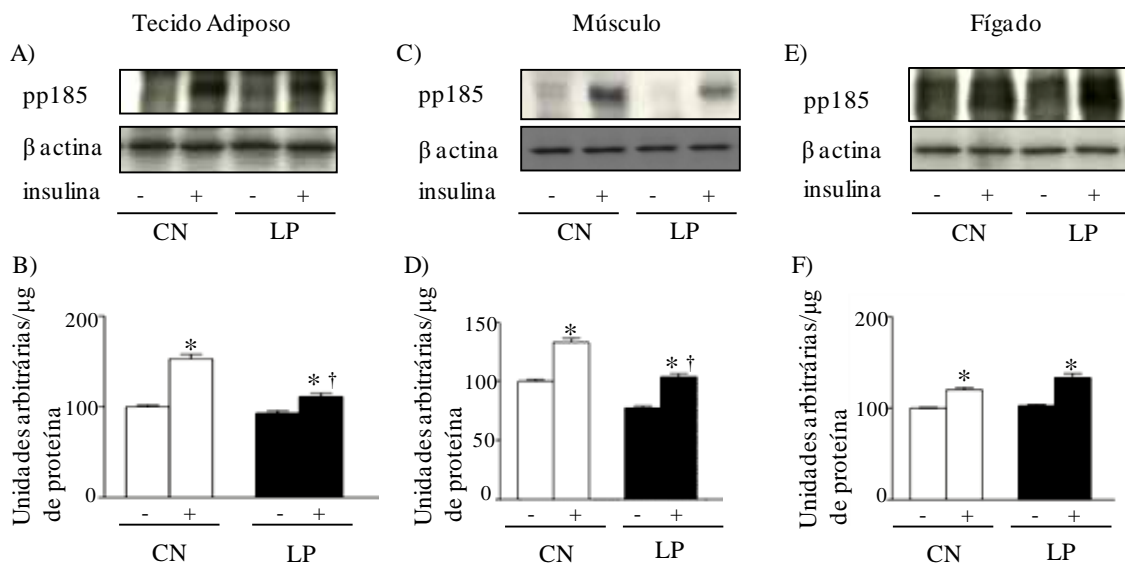


FIGURA 9 - Avaliação do grau de fosforilação em tirosina da pp185 (IRS-1/IRS-2) antes (-) e após (+) o estímulo insulínico no tecido adiposo branco periepídidimo (A, B), músculo gastrocnêmio (C, D) e fígado (E, F) de ratos-controle (CN) e de ratos com lesão periapical (LP). Em **A, C e E** autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 μg). β-actina foi utilizada como controle. Em **B, D e F**, valores do grau de fosforilação em tirosina da pp185, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média ± EPM, n=6. * $p < 0,05$ insulina (-) vs. insulina (+); † $p < 0,05$ CN (+) vs. LP (+).

4.9 Avaliação do conteúdo do substrato do receptor de insulina IRS-1 no músculo esquelético gastrocnêmio, tecido adiposo branco periepídidimo e fígado

Em relação ao conteúdo de IRS-1, observou-se que não houve diferenças entre os grupos CN e LP em todos os tecidos estudados (Figura 10).

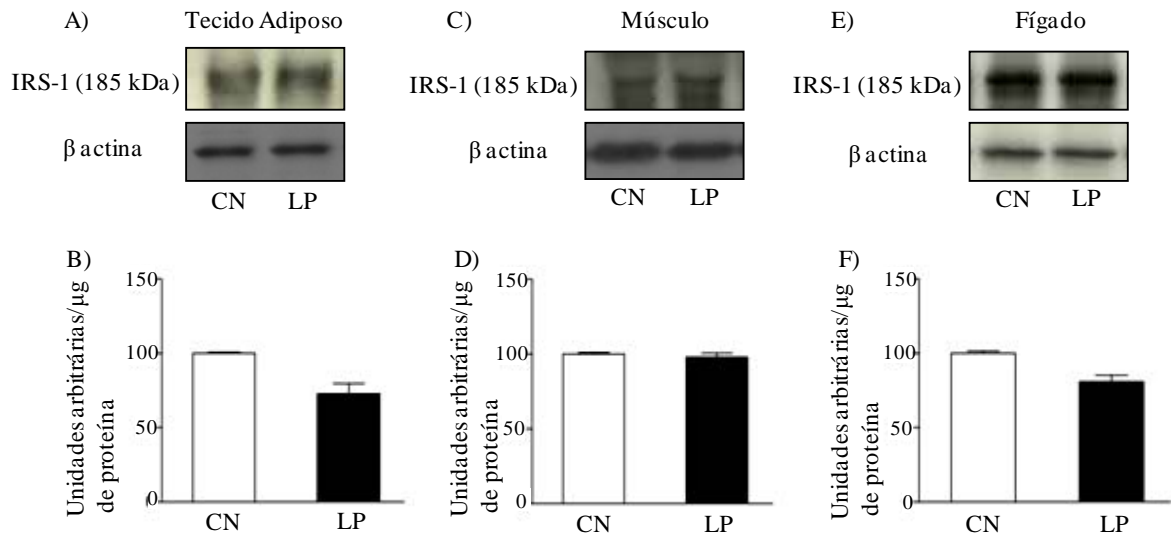


FIGURA 10 - Avaliação do conteúdo do IRS-1 no tecido adiposo branco periepídidimo (A, B), músculo gastrocnêmio (C, D) e fígado (E, F) de ratos-controle (CN) e de ratos com lesão periapical (LP). Em **A**, **C** e **E** autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 μg). β-actina foi utilizada como controle. Em **B**, **D** e **F**, valores do conteúdo do IRS-1, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média ± EPM, n=6.

5 DISCUSSÃO

É relatada, na literatura, uma possível associação bidirecional entre lesão periapical (LP) e alterações no metabolismo de glicose, pois a LP pode afetar negativamente a homeostasia glicídica (BAIN *et al.*, 2009) e o estado hiperglicêmico pode gerar efeitos deletérios sobre a condição pulpar, aumentando a extensão da LP e a reabsorção óssea alveolar (KOHSAKA *et al.*, 1996). Há algum tempo tenta-se estabelecer os efeitos de infecções localizadas sobre a circulação sistêmica. Nesse sentido, Walton e Langeland (1978) relatam estar bem elucidado na literatura que uma variedade de materiais e substâncias, quando inoculados em tecido pulpar, pode migrar para tecidos adjacentes ao dente e até mesmo para a circulação sistêmica, devido à ligação circulatória entre a polpa dental e outras estruturas distantes da cavidade oral. Essa correlação torna-se válida quando patologias bucais de caráter inflamatório ocorrem em concomitância com outras injúrias de caráter sistêmico, como por exemplo, aterosclerose, artrite reumatoide e *diabetes mellitus* tipo-2 (DM2) (ZHANG *et al.*, 2011). Nessa linha de raciocínio, sabe-se que doenças inflamatórias orais, incluindo a LP, podem aumentar a liberação de citocinas no sistema circulatório, produzindo um estado sistêmico hiperinflamatório, o que pode contribuir para o surgimento ou aumento de resistência insulínica (IR) (ASTOLPHI *et al.*, 2012; BAIN *et al.*, 2009; CHEHOUD *et al.*, 2008; COLOMBO *et al.*, 2012; DEL AGUILA *et al.*, 1999; DONAHUE; WU, 2001; SHIRAKASHI *et al.*, 2012).

As características referentes à LP induzida em ratos apresentam-se semelhantes àsquelas da doença endodôntica em humanos, tornando possível a extrapolação dos resultados obtidos nestes modelos experimentais (BAIN *et al.*, 2009; SCARPARO *et al.*, 2011). No momento da eutanásia os ratos do presente estudo foram considerados adultos (03 meses), já que, se comparados aos seres humanos, estes animais têm infância breve e acelerada, desenvolvendo-se rapidamente durante a juventude e tornando-se sexualmente maduros com cerca de seis semanas de idade (RAT BEHAVIOR AND BIOLOGY, 2011).

As imagens histopatológicas (Figura 3) demonstram que a lesão pulpar induzida por broca foi efetivada nos ratos utilizados no experimento em tela e que, após 30 dias, encontrava-se progredida para LP. Nesse sentido, a lesão pulpar é considerada por alguns autores como pré-requisito para o desenvolvimento de

inflamação periapical (STASHENKO *et al.*, 1998; STERN *et al.*, 1981). Em todos os espécimes analisados pôde-se observar a presença de tecido necrosado em toda a cavidade pulpar com extensão ao periápice dentário. Notou-se também a presença de reabsorção cementária, dentinária e óssea, de extensão moderada. Ainda, a região do ligamento periodontal, junto ao vértice apical, apresentou-se desorganizada, com presença de tecido necrosado e inflamação subjacente. Todas as lesões encontradas foram de características compatíveis com granuloma periapical com origem devido à necrose pulpar após exposição. De acordo com Consolaro (2008), o granuloma periapical constitui-se de um aglomerado de células inflamatórias nos tecidos periodontais apicais, especialmente de macrófagos, caracterizando a forma organizacional de granuloma. A finalidade da LP baseia-se em circunscrever, delimitar e localizar possíveis agentes agressores de difícil destruição, representando uma resposta de defesa local (STASHENKO, 1990). No caso do granuloma periapical, o agente agressor está representado pela microbiota presente no canal radicular com saída frequente de bactérias e seus produtos tóxicos pelo forame apical. Ainda, em dentes com necrose pulpar, logo na desembocadura do forame apical, no canal cementário, acumulam-se muitos neutrófilos, que são leucócitos polimorfonucleares especializados em atuar de prontidão e de forma especializada contra as bactérias *estafilococos* e *estreptococos* predominantes na microbiota dos canais radiculares infectados (CONSOLARO, 2008).

Nesse sentido, no presente estudo foi possível identificar nos dentes com LP um infiltrado inflamatório bem evidente, constituído principalmente por neutrófilos polimorfonucleares e células mononucleares. Estes achados corroboram os resultados de Pinto (2006), nos quais as lesões periapicais induzidas em ratos apresentam infiltrado inflamatório predominantemente polimorfonuclear no 30º dia e, após a cronificação, passa a conter infiltrado predominantemente mononuclear. Metzger (2000) também relata a presença de neutrófilos nas pulpites crônicas, nomeando estas células de “fagócitos profissionais”, devido à sua ação fagocítica. Apesar de os neutrófilos serem encontrados principalmente em lesões agudas, sua presença em pulpites crônicas de 30 dias pode atingir até 40% do total de células inflamatórias (YU; STASHENKO, 1987). A presença dos neutrófilos pode ser explicada porque estas células tendem a persistir nos granulomas periapicais, atuando na destruição do tecido periapical por meio da liberação de elastase,

colagenase e catepsina. Adicionalmente, componentes do sistema complemento, produtos bacterianos, macrófagos, produtos da degradação de colágeno e linfocinas podem atrair quimicamente os neutrófilos (STERN *et al.*, 1981).

A presença de neutrófilos e células mononucleares nas lesões endodônticas dos ratos do presente estudo também corroboram os achados de Yu e Stashenko (1987), os quais afirmam que as células mononucleares correspondem até 60% do granuloma periapical de ratos no 30º. Essa mistura de células polimorfonucleares e células mononucleares permitem afirmar que a LP é caracterizada por possuir infiltrado inflamatório do tipo “misto” (HAHN *et al.*, 1989). Sabe-se que ao redor do forame apical e após o aglomerado de neutrófilos, se localizam os leucócitos mononucleares do tipo macrófagos, linfócitos e plasmócitos (CONSOLARO, 2008). Ao estudarem 13 dentes humanos com LP, Torabinejad e Kettering (1985) descobriram que as LP apresentam linfócitos B e T, sendo que o número de células T é superior ao de células B, permitindo sugerir que o sistema imune mediado por células exerce importante função na patogenia das lesões periapicais. Os linfócitos T são variados e possuem grande número de funções, dentre elas, o comando do reconhecimento imunológico em resposta a um antígeno por meio da ligação destes aos receptores de membrana das células T (TCR). Após sua ativação, são secretadas várias citocinas, que irão regular a intensidade e/ou duração da resposta imune de acordo com a presença de células-alvo (JONTELL *et al.*, 1998). Na LP, por exemplo, encontram-se linfócitos T4+ ou CD4 (T *helper* ou células auxiliares). Especificamente, os linfócitos T *helper*-1 (Th1) produzem predominantemente: 1) interleucina-2 (IL-2), que transformam os linfócitos T que estão em repouso em células ativas; 2) interferon-gama (IFN- γ), que, juntamente com os linfócitos T ativados, desempenham papel central no recrutamento e ativação de macrófagos e osteoclastos (KOPP; SCHWARTING, 1989); 3) TNF- α (KAWASHIMA; STASHENKO, 1999). Já os linfócitos T *helper*-2 (Th2) produzem as interleucinas IL-4, IL-5 e IL-6, que estimulam a diferenciação, proliferação e ativação de linfócitos B (ABBAS; LICHTMAN, 2003; JONTELL *et al.*, 1998). Os linfócitos B reconhecem o receptor de superfície dos antígenos e, então, produzem e secretam anticorpos que irão se ligar especificamente ao antígeno. Adicionalmente, Marton e Kiss (1993) relatam alta concentração de macrófagos na LP, sugerindo que estas células são componentes essenciais do granuloma periapical. Os macrófagos realizam funções produtora e

reguladora da inflamação por meio dos seus mediadores solúveis, além de serem a principal fonte das citocinas IL-1 α , IL-1 β e TNF- α (METZGER, 2000).

Neste estudo, as concentrações plasmáticas de TNF- α encontraram-se elevadas nos ratos após 30 dias de indução da LP. Entretanto, não foi encontrada diferença na quantidade sérica de IL-6 entre os grupos CN e LP (Tabela 2). Isso pode ser explicado devido aos fatores relacionados à progressão da LP, já que em estudo anterior utilizando roedores com este tipo de lesão, encontrou-se que a produção do TNF- α é iniciada sete dias após a indução de lesão pulpar e sofre considerável aumento no 28^o dia. Além disso, descobriram-se nos mesmos animais que a IL-6 tem sua produção aumentada até o 14^o dia pós-indução e, então, começa a diminuir (KAWASHIMA; STASHENKO, 1999). Os resultados do presente trabalho também corroboram parte dos achados de Bain *et al.* (2009), os quais afirmam que o TNF- α encontra-se aumentado na circulação sistêmica de ratos com LP. Estes autores também comprovam a presença de IL-6 e IL-1 β em cornos uterinos e TNF- α em fígado de ratas com LP. Adicionalmente, Zhang *et al.* (2011) relatam aumento considerável na concentração sérica de outros fatores, como IL-18 e metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9) em ratas com LP. Porém, o presente trabalho não corrobora os achados de Bain *et al.* (2009) e Zhang *et al.* (2011) em relação à IL-6, já que estes autores relataram o aumento desta citocina na circulação geral de ratas com LP crônica (38 dias após exposição pulpar). Além disso, Abdolsamadi *et al.* (2008) indicam a presença de IL-6 sérica em humanos com LP. Adicionalmente, demonstra-se na literatura que a concentração de citocinas também se encontra aumentada na circulação sérica de pessoas com DP (ABDOLSAMADI *et al.*, 2008; COLOMBO *et al.*, 2012; LOOS, 2005). Ainda, em trabalho recente realizado em nosso laboratório utilizando ratos com DP induzida por 28 dias, os níveis séricos de TNF- α estavam aumentados, o que não ocorreu com a IL-6 (COLOMBO *et al.*, 2012). O tratamento da LP pode atuar na reversão do quadro inflamatório sistêmico, visto que as concentrações plasmáticas de citocinas podem ser reduzidas em pacientes submetidos à apicectomia, curetagem (MÁRTON *et al.*, 1988; MÁRTON; KISS, 2000), exodontia (REN; MALMSTROM, 2007) ou terapia endodôntica convencional (KETTERING; TORABINEJAD, 1984).

Como abordado anteriormente, o microambiente do canal pulpar exposto cronicamente apresenta, em sua maioria, colonização composta por diversos tipos de bactérias gram-negativas anaeróbias (SUNDQVIST, 1992), dotadas de

lipopolissacarídeos (LPS) na parede celular (WOLFF, 1973). Um importante efeito causado pelo LPS consiste na capacidade em ativar o receptor *toll like-4* (TLR4) e acentuar o processo inflamatório por meio da produção de mais citocinas (HOU *et al.*, 2000; MEDZHITOV, 2001). Nesse sentido, os LPS ligam-se à proteína ligante de LPS (LBP ou *LPS-binding protein*), que estão naturalmente presentes no soro. Imediatamente, a LBP transfere as moléculas de LPS a uma proteína chamada CD14 (“cluster” ou agrupamento de diferenciação 14, localizada na superfície de macrófagos) (STONE, 1994). O CD14 por si só não pode penetrar nas membranas celulares e, assim, não consegue gerar um sinal diretamente às células. Então, o CD14 se liga ao TLR4 presente na superfície celular (TIZARD, 2009), por exemplo, de linfócitos B e T. Esse processo caracteriza a nomeação dos macrófagos como “apresentadores de antígenos” (LUIZI *et al.*, 2004). A ligação do LPS ao complexo CD14/TLR4 ativa os macrófagos e estimula a produção de citocinas inflamatórias (STONE, 1994; TIZARD, 2009), principalmente o TNF- α e IL-6 (BLETSA *et al.*, 2006; BAIN *et al.*, 2009). Sob estímulo de LPS sintético, o ligante da proteína de membrana CD40 (CD40L) presente em células do sistema imune (linfócitos, macrófagos e células dendríticas), mostra-se capaz de produzir as citocinas TNF- α e IL-6, demonstrando a capacidade destes componentes bacterianos em acentuar uma resposta inflamatória (WAGNER *et al.*, 2004). Kayaoglu e Ørstavik (2004) aventam que, após ativação dos linfócitos T pelos produtos bacterianos, há subsequente liberação de fator de necrose tumoral beta (TNF- β) e IFN- γ por estas células, que, por sua vez, também estimulam a liberação de TNF- α pelos macrófagos. Além disso, o IFN- γ ativa a produção do óxido nítrico (NO), que possui alto poder citotóxico (KAYAOGU; ØRSTAVIK, 2004), levando à destruição celular e acentuação do processo inflamatório (LUIZI *et al.*, 2004), além de ocasionar disfunção das células β pancreáticas com, conseqüentemente, diminuição na secreção de insulina (SHIMABUKURO *et al.*, 1997). O NO também pode afetar o sinal insulínico (SI) por meio da diminuição da fosforilação das proteínas PI3K e Akt (PERREAULT; MARETTE, 2001).

Há aproximadamente duas décadas, a relação entre inflamação e IR tem sido explorada (KERN *et al.*, 2001; UYSAL *et al.*, 1997; VENTRE *et al.*, 1997). Como supracitado, estas investigações procederam-se após o pioneirismo de Hotamisligil *et al.* (1993) em demonstrar que o tecido adiposo de ratos obesos pode expressar a citocina TNF- α , fundamental para o desenvolvimento de IR. Seguindo esta linha de

raciocínio, Hotamisligil *et al.* (1999) observaram que camundongos obesos *knockout* para TNF- α , apresentaram até duas vezes maior sensibilidade insulínica em relação aos camundongos obesos selvagens. A partir desse trabalho, determinou-se que o aumento de TNF- α pode ser o suficiente para ocasionar IR (HOTAMISLIGIL, 1999) e, desde então, vários estudos vem se desenvolvendo com a finalidade de identificar a função exata do TNF- α no desencadeamento de IR (KERN *et al.*, 2001; UYSAL *et al.*, 1997; VENTRE *et al.*, 1997).

Atualmente, pode-se afirmar que a obesidade constitui estado metabólico inflamatório, denominado “metainflamação”, que se refere à presença de um determinado (“baixo”) grau de inflamação crônica em resposta à presença de citocinas, principalmente o TNF- α , e ao excesso de nutrientes e outros metabólitos (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005). Esta metainflamação está classificada como característica-chave na relação entre obesidade e DM2 (KIM *et al.*, 2009). Para tentar esclarecer esta conexão, alguns autores citam diversas citocinas advindas do tecido adiposo branco (adipocinas) na correlação com a alteração do SI em roedores (DYCK *et al.*, 2006), pois o aumento destas adipocinas nos indivíduos obesos está correlacionado com a IR (KIM *et al.*, 2009).

Charriere *et al.* (2003), ao analisarem cultura celular de pré-adipócitos de roedores, descobriram que o perfil dessas células possui alta semelhança com os macrófagos. Por meio deste experimento, demonstra-se que os pré-adipócitos possuem alta eficiência em transformar-se em macrófagos, enfatizando a estreita correlação evolucionária entre tecido adiposo e processo imune inato. Para corroborar, Lumeng *et al.* (2007) concluíram que os tecidos adiposos periepididimal, perirrenal, mesentérico e subcutâneo de animais e seres humanos obesos é caracterizado pelo acúmulo de macrófagos, com elevado poder na produção de adipocinas. Por outro lado, em ratos não obesos, os macrófagos do tecido adiposo não exibem fenótipo inflamatório, já que, nesse caso, as vias inflamatórias não estão ativadas devido à ausência de obesidade. Adicionalmente, sabe-se que macrófagos podem expressar receptores e produtos em comum com os adipócitos, incluindo proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ) e metaloproteinases de matrizes (MMPs) (BOULOUMIÉ *et al.*, 2001; MAKOWSKI *et al.*, 2001; TONTONNOZ *et al.*, 1998).

Gregor e Hotamisligil (2011) detectaram semelhanças existentes entre obesidade e infecção, em decorrência dos marcadores inflamatórios existentes na

obesidade também estarem expressos de maneira similar em processos infecciosos. Isso pode ser explicado porque os mamíferos possuem habilidade em estocar energia excessiva devido ao longo curso evolucionário que enfrentaram (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005). Todavia, o estoque energético em excesso pode ativar simultaneamente as vias metabólicas e inflamatórias, tornando possível a influência de uma via sobre outra, com consequente produção de citocinas que irão interagir negativamente com o receptor insulínico (RI) e desencadear a IR (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005). Como abordado anteriormente, a IR constitui na falha em responder a concentrações normais de insulina circulante, podendo causar hiperglicemia (NATIONAL INSTITUTE OF DIABETES AND DIGESTIVE AND KIDNEY DISEASES, 2011). Em decorrência desta hiperglicemia, a IR torna-se uma faceta importante de diversas desordens clínicas, incluindo DM2, hipertensão e dislipidemia (REAVEN, 1988). Sabe-se que indivíduos com patologias orais crônicas, incluindo infecções endodônticas, têm maior probabilidade em desenvolver ateromas e doenças coronárias, devido à hiperlipidemia, se comparados aos indivíduos com saúde oral não comprometida (FRIEDLANDER *et al.*, 2010). Nesse sentido, a IR exerce papel central na patogênese da dislipidemia, ocasionando aumento na liberação de ácidos graxos livres em células adiposas resistentes à insulina (MOORADIAN, 2009). Porém, ao comparar os ratos dos grupos LP e CN do presente estudo, não foram observadas diferenças significativas nas concentrações plasmáticas de colesterol total, VLDL-C, HDL-C, LDL-C e triglicérides (Tabela 1). Estes achados corroboram resultados obtidos anteriormente em nosso laboratório utilizando o mesmo modelo experimental (CINTRA *et al.*, 2012).

As alterações lipídicas associadas à obesidade são semelhantes àquelas observadas em pacientes com DM2 ou com IR (TASKINEN, 2003). Embora a obesidade e periodontite estejam definitivamente correlacionadas (GORMAN *et al.*, 2012), uma possível relação de sobrepeso com a doença endodôntica ainda não foi demonstrada (FEIN, 2012). Em nossos estudos não se observou diferença no peso corpóreo (Figura 4) e na ingestão alimentar (Figura 5) de ratos CN e com LP. Baseando-se nesses resultados pode-se inferir que a LP não influenciou na ingestão alimentar, o que pode indicar que o animal não sentiu dor (MCGIVERN; BERNTSON, 1980). Para sustentar esta hipótese, Bain *et al.* (2009) demonstraram que roedores com exposição pulpar aberta não apresentavam alterações na concentração plasmática de cortisol em relação aos ratos saudáveis, uma vez que a

dor em ratos promove aumento da cortisolemia (RAMSAY; LEWIS, 1995). Além disso, Stern *et al.* (1981) relatam que, geralmente, as lesões periapicais não são dolorosas e possuem caráter expansivo, tendendo à cronicidade.

A IR pode ocorrer tanto na presença de doenças (como o DM2, obesidade, hipertensão, doença ovariana policística e uma variedade de síndromes genéticas) quanto em condições fisiológicas (como puberdade e gestação) (KAHN *et al.*, 2009; REUSCH, 2002; TAYLOR; ARIOGLU, 1998). Além disso, a IR também pode estar presente em estados de estresse, em associação com a infecção e como resposta secundária ao tratamento com uma variedade de drogas, particularmente os glicocorticoides (KAHN *et al.*, 2009). Segundo Kahn *et al.* (2009), sob perspectiva molecular, a IR pode ocorrer em vários níveis: 1) pré-receptor: rara hoje em dia, mas antigamente era exemplificado por pacientes com altos níveis de anticorpos circulantes contra insulina, que bloqueavam a ligação do ligante a seu receptor; 2) receptor: pode resultar de alterações genéticas na expressão do receptor ou sua estrutura, como alterações na atividade do mesmo, devido à fosforilação em serina; 3) pós-receptor: pode ocorrer em quase todos os locais, em uma das vias comuns ou ramificadas da sinalização insulínica. Nos estados mais comuns de IR, parece haver defeitos em vários níveis. Tem-se como exemplo o DM2, no qual há redução na concentração do receptor insulínico, na atividade quinase do receptor, na concentração e fosforilação de pp185 (IRS-1/IRS-2), na atividade da PI3K e na translocação do transportador de glicose, bem como em defeitos na atividade das enzimas intracelulares (CARO *et al.*, 1989; CUSI *et al.*, 2000; KAHN *et al.*, 2009).

Como citado anteriormente, o TNF- α em excesso na circulação sistêmica dos ratos com LP pode causar prejuízos ao SI, o que possivelmente contribuiria para o desenvolvimento de IR (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1997). Nesse sentido, os resultados do presente estudo demonstraram que a sensibilidade à insulina, medida pela taxa de decaimento de glicose (Kitt), encontrou-se reduzida nos ratos LP em relação aos ratos CN (Figura 6). Estes resultados corroboram os de Bain *et al.* (2009) que detectaram IR em ratas com LP crônica (mais de 2 semanas pós exposição pulpar). Sabe-se que quanto menor o valor do Kitt, maior a IR, porque quando o valor do Kitt é baixo, significa que a sensibilidade das células à insulina está prejudicada. Como consequência, a taxa de decaimento de glicose dos ratos com LP após a injeção de insulina, durante o teste intravenoso de tolerância à insulina (ITT), é menor em comparação aos ratos CN. Em indivíduos saudáveis, a constante de decaimento da

glicose aumenta progressivamente à medida que a dose de glicose é aumentada no sangue. Já em indivíduos diabéticos, ocorre apenas um ligeiro aumento desta constante, indicando que a glicose demora um tempo maior para ser captada pelas células (MOORHOUSE *et al.*, 1963).

Como consequência da IR, as concentrações elevadas de insulina e glicose séricas podem estar elevadas (BAIN *et al.*, 2009). Porém, apesar de o SI estar diminuído nos ratos com LP, os níveis de glicose e insulina não estavam alterados entre os grupos LP e CN (Tabela 1). Estes resultados corroboram os achados de Colombo *et al.* (2012), que relataram não haver alteração glicêmica em ratos com periodontite, apesar destes animais apresentarem IR. Além disso, estudos que avaliaram a glicemia de ratos Wistar com 60 dias de doença periodontal induzida (WATANABE *et al.*, 2011) e de camundongos após 70 dias da indução desta doença (PONTES ANDERSEN *et al.*, 2006), também não observaram alteração na glicemia. Sabe-se que alterações no SI é uma característica que pode ser identificada em indivíduos que possivelmente desenvolverão diabetes, mesmo antes dessa doença se tornar evidente. As alterações no SI, se somadas à falha na secreção de insulina, podem agravar o estado de saúde do indivíduo, já que, possivelmente, ocorrerá evolução de uma situação de tolerância normal à glicose para intolerância à glicose e, finalmente, DM2 (SAAD; ZECCHIN, 2011).

Normalmente, o SI está alterado em modelos de IR (CHIBA *et al.*, 2010; CUSI *et al.*, 2000; KEROUZ *et al.*, 1997). O presente estudo, no intuito de averiguar tal relação, realizou a avaliação do SI na etapa inicial do processo em ratos com LP crônica (30 dias) e concluiu que houve diminuição significativa no grau de fosforilação em tirosina da subunidade beta do receptor insulínico ($R\beta$) em tecido adiposo branco (TAB) e fígado (F) do grupo com LP em comparação com o grupo CN (Figura 7). Infelizmente, o método de *immunoblotting* não é adequado para este tipo de avaliação em músculo gastrocnêmio (G), sendo indicado nesse caso o teste por imunoprecipitação (KASUGA *et al.*, 1982). Esta diminuição pode estar associada ao aumento da concentração plasmática de TNF- α (Tabela 2), já que esta citocina é reportada na literatura como agente bloqueador do receptor insulínico, o que pode contribuir para o surgimento de IR (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1997). Além disso, pode-se afirmar que a diminuição no grau de fosforilação em tirosina do $R\beta$ não ocorreu devido à redução de conteúdo desta subunidade, comprovando que não houve relação paralela (Figura 8).

O presente trabalho também avaliou o grau de fosforilação em tirosina da pp185 (IRS-1/IRS-2) e concluiu que houve diminuição significativa após o estímulo insulínico em G e TAB do grupo LP em comparação com o grupo CN (Figura 9). Estes resultados corroboram os achados de Chiba *et al.* (2010) e Colombo *et al.* (2012) que, pesquisando modelos experimentais envolvendo flúor e doença periodontal crônica, respectivamente, verificaram redução no grau de fosforilação da pp185 em G e TAB, provavelmente devido ao aumento sérico de TNF- α . Porém, não houve alteração significativa no grau de fosforilação em tirosina da pp185 em F ao comparar os grupos CN e LP (Figura 9). Estes achados podem explicar a ausência de alteração na glicemia e na lipidemia dos ratos com LP (Tabela 1), mesmo havendo redução no grau de fosforilação da pp185 no G e no TAB, já que a ausência de alteração no SI do fígado impede a ocorrência de possíveis defeitos na homeostase da glicose e de lípidos (TANIGUCHI *et al.*, 2006). Em vista desta observação, Cho *et al.* (2006) sugerem que o fígado pode compensar a IR encontrada no TAB e G, de modo a prevenir a hiperglicemia. A diminuição do grau de fosforilação em tirosina da pp185 no G e no TAB não foi decorrente da diminuição de conteúdo do IRS-1 nestes órgãos, comprovando que não houve relação paralela (Figura 9 e 10). A avaliação do conteúdo de IRS-2 não foi possível por meio do teste de *immunoblotting*, pois o anticorpo disponível comercialmente não foi adequado para se obter um bom resultado.

Considerando que as quantidades séricas de TNF- α do grupo LP estavam significativamente elevadas, pode-se considerar que existe a possibilidade de as seguintes serina-quinases terem sido ativadas: 1) serina quinase-6 (SK6); 2) família 38 da proteína quinase ativada por estresse (p38MAPK); 3) inibidor kappa beta kinase (I κ K- β); 4) inibidor kappa B beta (I κ B- β) (DE ALVARO *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2008); 5) inibidor de NF-kB quinase (I κ B); 6) proteína quinase C- θ (PKC- θ) e 7) *mammalian target of rapamycin* (mTOR) (GAO *et al.*, 2002; PERSEGHIN *et al.*, 2003; YU *et al.*, 2002; ZICK, 2003). Estas serina-quinases aumentam a fosforilação em serina e diminuem a fosforilação em tirosina da pp185, diminuindo o SI (DE ALVARO *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2008). A I κ B quinase (IKK), além de agir diretamente sobre a pp185, pode fosforilar o I κ B e, assim, ativar o fator de transcrição NF-kB que, entre outras funções, estimula a produção de mais citocinas, incluindo TNF- α , acentuando a reação inflamatória (SHOELSON *et al.*, 2003). Nesse sentido, sabe-se que o tratamento com salicilatos (antiinflamatórios) podem

restaurar completamente o SI (DE ALVARO *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2008). Conforme descrito anteriormente, quando a pp185 é fosforilada em tirosina, há propagação do SI. Porém, quando a pp185 é fosforilada em serina, há atenuação na transmissão deste sinal. Isso pôde ser comprovado em experimento que utilizou adipócitos de camundongos, no qual está demonstrado que a fosforilação em serina bloqueia o SI (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1996).

O SI também pode ser regulado negativamente por uma classe de proteínas nomeadas tirosinas fosfatases. Sabe-se que as fosfatases *Leukocyte Antigen Related* (LAR), *Src Homology 2 Protein Tyrosine Phosphatase* (SH-PTP2) e *Protein Tyrosine Phosphatase1B* (PTP1B) reduzem diretamente a atividade tirosina quinase do RI (AHMAD; GOLDSTEIN, 1995). Nesse sentido, sabe-se que ratos *knockout* de genes que estão envolvidos em “desligar” o sinal de insulina, como por exemplo, a PTP1B e a *5'-phosphoinositol phosphatase, SH2-containing 5'-inositol phosphatase* (SHIP2), melhoram o SI em roedores obesos (SAAD; ZECCHIN, 2011). Outras moléculas ativadas por processos infecciosos incluem as proteínas supressoras da sinalização de citocina-1 e 3 (SOCS-1 e SOCS-3) (UEKI *et al.*, 2004). Depois de induzida, as SOCS se ligam ao sítio tirosina do R β e diminuem sua capacidade de fosforilar em tirosina a pp185 (EMANUELLI *et al.*, 2001). Além disso, a SOCS-3 é capaz de ligar-se à pp185, provocando sua degradação proteossômica por meio de um mecanismo dependente de ubiquitinação (processo no qual uma proteína – nesse caso a pp185 – é marcada por moléculas de ubiquitina com o objetivo de ser reconhecida por um proteossoma, no qual é degradada) (RUI *et al.*, 2002). No caso de inflamação sistêmica devido à presença de antígenos, as proteínas SOCS são encontradas em músculo, fígado e, menos frequentemente, em tecido adiposo. No caso da obesidade, a SOCS-3 está particularmente presente em tecido adiposo e é responsável por diminuir a fosforilação dos IRS-1 em tirosina, diminuindo a ligação deste substrato com a PI3K (EMANUELLI *et al.*, 2001).

A citocina IL-6, que não apresentou diferença entre os grupos LP e CN deste trabalho (Tabela 2), é relatada na literatura como citocina de efeito duplo sobre a captação de glicose em miotubulos de camundongos. Nesse sentido, sabe-se que em cultura celular sob incubação de 20ng/mL de IL-6 por curto período de tempo (3h) e sob infusão de 100 nmol/l de insulina por 30 minutos, a IL-6 induz aumento da captação de glicose em miotubulos, provavelmente pela ativação das vias: proteína quinase 11 (LKB1), proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e substrato da proteína

kinase B de 160 kDa (AS160). Porém, quando os miotubulos ficam expostos por período crônico, a IL-6 promove deficiência da translocação de GLUT4 para a membrana plasmática destas células, diminuindo a captação de glicose. Também se atribui à IL-6 a produção de *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) e SOCS-3, intermediários da via de IR (NIETO-VAZQUEZ *et al.*, 2008). Porém, Krogh-Madsen *et al.* (2006) em estudo utilizando humanos, apontaram que a infusão sistêmica de IL-6 não provocou alteração na captação de glicose. Estes mesmos autores relatam que a injeção sistêmica de TNF- α resultou na diminuição do SI (KROGH-MADSEN *et al.*, 2006).

Como supracitado, a estimulação insulínica ocorre após a ligação da insulina à subunidade α , fazendo com que a subunidade β seja ativada e sofra autofosforilação, assumindo função de tirosina quinase (SAAD *et al.*, 1993; PATTI; KAHN, 1998) e promovendo fosforilação da pp185 em tirosina (BOURA-HALFON; ZICK, 2009). A família dos IRS inclui diferentes substratos que apresentam alto grau de homologia, sendo que os IRS-1 e 2 são os mais importantes no metabolismo da glicose. Entre outros efeitos já citados, sabe-se que camundongos *knockout* para IRS-1 apresentam retardo do crescimento intrauterino e pós-natal e IR em tecidos periféricos (ARAKI *et al.*, 1994; TAMEMOTO *et al.*, 1994). Já os indivíduos *knockout* para IRS-2 apresentam IR nos tecidos periféricos e fígado e diminuição da massa de célula β , o que resulta no desenvolvimento de DM2 (WITHERS *et al.*, 1998).

Em estudo utilizando adipócitos, comprovou-se que a fosforilação em tirosina da pp185 ocorre no compartimento de membranas intracelulares (MI) e, em menor grau, no citosol. Nesse sentido, a preferência dos autores em abordar o IRS-1 pode ser explicada porque este substrato está localizado majoritariamente nas MI, enquanto que o IRS-2 está em sua maioria localizado no citosol (mais de 75%) (INOUE *et al.*, 1998). Ao mesmo tempo, a habilidade da PI3K ligar-se às proteínas IRS é proporcional ao nível de fosforilação em tirosina que estas proteínas sofrem no interior das MI. Então, considerando a alta concentração do IRS-1 neste local, a associação de PI3K com IRS-1 é maior em relação ao IRS-2, podendo-se afirmar, a princípio, que o IRS-2 contribuiria menos para a associação com PI3K (INOUE *et al.*, 1998). Porém, Withers *et al.* (1998) relataram que ratos *knockout* para IRS-2, mas que possuíam IRS-1 íntegros, diminuíram em mais de 50% a ativação da PI3K após a ligação insulínica, comprovando que o IRS-2 também desenvolve função importante no mecanismo de transdução do SI.

Em seu decorrer, o estímulo insulínico e as respectivas fosforilações dos IRS em tirosina recrutam a PI3K do citosol para as MI. O retorno da PI3K das MI para o citosol demora alguns minutos, podendo resultar também na translocação dos IRS-1 e IRS-2 das MI para o citosol e, concomitantemente, na diminuição da fosforilação em tirosina destes substratos, criando uma situação de *feedback* negativo (INOUE *et al.*, 1998). Alessi *et al.* (1997) demonstraram que a PI3K ativada pode induzir a ativação de outras proteínas, como por exemplo, a proteína quinase-1 dependente de fosfoinosítido (PDK1) que, então, pode fosforilar e ativar a Akt (ou proteína quinase B – PKB). A Akt/PKB tem três diferentes isoformas - Akt1, Akt2 e Akt3 - e todas são ativadas pela fosforilação em treonina e serina (BELLACOSA *et al.*, 1998; KOHN *et al.*, 1996). Sabe-se que após ativação da Akt em serina/treonina, iniciar-se-á a translocação do GLUT4 do compartimento intracelular para a membrana citoplasmática (MORRIS *et al.*, 1996), tornando possível a captação de glicose para o interior da célula (ROWLAND *et al.*, 2011).

Portanto, é possível afirmar que a inibição da sinalização insulínica no RI e/ou nos IRS (principalmente a pp185) sejam possíveis mecanismos pelos quais a inflamação possa interferir e causar IR (AGUIRRE *et al.*, 2000; COLOMBO *et al.*, 2012; HOTAMISLIGIL *et al.*, 1996; SHIRAKASHI *et al.*, 2012; YIN *et al.*, 1998). Isso ocorre porque, além dos IRS intermediarem os sinais iniciados pela ligação da insulina ao RI, tanto este receptor quanto os substratos também pode ser alterados de forma negativa pelas citocinas inflamatórias (COLOMBO *et al.*, 2012; MYERS; WHITE, 1996; ZICK, 2003; SHIRAKASHI *et al.*, 2012).

Enquanto está claro que alterações no RI e na pp185 ocasionadas diretamente por citocinas desempenham mecanismo central pelo qual a inflamação medeia a IR, surgem outros caminhos relevantes, moléculas e mecanismos alternativos envolvidos neste processo. Um destes mecanismos envolve o estresse do retículo endoplasmático (ERE), gerado tanto pela obesidade quanto por infecções, ocorrendo, assim, ativação das serinas quinases JNK e IKK (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005). Isso ocorre porque há sobrecarga na capacidade do retículo endoplasmático (RE), causando o estresse funcional desta organela (OZCAN *et al.*, 2004). Logo, o ERE faz com que a JNK seja ativada, podendo fosforilar o IRS-1 em serina (OZCAN *et al.*, 2004). Para confirmar, Hirosumi *et al.* (2002) constataram que, em ratos obesos, a atividade de JNK encontrava-se

elevada em fígado, músculo e tecido adiposo, podendo predispor o surgimento de IR nestes tecidos.

Particularmente na obesidade, os metabólitos em excesso podem ativar receptores de citocinas ou receptores TLR para atingirem diretamente a célula. De modo indireto, estes nutrientes utilizam transportadores de metabólitos para ativar vias posteriores, que também são prejudiciais para o SI. Após a ativação dos receptores de citocinas ou dos TLR, ocorre a formação de três quinases proeminentes: JNK, IKK e *protein kinase R* (PKR), que além de interferirem negativamente na fosforilação em tirosina da pp185, também podem ativar vias nucleares para produção de mais citocinas inflamatórias. Por outro lado, os ácidos graxos livres (AGL) que adentram as células de modo indireto, utilizam moléculas chaperonas para atingirem o núcleo e, assim, acentuarem ainda mais a resposta inflamatória. Portanto, em ambos os caminhos, observa-se o desenvolvimento de inflamação exacerbada e estresse celular, culminando em IR nos indivíduos obesos (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011).

Saltiel e Kahn (2001) ressaltam o progresso investigativo conquistado ao longo dos anos no tocante à ação insulínica e seus mecanismos. Ao mesmo tempo, estes autores discutem sobre a necessidade de novas descobertas relacionadas à complexa rede de sinalização insulínica, aos mecanismos de sistemas cruzados entre citocinas e o SI e à susceptibilidade genética da IR bem como as interações entre genes e ambiente. Por sua vez, a IR é considerada predisponente para o desenvolvimento do DM2 (FACCHINI *et al.*, 2001). No século XXI, o DM2 é considerado um dos mais importantes problemas de saúde pública em muitos países, principalmente nas nações em desenvolvimento e/ou industrializadas. Com base em estimativas recentes da Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 347 milhões de pessoas no mundo têm DM2. Além disso, o número de mortes por diabetes duplicará entre 2005 e 2030 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012). No Brasil, com base no último censo, realizado em 2010, estima-se que existam mais de 12 milhões de diabéticos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2012). Esse fato tem merecido atenção especial dos profissionais de saúde, dos governos, da indústria farmacêutica e inclusive dos portadores dessa patologia (COSTA; ALMEIDA NETO, 2009).

Para que ocorra IR e, possivelmente, DM2, podem existir mecanismos que estejam desencadeando estes efeitos deletérios. Como destacado anteriormente, as

vias metabólicas superexpressadas na obesidade, bem como a inflamação advinda de processos infecciosos, como a LP, podem ativar vias e mecanismos que influenciam negativamente os tecidos adiposo, muscular e hepático. A literatura carece de informações e existem lacunas que ainda necessitam ser preenchidas. A elucidação de todo o processo irá contribuir para o melhor entendimento acerca da IR e do DM2 (FERNÁNDEZ-REAL; PICKUP, 2012).

Portanto, considerando que os resultados deste estudo revelam haver correlação entre LP crônica e alteração do SI em G e TAB, reforça-se a importância do controle e prevenção de uma doença tratável, como a LP, no intuito de prevenir a IR, intimamente relacionada com o DM2.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que a lesão periapical (LP) em ratos:

- não alterou a ingestão alimentar e peso corpóreo;
- não alterou as concentrações plasmáticas de glicose, insulina, colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL, colesterol VLDL e triglicérides;
- reduziu a sensibilidade à insulina;
- promoveu aumento nas concentrações plasmáticas de TNF- α , mas não alterou as concentrações plasmáticas de IL-6;
- reduziu o grau de fosforilação em tirosina do receptor insulínico em tecido adiposo branco e fígado, após o estímulo insulínico;
- reduziu o grau de fosforilação em tirosina da pp185 (IRS-1/IRS-2) no tecido adiposo branco e muscular, após o estímulo insulínico, porém não alterou a fosforilação deste substrato em tecido hepático.

A partir desses resultados, podemos inferir que o aumento de TNF- α em ratos LP pode ter ocasionado resistência à insulina e diminuição do sinal insulínico, entretanto esta alteração não é decorrente de alterações do conteúdo do R β ou IRS-1.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Cellular and molecular immunology**. 5.ed. Philadelphia: Saunders, 2003. 562 p.
- ABDOLSAMADI, H. R. et al. Serum interleukin-6 as a serologic marker of chronic periapical lesions: a case-control study. **J. Dent. Res. Dent. Clin. Dent. Prospects**, v. 2, n. 2, p. 43-47, 2008.
- AGUIRRE, V. et al. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 12, p. 9047-9054, Mar. 2000.
- AHMAD, F.; GOLDSTEIN, B. J. Purification, identification and subcellular distribution of three predominant protein-tyrosine phosphatase enzymes in skeletal muscle tissue. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1248, n. 1, p. 57-69, Apr. 1995.
- ALDHAHI, W.; HAMDY, O. Adipokines, inflammation, and the endothelium in diabetes. **Curr. Diab. Rep.**, v. 3, n. 4, p. 293-298, Aug. 2003.
- ALESSI, D. R. et al. 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the Drosophila DSTPK61 kinase. **Curr. Biol.**, v. 7, n. 10, p. 776-789, Oct. 1997.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 35, Suppl. 1, p. S64-S71, Jan. 2012.
- ARAKI, E. et al. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. **Nature**, v. 372, n. 6502, p. 186-190, Nov. 1994.
- ASTOLPHI, R. D. et al. Periapical lesions decrease insulin signal and cause insulin resistance. **J. Endod.** 2012. No prelo.
- BAGG, J. et al. **Essentials of microbiology for dental students**. 2.ed.Oxford: Oxford University Press, 2006. 317 p.
- BAIN, J. L. et al. Effects of induced periapical abscesses on rat pregnancy outcomes. **Arch. Oral. Biol.**, v. 54, n. 2, p. 162-171, Feb. 2009.

BAJAJ, M. et al. On the tertiary structure of the extracellular domains of the epidermal growth factor and insulin receptors. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 916, n. 2, p. 220-226, Nov. 1987.

BARKHORDAR, R. A.; HAYASHI, C.; HUSSAIN, M. Z. Detection of interleukin-6 in human dental pulp and periapical lesions. **Endod. Dent. Traumatol.**, v. 15, n. 1, p. 26-27, Feb. 1999.

BARNETT, M. L. The oral-systemic disease connection. An update for the practicing dentist. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 137 Suppl., p. 5S-6S, Oct. 2006.

BARTHEL, C. R. et al. TNF-alpha release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated Escherichia coli LPS. **Int. Endod. J.**, v. 30, n. 3, p. 155-159, May. 1997.

BELLACOSA, A. et al. Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. **Oncogene**, v. 17, n. 3, p. 313-325, Jul. 1998.

BERGENHOLTZ, G.; SPÅNGBERG, L. Controversies in endodontics. **Crit. Rev. Oral. Biol. Med.**, v. 15, n. 2, p. 99-114, Jan. 2004.

BLETSA, A. et al. Cytokine signalling in rat pulp interstitial fluid and transcapillary fluid exchange during lipopolysaccharide-induced acute inflammation. **J. Physiol.**, v. 573, Pt 1, p. 225-236, May. 2006.

BONORA, E. et al. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 68, n. 2, p. 374-378, Feb. 1989.

BORGGREVE, S. E.; DE VRIES, R.; DULLAART, R. P. Alterations in high-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus: role of lipolytic enzymes, lecithin:cholesterol acyltransferase and lipid transfer proteins. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 33, n. 12, p. 1051-1069, Dec. 2003.

BOULOUMIÉ, A. et al. Adipocyte produces matrix metalloproteinases 2 and 9: involvement in adipose differentiation. **Diabetes**, v. 50, n. 9, p. 2080-2086, Sep. 2001.

BOURA-HALFON, S.; ZICK, Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 296, n. 4, p. E581-E591, Apr. 2009.

BRUNO, K. F. et al. Microbiological and microscopic analysis of the pulp of non-vital traumatized teeth with intact crowns. **J. Appl. Oral. Sci.**, v. 17, n. 5, p. 508-514, 2009 Sep./Oct. 2009.

CAI, D. et al. Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 28, p. 25323-25330, Jul. 2003.

CARO, J. F. et al. Cellular alterations in liver, skeletal muscle, and adipose tissue responsible for insulin resistance in obesity and type II diabetes. **Diabetes Metab. Rev.**, v. 5, n. 8, p. 665-689, Dec. 1989.

CARPENTER, C. L.; CANTLEY, L. C. Phosphoinositide 3-kinase and the regulation of cell growth. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1288, n. 1, p. M11-M16, Aug. 1996.

CARVALHEIRA, J. B.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de sinalização da insulina. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 46, n. 4, p. 419-425, Aug. 2002.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. National diabetes fact sheet: **National estimates and general information on diabetes and prediabetes in the United States, 2011**. Atlanta: CDC, 2011.12 p.

CHARRIÈRE, G. et al. Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 11, p. 9850-9855, Mar. 2003.

CHEATHAM, B.; KAHN, C. R. Insulin action and the insulin signaling network. **Endocr. Rev.**, v. 16, n. 2, p. 117-142, Apr. 1995.

CHEHOUD, K. A. et al. Effects of fluoride intake on insulin sensitivity and insulin signal transduction. **Fluoride**, v. 41, n. 4, p. 270-275, 2008.

CHEUNG, A. T. et al. An in vivo model for elucidation of the mechanism of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-induced insulin resistance: evidence for differential regulation of insulin signaling by TNF-alpha. **Endocrinology**, v. 139, n. 12, p. 4928-4935, Dec. 1998.

- CHIBA, F. Y. et al. Insulin signal decrease in muscle but not in the liver of castrated male rats from chronic exposure to fluoride. **Fluoride**, v. 43, n. 1, p. 6, 2010.
- CHO, Y. et al. The novel roles of liver for compensation of insulin resistance in human growth hormone transgenic rats. **Endocrinology**, v. 147, n. 11, p. 5374-5384, Nov. 2006.
- CHOU, M. M. et al. Regulation of protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1. **Curr. Biol.**, v. 8, n. 19, p. 1069-1077, Sep. 1998.
- CINTRA, D. E. et al. Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. **J. Hepatol.**, v. 48, n. 4, p. 628-637, Apr. 2008.
- CINTRA, L. T. et al. Pulpal and periodontal diseases increase triglyceride levels in diabetic rats. **Clin. Oral. Investig.**, Oct. 2012.
- COFFER, P. J.; WOODGETT, J. R. Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. **Eur. J. Biochem.**, v. 201, n. 2, p. 475-481, Oct. 1991.
- COLOMBO, N. H. et al. Periodontal disease decreases insulin sensitivity and insulin signaling. **J. Periodontol.**, v. 83, n. 7, p. 864-70, Jul. 2012.
- CONSOLARO, A. Dentes com lesão periapical crônica diagnosticada e tratada durante o tratamento ortodôntico: quando retomar a aplicação de forças? **Rev. Clín. Ortodon.**, v. 7, n. 1, p. 109-111, Fev./Mar. 2008.
- COSTA, A. A.; ALMEIDA NETO, J. S. **Manual de diabetes**. 5.ed. São Paulo: Sarvier, 2009. 230 p.
- CUSI, K. et al. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. **J. Clin. Invest.**, v. 105, n. 3, p. 311-320, Feb. 2000.
- DANDONA, P.; ALJADA, A.; BANDYOPADHYAY, A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. **Trends Immunol.**, v. 25, n. 1, p. 4-7, Jan. 2004.

DE ALVARO, C. et al. Tumor necrosis factor alpha produces insulin resistance in skeletal muscle by activation of inhibitor kappaB kinase in a p38 MAPK-dependent manner. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 17, p. 17070-17078, Apr. 2004.

DE CAMILLI, P. et al. Phosphoinositides as regulators in membrane traffic. **Science**, v. 271, n. 5255, p. 1533-1539, Mar. 1996.

DE GROOT, M. et al. Association of depression and diabetes complications: a meta-analysis. **Psychosom. Med.**, v. 63, n. 4, p. 619-630, Jul./Aug. 2001.

DE OLIVEIRA RODINI, C.; BATISTA, A. C.; LARA, V. S. Comparative immunohistochemical study of the presence of mast cells in apical granulomas and periapical cysts: possible role of mast cells in the course of human periapical lesions. **Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod.**, v. 97, n. 1, p. 59-63, Jan. 2004.

DEFRONZO, R. Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. **Diabetes**, v. 5, n. 3, p. 177-269, 1997.

DEL AGUILA, L. F.; CLAFFEY, K. P.; KIRWAN, J. P. TNF-alpha impairs insulin signaling and insulin stimulation of glucose uptake in C2C12 muscle cells. **Am. J. Physiol.**, v. 276, n. 5 Pt 1, p. E849-E855, May. 1999.

DEMMER, R. T. et al. Periodontal status and A1C change: longitudinal results from the study of health in Pomerania (SHIP). **Diabetes Care**, v. 33, n. 5, p. 1037-1043, May. 2010.

DONAHUE, R. P.; WU, T. Insulin resistance and periodontal disease: an epidemiologic overview of research needs and future directions. **Ann. Periodontol.**, v. 6, n. 1, p. 119-124, Dec. 2001.

DYCK, D. J.; HEIGENHAUSER, G. J.; BRUCE, C. R. The role of adipokines as regulators of skeletal muscle fatty acid metabolism and insulin sensitivity. **Acta Physiol.**, v. 186, n. 1, p. 5-16, Jan. 2006.

EBINA, Y. et al. The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. **Cell**, v. 40, n. 4, p. 747-758, Apr. 1985.

EMANUELLI, B. et al. SOCS-3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to tumor necrosis factor-alpha in the adipose tissue of obese mice. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 51, p. 47944-47949, Dec. 2001.

FACCHINI, F. S. et al. Insulin resistance as a predictor of age-related diseases. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 86, n. 8, p. 3574-8, Aug. 2001.

FANTIN, V. R. et al. Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 278, n. 1, p. E127-E133, Jan. 2000.

FARESE, R. V. Insulin-sensitive phospholipid signaling systems and glucose transport. Update II. **Exp. Biol. Med.**, v. 226, n. 4, p. 283-295, Apr. 2001.

FEIN, J. E. **The relationship between diabetic control and periapical lesion resolution.** 2012. 59 f. Dissertação (Mestrado) - Department of Endodontics, Prosthodontics, and Operative Dentistry, University of Maryland, Baltimore, 2012.

FEINSTEIN, R. et al. Tumor necrosis factor-alpha suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 35, p. 26055-26058, Dec. 1993.

FELACO, M. et al. Localization of the e-NOS enzyme in endothelial cells and odontoblasts of healthy human dental pulp. **Life Sci.**, v. 68, n. 3, p. 297-306, Dec. 2000.

FERNÁNDEZ-REAL, J. M. et al. Plasma levels of the soluble fraction of tumor necrosis factor receptor 2 and insulin resistance. **Diabetes**, v. 47, n. 11, p. 1757-1762, Nov. 1998.

FERNÁNDEZ-REAL, J. M.; PICKUP, J. C. Innate immunity, insulin resistance and type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 55, n. 2, p. 273-278, Feb. 2012.

FOLLI, F. et al. Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity and association with insulin receptor substrate 1 in liver and muscle of the intact rat. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 31, p. 22171-22177, Nov. 1992.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin. Chem.**, v. 18, n. 6, p. 499-502, Jun. 1972.

FRIEDLANDER, A. H. et al. Radiographic quantification of chronic dental infection and its relationship to the atherosclerotic process in the carotid arteries. **Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod.**, v. 109, n. 4, p. 615-621, Apr. 2010.

GAO, Z. et al. Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 50, p. 48115-481121, Dec. 2002.

GARFIN, D. E. One-dimensional gel electrophoresis. **Methods. Enzymol.**, v. 182, p. 425-441, 1990.

GORMAN, A. et al. Overweight and obesity predict time to periodontal disease progression in men. **J. Clin. Periodontol.**, v. 39, n. 2, p. 107-114, Feb. 2012.

GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory mechanisms in obesity. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 29, p. 415-445, 2011.

GUO, X. et al. Detection of interleukin-8 in exudates from normal and inflamed human dental pulp tissues. **Chin. J. Dent. Res.**, v. 3, n. 1, p. 63-66, May. 2000.

HABER, E. P. et al. Secreção da insulina: efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 45, p. 219-227, Jun. 2001.

HAHN, C. L.; FALKLER, W. A.; SIEGEL, M. A. A study of T and B cells in pulpal pathosis. **J. Endod.**, v. 15, n. 1, p. 20-26, Jan. 1989.

HAHN, C. L.; LIEWEHR, F. R. Innate immune responses of the dental pulp to caries. **J. Endod.**, v. 33, n. 6, p. 643-651, Jun. 2007.

HAMACHI, T. et al. Detection of interleukin-1 beta mRNA in rat periapical lesions. **J. Endod.**, v. 21, n. 3, p. 118-121, Mar. 1995.

HANSEN, P. A. et al. Increased GLUT-4 translocation mediates enhanced insulin sensitivity of muscle glucose transport after exercise. **J. Appl. Physiol.**, v. 85, n. 4, p. 1218-1222, Oct. 1998.

- HIROSUMI, J. et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. **Nature**, v. 420, n. 6913, p. 333-336, Nov. 2002.
- HOLMAN, G. D.; KASUGA, M. From receptor to transporter: insulin signalling to glucose transport. **Diabetologia**, v. 40, n. 9, p. 991-1003, Sep. 1997.
- HOTAMISLIGIL, G. S. et al. Differential regulation of the p80 tumor necrosis factor receptor in human obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 46, n. 3, p. 451-455, Mar. 1997.
- HOTAMISLIGIL, G. S. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. **Science**, v. 271, n. 5249, p. 665-658, Feb. 1996.
- HOTAMISLIGIL, G. S. Mechanisms of TNF-alpha-induced insulin resistance. **Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes**, v. 107, n. 2, p. 119-125, 1999.
- HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, n. 5091, p. 87-91, Jan. 1993.
- HOU, L.; SASAKI, H.; STASHENKO, P. Toll-like receptor 4-deficient mice have reduced bone destruction following mixed anaerobic infection. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 8, p. 4681-4687, Aug. 2000.
- IACOPINO, A. M.; CUTLER, C. W. Pathophysiological relationships between periodontitis and systemic disease: recent concepts involving serum lipids. **J Periodontol.**, v. 71, n. 8, p. 1375-1384, Aug. 2000.
- INOUE, G. et al. Dynamics of insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. Differential compartmentalization and trafficking of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 19, p. 11548-11555, May. 1998.
- JENSEN, T.; DECKERT, T. Diabetic retinopathy, nephropathy and neuropathy. Generalized vascular damage in insulin-dependent diabetic patients. **Horm. Metab. Res. Suppl.**, v. 26, p. 68-70, 1992.
- JONTELL, M. et al. Immune defense mechanisms of the dental pulp. **Crit. Rev. Oral. Biol. Med.**, v. 9, n. 2, p. 179-200, 1998.

KAHN, C. R. et al. **Joslin: diabetes melito**. 14.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 1222 p.

KANETY, H. et al. Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). Possible mechanism for suppression of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 40, p. 23780-23784, Oct. 1995.

KAPLAN, S. A. The insulin receptor. **J. Pediatr.**, v. 104, n. 3, p. 327-336, Mar. 1984.

KASUGA, M.; KARLSSON, F. A.; KAHN, C. R. Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. **Science**, v. 215, n. 4529, p. 185-187, Jan. 1982a.

KASUGA, M. et al. The structure of insulin receptor and its subunits. Evidence for multiple nonreduced forms and a 210,000 possible proreceptor. **J. Biol. Chem.**, v. 257, n. 17, p. 10392-10399, Sep. 1982b.

KAWASHIMA, N.; STASHENKO, P. Expression of bone-resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. **Arch. Oral. Biol.**, v. 44, n. 1, p. 55-66, Jan. 1999.

KAYAOGLU, G.; ØRSTAVIK, D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. **Crit. Rev. Oral. Biol. Med.**, v. 15, n. 5, p. 308-320, 2004.

KERN, P. A. et al. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 280, n. 5, p. E745-E751, May. 2001.

KEROUZ, N. J. et al. Differential regulation of insulin receptor substrates-1 and -2 (IRS-1 and IRS-2) and phosphatidylinositol 3-kinase isoforms in liver and muscle of the obese diabetic (ob/ob) mouse. **J. Clin. Invest.**, v. 100, n. 12, p. 3164-3172, Dec. 1997.

KETTERING, J. D.; TORABINEJAD, M. Cytotoxicity of root canal sealers: a study using HeLa cells and fibroblasts. **Int. Endod. J.**, v. 17, n. 2, p. 60-66, Apr. 1984.

- KIM, J. H.; BACHMANN, R. A.; CHEN, J. Interleukin-6 and insulin resistance. **Vitam. Horm.**, v. 80, p. 613-633, 2009.
- KOHN, A. D.; TAKEUCHI, F.; ROTH, R. A. Akt, a pleckstrin homology domain containing kinase, is activated primarily by phosphorylation. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 36, p. 21920-21926, Sep. 1996.
- KOHSAKA, T. et al. Periapical lesions in rats with streptozotocin-induced diabetes. **J. Endod.**, v. 22, n. 8, p. 418-421, Aug. 1996.
- KOPP, W.; SCHWARTING, R. Differentiation of T lymphocyte subpopulations, macrophages, and HLA-DR-restricted cells of apical granulation tissue. **J. Endod.**, v. 15, n. 2, p. 72-75, Feb. 1989.
- KRAEGEN, E. W. et al. Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat-fed rats. **Diabetes**, v. 40, n. 11, p. 1397-1403, Nov 1991.
- KRODER, G. et al. Tumor necrosis factor-alpha- and hyperglycemia-induced insulin resistance. Evidence for different mechanisms and different effects on insulin signaling. **J. Clin. Invest.**, v. 97, n. 6, p. 1471-1477, Mar. 1996.
- KROGH-MADSEN, R. et al. Influence of TNF-alpha and IL-6 infusions on insulin sensitivity and expression of IL-18 in humans. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 291, n. 1, p. E108-114, Jul. 2006.
- KRUGER, N. J.; HAMMOND, J. B. Immunodetection of proteins on "western" blots using (125)i-labeled protein a. **Methods Mol. Biol.**, v. 3, p. 409-417, 1988.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, Aug. 1970.
- LE GOOD, J. A. et al. Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. **Science**, v. 281, n. 5385, p. 2042-2045, Sep. 1998.
- LÖE, H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 16, n. 1, p. 329-334, Jan. 1993.

LOOS, B. G. Systemic markers of inflammation in periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 76, n. 11 Suppl, p. 2106-2115, Nov. 2005.

LUIZI, S. B.; BARBACHAN, J. J. D.; CHIES, J. A. B. Resposta pulpar frente a agressões: lesões inflamatórias. **Rev. Fac. Odontol.** Porto Alegre, v. 45, n. 1, p. 60-63, Jul. 2004.

LUMENG, C. N.; DEYOUNG, S. M.; SALTIEL, A. R. Macrophages block insulin action in adipocytes by altering expression of signaling and glucose transport proteins. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 292, n. 1, p. E166-E174, Jan. 2007.

MAKOWSKI, L. et al. Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. **Nat. Med.**, v. 7, n. 6, p. 699-705, Jun. 2001.

MÁRTON, I. et al. Acute phase proteins in patients with chronic periapical granuloma before and after surgical treatment. **Oral. Microbiol. Immunol.**, v. 3, n. 2, p. 95-96, Jun. 1988.

MÁRTON, I. J. How does the periapical inflammatory process compromise general health? **Endod. Topics**, v. 8, n. 1, p. 3-14, Jul. 2004.

MARTON, I. J.; KISS, C. Characterization of inflammatory cell infiltrate in dental periapical lesions. **Int. Endod. J.**, v. 26, n. 2, p. 131-136, Mar. 1993.

MÁRTON, I. J.; KISS, C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 15, n. 3, p. 139-150, Jun. 2000.

MASSAGUE, J.; PILCH, P. F.; CZECH, M. P. Electrophoretic resolution of three major insulin receptor structures with unique subunit stoichiometries. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 77, n. 12, p. 7137-7141, Dec. 1980.

MASSLER, M.; PAWLAK, J. The affected and infected pulp. **Oral. Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 43, n. 6, p. 929-947, Jun. 1977.

MATSUMOTO, A.; ANAN, H.; MAEDA, K. An immunohistochemical study of the behavior of cells expressing interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta within

experimentally induced periapical lesions in rats. **J. Endod.**, v. 24, n. 12, p. 811-816, Dec. 1998.

MATTHEWS, D. R.; MATTHEWS, P. C. Banting Memorial Lecture 2010[^]. Type 2 diabetes as an 'infectious' disease: is this the Black Death of the 21st century? **Diabet. Med.**, v. 28, n. 1, p. 2-9, Jan. 2011.

MATTILA, K. J. et al. Association between dental health and acute myocardial infarction. **BMJ**, v. 298, n. 6676, p. 779-781, Mar. 1989.

MCGIVERN, R. F.; BERNTSON, G. G. Mediation of diurnal fluctuations in pain sensitivity in the rat by food intake patterns: reversal by naloxone. **Science**, v. 210, n. 4466, p. 210-211, Oct. 1980.

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 1, n. 2, p. 135-145, Nov. 2001.

METZGER, Z. Macrophages in periapical lesions. **Endod. Dent. Traumatol.**, v. 16, n. 1, p. 1-8, Feb. 2000.

MILLER, W. D. The human mouth as a focus of infection. **Dent. Cosmos**, v. 33, p. 689-713, 1891.

MONTANI, J. P. et al. Pathways from obesity to hypertension: from the perspective of a vicious triangle. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 26 Suppl 2, p. S28-S38, Sep. 2002.

MOORADIAN, A. D. Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. **Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.**, v. 5, n. 3, p. 150-159, Mar. 2009.

MOORHOUSE, J. A.; STEINBERG, J.; TESSLER, B. B. Effect of glucose dose upon intravenous glucose tolerance in health and in diabetes. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 23, p. 1074-1079, Nov. 1963.

MORRIS, A. J. et al. Evidence for an insulin receptor substrate 1 independent insulin signaling pathway that mediates insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) translocation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, n. 16, p. 8401-8406, Aug. 1996.

MYERS, M. G.; WHITE, M. F. Insulin signal transduction and the IRS proteins. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 36, p. 615-658, 1996.

NATIONAL INSTITUTE OF DIABETES AND DIGESTIVE AND KIDNEY DISEASES. **National diabetes statistics fact sheet: General information and national estimates on diabetes in the United States.** Atlanta: CDC, 2011.

NAVÉ, B. T. et al. Compartment-specific regulation of phosphoinositide 3-kinase by platelet-derived growth factor and insulin in 3T3-L1 adipocytes. **Biochem. J.**, v. 318 (Pt 1), p. 55-60, Aug. 1996.

NIETO-VAZQUEZ, I. et al. Dual role of interleukin-6 in regulating insulin sensitivity in murine skeletal muscle. **Diabetes**, v. 57, n. 12, p. 3211-3221, Dec. 2008.

OAKES, N. D. et al. Mechanisms of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding. **Diabetes**, v. 46, n. 11, p. 1768-1774, Nov. 1997.

OKIJI, T. et al. An immunohistochemical study of the distribution of immunocompetent cells, especially macrophages and Ia antigen-expressing cells of heterogeneous populations, in normal rat molar pulp. **J. Dent. Res.**, v. 71, n. 5, p. 1196-1202, May. 1992.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Doenças crônico-degenerativas e obesidade: estratégia mundial sobre alimentação saudável, atividade física e saúde.** Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2003. 60 p.

OZCAN, U. et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. **Science**, v. 306, n. 5695, p. 457-461, Oct. 2004.

PATTERSON, J. E.; ANDRIOLE, V. T. Bacterial urinary tract infections in diabetes. **Infect. Dis. Clin. North. Am.**, v. 11, n. 3, p. 735-750, Sep. 1997.

PATTI, M. E.; KAHN, C. R. The insulin receptor--a critical link in glucose homeostasis and insulin action. **J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol.**, v. 9, n. 2-4, p. 89-109, 1998.

PERREAULT, M.; MARETTE, A. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. **Nat. Med.**, v. 7, n. 10, p. 1138-1143, Oct. 2001.

PERSEGHIN, G.; PETERSEN, K.; SHULMAN, G. I. Cellular mechanism of insulin resistance: potential links with inflammation. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 27 Suppl 3, p. S6-S11, Dec. 2003.

PETERSEN, A. M.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **J. Appl. Physiol.**, v. 98, n. 4, p. 1154-1162, Apr. 2005.

PINTO, L. C. **Estudo radiográfico e microscópico das lesões periapicais inflamatórias induzidas em ratos**. 2006. 109 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Bauru, 2006.

PIYA, M. K.; TAHRANI, A. A.; BARNETT, A. H. Emerging treatment options for type 2 diabetes. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, Aug. 2010. No prelo.

PONTES ANDERSEN, C. C. et al. Periodontitis deteriorates metabolic control in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. **J. Periodontol.**, v. 77, n. 3, p. 350-356, Mar. 2006.

QURESHI, A. et al. Periodontal infection: a potential risk factor for pre-term delivery of low birth weight (PLBW) babies. **J. Pak. Med. Assoc.**, v. 55, n. 10, p. 448-452, Oct. 2005.

RAETZ, C. R. Bacterial endotoxins: extraordinary lipids that activate eucaryotic signal transduction. **J. Bacteriol.**, v. 175, n. 18, p. 5745-5753, Sep. 1993.

RAMSAY, D. S.; LEWIS, M. The effects of birth condition on infants' cortisol response to stress. **Pediatrics**, v. 95, n. 4, p. 546-9, Apr. 1995.

RAT BEHAVIOR AND BIOLOGY. How old is a rat in human years?. 2011. Disponível em: <<http://www.ratbehavior.org/RatYears>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

REAVEN, G. M. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, v. 37, n. 12, p. 1595-1607, Dec. 1988.

REN, Y. F.; MALMSTROM, H. S. Rapid quantitative determination of C-reactive protein at chair side in dental emergency patients. **Oral. Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 104, n. 1, p. 49-55, Jul. 2007.

REUSCH, J. E. Current concepts in insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, and the metabolic syndrome. **Am. J. Cardiol.**, v. 90, n. 5A, p. 19G-26G, Sep. 2002.

RITTENHOUSE, S. E. Phosphoinositide 3-kinase activation and platelet function. **Blood**, v. 88, n. 12, p. 4401-4414, Dec. 1996.

ROWLAND, A. F.; FAZAKERLEY, D. J.; JAMES, D. E. Mapping insulin/GLUT4 circuitry. **Traffic**, v. 12, n. 6, p. 672-681, Jun. 2011.

RUI, L. et al. SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 44, p. 42394-42398, Nov. 2002.

SAAD, M. J. et al. Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. **J. Clin. Invest.**, v. 92, n. 4, p. 2065-2072, Oct. 1993.

SAAD, M. J. A.; ZECCHIN, H. G. Resistência à insulina no diabetes tipo 2. In: ALBUQUERQUE, R.; PIMAZONI NETO, A. (Ed.) **Diabetes na prática clínica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Diabetes, 2011. Disponível em: <<http://www.diabetesebook.org.br/modulo-1/5-resistencia-a-insulina-no-diabetes-tipo-2>>. Acesso em 10 out. 2012.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 799-806, Dec. 2001.

SCANNAPIECO, F. A.; BUSH, R. B.; PAJU, S. Associations between periodontal disease and risk for nosocomial bacterial pneumonia and chronic obstructive pulmonary disease. A systematic review. **Ann. Periodontol.**, v. 8, n. 1, p. 54-69, Dec. 2003.

SCARPARO, R. K. et al. Response to intracanal medication in immature teeth with pulp necrosis: an experimental model in rat molars. **J. Endod.**, v. 37, n. 8, p. 1069-1073, Aug. 2011.

SEGURA-EGEA, J. J. et al. Diabetes mellitus, periapical inflammation and endodontic treatment outcome. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.**, v. 17, n. 2, p. e356-e361, Mar. 2012.

SHIMABUKURO, M. et al. Role of nitric oxide in obesity-induced beta cell disease. **J. Clin. Invest.**, v. 100, n. 2, p. 290-295, Jul. 1997.

SHIRAKASHI, D. J. et al. Maternal periodontal disease in rats decreases insulin sensitivity and insulin signaling in adult offspring. **J. Periodontol.** Jun 2012. No prelo.

SHOELSON, S. E.; LEE, J.; YUAN, M. Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 27 Suppl 3, p. S49-S52, Dec. 2003.

SMITH, A. G.; MUSCAT, G. E. Skeletal muscle and nuclear hormone receptors: implications for cardiovascular and metabolic disease. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 37, n. 10, p. 2047-2063, Oct. 2005.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Revista da Sociedade Brasileira de Diabetes. Disponível em: <http://www.diabetes.org.br/attachments/revistas2012/> Acesso em 25 mai. 2012.

SOSKOLNE, W. A.; KLINGER, A. The relationship between periodontal diseases and diabetes: an overview. **Ann. Periodontol.**, v. 6, n. 1, p. 91-98, Dec. 2001.

STARKIE, R. et al. Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF-alpha production in humans. **FASEB J.**, v. 17, n. 8, p. 884-886, May. 2003.

STASHENKO, P. et al. Pathogenesis of induced rat periapical lesions. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 78, n. 4, p. 494-502, Oct. 1994.

STASHENKO, P. Role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. **Endod. Dent. Traumatol.**, v. 6, n. 3, p. 89-96, Jun. 1990.

STASHENKO, P.; TELES, R.; D'SOUZA, R. Periapical inflammatory responses and their modulation. **Crit. Rev. Oral. Biol. Med.**, v. 9, n. 4, p. 498-521, 1998.

STEPHENS, J. M.; PEKALA, P. H. Transcriptional repression of the GLUT4 and C/EBP genes in 3T3-L1 adipocytes by tumor necrosis factor-alpha. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n. 32, p. 21839-21845, Nov. 1991.

STERN, M. H. et al. Quantitative analysis of cellular composition of human periapical granuloma. **J. Endod.**, v. 7, n. 3, p. 117-122, Mar. 1981.

- STONE, R. Search for sepsis drugs goes on despite past failures. **Science**, v. 264, n. 5157, p. 365-367, Apr. 1994.
- STRASSMANN, G. et al. The role of interleukin-6 in lipopolysaccharide-induced weight loss, hypoglycemia and fibrinogen production, in vivo. **Cytokine**, v. 5, n. 4, p. 285-290, Jul. 1993.
- SUN, X. J. et al. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. **Nature**, v. 377, n. 6545, p. 173-137, Sep. 1995.
- SUN, X. J. et al. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. **Nature**, v. 352, n. 6330, p. 73-77, Jul. 1991.
- SUNDQVIST, G. Ecology of the root canal flora. **J. Endod.**, v. 18, n. 9, p. 427-430, Sep. 1992.
- SYRJÄNEN, J. et al. Dental infections in association with cerebral infarction in young and middle-aged men. **J. Intern. Med.**, v. 225, n. 3, p. 179-184, Mar. 1989.
- TAMEMOTO, H. et al. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. **Nature**, v. 372, n. 6502, p. 182-186, Nov. 1994.
- TANIGUCHI, C. M. et al. Divergent regulation of hepatic glucose and lipid metabolism by phosphoinositide 3-kinase via Akt and PKC λ /zeta. **Cell Metab.**, v. 3, n. 5, p. 343-353, May 2006.
- TASKINEN, M. R. Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice. **Diabetologia**, v. 46, n. 6, p. 733-749, Jun. 2003.
- TAYLOR, G. W. et al. Non-insulin dependent diabetes mellitus and alveolar bone loss progression over 2 years. **J. Periodontol.**, v. 69, n. 1, p. 76-83, Jan. 1998.
- TAYLOR, S. I.; ARIOGLU, E. Syndromes associated with insulin resistance and acanthosis nigricans. **J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.**, v. 9, n. 2-4, p. 419-439, 1998.
- TELES, R.; WANG, C. Y.; STASHENKO, P. Increased susceptibility of RAG-2 SCID mice to dissemination of endodontic infections. **Infect. Immun.**, v. 65, n. 9, p. 3781-3787, Sep. 1997.

THE COMMITTEE OF THE JAPAN DIABETES SOCIETY ON THE DIAGNOSTIC CRITERIA OF DIABETES MELLITUS et al. Report of the Committee on the Classification and Diagnostic Criteria of Diabetes Mellitus. **J. Diab. Invest.**, v. 1, n. 5, p. 212-228, Oct. 2010.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária**. 8.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 587 p.

TOKER, A.; CANTLEY, L. C. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. **Nature**, v. 387, n. 6634, p. 673-676, Jun. 1997.

TONTONOZ, P. et al. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. **Cell**, v. 93, n. 2, p. 241-252, Apr. 1998.

TORABINEJAD, M.; KETTERING, J. D. Identification and relative concentration of B and T lymphocytes in human chronic periapical lesions. **J. Endod.**, v. 11, n. 3, p. 122-5, Mar. 1985.

TRANASI, M. et al. Microarray evaluation of age-related changes in human dental pulp. **J. Endod.**, v. 35, n. 9, p. 1211-7, Sep. 2009.

TSUKUMO, D. M. et al. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 56, n. 8, p. 1986-1998, Aug. 2007.

TSURUZOE, K. et al. Insulin receptor substrate 3 (IRS-3) and IRS-4 impair IRS-1- and IRS-2-mediated signaling. **Mol. Cell Biol.**, v. 21, n. 1, p. 26-38, Jan. 2001.

UEKI, K.; KONDO, T.; KAHN, C. R. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. **Mol. Cell Biol.**, v. 24, n. 12, p. 5434-5446, Jun. 2004.

ULLRICH, A.; SCHLESSINGER, J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. **Cell**, v. 61, n. 2, p. 203-212, Apr. 1990.

UYSAL, K. T. et al. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. **Nature**, v. 389, n. 6651, p. 610-614, Oct. 1997.

VAN DIEREN, S. et al. The global burden of diabetes and its complications: an emerging pandemic. **Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.**, v. 17 Suppl 1, p. S3-S8, May 2010.

VENTRE, J. et al. Targeted disruption of the tumor necrosis factor-alpha gene: metabolic consequences in obese and nonobese mice. **Diabetes**, v. 46, n. 9, p. 1526-31, Sep. 1997.

VLASSARA, H.; PALACE, M. R. Diabetes and advanced glycation endproducts. **J. Intern. Med.**, v. 251, n. 2, p. 87-101, Feb. 2002.

VOZAROVA, B. et al. Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. **Obes. Res.**, v. 9, n. 7, p. 414-417, Jul. 2001.

WAGNER, M. et al. IL-12p70-dependent Th1 induction by human B cells requires combined activation with CD40 ligand and CpG DNA. **J. Immunol.**, v. 172, n. 2, p. 954-963, Jan 2004.

WAKI, H.; TONTONNOZ, P. Endocrine functions of adipose tissue. **Annu. Rev. Pathol.**, v. 2, p. 31-56, 2007.

WALKER, K. S. et al. Activation of protein kinase B beta and gamma isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in vitro: comparison with protein kinase B alpha. **Biochem. J.**, v. 331 (Pt 1), p. 299-308, Apr. 1998.

WALTON, R. E.; LANGELAND, K. Migration of materials in the dental pulp of monkeys. **J. Endod.**, v. 4, n. 6, p. 167-177, Jun. 1978.

WANG, C. C.; GOALSTONE, M. L.; DRAZNIN, B. Molecular mechanisms of insulin resistance that impact cardiovascular biology. **Diabetes**, v. 53, n. 11, p. 2735-2740, Nov. 2004.

WATANABE, K. et al. Involvement of toll-like receptor 4 in alveolar bone loss and glucose homeostasis in experimental periodontitis. **J. Periodontal. Res.**, v. 46, n. 1, p. 21-30, Feb. 2011.

WELLEN, K. E.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, stress, and diabetes. **J Clin. Invest.**, v. 115, n. 5, p. 1111-1119, May 2005.

- WHITE, M. F. The insulin signalling system and the IRS proteins. **Diabetologia**, v. 40 Suppl 2, p. S2-S17, Jul 1997.
- WHITE, M. F.; KAHN, C. R. The insulin signaling system. **J Biol Chem**, v. 269, n. 1, p. 1-4, Jan. 1994.
- WHITE, M. F.; MARON, R.; KAHN, C. R. Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr-185,000 protein in intact cells. **Nature**, v. 318, n. 6042, p. 183-186, Nov. 1985.
- WHITE, M. F.; TAKAYAMA, S.; KAHN, C. R. Differences in the sites of phosphorylation of the insulin receptor in vivo and in vitro. **J. Biol. Chem.**, v. 260, n. 16, p. 9470-9478, Aug. 1985.
- WILD, S. et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, n. 5, p. 1047-1053, May 2004.
- WITHERS, D. J. et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. **Nature**, v. 391, n. 6670, p. 900-904, Feb. 1998.
- WOLFF, S. M. Biological effects of bacterial endotoxins in man. **J Infect Dis**, v. 128, p. Suppl:259-264, Jul. 1973.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diabetes**. Geneva: World Health Organization, 2012.
- YAMASAKI, M. et al. Effect of methotrexate-induced neutropenia on rat periapical lesion. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 77, n. 6, p. 655-61, Jun. 1994.
- YIN, M. J.; YAMAMOTO, Y.; GAYNOR, R. B. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. **Nature**, v. 396, n. 6706, p. 77-80, Nov. 1998.
- YU, C. et al. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 52, p. 50230-50236, Dec. 2002.
- YU, S. M.; STASHENKO, P. Identification of inflammatory cells in developing rat periapical lesions. **J. Endod.**, v. 13, n. 11, p. 535-540, Nov. 1987.

ZHANG, H. et al. Effects of gender on serum biomarkers of systemic inflammation coincident to experimentally-induced periapical lesions. **Arch. Oral Biol.**, v. 56, n. 2, p. 168-176, Feb. 2011.

ZHANG, J. et al. S6K directly phosphorylates IRS-1 on Ser-270 to promote insulin resistance in response to TNF-(alpha) signaling through IKK2. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 51, p. 35375-353782, Dec. 2008.

ZICK, Y. Role of Ser/Thr kinases in the uncoupling of insulin signaling. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 27 Suppl 3, p. S56-S60, Dec. 2003.

ANEXO A

Parecer de Aprovação da Comissão de Ética na
Experimentação Animal da Faculdade de
Odontologia do *Campus* de Araçatuba - UNESP

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto *"Avaliação do sinal insulínico em ratos adultos com lesão pulpar"*, sob a responsabilidade de **DÓRIS HISSAKO SUMIDA** está de acordo com os Princípios Éticos em Uso de Animais e foi aprovado em 10/3/2011, de acordo com o Processo FOA-0471/11.

Araçatuba, 15 de março de 2011.


FABIANO ANTONIO CADIOLI
Vice-Presidente da CEUA

mfsr.

Relatório em 27/3/11