

MAX SANDER DE OLIVEIRA DA MOTA

**EFEITO DA ATIVIDADE FÍSICA NA SENSIBILIDADE À
INSULINA E NO SINAL INSULÍNICO EM RATOS COM
DOENÇA PERIODONTAL**

MAX SANDER DE OLIVEIRA DA MOTA

**EFEITO DA ATIVIDADE FÍSICA NA SENSIBILIDADE À
INSULINA E NO SINAL INSULÍNICO EM RATOS COM
DOENÇA PERIODONTAL**

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: Profa. Adj. Doris Hissako Sumida.

Catálogo na Publicação (CIP)
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

M917e Mota, Max Sander de Oliveira da.
Efeito da atividade física na sensibilidade à insulina e
no sinal insulínico em ratos com doença periodontal / Max
Sander de Oliveira daMota. - Araçatuba,2014
104 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Doris Hissako Sumida

1.Periodontite 2. Resistência à insulina 3. Diabetes
Mellitus4. Proteínas substratos do receptor de insulina
5. ExercícioI. T.

CDD 612

Dados Curriculares

Nascimento: 26.12.1989, Ilha Solteira - SP.

Filiação: Margarida Gonçalves de Oliveira da Mota

David Pereira da Mota

2007/2011: Curso de Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas pela Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, *Campus* de Ilha Solteira - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

2012/2014: 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.

Dedico este trabalho

A meus pais Margarida e David pelo incentivo, apoio incondicional, confiança e esforços realizados para que eu chegasse até aqui.

Aos grandes amigos que sempre estiveram presentes, mesmo quando fisicamente distantes.

Agradecimentos Especiais

A Deus, pois a Ele devo tudo.

Aos meus pais por me ensinarem tudo que precisei aprender antes que algo tivesse que me ser ensinado. À toda minha família pela confiança e apoio incondicional.

À minha orientadora, Doris Hissako Sumida, pela confiança em mim depositada e pelos ensinamentos transmitidos ao longo destes dois anos.

A todos os amigos e colegas de laboratório, em especial a Maria Sara de Lima Coutinho, Fernando Yamamoto Chiba, Rita de Cássia Alves Nunes, Renato Felipe Pereira, Mariana Lopes Benites, Amanda Gomes, Nayara Rodrigues Alves, Natália Vieira Magalhães, Jéssica Cristiane Bonilha, Lara Mariano Pinheiro, Leonardo Raniel Figueiredo, Thaís Verônica Saori Tsosura, Natália Francisco Scaramele e Kelly Cristina dos Santos. A todos meu muito obrigado pela indispensável ajuda na execução de cada uma das etapas deste trabalho e por amenizarem a aspereza do caminho. Estendo também estes agradecimentos aos colegas que um dia participaram deste grupo de pesquisa: Natália Helena Colombo, Daisy Jaqueline Shirakashi, Rafael Dias Astolphi, Aline Pedro de Melo Yamamoto, Mariane Dias Curbete e Alana Carvalho, pela imprescindível participação em diversas fases deste trabalho.

Aos amigos de sempre que me acompanham (e que tenho a felicidade de acompanhar) ao longo destes anos. A João e Camila Masteghin, Lucivânia da Silva Mendes, Rafael Nonato Bassora, Mirelle Lelis da Silva, Vinícius Danilo Nonato Bezzon, Priscila da Silva, Ariana Ferreira Pereira, Thais Danielle da Silva, Enedir Silva Santos, Michael Jones da Silva, Jacira Venâncio de Paula Ono e Yasmin de Paula Ono. Tenho a honra de trazer em mim marcas da amizade que tanto contribuiu para que eu fosse quem sou e vivesse o que vivi.

A Danilo Freitas de Oliveira e Heloisa Corrêa dos Santos por estarem presentes – ainda que distantes – a cada minuto, em cada decisão, a cada necessidade de desabafo e encorajamento, por cada alegria vivida e por me aguentarem pacientemente (mas nunca calados), por isso são especiais.

Agradecimentos

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” e ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas pela oportunidade em realizar o Curso de Mestrado em Ciências Fisiológicas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

A todos os professores do Departamento de Ciências Básicas, e todos os alunos de pós-graduação e iniciação científica pelo agradável e pacífico convívio ao longo deste tempo.

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.

Aos funcionários 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.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da FOA/UNESP, Valéria Queiroz Marcondes Zagatto, Cristiane Regina Lui Mattos, Lilian Sayuri Mada pela 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.

Às funcionárias Meire Cristiane Gonçalves Dornellas e Eliseide Maria Ferreira Silva Navega pela imprescindível ajuda.

“O que dá o verdadeiro sentido ao encontro é a busca, e é preciso andar muito para se alcançar o que está perto.”

José Saramago

“Bem-aventurado aquele que teme ao Senhor e anda nos seus caminhos. Pois comerás do trabalho das tuas mãos; feliz serás, e te irá bem.”

Salmos 128: 1-2

MOTA, M.S.O. **Efeito da atividade física na sensibilidade à insulina e no sinal insulínico em ratos com doença periodontal.** 2014. 104 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

RESUMO

Estudos têm demonstrado que existe uma correlação entre diabetes mellitus (DM) e doença periodontal (DP) de tal maneira que pessoas com DM apresentam uma maior prevalência e severidade da doença periodontal, quando comparadas com pessoas saudáveis. Ademais, verifica-se também que entre pessoas com DP, há uma maior incidência de diabetes. Estudos anteriores do nosso laboratório demonstraram que a DP induz alteração no sinal insulínico e resistência à insulina. Vários estudos evidenciaram que o exercício físico promove melhora na sensibilidade à insulina. Sabendo-se que a DP reduz a sensibilidade insulínica e o sinal insulínico, este trabalho procurou averiguar se o exercício físico consegue reverter ou melhorar esse quadro em ratos com DP. Portanto, foram avaliados em ratos com DP, submetidos ou não ao exercício: 1) sensibilidade à insulina; 2) glicemia, insulinemia; 3) concentração plasmática de TNF- α e IL-6; 4) colesterolemia e trigliceridemia; e 5) grau de fosforilação em tirosina e serina do substrato do receptor de insulina pp185 (IRS-1/IRS-2). Para tanto, 80 ratos Wistar (2 meses de idade) foram distribuídos em quatro grupos: 1) grupo controle sedentário sem DP (CNS); 2) grupo controle exercitado sem DP (CNEEx); 3) grupo sedentário com DP (DPS); 4) grupo exercitado com doença periodontal (DPEEx). Nos grupos com DP, esta doença foi induzida por meio da ligadura com fio de seda ao redor do 1º molar inferior. Após a colocação da ligadura foram avaliadas, três vezes por semana, a ingestão de ração e, uma vez por semana, o peso corporal dos ratos. No vigésimo oitavo dia após a indução da doença foi iniciado o treinamento resistido. Após 12 semanas de treinamento físico, os experimentos foram realizados. A análise estatística foi realizada pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5%. Não foi observada diferença significativa na glicemia dos grupos estudados. O grupo DPS apresentou maior insulinemia quando comparado aos grupos CNS, CNEEx e DPEEx. O grupo DPS apresentou maior resistência à insulina e maior concentração de TNF- α quando comparado aos demais grupos. Não houve diferença na concentração plasmática de IL-6, na colesterolemia e trigliceridemia. O grupo DPS apresentou menor grau de fosforilação em tirosina da pp185 em tecidos muscular e adiposo, no entanto, não houve diferença no tecido

hepático. Não foi observada diferença no grau de fosforilação em serina da pp185. Assim, observou-se que o exercício físico promoveu diminuição da insulinemia, da concentração plasmática de TNF- α , melhora da resistência insulínica e do sinal insulínico de ratos com doença periodontal

Palavras-chave: Periodontite. Resistência à insulina. Diabetes Mellitus. Inflamação. Proteínas substratos do receptor de insulina. Exercício.

MOTA, M.S.O. **Effect of physical activity in insulin sensitivity and insulin signaling of rats with periodontal disease.** 2014. 104 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

ABSTRACT

Studies have shown that there is a correlation between Diabetes Mellitus (DM) and Periodontal Disease (PD) in a way that people with DM present higher prevalence and severity of PD, when compared with healthy people. It is also observed that among people with PD there is an increased prevalence of Diabetes. Previous studies in our laboratory showed that PD induces alterations in insulin signaling and insulin resistance. Several studies showed that exercise can promote improvements in insulin sensitivity. Knowing that PD reduces insulin sensitivity and signaling, this study investigated if physical exercise can revert or improve this condition in rats with PD. Therefore, it was assessed in rats with PD submitted or not to exercise: 1) insulin sensitivity; 2) glycemia, insulinemia; 3) TNF- α and IL-6 plasma levels; 4) cholesterolemia and triglyceridemia; 5) insulin receptor substrate pp185 (IRS-1/IRS-2) tyrosine and serine phosphorylation status. Therefore, 80 male Wistar rats (two-month-old) were distributed into four groups: 1) sedentary control group without PD (CNS); 2) exercised control group without PD (CNEx); 3) sedentary group with PD (DPS); 4) exercised group with PD (DPEX). In those groups with PD, the disease was induced by ligating silk thread on the lower first molars. After that, it was assessed food ingestion (three times a week) and body weight (once a week) of rats in all groups. In the 28th day after the disease induction, the resistance training began. After 12 weeks of training, the experiments were performed. Statistical analysis was performed by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. Significance value adopted was of 5%. No significant difference was observed in glycemia of the studied groups. DPS had higher insulin levels when compared to CNS, CNEx

and DPEX. DPS showed increased insulin resistance and higher concentration of TNF- α when compared to the other groups. There was no difference in plasma IL-6, in blood cholesterol and triglycerides. DPS had decreased levels of tyrosine phosphorylation of pp185 in muscle and adipose tissues, however, there was no difference in liver tissue. No difference in serine phosphorylation status was observed in pp185. Thus, it was observed that physical exercise caused a decrease in serum insulin, plasma concentrations of TNF- α , improved insulin resistance and insulin signaling in rats with periodontal disease.

Keywords: Periodontitis. Insulin resistance. Diabetes Mellitus. Inflammation. Insulin receptor substrate proteins. Exercise.

Lista de Figuras

- Figura 1** As vias de sinalização insulínica. O receptor de insulina é uma tirosina quinase que se auto fosforila 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 PI3-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** Constante de decaimento da Glicemia (Kitt) expressa em porcentagem de decaimento da glicemia por minuto dos grupos controle (CN) e com doença periodontal (DP), antes do treinamento resistido. Valores são expressos como Média \pm EPM, n = 12. *P < 0,05 CN vs DP. 44
- Figura 3** Constante de decaimento da Glicemia (Kitt) expressa em porcentagem de decaimento da glicemia por minuto após o treinamento resistido dos grupos controle sedentário (CNS), controle exercitado (CNEEx), doença periodontal sedentário (DPS) e doença periodontal exercitado (DPEEx). Valores são expressos como Média \pm EPM, n= 6. *P < 0,05 DPS vs CNS, CNEX e DPEEx. 45
- Figura 4** Avaliação do grau de fosforilação em tirosina da pp185 (IRS- 48

1/IRS-2) antes (-) e após (+) o estímulo insulínico em fígado (A, B), músculo gastrocnêmio (C,D) e tecido adiposo branco periepididimal (E, F) dos grupos controle sedentário (CNS), controle exercitado (CNEx), doença periodontal sedentário (DPS) e doença periodontal exercitado (DPEX). Em A, C e E autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 µg). GAPDH foi utilizado 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 DPS (+) vs. CNS (+), CNEx (+) e DPEX (+).

Figura 5 Avaliação do grau de fosforilação em serina do IRS-1 (Ser 307) 50
antes (-) e após (+) o estímulo insulínico em fígado (A, B), músculo gastrocnêmio (C,D) e tecido adiposo branco periepididimal (E, F) dos grupos CNS, CNEx, DPS e DPEX. Em **A, C e E** autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 µg). GAPDH foi utilizado como controle. Em **B, D e F**, valores do grau de fosforilação em serina do IRS-1, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média ± EPM, n=6.

Lista de Tabelas

Tabela 1	Ingestão alimentar total (g) dos grupos controle sedentário (CNS), controle exercitado (CNEEx), doença periodontal sedentário (DPS) e doença periodontal exercitado (DPEEx).	41
Tabela 2	Massa corpórea (g) dos grupos controle sedentário (CNS), controle exercitado (CNEEx), doença periodontal sedentário (DPS) e doença periodontal exercitado (DPEEx) no início e final do experimento.	41
Tabela 3	Valores das cargas (g) utilizadas no treinamento resistido definidos pelo teste de 1-RM dos grupos CNEEx e DPEEx.	42
Tabela 4	Glicemia (mg/dL), insulinemia (μ IU/mL) e HOMA-IR dos grupos controle sedentário (CNS), controle exercitado (CNEEx), doença periodontal sedentário (DPS) e doença periodontal exercitado (DPEEx).	43
Tabela 5	Concentrações plasmáticas de TNF- α e IL-6 dos grupos controle sedentário (CNS), controle exercitado (CNEEx), doença periodontal sedentário (DPS) e doença periodontal exercitado (DPEEx).	46
Tabela 6	Lipidemia em jejum dos grupos controle sedentário (CNS), controle exercitado (CNEEx), doença periodontal sedentário (DPS) e doença periodontal exercitado (DPEEx).	46

Lista de Abreviaturas

- AGE: Produtos finais de glicação avançada
- Akt /PKB: Proteína quinase B
- AMPK: Proteína quinase ativada por AMP
- AP-1: Proteína ativadora 1
- Cbl: *Casitas B-lineagelymphomaproto-oncogene*
- CNS: Grupo controle sedentário
- CNEx: Grupo controle exercitado
- CRP: Proteína C reativa
- dl: Decilitro
- DM: *Diabetes Mellitus* ou melito
- DM1: Diabetes Mellitus tipo 1
- DM2: Diabetes Mellitus tipo 2
- DP: Doença periodontal
- DPS: Grupo com doença periodontal sedentário
- DPEX: Grupo com doença periodontal exercitado
- DTT: Ditiotreitól
- EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EPM: Erro padrão da média
- EROs: Espécies reativas de oxigênio
- GLUT4: Proteína transportadora de glicose-4
- g: Grama
- Grb10: Proteína 10 ligada a receptor de fator de crescimento
- Grb14: Proteína 14 ligada a receptor de fator de crescimento
- HbA1C: Hemoglobina glicada A1C
- HDL-C: Lipoproteína de alta densidade
- HOMA-IR: Modelo de Avaliação da Homeostase - Resistência à Insulina
- IDF: *International Diabetes Federation*
- IGF-1: Fator de crescimento relacionado à insulina

- IKK: I κ B quinase
- I κ B: Inibidor do fator de transcri \tilde{c} o nuclear kappa B
- IL-1 β : Interleucina-1 beta
- IL-1ra: antagonista do receptor de IL-1
- IL-6: Interleucina-6
- IL-8: Interleucina-8
- IL-18: Interleucina-18
- IR: *Insulin resistance*(Resist \tilde{e} ncia insul \tilde{i} nica)
- R β : Subunidade beta do receptor insul \tilde{i} nico
- 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 toler \tilde{a} ncia \grave{a} insulina
- JNK: c-Jun amino-terminal kinase
- kg: Quilograma
- kDa: Kilodalton
- Kitt: Velocidade de decaimento da glicose
- L: Litro
- LDL-C: Lipoprote \tilde{i} nas de baixa densidade
- LPS: Lipopolissacar \tilde{i} deos
- MAPK: Prote \tilde{i} na quinase ativada por Ras-mit \tilde{o} geno
- mg: Miligrama
- mL: Mililitro
- μ L: Microlitro
- mm: Mil \tilde{i} metro
- mM: Milimolar
- μ m: Micrometro
- M: Molar
- mmol: Milimol

- mV: Milivolt
- NF-κB: Fator de transcrição nuclear kappa B
- NHANES III: *Nacional Health and Nutrition Examination Study III*
- nm: Nanômetro
- NO: Óxido Nítrico
- NOS: Óxido nítrico sintase
- OMS: Organização Mundial de Saúde
- PAMPs: Padrões moleculares associados a patógenos
- pp185: IRS-1/IRS-2
- p110: Subunidade catalítica da PI3K
- p85: Subunidade regulatória da PI3K
- PC-1: Glicoproteína-1 de membrana plasmática celular
- PI: Fosfatidilinositol
- PI-4P: Fosfatidilinositol 4-fosfato
- PI-4,5P2: Fosfatidilinositol 4,5-difosfato
- PIP3: Fosfoinositídeo fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
- PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinase
- PDK1: Proteína quinase- 1 dependente de fosfoinositídeo
- PTP1B: Proteína tirosina fosfatase 1B
- 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: *Srchomologycollagen*
- Src: Família de proteína tirosina quinase originalmente identificada por homologia com a proteína oncogênica PP60 (v-Src) do vírus do sarcoma de *rous*.
- SOCS: Supressor da sinalização de citocinas
- SOCS1: Supressor da sinalização de citocinas-1
- SOCS3: Supressor da sinalização de citocinas-3
- SB: Solução basal

- TEMED: Tetrametiletilenodiamina
- 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
- TR: Treinamento resistido
- Tris: Hidroximetilaminometano
- U: Unidade "rack"
- V: Volt
- VLDL-C: Lipoproteínas de muito baixa densidade
- ZDF: Ratos *Zucker Diabetic Fatty*

Sumário

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 Animais	32
3.2 Programa Orientado de Treinamento Resistido	33
3.3 Teste endovenoso de tolerância à insulina (ITT) curto	33
3.4 Determinação da glicemia (método de glicose-oxidase)	34
3.5 Determinação de insulinemia.....	34
3.6 Análise do HOMA-IR	35
3.7 Concentração plasmática de TNF- α e IL-6.....	35
3.8 Determinação da concentração plasmática de colesterol total.....	35
3.9 Determinação da concentração plasmática do Colesterol HDL.....	36
3.10 Determinação da concentração plasmática dos triglicérides	36
3.11 Determinação da concentração plasmática do LDL-C e VLDL-C.....	37
3.12 Avaliação do grau de fosforilação em tirosina e serina do substrato do receptor de insulina (pp185- IRS-1/IRS-2):	37
3.12.1 Preparação das amostras:	37
3.12.2 “Western blotting”:.....	38
3.13 Análise Estatística	40
4 RESULTADOS	41

4.1 Ingestão alimentar e massa corpórea	41
4.2 Glicemia, Insulinemia e HOMA-IR	42
4.3 Teste de Tolerância à Insulina (ITT)	43
4.4 Concentrações plasmáticas de TNF- α e IL-6.....	45
4.5 Lipidemia de jejum	46
4.6 Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina pp185 (IRS-1/IRS-2) no tecido adiposo branco periepididimal, músculo esquelético gastrocnêmio e fígado.....	47
4.7 Avaliação do grau de fosforilação em serina do substrato do receptor de insulina pp185 (IRS-1/IRS-2) no tecido adiposo branco periepididimal, músculo esquelético gastrocnêmio e fígado.	49
5 DISCUSSÃO	51
6 CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS.....	64

1 INTRODUÇÃO

O *diabetes mellitus* (DM) é considerado pela Organização Mundial de Saúde e pela Federação Internacional de Diabetes como uma epidemia global, atingindo 382 milhões de pessoas no mundo (8,3% da população de adultos), e no Brasil, alcançando 9,04% da população na faixa etária entre 20 e 79 anos (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013). Somado a isto, estima-se que existam cerca 175 milhões de casos não diagnosticados de diabetes no mundo (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013).

Estudos apontam que a prevalência dos casos de diabetes tanto no Brasil como na população mundial segue aumentando. Isto ocorre devido ao aumento e envelhecimento das populações, a urbanização e as mudanças de estilo de vida que esta acarreta, o que se reflete em uma maior prevalência de obesidade e sedentarismo. Desta forma, estima-se que de 2010 até 2030 ocorra um aumento de 54% no número de indivíduos diabéticos em todo o mundo, atingindo um total superior a 430 milhões de casos, enquanto que no Brasil, este valor será superior a 12 milhões (SHAW et al., 2010).

Conceitua-se o DM como um grupo de doenças metabólicas caracterizadas pela presença de hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina, em sua ação ou ambas, ocasionando modificações no metabolismo de proteínas, lipídios, sais minerais e, principalmente, carboidratos, além de estar associada a danos a longo prazo, como disfunção e falência de diferentes órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

O DM é classificado em dois tipos principais: 1) tipo 1 (DM1), associado a absoluta deficiência de insulina pancreática; 2) tipo 2 (DM2), relacionado aos distúrbios de ação e secreção de insulina, afetando principalmente indivíduos obesos; uma vez que a obesidade confere resistência à ação periférica da insulina (GROSSI; GENCO, 1998). O DM1 representa cerca de 5-10% dos casos de diabetes e é causado, normalmente, pela destruição autoimune das células- β pancreáticas, responsáveis pela produção e secreção de insulina. Já o DM2, que representa de 90 a 95% dos casos, engloba indivíduos com resistência insulínica e, progressivamente, relativa deficiência de insulina (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

Com a progressão do diabetes, o indivíduo desenvolve complicações sistêmicas como: alteração no metabolismo de proteínas, baixos níveis de colesterol HDL, altos níveis de triglicérides, microangiopatia, neuropatia, nefropatia, doenças macrovasculares, aumento do tempo de cicatrização de feridas e risco de infecção (;; BORGGREVE et al. 2003, ELNER et al., 1995; JENSEN; DECKERT, 1992; LIBMAN et al.,1993; LOE, 1993; PATTERSON; ANDRIOLE, 1997; TAYLOR et al., 1998; VLASSARA; PALACE, 2002).

Vários mecanismos têm sido sugeridos para o aumento da suscetibilidade à infecção em pacientes com diabetes, incluindo impedimento quimiotático, fagocítico e microbicida das células envolvidas na resposta imune (DRACHMAN et al., 1966; MOWAT; BAUM., 1971; PICKUP; CROOK., 1998; SIMA et al., 1988). Assim, existem quadros infecciosos quase exclusivos do paciente com DM, tais como, abscesso perinefrético, pielonefrite enfisematosa, otite externa invasiva maligna, mucormicose rinocerebral e colecistite enfisematosa. Há ainda uma maior incidência de infecções no trato respiratório, no trato urinário, em tecidos moles (como a celulite, abscessos, erisipelas, fascíte necrosante e piomiosite) e doença periodontal (ROCHA et al., 2002).

Doença periodontal (DP) é um nome genérico que engloba uma série de alterações patológicas que ocorrem no periodonto, e embora existam inúmeras classificações, elas podem ser organizadas em dois grandes grupos: gengivite e periodontite. Na gengivite, apenas o tecido gengival está alterado. Na periodontite, além dos tecidos moles, os tecidos duros como ossos, cemento e ligamento são alterados (LOURO et al., 2001).

Esta patologia trata-se de uma doença inflamatória crônica causada por microorganismos que acomete adultos, com incidência maior em idosos (URIZA et al., 2011), caracterizada pela destruição progressiva dos tecidos de suporte ao dente, podendo levar à perda de dentes, sendo, portanto, um importante assunto de saúde pública (KUMAR et al., 2014).

Nos dias atuais, há certo consenso dentro da área odontológica no que diz respeito ao fato de que infecções crônicas nos dentes e em seus periodontos, mesmo que não tragam qualquer desconforto ao paciente, têm grande potencial de progredir para lesões insidiosas, eventualmente fatais. Diversas evidências têm levado a considerar as condições bucais não mais de maneira isolada, mas em suas relações com o corpo humano (COLLINS et al., 1994; LUNARDELLI et al., 2005; QURESHI et al., 2005). Este posicionamento também é válido para as periodontopatias, que têm sido apontadas por diversos estudos como fator de

risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, acidentes vasculares cerebrais, pneumonias e o próprio diabetes mellitus (QURESHI et al., 2005; IACOPINO et al., 2000).

Os patógenos periodontais afetam as respostas inflamatórias locais e sistêmica. A resposta inflamatória local a estas bactérias ou produtos bacterianos é caracterizada pela infiltração dos tecidos periodontais por células inflamatórias, como neutrófilos polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos (NOACK et al., 2001). Posteriormente, células como macrófagos ativados liberam, citocinas pro-inflamatórias como prostaglandinas, interleucina 1 e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (SHAPIRA et al., 1994). Estas citocinas produzidas localmente podem ativar hepatócitos que passam a produzir proteínas de fase aguda, como proteína C reativa, um marcador de inflamação sistêmica (KAUR et al., 2014; PEPYS; HIRSCHFIELD, 2003). Assim, a interrelação entre um processo inflamatório localizado, como é a doença periodontal, e problemas sistêmicos ocorre devido ao fato da DP promover aumento de citocinas na circulação sanguínea, tais como proteína C reativa, Interleucina-6 (IL-6) e TNF- α , ocasionando assim uma inflamação sistêmica; e estas citocinas estão relacionadas com o desenvolvimento de resistência à insulina e incidência de diabetes mellitus (CULLINAN; SEYMOUR, 2013). Uma evidência desta relação foi encontrada por Munenaga et al. (2013) que realizaram um estudo no qual indivíduos diabéticos com doença periodontal receberam um tratamento com aplicação tópica de antibiótico. Estes pesquisadores verificaram que os indivíduos que apresentavam uma leve inflamação sistêmica decorrente da periodontite (sendo esta inflamação avaliada através da concentração de proteína C reativa ultra sensível) e que receberam o tratamento com antibiótico apresentaram melhora nos valores de hemoglobina glicada A1C (HbA1C), o que demonstra um melhor controle glicêmico.

Estudos demonstram que a doença periodontal está relacionada ao DM2 e à resistência à insulina de uma maneira bidirecional, ou seja, pacientes diabéticos apresentam uma maior severidade da doença periodontal e pacientes com DP apresentam maiores problemas no controle glicêmico, aumentando o risco da patogênese do diabetes e de suas complicações (ALMEIDA et al, 2006; ARORA et al., 2014; TAYLOR; BORGNACKE, 2008; WATANABE et al., 2008).

Um levantamento realizado por Demmer et al. (2008), do NHANES III (Nacional Health and Nutrition Examination Study III), com acompanhamento em 10 e 20 anos de 7.168 pessoas verificou uma associação entre doença periodontal e diabetes. Observou-se

neste estudo que participantes com doença periodontal tiveram um aumento de duas vezes na incidência de diabetes.

Uma análise do NHANES III demonstrou que uma situação glicêmica não controlada em pacientes com diabetes tipo 2 está associada a uma maior severidade de periodontite (TSAI et al., 2002). Pessoas com doença periodontal severa e moderada, por sua vez, apresentaram níveis elevados de glicemia quando comparados a indivíduos com saúde periodontal adequada (KATZ, 2001). Um estudo piloto demonstrou que indivíduos diabéticos apresentam quadro de periodontite severa quatro vezes maior que indivíduos não diabéticos (ALMAS et al., 2001).

Estudos realizados por Engebreston e colaboradores (2007) demonstraram a existência de uma relação entre doença periodontal e TNF- α em pacientes diabéticos (tipo 2), nos quais indivíduos com periodontite severa apresentaram maior concentração plasmática desta citocina quando comparados com aqueles cuja periodontite era moderada. Endo et al. (2009) observaram maior concentração de RNAm de TNF- α e proteína C-reativa (CRP) no fígado e de CRP e IL-6 em tecido adiposo branco de ratos obesos com doença periodontal. Estes mesmos pesquisadores demonstraram também que ratos magros com periodontite apresentavam maior concentração de TNF- α que ratos magros sem periodontite.

Encontra-se na literatura diversos estudos que relacionam TNF- α à modelos de resistência à insulina. Lang e colaboradores (1992) demonstraram que a administração crônica de TNF- α em animais foi capaz de induzir um estado de resistência insulínica, demonstrando a relação entre esta citocina (presente em indivíduos com doenças inflamatórias) e a sensibilidade à insulina.

Hotamisligil et al. (1993) encontraram concentrações elevadas de TNF- α no tecido adiposo de ratos e humanos obesos (HOTAMISLIGIL et al., 1995). Ao neutralizar os efeitos do TNF- α , observou-se maior captação periférica de glicose, ou seja, mostrou-se mais uma vez a relação entre esta citocina e a sensibilidade insulínica (HOTAMISLIGIL et al., 1993).

De fato, esta relação entre TNF- α e resistência à insulina foi comprovada por trabalhos que demonstraram que o tratamento com TNF- α causou diminuição da fosforilação do receptor de insulina e do IRS-1 *in vivo* (FEINSTEIN et al., 1993) e em cultura celular de adipócitos, além de diminuição na captação de glicose (HOTAMISLIGIL et al., 1994a). Esta redução da fosforilação em tirosina do IRS-1 pode ser devido à uma maior taxa

de fosforilação em serina deste substrato (KANETY et al., 1995). Por outro lado, a neutralização do TNF- α através de anticorpo específico ocasionou melhora na fosforilação em tirosina estimulada por insulina tanto do IR quanto do IRS-1 em músculo e tecido adiposo de ratos e também causou redução da concentração plasmática de insulina que se encontra elevada nos casos de resistência insulínica (HOTAMISLIGIL et al., 1994b). Além disso, camundongos obesos geneticamente modificados que não apresentavam TNF- α não apresentaram resistência insulínica, ao contrário dos animais selvagens (UYSAL et al., 1997).

Estudos realizados com ratos em nosso laboratório demonstraram que a DP causa resistência à insulina e alterações no sinal insulínico, provavelmente devido ao aumento da concentração de mediadores inflamatórios, como o TNF- α (COLOMBO et al., 2012).

A infecção periodontal, condicionada por células fagocitárias como monócitos, pode induzir a um estado crônico de resistência à insulina, contribuindo para o ciclo de hiperglicemia. A hiperglicemia ocasiona uma glicação não enzimática de proteínas e lipídios, formando assim os produtos finais de glicação avançada (AGEs – *advanced glycation end products*) (AMIR et al., 2011). O acúmulo de AGEs aumenta a trilha clássica da destruição tecidual, resultando em doença periodontal mais grave e em maior dificuldade de controlar a glicemia do diabético. (SCANNAPIECO, 2004), além de contribuir para uma cascata pro-inflamatória, promovendo a produção de citocinas como TNF- α e IL-6 por macrófagos e estimulando a secreção hepática de proteínas de fase aguda (LIN, 2006; MARCHETTI et al., 2012). De fato, a restrição de AGEs na dieta de indivíduos diabéticos ocasionou diminuição da concentração de TNF- α (LUÉVANO-CONTERAS et al., 2013).

Estudos posteriores que buscaram investigar as vias de sinalização intracelular ativadas por processos inflamatórios promoveram avanços no entendimento da relação entre citocinas pro-inflamatórias e a resistência à insulina. Citocinas pro-inflamatórias, como o TNF- α e IL-1 β são capazes de ativar as vias da c-Jun amino-terminal kinase (JNK) e do I κ B kinase β /fator nuclear κ B (IKK β /NF- κ B) por meio da interação com receptores específicos presentes na membrana plasmática e, assim, promover uma cascata de sinalização intracelular que culmina na resistência à insulina (SHOELSON et al., 2006).

JNK é um grupo de serina/treonina quinases (JNK-1, 2 e 3) pertencentes à família da MAPK que são responsáveis pela regulação de diversas atividades no desenvolvimento e função celular. Esta regulação se dá, em grande parte, devido à sua habilidade de controlar a transcrição de genes específicos por meio das proteínas ativadoras- 1 (AP-1) (WELLEN;

HOTAMISLIGIL, 2005). O AP-1 é um fator de transcrição que, quando ativado, promove a expressão de genes relacionados à imunidade inata (BENNET et al., 2003).

O fator nuclear κ B (NF- κ B) é um fator de transcrição que regula a expressão de diversos genes envolvidos em inúmeros processos como respostas inflamatórias e imunes, crescimento e desenvolvimento celular. Na ausência de um estímulo ativador, o NF- κ B encontra-se ligado a uma proteína inibidora, o I κ B. Desta maneira, o complexo NF- κ B/ I κ B permanece no citosol e, portanto, na sua forma inativa. O estímulo da célula pelo TNF- α ocasiona uma via de sinalização que leva à ativação da subunidade β do complexo da I κ B quinase (IKK), que, por sua vez, fosforila o I κ B em dois resíduos de serina N-terminais. O I κ B fosforilado é reconhecido pelo maquinário ubiquitina ligase, o que leva à sua poliubiquitinação e subsequente degradação. Desta forma, os dímeros de NF- κ B passam a ficar livres e translocam-se para o núcleo, onde ligam-se ao DNA em sequências específicas da região promotora de genes-alvo, promovendo a transcrição de genes relacionados à resistência à insulina (NAPETSCHNIG; WU, 2013).

JNK1 e IKK β contribuem para a resistência à insulina por meio de diversos mecanismos, dentre os quais, a fosforilação em serina dos IRS1 e 2. Embora tenha sido demonstrado que o IKK β seja capaz de fosforilar IRS1 em vários resíduos de serina (GAO et al., 2002), ainda não está claro o quanto esta fosforilação pode contribuir para a resistência à insulina, uma vez que o IKK β parece exercer seus efeitos principalmente através do NF- κ B. Para o JNK1, no entanto, existe uma forte correlação entre sua ativação e a fosforilação em serina/treonina dos IRS1 e 2. Outro mecanismo através do qual JNK1 e IKK β promovem resistência à insulina é por meio da indução da expressão de genes de citocinas pro-inflamatórias em diferentes tipos celulares, especialmente em macrófagos (SOLINAS; KARIN, 2010). Evidências do envolvimento destas quinases na etiologia da resistência à insulina podem ser observadas em estudos em que se verificou que a neutralização ou ausência de JNK e IKK β promoveram melhora da resistência à insulina e diminuição da expressão de citocinas pro-inflamatórias (ARKAN et al., 2005; SABIO et al., 2014).

A insulina exerce seu efeito pela da ligação a um receptor específico na membrana plasmática. O receptor de insulina é uma glicoproteína heterotetramérica constituído por duas subunidades alfa e duas subunidades beta, ligadas por pontes de dissulfeto (KASUGA et al., 1982a). A subunidade alfa é inteiramente extracelular, com peso molecular de 135 kDa, e

contém o sítio de ligação da insulina. A subunidade beta é uma proteína transmembrânica (95 kDa) responsável pela transdução do sinal insulínico (KASUGA et al., 1982a, 1982b).

Kasuga et al. (1982b, 1982c) descreveram que a subunidade beta do receptor de insulina é uma proteína quinase, estimulada pela insulina, sendo capaz de autofosforilar-se e de fosforilar outros substratos em aminoácidos tirosina. Essa atividade do receptor de insulina é importante para a ação insulínica (EBINA et al., 1987). O receptor, uma vez fosforilado em decorrência de sua ativação por insulina, passa a fosforilar substratos intracitoplasmáticos, como por exemplo, a pp185. Este foi o primeiro substrato do receptor de insulina estudado, com peso molecular de aproximadamente 185 kDa (WHITE et al., 1985). Sun et al. (1991) observaram que em células transfectadas com o receptor de insulina humano há um expressivo aumento da fosforilação em tirosina da pp185, coincidindo com aumento da ação insulínica.

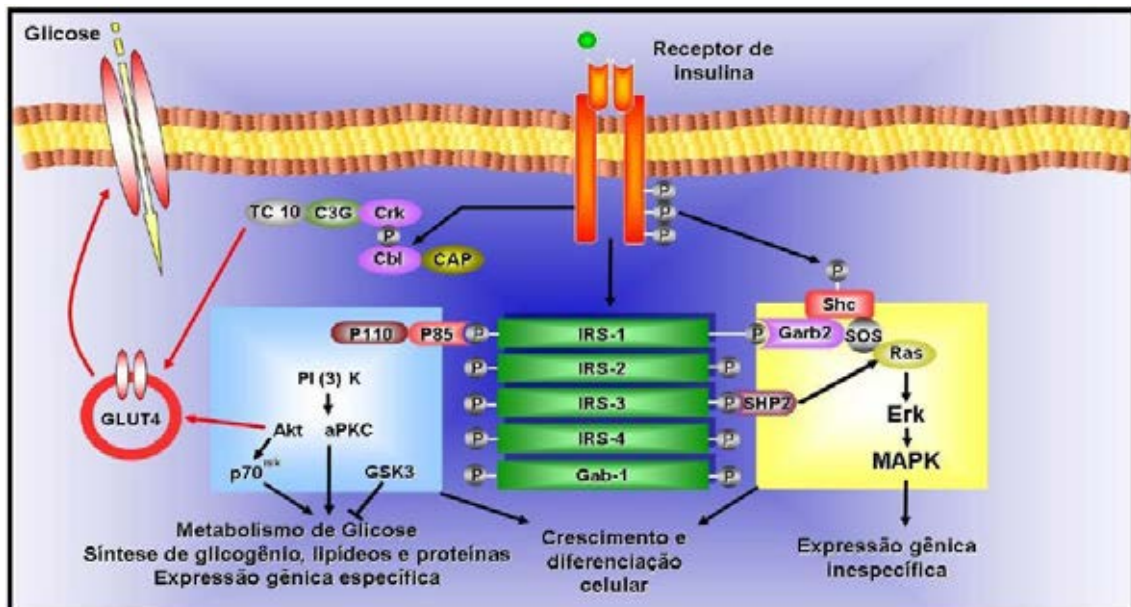
Em 1991, Sun e colaboradores clonaram a pp185 e denominaram-na de substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) e, após três anos, demonstrou-se que outra proteína também migrava na altura da banda desta proteína, que será denominada de IRS-2 (ARAKI et al., 1994; SUN et al., 1995; TAMEMOTO et al., 1994). Quando o IRS-1 e o IRS-2 estão fosforilados em tirosina, podem interagir com proteínas contendo a porção SH2 e ativá-las. Entre essas proteínas está uma enzima, a fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-k). Alessi et al. (1997) demonstraram que esta proteína ativada pode induzir a ativação de outras proteínas como a proteína quinase-1 dependente de fosfoinositideo (PDK1) e esta pode fosforilar e ativar a Akt (ou proteína quinase B – PKB). Esta proteína 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). A ativação desta proteína é essencial para síntese de glicogênio (CROSS et al., 1995), ação antiapoptótica (FRANKE et al., 1997), regulação da síntese lipídica (KITAMURA et al., 1999), síntese de proteínas (HAJDUCH et al., 1998), regulação da expressão gênica (VANHAESEBROECK; ALESSI 2000) e transporte de glicose estimulado pela insulina (WANG et al., 1999). Outras proteínas da mesma família do IRS-1, como o IRS-3 e IRS-4 podem também estimular o transporte de glicose (ZHOU et al., 1999). Cai et al. (2003) descobriram dois novos substratos do receptor de insulina, o IRS-5 e IRS-6.

Buren et al. (2003) demonstraram que altos níveis de insulina e glicose em longo prazo, particularmente em combinação, podem produzir, dentro de 24h de cultura de células adiposas de ratos, intensas alterações na capacidade de captação de glicose, no

conteúdo de IRS-1/2 e de proteína transportadora de glicose GLUT4 e na fosforilação da proteína kinase B (PKB) induzida pela insulina.

Em suma, a ação insulínica envolve uma seqüência de interações covalentes e não covalentes centralizadas, em primeiro nível, nos IRSs. A ligação da insulina ao seu receptor, na superfície celular, determina a fosforilação em tirosina destes substratos. Estes servem, então, como proteínas ancoradoras para várias enzimas intracelulares e adaptadores moleculares. Tais ligações determinam múltiplos sinais na cascata da ação insulínica, que contribuirão para determinar a multiplicidade dos efeitos biológicos finais (Figura 1). Portanto, os estudos que investigam alterações do mecanismo de ação de insulina presentes na resistência à insulina representam um passo importante na busca de mecanismos preventivos e ou curativo para o diabetes mellitus.

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).



Estudos epidemiológicos têm proporcionado evidências de que o nível de atividade física está associado com a incidência de DM2, mostrando que um programa de exercício

regular pode reduzir o risco de desenvolvimento deste tipo de diabetes (BORGHOUTS; KEIZER, 2000; MANSON et al., 1991).

Trabalhos de intervenção e epidemiológico têm demonstrado que mudanças no estilo de vida, adotando-se novos hábitos alimentares e prática regular de atividade física, diminuem a incidência de diabetes do tipo 2 em indivíduos com intolerância à glicose. Geralmente tem sido recomendada a realização de exercícios aeróbios para indivíduos com diabetes do tipo 2. No entanto, recentes estudos têm demonstrado que o exercício resistido também é benéfico no controle glicêmico de diabéticos do tipo 2 (CIOLAC; GUIMARÃES, 2004).

O exercício físico que desencadeia contrações musculares contra alguma forma de resistência externa, geralmente pesos, recebe as denominações de: treinamento com pesos, de força, contra-resistência e resistido. O treinamento resistido (TR), quando praticado com regularidade, pode aumentar a força muscular com positivas repercussões na proteção contra as quedas, além do eficiente estímulo para o aumento da massa óssea, influenciando fatores de risco relacionados com osteoporose (JOVINE et al., 2006).

Nuutila et al. (1994) em um estudo transversal conduzido em humanos, observou que atletas apresentam menores níveis de insulina e maior sensibilidade à insulina quando comparados a seus congêneres sedentários. Pesquisas demonstram que atletas másteres (idade acima dos 60 anos) que realizam exercícios regularmente podem prevenir a deterioração da tolerância à glicose e da sensibilidade à insulina associada ao envelhecimento (ROGERS et al., 1990; SEALS et al., 1984).

O efeito do exercício físico sobre a sensibilidade à insulina tem sido demonstrado em diversos estudos. Burstein et al. (1985) avaliaram o efeito do treinamento aeróbico e do destreinamento sobre a captação da glicose estimulada por insulina; e observaram que a taxa de depuração metabólica de glicose, medida pela técnica do clamp euglicêmico, foi significativamente maior em indivíduos treinados ($15,6 + 1,8$ ml/ kg/ min), 12 horas após a sessão de exercício, em comparação ao grupo controle ($7,8 + 1,2$ ml/ kg/ min) composto por indivíduos não treinados. Neste estudo também foi verificado que quando os indivíduos treinados abstiveram-se do treinamento físico por 60 horas, a taxa de depuração metabólica de glicose diminuiu para $10,1 + 1,0$ ml / kg / min, e ainda para $8,5 + 0,5$ ml / kg / min após 7 dias de destreinamento.

Mikines et al. (1988) estudaram o efeito do exercício físico agudo na sensibilidade à insulina e na capacidade de resposta da captação de glicose. Sete homens não treinados foram submetidos a avaliações pela técnica do clamp euglicêmico hiperinsulinêmico em três situações: 1) após 1 hora de repouso; 2) imediatamente após o exercício; 3) 48 horas após 60 minutos de exercício cicloergômetro; e constataram que a captação de glicose mediada por insulina avaliada imediatamente após o exercício e 48 horas após 60 minutos de exercício cicloergômetro foi maior quando comparado ao observado após 1 hora de repouso.

Em um estudo randomizado, Mavros e colaboradores (2013) observaram que indivíduos diabéticos tipo 2 submetidos a um protocolo de treinamento resistido apresentaram melhora na resistência insulínica, independentemente da perda de peso.

Durante o exercício físico, a contração muscular aumenta a translocação de GLUT4 independentemente da presença de insulina. Schimmack et al. (2006) demonstraram que este aumento de GLUT4 na membrana plasmática durante o exercício é decorrente da ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK). E esta ativação promove a captação de glicose e a oxidação de ácidos graxos. Ademais, Musi; Goodyear (2003) observaram que a ativação da AMPK associada ao aumento da captação de glicose é influenciada por fatores como conteúdo de glicose, tipo de fibra muscular e treinamento físico.

Entretanto, o mecanismo de transporte de glicose através da via de sinalização da AMPK não parece ser o único mecanismo responsável por esse processo metabólico. De maneira semelhante, existem inúmeras outras moléculas envolvidas nesse mecanismo de sinalização durante o exercício. O aumento na concentração do íon cálcio no interior da célula, a atividade da óxido nítrico sintase (NOS) e a síntese por ela de óxido nítrico (NO), o aumento na concentração de bradicinina ou até mesmo a hipóxia podem estimular a captação de glicose através do aumento da translocação do GLUT4 para a membrana durante a contração muscular (PAULI et al., 2009). Além disso, novas evidências científicas mostram que o exercício físico pode, além dos efeitos positivos sobre a via de sinalização dependente de insulina (IR/IRSs/PI3-q/Akt) e/ou independente de insulina (via AMPK e/ou outras biomoléculas), também pode beneficiar o indivíduo obeso com resistência à insulina por diminuir a expressão e/ou atividade de proteínas inflamatórias de efeito negativo à ação da insulina (PAULI et al., 2009).

A combinação de insulina e exercício resulta em efeitos aditivos em relação ao transporte de glicose associado ao recrutamento do transportador GLUT4 para a membrana plasmática, o que confirma as hipóteses sugeridas sobre a estimulação de dois mecanismos diferentes nos quais haveria duas localizações de *pools* intracelulares distintos de transportadores de glicose, ou seja, um que responde ao exercício e outro que responde à insulina (GOODYEAR; KAHN, 1998). Uma das justificativas para essa hipótese refere-se à capacidade da insulina – e não do exercício – em provocar uma redistribuição de Rab4, uma proteína transportadora de GTP (*GTP-binding protein*), que está implicada na regulação da translocação de GLUT4 em células adiposas (SHERMAN et al., 1996).

Considerando-se a importância da inflamação na patogênese da resistência à insulina e DM2, bem como os efeitos positivos da atividade física sobre a sensibilidade à insulina, faz-se necessário verificar a relação entre a atividade física e processos inflamatórios. Talebi-Garakani e Safarzade (2013) analisaram as concentrações plasmáticas de citocinas pró-inflamatórias em ratos diabéticos submetidos a quatro semanas de treinamento resistido e observaram que, após este período, houve diminuição na concentração de TNF- α , IL-6 e proteína reativa C ultra sensível.

Lemos et al. (2011) observaram que ratos ZDF (Zucker diabetic fatty) diabéticos submetidos a um treinamento físico moderado apresentaram níveis mais baixos de TNF- α , embora o oposto tenha sido observado naqueles submetidos à atividade física intensa. Lemos et al. (2007) sugerem que o treinamento moderado regular produz efeitos benéficos sobre o diabetes, devido à sua ação anti-inflamatória e antioxidante. Baseado nesta informação, estes autores inferiram que o exercício físico regular pode constituir uma medida importante como coadjuvante da terapêutica farmacológica.

Há vários autores que estudam o efeito anti-inflamatório do exercício físico (MATHUR; PEDERSEN, 2008; NICKLAS et al., 2005). Durante a contração muscular, o músculo é capaz de liberar substâncias capazes de modificar a produção de citocinas em outros tecidos, como a interleucina-6 (PETERSEN; PEDERSEN, 2006). A IL-6 produzida pelos músculos em resposta ao exercício físico promove a liberação de outras citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e IL-1ra (antagonista do receptor de IL-1), e inibe a produção de IL-1 β e TNF- α , diferentemente da IL-6 produzida pelo tecido adiposo (HOPPS et al., 2011).

Conforme descrito anteriormente, há na literatura diversos artigos científicos que relatam a associação de diabetes e doenças periodontal, os quais relatam que o DM leva a

um agravamento da DP e esta por sua vez piora o quadro de DM, ou seja, piorando o quadro de resistência à insulina; e o exercício físico por sua vez, melhora a sensibilidade à insulina. No entanto, ainda não há estudos demonstrando que o exercício físico possa reverter ou melhorar o sinal insulínico e a resistência à insulina encontrada em ratos com DP.

2 OBJETIVOS

Sabendo-se que a DP reduz a sensibilidade insulínica e o sinal insulínico, tornou-se fundamental averiguar se o treinamento resistido consegue reverter ou melhorar esse quadro em ratos com DP. Portanto, foram avaliados em ratos com DP submetidos ou não ao exercício: 1) sensibilidade à insulina; 2) grau de fosforilação em tirosina e serina do substrato do receptor de insulina pp185 (IRS-1/IRS-2); 3) glicemia, insulinemia, colesterolemia e trigliceridemia; 4) concentrações plasmáticas de TNF- α e IL-6.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 80 ratos Wistar de 2 meses de idade, mantidos em ambiente de 12/12 horas de claro e escuro (período claro iniciado às 7 horas) e temperatura de $23 \pm 2^\circ \text{C}$, recebendo água e ração *ad libitum*. Os ratos foram distribuídos em quatro grupos: 1) grupo controle sedentário sem DP (CNS); 2) grupo controle exercitado sem DP (CNEEx); 3) grupo sedentário com DP (DPS); 4) grupo com DP submetido à atividade física (DPEEx).

Os animais dos grupos DPS e DPEEx foram anestesiados usando cloridrato de cetamina (10%, 80 peso corporal mg / kg, ip) com xilazina (2%, 10 mg de peso corporal / kg, ip), e a doença periodontal foi induzida por meio de ligadura com fio de seda 4-0 na região cervical dos primeiros molares inferiores, bilateralmente. Após a colocação da ligadura foram avaliados a ingestão de ração (três vezes por semana) e o peso corporal dos ratos (uma vez por semana) de ambos os grupos. O trabalho está de acordo com os princípios éticos em uso de animais e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (processo 00510-2012).

Após 28 dias da indução da doença periodontal, foi realizado em um grupo de animais o primeiro teste de intolerância à insulina (ITT) e, posteriormente, o treinamento resistido foi iniciado. Foram realizadas duas semanas de treinamento físico com o intuito de adaptação dos animais e, posteriormente, o treinamento foi conduzido por doze semanas, conforme descrito abaixo.

Decorrido este período, os experimentos foram realizados. Após serem submetidos a jejum de 12 horas, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (Thiopentax® - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, Brasil, 3%, 5mg/ 100g p.c., i.p.) e, sob anestesia, foi realizada a laparotomia mediana, coletando-se sangue pela veia cava inferior. As amostras de sangue foram transferidas para tubos de plástico heparinizados e mantidas a 4°C até a centrifugação a 800 g (4°C , 15 minutos). O plasma obtido foi armazenado a -70°C até o dia da quantificação da insulinemia, glicemia, TNF- α , IL-6, colesterolemia e trigliceridemia. Um grupo de animais foi novamente submetido ao ITT conforme descrito abaixo. Em outro grupo foi quantificado, em tecido hepático, muscular (gastrocnêmio) e adiposo, o grau de fosforilação em tirosina e serina do substrato do receptor de insulina (pp185- IRS-1/IRS-2), após estímulo insulínico. Para tanto, estes animais

foram anestesiados conforme descrito anteriormente, realizando-se em seguida laparotomia mediana, com retirada de amostras dos tecidos.

3.2 Programa Orientado de Treinamento Resistido

Os animais realizaram o treinamento proposto por meio de uma escada, com as seguintes dimensões: (1.13 x 0.18 m, 2 cm grade), com 80° de inclinação; no topo da escada existe um local (casa), com diâmetro de 20 x 20 x 20 cm, onde ocorreu o descanso durante as subidas (HORNBERGER; FARRAR, 2004).

Os animais dos grupos doença periodontal (DPEX) e Controle Exercitados (CNEEx), realizaram um período de adaptação ao treinamento resistido, onde os mesmos fizeram durante a primeira semana de treinamento 8 repetições (subidas), com 30 segundos de descanso entre as subidas, 3 vezes por semana, sem acréscimo de carga. Na segunda semana os animais realizaram 12 repetições, com 30 segundos de descanso entre as mesmas, 3 vezes por semana. Após 2 semanas de treinamento foi realizado o teste de uma repetição máxima (1-RM), com o intuito de quantificar a força máxima de cada animal e a partir do teste, estipular porcentagens de trabalho para os grupos. Durante o teste de 1-RM os animais realizaram subida da escada com carga inicial de 200g, posteriormente, foi acrescentado 10g a cada subida, com um intervalo 2 minutos entre as subidas para descanso dos animais.

Ao término do período de adaptação e do teste de 1-RM, os grupos CNEEx e DPEX foram submetidos ao programa orientado de treinamento resistido em modo de circuito, 3 dias por semana, 20 minutos divididos em 5 séries de 8 repetições. Na primeira semana não houve acréscimo de carga, na segunda semana ocorreu acréscimo de sobrecarga através de um aparato acoplado à cauda (esferas de aço) referente a 60% do valor obtido através do teste de 1-RM. A partir da terceira semana, houve um acréscimo sucessivo de 5% de sobrecarga semanalmente, em relação ao valor obtido por meio do teste de 1-RM, durante 12 semanas.

3.3 Teste endovenoso de tolerância à insulina (ITT) curto

Os testes foram realizados pela manhã após jejum de 14 horas. Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (Thiopentax® - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, Brasil, 3%, 5mg/ 100g p.c., i.p.), e, sob esta anestesia, foi realizada a injeção de insulina (via veia peniana) que foi ministrada na dose de 0,75U / kg p.c.. Amostras de sangue foram colhidas (por secção da cauda) aos 0 (antes da injeção hormonal), 4, 8, 12, 16 minutos após insulina e a glicemia foi medida utilizando-se um monitor de glicemia (Accu-Chek Advantage, Roche Diagnostics, (Mannheim, Germany). A velocidade de desaparecimento da glicose (Kitt) foi calculada pela fórmula $\ln/t \frac{1}{2}$. O $t \frac{1}{2}$ da glicose foi calculado a partir da inclinação da curva de regressão mínima durante a fase linear de declínio da concentração plasmática de glicose (BONORA et al., 1989). O ITT foi realizado em dois momentos distintos, após 28 dias da indução da doença periodontal e, posteriormente, após o treinamento resistido.

3.4 Determinação da glicemia (método de glicose-oxidase)

A glicemia foi determinada pelo método da glicose-oxidase que é um método enzimático específico para quantificação de glicose (Enzymatic glucose, ANALISA Diagnóstica, Belo Horizonte, Brasil).

Neste método a glicose é oxidada enzimaticamente pela glicose oxidase, gerando ácido glucônico e água oxigenada. 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 505nm de comprimento de onda.

Para a dosagem de glicemia foram utilizados 10 μ L da amostra de plasma ou de padrão (100mg/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

1. Glicose (mg/dl) = (Absorbância do teste \div Absorbância do padrão) x 100
2. Glicose (mmol/L) = mg/dl x 0,0556

3.5 Determinação de insulinemia

A insulinemia foi quantificada pelo método radioimunológico –RIE (Coat-A-Count, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA). 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 estiver presente, mais será formado complexo insulina fria-anticorpo, acarretando queda na quantidade de complexo insulina marcada-anticorpo.

3.6 Análise do HOMA-IR

A resistência à insulina foi avaliada através do índice HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment - Insulin Resistance / Modelo de Avaliação da Homeostase - Resistência à Insulina), calculado a partir da fórmula, como segue: $HOMA - IR = \text{glicemia de jejum (mmol/L)} \times \text{insulinemia de jejum } (\mu\text{UI/ml}) / 22,5$.

3.7 Concentração plasmática de TNF- α e IL-6

As concentrações plasmáticas de TNF- α e IL-6 foram determinadas pelo método de ELISA com a utilização de kits de acordo com as instruções dos fabricantes. Os kits comerciais utilizados foram, respectivamente, Biosource International, Camarillo, USA; BD Biosciences, San Diego, USA.

3.8 Determinação da concentração plasmática de colesterol total

A concentração plasmática de colesterol total foi determinada pelo método de colesterol oxidase, que é um método enzimático específico esta análise (Katal Biotecnológica Ind. Com. Ltda., Belo Horizonte, Brasil).

No presente método, 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 10µL da amostra ou de padrão e 1,0 mL de reagente enzimático. Essa solução foi bem 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

3.9 Determinação da concentração plasmática do Colesterol HDL

A determinação da concentração plasmática do Colesterol HDL (C-HDL) 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, as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e muito baixa densidade (VLDL) sem alterar a solubilidade das lipoproteínas de alta densidade (HDL). Após centrifugação, recolhe-se o líquido sobrenadante que contém a fração HDL cujo conteúdo em colesterol (Colesterol HDL) é determinado enzimaticamente.

Para a dosagem de HDL foram utilizados 100µL 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 absorbâncias do teste e do padrão foram determinadas em 500nm 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.

3.10 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).

Neste 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. Este, 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 10µL 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 absorbâncias do teste e do padrão foram determinadas em 500nm acertando o zero com o branco.

Cálculos

Triglicérides (mg/dl) = (Absorbância do Teste ÷ Absorbância do Padrão) x200

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

3.11 Determinação da concentração plasmática do LDL-C e VLDL-C

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

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

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

3.12 Avaliação do grau de fosforilação em tirosina e serina do substrato do receptor de insulina (pp185- IRS-1/IRS-2):

3.12.1 Preparação das amostras:

Um grupo de ratos foi submetido à laparotomia mediana, com retirada de amostras de tecidos hepático, muscular (gastrocnêmio) e adiposo branco periepididimal antes e após a injeção de 1,5 U de insulina regular (i.v. veia porta) em tempos variáveis (30s para fígado, 90s para o gastrocnêmio, 120s para o tecido adiposo branco periepididimal) a fim de quantificar o grau de fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina pp185 (IRS-1/IRS-2) e em serina do IRS-1, após estímulo insulínico. Imediatamente após a extração, os tecidos foram homogeneizados em Polytron (24000 rpm durante 10 s) 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), e mantidos em banho-maria (100°C) durante 10 min, transferidos para gelo, e então centrifugados 16000g durante 40 min (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 de Laemmli (azul de bromofenol 0,1%; SDS 10 %; fosfato de sódio 1M pH 7,0; glicerol 50%; DTT15%).

3.12.2 “Western blotting”:

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

A primeira etapa do Western blotting consistiu na submissão das amostras a uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida. 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 e modificado por Garfin (1990), o qual envolve um sistema descontínuo de dois géis contíguos, mas diferentes: 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 fica sob o gel de “stacking”, com orientação vertical, num sistema de câmaras que mantém 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 min. A eletroforese foi realizada em equipamento para minigel da *Bio Rad* (Mini-Protean, Bio Rad Laboratories, Richmond, CA), e começou com a corrida no gel de “stacking” sob voltagem constante em 30 mV até que ocorreu o empacotamento da amostra, o que pode ser observado na transição dos géis. Posteriormente foi aplicada voltagem constante de 100 V para a corrida no gel de resolução, durante 2h.

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

- **“Electrophoretictransfer”:**

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 (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England). A transferência foi realizada sob voltagem constante de 100 V, durante 2h, a 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 (KRUGER; 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 - 0% de gordura) durante 2h à temperatura ambiente, e então, lavada com solução basal por três sessões de 10 min. Em seguida, a membrana foi incubada em solução (SB + 3% de leite desnatado) contendo o anticorpo antifosfotirosina (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, USA), antifosfoserina-IRS1 (Ser307) (UPSTATE, New York, EUA) ou anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, USA) que foi utilizado como controle por 4h em temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizadas três lavagens com solução basal, e a membrana foi incubada durante 1h com segundo anticorpo contendo peroxidase de “horseradish” (“kit’ de quimioluminescência – ECL – Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England). Novamente, foram realizadas 3 lavagens da membrana de nitrocelulose com solução basal, com duração de 10 min cada lavagem. Adicionou-se 1 ml de cada solução de detecção 1 e 2 (do kit de ECL), 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– Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England), durante 10 min à temperatura ambiente. O filme foi processado com solução reveladora e reforçadora GBX (KODAK BRASILEIRA, São Paulo, BR) e solução fixadora e reforçadora GBX (KODAK BRASILEIRA, São Paulo, BR).

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

3.13 Análise Estatística

Todos os valores são apresentados como média \pm EPM. A análise estatística foi feita pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey, e as diferenças entre os grupos foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Ingestão alimentar e massa corpórea

Não foi encontrada diferença significativa na ingestão alimentar total entre os grupos CNS, CNEx, DPS e DPEX (Tabela 1). Na análise das massas corpórea dos grupos CNS, CNEx, DPS e DPEX observou-se que não houve diferença significativa entre estes grupos no início do experimento. Semelhantemente, não foi encontrada diferença neste parâmetro no final do experimento (Tabela 2).

Tabela 1 - Ingestão alimentar total (g) dos grupos CNS, CNEx, DPS e DPEX.

Grupo	Consumo total (g)
CNS	1883 ± 20,88
CNEx	1946 ± 20,93
DPS	1867 ± 21,23
DPEX	1880 ± 24,77

Valores expressos como média ± EPM, n= 10.

Tabela 2 - Massa corpórea (g) dos grupos CNS, CNEx, DPS e DPEX no início e final do experimento.

Grupo	Massa inicial (g)	Massa final (g)
CNS	254,4 ± 6,4	498,7 ± 12,0
CNEx	256,8 ± 6,7	500,6 ± 9,2
DPS	243,7 ± 6,4	489,5 ± 5,2
DPEX	244,9 ± 4,4	498,9 ± 9,9

Valores expressos como média ± EPM, n= 10.

4.2 Treinamento resistido

A realização quinzenal do teste de 1-RM demonstrou que não houve diferença entre as cargas máximas dos grupos CNEx e DPEX ao longo do período de treinamento resistido.

Tabela 3 - Valores das cargas (g) utilizadas no treinamento resistido definidos pelo teste de 1-RM dos grupos CNEx e DPEX.

1-RM	CNEx	DPEX
1	291	289
2	320	319
3	351	347
4	398	395
5	450	444
6	497	492

Valores expressos como média \pm EPM, n= 10.

4.2 Glicemia, Insulinemia e HOMA-IR

Os valores da glicemia, insulinemia e HOMA-IR podem ser observados na tabela 3. Não foi encontrada diferença significativa na glicemia entre os grupos estudados. Entretanto, a análise da insulinemia revelou que o grupo DP apresentou maior valor de insulinemia quando comparado aos grupos CNS, CNEx e DPEX. Por outro lado o grupo DPEX apresentou maior insulinemia somente quando comparado ao CNS. Por meio do índice HOMA-IR observou-se que o grupo DPS apresentou maior resistência insulínica quando comparado com todos os demais grupos, enquanto o grupo DPEX apresentou diferença apenas quando comparado ao grupo CNS.

Tabela 4 – Glicemia (mg/dL), insulinemia (μ IU/mL) e HOMA-IR dos grupos controle sedentário (CNS), controle exercitado (CNEEx), doença periodontal sedentário (DPS) e doença periodontal exercitado (DPEEx).

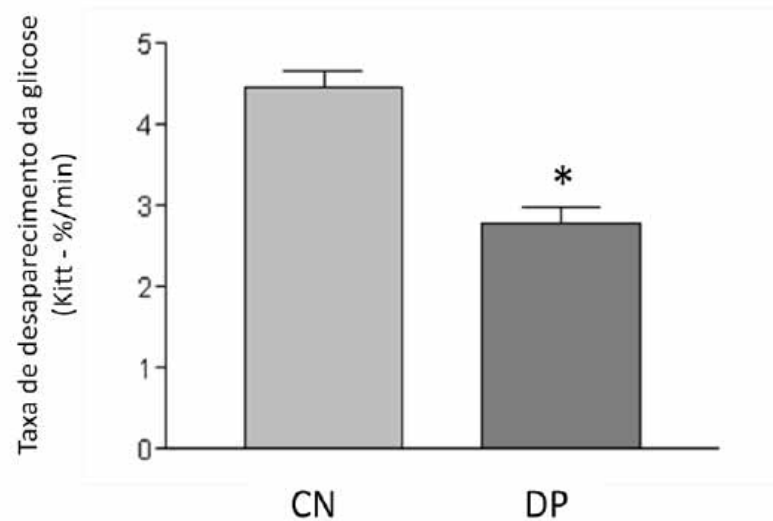
	CNS	CNEEx	DPS	DPEEx
Glicemia (mg/dL)	92,22 \pm 2,84	102,4 \pm 2,20	98,56 \pm 4,02	101,60 \pm 2,61
Insulinemia (μ IU/mL)	3,32 \pm 0,40	4,49 \pm 0,28	9,79 \pm 6,93*	6,93 \pm 0,92 [#]
HOMA-IR	0,78 \pm 0,07	1,08 \pm 0,05	2,36 \pm 0,22*	1,59 \pm 0,18 [#]

Os valores são expressos como media \pm EPM, n = 9. *P < 0,05 DPS vs CNS, CNEEx e DPEEx. [#]P < 0,05 DPEEx vs CNS. [†]P < 0,05 DPS vs CNS e DPEEx.

4.3 Teste de Tolerância à Insulina (ITT)

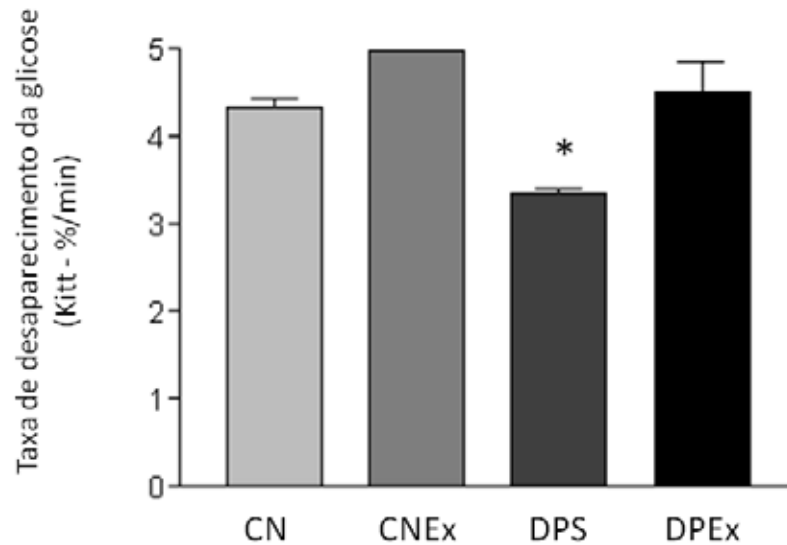
Ao realizar o ITT, após 28 dias da indução da doença periodontal (antes do período de treinamento resistido), observou-se redução significativa na constante de decaimento de glicose (Kitt) do grupo com doença periodontal quando comparada com o grupo controle (Figura 2).

FIGURA 2 – Constante de decaimento da Glicemia (Kitt) expressa em porcentagem de decaimento da glicemia por minuto dos grupos controle (CN) e com doença periodontal (DP), antes do treinamento resistido. Valores são expressos como Média \pm EPM, n = 12. *P < 0,05 CN vs DP.



Após o período de treinamento físico verificou-se que o valor do Kitt do grupo DPS foi significativamente menor em relação aos grupos controle (CNS e CNEEx) e DPEEx. Porém, não houve diferença entre os grupos controle CNS e CNEEx (Figura 3).

FIGURA 3 – Constante de decaimento da Glicemia (Kitt) expressa em porcentagem de decaimento da glicemia por minuto após o treinamento resistido dos grupos controle sedentário (CNS), controle exercitado (CNEx), doença periodontal sedentário (DPS) e doença periodontal exercitado (DPEX). Valores são expressos como Média \pm EPM, n= 6. *P < 0,05 DPS vs CNS, CNEX e DPEX.



4.4 Concentrações plasmáticas de TNF- α e IL-6

Após a análise da concentração plasmática de TNF- α , observou-se que o grupo DPS apresentou maior concentração plasmática desta citocina em relação aos grupos CNS e DPEX, mas não em relação ao grupo CNEx. Ademais, também não foram observadas diferenças entre os grupos CNS, CNEx e DPEX. Não houve diferença significativa na concentração plasmática de IL-6 entre os grupos estudados.

Tabela 5 – Concentrações plasmáticas de TNF- α e IL-6 dos grupos controle sedentário (CNS), controle exercitado (CNEEx), doença periodontal sedentário (DPS) e doença periodontal exercitado (DPEEx).

	CNS	CNEEx	DPS	DPEEx
TNF- α (pg/mL)	6,95 \pm 0,32	7,66 \pm 0,33	9,56 \pm 0,90 ⁺	7,24 \pm 0,14
IL-6	33,82 \pm 0,97	32,23 \pm 0,93	34,52 \pm 0,47	34,55 \pm 0,51

Os valores são expressos como média \pm EPM, n = 10. ⁺P < 0,05 DPS vs CNS e DPEEx

4.5 Lipidemia de jejum

Não foi observada diferença significativa nas concentrações plasmáticas de triglicérides, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL e colesterol VLDL entre os grupos CNS, CNEEx, DPS e DPEEx.

Tabela 6 - Lipidemia em jejum dos grupos controle sedentário (CNS), controle exercitado (CNEEx), doença periodontal sedentário (DPS) e doença periodontal exercitado (DPEEx).

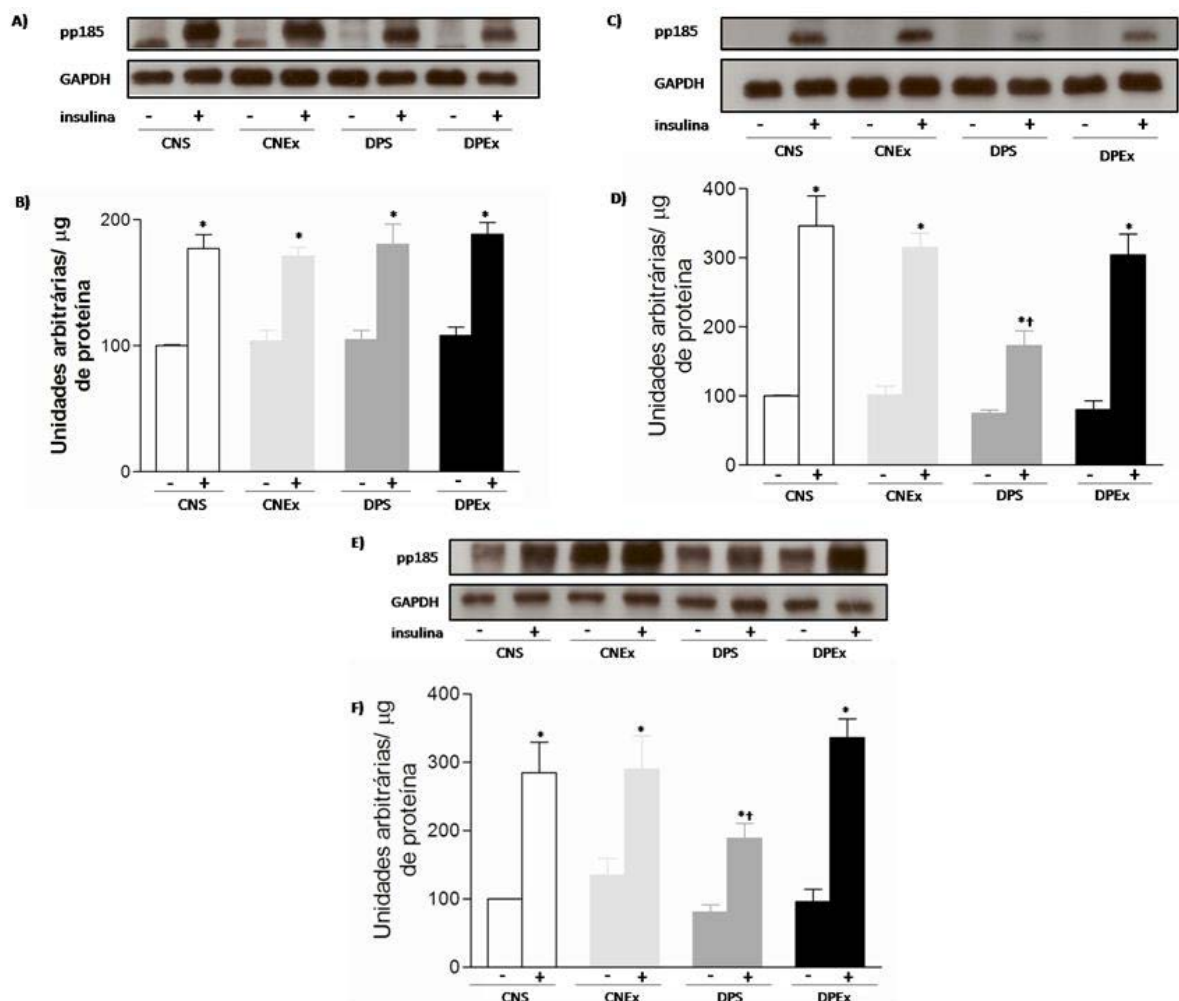
	CNS	CNEEx	DPS	DPEEx
Triglicérides (mg/dL)	72,03 \pm 6,65	72,60 \pm 2,99	69,83 \pm 1,92	71,58 \pm 2,64
Colesterol total (mg/dL)	76,58 \pm 3,62	84,63 \pm 4,39	87,46 \pm 2,13	94,44 \pm 4,73
Colesterol HDL (mg/dL)	35,58 \pm 0,83	33,11 \pm 1,10	33,79 \pm 0,74	34,76 \pm 0,90
Colesterol LDL (mg/dL)	38,03 \pm 1,95	37,00 \pm 3,85	40,03 \pm 1,72	44,53 \pm 5,06
Colesterol VLDL (mg/dL)	14,41 \pm 1,33	14,52 \pm 0,59	13,97 \pm 0,38	15,15 \pm 0,74

Valores expressos como média \pm EPM, n = 10.

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

Uma análise intragrupos revelou um aumento no grau de fosforilação em tirosina da pp185 após estímulo insulínico com relação ao estado basal em todos os tecidos estudados. Já a análise intergrupos revelou que, após o estímulo insulínico, o grau de fosforilação em tirosina da pp185 foi significativamente reduzido em músculo e tecido adiposo no grupo DPS quando comparado aos grupos CNS, CNEx e DPEx. Esta diferença intergrupos não foi observada em fígado (Figura 4).

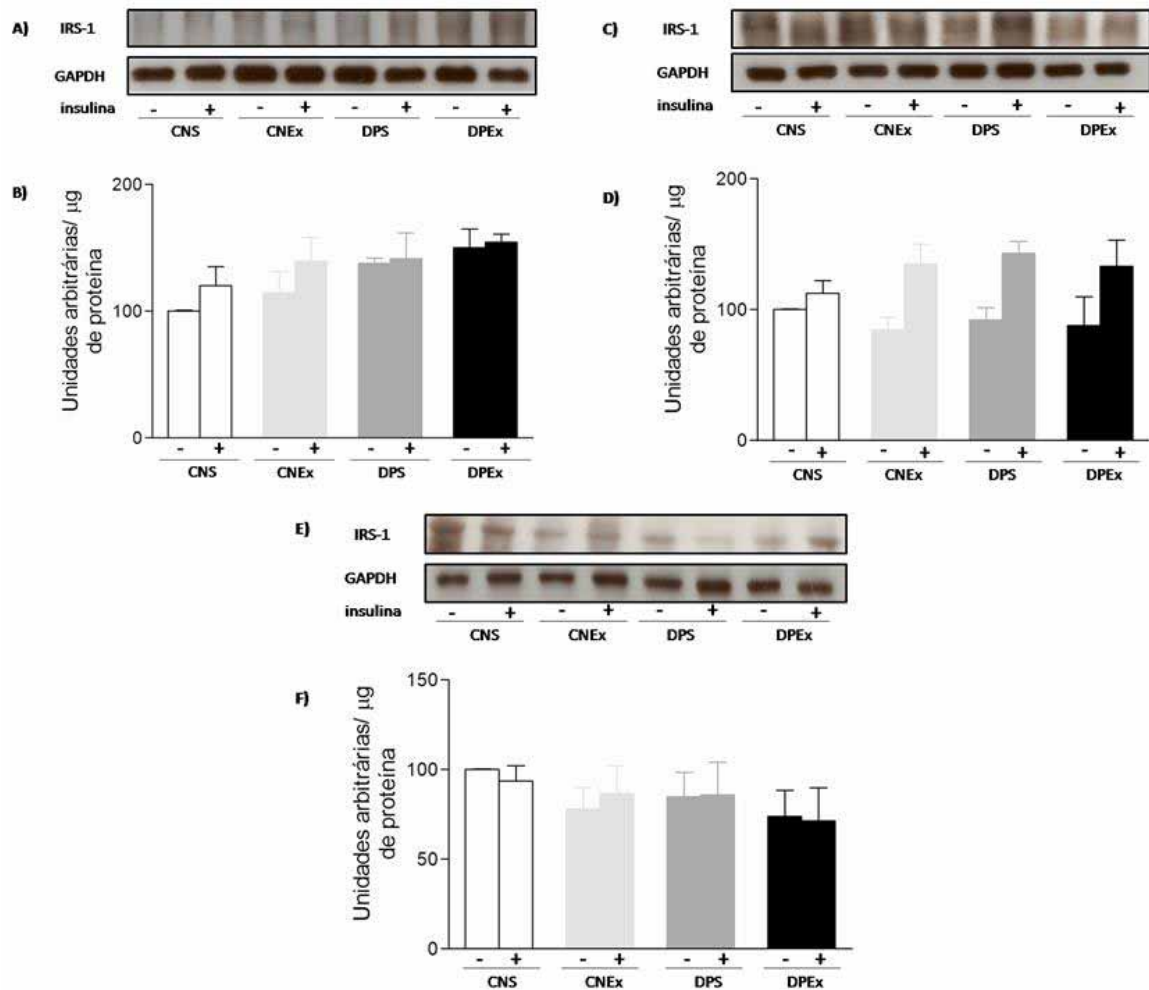
Figura 4 - Avaliação do grau de fosforilação em tirosina da pp185 (IRS-1/IRS-2) antes (-) e após (+) o estímulo insulínico em fígado (A, B), músculo gastrocnêmio (C,D) e tecido adiposo branco periepídídimo (E, F) dos grupos controle sedentário (CNS), controle exercitado (CNEEx), doença periodontal sedentário (DPS) e doença periodontal exercitado (DPEEx). Em **A, C e E** autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 µg). GAPDH foi utilizado 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 DPS (+) vs. CNS (+), CNEEx (+) e DPEEx (+).



4.7 Avaliação do grau de fosforilação em serina do substrato do receptor de insulina pp185 (IRS-1/IRS-2) no tecido adiposo branco periepídídimal, músculo esquelético gastrocnêmio e fígado.

Comparando-se os grupos CNS, CNEx, DPS e DPEx, observou-se que tanto no estado basal quanto após o estímulo insulínico não houve diferença significativa na fosforilação em serina do IRS-1 em nenhum dos tecidos estudados (Figura 5).

Figura 5 - Avaliação do grau de fosforilação em serina do IRS-1 (Ser 307) antes (-) e após (+) o estímulo insulínico em fígado (A, B), músculo gastrocnêmio (C,D) e tecido adiposo branco periepídídimo (E, F) dos grupos CNS, CNEx, DPS e DPEx. Em **A**, **C** e **E** autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 µg). GAPDH foi utilizado como controle. Em **B**, **D** e **F**, valores do grau de fosforilação em serina do IRS-1, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média ± EPM, n=6.



5 DISCUSSÃO

No presente estudo foi possível observar uma relação entre a doença periodontal e a sensibilidade insulínica, além da influência do exercício físico sobre as mesmas, no qual observou-se que a indução da doença periodontal promoveu resistência à insulina em ratos adultos e o exercício físico reverteu esta alteração.

Para a realização deste estudo foi utilizado o modelo de doença periodontal induzida por ligadura em ratos. Em seu estudo, Colombo et al. (2012) utilizando o mesmo modelo de indução de doença periodontal, demonstraram a efetividade deste modelo. Estes autores observaram por meio de cortes histológicos e análise radiográfica que houve perda óssea em ratos com doença periodontal induzida por ligadura.

A análise da ingestão alimentar (Tabela 1) não revelou diferença significativa entre os grupos estudados e, conseqüentemente, também não foi observada diferença na massa corpórea (Tabela 2) dos grupos CNS, CNEx, DPS e DPEx. Este resultado está de acordo com estudos anteriores como de Colombo et al. (2012) e Porto et al. (2013) que também não observaram tais alterações em ratos com doença periodontal.

O treinamento resistido também não teve influência na ingestão alimentar e massa corpórea. Talebi-Garakani e Safarzade (2013) observaram em seu estudo que ratos diabéticos submetidos à treinamento resistido não apresentaram diferença na massa corpórea quando comparados aos diabéticos sedentários, no entanto, o exercício físico diminuiu marcadores inflamatórios plasmáticos nestes animais, podendo ser importante na prevenção de complicações relacionadas ao diabetes. Estudo de Hall et al. (2013) demonstrou que o exercício físico melhorou a resistência à insulina de ratos diabéticos sem, no entanto, promover alterações na massa corporal.

Panvelosky-Costa et al. (2011) observaram que o treinamento resistido reduziu a expressão de RNAm de marcadores inflamatórios em músculo esquelético e melhoraram a sensibilidade insulínica de ratos obesos sem que houvesse influência da atividade física sobre a massa corpórea.

A existência de uma relação bidirecional entre a condição periodontal, diabetes melitus tipo 2 e resistência à insulina tem sido estudada (TAYLOR; BORGNAKKE, 2008). Alguns estudos demonstram que a presença de doença periodontal está relacionada a maiores concentrações plasmáticas de glicose em humanos quando comparados a

indivíduos com saúde periodontal adequada (KATZ, 2001; LÖSCHE et al., 2005). No entanto, no presente estudo não se observou diferença significativa entre as glicemias dos grupos estudados (Tabela 3). Este resultado está de acordo com estudos de Machado et al. (2005) que não observaram aumento da glicemia em humanos com DP e Andersen et al. (2006) e Colombo et al. (2012) que não observaram diferença na glicemia de ratos com DP em relação ao controle.

A análise da insulinemia revelou que os ratos do grupo DPS obtiveram maior insulinemia quando comparados com os grupos controle (CNS e CNEx) (Tabela 3). Este resultado está de acordo com trabalhos de Demmer et al. (2012) e Pontes Andersen et al. (2007) que observaram maior concentração plasmática de insulina associada à DP. Sun et al. (2011) observaram em seu estudo que o tratamento da DP foi capaz de, após três meses de tratamento, reduzir a concentração plasmática de insulina

Observou-se também um efeito da atividade física sobre a insulinemia dos animais estudados. Verificou-se uma diminuição significativa na concentração plasmática de insulina do grupo DPEx quando comparado ao DPS. Contudo, não se observou diferença entre os controles sedentário e exercitado (CNS e CNEx). Whyte et al. (2013) demonstraram que uma única sessão de exercício intenso foi capaz de diminuir os valores da insulinemia de indivíduos obesos. A atividade física crônica (treinamento resistido) conduzida em ratos obesos, por um maior período (8 semanas), ocasionou a diminuição da concentração plasmática de insulina (MARINHO et al, 2012). Geirsdottir et al. (2012) também observaram redução da insulinemia após 12 semanas de treinamento resistido em idosos pre-diabéticos e com DM2.

A partir dos valores de glicemias e insulinemias encontradas, obtivemos o valor do índice de HOMA-IR, que expressa a resistência à insulina, de tal maneira que quanto maior seu valor, maior a resistência insulínica. A partir dos resultados do presente estudo, foi possível observar que os ratos do grupo DPS apresentaram maior resistência à insulina quando comparados aos demais grupos (Tabela 3). Este resultado está de acordo com o estudo de Colombo et al. (2012) que observaram maior resistência insulínica em ratos após 28 dias da indução da DP.

Analisando-se o HOMA-IR, verificou-se que o grupo DPEx apresentou maior sensibilidade insulínica quando comparado ao grupo DPS, porém o DPEx não apresentou diferença em relação ao CNEx, o que reforça o fato de que o exercício físico teve efeito

positivo sobre a sensibilidade insulínica dos ratos com doença periodontal. No entanto, não se observou diferença entre os grupos controle sedentário e exercitado.

Além do HOMA-IR, a sensibilidade insulínica foi avaliada por meio de outro parâmetro, a constante de decaimento da glicemia (Kitt), um índice que permite avaliar a sensibilidade à insulina *in vivo* pelo ITT. Sua interpretação baseia-se em quanto menor o valor desta constante, maior a resistência à insulina (GELONEZE; TAMBASCIA, 2006). Os resultados obtidos pelo ITT confirmam os dados do HOMA-IR, ou seja, os ratos com DP, antes do exercício, apresentavam-se mais resistentes à insulina em relação ao grupo controle, mas após o exercício físico, observou-se que o grupo DPEx apresentou sensibilidade insulínica semelhante aos dos grupos controle. Por outro lado, o grupo DPS apresentou-se mais resistente em relação aos demais grupos, demonstrando, mais uma vez, o efeito benéfico da atividade física na sensibilidade à insulina.

A resistência à insulina pode ser definida como um estado no qual as concentrações fisiológicas de insulina provocam uma resposta subnormal na captação de glicose pelas células, especialmente no tecido muscular e adiposo. (CARVALHO-FILHO et al., 2007). Em consequência da menor captação de glicose em situações de resistência insulínica, torna-se necessária uma maior produção de insulina pelo pâncreas para a manutenção dos níveis glicêmicos normais, aumentando-se desta forma os níveis circulantes de insulina. Assim, a situação de resistência à insulina é, normalmente, acompanhada de hiperinsulinemia (CESARETTI; KOHLMANN, 2006).

A relação entre o exercício físico e a sensibilidade à insulina tem sido estudada ao longo do tempo e, hoje, sabe-se que o exercício é um importante auxiliar no controle glicêmico de indivíduos diabéticos (DUBE et al., 2012; O'HAGAN et al., 2013). Diversos estudos apontam aumento da sensibilidade insulínica e melhora do controle glicêmico promovido pela atividade física. Panvelosky-Costa et al. (2011) demonstraram aumento da sensibilidade à insulina promovida pelo treinamento resistido aferido pelo teste de intolerância à insulina em ratos obesos resistentes à insulina. Resultado semelhante foi observado por Oliveira et al. (2011) que demonstraram que o exercício crônico promoveu melhora na sensibilidade insulínica de ratos obesos. Mackenzie et al. (2012) observaram que a prática contínua de exercício moderado foi capaz de promover melhora do controle glicêmico de pacientes diabéticos. Pauli et al (2010) observaram que uma única sessão de

exercício promoveu melhora na sensibilidade insulínica de ratos velhos que se encontravam resistentes devido ao processo de envelhecimento.

Os mecanismos pelos quais a atividade física é capaz de melhorar a sensibilidade insulínica ainda não são completamente conhecidos, no entanto, um dos fatores importantes neste processo é o fato de o exercício ser capaz de melhorar o controle glicêmico (FIGUEIRA et al., 2013; GILLEN et al., 2012).

Acredita-se que esse melhor controle glicêmico promovido pela atividade física possa ser devido a uma maior captação periférica de glicose. Isto ocorre devido à maior translocação da proteína transportadora de glicose GLUT4 para a membrana plasmática por uma via independente da insulina (KENNEDY et al., 1999). Carvalho et al. (1996) demonstraram que uma maior expressão de GLUT4 no tecido adiposo é capaz de diminuir a glicemia de jejum e aumentar a tolerância à glicose em camundongos transgênicos que não expressavam GLUT4 em músculo.

Estudos demonstram que o exercício físico é capaz de aumentar a expressão de RNAm de GLUT4 em músculo esquelético (HUSSEY et al., 2011) e em tecido adiposo (HUSSEY et al., 2011) bem como a translocação da proteína para a membrana plasmática das células musculares, sendo esta ocasionada via AMPK (HAYASHI et al., 1998; KENNEDY et al., 1999).

Devido à conhecida relação entre a resistência insulínica e a concentração plasmática de TNF- α , avaliou-se no presente trabalho a concentração plasmática desta citocina (Tabela 4). Observou-se que a doença periodontal aumentou a concentração de TNF- α , da mesma forma que foi observado por Colombo et al. (2012) em ratos com DP e Engbreston et al. (2007) em humanos com DP. Astolphi et al. (2013) também observaram maior concentração plasmática de TNF- α associado à uma diferente forma de inflamação oral, a lesão periapical.

Sun et al. (2011) observaram em seu estudo que após 3 meses de tratamento da doença periodontal os níveis plasmáticos de TNF- α e o valor do HOMA-IR estavam significativamente diminuídos, demonstrando que o tratamento da doença periodontal foi capaz de reduzir a inflamação, melhorar o controle glicêmico e a resistência insulínica, além de melhorar a função das células β em indivíduos diabéticos (tipo 2), evidenciando que a presença de inflamação localizada está relacionada à patogênese da resistência à insulina e, conseqüentemente, diabetes melitus tipo 2.

No presente estudo observou-se que o grupo DPS apresentou maior concentração plasmática de TNF- α quando comparado ao grupo DPEX, demonstrando que a atividade física pode alterar a concentração plasmática desta citocina.

Na literatura há estudo demonstrando que o exercício físico agudo aumenta a concentração plasmática de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α (PEREIRA et al., 2013). Por outro lado, outros estudos demonstraram que a atividade física crônica é capaz de diminuir a concentração plasmática desta citocina (HO et al., 2013; LEMOS et al., 2011) como também sua expressão (AL-NASSAN et al., 2012).

Os mecanismos pelos quais o exercício físico atua sobre o TNF- α ainda não são completamente elucidados, no entanto, sabe-se que existe um aumento na concentração da citocina IL-6 (produzida pelo músculo) em decorrência da atividade física, e esta citocina, por sua vez, possui efeito inibitório sobre a produção de TNF- α (PETERSEN; PEDERSEN, 2006; STARKIE et al., 2003). Um outro possível fator é que durante a atividade física, ocorre liberação de epinefrina (PEDERSEN; HOFFMAN-GOETZ, 2000), substância capaz de diminuir a produção de TNF- α induzida por LPS (VAN DER POLL et al., 1996). Desta forma, o efeito inibitório da atividade física sobre a produção de TNF- α pode ser um importante mecanismo que diminui a resistência à insulina, que é uma das principais características do diabetes melitus tipo 2.

Além do aumento de TNF- α , alguns estudos demonstram que a doença periodontal está associada à elevação das concentrações séricas de IL-6 (BUHLIN et al., 2003; SHIMADA et al., 2010) em humanos. Foi demonstrado que o IL-6 possui um efeito duplo na sensibilidade à insulina no músculo esquelético (NIETO-VASQUEZ et al., 2008). Embora esta citocina tenha um efeito positivo na captação de glicose em curto prazo, observou-se que a exposição crônica a IL-6 ocasiona efeitos negativos. Miotúbulos pré-tratados com IL-6 por 3h apresentaram um efeito aditivo na captação de glicose, após estímulo com insulina. Entretanto, a insulina não estimulou a captação de glicose em miotúbulos após o tratamento crônico (24h) com IL-6. No presente estudo não foi observada diferença significativa na concentração plasmática de IL-6 entre os grupos estudados.

A resistência à insulina, juntamente com a dislipidemia é um dos marcadores da chamada síndrome metabólica (AYDIN et al., 2014) e o exercício físico está relacionado à melhora de casos de dislipidemia (HEEREN et al., 2009). Assim, procurou-se avaliar as

concentrações plasmáticas de lipídios de ratos com doença periodontal submetidos à atividade física crônica.

Indivíduos com diabetes mellitus tipo 2, devido à resistência à insulina, comumente apresentam dislipidemia que é caracterizada pela elevação sérica de colesterol LDL e triglicérides apresentando, além disso, menores concentrações plasmáticas de colesterol HDL. A resistência à insulina exerce papel central na patogênese da dislipidemia, uma vez que ocasiona aumento na liberação de ácidos graxos livres em células adiposas resistentes à insulina (MOORADIAN, 2009).

Alguns estudos mostram que pessoas com doença periodontal apresentam aumento nas concentrações plasmáticas de colesterol total, triglicérides, colesterol LDL e redução de colesterol HDL (BUHLIN et al., 2003; LÖSCHE et al., 2000;). Bactérias Gram-negativas associadas à doença periodontal produzem uma molécula denominada lipopolissacarídeo (LPS) e este é considerado o principal fator de virulência produzido por bactérias (CHAVES DE SOUZA et al., 2013). Acredita-se que a presença de LPS no plasma e as respostas de fase aguda à disseminação sistêmica de bactérias podem promover maior biossíntese de colesterol pelo fígado. Esta dislipidemia, por sua vez, pode favorecer aterogênese (SCHENKEIN; LOOS, 2013). Entretanto, alguns estudos demonstram que o exercício físico diminui a dislipidemia (HEO; KIM, 2013; KRAEMER; RATAMESS, 2004; MANN et al., 2014).

Outros estudos mostram que o tratamento periodontal não altera as concentrações séricas de colesterol total, triglicérides e colesterol LDL e HDL (KAMIL et al., 2011; LÖSCHE et al., 2005; TÜTER et al., 2007). Nossos resultados estão de acordo com estes resultados, pois também não foram observadas alterações no colesterol total, colesterol HDL, LDL e VLDL e triglicérides entre todos os grupos estudados.

Sabendo-se que em diferentes modelos de resistência à insulina, bem como na presença de doença periodontal, o sinal insulínico encontra-se alterado (CHIBA et al., 2010; COLOMBO et al., 2012; CUSI et al., 2000; KEROUZ et al., 1997;), procurou-se avaliar os efeitos do treinamento resistido sobre o sinal insulínico de ratos com doença periodontal.

Ao avaliar o sinal insulínico, o presente estudo observou diminuição no grau de fosforilação em tirosina da pp185 (IRS-1/IRS-2) nos tecidos muscular e adiposo do grupo DPS quando comparado aos demais grupos (Figura 4). Estes resultados estão de acordo com o trabalho de Colombo et al. (2012) que observou diminuição do grau de fosforilação em tirosina da pp185 nos mesmos tecidos em ratos com doença periodontal e de Astolpho et al.

(2013) que, ao analisar o sinal insulínico de ratos com lesão periapical, observaram redução da fosforilação em tirosina da pp185 em tecido adiposo. Em ambos os trabalhos a diminuição da transdução do sinal insulínico estava associada a aumento da concentração plasmática de TNF- α .

Como dito anteriormente, a liberação de citocinas pro-inflamatórias, como o TNF- α tanto pelo tecido adiposo quanto em condição de doença periodontal está relacionada à maior resistência à insulina e prejuízos no sinal insulínico. Estudos focando vias de sinalização intracelular ativadas por processos inflamatórios demonstraram que as vias do c-Jun amino-terminal kinase (JNK) e I κ B kinase β /fator nuclear κ B (IKK β /NF- κ B) tem importante papel no desenvolvimento da resistência à insulina (SHOELSON et al., 2006). Sabe-se que o aumento da adiposidade ativa estas vias (HIROSUMI et al., 2002) e que a inibição química ou genética de JNK ou IKK β /NF- κ B é capaz de melhorar a resistência à insulina (ARKAN et al., 2005; SOLINAS et al., 2007). O TNF- α , marcadores de estresse, incluindo espécies reativas de oxigênio (EROs) e Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRR), como os receptores semelhante à Toll (TLR) são capazes de ativar JNK e IKK β /NF- κ B (SHOELSON et al., 2006), participando, portanto, da patogênese da resistência à insulina.

Estudos demonstram que a inibição genética ou química de JNK e IKK β /NF- κ B está relacionada com melhora da resistência à insulina (SHOELSON et al., 2006). Bennet et al. (2003) observaram que o tratamento com um inibidor de JNK em ratos obesos e diabéticos promoveu diminuição na concentração plasmática de glicose e aumento na insulinemia. Em outro estudo, ratos mutantes, deficientes para JNK-1 apresentaram-se protegidos do desenvolvimento obesidade e de resistência à insulina associada à obesidade, além de maior grau de fosforilação da subunidade β do receptor de insulina, maior fosforilação em tirosina do IRS-1 e diminuição do grau de fosforilação em serina do IRS-1 (HIROSUMI et al., 2002). Alguns estudos com salicilatos, anti-inflamatórios com capacidade de inibir a atividade de NF- κ B (YIN et al., 1998; KOPP, GHOSH, 1994), observaram redução na glicemia, HbA1C, triglicérides, aumento na concentração plasmática de adiponectina e melhora na sensibilidade à insulina de indivíduos diabéticos (FLEISCHMAN et al., 2008; GOLDFINE et al., 2008; GOLDFINE et al., 2010). Ghanim et al. (2001) observaram que o tratamento de indivíduos obesos com troglitazona, uma tiazolidinediona utilizada no tratamento de DM2, foi capaz de diminuir a atividade de NF- κ B, bem como as concentrações plasmáticas de TNF- α e insulina. Ouchi et al. (2000) observaram que o tratamento de cultura celular com

adiponectina, uma adipocina relacionada à melhora da sensibilidade à insulina, diminuiu a atividade de NF- κ B estimulada por TNF- α .

Uma vez que foi observada uma maior concentração plasmática de TNF- α no grupo DPS (Tabela 4) e sabendo-se que esta citocina pode ativar as vias inflamatórias descritas acima, pode-se inferir que o menor grau de fosforilação em tirosina da pp185 em músculo e tecido adiposo do grupo DPS esteja relacionado ao aumento desta citocina.

Além do aumento da concentração plasmática de TNF- α , a doença periodontal está associada a aumento da concentração de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). O LPS é um componente da membrana de bactérias Gram-negativas e é importante no reconhecimento de microorganismos pelo sistema imune do hospedeiro (AKIRA et al., 2006). Sabe-se que muitas das bactérias que causam doença periodontal, como *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* são Gram-negativas e, portanto, expressam LPS em sua parede celular (PASTER et al., 2006; PIHLSTROM et al., 2005). O LPS proveniente de patógenos periodontais pode ser um importante ativador de TLRs, tornando-se, assim, um importante fator nas respostas inflamatórias da periodontite.

Um estudo de Kato et al. (2014) demonstrou que células tronco de ligamento periodontal tratadas com LPS de *P. gingivalis* por 21 dias apresentaram maior produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-8 e IL-6. Doyle et al. (2014) demonstraram que o tratamento de fibroblastos gengivais com azitromicina reduziu a produção de citocinas induzida por LPS de *P. gingivalis*.

Toll-like receptors (TLR) são proteínas transmembranas responsáveis pelo reconhecimento de moléculas associadas à patógenos pelo sistema imune inato. Estes receptores contêm em sua porção extracelular domínios ricos em leucinas repetidas que atuam no reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPS, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*) e na porção intracelular uma região conhecida como domínio receptor de Toll-Interleucina-1 (TIR) necessária para a sua transdução de sinal (KAWAI; AKIRA, 2010).

Dentre os PAMPs reconhecidos por TLRs, incluem-se lipídios, lipoproteínas, proteínas e ácidos nucléicos derivados de uma ampla variedade de microorganismos, como bactérias, vírus, parasitas e fungos (AKIRA et al., 2006). No entanto, existem evidências de que moléculas endógenas produzidas por células em processo de morte ou em certas condições

patológicas estimulam TLRs, resultando no desenvolvimento ou aceleração de doenças inflamatórias (KAWAI; AKIRA, 2006).

O LPS liberado de bactérias Gram-negativas associa-se a uma proteína plasmática solúvel chamada proteína ligante de LPS (LBP ou *LPS-binding protein*) e, posteriormente, liga-se a CD14, uma proteína ligada a glicosilfosfatidilinositol presente na superfície celular de fagócitos (POLTORAK et al., 1998; AKIRA et al., 2006). O LPS é então transferido ao MD2, uma proteína associada à porção extracelular do TLR4 (SHIMAZU et al., 1999), dando início a uma via de sinalização intracelular que culmina na ativação de fatores de transcrição, como o NF- κ B e MAPKs, e consequente expressão de genes envolvidos em respostas inflamatórias (AKIRA et al., 2006).

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 (BAIN et al., 2009; BLETSA et al., 2006). 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).

Além de sua importante função na imunidade inata, estudos demonstraram que TLRs podem ser ativados por moléculas endógenas relacionadas a danos teciduais ou estresse (HUANG et al., 2012). Além disso, tem sido demonstrado que estes receptores podem perceber perturbações metabólicas e, desta maneira, relacionar respostas imunológicas à homeostase metabólica (HOTAMISLIGIL; ERBAY, 2008). De fato, Shi et al. (2006) observaram que TLR podem atuar como sensores de lipídios endógenos, contribuindo com a patogênese de resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica. Estes autores demonstraram que uma mistura de palmitato e ácido oléico ativam NF- κ B por meio de TLR4 (SHI et al., 2006). Huang et al. (2012) demonstraram que ácidos graxos saturados foram capazes de ativar TLR2 e TLR4 e, conseqüentemente, vias inflamatórias subseqüentes como do NF- κ B e MAPKs. Tsukumo e colaboradores (2007) demonstraram em camundongos que apresentavam perda da função do TLR4 por meio de mutação uma prevenção da obesidade induzida por dieta, redução da ativação de IKK β e JNK, além de proteção contra o desenvolvimento de resistência à insulina em animais tratados com dieta hiperlipídica e em músculos isolados tratados com ácidos graxos.

Estudos demonstram que animais e humanos obesos e diabéticos apresentam maior expressão de TLR2 e TLR4 em tecidos muscular e adiposo. Observa-se um moderado aumento na concentração de LPS de ratos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica (FRESNO et al., 2011). Estudos com modelos genéticos de animais deficientes para TLR4 demonstraram que a perda da função de TLR4 reduz a inflamação induzida por dieta hiperlipídica, caracterizada por uma reduzida infiltração e ativação de macrófagos no tecido adiposo (ORR et al., 2012).

Como dito anteriormente, a atividade física possui um efeito inibitório sobre a produção de TNF- α , o que pode estar relacionado com a melhora no grau de fosforilação em tirosina do grupo DPEX (Figura 4). Ropelle et al. (2006) observaram que ratos obesos induzidos por dieta hiperlipídica submetidos a uma única sessão de natação apresentaram menor fosforilação da JNK, bloqueio da via IKK/NF- κ B, e menor grau de fosforilação do IRS-1 em serina, além de redução da atividade da PTP-1B no músculo gastrocnêmio. Experimentos com humanos demonstraram que uma sessão aguda de exercício físico também se mostrou eficiente na redução da fosforilação da JNK e no bloqueio da via IKK/NF- κ B após perfusão de ácidos graxos. O bloqueio da via IKK/NF- κ B também foi observado no músculo de pacientes diabéticos, e esse bloqueio ocorreu pela menor taxa de degradação do I κ B α e do I κ B β , impedindo que o NF- κ B iniciasse a transcrição de proteínas inflamatórias. Assim, além de uma melhora direta na transdução do sinal insulínico, o bloqueio desta via inflamatória através do exercício físico foi responsável por diminuir as concentrações plasmáticas de TNF- α nestes indivíduos (SRIWIJITKAMOL et al., 2007).

Atualmente, sabe-se que o óxido nítrico (NO) produzido pela proteína óxido nítrico sintase (NOS) é um importante sinalizador intracelular capaz de modificar a função protéica por diversos mecanismos em etapas pós-transcripcionais, incluindo nitrosilação, nitração e S-nitrosação. A S-nitrosação ocorre pela adição de um grupamento NO ao radical tiol (S-H) de um resíduo de cisteína, formando um nitrosotiol (S-NO). Foi demonstrado que drogas doadoras de NO, como nitrosoglutationa (GSNO) ou nitrosocisteína (CISNO) e a própria indução da iNOS seriam capazes de provocar S-nitrosação e com isso modificar a função de proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina (CARVALHO-FILHO et al., 2005). Carvalho-Filho et al. (2006) observaram em músculo de camundongos com resistência à insulina promovida por LPS redução da fosforilação do receptor de insulina e do IRS-1, maior expressão de iNOS associada a S-nitrosação do receptor de insulina e IRS-1. Além

disso, em animais *knock out* para iNOS não foi observada S-nitrosação do receptor de insulina e IRS-1 após tratamento com LPS. Nestes animais não foi observada resistência à insulina. Outro efeito positivo do exercício físico na transdução do sinal insulínico ocorre por meio da redução da expressão de iNOS e S-nitrosação de proteínas da via de sinalização da insulina (PAULI et al., 2009). Foi demonstrado que a atividade física foi capaz de melhorar a resistência à insulina e promover aumento da fosforilação do receptor de insulina, IRS-1 e Akt estimulada por insulina, e isto foi atribuído ao fato de o exercício ter revertido a S-nitrosação destas proteínas no músculo esquelético (PAULI et al., 2008). Acredita-se que a ativação da AMPK promovida pelo exercício seja responsável pela diminuição da expressão de iNOS e consequente melhora da resistência e do sinal insulínico (PILON et al., 2004).

A diminuição da fosforilação em tirosina no tecido adiposo e muscular observada no presente estudo não foi decorrente do aumento do grau de fosforilação em serina do IRS-1 nestes tecidos (Figura 5). Algumas proteínas podem estar relacionadas à diminuição da fosforilação em tirosina sem que haja aumento da fosforilação em serina, tais como a glicoproteína-1 de membrana plasmática celular (PC-1) (MADDUX; GOLDFINE, 2000), proteína ligada a receptor de fator de crescimento 10 (Grb10) e 14 (Grb14) (COONEY et al., 2004; MORRIONE, 2000;), supressores da sinalização de citocinas (SOCS1 e SOCS3) (UEKI et al., 2004) e proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B) (WU et al., 2001), que podem diminuir a função do receptor de insulina, bloqueando sua interação com proteínas IRS ou modificando sua atividade quinase.

Frittitta et al. (1998) observaram tanto in vivo como in vitro que o PC-1 pode ligar-se ao receptor de insulina inibindo sua função e, conseqüentemente, prejudicando a via de sinalização insulínica. Estudos demonstraram que camundongos deficientes para Grb10 apresentaram aumento da fosforilação em tirosina induzida por insulina de IRS-1 (SMITH et al., 2007), e camundongos knockouts para Grb14 exibem aumento no sinal insulínico por meio da via IRS-1 e Akt no fígado e músculo esquelético (COONEY et al., 2004). Além disso, foi demonstrado na literatura que ambos os modelos de camundongos knockout para Grb10 e Grb14 apresentam melhora na homeostase da glicemia (COONEY et al., 2004; SMITH et al., 2007;).

Estudos demonstram que as proteínas SOCS apresentam maior atividade em situações de resistência insulínica, como na obesidade, podendo participar da fisiopatologia do diabetes mellitus tipo 2 (EMANUELLI et al., 2001). É sabido que as SOCS estão envolvidas

na cascata da inflamação. Citocinas pro-inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β induzem expressão de SOCS-3 (FUKUSHIMA et al., 2010). Emanuelli et al. (2001) demonstraram que a SOCS-3 diminuiu a fosforilação em tirosina do IRS-1 induzida por insulina em fibroblastos e a sua associação com p85, uma subunidade reguladora de PI3K, podendo assim estar relacionada à resistência à insulina.

Um outro possível fator que atua negativamente no sinal insulínico, a PTP1B, promove a desfosforilação de resíduos de tirosina do IR e IRS-1 (GOLDSTEIN et al., 2000; SEELY et al., 1996). A produção de PTP1B é aumentada em estados de resistência à insulina, tais como obesidade e DM2, nos quais altas concentrações de citocinas (TNF- α e IL-6) são encontradas (AHMAD et al., 1997; ZABOLOTNY et al., 2008). A super expressão da PTP1B está relacionada à redução da captação de glicose no músculo (ZABOLOTNY et al., 2008) e a ausência de PTP1B aumenta a sensibilidade à insulina e restaura a ação desta em miócitos pré-tratados com TNF- α (ALONSO-CHAMORRO et al., 2011).

Como apresentado no presente trabalho, o aumento da concentração plasmática de citocinas e a ativação de vias inflamatórias intracelulares estão relacionadas à patogênese de resistência à insulina associada à obesidade e também associadas a processos inflamatórios locais como a doença periodontal (COLOMBO et al., 2012). É sabido que o exercício físico é capaz de melhorar a resistência à insulina de humanos e animais obesos, no entanto, ainda não era conhecido que o exercício promove reversão da resistência à insulina em ratos com doença periodontal. Assim, a atividade física pode ser um importante fator na prevenção ou até mesmo um co-adjuvante no tratamento de complicações sistêmicas decorrentes de periodontopatias.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que o treinamento resistido em ratos com doença periodontal:

- Não alterou a ingestão de ração e o peso corpóreo;
- Não alterou a concentração plasmática de glicose;
- Promoveu diminuição da insulinemia;
- Melhorou a sensibilidade à insulina;
- Diminuiu a concentração plasmática de TNF- α , mas não alterou a concentração plasmática de IL-6;
- Não alterou as concentrações plasmáticas de colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, colesterol VLDL e triglicérides;
- Melhorou 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;
- Não promoveu alteração no grau de fosforilação em serina do IRS-1.

A partir destes resultados, podemos inferir que o treinamento resistido promoveu melhora na sensibilidade à insulina e no sinal insulínico de ratos com doença periodontal, entretanto, estas alterações não são decorrentes de aumento da fosforilação de IRS-1 ou presença de dislipidemias. Acredita-se que este efeito benéfico da atividade física esteja relacionado à diminuição da concentração plasmática de TNF- α .

REFERÊNCIAS

- AHMAD, F.; AZEVEDO, J. L.; CORTRIGHT, R.; DOHM, G. L.; GOLDSTEIN, B. J. Alterations in skeletal muscle protein-tyrosine phosphatase activity and expression in insulinresistant human obesity and diabetes. **J. Clin. Invest.**, v. 100, n. 2, p. 449-458, July. 1997.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783-801, Feb. 2006.
- ALESSI, D. R.; JAMES, S. R.; DOWNES, C. P.; HOLMES, A. B.; GAFFNEY, P. R.; REESE, C. B.; COHEN, P. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . **Curr. Biol.**, v. 7, n. 4, p. 261-269, Apr. 1997.
- ALMAS, K.; AL-QAHTANI, M.; AL-YAMI, M.; KHAN, N. The relationship between periodontal disease and blood glucose level among type II diabetic patients. **J. Contemp. Dent. Pract.**, v. 2, n. 4, p. 18-25, Nov. 2001.
- ALMEIDA, R. F.; PINHO, M. M.; LIMA, C.; FARIA, I.; SANTOS, P.; BORDALO, C. Associação entre doença periodontal e patologias sistêmicas. **Rev. Port. Clin. Geral.**, v. 22, p. 379-390, 2006.
- AL-NASSAN, S.; FUJITA, N.; KONDO, H.; MURAKAMI, S.; FUJINO, H. Chronic exercise training down-regulates TNF- α and atrogin-1/MAFbx in mouse gastrocnemius muscle atrophy induced by hindlimb unloading. **Acta Histochem. Cytochem.**; v. 45, n. 6, p. 343-349, Dec. 2012.
- ALONSO-CHAMORRO, M.; NIETO-VAZQUEZ, I.; MONTORI-GRAU, M.; GOMEZ-FOIX, A. M.; FERNANDEZ-VELEDO, S.; LORENZO, M. New emerging role of protein-tyrosine phosphatase 1B in the regulation of glycogen metabolism in basal and TNF- α -induced insulinresistant conditions in an immortalised muscle cell line isolated from mice. **Diabetologia**, v. 54, n. 5, p. 1157-1168, May. 2011.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, suppl. 1, p. S15-S35, Jan. 2014.
- AMIR, J.; WAITE, M.; TOBLER, J.; CATALFAMO, D. L.; KOUTOUZIS, T.; KATZ, J.; WALLET, S. M. The role of hyperglycemia in mechanisms of exacerbated inflammatory responses within the oral cavity. **Cell. Immunol.**, v. 272, n. 1, p. 45-52, 2011.
- ANDERSEN, C. C. P.; BUSCHARD, K.; FLYVBJERG, A.; STOLTZE, K.; HOLMSTRUP, P. Periodontitis deteriorates metabolic control in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. **J. Periodontol.**, v. 77, n. 3, p. 350-356, Mar. 2006.
- ARAKI, E. LIPES, M. A.; PATTI, M. E.; BRÜNING, J. C.; HAAG, B. 3RD.; JOHNSON, R. S.; KAHN, C. R. 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.

ARKAN, M. C.; HEVENER, A. L.; GRETEN, F. R.; MAEDA, S.; LI, Z. W.; LONG, J. M.; WYNshaw-BORIS, A.; POLI, G.; OLEFSKY, J.; KARIN, M. IKK- β links inflammation to obesity-induced insulin resistance. **Nat. Med.**, v. 11, n. 2, p. 191-198, Feb. 2005.

ARORA, N.; PAPAPANOU, P. N.; ROSENBAUM, M.; JACOBS JUNIOR, D. R.; DESVARIEUX, M.; DEMMER, R. T. Periodontal infection, impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance: results from the Continuous National Health and Nutrition Examination Survey 2009-2010. **J. Clin. Periodontol.**, v. 41, n. 7, p. 643-652, July. 2014.

ASTOLPHI, R. D.; CURBETE, M. M.; COLOMBO, N. H.; SHIRAKASHI, D. J.; CHIBA, F. Y.; PRIETO, A. K.; CINTRA, L. T.; BOMFIM, S. R.; ERVOLINO, E.; SUMIDA, D. H. Periapical lesions decrease insulin signal and cause insulin resistance. **J. Endod.**, v. 39, n. 5, p. 648-652, May. 2013.

AYDIN, S.; AKSOY, A.; AYDIN, S.; KALAYCI, M.; YILMAZ, M.; KULOGLU, T.; CITIL, C.; CATAK, Z. Today's and yesterday's of pathophysiology: Biochemistry of metabolic syndrome and animal models. **Nutrition**, v. 30, n. 1, p. 1-9, Jan. 2013.

BAIN, J. L.; LESTER, S. R.; HENRY, W. D.; NAFTEL, J. P.; JOHNSON, R. B. Effects of induced periapical abscesses on rat pregnancy outcomes. **Arch. Oral. Biol.**, v. 54, n. 2, p. 162-171, Feb. 2009.

BELLACOSA, A.; CHAN, T. O.; AHMED, N. N.; DATTA, K.; MALSTROM, S.; STOKOE, D.; MCCORMICK, F.; FENG, J.; TSICHLIS P. Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. **Oncogene**, v. 17, n. 3, p. 313-325, July. 1998.

BENNETT, B. L.; SATOH, Y.; LEWIS, A. J. JNK: a new therapeutic target for diabetes. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 3, n. 4, p. 420-425, Aug. 2003.

BLETSA, A.; BERGGREEN, E.; FRISTAD, I.; TENSTAD, O.; WIIG, H. 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. MOGHETTI, P.; ZANCANARO, C.; CIGOLINI, M.; QUERENA, M.; CACCIATORI, V.; CORGNATI, A.; MUGGEO, M. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **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.

BORGHOUTS, L. B.; KEIZER, H.A. Exercise and insulin sensitivity: a review. **Int. J. Sports Med.**, v. 20, n. 1, p. 1-12, Jan. 2000.

BUHLIN, K.; GUSTAFSSON, A.; POCKLEY, A. G.; FROSTEGÅRD, J.; KLINGE, B. Risk factors for cardiovascular disease in patients with periodontitis. **Eur. Heart J.**, v. 24, n. 23, p. 2099-2107, Dec. 2003.

BUREN, J.; LIU, H. X.; LAURITZ, J.; ERIKSSON, J.W. High glucose and insulin in combination cause insulin receptor substrate-1 and -2 depletion and protein kinase B desensitization in primary cultured rat adipocytes: possible implications for insulin resistance in type 2 diabetes. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 148, n. 1, p. 157-167, Jan. 2003.

BURSTEIN, R.; POLYCHRONAKOS, C.; TOEWS, C. J.; MACDOUGAL, J. D.; GUYDA, H. J.; POSNER, B. I. Acute reversal of the enhanced insulin action in trained athletes. Association with insulin receptor changes. **Diabetes**, v. 34, n. 8, p. 756-760, Aug. 1985.

CAI, D. DHE-PAGANON, S.; MELENDEZ, P. A.; LEE, J.; SHOELSON, S. E. Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 28, p. 25323-25330, July. 2003.

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.

CARVALHO, C.; BRENELLI, S.; SILVA, A.; NUNES, A.; VELLOSO, L.; SAAD, M. Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. **Endocrinology**, v. 137, n. 1, p. 151-159, Jan. 1996.

CARVALHO-FILHO, M. A. UENO, M.; HIRABARA, S. M.; SEABRA, A. B.; CARVALHEIRA, J. B.; DE OLIVEIRA, M. G.; VELLOSO, L. A.; CURI, R.; SAAD, M. J. S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance. **Diabetes**, v. 54, n. 4, p. 959-967, Apr. 2005.

CARVALHO-FILHO, M. A.; CARVALHEIRA, J. B. C.; VELLOSO, L. A.; SAAD, M. J. A. Insulin and angiotensin II signaling pathways cross-talk: implications with the association between diabetes mellitus, arterial hypertension and cardiovascular disease. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 51, n. 2, p. 195-203, Mar. 2007.

CARVALHO-FILHO, M. A.; UENO, M.; CARVALHEIRA, J. B.; VELLOSO, L. A.; SAAD, M. J. Targeted disruption of iNOS prevents LPS-induced S-nitrosation of IRbeta/IRS-1 and Akt and insulin resistance in muscle of mice. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 291, n. 3, p. E476-E482, Sep. 2006.

CESARETTI, M. L. R.; KOHLMANN, O. J. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 50, n. 2, p. 190-197, Apr. 2006.

CHAVES DE SOUZA, J. A.; NOGUEIRA, A. V.; CHAVES DE SOUZA, P. P.; KIM, Y. J.; SILVA LOBO, C.; PIMENTEL LOPES DE OLIVEIRA, G. J.; CIRELLI, J. A.; GARLET, G. P.; ROSSA, C. JR. SOCS3 expression correlates with severity of inflammation, expression of proinflammatory

cytokines, and activation of STAT3 and p38 MAPK in LPS-induced inflammation in vivo. *Mediators Inflamm.*, v. 2013, p. 650812, 2013.

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. 25-30, Jan./ Mar. 2010.

CIOLAC, E. G.; GUIMARÃES, G. V. Exercício físico e síndrome metabólica. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v. 10, n. 4, p. 319-324, jul./ ago. 2004.

COLLINS, J. G.; WINDLEY 3rd, H. W.; ARNOLD, R. R.; OFFENBACHER, S. Effects of a *Porphyromonas gingivalis* infection on inflammatory mediator response and pregnancy outcome in the hamster. **Infect. Immun.**, v. 62, n. 10, p. 4356-4361, Oct. 1994.

COLOMBO, N. H.; SHIRAKASHI, D. J.; CHIBA, F. Y.; COUTINHO, M. S. L; ERVOLINO, E.; GARBIN, C. A. S; MACHADO, U. F.; SUMIDA, D. H. Periodontal disease decreases insulin sensitivity and insulin signaling. **J. Periodontol.**, v. 83, n. 7, p. 864-870, July. 2012.

COONEY, G. J. LYONS, R. J.; CREW, A. J.; JENSEN, T. E.; MOLERO, J. C.; MITCHELL, C. J.; BIDEN, T. J.; ORMANDY, C. J.; JAMES, D. E.; DALY, R. J. Improved glucose homeostasis and enhanced insulin signalling in Grb14-deficient mice. **EMBO J.**, v. 23, n. 3, p. 582-593, fev. 2004.

CROSS, D. E.; ALESSI, D. R.; COHEN, P.; ANDJELKOVITCH, M.; HEMMING, B. A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. **Nature**, v. 378, n. 6559, p. 785-789, Dec. 1995.

CULLINAN, M. P.; SEYMOUR, G. J. Periodontal disease and systemic illness: will the evidence ever be enough? **Periodontol.** 2000, v. 62, n. 1, p. 271-286, June. 2013.

CUSI, K. MAEZONO, K.; OSMAN, A.; PENDERGRASS, M.; PATTI, M. E.; PRATIPANAWATR, T.; DEFRONZO, R. A.; KAHN, C. R.; MANDARINO, L. J. 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.

DEMMER, R. T.; JACOBS, D. R.; DESVARIEUX, M. Periodontal disease and incident type 2 diabetes: results from the first national health and nutrition examination survey and its epidemiologic follow-up study. **Diabetes Care.**, v. 31, n. 7, p. 1373-1379, July. 2008.

DEMMER, R. T.; SQUILLARO, A.; PAPAPANOU, P. N.; ROSENBAUM, M.; FRIEDEWALD, W. T.; JACOBS, D. R.; DESVARIEUX, M. D. Periodontal infection, systemic inflammation, and insulin resistance: results from the continuous national health and nutrition examination survey (NHANES) 1999–2004. **Diabetes Care**, v. 35, n. 11, p. 2235–2242, Nov. 2012.

DOYLE, C. J.; FITZSIMMONS, T. R.; MARCHANT, C.; DHARMAPATNI, A. A.; HIRSCH, R.; BARTOLD, P. M. Azithromycin suppresses *P. gingivalis* LPS-induced pro-inflammatory cytokine and chemokine production by human gingival fibroblasts in vitro. **Clin. Oral Investig.**, May. 2014.

DRACHMAN, R.; ROOT, R.; WOOD, W. J. Studies on the effect of experimental nonketotic diabetes mellitus on antibacterial defense. I demonstration of a defect in phagocytosis. **J. Exp. Med.**, v. 124, n. 2, p. 227-240, Aug. 1966.

DUBE, J. J.; ALLISON, K. F.; ROUSSON, V.; GOODPASTER, B. H.; AMATI, F. Exercise dose and insulin sensitivity: relevance for diabetes prevention. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 44, n. 5, p. 793-799, May. 2012.

EBINA, Y.; ARAKI, E.; TAIRA, M. SHIMADA, F.; MORI, M.; CRAIK, C. S.; SIDDLE, K.; PIERCE, S. B.; ROTH, R. A.; RUTTER, W. J. Replacement of lysine residue 1030 in the putative ATP-binding region of insulin receptor abolishes insulin and antibody-stimulated glucose uptake and receptor kinase activity. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**, v. 84, n. 3, p. 704-708, Feb. 1987.

ELNER, S.; ELNER, V.; JAFFE, G.; STUART, A.; KUNKEL, S.; STRIETER, R. Cytokines in proliferative diabetic retinopathy and proliferative vitreoretinopathy. **Curr. Eye Res.**, v. 14, n. 11, p. 1045-1053, Nov. 1995.

EMANUELLI, B. PERALDI, P.; FILLOUX, C.; CHAVEY, C.; FREIDINGER, K.; HILTON, D. J.; HOTAMISLIGIL, G. S.; VAN OBBERGHEN, E. SOCS-3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to tumor necrosis factor- α in the adipose tissue of obese mice. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 51, p. 47944-47949, Dec. 2001.

ENDO, Y.; TOMOFUJI, T.; EKUNI, D.; IRIE, K.; AZUMA, T.; TAMAKI, N.; YAMAMOTO, T.; MORITA, M. Experimental periodontitis induces gene expression of proinflammatory cytokines in liver and white adipose tissues in obesity. **J. Periodontol.**, v. 81, n. 4, p. 520-526, Apr. 2009.

ENGBRETON, S.; CHERTOG, R.; NICHOLS, A.; HEY-HADAVI, J.; CELENTI, R.; GRBIC, J. Plasma levels of tumour necrosis factor- α in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes. **J. Clin. Periodontol.**, v. 34, n. 1, p. 18-24, Jan. 2007.

FEINSTEIN, R.; KANETY, H.; PAPALL, M. Z.; LUNENFELD, B.; KARASIK, A. Tumor necrosis factor- α suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n.35, p. 26055-26058, Dec. 1993.

FIGUEIRA, F. R.; UMPIERRE, D.; CASALI, K. R.; TETELBOM, P. S.; HENN, N. T.; RIBEIRO, J. P.; SCHAAN, B. D. Aerobic and combined exercise sessions reduce glucose variability in type 2 diabetes: crossover randomized trial. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e57733, 2013.

FLEISCHMAN, A.; SHOELSON, S. E.; BERNIER, R.; GOLDFINE, A. B. Salsalate improves glycemia and inflammatory parameters in obese young adults. **Diabetes Care**, v. 31, n. 2, p. 289-294, Feb. 2008.

FRANKE, T. F.; KAPLAN, D. R.; CANTLEY, L. C. PI3K: downstream AKT ion blocks apoptosis. **Cell**, v. 88, n. 4, p. 435-437, Feb. 1997.

FRESNO, M.; ALVAREZ, R.; CUESTA, N. Toll-like receptors, inflammation, metabolism and obesity. **Arch. Physiol. Biochem.**, v. 117, n. 3, p. 151-164, July. 2011.

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, June. 1972.

FRITTITTA, L. SPAMPINATO, D.; SOLINI, A.; NOSADINI, R.; GOLDFINE, I. D.; VIGNERI, R.; TRISCHITTA, V. Elevated PC-1 content in cultured skin fibroblasts correlates with decreased in vivo and in vitro insulin action in nondiabetic subjects: evidence that PC-1 may be an intrinsic factor in impaired insulin receptor signaling. **Diabetes**, v. 47, n. 7, p. 1095-1100, July. 1998.

FUKUSHIMA, A.; KAJIYA, H.; IZUMI, T.; SHIGEYAMA, C.; OKABE, K.; ANAN, H. Proinflammatory cytokines induce suppressor of cytokine signaling-3 in human periodontal ligament cells. **J. Endod.**, v. 36, n. 6, p. 1004-1008, June. 2010.

GAO, Z.; HWANG, D.; BATAILLE, F.; LEFEVRE, M.; YORK, D.; QUON, M. J.; YE, J. Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 50, p. 48115-48121, Dec. 2002.

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

GEIRSDOTTIR, O. G.; ARNARSON, A.; BRIEM, K.; RAMEL, K.; JONSON, P.V.; THORSDDOTTIR, I. Effect of 12-week resistance exercise program on body composition, muscle strength, physical function, and glucose metabolism in healthy, insulin-resistant, and diabetic elderly icelanders. **J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.**, v. 67, n. 11, p. 1259–1265, Nov. 2012.

GELONEZE, B.; TAMBASCIA, M. A. Avaliação laboratorial e diagnóstico da resistência insulínica. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 50, n. 2, p. 208-215, Apr. 2006.

GHANIM, H.; GARG, R.; ALJADA, A.; MOHANTY, P.; KUMBKARNI, Y.; ASSIAN, E.; HAMOUDA, W.; DANDONA, P. Suppression of nuclear factor-kappaB and stimulation of inhibitor kappaB by troglitazone: evidence for an anti-inflammatory effect and a potential antiatherosclerotic effect in the obese. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 86, n. 3, p. 1306-1312, Mar. 2001.

GILLEN, J. B.; LITTLE, J. P.; PUNTHAKEE, Z.; TARNOPOLSKY, M. A.; RIDDELL, M. C.; GIBALA, M. J. Acute high-intensity interval exercise reduces the postprandial glucose response and prevalence of hyperglycaemia in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Obes. Metab.**, v. 14, n. 6, p. 575-577, June. 2012.

GOLDFINE, A. B.; SILVER, R.; ALDHAHI, W.; CAI, D.; TATRO, E.; LEE, J.; SHOELSON, S. E. Use of salsalate to target inflammation in the treatment of insulin resistance and type 2 diabetes. **Clin. Transl. Sci.**, v. 1, n. 1, p. 36-43, May. 2008.

GOLDFINE, A. B.; FONSECA, V.; JABLONSKI, K. A.; PYLE, L.; STATEN, M. A.; SHOELSON, S. E.; TINSAL-T2D (Targeting Inflammation Using Salsalate in Type 2 Diabetes) STUDY TEAM.

The effects of salsalate on glycemic control in patients with type 2 diabetes: a randomized trial. **Ann. Intern. Med.**, v. 152, n. 6, p. 346-357, Mar. 2010.

GOLDSTEIN, B. J.; BITTNER-KOWALCZYK, A.; WHITE, M. F.; HARBECK, M. Tyrosine dephosphorylation and deactivation of insulin receptor substrate-1 by protein-tyrosine phosphatase 1B. Possible facilitation by the formation of a ternary complex with the Grb2 adaptor protein. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 6, p. 4283-4289, Feb. 2000.

GOODYEAR, L. J.; KAHN, B. B. Exercise, glucose transport and insulin sensitivity. **Annu. Rev. Med.**, v. 49, p. 235-261, 1998.

GROSSI, S. G.; GENCO, R. J. Periodontal disease and diabetes mellitus: a two-way relationship. **Ann. Periodontol.**, v. 3, n. 1, p. 51-61, July. 1998.

HAJDUCH, E.; ALESSI, D. R.; HEMMINGS, B. A.; HUNDAL, H. S. Constitutive activation of protein kinase B alpha by membrane targeting promotes glucose and system a amino acid transport, protein synthesis, and inactivation of glycogen synthase 3 in L6 muscle cells. **Diabetes.**, v. 47, n. 7, p. 1006-10013, July. 1998.

HALL, K. E.; MCDONALD, M. W.; GRISÉ, K. N.; CAMPOS, O. A.; NOBLE, E. G.; MELLING, C. W. The role of resistance and aerobic exercise training on insulin sensitivity measures in STZ-induced Type 1 diabetic rodents. **Metabolism**, v. 62, n. 10, p. 1485-1494, Oct. 2013.

HAYASHI, T.; HIRSHMAN, M. F.; KURTH, E. J.; WINDER, W. W.; GOODYEAR, L. J. Evidence for 5' AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport. **Diabetes**, v. 47, n. 8, p. 1369-1373, Aug. 1998.

HEEREN, M. V.; DE SOUSA, L. E.; MOSTARDA, C.; MOREIRA, E.; MACHERT, H.; RIGATTO, K. V.; WICHI, R. B.; IRIGOYEN, M. C.; DE ANGELIS, K. Exercise improves cardiovascular control in a model of dislipidemia and menopause. **Maturitas**, v. 62, n. 2, p. 200-204, fev. 2009.

HEO, M.; KIM, E. Effects of endurance training on lipid metabolism and glycosylated hemoglobin levels in streptozotocin-induced type 2 diabetic rats on a high-fat diet. **J. Phys. Ther. Sci.**, v. 25, n. 8, p. 989-992, ago. 2013.

HIROSUMI, J. TUNCMAN, G.; CHANG, L.; GÖRGÜN, C. Z.; UYSAL, K. T.; MAEDA, K.; KARIN, M.; HOTAMISLIGIL, G. S. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. **Nature**, v. 420, n. 6913, p. 333-336, nov. 2002.

HO, S. S.; DHALIWAL, S. S.; HILLS, A. P.; PAL, S. Effects of chronic exercise training on inflammatory markers in australian overweight and obese individuals in a randomized controlled trial. **Inflammation**, v. 36, n. 3, p. 625-632, June. 2013.

HOPPS, E.; CANINO, B.; CAIMI, G. Effects of exercise on inflammation markers in type 2 diabetic subjects. **Acta Diabetol.**, v. 48, n. 3, p. 183-189, Sep. 2011.

HORNBERGER, T. A. J.; FARRAR, R.P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. **Can. J. Appl. Physiol.**, v. 29, n. 1, p. 16-31, Feb. 2004.

HOTAMISLIGIL, G. S.; ARNER, P.; CARO, J. F.; ATKINSON, R. L.; SPIEGELMAN, B. M. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, v. 95, n. 5, p. 2409-2415, May. 1995.

HOTAMISLIGIL, G. S.; BUDAVARI, A.; MURRAY, D.; SPIEGELMAN, B. M. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes: central role of tumor necrosis factor- α . **J. Clin. Invest.**, v. 94, n. 4, p. 1543-1549, Oct. 1994b.

HOTAMISLIGIL, G. S.; MURRAY, D. L.; CHOY, L. N.; SPIEGELMAN, B. M. Tumor necrosis factor α inhibits signaling from the insulin receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, n. 11, p. 4854-4858, May. 1994a.

HOTAMISLIGIL, G. S.; ERBAY, E. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 8, n. 12, p. 923-934, Dec. 2008.

HOTAMISLIGIL, G.; SHARGILL, N.; SPIEGELMAN, B. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science.**, v. 259, n. 5091, p. 87-91, Jan. 1993.

HUANG, S.; RUTKOWSKY, J. M.; SNODGRASS, R. G.; ONO-MOORE, K. D.; SCHNEIDER, D. A.; NEWMAN, J. W.; ADAMS, S. H.; HWANG, D. H. Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. **J. Lipid Res.**, v. 53, n. 9, p. 2002-2013, Sep. 2012.

HUSSEY, S. E.; MCGEE, S. L.; GARNHAM, A.; WENTWORTH, J. M.; JEUKENDRUP, A. E.; HARGREAVES, M. Exercise training increases adipose tissue GLUT4 expression in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Obes. Metab.**, v. 13, n. 10, p. 959-962, Oct. 2011.

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.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. Diabetes Atlas 2000. Brussels, 2000.

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.

JOVINE, M. S.; BUCHALLA, C. M.; SANTARÉM, E. M. M.; SANTARÉM, J. M.; ALDRIGHI, J. M. Efeito do treinamento resistido sobre a osteoporose após a menopausa: estudo de atualização. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 9, n. 4, p. 493-505, 2006.

KAMIL, W.; AL HABASHNEH, R.; KHADER, Y.; AL BAYATI, L.; TAANI, D. Effects of nonsurgical periodontal therapy on C-reactive protein and serum lipids in Jordanian adults with advanced periodontitis. **J. Periodontal Res.**, v. 46, n. 5, p. 616-621, Oct. 2011.

KANETY, H.; FEINSTEIN, R.; PAPA, M. Z.; HEMI, R.; KARASIK, A. 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.

KASUGA, M.; HEDO, J. A.; YAMADA, K. M.; KAHN, C. R. Structure of insulin receptor and its subunits. **J. Biol. Chem.**, v. 257, n. 17, p. 10392-10399, Sep. 1982a.

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. 1982b.

KASUGA, M.; ZICK, Y.; BLITHE, D. L.; CRETZAZ, M.; KAHN, C. R. Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin receptor in cell-free system. **Nature**, v. 298, n. 5875, 667-669, Aug. 1982c.

KATO, H.; TAGUCHI, Y.; TOMINAGA, K.; UMEDA, M.; TANAKA, A. Porphyromonas gingivalis LPS inhibits osteoblastic differentiation and promotes pro-inflammatory cytokine production in human periodontal ligament stem cells. **Arch. Oral Biol.**, v. 59, n. 2, p. 167-175, Feb. 2014.

KATZ, J. Elevated blood glucose levels in patients with severe periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, v. 28, n. 7, p. 710-712, Jul. 2001.

KAUR, S.; BRIGHT, R.; PROUDMAN, S. M.; BARTOLD, P. M. Does periodontal treatment influence clinical and biochemical measures for rheumatoid arthritis? A systematic review and meta-analysis. **Semin. Arthritis Rheum.**, 2014. No prelo.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nat. Immunol.**, v. 11, n. 5, p. 373-384, May. 2010.

KAWAI, T.; AKIRA, S. TLR signaling. **Cell Death Differ.**, v. 13, n. 5, p. 816-825, May. 2006.

KENNEDY, J. W.; HIRSCHMAN, M. F.; GERVINO, E. V.; OCEL, J. V.; FORSE, R. A.; HOENIG, S. J.; LAURIE, D. A.; GOODYEAR, J.; HORTON, E. S. Acute exercise induces glut4 translocation in skeletal muscle of normal human subjects and subjects with type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 48, n. 5, p. 1192-1197, May. 1999.

KEROUZ, N. J.; HÖRSCH, D.; PONS, S.; KAHN, C. R. 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.

KITAMURA, T.; KITAMURA, Y.; KURODA, S.; HINO, Y.; ANDO, M.; KOTANI, K.; KONISHI, H.; MATSUZAKI, H.; KIKKAWA, U.; OGAWA, W.; KASUGA, M. Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-treonine kinase Akt. **Mol. Cell. Biol.**, v. 19, n. 9, p. 6286-6296, Sep. 1999.

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.

KOPP, E.; GHOSH, S. Inhibition of NF- κ B by sodium salicylate and aspirin. **Science**, v. 265, n. 5174, p. 956–959, Aug. 1994.

KRAEMER, W. J.; RATAMESS, N. A. Fundamentals of resistance training: progression and exercise prescription. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 36, n. 4, p. 674-688, Apr. 2004.

KRUGER, N. J.; HAMMOND, J. B. Molecular comparison of pyrophosphate- and atp dependent fructose 6-phosphate 1-phosphotransferases from potato tuber. **Plant Physiol.**, v. 86, n. 3, p. 645-648, Mar. 1988.

KUMAR, K. R.; RANGANATH, V.; NAIK, R.; BANU, S.; NICHANI, A. S. Assessment of high sensitivity C-reactive protein and lipid levels in healthy adults and patients with coronary artery disease, with and without periodontitis - a cross-sectional study. **J. Periodontal Res.**, 2014. No prelo.

LANG, C. H.; DOBRESCU, C.; BAGBY, G. J. Tumor necrosis factor impairs insulin action on peripheral glucose disposal and hepatic glucose output. **Endocrinology**, v. 130, n. 1, p. 43-52, Jan. 1992.

LEMOS, E. T.; PINTO, R.; OLIVEIRA, J.; GARRIDO, P.; SERENO, J.; MASCARENHAS-MELO, F.; PÁSCOA-PINHEIRO, J.; TEIXEIRA, F.; REIS, F. Differential effects of acute (extenuating) and chronic (training) exercise on inflammation and oxidative stress status in an animal model of type 2 Diabetes Mellitus. **Mediators Inflamm.**, v. 2011, p. 253061, 2011.

LEMOS, E. T.; REIS, F.; BAPTISTA, S.; PINTO, R.; SEPODES, B.; VALA, H.; ROCHA-PEREIRA, P.; SILVA, A. S.; TEIXEIRA, F. Exercise training is associated with improved levels of C-reactive protein and adiponectin in ZDF (type 2) diabetic rats. **Med. Sci. Monit.**, v. 13, n. 8, p. BR168-BR174, Aug. 2007.

LIBMAN, I.; LAPORTE, R.; TULL, E.; MATSUSHIMA, M. Insulin dependent diabetes mellitus in the 21st century and beyond. A model disease for global health? **Diabetes Metab.**, v. 19, n. 1, Pt. 2, p. 74-79, 1993.

LIN, L. RAGE on the Toll Road? **Cell. Mol. Immunol.**, v. 3, n. 5, p. 351-358, Oct. 2006.

LÖSCHE, W.; KARAPETOW, F.; POHL, A.; POHL, C.; KOCHER, T. Plasma lipid and blood glucose levels in patients with destructive periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, v. 27, n. 8, p. 537-541, Aug. 2000.

LÖSCHE, W.; MARSHAL, G. J.; APATZIDOU, D. A.; KRAUSE, S.; KOCHER, T.; KINANE, D. F. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and plasma lipids in patients with destructive periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, v. 32, n. 6, p. 640-644, June. 2005.

LOURO, P. M.; FIORI, H. H.; LOURO-FILHO, P.; STEIBEL, J.; FIORI, R. M. Periodontal Disease during pregnancy and low birth weight. **J. Pediatr.**, v. 77, n. 1, p. 23-28, Feb. 2001.

LUÉVANO-CONTERAS, C.; GARAY-SEVILLA, M. E.; WROBEL, K.; MALACARA, J. M.; WROBEL, K. Dietary advanced glycation end products restriction diminishes inflammation markers and oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus. **J. Clin. Biochem. Nutr.**, v. 52, n. 1, p. 22-26, Jan. 2013.

LUNARDELLI, A. N.; PERES, M. A. Is there association between periodontal disease, prematurity and low birth weight? A population-based study. **J. Clin. Periodontol.**, v. 32, n. 9, p. 938-946, Sep. 2005.

MACHADO, A. C.; QUIRINO, M. R.; NASCIMENTO, L. F. Relation between chronic periodontal disease and plasmatic levels of triglycerides, total cholesterol and fractions. **Braz. Oral Res.**, v. 19, n. 4, p. 284-289, Oct./ Dec. 2005.

MACKENZIE, R.; MAXWELL, N.; CASTLE, P.; ELLIOTT, B.; BRICKEY, G.; WATT, P. Intermittent exercise with and without hypoxia improves insulin sensitivity in individuals with type 2 diabetes. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 97, n. 4, p. E546-E555, Apr. 2012.

MADDUX, B. A.; GOLDFINE, I. D. Membrane glycoprotein PC-1 inhibition of insulin receptor function occurs via direct interaction with the receptor alpha-subunit. **Diabetes**, v. 49, n. 1, p. 13-19, Jan. 2000.

MANN, S.; BEEDIE, C.; JIMENEZ, A. Differential effects of aerobic exercise, resistance training and combined exercise modalities on cholesterol and the lipid profile: review, synthesis and recommendations. **Sports Med.**, v. 44, n. 2, p. 211-221, Feb. 2014.

MANSON, J. E.; RIMM, E. B.; STAMPFER, M. J.; COLDITZ, G. A.; WILLETT, W. C.; KROLEWSKI, A. S.; ROSNER, B.; HENNEKENS, C. H.; SPEIZER, F. E. Physical activity and incidence of non-insulin dependent diabetes mellitus in women. **Lancet.**, v. 338, n. 8770, p. 774-778, Sep. 1991.

MARCHETTI, E.; MONACO, A.; PROCACCINI, L.; MUMMOLO, S.; GATTO, R.; TETÈ, S.; BALDINI, A.; TECCO, S.; MARZO, G. Periodontal disease: the Influence of metabolic syndrome. **Nutr. Metab.**, v. 9, n. 1, p. 88, Sep. 2012.

MARINHO, R.; ROPELLE, E. R.; CINTRA, D. E.; SOUZA, C. T.; SILVA, A. S. R.; BERTOLI, F. C.; COLANTONIO, E.; D'ALMEIDA, V.; PAULI, J. R. Endurance exercise training increases apolipoprotein A1 expression and improves insulin signaling in the hepatic tissue of diet-induced obese mice, independently of weight loss. **J. Cell. Physiol.**, v. 227, n. 7, p. 2917-2926, Jul. 2012.

MATHUR, N.; PEDERSEN, B. K. Exercise as a mean to control low-grade systemic inflammation. **Mediators Inflamm.**, v. 2008, p. 109502, 2008.

MAVROS, Y.; KAY, S.; ANDERBERG, K. A.; BAKER, M. K.; WANG, Y.; ZHAO, R.; MEIKLEJOHN, J.; CLIMSTEIN, M.; O'SULLIVAN, A.; DE VOS, N.; BAUNE, B. T.; BLAIR, S. N.; SIMAR,

D.; ROONEY, K.; SINGH, N.; FIATARONE SINGH, M. A. Changes in insulin resistance and HbA1c are related to exercise-mediated changes in body composition in older adults with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 36, n. 8, p. 2372-2379, Aug. 2013.

MIKINES, K. J.; SONNE, B.; FARRELL, P. A.; TRONIER, B.; GALBO, H. Effect of physical exercise on sensitivity and responsiveness to insulin in humans. **Am. J. Physiol.**, v. 254, n. 3, pt. 1, p. E248 – E259, Mar. 1988.

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

MORRIONE, A. Grb10 proteins in insulin-like growth factor and insulin receptor signaling (review). **Int. J. Mol. Med.**, v. 5, n. 2, p. 151-154, Feb. 2000.

MOWAT, A.; BAUM, J. Chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes from patients with diabetes mellitus. **N. Engl. J. Med.**, v. 284, n. 12, p. 621-627, Mar. 1971.

MUNENAGA, Y.; HIROSHIMA STUDY GROUP, YAMASHINA, T.; TANAKA, J.; NISHIMURA F. Improvement of glycated hemoglobin in Japanese subjects with type 2 diabetes by resolution of periodontal inflammation using adjunct topical antibiotics: Results from the Hiroshima Study. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v. 100, n. 1, p. 53-60, Apr. 2013.

MUSI, N.; GOODYEAR, L. J. AMP-activated protein kinase and muscle glucose uptake. **Acta Physiol. Scand.**, v. 178, n. 4, p. 337-345, Aug. 2003.

NAPETSCHNIG, J.; WU, H. Molecular basis of NF- κ B signaling. **Annu. Rev. Biophys.**, v. 42, p. 443-468, Mar. 2013.

NICKLAS, B. J.; YOU, T.; PAHOR, M. Behavioural treatments for chronic systemic inflammation: effects of dietary weight loss and exercise training. **CMAJ**, v. 172, n. 9, p. 1199-1209, Apr. 2005.

NIETO-VAZQUEZ, I.; FERNÁNDEZ-VELEDO, S.; DE ALVARO, C.; LORENZO, M. Dual role of interleukin-6 in regulating insulin sensitivity in murine skeletal muscle. **Diabetes.**, v. 57, n. 12, p. 3211-3221, Dec. 2008.

NOACK, B.; GENCO, R. J.; TREVISAN, M.; GROSSI, S.; ZAMBON, J. J.; DE NARDIN, E. Periodontal infections contribute to elevated systemic C-reactive protein level. **J. Periodontol.**, v. 72, n. 9, p. 1221-1227, Sep. 2001.

NUUTILA, P.; KNUUTI, M. J.; HEINONEN, O. J.; RUOTSALAINEN, U.; TERÄS, M.; BERGMAN, J.; SOLIN, O.; YKI-JÄRVINEN, H.; VOIPIO-PULKKI L. M.; WEGELIUS, U. Different alterations in the insulin-stimulated glucose uptake in the athlete's heart and skeletal muscle. **J. Clin. Invest.**, v. 93, n. 5, p. 2267-2274, May. 1994.

O'HAGAN, C.; DE VITO, G.; BOREHAM, C. A. G. Exercise prescription in the treatment of type 2 diabetes mellitus: current practices, existing guidelines and future directions. **Sports Med.**, v. 43, n. 1, p. 39-49, Jan. 2013.

OLIVEIRA, A. G.; CARVALHO, B. M.; TOBAR, N.; ROPELLE, E. R.; PAULI, J. R.; BAGAROLLI, R. A.; GUADAGNINI, D.; CARVALHEIRA, J. B.C.; SAAD, M. J. A. Physical exercise reduces circulating lipopolysaccharide and tlr4 activation and improves insulin signaling in tissues of DIO rats. **Diabetes**, v. 60, n. 3, p. 784-796, Mar. 2011.

ORR, J. S.; PUGLISI, M. J.; ELLACOTT, K. L.; LUMENG, C. N.; WASSERMAN, D. H.; HASTY, A. H. Toll like receptor 4 deficiency promotes the alternative activation of adipose tissue macrophages. **Diabetes**, v. 61, n. 11, p. 2718-2727, Nov. 2012.

OUCHI, N.; KIHARA, S.; ARITA, Y.; OKAMOTO, Y.; MAEDA, K.; KURIYAMA, H.; HOTTA, K.; NISHIDA, M.; TAKAHASHI, M.; MURAGUCHI, M.; OHMOTO, Y.; NAKAMURA, T.; YAMASHITA, S.; FUNAHASHI, T.; MATSUZAWA, Y. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. **Circulation**, v. 102, n. 11, p. 1296-1301, set. 2000.

PANVELOSKY-COSTA, A. C.; PINTO-JÚNIOR, D. A. C.; BRANDÃO, B. B.; MOREIRA, R. J.; MACHADO, U. F.; SERAPHIM, P. M. Treinamento resistido reduz inflamação em músculo esquelético e melhora a sensibilidade à insulina periférica em ratos obesos induzidos por dieta hiperlipídica. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 55, n. 2, p. 155-163, Mar. 2011.

PASTER, B. J.; OLSEN, I.; AAS, J. A.; DEWHIRST, F. E. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. **Periodontol.** 2000, v. 42, p. 80-87, 2006.

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

PAULI, J. R.; CINTRA, D. E.; SOUZA, C. T.; ROPELLE, E. R. New mechanisms by which physical exercise improves insulin resistance in the skeletal muscle. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 53, n. 4, p. 399-408, jun. 2009.

PAULI, J. R.; ROPELLE, E. R.; CINTRA, D. E.; CARVALHO-FILHO, M. A.; MORAES, D. E.; SOUZA, C. T.; VELLOSO L. A.; CARVALHEIRA, J. B.; SAAD, M. J. Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt in dietary induce obese Wistar rats. **J. Physiol.**, v. 586, n. 2, p. 659-671, Jan. 2008.

PAULI, J. R.; ROPELLE, E. R.; CINTRA, D. E.; DE SOUZA, C. T.; DA SILVA, A. S.; MORAES, J. C.; PRADA, P. O.; DE ALMEIDA LEME, J. A.; LUCIANO, E.; VELLOSO, L. A.; CARVALHEIRA, J. B.; SAAD, M. J. Acute exercise reverses aged-induced impairments in insulin signaling in rodent skeletal muscle. **Mech. Ageing Dev.**, v. 131, n. 5, p. 323-329, May. 2010.

PEDERSEN, B. K.; HOFFMAN-GOETZ, L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. **Physiol. Rev.**; v. 80, n. 3, p. 1055-1081, July. 2000.

PEPYS, M. B.; HIRSCHFIELD, G. M. C-reactive protein: a critical update. **J. Clin. Invest.**, v. 111, n. 12, p. 1805-1812, June. 2003.

PEREIRA, G. B. P.; TIBANA, R. A.; NAVALTA, J.; SOUSA, N. M.; CORDOVA, C.; SOUZA, V. C.; NÓBREGA, O. T.; PRESTES, J.; PEREZ, S. E. Acute effects of resistance training on cytokines and osteoprotegerin in women with metabolic syndrome. **Clin. Physiol. Funct. Imaging.**, v. 33, n. 2, p. 122-130, Mar. 2013.

PETERSEN, A. M. W., PEDERSEN, B. K. The role of IL-6 in mediating the anti-inflammatory effect of exercise. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 57, Suppl. 10, p. 43-51, Nov. 2006.

PICKUP, J.; CROOK, M. Is type 2 diabetes mellitus a disease of the innate immune system? **Diabetologia.**, v. 41, n. 10, p. 1241-1248, Oct. 1998.

PIHLSTROM, B. L.; MICHALOWICZ, B. S.; JOHNSON, N. W. Periodontal diseases. **Lancet**, v. 366, n. 9499, p. 1809-1820, Nov. 2005.

PILON, G.; DALLAIRE, P.; MARETTE, A. Inhibition of inducible nitric-oxide synthase by activators of AMP-activated protein kinase: a new mechanism of action of insulin-sensitizing drugs. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 20, p. 20767-20774, May. 2004.

POLTORAK, A.; HE, X.; SMIRNOVA, I.; LIU, M. Y.; VAN HUFFEL, C.; DU, X.; BIRDWELL, D.; ALEJOS, E.; SILVA, M.; GALANOS, C.; FREUDENBERG, M.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; LAYTON, B.; BEUTLER, B. Defective LPS signaling in C2H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2085-2088, Dec. 1998.

PONTES ANDERSEN, C. C.; FLYVBJERG, A.; BUSCHARD, K.; HOLMSTRUP, P. periodontitis is associated with aggravation of prediabetes in Zucker fatty rats. **J. Periodontol.**, v. 78, n. 3, p. 559-565, Mar. 2007.

PORTO, A. N.; BORGES, A. H.; SEMENOFF-SEGUNDO, A.; SEMENOFF, T. A.; PEDRO, F. L.; BANDECA, M. C.; CORTELLI, S. C. Lipid profile parameters under influence of periodontitis associated with chronic stress: an animal model study. **J. Int. Oral. Health.**, v. 5, n. 4, p. 8-14, Aug. 2013.

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

ROCHA, J. L. L.; BAGGIO, H. C. C.; CUNHA, C. A.; NICLEWICZ, E. A.; LEITE, S. A. O.; BAPTISTA, M. I. D. K. Aspectos Relevantes da Interface Entre Diabetes Mellitus e Infecção. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 46, n. 3, p. 221-229, June. 2002.

ROGERS, M. A.; KING, D. S.; HAGBERG, J. M.; EHSANI, A. A.; HOLLOSZY, J. O. Effect of 10 days of physical inactivity on glucose tolerance in master athletes. **J. Appl. Physiol.**, v. 68, n. 5, p. 1833-1837, May. 1990.

ROPELLE, E. R.; PAULI, J. R.; PRADA, P. O.; DE SOUZA, C. T.; PICARDI, P. K.; CINTRA, D. E.; FERNANDES, M. F.; FLORES, M. B.; VELLOSO, L. A.; SAAD, M. J.; CARVALHEIRA, J. B. Reversal of diet-induced insulin resistance with single bout of exercise in the rat the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation. **J. Physiol.**, v. 577, Pt. 3, p. 997-1007, dec. 2006.

SABIO, G.; DAVIS, R. J. TNF and MAP kinase signalling pathways. **Semin. Immunol.**, v. 26, n. 3, p. 237-245, Jun. 2014.

SCANNAPIECO, F. A. Inflamação periodontal: da gengivite à doença sistêmica? **Compend. Cont. Educ. Dent.**, v. 25, n. 7, p. 16-25, 2004.

SCHENKEIN, H. A.; LOOS, B. G. Inflammatory mechanisms linking periodontal diseases to cardiovascular diseases. **J. Periodontol.**, v. 84, n. 4 (Suppl), p. S51-S69, apr. 2013.

SCHIMMACK, G.; DEFRONZO, R. A.; MUSI, N. AMP-activated protein kinase: Role in metabolism and therapeutic implications. **Diabetes Obes. Metab.**, v. 8, n. 6, p. 591-602, Nov. 2006.

SEALS, D. R.; HAGBERG, J. M.; ALLEN, W. K.; HURLEY, B. F.; DALSKY, G. P.; EHSANI, A. A.; HOLLOSZY, J.O. Glucose tolerance in young and older athletes and sedentary men. **J. Appl. Physiol.**, v. 56, n. 6, p. 1521-25, June. 1984.

SEELY, B. L.; STAUBS, P. A.; REICHART, D. R.; BERHANU, P.; MILARSKI, K. L.; SALTIEL, A. R.; KUSARI, J.; OLEFSKY, J. M. Protein tyrosine phosphatase 1B interacts with the activated insulin receptor. **Diabetes**, v. 45, n. 10, p. 1379-1385, Oct. 1996.

SHAPIRA, L.; SOSKOLNE, W. A.; SELA, M. N.; OFFENBACHER, S.; BARAK, V. The secretion of PGE2, IL-1 beta, IL-6, and TNF alpha by adherent mononuclear cells from early onset periodontitis patients. **J. Periodontol.**, v. 65, n. 2, p. 139-146, Feb. 1994.

SHAW, J. E.; SICREE, R. A.; ZIMMET, P. Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v. 87, n. 1, p. 4-14, Jan. 2010.

SHERMAN, L. A.; HIRSHMAN, M. F.; CORMONT, M.; LE MARCHAND-BRUSTEL, Y.; GOODYEAR, L. J. Differential effects of insulin and exercise on Rab4 distribution in rat skeletal muscle. **Endocrinology**, v. 137, n. 1, p. 266-273, Jan. 1996.

SHI, H.; KOKOEVA, M. V.; INOUE, K.; TZAMELI, I.; YIN, H.; FLIER, J. S. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, v. 116, n. 11, p. 3015-3025, Nov. 2006.

SHIMADA, Y.; KOMATSU, Y.; IKEZAWA-SUZUKI, I.; TAI, H.; SUGITA, N.; YOSHIE, H. The effect of periodontal treatment on serum leptin, interleukin-6, and C-reactive protein. **J. Periodontol.**, v. 81, n. 8, p. 1118-1123, Aug. 2010.

SHIMAZU, R.; AKASHI, S.; OGATA, H.; NAGAI, Y.; FUKUDOME, K.; MIYAKE, K.; KIMOTO, M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. **J. Exp. Med.**, v. 189, n. 11, p. 1777-1782, June. 1999.

SHOELSON, S. E.; LEE, J.; GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, v. 116, n. 7, p. 1793-1801, July. 2006.

SIMA, A.; O'NEILL, S.; NAIMARK, D.; YAGIHASHI, S.; KLAN, D. Bacterial phagocytosis and intracellular killing by alveolar macrophages in BB rats. **Diabetes**, v. 37, n. 5, p. 544-549, May. 1998.

SMITH, F. M. HOLT, L. J.; GARFIELD, A. S.; CHARALAMBOUS, M.; KOUMANOV, F.; PERRY, M.; BAZZANI, R.; SHEARDOWN, S. A.; HEGARTY, B. D.; LYONS, R. J.; COONEY, G. J.; DALY, R. J.; WARD, A. Mice with a disruption of the imprinted Grb10 gene exhibit altered body composition, glucose homeostasis, and insulin signaling during postnatal life. **Mol Cell Biol.**, v. 27, n. 16, p. 5871-5876, Aug. 2007.

SOLINAS, G.; VILCU, C.; NEELS, J. G.; BANDYOPADHYAY, G. K.; LUO, J. L.; NAUGLER, W.; GRIVENNIKOV, S.; WYNSHAW-BORIS, A.; SCADENG, M.; OLEFSKY, J. M.; KARIN, M. JNK1 in hematopoietically derived cells contributes to diet-induced inflammation and insulin resistance without affecting obesity. **Cell Metab.**, v. 6, n. 5, p. 386-397, Nov. 2007.

SOLINAS, G.; KARIN, M. JNK1 and IKKbeta: molecular links between obesity and metabolic dysfunction. **FASEB J.**, v. 24, n. 8, p. 2596-2611, Aug. 2010.

SRIWIJITKAMOL, A. COLETTA, D. K.; WAJCBERG, E.; BALBONTIN, G. B.; REYNA, S. M.; BARRIENTES, J.; EAGAN, P. A.; JENKINSON, C. P.; CERSOSIMO, E.; DEFRONZO, R. A.; SAKAMOTO, K.; MUSI, N. Effect of acute exercise on AMPK signaling in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes: a time-course and dose-response study. **Diabetes**, v. 56, n. 3, p. 836-848, Mar. 2007.

STARKIE, R.; OSTROWSKI, S. R.; JAUFFRED, S.; FEBBRAIO, M.; PEDERSEN, B. K. Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF-alpha production in humans. **FASEB J.**, v. 17, n. 8, p. 884-886, May. 2003.

STONE, R. Search for sepsis drugs goes on despite past failures. **Science**, v. 264, n. 5157, p. 365-367, Apr. 1994.

SUN, W. L.; CHEN, L.L; ZHANG, S. Z.; WU, Y. M.; REN, Y. Z.; QIM, G. M. Inflammatory cytokines, adiponectin, insulin resistance and metabolic control after periodontal intervention in patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis. **Intern. Med.**, v. 50, n. 15, p. 1569-1574, 2011.

SUN, X, J.; WANG, L. M.; ZHANG., Y; MYERS, M. G.; LANE, W. S.; PIECE, J. H.; WHITE, M. F. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signaling. **Nature**, v. 377, n. 6545, p. 173-177, Sep. 1995.

SUN, X. J.; ROTHENBERG, P.A.; KAHN, C. R.; BACKER, J. M.; ARAKI, E.; WILDEN, P. A.; CAHILL, D. A.; GOLDSTEIN, B. J.; WHITE, M. F. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. **Nature**, v. 352, n. 6330, p. 73-77, July. 1991.

TABÁK, A. G.; HERDER, C.; RATHMANN, W.; BRUNNER, E. J.; KIVIMÄKI, M. Prediabetes: a high-risk state for developing diabetes. **Lancet**, v. 379, n. 9833, p. 2279-2290, June. 2012.

TALEBI-GARAKANI, E.; SAFARZADE, A. Resistance training decreases serum inflammatory markers in diabetic rats. **Endocrine**, v. 43, n. 3, p. 564-570, June. 2013.

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.

TAYLOR, G. W.; BORGNAKKE, W. S. Periodontal disease: associations with diabetes, glycemic control and complications. **Oral Dis.**, v. 14, n. 3, p. 191-203, Apr. 2008.

TAYLOR, G. W.; BURT, B. A.; BECKER, M. P.; GENCO, R. J.; SHLOSSMAN, M.; KNOWLER, W. C.; PETTITT, D. J. Non-insulin dependent diabetes mellitus and alveolar bone loss progression over 2 years. **J. Periodontol.**, v. 69, n. 1, p. 76-83, Jan. 1998.

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

TSAI, C.; HAYES, C; TAYLOR, G. W. Glicemic control of type 2 diabetes and severe periodontal disease in the US adult population. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v. 30, n. 3, p. 182-192, June. 2002.

TSUKUMO, D. M.; CARVALHO-FILHO, M. A.; CARVALHEIRA, J. B.; PRADA, P. O.; HIRABARA, S. M.; SCHENKA, A. A.; ARAÚJO, E. P.; VASSALLO, J.; CURI, R.; VELLOSO, L. A.; SAAD, M. J. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 56, n. 8, p.1986-98, Aug. 2007.

TUTER, G.; KURTIŞ, B.; SERDAR, M.; AYKAN, T.; OKYAY, K.; YÜCEL, A.; TOYMAN, U.; PINAR, S.; CEMRI, M.; CENGEL, A.; WALKER, S. G.; GOLUB, L. M. Effects of scaling and root planing and sub-antimicrobial dose doxycycline on oral and systemic biomarkers of disease in patients with both chronic periodontitis and coronary artery disease. **J. Clin. Periodontol.**, v. 34, n. 8, p. 673-681, Aug. 2007.

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, June. 2004.

URIZA, C. L.; ARREGOCES, F. E.; PORRAS, J. V.; CAMARGO, M. B. F.; MORALES, A. R. Ultra-sensitive c-reactive protein (us-crp) in patients with periodontal disease and risk of acute myocardial infarction. **Cardiol. Res.**, v. 2, n. 1, p. 27-35, 2011.

UYSAL, K.; WIESBROCK, S.; MARINO, M.; HOTAMISLIGIL, G. Protection from obesity induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. **Nature**, v. 389, n. 6651, p. 610-614, Oct. 1997.

VAN DER POLL, T.; COYLE, S. M.; MOLDAWER, L. L.; LOWRY, S. F. Changes in endotoxin-induced cytokine production by whole blood after in vivo exposure of normal humans to endotoxin. **J. Infect. Dis.**, v. 174, n. 6, p. 1356-1360, Dec. 1996.

VANHAESEBROECK, B.; ALESSI, D. R. The PI3K- PDK1 connection: more than just a road to PBK. **Biochem. J.**, v. 346, pt. 3, p. 561-576, Mar. 2000.

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

WAGNER, M. POECK, H.; JAHRSDOERFER, B.; ROTHENFUSSER, S.; PRELL, D.; BOHLE, B.; TUMA, E.; GIESE, T.; ELLWART, J. W.; ENDRES, S.; HARTMANN, G. 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.

WANG, Q.; SOMWAR, R.; BILAN, P. J.; LIU, Z.; JIN, J.; WOODGETT, J. R.; KLIP, A. Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 Myoblasts. **Mol. Cell. Biol.**, v. 19, n. 6, p. 4008-4018, June. 1999.

WATANABE, K.; PETRO, B. J.; SHLIMON, A. E.; UNTERMAN, T. G. Effect of periodontitis on insulin resistance and the onset of type 2 diabetes mellitus in Zucker diabetic fatty rats. **J. Periodontol.**, v. 79, n. 7, p. 1208-1216, July. 2008.

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.; 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.

WHYTE, L. J.; FERGUSON, C.; WILSON, J.; SCOTT, R. A.; GILL, J. M. R. Effects of single bout of very high-intensity exercise on metabolic health biomarkers in overweight/obese sedentary men, **Metabolism.**, v. 62, n. 2, p. 212-219, Feb. 2012.

WU, X. HOFFSTEDT, J.; DEEB, W.; SINGH, R.; SEDKOVA, N.; ZILBERING, A.; ZHU, L.; PARK, P. K.; ARNER, P.; GOLDSTEIN, B. J. Depot-specific variation in protein-tyrosine phosphatase activities in human omental and subcutaneous adipose tissue: a potential contribution to differential insulin sensitivity. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 86, n. 12, p. 5973-5980, Dec. 2001.

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.

ZABOLOTNY, J. M.; KIM, Y. B.; WELSH, L. A.; KERSHAW, E. E.; NEEL, B. G.; KAHN, B. B. Protein-tyrosine phosphatase 1B expression is induced by inflammation in vivo. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 21, p. 14230-14241, May. 2008.

ZHOU, L. CHEN, H.; XU, P.; CONG, L. N.; SCIACCHITANO, S.; LI, Y.; GRAHAM, D.; JACOBS, A. R.; TAYLOR, S. I.; QUON, M. J. Action of Insulin Receptor Substrate-3 (IRS-3) and IRS-4 to Stimulate Translocation of Glut-4 in Rat Adipose cells. **Mol. Endocrinol.**, v. 13, n. 3, p. 505-14, Mar. 1999.

ANEXO A

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


Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Efeito da atividade física na sensibilidade à insulina e no sinal insulínico em ratos com doença periodontal" sob responsabilidade da Pesquisadora DÓRIS HISSAKO SUMIDA e colaboração de Luciano Tavares Ângelo Cintra e Max Sander de Oliveira da Mota está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo 00510-2012.

CERTIFICATE

We certify that the research "Effect of physical activity in insulin sensitivity and insulin signaling in rats with periodontal disease", process number 00510-2012, under responsibility of DÓRIS HISSAKO SUMIDA and with collaboration of Luciano Tavares Ângelo Cintra and Max Sander de Oliveira da Mota agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.


Prof. Dr. Fabiano A. Cadioli
CEUA Coordinator

ANEXO B

Artigo que será enviado para a revista Journal of
Endocrinology

Resistance training reverses insulin resistance of rats with periodontal disease

Max Sander de O. da Mota¹ – Post graduate student

Maria Sara de L. Coutinho Mattera¹ – Post graduate student

Fernando Y. Chiba² - Postdoctoral student

Renato Felipe Pereira¹ – Post graduate student

Cristina Antoniali Silva¹ – Assistant Professor

Edilson Ervolino¹ - Assistant Professor

Cléa Adas Saliba Garbin² – Associate Professor

Doris H. Sumida¹ – Associate Professor

¹ Department of Basic Sciences, Dental School of Araçatuba, UNESP- Univ Estadual Paulista, Brazil

² Department of Child and Social Dentistry, Dental School of Araçatuba, UNESP- Univ Estadual Paulista, Brazil

Corresponding Author:

Doris Hissako Sumida

E-mail: dorishs@foa.unesp.br

Dental School of Araçatuba, UNESP- Univ Estadual Paulista

Address: R. José Bonifácio, 1193, CEP: 16015-050, Araçatuba-SP, Brazil

TEL: (+55) 18 3636 2819 FAX: (+55) 18 3636 3233

Short title: Exercise and insulin sensitivity in rats with periodontitis

Keywords: Periodontitis; diabetes mellitus; insulin resistance; tumor necrosis factor-alpha; resistance training.

Word count: 2777 words

Abstract

Periodontitis is associated to the onset of insulin resistance (IR) and resistance training (RT) is considered effective to improve insulin sensitivity of rats. Therefore, this study aimed to evaluate the effects of RT on glycemia, insulinemia, insulin sensitivity, insulin signaling (IS) and TNF- α levels of rats with periodontitis. Forty male Wistar rats were distributed into 4 groups: sedentary control group (SCN), exercised control group (ExCN), sedentary ligature-induced periodontal disease group (SPD) and exercised ligature-induced periodontal disease group (ExPD). Twenty-eight days after inducing periodontitis the 14-week RT started. Plasmatic concentration of Glucose, insulin and TNF- α were analyzed. Insulin sensitivity was measured using the insulin tolerance test (ITT) and HOMA-IR index. IS was evaluated by measuring pp185 tyrosine and serine phosphorylation status in insulin-sensitive tissues by the Western blotting method. No difference was observed on the glycemia. Higher levels of insulin, HOMA-IR and TNF- α , and a decrease in insulin sensitivity were observed in SPD. SPD showed decreased insulin-stimulated pp185 tyrosine phosphorylation status in skeletal muscle and adipose tissue when compared to the other groups. In addition, ExPD showed increased insulin-stimulated pp185 tyrosine phosphorylation status in the same tissues when compared to SPD, and showed no significant difference when compared to SCN and ExCN. No differences on pp185 serine phosphorylation status were observed among the groups. RT reversed IR and the alterations in IS in rats with induced periodontitis and decreased insulin and TNF- α levels. Therefore, these results show the importance of exercise training to prevent or treat insulin resistance associated to periodontitis.

Introduction

Periodontal disease is a chronic infectious inflammatory disease that occurs commonly in middle age adults, and increases in elderly people (URIZA et al., 2011). It has been considered a predisposing factor to the development of insulin resistance and TYPE 2 Diabetes Mellitus (T2DM) because of inflammatory mediators releasing, such as TNF- α (MEALEY; OATES, 2006). In fact, some studies have demonstrated that chronic periodontitis is associated with elevated plasma levels of TNF- α in subjects with T2DM (ENGBRESTON et al., 2007) and in rats with induced periodontal disease (COLOMBO et al., 2012).

The proinflammatory cytokine TNF- α is related to insulin resistance in obese animals and to suppression of insulin signaling in vivo and in vitro (FEINSTEIN et al., 1993; HOTAMISLIGIL et al., 1994) by reducing tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. Colombo et al. (2012) showed that induced periodontal disease caused alterations to both insulin signaling and sensitivity with elevation of TNF- α plasma level. In addition, it has been demonstrated that periodontal treatment reduces TNF- α levels in diabetic subjects (DAG et al., 2009) and improved glycemic control in type 2 diabetic patients (BHARTI et al., 2013).

Some studies have demonstrated that resistance training (RT) improved insulin resistance of type 2 diabetic and obese subjects (MAVROS et al., 2013). It is known that exercise can improve insulin sensitivity by decreasing visceral fat (CAMPOS et al., 2014), inflammatory markers (PHILLIPS et al., 2010) and increasing GLUT4 translocation (KENNEDY et al., 1999; HOWLETT et al., 2013).

Considering that periodontal disease can promote alterations in insulin signal transduction and insulin sensitivity and that resistance training can improve such parameters in obese animals, this study aimed to evaluate insulin sensitivity, insulin signaling and TNF- α levels in adult rats with induced periodontal disease submitted to resistance training.

Materials and Methods

Animals

Forty male Wistar rats (at 2 months old) were housed under a 12/12 hour light/dark cycle (lights on 7:00 am), with temperature of $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ and food and water available *ad libitum*. This study followed the ethical principles and guidelines for animal experimentation and was approved by the local ethics committee according to protocol no. 00510-2012.

Experimental Design

Initially, the animals were randomly divided into two groups: control (CN) and periodontal disease (PD). PD animals were anesthetized using ketamine hydrochloride* (Ketamina, Agener, Embu-Guaçu, Brazil, 10%, 80 mg/kg body weight, intraperitoneally) with xylazine† (Xilasina, Dorcipec®, Monte Carlos, Brazil, 2%, 10 mg/kg body weight, intraperitoneally) and then periodontal disease was induced by ligating 4-0 silk thread on the cervical region of the lower first molars, bilaterally. Twenty eight days after the periodontal disease induction, CN and PD animals were submitted to the first insulin tolerance test (ITT) and then they were divided into four groups: sedentary control group (SCN), exercised control group (ExCN), sedentary periodontal disease group (SPD) and exercised periodontal disease group (ExPD), and then, the resistance training protocol started. After 14 weeks, the animals were submitted to 14-hour fasting and sodium thiopental (Thiopentax®, Cristália, Itapira, Brazil, 3%, 50 mg/kg body weight, intraperitoneally) anesthetization. Then the experiments were performed.

Resistance Training

Resistance training was applied according to the protocol described by Hornberger and Farrar (2004). Initially, the rats were subjected to a 2-week adaptation program and then, the RT program started. During the RT period, training was performed 3 days a week on an alternate day

basis, with the rats executing climbing of a ladder with gradual load increase during the 12-week period of training.

Determination of Glucose, Insulin and TNF- α levels

Plasma samples were used to determine glucose level by glucose oxidase method (Enzymatic glucose, ANALISA Diagnóstica, Belo Horizonte, Brazil) and insulinemia was determined by radioimmunoassay (Coat - A - Count, DPC Diagnostics Products, Los Angeles, CA). Insulin resistance was evaluated by the homeostasis model assessment of insulin resistance $HOMA-IR = (\text{fasting glycemia [mmol/L]} \cdot \text{fasting insulinemia [mUI/mL]})/22.5$. Plasmatic levels of TNF- α were quantified using an enzyme-linked immunosorbent assay kit (Invitrogen, Camarillo, CA).

Short Intravenous Insulin Tolerance Test (ITT)

ITTs were performed before and after training period, following the protocol described by Chehoud et al. (2008). Insulin (0.75 U/kg body weight) was administered through penile vein to all groups. Blood samples (≈ 50 mL) were collected from nicked tails at 0 (before hormone administration), 4, 8, 12, and 16 minutes (after insulin administration), and glucose was measured using a glucose monitor (Accu-Chek Advantage, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). The results were analyzed by comparison of the constant rate for glucose disappearance (Kitt) from 0 to 16 minutes of the test. The Kitt value was calculated using the equation $0.693/t_{1/2}$. The glucose $t_{1/2}$ was calculated from the slope of the least squares analysis of the plasma glucose concentrations during the linear decay phase.

Assessment of the IRS (pp185 – IRS-1/IRS-2) tyrosine and serine phosphorylation status

Samples from liver, gastrocnemius skeletal muscle, and peri-epididymal white adipose tissue were collected from six animals of each group (SCN, ExCN, SPD and ExPD) before and after

administration of 1.5 U of regular insulin (portal vein intravenously) at variable times (30 seconds for liver, 90 seconds for gastrocnemius, and 120 seconds for white adipose tissue). Tissue samples were prepared according to the method described by Carvalho et al. (1996) and submitted to the Western blotting method for quantification of pp185 (IRS-1/IRS-2) tyrosine and serine phosphorylation status using anti-phosphotyrosine and antiphosphoserine antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). GAPDH antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) was used as control. Immunoreactive bands were detected by autoradiography using a chemiluminescent substrate system (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) according to the instructions of the manufacturer. Quantitative analysis of the blots was performed using a software (Scion Image Release beta 3b, National Institutes of Health, Frederick, MD).

Statistical Analyses

All values are presented as mean \pm SEM. The normality of data was verified and then statistical analysis was performed by analysis of variance, followed by Tukey post hoc test when the analysis of variance suggested a significant difference between groups ($P < 0.05$).

Results

Glycemia, insulinemia, HOMA-IR index and TNF- α levels

The comparison of fasting glycemia of the four groups showed no significant difference (Table 1). Insulinemia and HOMA-IR index values were higher ($P < 0.05$) in SPD group when compared to the other groups. On the other hand, ExPD insulinemia and HOMA-IR index were higher only when compared to SCN. No difference was observed between SPD and ExCN groups (Table 1).

ITT

Twenty-eight days after periodontal disease induction (before RT period), the KITT of PD group was smaller ($P < 0.05$) than CN group. A smaller value of KITT shows greater insulin resistance due to impaired insulin sensitivity. After RT, SPD showed smaller KITT value ($P < 0.05$) when compared to SCN, ExCN and ExPD groups.

Insulin signal transduction

It was observed an increase in pp185 tyrosine phosphorylation status after insulin stimulus in relation to baseline in all groups and tissues. After insulin stimulus, pp185 phosphorylation status was reduced ($P < 0.05$) in muscle and white adipose tissue in SPD group compared with the SCN, ExCN and ExPD groups. However, this alteration in insulin signaling was not observed in liver of all groups (Fig. 2). No difference was observed in IRS-1 serine phosphorylation status between the groups studied (Fig. 3)

Discussion

Knowing that there is a relation between periodontal disease, insulin resistance and insulin signaling (COLOMBO et al., 2012), the present study aimed to verify the effects of RT on these parameters in adult rats with induced periodontal disease. It was observed that induced periodontal disease promoted insulin resistance and a decrease in insulin signaling in adult rats and RT improved these alterations.

The existence of a bidirectional relation between periodontal condition, T2DM and insulin resistance has been demonstrated. Katagariet al. (2013) showed that glycemic control ameliorated periodontal disease in type 2 diabetic subjects without periodontal treatment. Some studies show that the presence of periodontal disease is related to elevated blood glucose levels in humans when

compared to individuals with healthy periodontal condition (JUNG et al., 2014). However, in the present study no significant difference in glycemia was observed (Table 1). This result is in agreement with studies of Machado et al. (MACHADO et al., 2005) that did not observe differences on glycemia of humans with PD and Pontes Andersen et al. (2006) and Colombo et al. (2012) that did not observe difference on glycemia of rats with PD when compared to controls.

Although hyperglycemia is a characteristic of diabetes, normally, a compensatory increase in insulin secretion makes normoglycemic the most of the obese insulin-resistant individuals (WU et al., 2013). This was also observed in the present study. The analysis of insulin levels (Table 1) revealed that rats of SPD group showed higher insulinemia when compared to control groups (SCN and ExCN). This result is in agreement with Demmer et al. (2012) and Pontes Andersen et al. (2007) that observed higher levels of insulin in association with PD. Moreover, Sun et al. (2011) observed that after 3 months of treatment of PD insulin levels were reduced.

It was also observed an effect of RT in rats' insulinemia. It was verified a significant decrease in insulin levels of ExPD group when compared to SPD. However, no differences were observed between sedentary and exercised controls (SCN and ExCN). Whyte et al. (2012) verified that a single bout of intensive exercise decreased insulinemia of obese individuals. Chronic physical activity (resistance training) conducted during 8 weeks in obese rats caused decrease in insulin level (MARINHO et al., 2012). Geirsdottir et al. (2012) also observed reduction on insulinemia after 12 weeks of RT with prediabetic and with T2DM elderly.

Based on obtained values of glycemia and insulinemia, HOMA-IR index was calculated. This index expresses insulin resistance, so that the higher the value of this index, more insulin resistant is the animal. The present study observed that rats of SPD group showed higher values of HOMA-IR when compared to the other groups (Table 1). This result is in agreement with Colombo et al. (2012) that observed greater insulin resistance in rats after 28 days of induction of PD. The exercise reversed this alteration so that ExPD group showed a decreased value of HOMA-IR index when compared to SPD.

Besides HOMA-IR, insulin sensitivity was evaluated by another parameter, the constant rate for glucose disappearance (Kitt), an index that allows the evaluation of insulin sensitivity in vivo. The lower this index is, greater is the insulin resistance (GELONEZE; TAMBASCIA, 2006). The results obtained by ITT confirm data seen with HOMA-IR, that is, rats with PD before RT showed decreased insulin sensitivity when compared to control group. However, after RT, it was observed that ExPD group showed increased insulin sensitivity compared to SPD and similar values to control groups, showing again the benefic effects of physical activity in insulin resistance.

The relation between physical exercise and insulin sensitivity has been studied, and it is known that exercise is important to help glycemic control of diabetic subjects (DUBÉ et al., 2011).

Several studies show increase of insulin sensitivity and improvement on glycemic control promoted by physical exercise. Panvelosky et al. (2011) demonstrated increase of insulin sensitivity promoted by resistance training in diet-induced obese rats. Similar result was observed by Oliveira et al. (2011) that showed that chronic exercise promoted improvement in insulin sensitivity of obese rats. Mackenzie et al. (MACKENZIE et al., 2012) observed that continuous moderate exercise promoted improvement of glycemic control of diabetic patients.

The mechanisms by which physical exercise improves insulin sensitivity are still not completely understood, however, exercise can improve glycemic control and this may be an important explanation (FIGUEIRA et al., 2013). Glycemic control promoted by physical exercise can be due to a higher peripheral glucose uptake. This happens due to a higher translocation of glucose transporter protein (GLUT4) to plasma membrane through an insulin independent pathway (KENNEDY et al., 1999), possibly mediated by the 5' AMP-activated protein kinase (AMPK) (HAYASHI et al., 1998). Carvalho et al. (1996) demonstrated that a higher expression of GLUT4 in adipose tissue is able of lowering fast glycemia and increase glucose tolerance in transgenic mice that did not expressed GLUT4 in muscle.

Due to the known relation between insulin resistance and TNF- α plasmatic levels, this cytokine concentration was evaluated in this study. It was observed that PD increased TNF- α level in rats (COLOMBO et al., 2012) and in humans (ENGEBRETON et al. 2007).

Besides its negative effects on insulin sensitivity, it has also been demonstrated that TNF- α is related to impairment in insulin signaling (HOTAMISLIGIL et al., 1994). The decrease in pp185 tyrosine phosphorylation status in skeletal muscle and adipose tissue observed in the present study can be due to these effects of TNF- α . Colombo et al. (2012) demonstrated that periodontal disease led to a decreased pp185 tyrosine phosphorylation status. The same was reported by Astolphi et al. (2013), that found impairment in insulin signaling associated to periapical lesion. This way, the increase of TNF- α levels in SPD might have caused insulin resistance and a decrease in pp185 tyrosine phosphorylation status.

It is known that IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation causes the increase of insulin signal, while in some insulin resistant conditions, there is an increase in serine phosphorylation of these substrates, which attenuates the signal by decreasing the tyrosine phosphorylation capacity of the insulin receptor and its substrate after insulin stimulus (HOTAMISLIGIL et al., 1996). It has been demonstrated that TNF- α can act in the insulin signaling pathway, increasing phosphorylation of the IRS-1 on multiple serine residues (ZHANG et al., 2008). However, no difference in pp185 serine phosphorylation was observed in the present study. Therefore, it is possible that the decrease in pp185 tyrosine phosphorylation status is due to other proteins, such as membrane glycoprotein PC-1 (MADDUX; GOLDFINE, 2000;), growth factor receptor-bound protein 10 and 14 (Grb10 and Grb14) (MORRIONE, 2000; COONEY et al., 2004), suppressor of cytokine signaling 1 and 3 (SOCS1 and SOCS3) (UEKI et al., 2004) and protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) (WU et al., 2001). These proteins are related to decrease in insulin receptor function, blocking its interaction with IRS or modifying its kinase activity, therefore leading to decreased insulin signaling.

No difference in pp185 tyrosine phosphorylation status in the liver was observed, such as observed by Colombo et al. (2012). This may explain the absence of glycemia alteration in PD rats

even with reduced pp185 tyrosine phosphorylation status in muscle and adipose tissues, since Cho et al. (2006) suggest that liver may compensate for insulin resistance found in the adipose and muscle tissues to prevent hyperglycemia.

Sun et al. (2011) observed that after 3 months of PD treatment, plasmatic levels of TNF- α and HOMA-IR were significantly decreased, showing that this treatment reduced inflammation, improved glycemic control, insulin resistance and improved β cell function in diabetic subjects (type 2), showing that the presence of localized inflammation is related to insulin resistance pathogenesis and, consequently, type 2 diabetes mellitus.

In this study it was observed that SPD showed higher plasmatic concentration of TNF- α when compared to ExPD group, showing that physical activity can change plasmatic concentration of this cytokine.

Studies show that acute exercise increases plasmatic levels of proinflammatory cytokines, such as TNF- α and that chronic exercise decreases this cytokine levels as well as its expression (HO et al., 2013).

The mechanisms by which exercise acts on TNF- α are not completely elucidated, however, it is known that there is an increase in IL-6 levels (produced by muscle) due to physical activity and this cytokine inhibits TNF- α production (PETERSEN; PEDERSEN, 2005). Another possible factor is that during physical activity, there is release of epinephrine (PEDERSEN; HOFFMAN-GOETZ, 2000) and it decreases TNF- α production induced by LPS (VAN DER POLL et al., 1996). This way, inhibitory effect of physical activity on TNF- α production can be an important mechanism that restores pp185 tyrosine phosphorylation status and decreases insulin resistance, one of the main features of type 2 diabetes mellitus. In fact, Pauli et al. (2008) demonstrated that physical activity is related to increase in IRS-1 tyrosine phosphorylation and improvement of insulin resistance.

In summary, besides corroborating the relation between periodontal disease and insulin resistance, the present study demonstrated a positive effect of resistance training on insulin

sensitivity, insulin signaling, TNF- α and insulin levels, showing that physical exercise may be an important factor in preventing of insulin resistance in patients with periodontal disease.

Conclusions

Knowing that periodontal disease can promote impaired insulin sensitivity and signaling, probably due to the elevation of TNF- α levels, the present study showed that resistance training reversed the insulin resistance, the alterations in insulin signaling, TNF- α and insulin levels.

Declaration of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

Funding

This study was supported by São Paulo Research Foundation (grants number 2012/03688-0).

Acknowledgments

The authors thank Devani Mariano Pinheiro for her help with the insulinemia assay.

References

American Diabetes Association 2012 Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* **35** 64-71.

Astolphi RD, Curbete MM, Colombo NH, Shirakashi DJ, Chiba FY, Prieto AK, Cintra LT, Bomfim SR, Ervolino E & Sumida DH 2013 Periapical lesions decrease insulin signal and cause insulin resistance. *Journal of Endodontic* **39** 648-652.

Bharti P, Katagiri S, Nitta H, Nagasawa T, Kobayashi H, Takeuchi Y, Izumiyama H, Uchimura I, Inoue S & Izumi Y 2013 Periodontal treatment with topical antibiotics improves glycemic control in association with elevated serum adiponectin in patients with type 2 diabetes mellitus. *Obesity Research & Clinical Practice* **7** e129-e138.

Campos RM, de Mello MT, Tock L, Silva PL, Masquio DC, de Piano A, Sanches PL, Carnier J, Corgosinho FC, Foschini D, et al 2014 Aerobic plus resistance training improves bone metabolism and inflammation in adolescents who are obese. *The Journal of Strength and Conditioning Research* **28** 758-766.

Carvalho CR, Brenelli SL, Silva AC, Nunes AL, Velloso LA & Saad MJ 1996 Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. *Endocrinology* **137** 151-159.

Carvalho-Filho MA, Carvalheira JBC, Velloso LA & Saad MJA 2007 Insulin and angiotensin II signaling pathways cross-talk: implications with the association between diabetes mellitus, arterial hypertension and cardiovascular disease. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* **51** 195-203.

Chehoud KA, Chiba FY, Sasaki KT, Garbin CA & Sumida DH 2008 Effects of fluoride intake on insulin sensitivity and insulin signal transduction. *Fluoride* **41** 270-275.

Cho Y, Ariga M, Uchijima Y, Kimura K, Rho JY, Furuhashi Y, Hakuno F, Yamanouchi K, Nishihara M & Takahashi S 2006 The novel roles of liver for compensation of insulin resistance in human growth hormone transgenic rats. *Endocrinology* **147** 5374-5384.

Colombo NH, Shirakashi DJ, Chiba FY, Coutinho MS, Ervolino E, Garbin CA, Machado UF & Sumida DH 2012 Periodontal disease decreases insulin sensitivity and insulin signaling. *Journal of Periodontology* **83** 864-870.

Dag A, Firat ET, Arikan S, Kadiroglu AK & Kaplan A 2009 The effect of periodontal therapy on serum TNF-alpha and HbA1c levels in type 2 diabetic patients. *Australian Dental Journal* **54** 17-22.

Del Aguila LF, Claffey KP & Kirwan JP 1999 TNF-alpha impairs insulin signaling and insulin stimulation of glucose uptake in C2C12 muscle cells. *American Journal of Physiology* **276** E849-E855.

Demmer RT, Squillaro A, Papapanou PN, Rosenbaum M, Friedewald WT, Jacobs DR Jr & Desvarieux M 2012 Periodontal infection, systemic inflammation, and insulin resistance: results from the continuous National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2004. *Diabetes Care* **35** 2235-2242.

Dube JJ, Allison KF, Rousson V, Goodpaster BH & Amati F 2012 Exercise dose and insulin sensitivity: relevance for diabetes prevention. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **44** 793-799.

Engbreston S, Chertog R, Nichols A, Hey-Hadavi J, Celenti R & Grbic J 2007 Plasma levels of tumour necrosis factor- α in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes. *Journal of Clinical Periodontology***34** 18-24.

Feinstein R, Kanety H, Papall MZ, Lunenfeld B & Karasik A 1993 Tumor Necrosis Factor- α Suppresses Insulin-induced tyrosine Phosphorylation of Insulin Receptor and Its Substrates. *The Journal of Biological Chemistry***268** 26055-26058.

Figueira FR, Umpierre D, Casali KR, Tetelbom PS, Henn NT, Ribeiro JP & Schaan BD 2013 Aerobic and combined exercise sessions reduce glucose variability in type 2 diabetes: crossover randomized trial. *PLoS One***8** e57733.

Geirsdottir OG, Arnarson A, Briem K, Ramel K, Jonson PV & Thorsdottir I 2012 Effect of 12-week resistance exercise program on body composition, muscle strength, physical function, and glucose metabolism in healthy, insulin-resistant, and diabetic elderly icelanders. *Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Science***67** 1259-1265.

Geloneze B & Tambascia MA 2006 Avaliação laboratorial e diagnóstico da resistência insulínica. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia***50** 208-215.

Hayashi T, Hirshman MF, Kurth EJ, Winder WW & Goodyear LJ 1998 Evidence for 5' AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport. *Diabetes***47** 1369-1373.

Ho SS, Dhaliwal SS, Hills AP & Pal S 2013 Effects of chronic exercise training on inflammatory markers in australian overweight and obese individuals in a randomized controlled trial. *Inflammation***36** 625-32.

Hornberger TA Jr & Farrar RP 2004 Hysiological hypertrophy of the FHL muscle following 8weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Canadian Journal of Applied Physiology***29** 16-31.

Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN & Spiegelman BM 1994 Tumor necrosis factor α inhibits signaling from the insulin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences***91** 4854-4858.

Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF & Spiegelman BM 1996 IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α and obesity-induced insulin resistance. *Science***271** 665-668.

Howlett KF, Andrikopoulos S, Proietto J & Hargreaves M 2013 Exercise-induced muscle glucose uptake in mice with graded, muscle-specific GLUT-4 deletion. *Physiological Reports***1** e00065.

Hussey SE, Mcgee SL, Garnham A, Wentworth JM, Jeukendrup AE & Hargreaves M 2011 Exercise training increases adipose tissue GLUT4 expression in patients with type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism***13** 959-962.

Jung, YS, Shin MH & Kweon SS 2014 Periodontal disease associated with blood glucose levels in urban Koreans aged 50 years and older: the Dong-gu study. *Gerodontology* Jan 16. doi: 10.1111/ger.12107.

Katagiri S, Nitta H, Nagasawa T, Izumi Y, Kanazawa M, Matsuo A, Chiba H, Fukui M, Nakamura N, Oseko F, et al. 2013 Effect of glycemic control on periodontitis in type 2 diabetic patients with periodontal disease. *Journal of Diabetes Investigation* **4** 320-325.

Kennedy JW, Hirschman MF, Gervino EV, Ocel JV, Forse RA, Hoening SJ, Laurie DA, Goodyear J & Horton ES 1999 Acute exercise induces GLUT4 translocation in skeletal muscle of normal human subjects and subjects with type 2 diabetes. *Diabetes* **48** 1192-1197.

Machado AC, Quirino MR & Nascimento LF 2005 Relation between chronic periodontal disease and plasmatic levels of triglycerides, total cholesterol and fractions. *Brazilian Oral Research* **19** 284-289.

Mackenzie R, Maxwell N, Castle P, Elliott B, Brickey G & Watt P 2012 Intermittent exercise with and without hypoxia improves insulin sensitivity in individuals with type 2 diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **97** E546-E555.

Marinho R, Ropelle ER, Cintra DE, De Souza CT, Da Silva AS, Bertoli FC, Colantonio E, D'Almeida V & Pauli JR 2012 Endurance exercise training increases APPL1 expression and improves insulin signaling in the hepatic tissue of diet-induced obese mice, independently of weight loss. *Journal of Cellular Physiology* **227** 2917-2926.

Mavros Y, Kay S, Anderberg KA, Baker MK, Wang Y, Zhao R, Meiklejohn J, Climstein M, O'Sullivan A, de Vos N, et al 2013 Changes in insulin resistance and HbA1c are related to exercise-mediated changes in body composition in older adults with type 2 diabetes. *Diabetes Care* **36** 2372-2379.

Mealey BL, Oates TW & American Academy of Periodontology 2006 Diabetes mellitus and periodontal diseases. *Journal of Periodontology* **77** 1289-1303.

Oliveira AG, Carvalho BM, Tobar N, Ropelle ER, Pauli JR, Bagarolli RA, Guadagnini D, Carvalheira JB & Saad MJ 2011 Physical exercise reduces circulating lipopolysaccharide and TLR4 activation and improves insulin signaling in tissues of DIO rats. *Diabetes* **60** 784-796.

Pavelosky-Costa AC, Pinto-Júnior DAC, Brandão BB, Moreira RJ, Machado UF & Seraphim PM 2011 Treinamento resistido reduz inflamação em músculo esquelético e melhora a sensibilidade à insulina periférica em ratos obesos induzidos por dieta hiperlipídica. *Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* **55** 155-163.

Pauli JR, Ropelle ER, Cintra DE, Carvalho-Filho MA, Moraes JC, De Souza CT, Velloso LA, Carvalheira JB & Saad MJ 2008 Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the

insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt in dietary induce obese Wistar rats. *Journal of Physiology* **586** 659-671.

Pedersen BK & Hoffman-Goetz L 2000 Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiological Reviews* **80** 1055-1081.

Petersen AMW & Pedersen BK 2005 The anti-inflammatory effect of exercise. *Journal of Applied Physiology* **98** 1154-1162.

Phillips MD, Flynn MG, McFarlin BK, Stewart LK & Timmerman KL 2010 Resistance training at eight-repetition maximum reduces the inflammatory milieu in elderly women. *Medicine & Science in Sports & Exercise* **42** 314-325.

Pontes Andersen CC, Buschard K, Flyvbjerg A, Stoltze K & Holmstrup P 2006 Periodontitis deteriorates metabolic control in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Journal of Periodontology* **77** 350-356.

Pontes Andersen CC, Flyvbjerg A, Buschard K & Holmstrup P 2007 Periodontitis is associated with aggravation of prediabetes in Zucker fatty rats. *Journal of Periodontology* **78** 559-565.

Shoelson SE, Lee J & Goldfine AB 2006 Inflammation and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation* **116** 793-801.

Sun WL, Chen LL, Zhang SZ, Wu YM, Ren YZ & Qim GM 2011 Inflammatory cytokines, adiponectin, insulin resistance and metabolic control after periodontal intervention in patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis. *Internal Medicine* **50** 1569-1574.

Van der Poll T, Coyle SM, Moldawer LL & Lowry SF 1996 Changes in endotoxin-induced cytokine production by whole blood after in vivo exposure of normal humans to endotoxin. *Journal of Infectious Diseases* **174** 1356-1360

Whyte LJ, Ferguson C, Wilson J, Scott RA & Gill JMR 2012 Effects of single bout of very high-intensity exercise on metabolic health biomarkers in overweight/obese sedentary men. *Journal of Metabolism* **227** 2917-2926.

Wu Y, Wu T, Wu J, Zhao L, Li Q, Varghese Z, Moorhead JF, Powis SH, Chen Y & Ruan XZ. Chronic inflammation exacerbates glucose metabolism disorders in C57BL/6J mice fed with high-fat diet. *Journal of Endocrinology* **219** 195-204.

Zhang J, Gao Z, Yin J, Quon MJ & Ye J 2008 S6K directly phosphorylates IRS-1 on Ser-270 to promote insulin resistance in response to TNF-(alpha) signaling through IKK2. *Journal of Biological Chemistry* **283** 35375-35382.

FIGURE LEGENDS

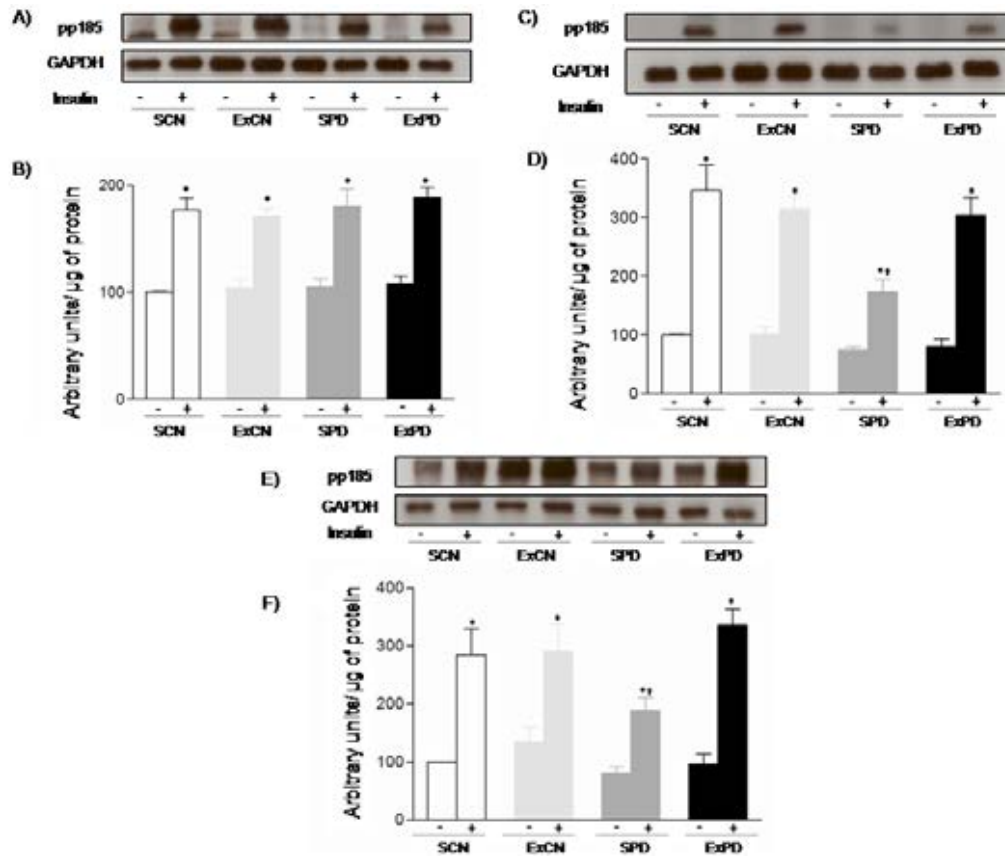


Figure 1 – Constant rate for glucose disappearance (Kitt- %/min) from 0 to 16 minutes of the test. In A, Kitt of control group (CN) and periodontal disease group (PD) after twenty-eight days of periodontal disease induction (n=12). In B, Kitt of sedentary control group (SCN), exercised control group (ExCN), sedentary periodontal disease group (SPD) and exercised periodontal disease group (ExPD) after 14 weeks of resistance training (n=6). Values are expressed as mean \pm SEM. *P < 0.0001 PD versus CN, #P < 0.05 SPD versus SCN, ExCN and ExPD.

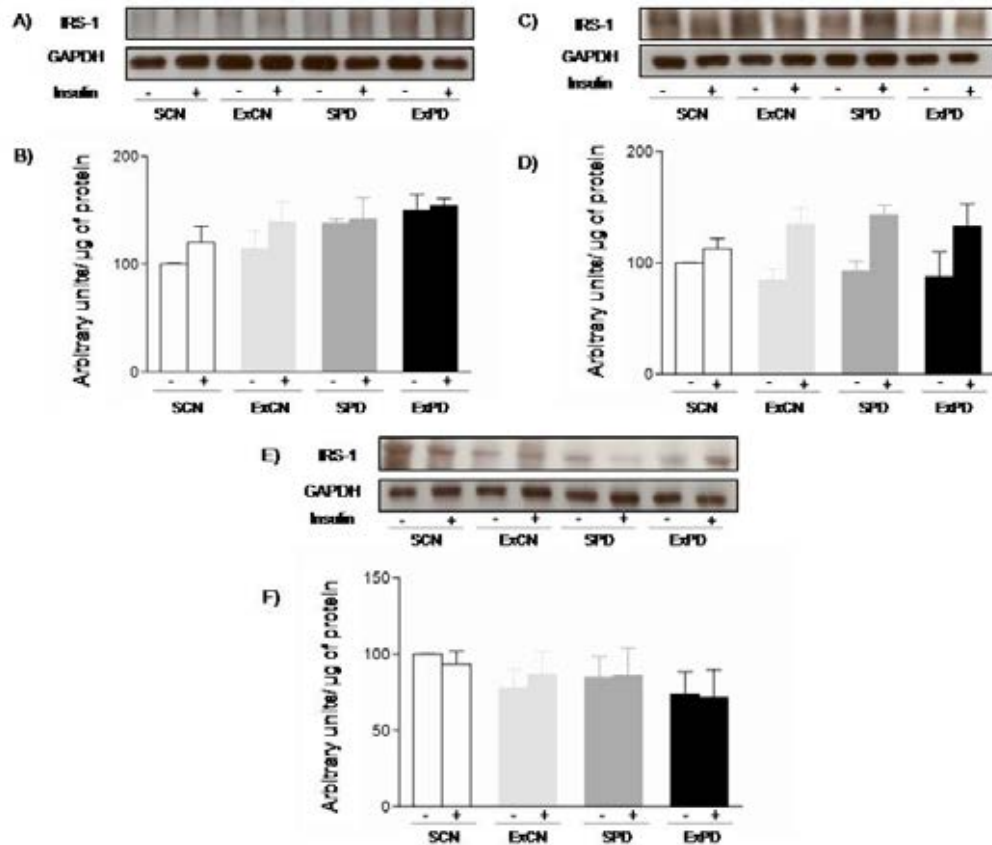


Figure 2 - Evaluation of pp185 (IRS-1/IRS-2) tyrosine phosphorylation status before (-) and after (+) insulin stimulus in liver (A and B), gastrocnemius skeletal muscle (C and D) and in peri-epididymal white adipose tissue (E and F) of sedentary control group (SCN), exercised control group (ExCN), sedentary periodontal disease group (SPD) and exercised periodontal disease group (ExPD). Panels A, C, and E show typical autoradiography, in which similar quantities of protein (185 mg) were submitted to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). GAPDH was used as control. Panels B, D, and F show tyrosine phosphorylation status values (expressed in arbitrary units), which are presented as mean \pm SEM, n = 6. *P < 0.05 for insulin (-) versus insulin (+); †P < 0.05 for SPD (+) versus SCN (+), ExCN (+) and ExPD (+).

TABLETable 1. Glycemia, insulinemia, HOMA-IR and TNF- α plasmatic levels of SCN, ExCN, SPD, ExPD groups.

	SCN	ExCN	SPD	ExPD
Glycemia (mg/dL)	92.22 \pm 2.84	102.4 \pm 2.20	98.56 \pm 4.02	101.60 \pm 2.61
Insulinemia (μ IU/mL)	3.32 \pm 0.40	4.49 \pm 0.28	9.79 \pm 6.93*	6.93 \pm 0.92 [#]
HOMA-IR	0.78 \pm 0.07	1.08 \pm 0.05	2.36 \pm 0.22*	1.59 \pm 0.18 [#]
TNF- α (pg/mL)	6.95 \pm 0.32	7.66 \pm 0.33	9.56 \pm 0.90 ⁺	7.24 \pm 0.14

Values are presented as mean \pm SEM. *P < 0.05 for SPD versus SCN, ExCN and ExPD. [#]P < 0.05 for ExPD versus SCN and SPD. ⁺P < 0.05 SPD versus SCN and EXPD.