



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

Campus de Araçatuba
Departamento de Ciências Básicas

Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

NATÁLIA HELENA COLOMBO

**AVALIAÇÃO DO SINAL INSULÍNICO EM
RATOS ADULTOS COM DOENÇA PERIODONTAL**

Araçatuba-SP

2012



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

Campus de Araçatuba
Departamento de Ciências Básicas

Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

NATÁLIA HELENA COLOMBO

AVALIAÇÃO DO SINAL INSULÍNICO EM RATOS ADULTOS 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: Prof. Adj. Doris
Hissako Sumida

Co-orientador: Prof. Titular
Ubiratan Fabres Machado

Araçatuba-SP

2012

Catálogo na publicação (CIP)
Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca da FOA / UNESP

C718a Colombo, Natália Helena.
Avaliação do sinal insulínico inibitório em ratos adultos com doença periodontal / Natália Helena Colombo. - - Araçatuba : [s.n.], 2012
104 f.: il. ; tab. + 1 CD-ROM

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

1. Periodontite 2. Resistência à insulina 3. Inflamação
4. Proteínas substratos do receptor de insulina 5. Ratos
6. Diabetes Mellitus tipo 2

Black D6
CDD 617.63

Dados Curriculares

Nascimento: 07.09.1985, Araçatuba - SP.

Filiação: Selma Maffei Colombo
Valdir Colombo

2004/2009: Curso de Graduação em Odontologia Faculdade de Odontologia do *Campus* de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

2010/2012: Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia do *Campus* de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

Dedicatória

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Selma e Valdir pelo amor, paciência, incentivo, confiança, apoio às minhas escolhas e pelos esforços realizados para a minha educação.

Ao meu irmão Gustavo pelo incentivo, sinceridade e amizade.

Ao meu namorado Fabiano, pelo amor, incentivo e paciência nesta difícil jornada.

Agradecimentos Especiais

A Deus, por me proporcionar mais uma oportunidade de agradecê-lo.

À minha orientadora Doris Hissako Sumida, pela sua orientação, ensinamentos transmitidos, grande incentivo e confiança a mim depositada.

À minha amiga Daisy Jaqueline Shirakashi, pela amizade, pelo imenso apoio e colaboração constantes durante todas as fases deste projeto.

Aos amigos do laboratório Fernando Yamamoto Chiba, Patrícia Juvencio Dias, Maria Sara de Lima Coutinho e Alana Carvalho de Oliveira, pela amizade e pela colaboração com este trabalho.

Agradecimentos

À UNESP – Universidade Estadual Paulista, pela oportunidade de realizar este curso.

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

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pela concessão da bolsa de estudos; à FUNDUNESP (Fundação para Desenvolvimento da UNESP) e a Pró-Reitoria de pesquisa da UNESP (PROPe-UNESP) que proporcionaram os recursos necessários para a realização das pesquisas em nosso laboratório.

Aos professores do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, por todos os ensinamentos ministrados, empréstimos de laboratório e equipamentos e pela ótima convivência.

Ao Prof. Titular Ubiratan Fabres Machado pela co-orientação e ensinamentos transmitidos.

Aos professores Edilson Ervolino, Sandra Helena Penha de Oliveira, Leda Maria Pescinini Salzedas, Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune, Antonio Augusto Ferreira de Carvalho, pela colaboração com esta pesquisa.

Aos amigos e colegas do curso de pós-graduação, pelo agradável convívio, pelo companheirismo durante as disciplinas cursadas e pela companhia nas longas viagens para São Paulo. Um agradecimento especial à Vilma Clemi Coli, pela ajuda com os ensaios lipídicos.

Aos alunos de iniciação científica, Amanda de Almeida Oliveira, Lara Vieira Pacanaro, Mariane Machado Curbete, Marjorie de Oliveira Gallinari, Viviane

Clície da Silva, Wendrew Douglas de Souza Gomes e aos alunos de pós-graduação Aline Pedro de Melo Yamamoto e Rafael Dias Astolphi, pela amizade e colaboração com este trabalho.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Katsuko Aparecida Anze Inoue (Cidinha) e Arnaldo César dos Santos, pela imensa disposição em ajudar.

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

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

Às funcionárias da Diretoria Técnica Administrativa, Isabel Cristina Lui Poi e Célia Cristina Antonello Cunha, pela atenção dispensada.

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

A todos os meus familiares e amigos, pelo apoio e incentivo constantes.

A todos os demais professores e funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, pela ajuda e atenção que me dispensaram desde a graduação.

Epígrafe

*“Se não houver frutos, valeu a beleza das flores;
Se não houver flores, valeu a sombra das folhas;
Se não houver folhas, valeu a intenção da semente.”*

Henfil

“Aprenda como se você fosse viver para sempre.

Viva como se você fosse morrer amanhã.”

Mahatma Gandhi

COLOMBO, N.H. Avaliação do sinal insulínico em ratos com doença periodontal. 2012. 104 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2012.

RESUMO

A doença periodontal é considerada, pela Organização Mundial da Saúde, como a sexta complicação clássica do diabético. O diabetes pode influenciar a prevalência, severidade e progressão da periodontite. A literatura mostra uma associação bidirecional entre periodontite e diabetes mellitus (DM). DM afeta negativamente a condição periodontal e a periodontite afeta negativamente o controle glicêmico, aumentando, assim, o risco de complicações no paciente diabético. No entanto, ainda não há estudos que demonstrem que um processo inflamatório local, como a doença periodontal “per si”, possa induzir alterações nas etapas iniciais no sinal insulínico em indivíduos não diabéticos. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar se a doença periodontal é capaz de causar alteração na etapa inicial do sinal insulínico e na sensibilidade à insulina em ratos não diabéticos. Para tanto, foram utilizados ratos Wistar (02 meses de idade) e os animais foram divididos em dois grupos: ratos com doença periodontal (DP) induzida por ligadura e ratos-controle (CN). Após 28 dias da colocação da ligadura, realizaram-se os experimentos: 1) coleta de sangue (n=10) e obtenção de plasma para análise das concentrações de glicose, frutossamina, colesterol total, colesterol HDL (HDL-C), triglicérides, TNF- α , IL-6 e resistina; 2) teste de tolerância à insulina (ITT) para a avaliação da sensibilidade à insulina (n=7); 3) avaliação tanto do grau de fosforilação em tirosina da pp185 (IRS-1/IRS-2) e em serina do IRS-1 como dos conteúdos de IR β e de IRS-1 em tecidos adiposo branco periepídidimo, muscular esquelético e hepático. A partir dos resultados pode-se observar que os ratos com DP apresentaram: 1) redução na sensibilidade à insulina ($p < 0.05$); 2) nenhuma alteração nas concentrações plasmáticas de glicose, frutossamina, colesterol total, HDL-C, triglicérides; 3) aumento nas concentrações plasmáticas de TNF- α , mas nenhuma alteração nas concentrações de IL-6 e resistina; 4) diminuição ($p < 0.05$) no grau de fosforilação em tirosina da pp185 (IRS-1/IRS-2), após o estímulo insulínico, no tecido adiposo branco e muscular esquelético, mas sem

alteração no fígado; 5) nenhuma alteração no grau de fosforilação em serina do IRS-1 e nos conteúdos de IR β e de IRS-1 nestes tecidos responsivos à insulina. Com base nesses resultados, podemos inferir que o aumento de TNF- α em ratos com DP pode ter ocasionado a alteração no sinal insulínico e na sensibilidade à insulina. O presente trabalho reforça a importância da prevenção da doença periodontal no intuito de prevenir a resistência à insulina e as alterações sistêmicas que podem ser geradas devido a este estado metabólico.

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

COLOMBO, N.H. **Evaluation of insulin signaling in male rats with periodontal disease.** 2012. 104 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2012.

ABSTRACT

Periodontal disease (PD) is considered by the World Health Organization as the sixth classic complication of diabetes. Diabetes may influence the prevalence, severity and progression of periodontitis. The literature shows a bidirectional association between periodontitis and diabetes mellitus (DM). DM negatively affects periodontal status and periodontal disease, in addition to adversely affecting glycemic control, increasing the risk of complications in diabetic patients. However, there are no studies showing that local inflammatory events, such as periodontal disease, “per se”, can induce changes in early steps of insulin signaling in non-diabetic individuals. Therefore, the purpose of this study was to determine whether periodontal disease can cause changes in the initial phase of insulin signaling and in insulin sensitivity in non-diabetic rats. For this purpose, Wistar rats (two-month-old) were used in the present study. The animals were divided into two groups: 1) group with ligature-induced periodontal disease (PD); 2) control group (CN). Twenty eight days after ligature placement, experiments were carried out: 1) blood collection (n = 10) obtaining plasma for glucose, fructosamine, total cholesterol, HDL cholesterol (HDL-C), triglycerides, TNF- α , IL-6 and resistin analyses; 2) insulin tolerance test (ITT) for evaluating insulin sensitivity (n = 7); 3) assessment of both pp185 (IRS-1 / IRS-2) tyrosine phosphorylation and IRS-1 serine phosphorylation status, and IR β and IRS-1 content in periepididymal white adipose tissue, skeletal muscle and liver. Observation of results in rats with DP showed: 1) reduction in insulin sensitivity (p <0.05); 2) no change in glucose, fructosamine, total cholesterol, HDL-C and triglycerides plasmatic concentrations; 3) increase in TNF- α plasmatic concentration, but no changes in IL-6 and resistin plasma levels; 4) decrease in (p <0.05) pp185 (IRS-1/IRS-2) tyrosine phosphorylation status after insulin stimulation in white adipose tissue and skeletal muscle, but no change in liver, 5) no change in IRS-1 serine phosphorylation status and IR β and IRS-1 content in these insulin-responsive tissues. Based on these results, it could be inferred

that the increase in TNF- α in PD rats may have caused the change in insulin signaling and insulin sensitivity. This study reinforces the importance of periodontal disease prevention to prevent insulin resistance and systemic changes that may be generated due to this metabolic state.

Keywords: Periodontitis. Insulin resistance. Inflammation. Insulin Receptor Substrate Proteins. Rats. Diabetes Mellitus, Type 2.

Lista de Figuras

- Figura 1** **As vias de sinalização insulínica.** O receptor de insulina é uma tirosina quinase que se autofosforila e catalisa a fosforilação de proteínas intracelulares como as proteínas IRS, Shc e Cbl. Após a fosforilação essas proteínas se ligam a outras moléculas de sinalização através 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 (figura extraída e adaptada de Carvalheira et al.).
- Figura 2** Radiografias digitais das mandíbulas e fotomicrografias dos tecidos periodontais obtidos de animais experimentais. Em A, imagens radiográficas mostrando osso alveolar normal e em B, perda óssea em regiões interproximais e inter-radiculares (seta branca) 28 dias após a periodontite induzida por ligadura. Perda óssea foi medida pela distância da junção cimento-esmalte à crista óssea alveolar (linha branca). Em C, características histológicas dos tecidos periodontais do animal controle (sem ligadura) demonstrando camada do epitélio de espessura regular, com tecido conjuntivo denso com baixo infiltrado inflamatório e superfície regular da crista óssea. Em D, características histológicas 28 dias após a colocação da ligadura, demonstrando perda de papila gengival, aumento da espessura da camada epitelial, infiltrado inflamatório mais intenso no tecido conjuntivo, além de irregularidade da superfície da crista óssea. Em E, fotomicrografias demonstrando regiões inter-

radiculares no controle e em F, perda óssea (asterisco) claramente observada no grupo com ligadura. Abreviaturas e símbolos: ABC, crista óssea alveolar; CEJ, junção cimento esmalte; d, dentina; PL, ligamento periodontal; IR, região interradicular; seta de preta ponta, cimento.

- Figura 3** Peso corpóreo dos ratos-controle (CN) e ratos com doença periodontal (DP) durante 28 dias. Os valores são expressos como média \pm EPM, n = 25. 42
- Figura 4** Ingestão alimentar de ratos-controle (CN) e ratos com doença periodontal (DP) durante 28 dias. Os valores são expressos como média \pm EPM, n=25. 42
- Figura 5** Teste intravenoso de tolerância à insulina nos ratos-controle (CN) e com doença periodontal (DP). As amostras de sangue foram coletadas nos tempos de 0 (basal), 4, 8, 12, 16 minutos após a injeção de insulina. Os valores das glicemias são apresentados como média \pm EPM, n=7. 46
*p<0.05 para CN vs. DP.
- Figura 6** Velocidade de desaparecimento da glicose (Kiit) em ratos do grupo controle (CN) e do grupo com doença periodontal (DP). Os animais foram submetidos ao teste de tolerância à insulina (0,75U / kg de peso corpóreo) e as amostras foram coletadas nos tempos 0 (basal), 4, 8, 12, 16 minutos após a injeção de insulina. O Kitt foi calculado como descrito em materiais e métodos e os valores são expressos como média \pm EPM, n = 7. 47
*p<0,05 para CN vs. DP.
- Figura 7** Avaliação do grau de fosforilação em tirosina da pp185 (IRS-1/IRS-2) antes (-) e após (+) o estímulo insulínico no músculo gastrocnêmio (A, B), tecido adiposo branco periepídidimal (C, D) e fígado (E, F) de ratos-controle 49

(CN) e de ratos com doença periodontal (DP). Em **A, C** e **E** autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 µg). β-actin foi utilizada como controle. Em **B, D e F**, valores do grau de fosforilação em tirosina da pp185, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média ± EPM, n=7.

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

† p<0,05 CN (+) vs. DP (+);

‡ p< 0,05 CN (-) vs. DP (-).

- Figura 8** Avaliação do grau de fosforilação em serina do IRS-1 (Ser 307) antes (-) e após (+) o estímulo insulínico no músculo gastrocnêmio (A, B), tecido adiposo branco periepídídimal (C, D) e fígado (E, F) de ratos-controle (CN) e de ratos com doença periodontal (DP). Em **A, C** e **E** autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 µg). β-actina foi utilizada como controle. Em **B, D e F**, valores do grau de fosforilação em serina do IRS-1, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média ± EPM, n=7. 50
- Figura 9** Avaliação do conteúdo da subunidade β do receptor de insulina (IRβ) no tecido muscular gastrocnêmio (A, B), adiposo branco periepídídimal (C, D) e hepático (E, F) de ratos-controle (CN) e de ratos com doença periodontal (PD). Em **A, C** e **E** autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 µg). Em **B, D e F**, valores do conteúdo do IRβ, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média ± EPM, n=6. 51
- Figura 10** Avaliação do conteúdo do IRS-1 no tecido muscular gastrocnêmio (A, B), adiposo branco periepídídimal (C, D) e hepático (E, F) de ratos-controle (CN) e de ratos 52

com doença periodontal (PD). Em **A**, **C** e **E** autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 µg). Em **B**, **D** e **F**, valores do conteúdo do IRS-1, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média ± EPM, n=6.

Lista de Tabelas

Tabela 1	Perda óssea alveolar e suporte ósseo dos ratos-controle (CN) e ratos com doença periodontal (DP)	40
Tabela 2	Parâmetros morfométricos dos ratos-controle (CN) e ratos com doença periodontal (DP)	43
Tabela 3	Concentração plasmática de glicose em jejum e frutossamina dos ratos-controle (CN) e ratos com doença periodontal (DP)	44
Tabela 4	Perfil lipídico dos ratos-controle (CN) e ratos com doença periodontal (DP)	45
Tabela 5	Concentrações plasmáticas de TNF- α , IL-6 e resistina nos ratos-controle (CN) e ratos com doença periodontal (DP)	48

Lista de Abreviaturas

- AGE: Produtos de glicação avançada
- AMPK: Proteína quinase AMP ativada
- AS160: Substrato da AKT de 160 kDa
- RAGE: Receptores para produtos de glicação avançada
- Akt /PKB: Proteína quinase B
- Cbl: *Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene*
- CEJ: Junção cimento esmalte
- CN: Grupo controle
- DM: Diabetes Mellitus
- DM1: Diabetes Mellitus tipo 1
- DM2: Diabetes Mellitus tipo 2
- DP: Doença periodontal
- DTT: Ditioneitol
- EDTA: Ácido etilendiamino tetra-acético
- EPM: Erro padrão da média
- F: Fígado
- GLUT4: Proteína transportadora de glicose GLUT4
- Grb10: Proteína 10 ligada a receptor de fator de crescimento
- Grb14: Proteína 14 ligada a receptor de fator de crescimento
- HDL-C: Lipoproteína de alta densidade
- HOMA-IR: Modelo de Avaliação da Homeostase - Resistência à Insulina
- IFN- γ : Interferon- γ
- IL-1: Interleucina -1
- IL-1 β : Interleucina -1 β
- IL-6: Interleucina-6
- IL-8: Interleucina-8
- IL-10: Interleucina-10
- IR: Receptor de insulina
- IRS: Substrato do receptor de insulina
- IRS-1: Substrato 1 do receptor de insulina
- IRS-2: Substrato 2 do receptor de insulina

- IRS-3: Substrato 3 do receptor de insulina
- IRS-4: Substrato 4 do receptor de insulina
- ITT: Teste endovenoso de tolerância à insulina
- kDa: Kilodalton
- Kiit: Velocidade de decaimento da glicose
- LDL-C: Lipoproteínas de baixa densidade
- LPS: Lipopolissacarídeos
- MAPK: Proteína quinase ativada por Ras-mitógeno
- MG: Músculo esquelético gastrocnêmio
- NHANES III: *Nacional Health and Nutrition Examination Study III*
- OMS: Organização Mundial de Saúde
- PAMPs: Padrões moleculares associados a patógenos
- PC-1: Glicoproteína-1 de membrana plasmática celular
- PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinase
- PDK1: Proteína quinase- 1 dependente de fosfoinosítídeo
- PGE: Prostaglandina E
- PKC: Proteína quinase
- PRRs: Receptores de reconhecimento de padrões
- PTP1B: Proteína tirosina fosfatase 1B
- SDS: Dodecil sulfato de sódio
- SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida em dodecil sulfato de sódio
- SH2: Domínios com homologia a Src 2
- Shc: *Src homology collagen*
- Src: Família de proteína tirosina quinase originalmente identificada por homologia com a proteína oncogênica PP60 (v-Src) do vírus do sarcoma de *rous*.
- SK6 (p70S6k): Proteína serina/treonina quinase
- SOCS: Supressor da sinalização de citocinas
- SOCS1: Supressor da sinalização de citocinas 1
- SOCS3: Supressor da sinalização de citocinas 3
- TAB: Tecido adiposo branco

- TEMED: Tetrametil etilenodiamina
- TC10: *Small guanosine 5'-triphosphate (GTP) binding protein*
- TLRs: Receptores Toll-like
- TLR-2: Receptor Toll-like 2
- TLR-4: Receptor Toll-like 4
- TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa
- Tris: Hidroximetil aminometano
- VLDL-C: Lipoproteínas de muito baixa densidade

Sumário

1	INTRODUÇÃO	21
2	OBJETIVO	30
3	MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1	Animais	31
3.2	Índice de Lee	32
3.3	Análise radiográfica da perda óssea alveolar e suporte ósseo periodontal	32
3.4	Análise histológica da perda óssea alveolar	33
3.5	Determinação da glicemia	33
3.6	Frutosamina	34
3.7	Determinação da concentração plasmática de colesterol total	34
3.8	Determinação da concentração plasmática do Colesterol HDL	34
3.9	Determinação da concentração plasmática dos triglicérides	35
3.10	Determinação da concentração plasmática do LDL-C e VLDL-C	36
3.11	Teste intravenoso de tolerância à insulina (ITT) curto	36
3.12	Concentrações plasmáticas de citocinas	36
3.13	Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina pp185 (IRS-1/IRS-2) e em serina do IRS-1 e dos conteúdos de IR β e IRS-1	36
3.13.1	Preparação das amostras para “Western blotting”	36
3.13.2	“Western blotting”	37
3.14	Análise estatística	39
4	RESULTADOS	40
4.1	Análise radiográfica do osso alveolar	40
4.2	Análise histológica da inflamação e reabsorção óssea	40
4.3	Peso corpóreo e ingestão alimentar	42
4.4	Parâmetros morfométricos	43
4.5	Concentrações plasmáticas de glicose e frutosamina	44
4.6	Lipidemia	45
4.7	Teste intravenoso de tolerância à insulina (ITT) curto	46
4.8	Concentrações plasmáticas de TNF- α , IL-6 e resistina	48

4.9	Avaliação do grau de fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina pp185 (IRS-1/IRS-2) no músculo esquelético gastrocnêmio, tecido adiposo branco periepídidimo e fígado	49
4.10	Avaliação do grau de fosforilação em serina do substrato do receptor de insulina IRS-1 no músculo esquelético gastrocnêmio, tecido adiposo branco periepídidimo e fígado	50
4.11	Avaliação do conteúdo do IR β no músculo esquelético gastrocnêmio, tecido adiposo branco periepídidimo e fígado	51
4.12	Avaliação do conteúdo do substrato do receptor de insulina IRS-1 no músculo esquelético gastrocnêmio, tecido adiposo branco periepídidimo e fígado	52
5	DISCUSSÃO	53
6	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS	66
	ANEXOS	84

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal (DP) tem sido apontada por diversos estudos como fator de risco para o desenvolvimento de várias doenças sistêmicas, como por exemplo, doenças cardiovasculares, acidentes vasculares cerebrais, pneumonias e diabetes mellitus.¹

O diabetes mellitus (DM) é considerado uma epidemia global, atinge 366 milhões de pessoas no mundo (2011), sendo que, no Brasil, alcança cerca de 10% da população adulta. Estima-se que em 2030 a população mundial de diabéticos será de 552 milhões e no Brasil alcançará 19 milhões.² Este crescimento na prevalência de diabetes, impulsionado principalmente pela crescente prevalência de diabetes tipo 2, está ocorrendo tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento.³ Assim, o DM é considerado um problema de saúde pública prevalente, em ascendência, oneroso do ponto de vista econômico e social, com potencial reconhecido para prevenção.⁴ Os custos econômicos decorrentes desta doença incluem gastos diretos com cuidados médicos e custos indiretos, tais como perda de produtividade profissional resultante da morbidade relacionada ao diabetes e mortalidade prematura.⁵

O DM é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia crônica, distúrbios no metabolismo dos carboidratos, gorduras e proteínas decorrentes de defeitos na secreção e/ou ação da insulina. A ação deficiente da insulina resulta de secreção inadequada e/ou respostas dos tecidos a este hormônio que pode estar diminuída em um ou mais pontos nas vias complexas da ação insulínica. A hiperglicemia crônica do diabetes está associada a danos em longo prazo, como disfunção e falência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos.⁶ Com a progressão da doença, o indivíduo desenvolve complicações sistêmicas, como, por exemplo, alteração no metabolismo de proteínas, baixas concentrações plasmáticas de colesterol HDL, altas concentrações de triglicérides, doenças cardiovasculares,⁷ disfunção endotelial,⁸⁻¹⁰ microangiopatia, macroangiopatia,^{9, 10} retinopatia, neuropatia, nefropatia,¹¹ aumento do tempo de cicatrização de feridas¹² e risco de infecção.^{13, 14}

Os principais tipos de diabetes são o diabetes mellitus tipo 1 (DM1) e o diabetes mellitus tipo 2 (DM2). O DM1 tem como causa uma deficiência absoluta da secreção de insulina e representa de 5 a 10% das pessoas com esta enfermidade. Indivíduos com risco aumentado de desenvolver este tipo de diabetes geralmente podem ser identificados pela evidência sorológica de um processo patológico autoimune ocorrendo nas ilhotas pancreáticas e por marcadores genéticos. O tipo mais prevalente de diabetes é o DM2, que representa de 90 a 95% dos casos diagnosticados como diabetes mellitus. Esta patologia tem como causa uma combinação de resistência à ação da insulina e uma inadequada resposta compensatória de secreção de insulina.⁶

Para que a insulina exerça seu efeito, existe a necessidade de ligação a um receptor específico na membrana plasmática (Figura 1). O receptor de insulina é uma glicoproteína heterotetramérica constituído por duas subunidades alfa e duas subunidades beta, ligadas por pontes de dissulfeto.¹⁵ 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.^{15, 16}

Kasuga et al.^{16, 17} 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.¹⁸ 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.¹⁹ Sun et al.²⁰ 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 et al.²⁰ clonaram a pp185 e denominaram-na substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) e, após três anos, demonstrou-se em experimentos de "Western blotting" que outra proteína também migrava na altura da banda desta proteína, que foi denominada IRS-2.²¹⁻²³ 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, tem-se a enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K). Alessi et al.²⁴ demonstraram que esta proteína ativada pode induzir a ativação de outras proteínas, como por exemplo, a proteína quinase-1 dependente de fosfoinosítideo (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.^{25, 26} A ativação desta proteína é essencial para síntese de glicogênio,²⁷ ação antiapoptótica,²⁸ regulação da síntese lipídica,²⁹ síntese de proteínas,³⁰ regulação da expressão gênica³¹ e transporte de glicose estimulado pela insulina.³² Outras proteínas da mesma família do IRS-1, como o IRS-3 e IRS-4 também podem estimular o transporte de glicose.³³

Buren et al.³⁴ demonstraram que altas concentrações plasmáticas de insulina e glicose em longo prazo, particularmente em combinação, podem produzir, dentro de 24h em 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 PKB induzida pela insulina.

Em suma, a ação insulínica envolve uma sequência 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. Portanto, os estudos que investigam alterações do mecanismo de ação da insulina presentes na resistência à insulina representam um passo importante na busca de mecanismos preventivos e/ ou curativo para o diabetes mellitus.

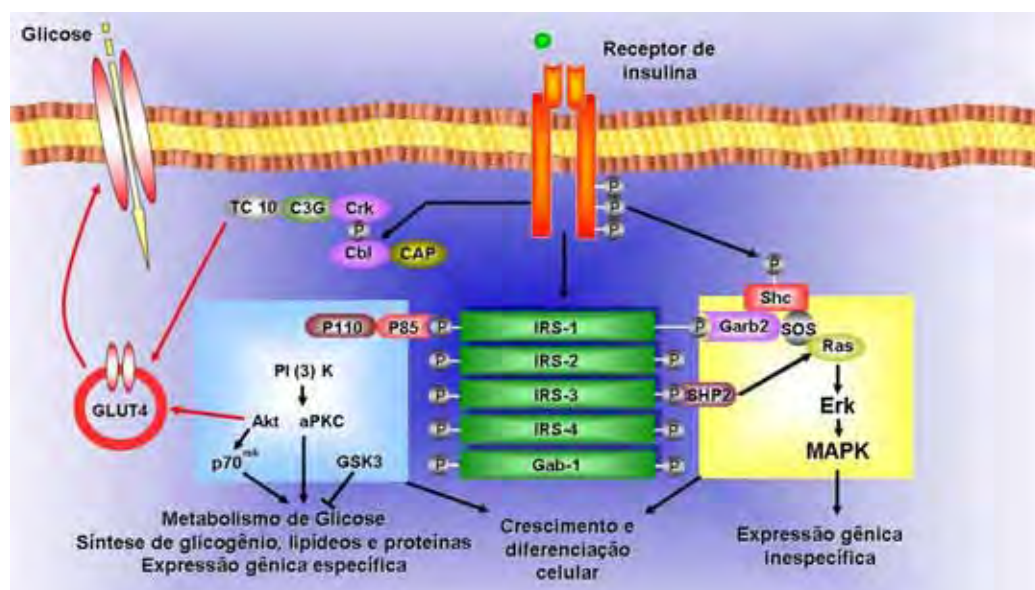


FIGURA 1- As vias de sinalização insulínica. O receptor de insulina é uma tirosina quinase que se autofosforila e catalisa a fosforilação de proteínas intracelulares como as proteínas IRS, Shc e Cbl. Após a fosforilação essas proteínas se ligam a outras moléculas de sinalização através de seus domínios 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 (figura extraída e adaptada de Carvalheira et al.).³⁵

A literatura apresenta estudos que avaliam o sinal insulínico em tecidos responsivos à insulina (músculo esquelético, tecido adiposo branco e fígado), pois eles são os principais responsáveis pela homeostase glicêmica.³⁶⁻³⁸ Sabe-se que após a ingestão de glicose, o aumento na concentração plasmática de glicose estimula a liberação de insulina, e a combinação de hiperinsulinemia e hiperglicemia estimula a captação de glicose por órgãos esplâncnicos (fígado e intestino) e tecidos periféricos (principalmente músculo) e suprime a produção endógena (principalmente hepática) de glicose. A maioria (80% - 85%) da captação de glicose por tecidos periféricos ocorre no músculo, com uma pequena quantidade (4% - 5%) metabolizada por adipócitos.³⁹ E os pacientes portadores de DM2 apresentam resistência à insulina no tecido muscular e adiposo em termos de captação de

glicose e resistência à insulina no tecido hepático em termos da capacidade do hormônio para suprimir a captação de glicose hepática.⁴⁰

A literatura mostra uma associação entre DM e alterações patológicas na cavidade bucal. Papapanou⁴¹ em 1996 realizou uma meta-análise e verificou que o DM pode influenciar não apenas na prevalência e severidade da periodontite, como também na progressão desta doença. Estes estudos corroboram os resultados de Oliver e Tervonen⁴² que demonstraram a importância do DM como fator de risco para a periodontite em índios Pima (EUA), que apresentam uma grande prevalência de DM. Ademais, a OMS incluiu, desde 1993, a DP como a sexta complicação clássica do diabético.¹³

O DM pode contribuir para o quadro de periodontite devido às mudanças vasculares, disfunção de neutrófilos, síntese de colágenos e pela predisposição genética, além de mudanças na microbiota gengival.⁴² Além disso, a insulina apresenta atividade anti-inflamatória, assim um estado de resistência à insulina não apenas reduz a utilização da glicose pelos tecidos responsivos à insulina, mas também estimula a sinalização pró-inflamatória.⁴³

Tanto a hiper quanto hipoglicemia podem prejudicar diretamente as funções biológicas dos tecidos periodontais. Células do ligamento periodontal cultivadas em condições hiperglicêmicas tiveram suas funções biológicas como adesão e motilidade prejudicadas, enquanto as células cultivadas em condições de hipoglicemia sofreram morte. Estas mudanças, devido a diferentes concentrações plasmáticas de glicose foram observadas mais intensivamente em células do ligamento periodontal do que em outras células fibroblásticas, sugerindo que as funções biológicas do ligamento periodontal são facilmente levadas a comprometimento por variações das concentrações plasmáticas de glicose.⁴⁴

A hiperglicemia progressivamente promove a glicação das proteínas do corpo, formando produtos de glicação avançada (AGE) que são quimiotáticos para a linhagem de monócitos e macrófagos e são captados pelos monócitos e células endoteliais através de receptores específicos, conhecidos como receptores para produtos de glicação avançada (RAGE). Em seguida, eles estimulam monócitos a se proliferar e induzir radicais livres de oxigênio e citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Estas citocinas, por sua vez, podem agravar ainda mais a

destruição do tecido inflamado pela ativação de outras células inflamatórias, tais como linfócitos T ou B, enquanto os radicais livres de oxigênio podem danificar diretamente os tecidos.⁴⁴

A doença periodontal é uma doença infecciosa crônica do periodonto causada pela colonização de mistura complexa de bactérias anaeróbias gram-negativas e, em menor grau, bactérias gram-positivas, nos tecidos periodontais. A reação inflamatória provoca uma progressão lenta da perda óssea alveolar. Se a DP não for tratada, os dentes perdem o suporte ósseo alveolar e tornam-se móveis, podendo ocasionar a perda daqueles acometidos pela doença. Sabe-se que a DP é uma das principais causas de perda dentária entre adultos, resultando em redução da função oral e da qualidade de vida.⁴⁵

A detecção de patógenos é um elemento essencial para o início da resposta imune inata, tais como inflamação, é mediada por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que reconhecem estruturas moleculares (amplamente partilhadas por patógenos) conhecidas como PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos). A ligação de PAMPs aos PRRs inicia uma série de programas de sinalização que executam a primeira linha da resposta defensiva necessária para eliminar microrganismos infecciosos.⁴⁶

Os receptores Toll-like (TLRs) foram os primeiros PRRs a serem identificados. Eles são também os mais bem caracterizados e reconhecem uma vasta gama de PAMPs.⁴⁶ Os TLRs são amplamente expressos em células do sistema imune inato (macrófagos, células epiteliais, endoteliais, e células do parênquima de órgãos) e em células do sistema imune adaptativo (células B, mastócitos, células T, e células dendríticas).⁴⁷ Uma família de 10 TLRs funcionais humanos podem reconhecer os ligantes que não existem no hospedeiro e iniciar as cascatas inflamatórias. Isto provoca a produção de citocinas inflamatórias, quimiocinas e interferons.⁴⁷

Os receptores Toll-like 1-9 são expressos por células do tecido gengival normal e a expressão destes receptores apresenta-se aumentada nas células do tecido gengival inflamado.⁴⁸ Cada TLR detecta PAMPs distintos derivados de vírus, bactérias, fungos ou parasitas. Como exemplos de PAMPs bacterianos pode-se citar lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteínas, flagelina, DNA e RNA.⁴⁶ Sabe-se que o LPS estimula o RNAm para TLR-2 e TLR-4⁴⁹ e causa regulação transcricional de uma

ampla gama de genes pró-inflamatórios incluindo TNF- α , IL-1, IL-8 e IL-6.⁵⁰ Portanto, a estimulação dos TLRs provoca uma resposta defensiva imediata, incluindo a produção de uma matriz de peptídeos antimicrobianos e citocinas.⁵¹

Os LPS são os principais componentes das membranas mais externas das bactérias gram-negativas e considerados fatores importantes na patogênese da doença periodontal, são encontrados adsorvidos às superfícies dentárias radiculares e aos tecidos gengivais de pacientes com doença periodontal.⁵² Como visto acima, os LPS podem induzir a produção de várias citocinas em macrófagos, tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6 que desempenham papel importante na maturação de células progenitoras dos osteoclastos⁵³ e ocasionam a ativação de osteoclastos, favorecendo a reabsorção óssea e o aumento de colagenase que propicia maior destruição das fibras do ligamento periodontal, promovendo assim, uma destruição do osso e do tecido conjuntivo.⁵⁴⁻⁵⁶

Uma associação bidirecional entre periodontite e DM foi estabelecida na literatura. DM afeta negativamente a condição periodontal e a periodontite afeta negativamente o controle glicêmico, aumentando, assim, o risco de complicações no paciente diabético.⁵⁷

A doença periodontal é considerada fator predisponente para o desenvolvimento de resistência à insulina e DM2 devido à liberação de mediadores inflamatórios.⁵⁸ Além de atuarem localmente, estes mediadores atingem a circulação sistêmica. Estudos mostram que as concentrações séricas de TNF- α estão elevadas em pacientes com DP.⁵⁹⁻⁶¹ Concentrações elevadas de TNF- α e IL-6 também podem ser observadas em tecidos (fígado e tecido adiposo branco) de ratos com doença periodontal. Contudo, estas citocinas apresentam-se elevadas nos tecidos somente quando a doença periodontal está associada à obesidade.⁶² Além disso, o tratamento periodontal reduz as concentrações séricas de TNF- α em indivíduos diabéticos.⁶³

Um levantamento realizado por Demmer et al.⁶⁴ do NHANES III (National 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. Participantes com doença periodontal apresentaram aumento de duas vezes na incidência de diabetes.

Análise do NHANES III demonstrou que uma situação glicêmica não controlada em pacientes com DM2 foi associada a uma maior severidade de periodontite.⁶⁵ Pessoas com doença periodontal severa e moderada apresentaram concentrações elevadas de glicemia quando comparadas aos indivíduos com saúde periodontal adequada.⁶⁶ Um estudo piloto demonstrou que indivíduos diabéticos apresentam quadro de periodontite severa quatro vezes maior que indivíduos não diabéticos.⁶⁷

A literatura tem associado a doença periodontal às alterações séricas nos lipídeos, porém não estabeleceu se a periodontite causa elevação nas concentrações séricas de lipídeos ou se esta elevação predispõe à periodontite, uma vez que pacientes com doença periodontal moderada à severa apresentam aumento nas concentrações séricas de triglicérides e colesterol⁶⁸ e pacientes com hiperlipidemia demonstram maior incidência de periodontite.¹

Engelbreton et al.⁶¹ demonstraram que a periodontite crônica severa possui associação positiva com o TNF- α plasmático em adultos com diabetes mellitus tipo 2. Este mesmo estudo verificou que indivíduos com periodontite severa apresentaram maiores concentrações plasmáticas desta citocina se comparados àqueles com periodontite moderada.

Vários autores demonstraram que o TNF- α pode induzir resistência à insulina na obesidade.⁶⁹⁻⁷¹ Também foi demonstrado que o tratamento com TNF- α leva à redução da autofosforilação do receptor da insulina estimulada pela própria insulina e inibição subsequente da fosforilação em tirosina de IRS-1.^{70, 72-74} Ademais, o TNF- α induz modificação do IRS-1 por fosforilação em serina, o que torna essa molécula inibitória para a capacidade sinalizadora do receptor de insulina.^{70, 75} Demonstrou-se também que a neutralização dos efeitos do TNF- α em ratos obesos provocou aumento da sensibilidade insulínica.^{69, 76} Além do mais, observou-se que camundongos deficientes em TNF- α permaneceram sensíveis à insulina quando colocados em dieta rica em gordura.⁷⁷

Lumeng et al.,⁷⁸ utilizando estudo *in vitro*, mostraram que o tratamento de adipócitos de camundongos com TNF- α por 6 horas reduziu: 1) as concentrações da proteína transportadora de glicose (GLUT4); 2) a expressão do receptor de insulina; 3) fosforilação de IRS-1 em tirosina. Neste estudo, o pré-tratamento dos adipócitos

isolados com IL-10 preveniu os efeitos do TNF- α nestas proteínas. Demonstrou-se também que a inibição da IL-10 em camundongos promove o aumento da expressão de citocinas inflamatórias.⁷⁹

Na literatura há estudos demonstrando a ação de outras citocinas inflamatórias, como o IL-6 e IL-1 β no sinal insulínico. Jager et al.⁸⁰ observaram que o tratamento crônico de IL-1 β em adipócitos (3T3-L1) reduziu a expressão de GLUT4 e impediu a translocação deste transportador para a membrana plasmática em resposta à insulina. Além disso, a literatura também mostra que o tratamento crônico do músculo com IL-6 induz a fosforilação em serina do IRS-1, prejudica a fosforilação em tirosina do IRS-1 e IRS-2; e reduz a fosforilação em serina da Akt.⁸¹

Conforme descrito anteriormente, há na literatura diversos artigos científicos que relatam uma associação ente diabetes e doença periodontal, nos quais se observa que o DM leva ao agravamento da DP e esta, por sua vez, piora o quadro de DM. No entanto, ainda não há estudos que demonstrem que um processo inflamatório local, como a doença periodontal, possa induzir resistência à insulina e alteração na etapa inicial do sinal insulínico em indivíduos não diabéticos. O presente projeto propõe-se a investigar esta proposição.

2 OBJETIVOS

Sabendo-se que o processo inflamatório pode ocasionar alteração no sinal insulínico, tornou-se fundamental averiguar se um processo inflamatório local, como a DP “per si”, é capaz de induzir resistência à insulina e alterações na etapa inicial do sinal insulínico. Portanto, no presente projeto foram avaliados: 1) glicemia; 2) fruttosaminemia; 3) colesterolemia e triacilgliceridemia; 4) concentração plasmática de TNF- α , IL-6 e resistina; 5) resistência à insulina; 6) grau de fosforilação em tirosina da pp185 (IRS-1/IRS-2) e em serina do IRS-1 em músculo esquelético gastrocnêmio (MG), tecido adiposo branco (TAB) periepídimal e fígado (F); 7) conteúdos de IR β e de IRS-1 em MG, TAB e F.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 62 ratos Wistar de 2 meses de idade (200 g), mantidos em ambiente de 12/12 horas de claro e escuro (período claro iniciado às 7h) e temperatura de $23 \pm 2^\circ \text{C}$. Os ratos foram divididos em dois grupos: 1) com doença periodontal (DP); 2) ratos-controle (CN).

Animais do grupo DP foram anestesiados usando cloridrato de quetamina (10%, 80mg/ kg de peso corpóreo, intraperitoneal) com xilazina (2%, 10 mg/ kg de peso corpóreo, intraperitoneal), e a doença periodontal foi induzida por ligadura com fio de seda 4-0 adaptada na região cervical dos primeiros molares inferiores, bilateralmente.⁸² Após a colocação da ligadura foram avaliados a ingestão alimentar (três vezes por semana) e o peso corporal (uma vez por semana) dos ratos de ambos os grupos. Após 28 dias da indução da doença periodontal os experimentos foram realizados. Todos os procedimentos experimentais foram realizados em ratos DP e CN submetidos a uma privação alimentar de 14 horas e anestesiados com tiopental sódico (Thiopentax® - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, Brasil, 3%, 5mg/ 100g peso corpóreo, intraperitoneal).

Os animais dos grupos CN (n=10) e DP (n=10) foram submetidos a laparotomia mediana para coleta de sangue pela veia cava inferior. As amostras de sangue foram transferidas para tubos de plástico heparinizados e centrifugadas (4000 rpm, 4°C , 15 minutos). O plasma obtido foi alíquotado e armazenado a -70°C até o dia da avaliação das concentrações plasmáticas de glicose, frutamina, colesterol total, colesterol HDL (HDL-C), triglicérides, TNF- α , IL-6 e resistina. Destes animais também foi realizada a remoção do músculo esquelético gastrocnêmio da pata esquerda, do tecido adiposo branco (TAB) periepididimal e retroperitoneal para análise do peso tecidual. Em seguida os animais foram eutanasiados por dose anestésica excessiva.

Outro grupo de ratos CN (n=7) e DP (n=7) foi submetido ao teste endovenoso de tolerância à insulina (ITT). Em seguida os animais foram eutanasiados por dose anestésica excessiva.

Um outro grupo de ratos CN (n=7) e DP (n=7) foi submetido à laparotomia mediana, com retirada de amostras de tecidos responsivos à insulina 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 periepídidimo) a fim de quantificar o grau de fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina pp185 (IRS-1/IRS-2), após estímulo insulínico. Em seguida os animais foram eutanasiados por dose anestésica excessiva.

Por último, um grupo de animais CN (n=7) e DP (n=7) foi utilizado para quantificar, em tecidos responsivos à insulina: 1) o grau de fosforilação em serina do substrato do receptor de insulina IRS-1, após estímulo insulínico; 2) os conteúdos do receptor de insulina (IR β) e de IRS-1. Nestes experimentos, os animais foram anestesiados conforme já descrito, realizando-se, a seguir, laparotomia mediana, com retirada de amostras dos tecidos, antes e após a injeção de 1,5 U de insulina regular (i.v. veia porta) em tempos variáveis (30s para o fígado, 90s para o gastrocnêmio e 120s para o tecido adiposo branco periepídidimo). Em seguida os animais foram eutanasiados.

3.2 Índice de Lee

Como indicativo de massa corpórea, foi calculado o índice de Lee (similar ao IMC para humanos), que é a raiz cúbica do peso corpóreo em gramas dividido pelo comprimento naso-anal em centímetros x 1000.⁸³

3.3 Análise radiográfica da perda óssea alveolar e suporte ósseo periodontal

Após 28 dias da indução da doença periodontal, os animais foram eutanasiados. As hemimandíbulas direita e esquerda foram dissecadas e fixadas por 24h em formaldeído 4%. Para obtenção das imagens radiográficas foi utilizado o aparelho de raios-X GE-100 (General Electric, Milwaukee, EUA), operando com 70 kvp, 10 mA e tempo de exposição de 0,10 segundos. A imagem digital foi obtida diretamente com placa óptica digital (Digora, Soredex, Orion Corporation, Helsinki, Finland). As leituras das placas ópticas foram realizadas em equipamentos de laser scanner sensibilizados, e as imagens foram analisadas usando um software (Windows Digora 1.51, Soredex, Orion Corporation, Helsinki, Finland). Análises

radiográficas foram realizadas para detectar a perda óssea alveolar de acordo com o descrito por Holzhausen et al.⁸² A distância entre a junção cimento-esmalte (CEJ) e a altura do osso alveolar foi determinada na superfície da raiz mesial do primeiro molar inferior esquerdo e direito, com o auxílio de um software (Windows Digora 1.51, Soredex, Orion Corporation, Helsinki, Finland). O suporte ósseo periodontal foi analisado como descrito por Pontes Andersen et al.⁸⁴ As medidas foram realizadas eletronicamente na mesial e distal do primeiro molar inferior direito e esquerdo. Uma linha foi desenhada conectando as cúspides (C) do primeiro molar ao ápice (A) da raiz correspondente. Uma segunda linha foi traçada a partir do ápice (A) ao nível do osso correspondente ao defeito ósseo interproximal mais profundo (B). As distâncias foram medidas em milímetros, e o suporte ósseo periodontal foi calculado segundo a fórmula: Suporte Ósseo Periodontal = $(AB / AC) \times 100\%$.

3.4 Análise histológica da perda óssea alveolar

Cinco animais de cada grupo (DP e CN) foram selecionados aleatoriamente para análise histológica. As hemimandíbulas direita e esquerda coletadas de ratos de ambos os grupos CN e DP, 28 dias após a colocação da ligadura, foram embebidas em formaldeído 4% por 24h. A descalcificação foi realizada em EDTA 10% (pH 7,4) por aproximadamente 3 meses. Foram feitos cortes sequenciais com 5 µm de espessura ao longo do eixo dos dentes no sentido mesiodistal, e os cortes foram corados com hematoxilina e eosina. Estudos morfológicos foram realizados na gengiva e osso alveolar.

3.5 Determinação da glicemia

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), pelo qual a glicose é oxidada enzimaticamente pela glicose oxidase, gerando ácido glucônico e água oxigenada. A H₂O₂, 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 µL da amostra de plasma ou de padrão (100 mg/dl) e 1,0 mL de reagente enzimático. Essa solução foi bem homogeneizada e colocada em banho-maria a 37°C durante 15 minutos. As absorbâncias do teste e do padrão foram determinadas em 505 nm acertando o zero com o branco.

Cálculos

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

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

3.6 Frutosamina

A frutosamina (µmol/L) foi estimada por método cinético de tempo fixo (kit comercial - Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Brasil, ref. 97), utilizando como substrato, azul de nitrotetrazólio. As absorbâncias nos tempos de reação 10 e 15 minutos foram estimadas em espectrofotômetro da marca Hitachi (Hitachi, Ltd. Tokyo, Japan), em comprimento de onda de 530 nm. Para realização das dosagens foram seguidas as recomendações do fabricante.

3.7 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 desta análise (Katal Biotecnológica Ind. Com. Ltda., Belo Horizonte, Brasil) pelo qual os ésteres de colesterol da amostra são hidrolisados pela colesterol esterase, produzindo colesterol livre. Este, em presença da colesterol oxidase e de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio que, pela ação da peroxidase em presença de fenol e 4-aminoantipirina produz, um composto roseoavermelhado (quinonimina) com máximo de absorção em 500 nm.

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

Cálculos

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

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

3.8 Determinação da concentração plasmática do Colesterol HDL

A determinação da concentração plasmática do colesterol HDL (HDL-C) foi realizada por um método enzimático de precipitação, específico para esta análise (Katal Biotecnológica Ind. Com. Ltda., Belo Horizonte, Brasil).

O conjunto Colesterol HDL é um sistema que se destina à separação do colesterol ligado à fração HDL no plasma sanguíneo. A mistura ácido fosfotúngstico/cloreto de magnésio precipita os quilomicrons, as lipoproteínas de baixa densidade (LDL-C) e muito baixa densidade (VLDL-C) sem alterar a solubilidade das lipoproteínas de alta densidade (HDL-C). Após centrifugação, recolhe-se o líquido sobrenadante que contém a fração HDL-C cujo colesterol é determinado enzimaticamente.

Para a dosagem de HDL-C foram utilizados 100 µL da amostra ou de padrão e 1,0 mL de reagente de cor. Essa solução foi bem homogeneizada e colocada em banho-maria a 37°C durante 10 minutos. As absorbâncias do teste e do padrão são determinadas em 500 nm acertando o zero com o branco.

Cálculos

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

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

3.9 Determinação da concentração plasmática dos triglicérides

A concentração plasmática dos triglicérides foi determinada pelo método enzimático da glicerol-P-oxidase, específico para quantificação de triglicérides (Katal Biotecnológica Ind. Com. Ltda., Belo Horizonte, Brasil).

No presente método, os triglicérides do plasma são hidrolisados pela lipase lipoproteica produzindo glicerol livre. Este é fosforilado pela glicerol quinase, cujo produto sofre a ação da glicerol-P-oxidase, a qual, em presença de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio. 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 10 µL da amostra ou de padrão e 1,0 mL de reagente de cor. Essa solução foi homogeneizada e colocada em banho-maria a 37°C durante 10 minutos. As absorbâncias do teste e do padrão são determinadas em 500 nm acertando o zero com o branco.

Cálculos

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

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

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

Os valores do colesterol VLDL e colesterol LDL foram obtidos pela equação de Friedewald et al.⁸⁵

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

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

3.11 Teste endovenoso de tolerância à insulina (ITT) curto

Os animais foram anestesiados e, sob esta anestesia, realizou-se a injeção de insulina (Novolin®, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca) pela veia peniana ministrada na dose de 0,75U/ kg de peso corpóreo. Amostras de sangue foram colhidas (por secção da cauda) aos 0 (antes da injeção hormonal), 4, 8, 12, 16 minutos após insulina e a glicemia foi medida utilizando um monitor de glicemia (Accu-Chek Advantage, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

A velocidade de desaparecimento da glicose (K_{itt}) foi calculada pela fórmula $\ln^2/t_{1/2}$. O $t_{1/2}$ da glicose foi calculado de acordo com Bonora et al.⁸⁶ a partir da inclinação da curva de regressão mínima durante a fase linear de declínio da concentração plasmática de glicose, ou seja $t_{1/2} = \ln^2/\text{coeficiente de } x$.

3.12 Concentrações plasmáticas de citocinas

As concentrações plasmáticas de TNF- α , IL-6 e resistina 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; Biovedor, Heidelberg, Germany.

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

3.13.1 Preparação das amostras para “Western blotting”

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; 0,1mg/mL Aprotinina) 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%; DTT 15%).

3.13.2 “Western blotting”

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

A primeira etapa do Western blotting consistiu na submissão das amostras (185 μ g de proteína em cada poço) 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 Garfin⁸⁷, 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 ficou sob o gel de “stacking”, com orientação vertical,

num sistema de câmaras que manteve as porções superiores e inferiores do gel em contato com um tampão de corrida (Tris 50 mM; glicina 375 mM; SDS 0,1%; EDTA 1,8 mM).

No gel de “stacking” foram aplicadas as amostras solubilizadas em tampão de Laemmli. Imediatamente antes da aplicação, as amostras foram fervidas por 4 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 ocorresse o empacotamento da amostra, o que pôde ser observado na transição dos géis. Posteriormente foi aplicada voltagem constante de 100 V para a corrida no gel de resolução, durante 2h.

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

- **Transferência eletroforética**

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

A transferência foi realizada sob voltagem constante de 100 V, durante 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.⁸⁸ 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 os anticorpos antifosfotirosina (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, USA) ou antifosfoserina-IRS1 (Ser307) (UPSTATE, New York, EUA) ou anti-IRS-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, USA) ou anti-IR β (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, USA) por 4h em temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizadas três lavagens com solução basal, e as membranas foram incubadas durante 1h com segundo anticorpo contendo

peroxidase de “horseradish” (“kit” de quimioluminescência -ECL- GE Healthcare Buckinghamshire, Germany). Novamente, foram realizadas 3 lavagens das membranas de nitrocelulose com solução basal, com duração de 10 min cada lavagem. Após estes procedimentos, as membranas foram levadas até uma câmara escura, onde foi adicionado 1 ml de cada solução de detecção 1 e 2 (do kit de ECL), e incubou-se por 1 minuto. Por fim, foi drenado o excesso de reagente e a membrana de nitrocelulose foi exposta a filme de RX (Hyperfilm ECL– GE Healthcare Buckinghamshire, Germany) dentro de um cassete para autorradiografia (GE Healthcare Buckinghamshire, Germany) à prova de luz, durante 10 min, em 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 Scion Image (Scion Image-Release Beta 3b, NIH, Frederick, MD, USA).

3.14 Análise estatística

Duas análises foram realizadas:

1) Para o sinal insulínico e valores de glicemia do ITT:

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

2) Para a análise da perda óssea alveolar e suporte ósseo periodontal, concentrações plasmáticas de glicose em jejum, frutossamina, insulina, citocinas, ensaios lipídicos e valores do Kitt:

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

Todos os valores foram apresentados como média \pm EPM.

4 RESULTADOS

4.1 Análise radiográfica do osso alveolar

A análise do osso alveolar revelou que o grupo DP apresentou maior perda óssea e menor suporte ósseo que o grupo controle (Tabela 1).

Tabela 1 - Perda óssea alveolar e suporte ósseo dos ratos-controle (CN) e ratos com doença periodontal (DP)

	CN (média ± EPM)	DP (média ± EPM)
Perda óssea (mm)	0.58 ± 0.03	1.46 ± 0.05*
Suporte ósseo (%)	56.95 ± 0.44	45.01 ± 0.90*

*p < 0,0001 para grupo CN vs. DP

4.2 Análise histológica da inflamação e reabsorção óssea

Os tecidos periodontais dos ratos CN apresentaram morfologia normal. Por outro lado, observou-se perda da papila gengival, aumento da espessura da camada epitelial, inflamação e reabsorção óssea na região interproximal e interradicular, além de irregularidade da superfície da crista óssea nos cortes histológicos obtidos 28 dias após a indução da periodontite experimental em ratos DP (Figura 2).

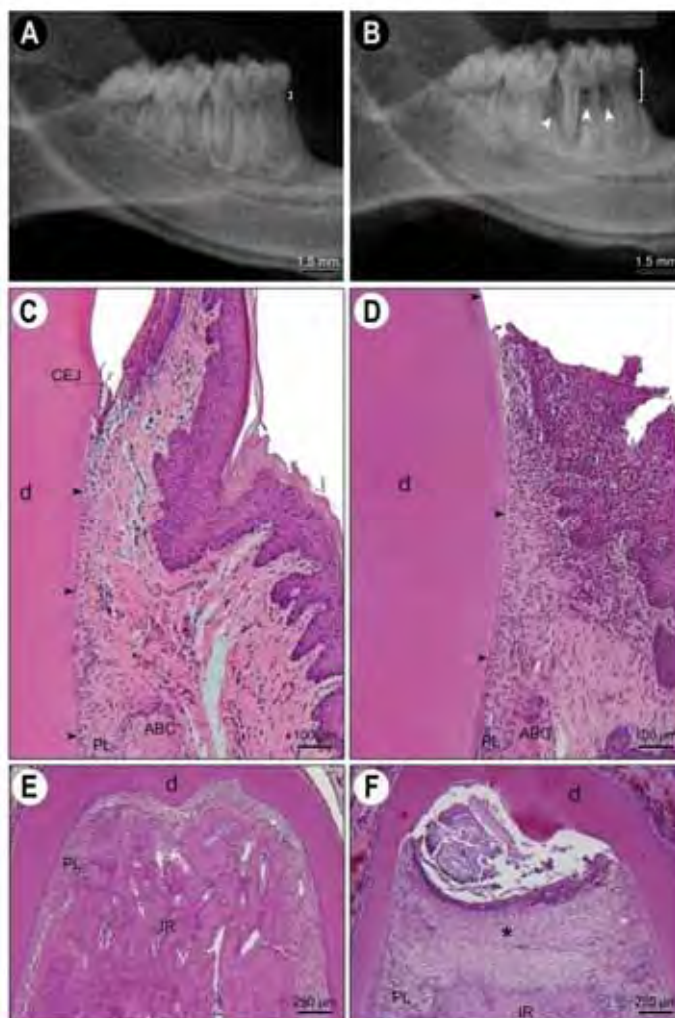


FIGURA 2 - Radiografias digitais das mandíbulas e fotomicrografias dos tecidos periodontais obtidos de animais experimentais. Em A, imagens radiográficas mostrando osso alveolar normal e em B, perda óssea em regiões interproximais e inter-radiculares (seta branca) 28 dias após a periodontite induzida por ligadura. Perda óssea foi medida pela distância da junção cimento-esmalte à crista óssea alveolar (linha branca). Em C, características histológicas dos tecidos periodontais do animal controle (sem ligadura) demonstrando camada do epitélio de espessura regular, com tecido conjuntivo denso com baixo infiltrado inflamatório e superfície regular da crista óssea. Em D, características histológicas 28 dias após a colocação da ligadura, demonstrando perda de papila gengival, aumento da espessura da camada epitelial, infiltrado inflamatório mais intenso no tecido conjuntivo, além de irregularidade da superfície da crista óssea. Em E, fotomicrografias demonstrando regiões inter-radiculares no controle e em F, perda óssea (asterisco) claramente observada no grupo com ligadura. Abreviaturas e símbolos: ABC, crista óssea alveolar; CEJ, junção cimento esmalte; d, dentina; PL, ligamento periodontal; IR, região interradicular; seta de preta ponta, cimento.

4.3 Peso corpóreo e ingestão alimentar:

Os ratos DP não apresentaram diferença tanto no peso corpóreo (Figura 3) como na ingestão alimentar (Figura 4) em relação aos ratos-controle, desde a indução da doença periodontal até a realização dos experimentos.

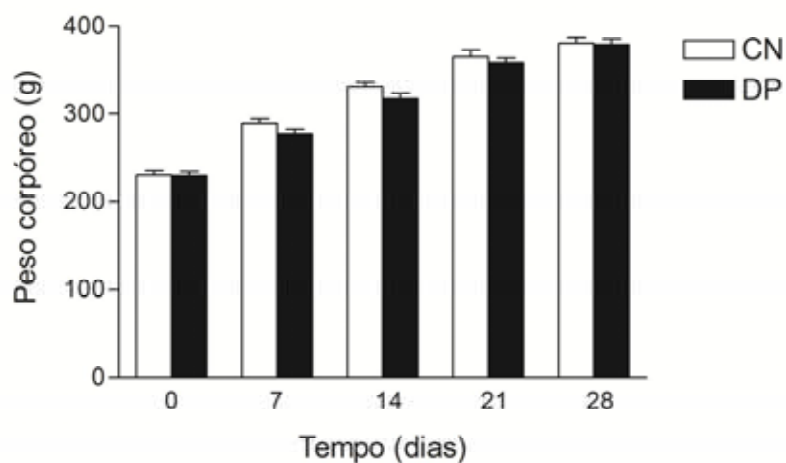


FIGURA 3 - Peso corpóreo dos ratos-controle (CN) e ratos com doença periodontal (DP) durante 28 dias. Os valores são expressos como média \pm EPM, n = 25.

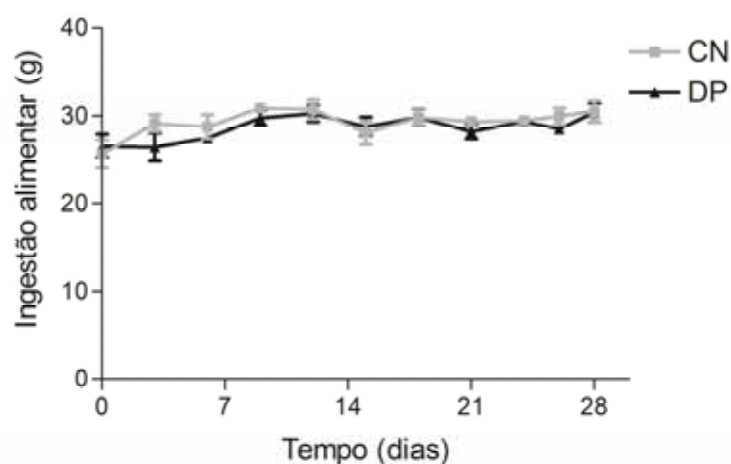


FIGURA 4 - Ingestão alimentar de ratos-controle (CN) e ratos com doença periodontal (DP) durante 28 dias. Os valores são expressos como média \pm EPM, n=25.

4.4 Parâmetros morfométricos

A Tabela 2 mostra os parâmetros morfométricos de ambos os grupos no dia da eutanásia. Os ratos DP não apresentaram diferenças tanto nos pesos dos tecidos adiposos (periepididimal e retroperitoneal) e muscular (gastrocnêmio) como no índice de Lee em relação aos ratos-controle.

Tabela 2 - Parâmetros morfométricos dos ratos-controle (CN) e ratos com doença periodontal (DP)

	CN	DP
Índice de Lee	305.80 ± 0.12	304.70 ± 0.14
Peso TAB periepididimal (g)	4.07 ± 0.36	4.39 ± 0.35
Peso TAB retroperitoneal (g)	3.52 ± 0.35	3.15 ± 0.23
Peso músculo gastrocnêmio (g)	2.06 ± 0.06	2.07 ± 0.04

Valores expressos como média ± EPM, n=10. Tecido adiposo branco (TAB).

4.5 Concentrações plasmáticas de glicose e frutossamina

Não foram observadas diferenças nas glicemias entre os dois grupos estudados. Além disso, não foi observada alteração nas concentrações plasmáticas de frutossamina entre estes grupos (Tabela 3).

Tabela 3 - Concentração plasmática de glicose em jejum e frutossamina dos ratos-controle (CN) e ratos com doença periodontal (DP)

	CN	DP
Glicemia (mg/dL)	105.20 ± 3.43	109.50 ± 3.37
Frutosaminemia (µmol/L)	198.50 ± 16.08	196.70 ± 26.98

Valores expressos como média ± EPM, n=10.

4.6 Lipidemia

Não foram observadas diferenças nas concentrações plasmáticas de colesterol Total, Colesterol LDL, Colesterol HDL e triglicérides nos ratos DP em relação aos ratos CN (Tabela 4).

Tabela 4 - Perfil lipídico dos ratos-controle (CN) e ratos com doença periodontal (DP)

	CN	DP
Colesterol Total (mg/dl)	55.17 ± 3.46	59.77 ± 2.81
Triglicérides (mg/dl)	38.00 ± 1.83	34.91 ± 2.61
Colesterol HDL (mg/dl)	15.70 ± 0.34	15.80 ± 0.53
Colesterol LDL (mg/dl)	31.87 ± 3.48	36.99 ± 2.86
Colesterol VLDL (mg/dl)	7.60 ± 0.37	6.982 ± 0.52

Valores expressos como média ± EPM, n=10.

4.7 Teste intravenoso de tolerância à insulina (ITT)

Na comparação das glicemias (Figura 5) em cada período de tempo, o grupo DP apresentou glicemia significativamente maior comparado ao grupo CN, exceto para o estado basal (tempo 0) e 4 minutos após a infusão de insulina.

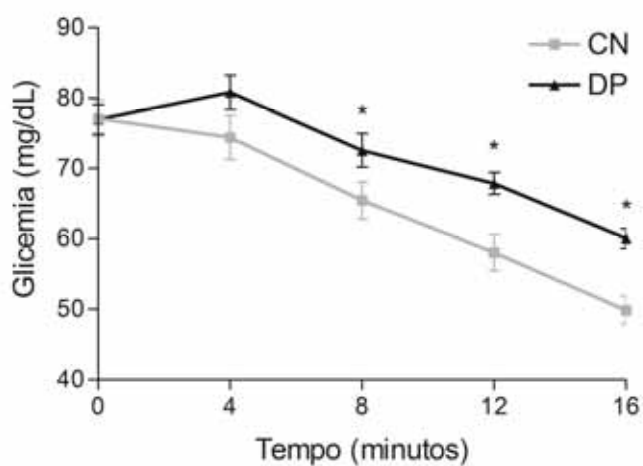


FIGURA 5 - Teste intravenoso de tolerância à insulina nos ratos-controle (CN) e com doença periodontal (DP). As amostras de sangue foram coletadas nos tempos de 0 (basal), 4, 8, 12, 16 minutos após a injeção de insulina. Os valores das glicemias são apresentados como média \pm EPM, n=7.

* $p < 0,05$ para CN vs. DP.

A partir dos valores apresentados na figura 5, calculou-se a taxa de desaparecimento da glicose (Kitt) durante o teste de tolerância à insulina. O grupo DP apresentou uma taxa de decaimento da glicose (Kitt) menor ($p < 0.05$) em relação ao grupo CN (Figura 6).

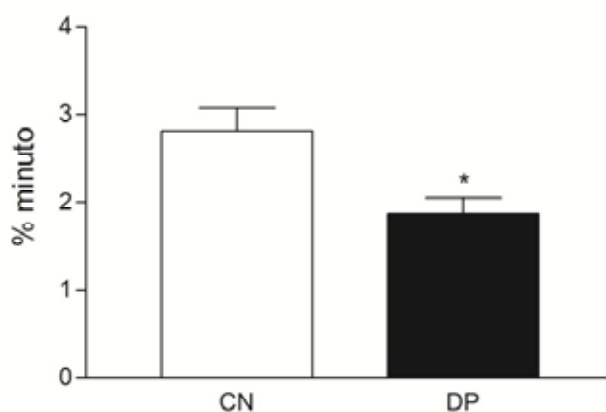


FIGURA 6 - Velocidade de desaparecimento da glicose (Kitt) em ratos do grupo controle (CN) e do grupo com doença periodontal (DP). Os animais foram submetidos ao teste de tolerância à insulina (0,75U / kg de peso corpóreo) e as amostras foram coletadas nos tempos 0 (basal), 4, 8, 12, 16 minutos após a injeção de insulina. O Kitt foi calculado como descrito em materiais e métodos e os valores são expressos como média \pm EPM, $n = 7$.

* $p < 0,05$ para CN vs. DP.

4.8 Concentrações plasmáticas de TNF- α , IL-6 e resistina

Em relação às citocinas estudadas, observou-se aumento apenas nas concentrações plasmáticas de TNF- α no grupo DP em relação ao CN. As concentrações plasmáticas de IL-6 e resistina não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (Tabela 5).

Tabela 5 - Concentrações plasmáticas de TNF- α , IL-6 e resistina nos ratos-controle (CN) e ratos com doença periodontal (DP)

	CN	DP
TNF- α (pg/ml)	8.62 \pm 0.21	9.37 \pm 0.15*
IL-6 (pg/ml)	14.86 \pm 0.44	14.44 \pm 0.31
Resistina (ng/ml)	0.68 \pm 0.15	0.86 \pm 0.18

Valores expressos como média \pm EPM, n=10. *p< 0,05 CN vs. DP.

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

Observou-se aumento no grau de fosforilação em tirosina da pp185 após o estímulo insulínico com relação ao estado basal em ambos os grupos e tecidos. Após estímulo insulínico, o grau de fosforilação em tirosina da pp185 foi reduzido ($p < 0.05$) no grupo DP em relação ao grupo CN nos tecidos muscular e adiposo. Contudo, esta alteração no sinal insulínico não foi observada no fígado, entre os grupos. Não houve diferença no grau de fosforilação em tirosina da pp185 no estado basal entre os grupos, nos tecidos muscular e hepático, mas houve diferença ($p < 0,05$) no TAB (Figura 7).

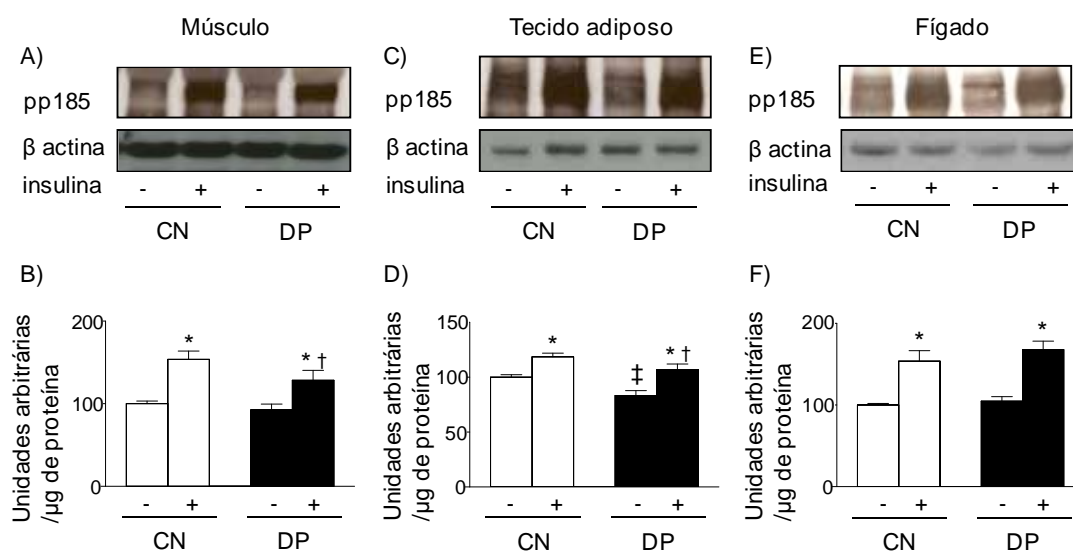


FIGURA 7 - Avaliação do grau de fosforilação em tirosina da pp185 (IRS-1/IRS-2) antes (-) e após (+) o estímulo insulínico no músculo gastrocnêmio (A, B), tecido adiposo branco periepídimal (C, D) e fígado (E, F) de ratos-controle (CN) e de ratos com doença periodontal (DP). Em **A**, **C** e **E** autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 μg). β-actina foi utilizada como controle. Em **B**, **D** e **F**, valores do grau de fosforilação em tirosina da pp185, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média ± EPM, n=7.

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

† $p < 0,05$ CN (+) vs. DP (+);

‡ $p < 0,05$ CN (-) vs. DP (-).

4.10 Avaliação do grau de fosforilação em serina do substrato do receptor de insulina IRS-1 no músculo esquelético gastrocnêmio, tecido adiposo branco periepídimal e fígado

Comparando-se os grupos CN e DP, 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 8).

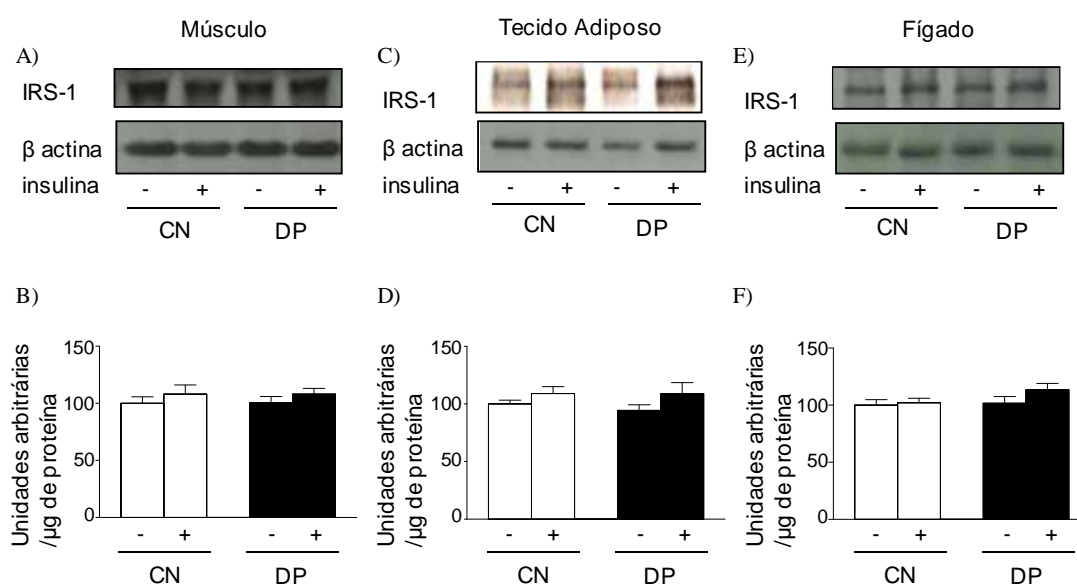


FIGURA 8 - Avaliação do grau de fosforilação em serina do IRS-1 (Ser 307) antes (-) e após (+) o estímulo insulínico no músculo gastrocnêmio (A, B), tecido adiposo branco periepídimal (C, D) e fígado (E, F) de ratos-controle (CN) e de ratos com doença periodontal (DP). Em **A**, **C** e **E** autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 μ g). β -actina foi utilizada como controle. Em **B**, **D** e **F**, valores do grau de fosforilação em serina do IRS-1, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média \pm EPM, n=7.

4.11 Avaliação do conteúdo do IR β no músculo esquelético gastrocnêmio, tecido adiposo branco periepídimal e fígado

Não houve diferença no conteúdo celular de IR β entre os grupos em todos os tecidos estudados (Figura 9).

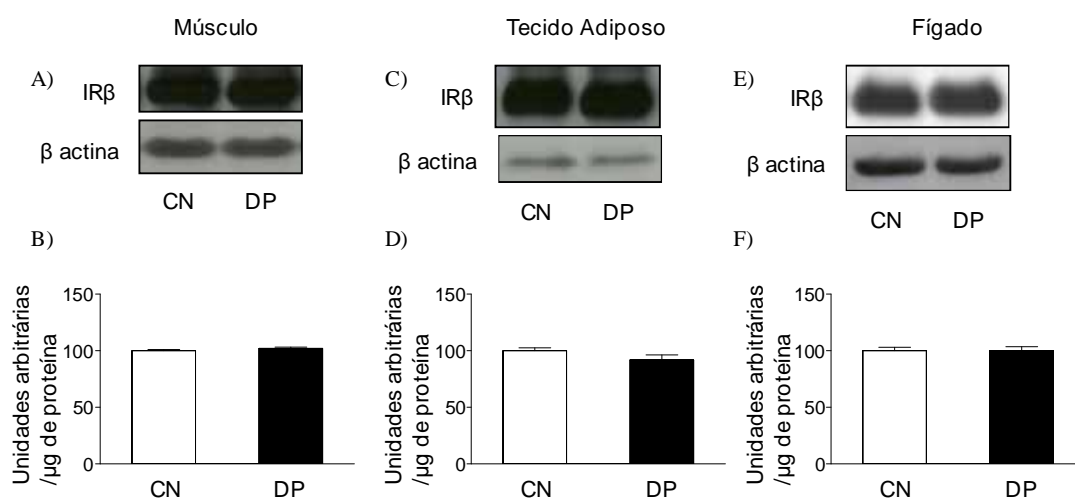


FIGURA 9 - Avaliação do conteúdo da subunidade β do receptor de insulina (IR β) no tecido muscular gastrocnêmio (A, B), adiposo branco periepídimal (C, D) e hepático (E, F) de ratos-controle (CN) e de ratos com doença periodontal (PD). Em **A**, **C** e **E** autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 μ g). Em **B**, **D** e **F**, valores do conteúdo do IR β , expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média \pm EPM, n=6.

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

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

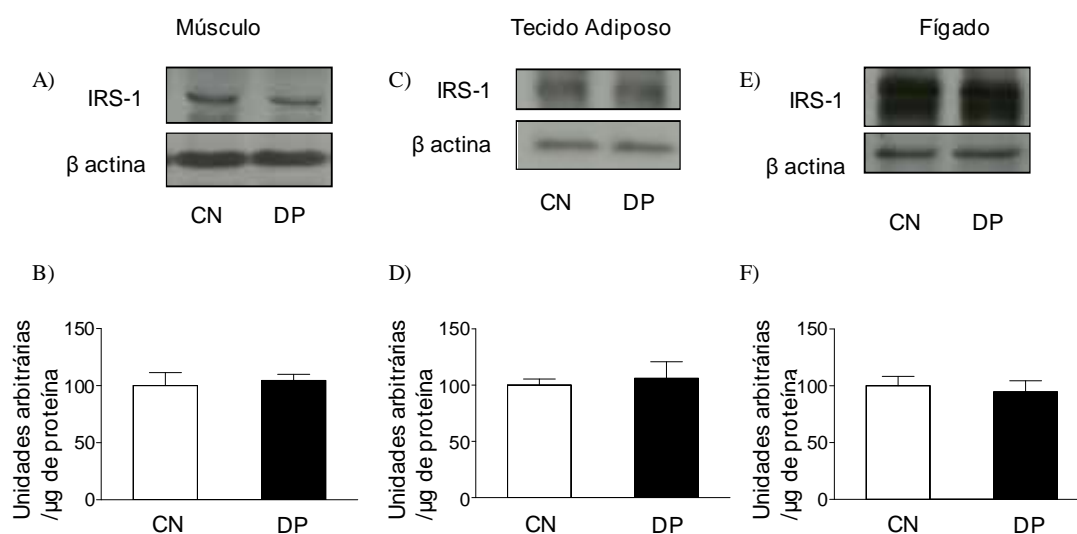


FIGURA 10 - Avaliação do conteúdo do IRS-1 no tecido muscular gastrocnêmio (A, B), adiposo branco periepididimal (C, D) e hepático (E, F) de ratos-controle (CN) e de ratos com doença periodontal (PD). Em **A**, **C** e **E** autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 μg). Em **B**, **D** e **F**, valores do conteúdo do IRS-1, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média ± EPM, n=6.

5 DISCUSSÃO

A literatura mostra uma associação bidirecional entre periodontite e diabetes mellitus (DM), pois o DM agrava a condição periodontal e a periodontite afeta negativamente o controle glicêmico, aumentando o risco de complicações no paciente diabético.⁵⁷

O presente estudo utilizou o modelo de doença periodontal induzida por ligadura em ratos. As imagens radiográficas e histológicas (Figura 2) e as respectivas medidas da perda óssea (Tabela 1) demonstraram que a indução desta doença foi efetiva. Existem modelos de indução de doença periodontal nos quais, além da realização da ligadura, realiza-se a inoculação de *Porphyromonas gingivalis*. Um estudo recente demonstrou que este modelo de indução com inoculação bacteriana também é efetivo, contudo, produz menor perda óssea se comparado ao modelo no qual se insere apenas a ligadura. E esta diferença na perda óssea entre os modelos foi observada em todos os tempos estudados, ou seja, aos 15, 21 e 30 dias após a indução da DP.⁸⁹

Alguns estudos mostram que pessoas com doença periodontal moderada e severa apresentam concentrações elevadas de glicemia quando comparadas aos indivíduos com saúde periodontal adequada.^{66, 90} Entretanto, o presente não demonstrou aumento na glicemia em jejum nos ratos DP em relação aos ratos CN (Tabela 3). Além disso, os ratos DP não apresentaram alterações nas concentrações plasmáticas de frutossamina que pode ser usada para mensurar as concentrações plasmáticas de proteínas glicadas que refletem o controle glicêmico durante um período de 2-3 semanas.⁹¹ Estes dados corroboram estudos que também não mostram aumento na glicemia em pessoas⁹², ratos⁸⁴ ou camundongos⁹³ com doença periodontal em relação aos controles saudáveis. Estudos de Pontes Andersen et al.⁸⁴ e Watanabe et al.,⁹³ que avaliaram a glicemia de ratos Wistar após 60 dias da indução da periodontite e de camundongos após 70 dias da indução da DP, respectivamente, também não observaram alteração na glicemia. Mostrando que o aumento no tempo de indução da doença nestes animais não alterou o parâmetro glicêmico.

A doença periodontal também é associada à redução na sensibilidade à insulina em pessoas não diabéticas com idade entre 30 e 49 anos. Entretanto, esta associação não é observada entre pessoas mais velhas.⁹⁴ Os resultados do presente estudo demonstraram que a sensibilidade à insulina, medida pela taxa de decaimento de glicose (Kitt), foi reduzida nos ratos DP em relação aos ratos CN (Figura 5). Sabe-se que quanto menor o valor do Kitt, maior a resistência à insulina, porque quando o valor do Kitt é baixo, significa que a sensibilidade das células à insulina está prejudicada. Como consequência, a taxa de decaimento de glicose após a injeção de insulina é baixa.

O efeito sistêmico da doença periodontal em ratos é reforçado por estudos que demonstram que ratos diabéticos com doença periodontal são mais intolerantes à glicose do que os ratos diabéticos sem periodontite; além disso, a doença periodontal é associada ao aumento de ácidos graxos livres (AGL) em ratos não diabéticos.⁸⁴

Gorman et al.⁹⁵ associaram a obesidade e sobrepeso com maior risco para progressão da DP. Por outro lado, em nossos estudos não se observou diferença no peso corpóreo (Figura 3), na ingestão alimentar (Figura 4), no índice de Lee e nos pesos dos tecidos adiposos (periepídimo e retroperitoneal) e muscular (gastrocnêmio) (Tabela 2) entre os dois grupos estudados (CN e DP).

As alterações lipídicas associadas à obesidade são semelhantes às aquelas observadas em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 ou com resistência à insulina.⁹⁶ Alguns estudos mostram que pessoas com DP apresentam aumento nas concentrações plasmáticas de colesterol total,⁹⁰ triglicérides,^{90, 97} LDL-C⁹⁰ e redução de HDL-C.^{97, 98} A redução de HDL-C tem implicações metabólicas importantes, pois aumenta o risco de desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2.⁹⁹ A literatura demonstra que o tratamento periodontal aumenta as concentrações séricas de HDL-C.¹⁰⁰

Por outro lado, outros estudos apontam que o tratamento periodontal não altera as concentrações séricas de colesterol total, triglicérides, LDL-C¹⁰⁰⁻¹⁰² e HDL-C.^{101, 102} Além disso, Machado et. al.⁹² concluíram que a doença periodontal (em humanos), independente da intensidade, não tem relação com a lipidemia, pois pacientes com DP não apresentaram alterações nas concentrações plasmáticas de

colesterol total, triglicérides, LDL-C e HDL-C quando comparados com indivíduos saudáveis. Os dados do presente estudo corroboram estes trabalhos, pois os ratos com DP não demonstraram alteração nas concentrações plasmáticas de colesterol total, triglicérides, HDL-C, LDL-C, VLDL-C comparativamente aos animais CN (Tabela 4).

As discordâncias observadas entre os estudos que relacionam doença periodontal e hiperlipidemia, em humanos, podem ocorrer devido ao grande número de variáveis envolvidas, tais como hábitos alimentares, atividades físicas, condição sócio-econômica entre outras.⁹² O modelo experimental utilizado neste estudo tem a vantagem de eliminar estas variáveis por ser realizado em animais.

Adicionalmente, como a DP foi induzida em apenas dois sítios, esta doença pode ser considerada menos generalizada do que a observada na maioria dos estudos realizados em humanos. Diante disso, pode-se aventar que a ausência de dislipidemia no grupo DP pode ser devida a uma menor severidade da doença periodontal.

Apesar do presente estudo não ter encontrado dislipidemias em ratos com DP, sabe-se que pessoas com diabetes mellitus tipo 2, devido à resistência à insulina, comumente apresentam dislipidemia, caracterizada pela elevação sérica de LDL-C e triglicérides apresentando também, menores concentrações plasmáticas de HDL-C.¹⁰³ A resistência à insulina tem um papel central na patogênese da dislipidemia no diabético, ocorrendo aumento na liberação de ácidos graxos livres em células adiposas resistentes à insulina.

Segundo Cesaretti e Kolmann Junior,¹⁰⁴ resistência à insulina é uma condição genética ou adquirida, na qual concentrações fisiológicas de insulina provocam uma resposta biológica subnormal, como por exemplo, diminuição na captação de glicose pelas células, especialmente nas musculares e adiposas. Em consequência da menor captação de glicose, torna-se necessária uma maior produção de insulina pelo pâncreas, para a manutenção da glicemia normal, aumentando-se, desta forma, as concentrações circulantes de insulina e, portanto, a presença de resistência ao hormônio se faz acompanhada de hiperinsulinemia.

Geralmente, o termo resistência à insulina é empregado tendo-se como referência o controle glicêmico, refletindo um efeito inadequado da insulina na

homeostase da glicose. Além do mais, a insulina tem ações pleiotrópicas, modulando diversas funções celulares, como por exemplo, o metabolismo de lipídeos e proteínas, o transporte de íons e aminoácidos, a proliferação e o ciclo celular, a diferenciação celular, apoptose e a síntese de óxido nítrico (NO). Logo, quando se considera situações de resistência à insulina, não se deve levar em conta apenas o metabolismo de glicose, mas sim toda a gama de ações metabólicas e de crescimento promovido pela insulina. Deve-se considerar, também, que a resistência à insulina pode afetar estas funções de forma heterogênea.¹⁰⁵

A resistência insulínica é extremamente comum e ocorre tanto em estados de doenças (como o diabetes tipo 2, obesidade, hipertensão, doença ovariana policística e uma variedade de síndromes genéticas) quanto em condições fisiológicas (como puberdade e gestação).¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ A resistência à insulina também está presente em muitos estados de estresse, em associação com a infecção e secundária ao tratamento com uma variedade de drogas, particularmente os glicocorticóides.¹⁰⁸

Segundo Kahn et al.,¹⁰⁸ sob perspectiva molecular, a resistência insulínica pode ocorrer em vários níveis: 1) pré-receptor: é rara hoje em dia, mas antigamente era exemplificado por pacientes com altos níveis de anticorpos circulantes contra insulina, que bloqueavam a ligação do ligante a seu receptor; 2) receptor: pode resultar de alterações genéticas na expressão do receptor ou sua estrutura, como alterações na atividade do receptor devido à fosforilação em serina; 3) pós-receptor: pode ocorrer em quase todos os locais, em uma das vias comuns ou ramificadas da sinalização insulínica.

Nos estados mais comuns de resistência à insulina, parece haver defeitos em vários níveis. Por exemplo, no diabetes tipo 2 há redução na concentração do receptor, na atividade quinase do receptor, na concentração e fosforilação de IRS-1 e IRS-2, na atividade da PI3K e na translocação do transportador de glicose, bem como em defeitos na atividade das enzimas intracelulares.¹⁰⁸⁻¹¹⁰

Normalmente, o sinal insulínico está alterado em modelos de resistência à insulina.¹¹⁰⁻¹¹² O presente estudo, no intuito de averiguar tal relação, realizou a avaliação do sinal insulínico. Os resultados demonstraram que a doença periodontal alterou a etapa inicial do sinal insulínico em ratos, reduzindo o grau de fosforilação

em tirosina da pp185 (IRS-1/IRS-2), após o estímulo insulínico, no músculo gastrocnêmico e no tecido adiposo branco periepídimal (Figura 7).

No fígado não se observou alteração no grau de fosforilação em tirosina da pp185 (Figura 7). Esses resultados estão de acordo com Chiba et al.^{111, 113} que, em modelo experimental envolvendo flúor, verificaram redução no grau de fosforilação da pp185 no músculo e no tecido adiposo, mas não no fígado. Este resultado pode explicar a ausência de alteração na glicemia nos ratos DP mesmo havendo redução no grau de fosforilação da pp185 no tecido muscular e adiposo. Nesse sentido, Cho et al.¹¹⁴ sugerem que o fígado pode compensar a resistência à insulina encontrada no tecido adiposo e muscular para prevenir a hiperglicemia.

Sabe-se que após a estimulação insulínica, o receptor de insulina fosforila diretamente as proteínas IRSs. A fosforilação em tirosina destas proteínas cria sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios com homologia a SRC 2 (SH2). As proteínas SH2 que se ligam às proteínas IRS fosforiladas são divididas em duas categorias principais. As mais bem estudadas são as moléculas adaptadoras, como a subunidade regulatória da PI3K ou a molécula GrB2, que se associa com a SOS para ativar a via da proteína quinase ativada por Ras-mitógeno (MAP).^{38, 115-117} A outra categoria importante de proteínas que se ligam às proteínas IRS são as enzimas, como a fosfotirosina fosfatase SHP2^{118, 119} e as tirosinas quinases citoplasmáticas, como Fyn tirosina kinase.¹⁰⁸

As funções fisiológicas do IRS-1/2 foram estabelecidas por meio da produção de camundongos sem os genes que codificam o IRS-1 e IRS-2 (camundongos *knockout* para IRS-1 e IRS-2). O camundongo que não expressa IRS-1 apresenta retardo de crescimento, resistência à insulina, primariamente no músculo e na gordura, mas não é hiperglicêmico.^{21, 120} Foi demonstrado que o IRS-2 poderia compensar parcialmente a ausência de IRS-1, o que explicaria o fenótipo de resistência à insulina sem hiperglicemia do camundongo *knockout* de IRS-1. O camundongo que não expressa o IRS-2 foi gerado¹²¹ e também apresenta resistência à insulina, mas primariamente no fígado, e hiperglicemia acentuada devido a diversas anormalidades na ação da insulina nos tecidos periféricos e à falência da atividade secretória das células β , acompanhada de redução significativa da massa de células β pancreáticas.^{121, 122} Em contraste, camundongos *knockout*

para o IRS-3 têm crescimento e metabolismos normais, enquanto os camundongos *knockout* para o IRS-4 exibem anormalidades mínimas na tolerância à insulina.^{123, 124}

A diminuição da fosforilação em tirosina no tecido adiposo e muscular observada na Figura 7, ao contrário do esperado, não foi decorrente do aumento do grau de fosforilação em serina do IRS-1 nestes tecidos (Figura 8). Em vista disso, pode-se aventar que a diminuição da fosforilação em tirosina seja decorrente da ação de outras proteínas, tais como glicoproteína-1 de membrana plasmática celular (PC-1),¹²⁵ proteína ligada a receptor de fator de crescimento 10 (Grb10) e 14 (Grb14),^{126, 127} supressores da sinalização de citocinas (SOCS1 e SOCS3)¹²⁸ e proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B),¹²⁹ que podem diminuir a função do receptor de insulina, bloqueando sua interação com proteínas IRS ou modificando sua atividade quinase.

Frittitta et al.¹³⁰ observaram que o PC-1 liga-se ao IR tanto *in vivo* como *in vitro*, e subseqüentemente, a função do receptor é inibida. Por conseguinte, é possível que o PC-1 interaja com o IR e altere a sua capacidade de ativar a subunidade β .

Smith et al.¹³¹ demonstraram que camundongos deficientes para Grb10 exibem aumento na fosforilação em tirosina de IRS-1 induzida por insulina no tecido adiposo branco e muscular. Camundongos deficientes para Grb14 exibem aumento no sinal insulínico por meio da via IRS-1 e Akt no fígado e músculo esquelético.¹²⁷ Além disso, foi demonstrado na literatura que ambos os modelos de camundongos *knockout* para Grb10 e Grb14 apresentam melhora na homeostase da glicose corpórea.^{127, 131}

As proteínas SOCS têm sido encontradas em maior atividade em situações de resistência insulínica, como na obesidade, podendo participar da fisiopatologia do diabetes mellitus tipo 2.¹³² Ademais, sabe-se 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-3.¹³³ Emanuelli et al.¹³² demonstraram que a SOCS-3 em fibroblastos diminui a fosforilação em tirosina do IRS-1 induzida por insulina e a sua associação com p85, uma subunidade reguladora de PI3K. Este mecanismo aponta para uma função da SOCS-3 na resistência à insulina. Esses autores demonstraram ainda que o TNF- α induziu aumento na expressão de SOCS-3, no

fígado, músculo e tecido adiposo. A inflamação aumenta a expressão hepática de SOCS, especialmente SOCS-1 e SOCS-3, e estas proteínas podem antagonizar sinalização do IR no fígado, podendo haver prejuízo na fosforilação em tirosina de IRS.¹³⁴

Conforme citado anteriormente, a PTP1B, também atua como um regulador negativo do sinal insulínico¹²⁹ através da desfosforilação de resíduos de tirosina do IR e IRS-1.^{135, 136} 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 , IL-6) são encontradas.^{137, 138} A super expressão da PTP1B está relacionada à redução da captação de glicose no músculo¹³⁸ e a ausência de PTP1B aumenta a sensibilidade à insulina e restaura a ação desta em miócitos pré-tratados com TNF- α .¹³⁹

Tanto a doença periodontal quanto o aumento de tecido adiposo liberam TNF- α . Hotamisligil et al.^{69, 140} demonstraram que o aumento de tecido adiposo tanto em roedores como em humanos obesos induz um aumento na produção de TNF- α nos adipócitos.

O tecido adiposo é um órgão dinâmico que secreta várias citocinas denominadas adipocinas. Estas adipocinas, em sua grande maioria, estão relacionadas, direta ou indiretamente, a processos que contribuem na aterosclerose, hipertensão arterial, resistência à insulina, DM2 e dislipidemias. Dentre elas, destacam-se o TNF- α , IL-6, resistina e a adiponectina. A adiponectina, ao contrário das demais adipocinas, age como fator protetor para doenças cardiovasculares e aumenta a sensibilidade à insulina.¹⁴¹

O tratamento de hepatócitos humanos com resistina em concentrações semelhantes às encontradas em humanos obesos ocasiona redução da expressão/ fosforilação do IRS-2 e Akt.¹⁴²

Células do músculo esquelético tratadas com resistina apresentam redução na captação de glicose e síntese de glicogênio basal e após o estímulo com insulina. Este efeito é observado de maneira aguda (2h de tratamento) ou crônica (24h de tratamento). Além disso, o tratamento crônico de células musculares com resistina diminui a translocação de GLUT4, mas não altera o teor total de GLUT1 ou GLUT4.¹⁴³

A resistina também reduz o conteúdo e o grau de fosforilação em tirosina do IRS-1, mas não exerce efeito sobre o conteúdo ou função do receptor de insulina e sobre o conteúdo de IRS-2. Esta citocina atua sobre o conteúdo e função da Akt, reduzindo a fosforilação da Akt e o conteúdo de Akt1. Estas observações ressaltam o papel potencial da resistina na fisiopatologia do diabetes tipo 2 na obesidade.¹⁴³

Saito et al.¹⁴⁴ e Furugen et al.¹⁴⁵ demonstraram um aumento nas concentrações séricas de resistina em pacientes com doença periodontal. Contudo, os dados do presente estudo não demonstraram alterações nas concentrações plasmáticas de resistina nos ratos com DP em relação aos ratos CN. Estes resultados corroboram os dados de Davies et al.¹⁴⁶ que também não demonstraram alterações séricas de resistina em pacientes com periodontite agressiva.

Nieto-Vazquez et al.⁸¹ demonstraram que o IL-6 produz um efeito duplo na sensibilidade à insulina no músculo esquelético, pois produz um efeito positivo na captação de glicose em curto prazo e negativo após exposição crônica. 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; além disso, o efeito inibitório observado da IL-6 crônica foi dose dependente. Os mecanismos pelos quais o tratamento crônico com IL-6 em miotúbulos produz resistência à insulina envolvem ativação da JNK1/2, expressão da SOCS3, e ativação da PTP1B. Esse tratamento crônico com essa citocina em miotúbulos também induz a fosforilação em serina do IRS-1, prejudica a fosforilação em tirosina induzida pela insulina do IRS-1 e IRS-2, e reduz a fosforilação em serina da Akt.⁸¹

A expressão de GLUT4 ou GLUT1 nos miotúbulos não foi modificada pelo tratamento crônico com IL-6. Tanto a insulina quanto o IL-6 individualmente produziram translocação de GLUT4 para a membrana plasmática, mas quando as células foram pré-tratadas com IL-6 por 24h, a insulina não promoveu a translocação do GLUT4 para a membrana plasmática.⁸¹

Em 2003, Rotter et al.¹⁴⁷ observaram que IL-6 (dependendo do tempo de incubação) pode alterar a expressão de proteínas envolvidas na sinalização insulínica e na captação de glicose no tecido adiposo, pois constataram que células adiposas expostas a IL-6 de forma aguda (30 min) não apresentam alteração tanto

na fosforilação em serina e tirosina do IRS-1 como na fosforilação em tirosina do receptor de insulina. Por outro lado, esses autores demonstraram que o tratamento crônico (24h) de células adiposas com IL-6 reduz a expressão de genes e da proteína IRS-1, além de reduzir a expressão gênica de GLUT4 e a captação de glicose estimulada pela insulina; e não observaram alteração nos conteúdos de RNAm de IRS-2 e de sua proteína.¹⁴⁷ Entretanto, os estudos de Stouthard et al.¹⁴⁸ demonstraram que a incubação tanto aguda (2 a 5h) como crônica (24h) de adipócitos (3T3-L1) com IL-6 (concentrações semelhantes às encontradas na septicemia) aumenta o transporte de glicose estimulado pela insulina nestas células.

Além de atuar no sinal insulínico, o IL-6, *in vitro*, pode induzir morte de células beta pancreáticas quando são expostas a esta citocina por 48h.¹⁴⁹

Outra citocina que altera a captação de glicose é o TNF- α . Sabe-se que esta citocina ativa a via AMPK/AS160 em adipócitos humanos, uma cascata de sinalização que envolve a translocação de GLUT4. Adipócitos humanos tratados com TNF- α mostram uma alta captação de glicose basal. Esta ativação é dependente da ativação de AMPK, contudo, na presença de insulina os adipócitos apresentam sinalização insulínica prejudicada e não aumentam a captação de glicose.¹⁵⁰

Baixas concentrações de TNF- α reduzem a atividade tirosina quinase do receptor de insulina. Altas concentrações desta citocina podem reduzir a expressão do receptor de insulina, IRS-1 e GLUT4 no tecido adiposo.¹⁵¹ A incubação de adipócitos por 24h com TNF- α reduz a expressão gênica de GLUT4.¹⁴⁷

O TNF- α atua na via da sinalização insulínica ativando a SK6 (p70S6k- uma serina quinase) e esta fosforila diretamente o IRS-1 em múltiplos resíduos de serina para inibir a sinalização insulínica.¹⁵² Sabe-se que a fosforilação em tirosina de IRS-1 e de IRS-2 ocasiona aumento do sinal insulínico; por outro lado a fosforilação em serina destes substratos atenua a transmissão deste sinal por diminuir a capacidade de fosforilação do receptor de insulina e de seus substratos em tirosina, após estímulo com insulina.⁷⁰

A periodontite crônica está associada à elevação sérica das concentrações de TNF- α em ratos⁶² e em humanos sistemicamente saudáveis,⁵⁹ assim como em humanos com DM2 nos quais se observa que quanto maior a severidade da doença

periodontal, maiores as concentrações plasmáticas de TNF- α encontradas.⁶¹ Além do aumento de TNF- α , alguns estudos demonstram que a DP está associada à elevação das concentrações séricas de IL-6^{98, 153} em humanos. Com relação ao TNF- α , os resultados do presente trabalho corroboram estes estudos pois constatou-se aumento nas concentrações plasmáticas de TNF- α em ratos DP (Tabela 5).

Conforme descrito anteriormente, em decorrência do aumento de TNF- α nesse grupo DP, era esperado que ele apresentasse também aumento no grau de fosforilação em serina do IRS-1. Entretanto, no grupo DP não se observou alteração nesta fosforilação nos tecidos adiposo, muscular e hepático em comparação ao grupo CN (Figura 8). Desta maneira, mais estudos são necessários para a fim de se verificar quais mecanismos estão envolvidos na redução do grau de fosforilação em tirosina em ratos DP identificado neste estudo.

Estudos mostram que o tratamento periodontal em pacientes com tolerância à glicose prejudicada aumenta as concentrações séricas de adiponectina e reduz as concentrações de CRP (proteína C reativa), TNF- α e IL-6.¹⁵⁴ Do mesmo modo, o tratamento periodontal em pacientes com DM2 também reduz as concentrações plasmáticas de TNF- α ^{63, 155, 156}, IL-6^{153, 156, 157} e de CRP^{154, 156}, assim como reduz a glicemia e insulinemia em jejum e o índice de HOMA-IR, e aumenta as concentrações plasmáticas de adiponectina.¹⁵⁶

O efeito sistêmico do tratamento periodontal também é observado em pacientes não diabéticos, pois, o tratamento periodontal em pessoas sistemicamente saudáveis também reduz as concentrações séricas de TNF- α ⁶³ e IL-6.¹⁵⁸

Contudo, outros estudos demonstram que a doença periodontal em pessoas sistemicamente saudáveis não altera as concentrações séricas de TNF- α ,^{98, 159} IL-1 β ^{97, 159} e IL-6.¹⁵⁹ O presente estudo também observou (Tabela 5) inalteração nas concentração de IL-6 entre os grupos estudados.

Assim, pode-se observar que há divergências na literatura em relação ao aumento das concentrações plasmáticas de citocinas na doença periodontal. Esta divergência de resultados apresentados pode ser, entre outros fatores, devido ao tipo de bactéria predominante no biofilme dental. Recentemente, Andrukhov et al.⁶⁰ demonstraram que o aumento das concentrações séricas de TNF- α em pessoas com doença periodontal está associado ao aumento da concentração de

Porphyromonas gingivalis no biofilme dental. Adicionalmente, o aumento da concentração de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (previamente chamado *Actinobacillus actinomycetemcomitans*) no biofilme está associado à elevação das concentrações séricas de IFN- γ (Interferon- γ).

Conforme descrito anteriormente, os TLRs possuem papel chave na periodontite, uma vez que esta doença é desencadeada por microrganismos gram negativos, tais como *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, que apresentam LPS em suas paredes, e que são reconhecidos pelos TLRs.¹⁶⁰

A ativação de TLRs pode levar à degradação do inibidor kappa B (I κ B) e isto promove a translocação nuclear de fator de transcrição nuclear kB (NF-kB) e subsequente produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas.⁴⁷ Além disso, os TLRs podem desempenhar um papel na cascata inflamatória associada ao desenvolvimento de diabetes. Um aumento da expressão de TLR2 e TLR4 foi detectado em monócitos de pacientes com DM1 e no tecido adiposo de pacientes com DM2.¹⁶¹ Kim et al.¹⁶² avaliaram a concentração de citocinas e expressão de TLR2 e TLR4 no músculo esquelético de pessoas não obesas com tolerância à glicose prejudicada. Verificaram-se níveis elevados de TNF- α , IL-6 e TLR4, mas nenhuma alteração foi notada na expressão de TLR2. Um estudo de recente mostra que pessoas que tiveram perda de peso, apresentaram redução da expressão de RNAm para TLR4 e isso foi associado ao aumento da sensibilidade à insulina.¹⁶³

Um estudo realizado por Radin et al.¹⁶⁴ demonstrou que a hiperlipidemia aguda induziu resistência à insulina no músculo esquelético, e que a deleção do TLR4 promoveu proteção contra este efeito. Estes autores constataram que os ácidos graxos ativaram a via do NF-kB no músculo esquelético e nos miotúbulos e verificaram que este efeito foi bloqueado pela inibição do TLR4. Além disso, a inibição da via do NF-kB em miotúbulos com expressão reduzida de TLR4 também protege contra a resistência à insulina induzida por lipídios, sugerindo um mecanismo pelo qual a redução da atividade do TLR4 confere um efeito benéfico na ação da insulina.¹⁶⁴

Com base nos achados anteriormente citados, podemos inferir que o aumento de TNF- α em ratos DP pode ter ocasionado resistência à insulina e diminuição da

fosforilação em tirosina da pp185, porém esta alteração não é decorrente de um aumento em fosforilação em serina de IRS-1 ou presença de dislipidemias. Entretanto, convém salientar que outras vias que envolvam as proteínas tais como JNK, PTP1B, SOCS, PC-1, Grb10 e Grb14, podem estar relacionadas à resistência à insulina observada neste estudo.

O presente trabalho reforça a importância da prevenção da doença periodontal no intuito de prevenir a resistência à insulina e as alterações sistêmicas que podem ser geradas devido a este estado metabólico.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que a doença periodontal em ratos:

- não alterou a ingestão alimentar, peso corpóreo, índice de Lee e pesos dos tecidos adiposos brancos (periepídimal e retroperitoneal) e muscular esquelético (gastrocnêmio);
- não alterou as concentrações plasmáticas de glicose, frutossamina, colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL, colesterol VLDL e triglicérides;
- reduziu a sensibilidade à insulina;
- promoveu aumento nas concentrações plasmáticas de TNF- α , mas não alterou as concentrações plasmáticas de IL-6 e resistina;
- reduziu o grau de fosforilação em tirosina da pp185 (IRS-1/IRS-2) no tecido adiposo branco e muscular, após o estímulo insulínico, porém não alterou a fosforilação deste substrato em tecido hepático;
- não promoveu alteração no grau de fosforilação em serina do IRS-1 e nos conteúdos de IR β e IRS-1 em tecido adiposo branco, muscular e hepático.

A partir desses resultados, podemos inferir que o aumento de TNF- α em ratos DP pode ter ocasionado resistência à insulina e diminuição do sinal insulínico, entretanto esta alteração não é decorrente de um aumento em fosforilação em serina de IRS-1 ou presença de dislipidemias.

REFERÊNCIAS

1. Iacopino AM, Cutler CW. Pathophysiological relationships between periodontitis and systemic disease: recent concepts involving serum lipids. *J Periodontol.* 2000;71(8):1375-84.
2. Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011;94(3):311-21.
3. Smyth S, Heron A. Diabetes and obesity: the twin epidemics. *Nat Med.* 2006;12(1):75-80.
4. Georg AE, Duncan BB, Toscano CM, Schmidt MI, Mengue S, Duarte C, et al. [Economic analysis of a screening program for diabetes mellitus in Brazil]. *Rev Saude Publica.* 2005;39(3):452-60. Português.
5. Hogan P, Dall T, Nikolov P, American Diabetes Association. Economic costs of diabetes in the US in 2002. *Diabetes Care.* 2003;26(3):917-32.
6. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2007;30 Suppl 1:S42-7.
7. Borggreve SE, De Vries R, Dullaart RP. 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.* 2003;33(12):1051-69.
8. Huang A, Yang YM, Feher A, Bagi Z, Kaley G, Sun D. Exacerbation of endothelial dysfunction during the progression of diabetes: role of oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* In press 2012.
9. Guerci B, Kearney-Schwartz A, Böhme P, Zannad F, Drouin P. Endothelial dysfunction and type 2 diabetes. Part 1: physiology and methods for exploring the endothelial function. *Diabetes Metab.* 2001;27(4 Pt 1):425-34.

10. Guerci B, Böhme P, Kearney-Schwartz A, Zannad F, Drouin P. Endothelial dysfunction and type 2 diabetes. Part 2: altered endothelial function and the effects of treatments in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab.* 2001;27(4 Pt 1):436-47.
11. Jensen T, Deckert T. Diabetic retinopathy, nephropathy and neuropathy. Generalized vascular damage in insulin-dependent diabetic patients. *Horm Metab Res Suppl.* 1992;26:68-70.
12. Peppas M, Raptis SA. Glycooxidation and wound healing in diabetes: an interesting relationship. *Curr Diabetes Rev.* 2011;7(6):416-25.
13. Loe H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 1993;16(1):329-34.
14. Patterson JE, Andriole VT. Bacterial urinary tract infections in diabetes. *Infect Dis Clin North Am.* 1997;11(3):735-50.
15. Kasuga M, Hedou JA, Yamada KM, Kahn CR. The structure of insulin receptor and its subunits. Evidence for multiple nonreduced forms and a 210,000 possible proreceptor. *J Biol Chem.* 1982;257(17):10392-9.
16. Kasuga M, Karlsson FA, Kahn CR. Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. *Science.* 1982;215(4529):185-7.
17. Kasuga M, Zick Y, Blithe DL, Crettaz M, Kahn CR. Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin receptor in a cell-free system. *Nature.* 1982;298(5875):667-9.
18. Ebina Y, Araki E, Taira M, Shimada F, Mori M, Craik CS, et al. Replacement of lysine residue 1030 in the putative ATP-binding region of the insulin receptor abolishes insulin- and antibody-stimulated glucose uptake and receptor kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(3):704-8.
19. White MF, Takayama S, Kahn CR. Differences in the sites of phosphorylation of the insulin receptor in vivo and in vitro. *J Biol Chem.* 1985;260(16):9470-8.

20. Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, et al. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature*. 1991;352(6330):73-7.
21. Araki E, Lipes MA, Patti ME, Brüning JC, Haag B, Johnson RS, et al. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature*. 1994;372(6502):186-90.
22. Sun X, Wang L, Zhang Y, Yenush L, Myers MJ, Glasheen E, et al. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature*. 1995;377(6545):173-7.
23. Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hayakawa T, et al. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature*. 1994;372(6502):182-6.
24. Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol*. 1997;7(4):261-9.
25. Bellacosa A, Chan TO, Ahmed NN, Datta K, Malstrom S, Stokoe D, et al. Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene*. 1998;17(3):313-25.
26. Kohn AD, Takeuchi F, Roth RA. Akt, a pleckstrin homology domain containing kinase, is activated primarily by phosphorylation. *J Biol Chem*. 1996;271(36):21920-6.
27. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 1995;378(6559):785-9.
28. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell*. 1997;88(4):435-7.

29. Kitamura T, Kitamura Y, Kuroda S, Hino Y, Ando M, Kotani K, et al. Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt. *Mol Cell Biol.* 1999;19(9):6286-96.
30. Hajdуч E, Alessi DR, Hemmings BA, Hundal HS. 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 kinase 3 in L6 muscle cells. *Diabetes.* 1998;47(7):1006-13.
31. Vanhaesebroeck B, Alessi DR. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J.* 2000;346 Pt 3:561-76.
32. Wang Q, Somwar R, Bilan PJ, Liu Z, Jin J, Woodgett JR, et al. Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myoblasts. *Mol Cell Biol.* 1999;19(6):4008-18.
33. Zhou L, Chen H, Xu P, Cong LN, Sciacchitano S, Li Y, et al. Action of insulin receptor substrate-3 (IRS-3) and IRS-4 to stimulate translocation of GLUT4 in rat adipose cells. *Mol Endocrinol.* 1999;13(3):505-14.
34. Burén J, Liu HX, Lauritz J, Eriksson JW. High glucose and insulin in combination cause insulin receptor substrate-1 and -2 depletion and protein kinase B desensitisation in primary cultured rat adipocytes: possible implications for insulin resistance in type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol.* 2003;148(1):157-67.
35. Carvalheira JB, Zecchin HG, Saad MJA. Vias de sinalização da insulina. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2002;46(4):419-25.
36. Saad MJ, Carvalho CR, Thirone AC, Velloso LA. Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat. *J Biol Chem.* 1996;271(36):22100-4.
37. Saad MJ, Araki E, Miralpeix M, Rothenberg PL, White MF, Kahn CR. Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. *J Clin Invest.* 1992;90(5):1839-49.

38. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001;414(6865):799-806.
39. DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am*. 2004;88(4):787-835, ix.
40. Kahn CR. The Gordon Wilson Lecture. Lessons about the control of glucose homeostasis and the pathogenesis of diabetes from knockout mice. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2003;114:125-48.
41. Papapanou PN. Periodontal diseases: epidemiology. *Ann Periodontol*. 1996;1(1):1-36.
42. Oliver RC, Tervonen T. Diabetes--a risk factor for periodontitis in adults? *J Periodontol*. 1994;65(5 Suppl):530-8.
43. Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Mohanty P, Garg R. Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation*. 2005;111(11):1448-54.
44. Nishimura F, Takahashi K, Kurihara M, Takashiba S, Murayama Y. Periodontal disease as a complication of diabetes mellitus. *Ann Periodontol*. 1998;3(1):20-9.
45. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet*. 2005;366(9499):1809-20.
46. Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*. 2011;34(5):637-50.
47. Tilich M, Arora RR. Modulation of toll-like receptors by insulin. *Am J Ther*. 2011;18(5):e130-7.
48. Beklen A, Hukkanen M, Richardson R, Konttinen YT. Immunohistochemical localization of Toll-like receptors 1-10 in periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*. 2008;23(5):425-31.

49. Kocgozlu L, Elkaim R, Tenenbaum H, Werner S. Variable cell responses to *P. gingivalis* lipopolysaccharide. *J Dent Res*. 2009;88(8):741-5.
50. Wright SD. Toll, a new piece in the puzzle of innate immunity. *J Exp Med*. 1999;189(4):605-9.
51. Akira S. Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem*. 2003;278(40):38105-8.
52. Mayrand D, Holt SC. Biology of asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species. *Microbiol Rev*. 1988;52(1):134-52.
53. Xing Q, de Vos P, Faas MM, Ye Q, Ren Y. LPS promotes pre-osteoclast activity by up-regulating CXCR4 via TLR-4. *J Dent Res*. 2011;90(2):157-62.
54. Iacopino AM. Diabetic periodontitis: possible lipid-induced defect in tissue repair through alteration of macrophage phenotype and function. *Oral Dis*. 1995;1(4):214-29.
55. Lalla E, Lamster IB, Schmidt AM. Enhanced interaction of advanced glycation end products with their cellular receptor RAGE: implications for the pathogenesis of accelerated periodontal disease in diabetes. *Ann Periodontol*. 1998;3(1):13-9.
56. Lalla E, Lamster IB, Feit M, Huang L, Spessot A, Qu W, et al. Blockade of RAGE suppresses periodontitis-associated bone loss in diabetic mice. *J Clin Invest*. 2000;105(8):1117-24.
57. Taylor GW, Borgnakke WS. Periodontal disease: associations with diabetes, glycemic control and complications. *Oral Dis*. 2008;14(3):191-203.
58. Mealey B, Oates T, American Academy of Periodontology. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol*. 2006;77(8):1289-303.
59. Passoja A, Puijola I, Knuutila M, Niemelä O, Karttunen R, Raunio T, et al. Serum levels of interleukin-10 and tumour necrosis factor- α in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2010;37(10):881-7.

60. Andrukhov O, Ulm C, Reischl H, Nguyen PQ, Matejka M, Rausch-Fan X. Serum cytokine levels in periodontitis patients in relation to the bacterial load. *J Periodontol*. 2011;82(6):885-92.
61. Engebretson S, Chertog R, Nichols A, Hey-Hadavi J, Celenti R, Grbic J. Plasma levels of tumour necrosis factor-alpha in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes. *J Clin Periodontol*. 2007;34(1):18-24.
62. Endo Y, Tomofuji T, Ekuni D, Irie K, Azuma T, Tamaki N, et al. Experimental periodontitis induces gene expression of proinflammatory cytokines in liver and white adipose tissues in obesity. *J Periodontol*. 2010;81(4):520-6.
63. Dağ A, Fırat E, Arıkan S, Kadiroğlu A, Kaplan A. The effect of periodontal therapy on serum TNF-alpha and HbA1c levels in type 2 diabetic patients. *Aust Dent J*. 2009;54(1):17-22.
64. Demmer RT, Jacobs DR, 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*. 2008;31(7):1373-9.
65. Tsai C, Hayes C, Taylor GW. Glycemic control of type 2 diabetes and severe periodontal disease in the US adult population. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2002;30(3):182-92.
66. Katz J. Elevated blood glucose levels in patients with severe periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2001;28(7):710-2.
67. 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*. 2001;2(4):18-25.
68. Taleghani F, Shamaei M, Shamaei M. Association between chronic periodontitis and serum lipid levels. *Acta Med Iran*. 2010;48(1):47-50.

69. Hotamisligil G, Shargill N, Spiegelman B. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993;259(5091):87-91.
70. Hotamisligil G, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White M, Spiegelman B. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science*. 1996;271(5249):665-8.
71. Fernández-Real JM, Broch M, Ricart W, Casamitjana R, Gutierrez C, Vendrell J, et al. Plasma levels of the soluble fraction of tumor necrosis factor receptor 2 and insulin resistance. *Diabetes*. 1998;47(11):1757-62.
72. Feinstein R, Kanety H, Papa M, Lunenfeld B, Karasik A. Tumor necrosis factor- α suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. *J Biol Chem*. 1993;268(35):26055-8.
73. Hotamisligil G, Spiegelman B. Tumor necrosis factor α : a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes*. 1994;43(11):1271-8.
74. Kroder G, Bossenmaier B, Kellerer M, Capp E, Stoyanov B, Mühlhöfer A, et al. Tumor necrosis factor- α - and hyperglycemia-induced insulin resistance. Evidence for different mechanisms and different effects on insulin signaling. *J Clin Invest*. 1996;97(6):1471-7.
75. Kanety H, Feinstein R, Papa MZ, Hemi R, Karasik A. Tumor necrosis factor α -induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). Possible mechanism for suppression of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1. *J Biol Chem*. 1995;270(40):23780-4.
76. Cheung A, Ree D, Kolls J, Fuselier J, Coy D, Bryer-Ash M. An in vivo model for elucidation of the mechanism of tumor necrosis factor- α (TNF- α)-induced insulin resistance: evidence for differential regulation of insulin signaling by TNF- α . *Endocrinology*. 1998;139(12):4928-35.

77. Uysal K, Wiesbrock S, Marino M, Hotamisligil G. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature*. 1997;389(6651):610-4.
78. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2007;117(1):175-84.
79. Cintra DE, Pauli JR, Araújo EP, Moraes JC, de Souza CT, Milanski M, et al. Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. *J Hepatol*. 2008;48(4):628-37.
80. Jager J, Grémeaux T, Cormont M, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. Interleukin-1 β -induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology*. 2007;148(1):241-51.
81. 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*. 2008;57(12):3211-21.
82. Holzhausen M, Rossa Júnior C, Marcantonio Júnior E, Nassar PO, Spolidório DM, Spolidório LC. Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol*. 2002;73(9):1030-6.
83. Bernardis LL, Patterson BD. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J Endocrinol*. 1968;40(4):527-8.
84. Pontes Andersen CC, Buschard K, Flyvbjerg A, Stoltze K, Holmstrup P. Periodontitis deteriorates metabolic control in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *J Periodontol*. 2006;77(3):350-6.
85. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972;18(6):499-502.

86. Bonora E, Moghetti P, Zancanaro C, Cigolini M, Querena M, Cacciatori V, et al. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *J Clin Endocrinol Metab.* 1989;68(2):374-8.
87. Garfin DE. One-dimensional gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* 1990;182:425-41.
88. Kruger NJ, Hammond JB. Immunodetection of proteins on "western" blots using (125)i-labeled protein a. *Methods Mol Biol.* 1988;3:409-17.
89. Meulman T, Peruzzo DC, Stipp RN, Gonçalves PF, Sallum EA, Casati MZ, et al. Impact of Porphyromonas gingivalis inoculation on ligature-induced alveolar bone loss. A pilot study in rats. *J Periodontal Res.* 2011;46(5):629-36.
90. 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.* 2000;27(8):537-41.
91. Post EM, Moore JD, Ihrke J, Aisenberg J. Fructosamine levels demonstrate improved glycemic control for some children attending a diabetes summer camp. *Pediatr Diabetes.* 2000;1(4):204-8.
92. Machado AC, Quirino MR, Nascimento LF. Relation between chronic periodontal disease and plasmatic levels of triglycerides, total cholesterol and fractions. *Braz Oral Res.* 2005;19(4):284-9.
93. Watanabe K, Iizuka T, Adeleke A, Pham L, Shlimon AE, Yasin M, et al. Involvement of toll-like receptor 4 in alveolar bone loss and glucose homeostasis in experimental periodontitis. *J Periodontal Res.* 2011;46(1):21-30.
94. Timonen P, Suominen-Taipale L, Jula A, Niskanen M, Knuuttila M, Ylöstalo P. Insulin sensitivity and periodontal infection in a non-diabetic, non-smoking adult population. *J Clin Periodontol.* 2011;38(1):17-24.

95. Gorman A, Kaye EK, Apovian C, Fung TT, Nunn M, Garcia RI. Overweight and obesity predict time to periodontal disease progression in men. *J Clin Periodontol*. 2012;39(2):107-14.
96. Taskinen MR. Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice. *Diabetologia*. 2003;46(6):733-49.
97. Monteiro AM, Jardim MA, Alves S, Giampaoli V, Aubin EC, Figueiredo Neto AM, et al. Cardiovascular disease parameters in periodontitis. *J Periodontol*. 2009;80(3):378-88.
98. Buhlin K, Gustafsson A, Pockley AG, Frostegård J, Klinge B. Risk factors for cardiovascular disease in patients with periodontitis. *Eur Heart J*. 2003;24(23):2099-107.
99. Montonen J, Drogan D, Joost HG, Boeing H, Fritsche A, Schleicher E, et al. Estimation of the contribution of biomarkers of different metabolic pathways to risk of type 2 diabetes. *Eur J Epidemiol*. 2011;26(1):29-38.
100. Tüter G, Kurtiş B, Serdar M, Aykan T, Okyay K, Yücel A, et al. 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*. 2007;34(8):673-81.
101. 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*. 2011;46(5):616-21.
102. Lösche W, Marshal GJ, Apatzidou DA, Krause S, Kocher T, Kinane DF. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and plasma lipids in patients with destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2005;32(6):640-4.
103. Mooradian AD. Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2009;5(3):150-9.

104. Cesaretti ML, Kohlmann Junior O. [Experimental models of insulin resistance and obesity: lessons learned]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006;50(2):190-7. Português.
105. Carvalho-Filho MA, Carvalheira JBC, Velloso LA, Saad MJA. [Insulin and angiotensin II signaling pathways cross-talk: implications with the association between diabetes mellitus, arterial hypertension and cardiovascular disease.] *Arq Bras de Endocrinol Metabol.* 2007;51(2):195-203. Português.
106. Reusch JE. Current concepts in insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, and the metabolic syndrome. *Am J Cardiol.* 2002;90(5A):19G-26G.
107. Taylor SI, Arioglu E. Syndromes associated with insulin resistance and acanthosis nigricans. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 1998;9(2-4):419-39.
108. Kahn CR, Weir GC, King GL, Jacobson AM, Moses AC, Smith RJ. *Joslin: diabetes melito.* 14nd ed. Porto Alegre: Artmed; 2009.
109. Caro JF, Dohm LG, Pories WJ, Sinha MK. Cellular alterations in liver, skeletal muscle, and adipose tissue responsible for insulin resistance in obesity and type II diabetes. *Diabetes Metab Rev.* 1989;5(8):665-89.
110. Cusi K, Maezono K, Osman A, Pendergrass M, Patti ME, Pratipanawatr T, et al. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest.* 2000;105(3):311-20.
111. Chiba FY, Colombo NH, Shirakashi DJ, Gomes WDS, Moimaz SAS, Garbin CAS, et al. Insulin signal decrease in muscle but not in the liver of castrated male rats from chronic exposure to fluoride. *Fluoride.* 2010;43(1):25-30.
112. Kerouz NJ, Hörsch D, Pons S, Kahn CR. 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.* 1997;100(12):3164-72.

113. Chiba FY, Colombo NH, Shirakashi DJ, Silva VC, Garbin CAS, Antoniali C, et al. NaF treatment increases TNF- α and reduces insulin signal in rats *Journal of Fluorine Chemistry*. In press 2012.
114. Cho Y, Ariga M, Uchijima Y, Kimura K, Rho JY, Furuhashi Y, et al. The novel roles of liver for compensation of insulin resistance in human growth hormone transgenic rats. *Endocrinology*. 2006;147(11):5374-84.
115. Cheatham B, Kahn CR. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev*. 1995;16(2):117-42.
116. Skolnik EY, Lee CH, Batzer A, Vicentini LM, Zhou M, Daly R, et al. The SH2/SH3 domain-containing protein GRB2 interacts with tyrosine-phosphorylated IRS1 and Shc: implications for insulin control of ras signalling. *EMBO J*. 1993;12(5):1929-36.
117. Jhun BH, Rose DW, Seely BL, Rameh L, Cantley L, Saltiel AR, et al. Microinjection of the SH2 domain of the 85-kilodalton subunit of phosphatidylinositol 3-kinase inhibits insulin-induced DNA synthesis and c-fos expression. *Mol Cell Biol*. 1994;14(11):7466-75.
118. Case RD, Piccione E, Wolf G, Bennett AM, Lechleider RJ, Neel BG, et al. SH-PTP2/Syp SH2 domain binding specificity is defined by direct interactions with platelet-derived growth factor beta-receptor, epidermal growth factor receptor, and insulin receptor substrate-1-derived phosphopeptides. *J Biol Chem*. 1994;269(14):10467-74.
119. Kuhné MR, Pawson T, Lienhard GE, Feng GS. The insulin receptor substrate 1 associates with the SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp. *J Biol Chem*. 1993;268(16):11479-81.
120. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med*. 2001;7(8):941-6.

121. Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*. 1998;391(6670):900-4.
122. Kubota N, Tobe K, Terauchi Y, Eto K, Yamauchi T, Suzuki R, et al. Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia. *Diabetes*. 2000;49(11):1880-9.
123. Liu SC, Wang Q, Lienhard GE, Keller SR. Insulin receptor substrate 3 is not essential for growth or glucose homeostasis. *J Biol Chem*. 1999;274(25):18093-9.
124. Fantin VR, Wang Q, Lienhard GE, Keller SR. Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000;278(1):E127-33.
125. Maddux BA, Goldfine ID. Membrane glycoprotein PC-1 inhibition of insulin receptor function occurs via direct interaction with the receptor alpha-subunit. *Diabetes*. 2000;49(1):13-9.
126. Morrione A. Grb10 proteins in insulin-like growth factor and insulin receptor signaling (review). *Int J Mol Med*. 2000;5(2):151-4.
127. Cooney GJ, Lyons RJ, Crew AJ, Jensen TE, Molero JC, Mitchell CJ, et al. Improved glucose homeostasis and enhanced insulin signalling in Grb14-deficient mice. *EMBO J*. 2004;23(3):582-93.
128. Ueki K, Kondo T, Kahn CR. 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*. 2004;24(12):5434-46.
129. Wu X, Hoffstedt J, Deeb W, Singh R, Sedkova N, Zilbering A, et al. 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*. 2001;86(12):5973-80.

130. Frittitta L, Spampinato D, Solini A, Nosadini R, Goldfine ID, Vigneri R, et al. 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*. 1998;47(7):1095-100.
131. Smith FM, Holt LJ, Garfield AS, Charalambous M, Koumanov F, Perry M, et al. Mice with a disruption of the imprinted Grb10 gene exhibit altered body composition, glucose homeostasis, and insulin signaling during postnatal life. *Mol Cell Biol*. 2007;27(16):5871-86.
132. Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Chavey C, Freidinger K, Hilton DJ, et al. SOCS-3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to tumor necrosis factor-alpha in the adipose tissue of obese mice. *J Biol Chem*. 2001;276(51):47944-9.
133. Fukushima A, Kajiya H, Izumi T, Shigeyama C, Okabe K, Anan H. Pro-inflammatory cytokines induce suppressor of cytokine signaling-3 in human periodontal ligament cells. *J Endod*. 2010;36(6):1004-8.
134. Farrell GC. Signalling links in the liver: knitting SOCS with fat and inflammation. *J Hepatol*. 2005;43(1):193-6.
135. Goldstein BJ, Bittner-Kowalczyk A, White MF, 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*. 2000;275(6):4283-9.
136. Seely BL, Staubs PA, Reichart DR, Berhanu P, Milarski KL, Saltiel AR, et al. Protein tyrosine phosphatase 1B interacts with the activated insulin receptor. *Diabetes*. 1996;45(10):1379-85.
137. Ahmad F, Azevedo JL, Cortright R, Dohm GL, Goldstein BJ. Alterations in skeletal muscle protein-tyrosine phosphatase activity and expression in insulin-resistant human obesity and diabetes. *J Clin Invest*. 1997;100(2):449-58.

138. Zabolotny JM, Kim YB, Welsh LA, Kershaw EE, Neel BG, Kahn BB. Protein-tyrosine phosphatase 1B expression is induced by inflammation in vivo. *J Biol Chem.* 2008;283(21):14230-41.
139. Alonso-Chamorro M, Nieto-Vazquez I, Montori-Grau M, Gomez-Foix AM, 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 insulin-resistant conditions in an immortalised muscle cell line isolated from mice. *Diabetologia.* 2011;54(5):1157-68.
140. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 1995;95(5):2409-15.
141. Hermsdorff HH, Monteiro JB. [Visceral, subcutaneous or intramuscular fat: where is the problem?]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2004;48(6):803-11. Português.
142. Costandi J, Melone M, Zhao A, Rashid S. Human resistin stimulates hepatic overproduction of atherogenic ApoB-containing lipoprotein particles by enhancing ApoB stability and impairing intracellular insulin signaling. *Circ Res.* 2011;108(6):727-42.
143. Palanivel R, Maida A, Liu Y, Sweeney G. Regulation of insulin signalling, glucose uptake and metabolism in rat skeletal muscle cells upon prolonged exposure to resistin. *Diabetologia.* 2006;49(1):183-90.
144. Saito T, Yamaguchi N, Shimazaki Y, Hayashida H, Yonemoto K, Doi Y, et al. Serum levels of resistin and adiponectin in women with periodontitis: the Hisayama study. *J Dent Res.* 2008;87(4):319-22.
145. Furugen R, Hayashida H, Yamaguchi N, Yoshihara A, Ogawa H, Miyazaki H, et al. The relationship between periodontal condition and serum levels of resistin and adiponectin in elderly Japanese. *J Periodontal Res.* 2008;43(5):556-62.

146. Davies RC, Jaedicke KM, Barksby HE, Jitprasertwong P, Al-Shahwani RM, Taylor JJ, et al. Do patients with aggressive periodontitis have evidence of diabetes? A pilot study. *J Periodontal Res.* 2011;46(6):663-72.
147. Rotter V, Nagaev I, Smith U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem.* 2003;278(46):45777-84.
148. Stouthard JM, Oude Elferink RP, Sauerwein HP. Interleukin-6 enhances glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;220(2):241-5.
149. Oh YS, Lee YJ, Park EY, Jun HS. Interleukin-6 treatment induces beta-cell apoptosis via STAT-3-mediated nitric oxide production. *Diabetes Metab Res Rev.* 2011;27(8):813-9.
150. Fernández-Veledo S, Vila-Bedmar R, Nieto-Vazquez I, Lorenzo M. c-Jun N-terminal kinase 1/2 activation by tumor necrosis factor-alpha induces insulin resistance in human visceral but not subcutaneous adipocytes: reversal by liver X receptor agonists. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(9):3583-93.
151. Stephens JM, Pekala PH. Transcriptional repression of the C/EBP-alpha and GLUT4 genes in 3T3-L1 adipocytes by tumor necrosis factor-alpha. Regulation is coordinate and independent of protein synthesis. *J Biol Chem.* 1992;267(19):13580-4.
152. Zhang J, Gao Z, Yin J, Quon M, Ye J. S6K directly phosphorylates IRS-1 on Ser-270 to promote insulin resistance in response to TNF-(alpha) signaling through IKK2. *J Biol Chem.* 2008;283(51):35375-82.
153. 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.* 2010;81(8):1118-23.

154. Sun W, Chen L, Zhang S, Ren Y, Qin G. Changes of adiponectin and inflammatory cytokines after periodontal intervention in type 2 diabetes patients with periodontitis. *Arch Oral Biol.* 2010; 55(12):970-4.
155. Correa FO, Gonçalves D, Figueredo CM, Bastos AS, Gustafsson A, Orrico SR. Effect of periodontal treatment on metabolic control, systemic inflammation and cytokines in patients with type 2 diabetes. *J Clin Periodontol.* 2010;37(1):53-8.
156. Sun WL, Chen LL, Zhang SZ, Wu YM, Ren YZ, Qin GM. Inflammatory cytokines, adiponectin, insulin resistance and metabolic control after periodontal intervention in patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis. *Intern Med.* 2011;50(15):1569-74.
157. O'Connell P, Taba M, Nomizo A, Foss Freitas M, Suaid F, Uyemura S, et al. Effects of periodontal therapy on glycemic control and inflammatory markers. *J Periodontol.* 2008;79(5):774-83.
158. D'Aiuto F, Parkar M, Andreou G, Suvan J, Brett PM, Ready D, et al. Periodontitis and systemic inflammation: control of the local infection is associated with a reduction in serum inflammatory markers. *J Dent Res.* 2004;83(2):156-60.
159. Fentoğlu Ö, Köroğlu BK, Hiçyılmaz H, Sert T, Özdem M, Sütçü R, et al. Pro-inflammatory cytokine levels in association between periodontal disease and hyperlipidaemia. *J Clin Periodontol.* 2011;38(1):8-16.
160. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(7):499-511.
161. Devaraj S, Dasu MR, Rockwood J, Winter W, Griffen SC, Jialal I. Increased toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 expression in monocytes from patients with type 1 diabetes: further evidence of a proinflammatory state. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(2):578-83.

162. Kim TH, Choi SE, Ha ES, Jung JG, Han SJ, Kim HJ, et al. IL-6 induction of TLR-4 gene expression via STAT3 has an effect on insulin resistance in human skeletal muscle. *Acta Diabetol.* In press 2011.

163. de Mello VD, Kolehmainen M, Pulkkinen L, Schwab U, Mager U, Laaksonen DE, et al. Downregulation of genes involved in NFkappaB activation in peripheral blood mononuclear cells after weight loss is associated with the improvement of insulin sensitivity in individuals with the metabolic syndrome: the GENOBIN study. *Diabetologia.* 2008;51(11):2060-7.

164. Radin MS, Sinha S, Bhatt BA, Dedousis N, O'Doherty RM. Inhibition or deletion of the lipopolysaccharide receptor Toll-like receptor-4 confers partial protection against lipid-induced insulin resistance in rodent skeletal muscle. *Diabetologia.* 2008;51(2):336-46.

ANEXO A

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "AVALIAÇÃO DA VIA INIBITÓRIA DO SINAL INSULÍNICO EM RATOS ADULTOS COM DOENÇA PERIODONTAL" sob responsabilidade *Profa. Dra. Dóris Hissako Sumida* está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em 10/09/2009 de acordo com o protocolo 2009-005672.

Araçatuba, 10 de Setembro de 2009

Prof.^a Dra. Tereza Cristina Cardoso da Silva
Presidente da CEEA- FOA/UNESP

ANEXO B

Artigo aceito para publicação na Journal of
Periodontology

**Periodontal Disease Decreases Insulin Sensitivity
and Insulin Signaling**

Periodontal Disease Decreases Insulin Sensitivity and Insulin Signaling

Natalia H. Colombo * - Post graduate student

Daisy J. Shirakashi * - Post graduate student

Fernando Y. Chiba [†] - Post graduate student

Maria Sara de Lima Coutinho * - Undergraduate student

Edilson Ervolino * - Assistant Professor

Cléa Adas Saliba Garbin [†] - Associate Professor

Ubiratan Fabres Machado [‡] - Full Professor

Doris H. Sumida * - Associate Professor

* Department of Basic Sciences, Dental School of Araçatuba, São Paulo State University -UNESP, Brazil

[†] Department of Child and Social Dentistry, Dental School of Araçatuba, São Paulo State University - UNESP, Brazil

[‡] Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, 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

Fax number and e-mail can be published.

Grants from the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP), São Paulo, SP, Brazil.

2862 words, three figures and two tables

Periodontal disease decreases insulin signaling

The present study showed that induced periodontal disease in rats reduces insulin sensitivity and insulin signaling probably due to the plasmatic elevation of TNF- α level.

PERIODONTAL DISEASE DECREASES INSULIN SENSITIVITY AND INSULIN SIGNALING

Background: The purpose of this study was to investigate whether local inflammatory events, such as periodontal disease, are able to increase TNF- α plasmatic concentration, and decrease insulin sensitivity and insulin signaling in non-diabetic rats.

Methods: Forty-eight male Wistar rats (at two months old) were divided into two groups, with either ligature-induced periodontal disease (PD) or control conditions (CN). Experiments were carried out in both groups twenty-eight days following ligature placement.

Plasmatic concentration of glycemia and TNF- α (n=10) were analyzed by the glucose oxidase and ELISA method, respectively. Insulin sensitivity (n=7) were measured using the insulin tolerance test (ITT). Insulin signal transduction (n=7) was measured by pp185 tyrosine phosphorylation status in insulin-sensitive tissues using the western blotting method.

Results: The PD group showed decreased insulin sensitivity (p<0.05), although no glycemic alterations were noted (p>0.05). TNF- α plasmatic concentration was higher in PD rats compared to control. In addition, a decrease in the pp185 tyrosine phosphorylation status was observed following insulin stimulus in both white adipose and skeletal muscle tissues of the PD group compared to the control group.

Conclusions: Periodontal disease is able to cause alterations to both insulin signaling and insulin sensitivity, probably due to the elevation of TNF- α plasmatic concentration. Thus, the present results emphasize the importance of the prevention of local inflammatory diseases, such as periodontitis, to prevent diabetes mellitus.

KEY WORDS

Periodontitis, Diabetes Mellitus, Insulin Receptor Substrate Proteins, Insulin Resistance, Insulin.

INTRODUCTION

Diabetes mellitus is a group of metabolic diseases characterized by hyperglycemia resulting from the impairment of insulin secretion, insulin action, or both. Type 2 diabetes mellitus (T2DM) encompasses individuals with insulin resistance and insulin deficiency, occurring in 90-95% of diabetic individuals.¹ The prevalence of this disease has increased significantly, and estimates suggest that by the year 2025, the number of patients with T2DM will have doubled in relation to the year 2000 and might reach 300 million people worldwide.² The exact mechanisms contributing to the onset of insulin resistance are not fully understood. Several studies have suggested that subclinical chronic inflammation may be an important pathogenic factor for the development of insulin resistance and T2DM.³

Insulin action begins with its binding to a specific receptor which self-phosphorylates and phosphorylates cytoplasmic substrates, including a broad band of 165-185 kDa cytoplasmic protein, called pp185. This band has two proteins with 70% homology, denominated insulin receptor substrate-1 and -2 (IRS-1 and IRS-2).^{4, 5} These tyrosine-phosphorylated substrates may bind with and activate the PI 3-kinase. This activation is essential for glucose transportation to insulin-sensitive tissues.⁶

Periodontal disease is considered a predisposing factor for the development of insulin resistance and T2DM due to the release of inflammatory mediators.⁷ Besides acting locally, these mediators diffuse to the systemic circulation. Studies show that two out of three patients with periodontal disease have a high concentration of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in the plasma.⁸ Elevated levels of TNF- α and IL-6 can also be observed in tissues (liver and white adipose tissue) of rats with periodontal disease. However, these cytokines are only elevated in tissues when periodontal disease is associated with obesity.⁹ In addition, periodontal treatment reduces TNF- α concentration in the blood of diabetic individuals.¹⁰ TNF- α alters the insulin signal by reducing the tyrosine phosphorylation of the insulin receptor and its substrates.¹¹⁻¹⁴ Moreover, TNF- α induces IRS-1 phosphorylation on serine, which makes this molecule inhibitory to the signaling capacity of the insulin receptor.^{11, 15}

Studies have demonstrated the metabolic alterations induced by periodontitis in animal models of diabetic rats. Periodontal disease increases glucose tolerance in rats with T2DM.¹⁶ Another study in diabetic rats showed that the combination of periodontitis and a hyperlipidic diet accelerates the development of severe insulin resistance, impairs glucose homeostasis, and elevates serum TNF- α concentration.¹⁷

Insulin resistance is a key mechanism for the pathophysiology of T2DM, as well as its degenerative alterations. The study of the alterations in the insulin action mechanism noted in insulin-resistant patients represents an important step for the prevention and/or cure of T2DM.

Considering that the inflammatory process may alter insulin signal transduction, the purpose of this study was to evaluate if induced periodontal disease is able to increase TNF- α plasmatic concentration, and decrease insulin sensitivity and insulin signaling in non-diabetic rats. It's believed that periodontitis can promote an increase of TNF- α levels and, in turn, cause insulin resistance and alterations in insulin signal.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Forty-eight male Wistar rats (at two months old) were used in the present study. The animals were kept under a 12/12 h light/dark cycle (lights on at 07:00), temperature of $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and food and water ad libitum. This study followed the Ethical Principles and Guidelines for Animal Experimentation and was approved by the local ethics committee, according to protocol number 2007/005735.

Experimental Design

The animals were divided into two groups with 24 animals in each group: control group (CN) and periodontal disease group (PD). PD group animals were anesthetized using ketamine hydrochloride[§] (10%, 80 mg/kg body weight, i.p.) with xylazine^l (2%, 10 mg/kg body weight, i.p.) in order to induce periodontal disease, by ligating 4-0 silk thread on cervical region of the lower first molars, bilaterally, for 28 days. After this period, they were submitted to 14-hour fasting and sodium thiopental[¶] (3%, 50 mg/kg body weight, i.p.) anesthetization. Then the experiments were carried out.

Glucose and TNF- α Level Measurement

Ten animals of each group (CN and PD) were submitted to median laparotomy and blood samples (4mL) were taken via inferior vena cava puncture, followed by euthanasia. The samples were then distributed into tubes containing heparin.[#] Plasma was prepared by centrifugation of blood at 3000g for 15 minutes at 4°C and then stored in aliquots at -70°C until used. The obtained plasma was used to measure the glucose concentration by the glucose oxidase method.^{**} Plasmatic concentrations of TNF- α were quantified using an enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA) kit.^{††} The limits of detection of the TNF- α was <0.7 pg/ml.

Short Intravenous Insulin Tolerance Test (ITT)

The insulin tolerance tests were carried out in seven animal of each group (CN and PD) following the protocol described by Chehoud et al.¹⁸ A dose of 0.75 U/kg p.c. insulin^{††} was administered through the penile vein to both animal groups. Blood samples (about 50 μ l) were collected from nicked tails at 0 (before hormone administration), 4, 8, 12 and 16 min (after insulin administration) and glucose was measured using a glycemia monitor.^{§§} The results were analyzed by constant comparison of the constant rate for glucose disappearance (K_{itt}) from 0 to 16 min of the test. The K_{itt} was calculated using the formula $0.693/t_{1/2}$. The glucose $t_{1/2}$ was calculated from the slope of the least-square analysis of the plasma glucose concentrations during the linear decay phase.¹⁹

Assessment of the Insulin Receptor Substrate (pp185–IRS-1/IRS-2) Tyrosine Phosphorylation Status

Samples from the liver (L), gastrocnemius skeletal muscle (SM) and periepididymal white adipose tissue (WAT) were collected from seven animals of each group (PD and CN) prior to and after administration of 1.5 U regular insulin (i.v. portal vein) at variable times (30 s for L, 90 s for SM, 120 s for WAT). Tissue samples were prepared according to the method described by Carvalho et al.²⁰ and submitted to the western blotting method for quantification of the pp185 (IRS-1/IRS-2) tyrosine phosphorylation status using anti-phosphotyrosine antibody.^{||} β -actin antibody^{||} were used as controls. Immunoreactive bands were detected by autoradiography using a chemiluminescent substrate system^{¶¶} according to the manufacturer's instructions. Quantitative analysis of the blots was carried out using a software.^{##}

Radiographic Evaluation of Alveolar Bone Loss and Periodontal Bone Support

On the 28th day after periodontal disease induction, the animals were euthanatized. The right and left hemi-mandibles were dissected and fixed for 24h in 4% formaldehyde. Radiographic images were acquired using 70kvp, 10 mA, 0,10 s time exposure. The source-to-film distance was always set at 40 cm. The digital image was obtained directly with the optical digital plate.^{***} The readings of optical plates were performed in sensitized laser scanner equipment, and the images were analyzed by a software.^{†††} Radiographic analyses were performed to detect alveolar bone loss as described by Holzhausen et al.²¹ The distance between the cement-enamel junction (CEJ) and the height of alveolar bone was determined for mesial root surfaces of left and right mandible first molars with the aid of the software.^{†††} Periodontal bone support was analyzed as described by Andersen et al.²² Measurements were

performed electronically on the mesial and distal parts of right and left mandible first molars. A line was drawn connecting the cusps (C) of the first molar to the apex (A) of the corresponding root. A second line was drawn from the apex (A) to the level of bone corresponding to the deepest interproximal bone defect (B). The distances were measured in millimeters, and periodontal bone support (PBS) was calculated according to the formula $PBS = (AB/AC) \times 100\%$.

Histological Analysis

For histological analysis, five animals of each group (PD and CN) were randomly selected. The right and left hemi-mandibles collected from rats of both groups CN and PD, 28 days after ligature placement, were soaked in 4% formaldehyde for 24h. Decalcification was carried out in 10% EDTA (pH 7.4) for approximately 3 months. Serial paraffin sections of 5 μm thickness were made on the mesial-distal aspects of the whole right and left first lower molars and stained with hematoxylin and eosin. Morphological studies were made on the mesial and distal gingiva and alveolar bone.

Statistical Analyses

Two analyses were performed:

- 1) For insulin signal and glycemia values from ITT test:

The normality of data set analyzed was verified. The statistical analyses were performed by analysis of variance, followed by Tukey post hoc test when the analysis of variance suggested a significant difference among groups ($P < 0.05$). Data analysis was performed with a statistical program.^{†††}

- 2) For analysis of fasting glycemia, TNF- α levels, Kitt values, alveolar bone loss and periodontal bone support:

The statistical analyses were analyzed by Student t test. P value of < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Alveolar Bone Radiographic Analysis

Alveolar bone analysis revealed that PD group had more bone loss and less bone support than

Control group ($p < 0.0001$; Table 1).

Histological Analysis of Inflammation and Bone Resorption

Periodontal tissues from CN rats presented normal morphology. On the other hand, loss of gingival papilla, increase of thickness of the epithelial layer, inflammation and bone resorption in the interproximal and interradicular region, besides irregularity of bone crest surface were observed in the histological sections obtained 28 days after the induction of experimental periodontitis in PD rats (Fig. 1).

Glycemia and TNF- α Plasmatic Concentration

PD rats showed no glycemic alterations when compared to CN rats. However, the value of TNF plasmatic concentration was higher in PD rats compared to control.

ITT

In the glycemia comparison (Fig. 2) at each period of time, the PD group showed significantly higher glycemia compared to the control group, except for basal (time 0) and 4 minutes after insulin infusion.

Table 2 shows the glucose disappearance rate (K_{itt}) during the insulin tolerance test, performed in the first 16 min after the hormone infusion in the control and PD groups. The PD group had a significantly lower ($p<0.05$) glucose disappearance rate (K_{itt}) in relation to the CN group, demonstrating decreased insulin sensitivity in PD rats compared to CN rats.

Insulin Signal

An increased pp185 phosphorylation status was observed after insulin stimulus in relation to baseline in both groups and tissues. After insulin stimulus, the pp185 phosphorylation status was reduced ($p<0.05$) in the muscle and white adipose tissues in the PD group compared to the CN group. However, this alteration in insulin signaling was not observed in the liver between groups. There was no difference in the pp185 phosphorylation status at baseline across these groups in the liver and muscle, but a difference ($p<0.05$) was observed in the white adipose tissue (Fig. 3).

DISCUSSION

The present study demonstrated that induced periodontal disease, confirmed by radiographic histological analysis, decreases the insulin signaling in rats by reducing the pp185 tyrosine phosphorylation status (IRS-1/IRS-2) in the gastrocnemius muscle and white adipose tissue, after insulin stimulus (Western Blotting analysis). Although the Western analysis had been previously considered a semi-quantitative method, mainly because it does not provide a true quantity of the protein (μg of protein), the method is now considered very

sensitive for quantification, since calibration of changes in densitometric values has been extensively reported, and linear regression analysis has confirmed excellent values of r^2 .²³

It is known that IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation cause the insulin signal to increase. On the other hand, serine phosphorylation of these substrates attenuates the signal by decreasing the tyrosine phosphorylation capacity of the insulin receptor and its substrate, after insulin stimulus.¹¹ It has been recently demonstrated that TNF- α acts in the insulin signaling pathway, activating the SK6 (p70S6k- a serine kinase). This kinase directly phosphorylates the IRS-1 on multiple serine residues to inhibit insulin signaling.²⁴ Thus, the insulin signal alteration observed in PD rats could be due to an increase of inflammatory mediators in the plasma, such as TNF- α , induced by the periodontal disease. Under no insulin stimulus (baseline), the present study showed a decrease in pp185 tyrosine phosphorylation only in WAT of PD rats compared to control. This result may have great importance in decreased insulin signaling. It is known that this tissue can provide significant amount of macrophages and this cell can secrete TNF-alpha that causes a change in insulin signal.^{15, 25, 26}

Chronic periodontitis is associated with the elevation of serum TNF- α levels in rats⁹ as well as in individuals with T2DM. Interestingly, it has been demonstrated that the higher the severity of periodontal disease, the higher the plasma TNF- α concentration.²⁷ The present study has also demonstrated an increase of TNF- α plasmatic concentration in PD rats compared to control. Recent studies have shown that periodontal treatment in both T2DM and systemically healthy patients reduces serum TNF- α levels,^{10, 28} IL-6, and glycosylated hemoglobin.²⁹ The systemic effect of periodontal disease in rats is reinforced by studies that demonstrated that diabetic rats with periodontal disease are more glucose intolerant than diabetic rats without periodontitis. In addition, periodontal disease is associated with the increase of free fatty acids in non-diabetic rats.¹⁶

It is very well established that comparison of aging peculiarities in animals with different species-specific life spans can not be done only based on chronobiological data of their average life expectancy, but must consider ontobiological changes of the species.³⁰ In the ontobiological concern, we would like to point out that male rats (laboratory strains such as Sprague-Dawley and Wistar) have been reported to achieve sexual maturity at 45-55 days³¹, whereas male humans achieve the Tanner V stage (complete sexual maturity) at 17 years of age.³² Considering the above, a three-month old rat is considered an adult. We didn't use older rats or Zucker diabetic Sprague-Dawley (ZDSD) that show an obese phenotype and the

potential to develop overt hyperglycemia between 15 and 21 wk of age³³ because they show insulin resistance. We aimed at knowing whether periodontitis causes insulin resistance and alteration in insulin signal in normal rats. Therefore, the aim of the study was not to verify if periodontal disease could worsen the insulin resistance in older or diabetic rats, but to check if periodontitis could cause insulin resistance in a healthy adult rat.

The literature demonstrates that people with moderate and severe periodontal disease present high glycemia levels when compared to people with adequate periodontal health.³⁴ In the present study, there was no glycemia increase in PD rats (Table 2). Periodontal disease is also associated with reduced insulin sensitivity in non-diabetic individuals aged 30 to 49, however this association is not observed in older individuals.³⁵ The results of the present study demonstrate that insulin sensitivity, measured by the glucose disappearance rate (K_{itt}) during the 16 min ITT, was reduced in PD rats compared to control rats (Table 2). It's known that the smaller the KITT value, the greater the insulin resistance is, because when the value of KITT is low, it entails that the cell sensitivity to insulin is impaired. As consequence, the glucose disappearance rate after insulin injection is low.¹⁹

No insulin signal alteration was observed in the liver (Fig. 3.F). These results are in agreement with Chiba et al.,³⁶ who verified a reduced pp185 phosphorylation status in the muscle, but not in the liver in an experimental model involving fluoride. This result may explain the absence of glycemia alteration in PD rats even with reduced pp185 phosphorylation status in muscle and adipose tissues. Interestingly, Cho et al.³⁷ suggest that the liver may compensate for insulin resistance found in the adipose and muscle tissues to prevent hyperglycemia.

In the literature there are basically two ways to perform the tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate. In some studies, the tissues are removed from different rats after insulin or saline injection to verify basal and insulin stimulated tyrosine phosphorylation³⁸⁻⁴⁰ and other studies analyze it through the tissue samples that are taken before and after insulin injection in the same rat.^{18, 36, 41-43} We chose to remove the tissue samples before and after insulin injection in the same rat to avoid excessive and unnecessary use of rats and we observed no difference between double biopsy control, i.e, between the "control without insulin" (baseline), in which tissue samples were taken before and after insulin injection and the "control without insulin" (baseline), in which only saline was injected to take sample tissues. After insulin injection there is no difference in tyrosine phosphorylation status either.

The reduced insulin sensitivity and insulin signaling in PD rats evidenced by the present study is likely to be due to the plasmatic elevation of TNF- α level. The interlink between poor oral and systemic health is important, as in PD rats there is a decrease in insulin signal and insulin sensitivity. These alterations are present in Type 2 diabetes mellitus²⁶ and periodontitis is one known complication of this disease.

CONCLUSION

Periodontal disease is able to cause alterations in both insulin signaling and insulin sensitivity, probably due to the elevation of TNF- α plasmatic concentration. Thus, the present results emphasize the importance of preventing local inflammatory diseases such as periodontal disease, aiming to prevent diabetes mellitus.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants (2009/ 02976-0 and 2009/02846-9) from the São Paulo Research Foundation (FAPESP), São Paulo, SP, Brazil and Pro-Rectorry of Research of UNESP (PROPe-UNESP). We would like to thank Mrs. Karina Vieira Casatti^{§§§} (English teacher) for her English technical assistance in the preparation of this manuscript. We would also like to thank Associate Professor PhD of Biostatistics, Maria Lucia Marçal Mazza Sundefeld^{|||} for her help in the statistical analyses.

REFERENCES

1. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2007;30 Suppl 1:S42-47.
2. Green A, Christian Hirsch N, Pramming S. The changing world demography of type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2003;19:3-7.
3. Sjöholm A, Nyström T. Inflammation and the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2006;22:4-10.
4. Rothenberg P, Lane W, Karasik A, Backer J, White M, Kahn C. Purification and partial sequence analysis of pp185, the major cellular substrate of the insulin receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1991;266:8302-8311.
5. Sun X, Wang L, Zhang Y, et al. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature* 1995;377:173-177.
6. Clarke J, Young P, Yonezawa K, Kasuga M, Holman G. Inhibition of the translocation of GLUT1 and GLUT4 in 3T3-L1 cells by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, wortmannin. *Biochem J* 1994;300 (Pt 3):631-635.
7. Mealey B, Oates T. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol* 2006;77:1289-1303.
8. Nishimura F, Takahashi K, Kurihara M, Takashiba S, Murayama Y. Periodontal disease as a complication of diabetes mellitus. *Ann Periodontol* 1998;3:20-29.

9. Endo Y, Tomofuji T, Ekuni D, et al. Experimental periodontitis induces gene expression of proinflammatory cytokines in liver and white adipose tissues in obesity. *J Periodontol* 2010;81:520-526.
10. Dağ A, Firat E, Arikan S, Kadiroğlu A, Kaplan A. The effect of periodontal therapy on serum TNF-alpha and HbA1c levels in type 2 diabetic patients. *Aust Dent J* 2009;54:17-22.
11. Hotamisligil G, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White M, Spiegelman B. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996;271:665-668.
12. Kroder G, Bossenmaier B, Kellerer M, et al. Tumor necrosis factor-alpha- and hyperglycemia-induced insulin resistance. Evidence for different mechanisms and different effects on insulin signaling. *J Clin Invest* 1996;97:1471-1477.
13. Hotamisligil G, Murray D, Choy L, Spiegelman B. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:4854-4858.
14. Feinstein R, Kanety H, Papa M, Lunenfeld B, Karasik A. Tumor necrosis factor-alpha suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. *J Biol Chem* 1993;268:26055-26058.
15. Kanety H, Feinstein R, Papa M, 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* 1995;270:23780-23784.
16. Andersen CCP, Buschard K, Flyvbjerg A, Stoltze K, Holmstrup P. Periodontitis Deteriorates Metabolic Control in Type 2 Diabetic Goto-Kakizaki Rats. *J Periodontol* 2006;77:350-356.
17. Watanabe K, Petro B, Shlimon A, Unterman T. Effect of periodontitis on insulin resistance and the onset of type 2 diabetes mellitus in Zucker diabetic fatty rats. *J Periodontol* 2008;79:1208-1216.
18. Chehoud KA, Chiba FY, Sasaki KT, Garbin CAS, Sumida DH. Effects of fluoride intake on insulin sensitivity and insulin signal transduction. *Fluoride* 2008;41:270-275.
19. Bonora E, Moghetti P, Zaccaro C, et al. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;68:374-378.
20. 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* 1996;137:151-159.
21. Holzhausen M, Rossa Júnior C, Marcantonio Júnior E, Nassar PO, Spolidório DM, Spolidório LC. Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol* 2002;73:1030-1036.
22. Andersen CCP, Buschard K, Flyvbjerg A, Stoltze K, Holmstrup P. Periodontitis Deteriorates Metabolic Control in Type 2 Diabetic Goto-Kakizaki Rats. 2006;77:350-356.
23. Ferguson RE, Carroll HP, Harris A, Maher ER, Selby PJ, Banks RE. Housekeeping proteins: a preliminary study illustrating some limitations as useful references in protein expression studies. *Proteomics* 2005;5:566-571.
24. Zhang J, Gao Z, Yin J, Quon M, Ye J. S6K directly phosphorylates IRS-1 on Ser-270 to promote insulin resistance in response to TNF-(alpha) signaling through IKK2. *J Biol Chem* 2008;283:35375-35382.
25. Torres-Leal FL, Fonseca-Alaniz MH, Rogero MM, Tirapegui J. The role of inflamed adipose tissue in the insulin resistance. *Cell Biochem Funct* 2010;28:623-631.
26. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol* 2010;72:219-246.
27. Engebretson S, Chertog R, Nichols A, Hey-Hadavi J, Celenti R, Grbic J. Plasma levels of tumour necrosis factor-alpha in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes. *J Clin Periodontol* 2007;34:18-24.

28. Correa F, Gonçalves D, Figueredo C, Bastos A, Gustafsson A, Orrico S. Effect of periodontal treatment on metabolic control, systemic inflammation and cytokines in patients with type 2 diabetes. *J Clin Periodontol* 2010;37:53-58.
29. O'Connell P, Taba M, Nomizo A, et al. Effects of periodontal therapy on glycemic control and inflammatory markers. *J Periodontol* 2008;79:774-783.
30. Frolkis VV. Syndromes of aging. *Gerontology* 1992;38:80-86.
31. Horton JA, Bariteau JT, Loomis RM, Strauss JA, Damron TA. Ontogeny of skeletal maturation in the juvenile rat. *Anat Rec (Hoboken)* 2008;291:283-292.
32. Tanner JM, Davies PS. Clinical longitudinal standards for height and height velocity for North American children. *J Pediatr* 1985;107:317-329.
33. Reinwald S, Peterson RG, Allen MR, Burr DB. Skeletal changes associated with the onset of type 2 diabetes in the ZDF and ZSDS rodent models. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;296:E765-774.
34. Katz J. Elevated blood glucose levels in patients with severe periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2001;28:710-712.
35. Timonen P, Suominen-Taipale L, Jula A, Niskanen M, Knuuttila M, Ylöstalo P. Insulin sensitivity and periodontal infection in a non-diabetic, non-smoking adult population. *J Clin Periodontol* 2011;38:17-24.
36. Chiba FY, Colombo NH, Shirakashi DJ, Gomes WDdS, Moimaz SAS, Sumida DH. Insulin signal decrease in muscle but not in the liver of castrated male rats from chronic exposure to fluoride. *Fluoride* 2010;43:25-30.
37. Cho Y, Ariga M, Uchijima Y, et al. The novel roles of liver for compensation of insulin resistance in human growth hormone transgenic rats. *Endocrinology* 2006;147:5374-5384.
38. Oliveira AG, Carvalho BM, Tobar N, et al. Physical exercise reduces circulating lipopolysaccharide and TLR4 activation and improves insulin signaling in tissues of DIO rats. *Diabetes* 2011;60:784-796.
39. Pauli JR, Ropelle ER, Cintra DE, et al. Acute exercise reverses aged-induced impairments in insulin signaling in rodent skeletal muscle. *Mech Ageing Dev* 2010;131:323-329.
40. Saad MJ, Araki E, Miralpeix M, Rothenberg PL, White MF, Kahn CR. Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. *J Clin Invest* 1992;90:1839-1849.
41. Anhô GF, Hirabara SM, Turrer TC, et al. Postpartum glycemic homeostasis in early lactating rats is accompanied by transient and specific increase of soleus insulin response through IRS2/AKT pathway. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;292:R2225-2233.
42. Lima FB, Machado UF, Bartol I, et al. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. *Am J Physiol* 1998;275:E934-941.
43. Okamoto MM, Sumida DH, Carvalho CR, et al. Changes in dietary sodium consumption modulate GLUT4 gene expression and early steps of insulin signaling. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;286:R779-785.

Table 1. Alveolar Bone Destruction

	CN (mean \pm SEM)	PD (mean \pm SEM)
Bone loss (mm)	0.58 \pm 0.03*	1.46 \pm 0.05
Bone suport (%)	56.95 \pm 0.44*	45.01 \pm 0.90

*p < 0.0001 for CN versus PD animals.

Table 2. Glycemia and TNF- α plasmatic concentration and Glucose disappearance rate (Kitt) of control group rats (CN) and periodontal disease rats (PD)

Parameters	CN (mean \pm SEM)	PD (mean \pm SEM)
glycemia (mg/dl) (n=10)	105.2 \pm 3.426	109.5 \pm 3.371
TNF- α (pg/ml) (n = 10)	8.62 \pm 0.21	9.37 \pm 0.15 *
Glucose disappearance rate (Kitt) (n=7)	2.81 \pm 0.25	1.87 \pm 0.18 *

*p < 0.01 for CN versus PD animals.

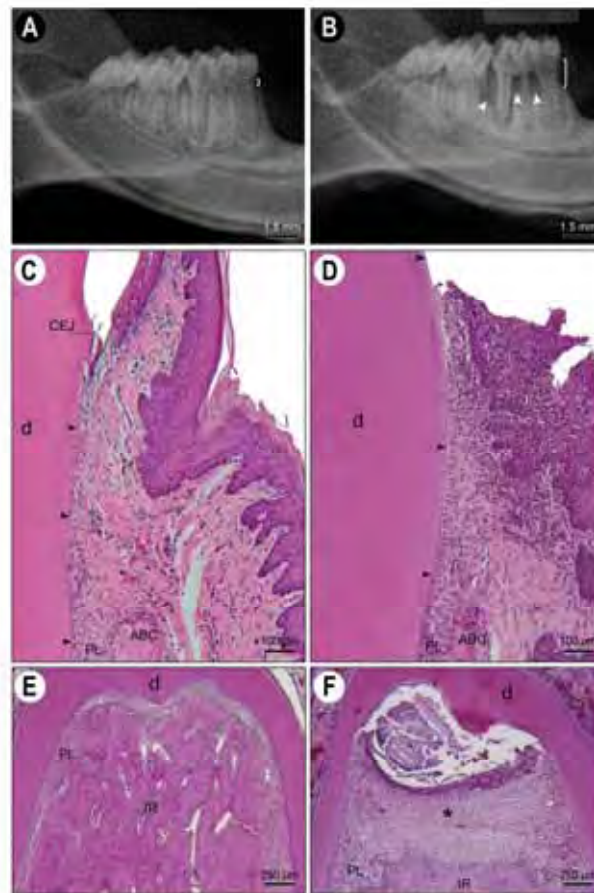


Figure 1- Digital X-ray mandible images and periodontal tissues photomicrographs obtained from experimental animals. In A, radiographic images showing normal alveolar bone and in B, loss bone in interproximal and interradicular regions (white arrowhead) 28 days after ligature-induced periodontitis. Loss bone was measured by cementum enamel junction to alveolar bone crest distance (white line). In C, histological characteristics from control animal (nonligated) showing epithelium layer of regular thickness, dense connective tissue with low inflammatory infiltrate and regular bone crest surface. In D, histological characteristics after ligature placement demonstrating loss of gingival papilla, increase of thickness of the epithelial layer, inflammatory infiltrate more intense in connective tissue, besides irregularity of bone crest surface. In E, photomicrographs showing interradicular region in control and in F, loss bone (asterisk) clearly observed in the ligature group. Abbreviations and symbols: ABC, alveolar bone crest; CEJ, cementum enamel junction; d, dentin; PL, periodontal ligament; IR, interradicular region; black arrowhead, cementum.

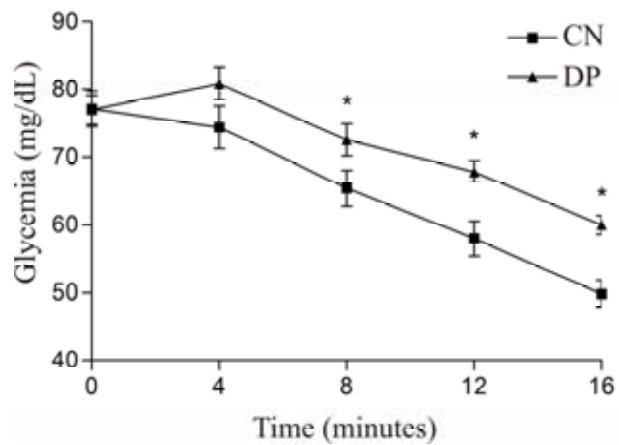


Figure 2 – Intravenous insulin tolerance test in control and PD groups. The blood samples were collected at the times of 0 (basal), 4, 8, 12, 16 minutes, after insulin injection. The values of glycemia are presented as mean \pm SEM, n=7.*p<0.05 compared to control.

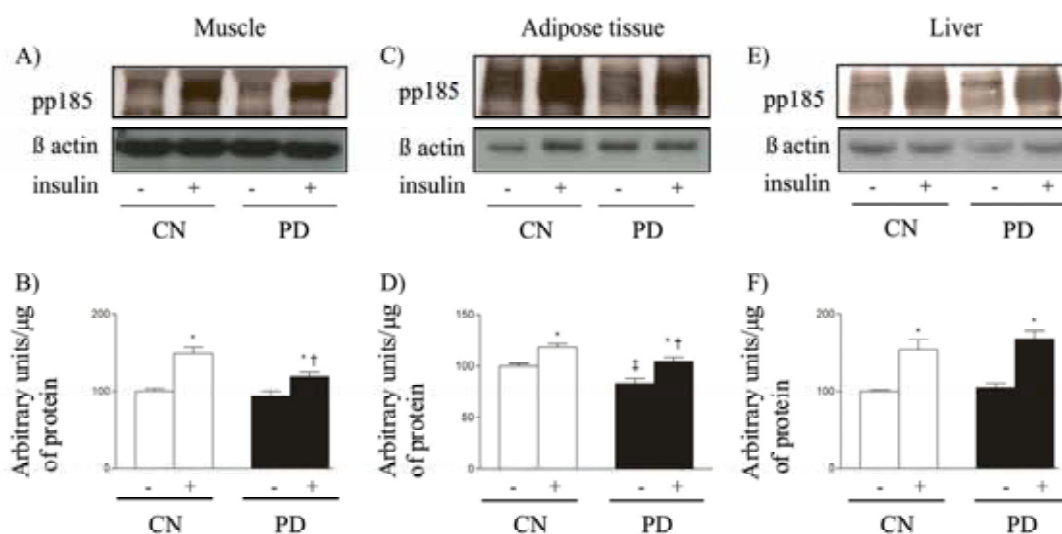


Figure 3 – Evaluation of pp185 (IRS-1/IRS-2) tyrosine phosphorylation status before (-) and after (+) insulin stimulus in gastrocnemius muscle (A,B), in periepididymal white adipose tissue (C,D) and in liver (E,F) of control (CN) and periodontal disease (PD) rats. **A, C and E** show typical autoradiography, where similar quantities of protein (185 μg) were submitted to SDS-PAGE. β-actin was used as control. **B, D and F** show tyrosine phosphorylation status values (expressed in arbitrary units) which are presented as means ± SEM, n=7. *p<0.05 for insulin (-) versus insulin (+); †p<0.05 for CN (+) versus PD (+); ‡p< 0.05 for CN (-) versus PD (-).

§ Ketamina, Agener, Embu-Guaçu, Brazil.

l Xilasina, Dorcipec®, Monte Carlos, Brazil.

¶ Thiopentax®, Cristália, Itapira, Brazil.

Lique mine, Hoffmann-La Roche, Basle, Switzerland.

** Enzymatic glucose, ANALISA Diagnóstica, Belo Horizonte, MG, Brazil.

†† Biosource International, Camarillo, California, USA.

‡‡ Novolin®, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca.

§§ Accu-Chek Advantage, Roche Diagnostic, Indianapolis, IN, USA.

|| Santa Cruz Biotecnology. Inc, Santa Cruz, California, USA.

¶¶ GE Healthcare, Buckinghamshire, UK.

Scion Image-Release Beta 3b, NIH, Frederick, MD, USA.

*** Digora, Soredex, Orion Corporation, Helsinki, Finland.

††† Windows Digora 1.51, Soredex, Orion Corporation, Helsinki, Finland.

‡‡‡ SAS System, v. 9.2. SAS Institute Inc, Cary, North Carolina, USA.

§§§ English Club School, Araçatuba, SP, Brazil.

||| Department of Child and Social Dentistry, Dental School of Araçatuba, São Paulo State University

- UNESP, Brazil.