



Alana Carvalho de Oliveira

**Avaliação da via inibitória do sinal
insulínico em músculo esquelético e
sensibilidade à insulina em ratos adultos
com doença periodontal**

Araçatuba-SP

2014

Alana Carvalho de Oliveira

Avaliação da via inibitória do sinal insulínico em músculo esquelético e sensibilidade à insulina em ratos adultos com doença periodontal

Trabalho de Conclusão de Curso
como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Bacharel em
Odontologia da Faculdade de
Odontologia de Araçatuba,
Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”.

Orientadora: Prof^a. Adj. Doris Hissako
Sumida

Araçatuba-SP

2014

Dedicatória

Dedico este trabalho

Aos meus pais, irmãos, avós e a toda minha família, por sua capacidade de acreditar e investir em mim. Mãe, seu cuidado e dedicação me deram, em alguns momentos, a esperança para seguir. Pai, sua presença significou segurança e certeza de que não estou sozinha nessa caminhada.

Agradecimentos Especiais

A Deus, em primeiro lugar, que iluminou meu caminho durante esta caminhada.

À minha professora orientadora Doris Hissako Sumida, por seus ensinamentos, paciência, confiança e incentivo que tornaram possível a conclusão desta monografia.

Aos meus amigos do laboratório Natália Helena Colombo, Daisy Jaqueline Shirakashi, Maria Sara de Lima Coutinho, Patrícia Juvêncio Dias, pela amizade e colaboração com este trabalho.

A todos meus amigos, em especial aos da Turma 11, que de alguma forma estiveram e estão próximos de mim, fazendo esta caminhada valer cada vez mais a pena.

Agradecimentos

À UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, pela oportunidade de realizar este curso.

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

A todos meus professores, por todos os ensinamentos ministrados, tornando-se importantes tanto em minha formação profissional como em meu amadurecimento pessoal.

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

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

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

Oliveira, A.C. Avaliação da via inibitória do sinal insulínico em músculo esquelético e sensibilidade à insulina em ratos adultos com doença periodontal. 2014. 59 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

RESUMO

A doença periodontal é considerada, pela Organização Mundial da Saúde, como a sexta complicação clássica do diabético. O diabetes pode influenciar na 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 a resistência insulínica e o grau de fosforilação em serina do IRS-1 em tecido muscular esquelético gastrocnêmio. 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) teste de tolerância à insulina (ITT) para a avaliação da sensibilidade à insulina (n=7); 2) avaliação do grau de fosforilação em serina do IRS-1 em tecido muscular esquelético. 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 no grau de fosforilação em serina do IRS-1 em tecido muscular esquelético gastrocnêmio. Com base nesses resultados, podemos inferir que o aumento de TNF- α em ratos DP observado em estudos anteriores 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.

Oliveira, A.C. Evaluation of the inhibitory pathway of the insulin signal in skeletal muscle and insulin sensitivity in adult rats with periodontal disease. 2014. 59 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

ABSTRACT

Periodontal disease 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 evaluate insulin resistance and assessment of IRS-1 serine phosphorylation status in skeletal muscle *gastrocnemius*. 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) insulin tolerance test (ITT) for evaluating insulin sensitivity (n = 7); 2) assessment of both IRS-1 serine phosphorylation status in skeletal muscle. Observation of results in rats with DP showed: 1) reduction in insulin sensitivity (p <0.05); 2) no change in IRS-1 serine phosphorylation status in skeletal muscle. Based on these results, it could be inferred that the increase in TNF- α in DP rats observed in previous studies 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.).³⁶ 19
- 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 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 33

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 ponta preta, cimento.

Figura 3	Peso corpóreo semanal dos ratos-controle (CN) e com doença periodontal (DP) durante 28 dias. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, n = 15.	34
Figura 4	Média de ingestão alimentar de ratos-controle (CN) e ratos com doença periodontal (DP) durante 28 dias. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, n=15.	34
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.	35
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 p.c.) 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.	36
Figura 7	Avaliação do grau de fosforilação em serina do IRS-1 antes (-) e após (+) o estímulo insulínico no músculo gastrocnêmio (A, B) de ratos-controle (CN) e de ratos com doença periodontal (DP). Em A autorradiografia	37

típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 µg). β-actina foi utilizada como controle. Em **B**, valores do grau de fosforilação em serina do IRS-1, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média ± EPM, n=7.

Lista de Tabelas

Tabela 1	Perda óssea alveolar e suporte ósseo dos ratos- controle (CN) e ratos com doença periodontal (DP)	32
Tabela 2	Parâmetros morfométricos dos ratos-controle (CN) e ratos com doença periodontal (DP)	35

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 etilenodiamino tetra-acético
- EPM: Erro padrão da média
- Foxo1: Forkhead Box protein 01
- 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
- 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 fosfoinositideo
- 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

- SOP: suporte ósseo periodontal
- 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	16
2	OBJETIVO	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	Animais	26
3.2	Índice de Lee	26
3.3	Análise radiográfica da perda óssea alveolar e suporte ósseo periodontal	27
3.4	Análise histológica da perda óssea alveolar	27
3.5	Teste intravenoso de tolerância à insulina (ITT) curto	28
3.6	Avaliação do grau de fosforilação em serina do IRS-1 em tecido muscular esquelético gastrocnêmio	28
3.6.1	Preparação das amostras para “Western blotting”	28
3.6.2	“Western blotting”	28
3.7	Análise estatística	30
4	RESULTADOS	32
4.1	Análise radiográfica do osso alveolar	32
4.2	Análise histológica da inflamação e reabsorção óssea	32
4.3	Peso corpóreo e ingestão alimentar	34
4.4	Parâmetros morfométricos	34
4.5	Teste intravenoso de tolerância à insulina (ITT) curto	35
4.6	Avaliação do grau de fosforilação em serina do substrato do receptor de insulina IRS-1 no músculo esquelético gastrocnêmio	36
5	DISCUSSÃO	38
6	CONCLUSÃO	45
7	REFERÊNCIAS	46

1. INTRODUÇÃO

A doença periodontal 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 382 milhões de pessoas no mundo (2013), sendo que, no Brasil, alcança cerca de 10% da população adulta. Estima-se que em 2035 a população mundial de diabéticos será de 592 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 ascensão, 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 Gastos relacionados ao diabetes mundialmente, em 2013, foram estimados em 11% do total dos gastos com atenção em saúde em indivíduos adultos.²

No Brasil, dados da Vigilância de Fatores de Riscos e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel), de 2011, mostram que a prevalência de diabetes autorreferida na população acima de 18 anos aumentou de 5,3% para 5,6%, entre 2006 e 2011. Ao analisar esse dado de acordo com o gênero, apesar do aumento de casos entre os homens, que eram 4,4%, em 2006, e passaram para 5,2%, em 2011, as mulheres apresentaram uma maior proporção da doença, correspondendo a 6% dessa população. Além disso, a pesquisa deixou claro que as ocorrências são mais comuns em pessoas com baixa escolaridade.⁶

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.⁷ 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,⁸ disfunção endotelial,⁹⁻¹¹ microangiopatia, macroangiopatia,^{10, 11} retinopatia, neuropatia, nefropatia,¹² aumento do tempo de cicatrização de feridas¹³ e risco de infecção.^{14, 15}

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.⁷

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.¹⁶ 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.^{16,}

17

Kasuga et al.^{17, 18} 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.¹⁹ 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.²⁰

Sun et al.²¹ 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.²¹ clonaram a pp185 e denominaram-na substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) e, após três anos, demonstrou-se que outra proteína também migrava na altura da banda desta proteína, que foi denominada IRS-2.²²⁻²⁴ 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.²⁵ demonstraram que esta proteína ativada pode induzir a ativação de outras proteínas, como por exemplo, a proteína quinase-1 dependente de fosfoinosítídeo (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.^{26, 27} A ativação desta proteína é essencial para síntese de glicogênio,²⁸ ação antiapoptótica,²⁹ regulação da síntese lipídica,³⁰ síntese de proteínas,³¹ regulação da expressão gênica³² e transporte de glicose estimulado pela insulina.³³ Outras proteínas da mesma família do IRS-1, como o IRS-3 e IRS-4 também podem estimular o transporte de glicose.³⁴

Buren et al.³⁵ demonstraram que altas concentrações plasmáticas de insulina e glicose em longo prazo, particularmente em combinação, podem produzir, dentro de 24h de cultura de células adiposas de ratos, intensas alterações na capacidade de captação de glicose, no conteúdo de IRS-1/2 e de proteína transportadora de glicose GLUT4 e na fosforilação da 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 curativos para o diabetes mellitus.

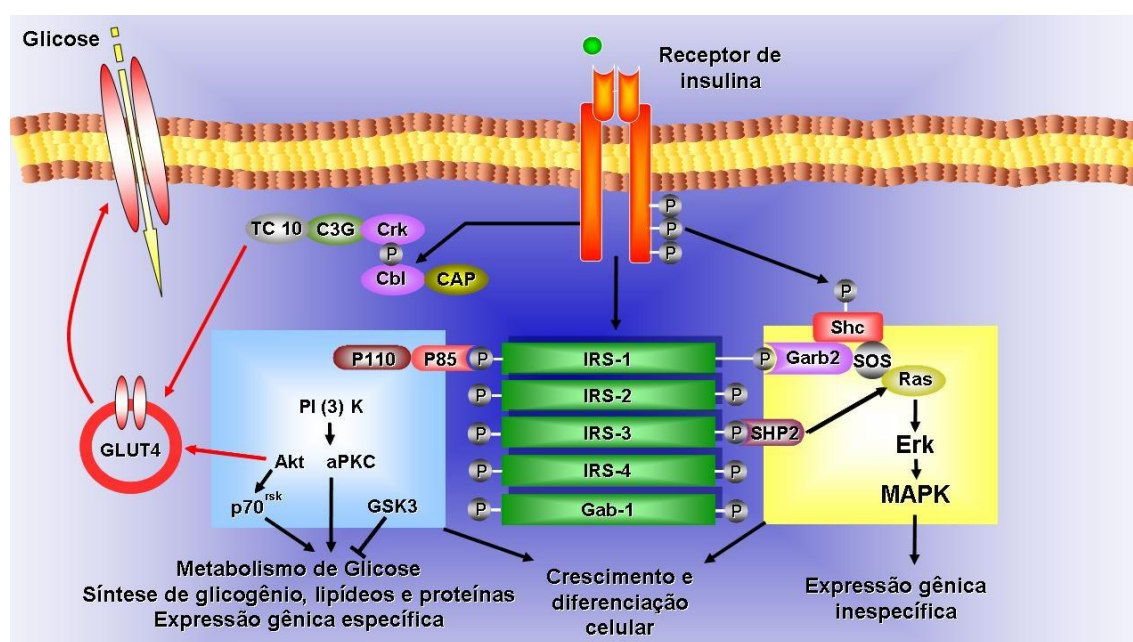


FIGURA 1- As vias de sinalização insulínica. O receptor de insulina é uma tirosina quinase que se autofosforila e catalisa a fosforilação de proteínas intracelulares como as proteínas IRS, Shc e Cbl. Após a fosforilação essas proteínas se ligam a outras moléculas de sinalização através de seus domínios 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 Carvalho et al.).³⁶

A literatura mostra uma associação entre DM e alterações patológicas na cavidade bucal. Papapanou³⁷ 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 Tervonen³⁸ 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.¹⁴

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.³⁸ 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.³⁹

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 foram submetidas à morte celular. 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.⁴⁰

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 estimulariam 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.⁴⁰

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.⁴¹

A detecção de patógenos é um elemento essencial para o início da resposta imune inata, tais como inflamação, e 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 microorganismos infecciosos.⁴²

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.⁴² 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).⁴³ 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.⁴³

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.⁴⁴ Cada TLR detecta PAMPs distintos derivados de vírus, bactérias, fungos ou parasitas. Como exemplos de PAMPs bacterianos podem-se citar lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteínas, flagelina, DNA e RNA.⁴² Sabe-se que o LPS estimula o RNAm para TLR-2 e TLR-4⁴⁵ e causa regulação transcricional de uma ampla gama de genes pró-inflamatórios incluindo TNF- α , IL-1, IL-8 e IL-6.⁴⁶ Portanto, a estimulação dos TLRs provoca uma resposta defensiva imediata, incluindo a produção de uma matriz de peptídeos antimicrobianos e citocinas.⁴⁷

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.⁴⁸ Como visto acima, os LPS podem induzir a produção de várias

citocinas em macrófagos, tais como TNF- α , IL- β , IL-6 que desempenham papel importante na maturação de células progenitoras dos osteoclastos⁴⁹ e ocasionam a ativação de osteoclastos, favorecendo a reabsorção óssea e o aumento de collagenase que propicia maior destruição das fibras do ligamento periodontal, promovendo assim, uma destruição do osso e do tecido conjuntivo.⁵⁰⁻⁵²

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.⁵³ Várias meta-análises têm indicado que o tratamento não cirúrgico da periodontite em pacientes com diabetes tipo 2 tem efeito benéfico sobre a condição glicêmica.⁵⁴⁻⁵⁶ A doença periodontal é considerada fator predisponente para o desenvolvimento de resistência à insulina e DM2 devido à liberação de mediadores inflamatórios.⁵⁷ 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.⁵⁸ 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.⁵⁹ Além disso, o tratamento periodontal reduz as concentrações séricas de TNF- α em indivíduos diabéticos.⁶⁰

A literatura sugere níveis aumentados de resistina em pacientes com periodontite crônica em comparação com controles saudáveis. Resistina induz a resistência à insulina, sendo grande quantidade segregada por adipócitos. Portanto, maiores níveis de resistina em periodontite podem ser considerados fator de risco para o diabetes, diminuindo a sensibilidade à insulina.⁶¹

Um levantamento realizado por Demmer et al.⁶² 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.⁶³ Pessoas com doença periodontal severa e moderada apresentaram concentrações elevadas de glicemia quando comparadas aos indivíduos com saúde periodontal adequada.⁶⁴ Um estudo piloto demonstrou que indivíduos diabéticos apresentam quadro de periodontite severa quatro vezes maior que indivíduos não diabéticos.⁶⁵ Outro recente estudo demonstrou que pacientes com diabetes tipo 2 apresentaram maior risco à doença periodontal severa em comparação a indivíduos não diabéticos.⁶⁶ Tais resultados destacam a necessidade de terapia periodontal de suporte frequente para os pacientes diagnosticados com diabetes mellitus tipo 2.

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 a periodontite, uma vez que pacientes com doença periodontal moderada a severa apresentam aumento nas concentrações séricas de triglicérides e colesterol⁶⁷ e pacientes com hiperlipidemia demonstram maior incidência de periodontite.¹

Níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias podem desempenhar importante papel na associação entre periodontite e dislipidemia. Propõe-se que a periodontite seja associada com a gravidade do distúrbio no metabolismo de lipídeos, assim como o agravamento no estado de hiperlipidemia esteja relacionado com a inflamação periodontal por meio da regulação de citocinas pró-inflamatórias séricas e no fluido crevicular gengival.⁶⁸

Engelbreton et al.⁶⁹ 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.⁷⁰⁻⁷² 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.^{71, 73-75} 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.^{71, 76} Demonstrou-se também que a neutralização dos

efeitos do TNF- α em ratos obesos provocou aumento da sensibilidade insulínica.^{70, 77} Além do mais, observou-se que camundongos deficientes em TNF- α permaneceram sensíveis à insulina quando colocados em dieta rica em gordura.⁷⁸

Lumeng et al.,⁷⁹ 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.⁸⁰

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.⁸¹ 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.⁸²

Conforme descrito anteriormente, há na literatura diversos artigos científicos que relatam uma associação entre 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

O objetivo do presente estudo foi avaliar: 1) resistência à insulina; 2) grau de fosforilação em serina do IRS-1 em músculo esquelético gastrocnêmio (MG) em ratos adultos com doença periodontal induzida.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados 48 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 $23 \pm 2^{\circ}$ 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 cetamina (10%, 80mg/ kg de p.c., ip) com xilazina (2%, 10 mg/ kg de p.c, ip), e a doença periodontal foi induzida por ligadura com fio de seda 4-0 adaptada na região cervical dos primeiros molares inferiores, bilateralmente. Após a colocação da ligadura foram avaliados ingestão alimentar (três vezes por semana) e 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 p.c., i.p.). Os animais dos grupos CN (n=10) e DP (n=10) foram submetidos à remoção do músculo esquelético gastrocnêmio da perna esquerda, do tecido adiposo branco (TAB) periepídídimal e retroperitoneal para análise do peso tecidual. Em seguida os animais foram eutanasiados. 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. Um outro grupo de ratos CN (n=7) e DP (n=7) foi submetido à laparotomia mediana, com retirada de amostras de tecido muscular 90s antes e após a injeção de 1,5 U de insulina regular (i.v. veia porta), a fim de quantificar o grau de fosforilação em serina do substrato do receptor de insulina IRS-1 em tecido muscular esquelético gastrocnêmio, após estímulo insulínico. Em seguida os animais foram eutanasiados. Este projeto foi desenvolvido de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA de acordo com o protocolo 2009-005672.

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 100.

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.⁸³ 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 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 (SOP) foi calculado segundo a fórmula $SOP = (AB / AC) \times 100\%$. Para esta análise foi realizada a calibração dos examinadores.

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. 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 p.c. Amostras de sangue foram colhidas (por secção da cauda) aos 0 (antes da injeção hormonal), 4, 8, 12, 16 minutos após insulina e a glicemia foi medida utilizando 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.⁸⁵ a partir da inclinação da curva de regressão mínima durante a fase linear de declínio da concentração plasmática de glicose, ou seja $t_{1/2} = Ln^2/\text{coeficiente de } x$.

3.6. Avaliação do grau de fosforilação em serina do IRS-1 em tecido muscular esquelético gastrocnêmio

3.6.1. 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%; DTT15%).

3.6.2. “Western blotting”

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

A primeira etapa do Western blotting consistiu na submissão das amostras a uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida. Através deste método, foi possível separar proteínas de acordo com seu peso molecular, sem que as unidades protéicas fossem perdidas, permitindo estudos posteriores nessas frações protéicas. Foi utilizado o método desenvolvido por Laemmli e modificado por Garfin⁸⁶, 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).

- **“Electrophoretic transfer”**

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.⁸⁷ 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. Adicionou-se 1 ml de cada solução de detecção 1 e 2 (do kit de ECL), e incubou-se por 1 minuto. Por fim, foi drenado o excesso de reagente e a membrana de nitrocelulose foi exposta a filme de RX (Hyperfilm ECL– GE Healthcare Buckinghamshire, Germany), durante 10 min à temperatura ambiente. O filme foi processado com solução reveladora e reforçadora GBX (KODAK BRASILEIRA, São Paulo, BR) e solução fixadora e reforçadora GBX (KODAK BRASILEIRA, São Paulo, BR).

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

3.7. 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:

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 aspectos histopatológicos de normalidade. 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).

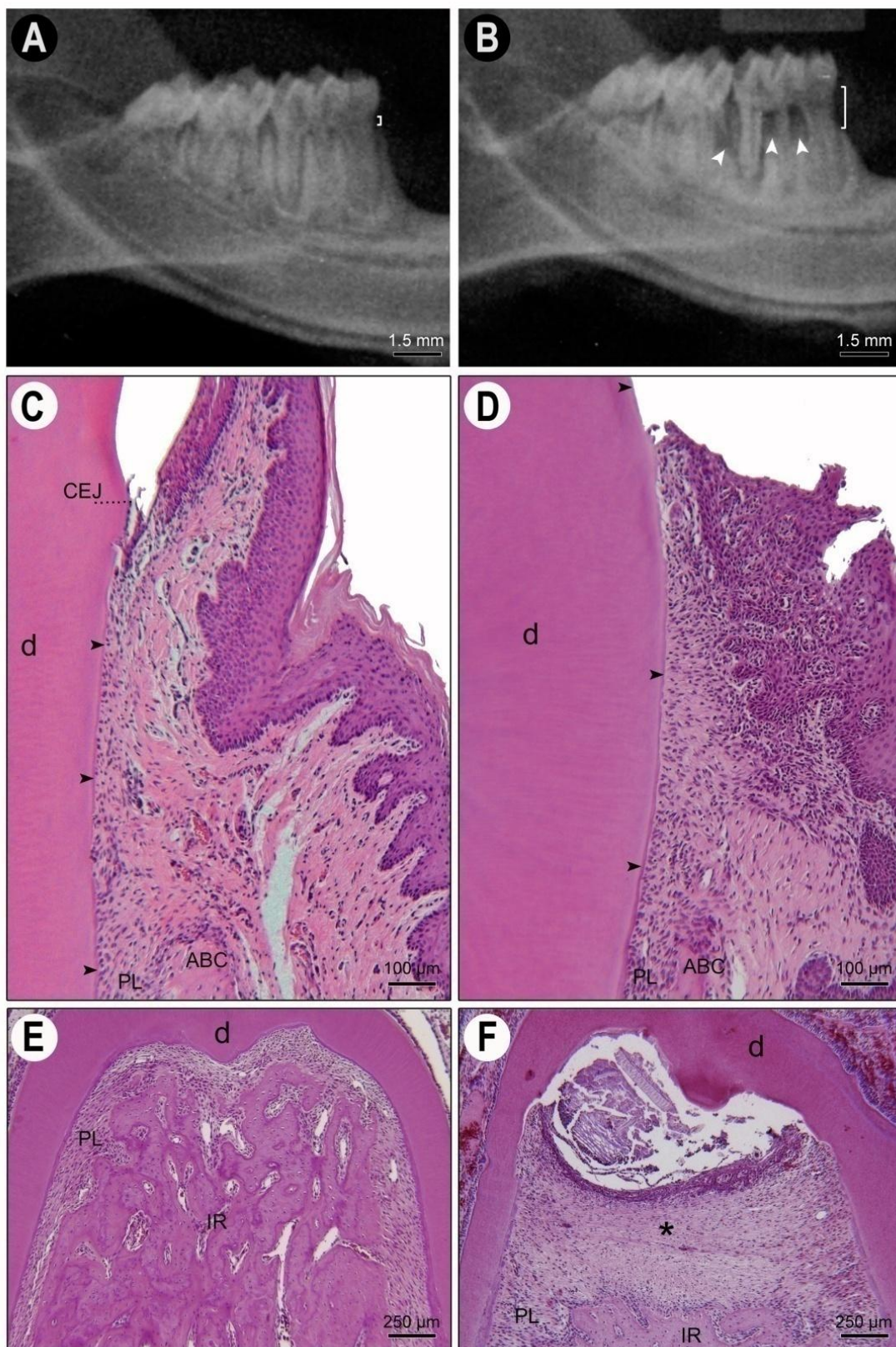


FIGURA 2 - Radiografias digitais das mandíbulas e fotomicrografias dos tecidos periodontais obtidos de animais experimentais. Em A, imagens radiográficas mostrando osso alveolar normal e em B, perda óssea em regiões interproximais e inter-radiculares (seta branca) 28 dias após a periodontite induzida por ligadura. Perda óssea foi medida pela distância da junção cimento-esmalte à crista óssea alveolar (linha branca). Em C, características histológicas 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 ponta preta, 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.

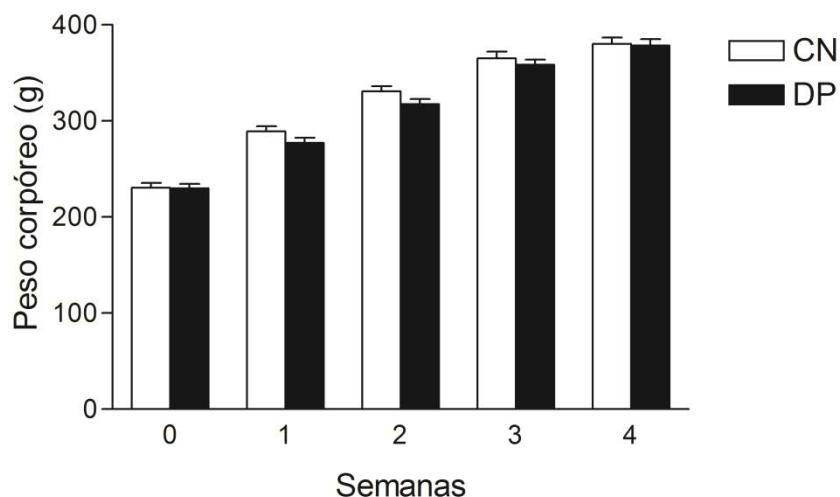


FIGURA 3 - Peso corpóreo semanal dos ratos-controle (CN) e com doença periodontal (DP) durante 28 dias. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, $n = 15$.

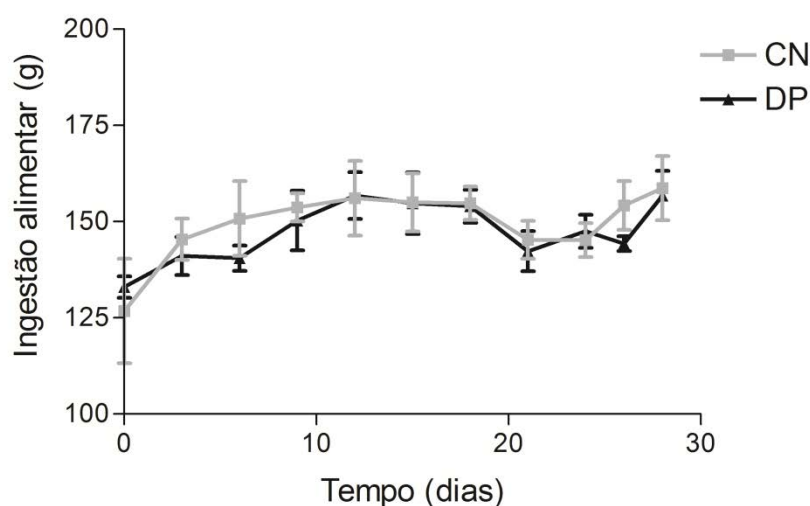


FIGURA 4 - Média de ingestão alimentar de ratos-controle (CN) e ratos com doença periodontal (DP) durante 28 dias. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, $n=15$.

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 (periepídidimal 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	30.58 ± 0.1164	30.47 ± 0.1424
Peso TAB periepídidimal (g)	4.071 ± 0.3599	4.393 ± 0.3473
Peso TAB retroperitoneal (g)	3.523 ± 0.3499	3.146 ± 0.2340
Peso músculo gastrocnêmio (g)	2.057 ± 0.06198	2.072 ± 0.04311

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

4.5. 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.

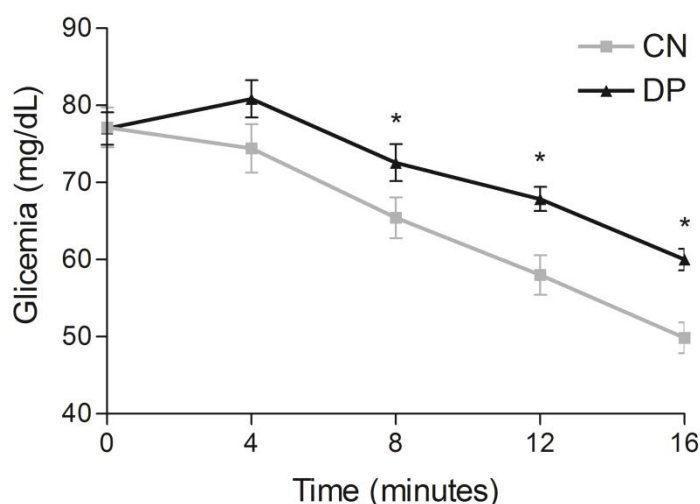


FIGURA 5 - Teste intravenoso de tolerância à insulina nos ratos-controle (CN) e com doença periodontal (DP). As amostras de sangue foram coletadas nos tempos de 0 (basal), 4, 8, 12, 16 minutos após a injeção de insulina. Os valores das glicemias são apresentados como média ± EPM, n=7.

* $p < 0.05$ 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).

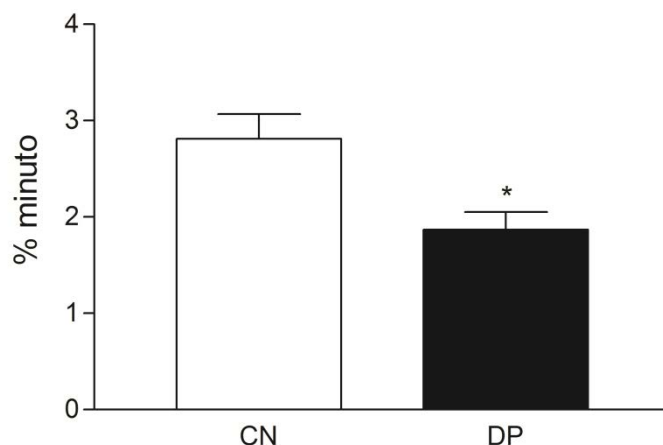


FIGURA 6 - Velocidade de desaparecimento da glicose (Kitt) em ratos do grupo controle (CN) e do grupo com doença periodontal (DP). Os animais foram submetidos ao teste de tolerância à insulina (0,75U / kg p.c.) e as amostras foram coletadas nos tempos 0 (basal), 4, 8, 12, 16 minutos após a injeção de 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.

4.6. Avaliação do grau de fosforilação em serina do substrato do receptor de insulina IRS-1 no músculo esquelético gastrocnêmio

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 músculo esquelético gastrocnêmio (Figura 7).

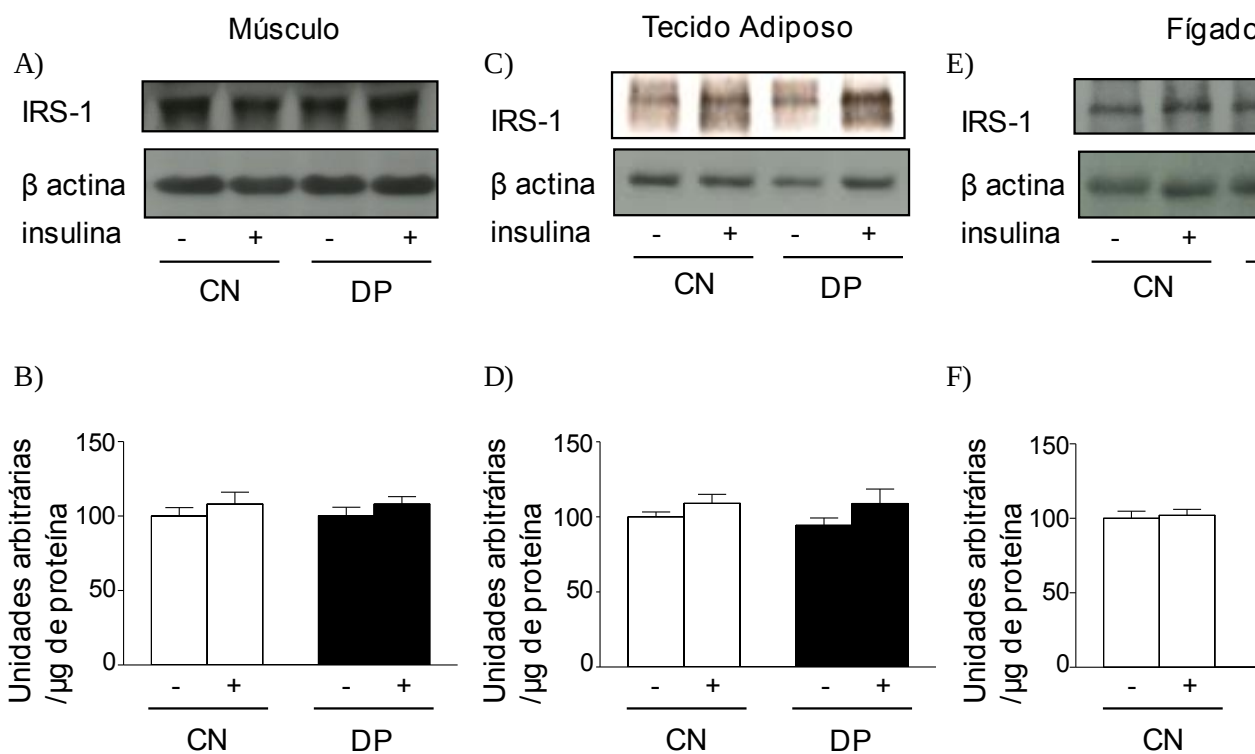


FIGURA 7 - Avaliação do grau de fosforilação em serina do IRS-1 antes (-) e após (+) o estímulo insulínico no músculo gastrocnêmio (A, B). Em **A**, autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 μg). β-actina foi utilizada como controle. Em **B**, valores do grau de fosforilação em serina do IRS-1, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média ± EPM, n=7.

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.⁵³

O presente estudo utilizou o modelo de doença periodontal induzida por ligadura em ratos. As imagens radiográficas e histológicas (Figura 2) 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.⁸⁸

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.⁸⁹ 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. A resistência insulínica, por sua vez, é um dos principais fatores que contribuem para o desenvolvimento do Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2).⁹⁰

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.⁸⁴

Gorman et al.⁹¹ 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 (periepididimal e

retroperitoneal) e muscular (gastrocnêmio) (Tabela 2) entre os dois grupos estudados (CN e DP).

Segundo Cesaretti e Kolmann Junior,⁹² 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.⁹³

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).⁹⁴⁻⁹⁶ 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.⁹⁶

Segundo Kahn et al.,⁹⁶ 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.⁹⁶⁻⁹⁸

Normalmente, o sinal insulínico está alterado em modelos de resistência à insulina.⁹⁸⁻¹⁰⁰ O presente estudo, no intuito de averiguar tal relação, realizou a avaliação do sinal insulínico. Resultados de nossos estudos anteriores 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.

No fígado não se observou alteração no grau de fosforilação em tirosina da pp185. Esses resultados estão de acordo com Chiba et al.^{99, 101} 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.¹⁰² sugerem que o fígado pode compensar a resistência à insulina encontrada no tecido adiposo e muscular para prevenir a hiperglicemia.

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.^{22, 103} 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 gerado¹⁰⁴ 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.^{104, 105} 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.^{106, 107}

A diminuição da fosforilação em tirosina no tecido muscular observada nos nossos estudos anteriores, ao contrário do esperado, não foi decorrente do aumento do grau de fosforilação em serina do IRS-1 neste tecido (Figura 7). 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),¹⁰⁸ proteína ligada a receptor de fator de crescimento 10 (Grb10) e 14 (Grb14),^{109, 110} supressores da sinalização de citocinas (SOCS1 e SOCS3)¹¹¹ e proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B)¹¹² que podem diminuir a função do receptor de insulina, bloqueando sua interação com proteínas IRS ou modificando sua atividade quinase.

Frittitta et al.¹¹³ observaram que o PC-1 liga-se ao IR tanto in vivo como in vitro, e subsequentemente, 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.¹¹⁴ 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.¹¹⁰ Além disso, foi demonstrado na literatura que ambos os modelos de camundongos *knockout* para Grb10 e Grb14 apresentam melhora na homeostase da glicose corpórea.^{110, 114}

Foxo1 foi identificada pela primeira vez como um substrato da Akt na sinalização da insulina,^{115, 116} e a fosforilação Akt – Foxo1 serve como um poderoso indicador da sensibilidade à insulina na regulação metabólica de uma variedade de células e tecidos.¹¹⁷⁻¹¹⁹ Recentemente, foi demonstrado que a deleção dos genes IRS-1 e IRS-2 no fígado de ratos preveniu ativação da fosforilação hepática de Akt/Foxo1, resultando no desenvolvimento de hiperglicemia, hiperinsulinemia e resistência à insulina.^{117, 120} Já a deleção de

IRS-1 e IRS-2 no músculo cardíaco provocou diminuição na fosforilação de Akt (T308 e S473) e Foxo1 (S253), causando morte súbita de animais machos numa idade de 6 a 8 semanas.¹¹⁹ Tais resultados indicam que a perda de IRS-1 e IRS-2 pode servir como uma tecla fundamental para a resistência à insulina e insuficiência cardíaca. Estudos em ratos demonstraram que a inativação de Akt, subsequente à supressão de IRS-1 e IRS-2, atua como um mecanismo fundamental para a resistência à insulina em tecidos responsivos à insulina.¹²¹

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 2.¹²² 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-3.¹²³ Emanuelli et al.¹²² 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.¹²⁴

Conforme citado anteriormente, a PTP1B também atua como um regulador negativo do sinal insulínico¹¹² através da desfosforilação de resíduos de tirosina do IR e IRS-1.^{125, 126} 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.^{127, 128} A super expressão da PTP1B está relacionada à redução da captação de glicose no músculo¹²⁸ e a ausência de PTP1B aumenta a sensibilidade à insulina e restaura a ação desta em miócitos pré-tratados com TNF- α .¹²⁹

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.¹³⁰ A incubação de adipócitos por 24h com TNF- α reduz a expressão gênica de GLUT4.¹³¹

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.¹³² 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.⁷¹

A periodontite crônica está associada à elevação sérica das concentrações de TNF- α em ratos⁵⁹ e em humanos sistemicamente saudáveis,⁵⁸ 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.⁶⁷ Além do aumento de TNF- α , alguns estudos demonstram que a DP está associada à elevação das concentrações séricas de IL-6¹³³ em humanos.

Alguns estudos avaliaram marcadores tais como IL-6, TNF- α , proteína-C reativa e IL-1 β relacionando-os à resistência à insulina e controle glicêmico.¹³⁴⁻¹³⁷

Conforme descrito anteriormente, era esperado aumento no grau de fosforilação em serina do IRS-1. Entretanto, no grupo DP não se observou alteração nesta fosforilação no tecido muscular em comparação ao grupo CN (Figura 7).

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-6.¹³⁸ Do mesmo modo, o tratamento periodontal em pacientes com DM2 também reduz as concentrações plasmáticas de TNF- α ^{60, 139, 140}, IL-6^{133, 140, 141} e de CRP^{138, 140}, assim como reduz a glicemia e insulinemia em jejum e o índice de HOMA-IR, e aumenta as concentrações plasmáticas de adiponectina.¹⁴⁰

Conforme descrito na introdução, 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.¹⁴²

A ativação de TLRs pode levar a degradação do inibidor kappa B ($\text{I}\kappa\text{B}$) e isto promove a translocação nuclear de fator de transcrição nuclear kB (NF-kB) e subsequente produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas.⁴³ 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 DM2.¹⁴³ Kim et al.¹⁴⁴ 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 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.¹⁴⁵

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. 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 resistência à insulina e alterações na sinalização insulínica relacionadas ao desenvolvimento de síndromes metabólicas.

6. CONCLUSÃO

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

- reduziu a sensibilidade à insulina;
- não promoveu alteração no grau de fosforilação em serina do IRS-1 em tecido muscular esquelético gastrocnêmio.

7. 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. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*, 6th edn. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2013.
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. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. *Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica: diabetes mellitus*. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.
7. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2007;30 Suppl 1:S42-7.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.

12. 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.
13. Peppia M, Raptis SA. Glycooxidation and wound healing in diabetes: an interesting relationship. *Curr Diabetes Rev.* 2011;7(6):416-25.
14. Loe H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 1993;16(1):329-34.
15. Patterson JE, Andriole VT. Bacterial urinary tract infections in diabetes. *Infect Dis Clin North Am.* 1997;11(3):735-50.
16. Kasuga M, Hedo 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.

24. 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.
25. 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 B α . *Curr Biol*. 1997;7(4):261-9.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell*. 1997;88(4):435-7.
30. 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.
31. Hajdуч E, Alessi DR, Hemmings BA, Hundal HS. Constitutive activation of protein kinase B α 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.
32. Vanhaesebroeck B, Alessi DR. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J*. 2000;346 Pt 3:561-76.
33. 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.
34. 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.

35. 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.
36. Carnevali JB, Zecchin HG, Saad MJA. Vias de sinalização da insulina. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2002;46(4):419-25.
37. Papapanou PN. Periodontal diseases: epidemiology. *Ann Periodontol*. 1996;1(1):1-36.
38. Oliver RC, Tervonen T. Diabetes--a risk factor for periodontitis in adults? *J Periodontol*. 1994;65(5 Suppl):530-8.
39. 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.
40. 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.
41. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet*. 2005;366(9499):1809-20.
42. Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*. 2011;34(5):637-50.
43. Tillich M, Arora RR. Modulation of toll-like receptors by insulin. *Am J Ther*. 2011;18(5):e130-7.
44. 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.
45. Kocgozlu L, Elkaim R, Tenenbaum H, Werner S. Variable cell responses to *P. gingivalis* lipopolysaccharide. *J Dent Res*. 2009;88(8):741-5.
46. Wright SD. Toll, a new piece in the puzzle of innate immunity. *J Exp Med*. 1999;189(4):605-9.
47. Akira S. Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem*. 2003;278(40):38105-8.
48. Mayrand D, Holt SC. Biology of asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species. *Microbiol Rev*. 1988;52(1):134-52.

49. 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.
50. 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.
51. 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.
52. 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.
53. Taylor GW, Borgnakke WS. Periodontal disease: associations with diabetes, glycemic control and complications. *Oral Dis*. 2008;14(3):191-203.
54. Darre L, Vergnes JN, Gourdy P, Sixou M. Efficacy of periodontal treatment on glycaemic control in diabetic patients: a meta-analysis of interventional studies. *Diabetes Metab* 2008;34:497-506.
55. Teeuw WJ, Gerdes VE, Loos BG. Effect of periodontal treatment on glycemic control of diabetic patients: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care* 2010;33:421-427.
56. Simpson TC, Needleman I, Wild SH, Moles DR, Mills EJ. Treatment of periodontal disease for glycaemic control in people with diabetes. *Cochrane Database Syst Rev* 2010;5:CD004714.
57. Mealey B, Oates T, American Academy of Periodontology. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol*. 2006;77(8):1289-303.
58. Passoja A, Puijola I, Knuuttila 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.
59. 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.

60. 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(1):17-22.
61. Devanoorkar A, Kathariya R, Guttiganur N, Gopalakrishnan D, Bagchi P. Resistin: A potential biomarker for periodontitis influenced diabetes mellitus and diabetes induced periodontitis. *Disease Markers*. 2014:1-7.
62. 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.
63. 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.
64. Katz J. Elevated blood glucose levels in patients with severe periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2001;28(7):710-2.
65. 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.
66. Al-Khabbaz AK. Type 2 diabetes mellitus and periodontal disease severity. *Oral Health Prev Dent*. 2014;12(1):77-82.
67. Taleghani F, Shamaei M, Shamaei M. Association between chronic periodontitis and serum lipid levels. *Acta Med Iran*. 2010;48(1):47-50.
68. Fentoglu O, Koroglu BK, Hiçyılmaz H, Sert T, Ozdem M, Sutçu R. Pro-inflammatory cytokine levels in association between periodontal disease and hyperlipidaemia. *J Clin Periodontol*. 2011;38:8-16.
69. 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.
70. Hotamisligil G, Shargill N, Spiegelman B. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993;259(5091):87-91.
71. 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(5249):665-8.

72. 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.

73. 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(35):26055-8.

74. Hotamisligil G, Spiegelman B. Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes*. 1994;43(11):1271-8.

75. Kroder G, Bossenmaier B, Kellerer M, Capp E, Stoyanov B, Mühlhöfer A, 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(6):1471-7.

76. Kanety H, Feinstein R, Papa MZ, 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(40):23780-4.

77. 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-alpha (TNF-alpha)-induced insulin resistance: evidence for differential regulation of insulin signaling by TNF-alpha. *Endocrinology*. 1998;139(12):4928-35.

78. Uysal K, Wiesbrock S, Marino M, Hotamisligil G. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature*. 1997;389(6651):610-4.

79. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2007;117(1):175-84.

80. 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.

81. Jager J, Grémeaux T, Cormont M, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. Interleukin-1beta-induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology*. 2007;148(1):241-51.

82. 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.
83. 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.
84. 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(3):350-6.
85. 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.
86. Garfin DE. One-dimensional gel electrophoresis. *Methods Enzymol*. 1990;182:425-41.
87. Kruger NJ, Hammond JB. Immunodetection of proteins on "western" blots using (125)i-labeled protein a. *Methods Mol Biol*. 1988;3:409-17.
88. 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.
89. 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.
90. Frojdo S, Vidal H, Pirola L. Alterations of insulin signaling in type 2 diabetes: A review of the current evidence from humans. *Biochimica et BiophysicaActa*. 2009;83-92.
91. 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.
92. Cesaretti ML, Kohlmann Junior O. [Experimental models of insulin resistance and obesity: lessons learned]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2006;50(2):190-7. Português.

93. 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.
94. Reusch JE. Current concepts in insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, and the metabolic syndrome. *Am J Cardiol.* 2002;90(5A):19G-26G.
95. Taylor SI, Arioglu E. Syndromes associated with insulin resistance and acanthosis nigricans. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 1998;9(2-4):419-39.
96. Kahn CR, Weir GC, King GL, Jacobson AM, Moses AC, Smith RJ. *Joslin: diabetes melito.* 14nd ed. Porto Alegre: Artmed; 2009.
97. 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.
98. 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.
99. 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.
100. 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.
101. 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.
102. Cho Y, Ariga M, Uchijima Y, Kimura K, Rho JY, Furuhata 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.
103. 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 lipoatrophy and obesity. *Nat Med.* 2001;7(8):941-6.

104. 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.
105. 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.
106. 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.
107. 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.
108. 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.
109. Morrione A. Grb10 proteins in insulin-like growth factor and insulin receptor signaling (review). *Int J Mol Med*. 2000;5(2):151-4.
110. 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.
111. 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.
112. 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.
113. 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.

114. 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.
115. Guo S, Rena G, Cichy S, He X, Cohen P, Unterman T. Phosphorylation of serine 256 by protein kinase B disrupts transactivation by FKHR and mediates effects of insulin on insulin-like growth factor-binding protein-1 promoter activity through a conserved insulin response sequence. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274:17184-17192.
116. Rena G, Guo S, Cichy SC, Unterman TG, Cohen P. Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274:17179-17183.
117. Guo S, Copps KD, Dong X, Park S, Cheng Z, Poci A, Rossetti L, Sajan M, Farese RV, White MF. The Irs1 branch of the insulin signaling cascade plays a dominant role in hepatic nutrient homeostasis. *Molecular and Cellular Biology*. 2009;29:5070-5083.
118. Gonzalez E, Flier E, Molle D, Accili D, McGraw TE. Hyperinsulinemia leads to uncoupled insulin regulation of the GLUT4 glucose transporter and the FoxO1 transcription factor. *PNAS*. 2011;101:10162-10167.
119. Qi Y, Xu Z, Zhu Q, Thomas C, Kumar R, Feng H, Dostal DE, White MF, Baker KM, Guo S. Myocardial loss of IRS1 and IRS2 causes heart failure and is controlled by p38 α MAPK during insulin resistance. *Diabetes*. 2013;62:3887-3900.
120. Dong XC, Copps KD, Guo S, Li Y, Kollipara R, DePinho RA, White MF. Inactivation of hepatic Foxo1 by insulin signaling is required for adaptive nutrient homeostasis and endocrine growth regulation. *Metabolism*. 2008;8:65-76.
121. Guo S. Insulin signaling, resistance, and metabolic syndrome: insights from mouse models into disease. *Journal of Endocrinology*. 2014;220:T1-T23.
122. 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- α in the adipose tissue of obese mice. *J Biol Chem*. 2001;276(51):47944-9.

123. 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.
124. Farrell GC. Signalling links in the liver: knitting SOCS with fat and inflammation. *J Hepatol*. 2005;43(1):193-6.
125. 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.
126. 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.
127. 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.
128. 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.
129. 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.
130. Stephens JM, Pekala PH. Transcriptional repression of the C/EBP- α and GLUT4 genes in 3T3-L1 adipocytes by tumor necrosis factor- α . Regulation is coordinate and independent of protein synthesis. *J Biol Chem*. 1992;267(19):13580-4.
131. Rotter V, Nagaev I, Smith U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor- α , overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem*. 2003;278(46):45777-84.

132. 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.
133. 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.
134. Auyeung L, Wang PW, Lin RT, Hsieh CJ, Lee PY, Zhuang RY. Evaluation of periodontal status and effectiveness of non-surgical treatment in patients with type 2 diabetes mellitus in Taiwan for 1-year period. *J Periodontol*. 2012;83(5):621-628.
135. Beisswenger PJ, Brown WV, Ceriello A, Le NA, Goldberg RB, Cooke JP. Meal induced increases in C-reactive protein, interleukin-6 and tumor necrosis factor α are attenuated by prandial + basal insulin in patients with type 2 diabetes. *Diabet Med*. 2011;28(9):1088-1095.
136. Chen L, Luo G, Xuan D, Wei B, Liu F, Li J. Effects of non-surgical periodontal treatment on clinical response, serum inflammatory parameters, and metabolic control in patients with type 2 diabetes: a randomized study. *J Periodontol*. 2012;83(4):435-443.
137. Kardesler L, Buduneli N, Cetinkalp S, Kinane DF. Adipokines and inflammatory mediators after initial periodontal treatment in patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2010;81(1):24-33.
138. 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.
139. 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.
140. 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.

141. 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.
142. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(7):499-511.
143. 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.
144. 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.
145. 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.