

RENATO FELIPE PEREIRA

**AVALIAÇÃO DA FOSFORILAÇÃO DA AKT E DO
CONTEÚDO DA PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE
GLICOSE GLUT4 EM MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS
ADULTOS COM LESÃO PERIAPICAL**

RENATO FELIPE PEREIRA

**AVALIAÇÃO DA FOSFORILAÇÃO DA AKT E DO
CONTEÚDO DA PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE
GLICOSE GLUT4 EM MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS
ADULTOS COM LESÃO PERIAPICAL**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do *Campus* de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, para obtenção do título de "Mestre em Ciências Fisiológicas".
Orientadora: Profa. Adj. Doris Hissako Sumida.

Dados Curriculares

Nascimento: 18.10.1989, São Caetano do Sul - SP.

Filiação: Aparecida Lino Pereira

Antônio Paulo Pereira

2008/2012: Curso de Graduação em Bacharelado em Educação Física pela União das Faculdades dos Grandes Lagos – UNILAGO.

2013/2014: Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia do *Campus* de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

Dedico este trabalho

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

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

Agradecimentos

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

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

A todos os amigos e colegas de laboratório, em especial a Maria Sara de Lima Coutinho, Fernando Yamamoto Chiba, Rita de Cássia Alves Nunes, Mariana Lopes Benites, Amanda Gomes, Nayara Rodrigues Alves, Natália Vieira Magalhães, Jéssica Cristiane Bonilha, Lara Mariano Pinheiro, Leonardo Raniel Figueiredo, Thaís Verônica Saori Tsosura, Natália Francisco Scaramele e Kelly Cristina dos Santos.

A todos os professores e alunos do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas pelo agradável e pacífico convívio ao longo deste tempo.

Aos Prof. Edilson Ervolino e Luciano Tavares Angelo Cintra pelo apoio e pelos ensinamentos.

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

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

Aos funcionários da Seção Técnica de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão (STAEPE), Samuel Aparecido Patim, Maurício Hiromi Tutumi, Patrick Santos Nogueira da Silva e Reinaldo Inácio Mendes.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da FOA/UNESP, Valéria Queiroz Marcondes Zagatto, Cristiane Regina Lui Mattos, Lilian Sayuri Mada pela atenção dispensada e grande disposição em atender.

Aos funcionários do Setor de Biotério, Alan Roge Senerine Carvalho, Camilo Roberto Venancio e João Batista Alves Correa.

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

A todos meu muito obrigado pela indispensável ajuda na execução de cada uma das etapas deste trabalho e por amenizarem a aspereza do caminho.

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

A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê. (Arthur Schopenhauer)

PEREIRA, R.F. **Avaliação da fosforilação da Akt e do conteúdo da proteína transportadora de glicose GLUT4 em músculo esquelético de ratos adultos com lesão periapical.** 2014. 81f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

RESUMO

Atualmente, há certo consenso dentro da área odontológica relacionado ao fato de que inflamações crônicas nos dentes, podem eventualmente ocasionar desordens sistêmicas. A Lesão Periapical (LP) é caracterizada como uma inflamação oral e está associada ao aumento da quantidade de citocinas pró-inflamatórias, tais como, IL-6 e TNF- α , que possivelmente induzem resistência insulínica. A resistência à insulina pode ser definida como o estado no qual existe uma menor captação tecidual de glicose em resposta ao estímulo insulínico; no entanto, os mecanismos que causam resistência à insulina não são totalmente compreendidos. Estudos anteriores do nosso laboratório demonstraram que ratos adultos com LP apresentam alterações na etapa inicial da via do sinal insulínico e menor sensibilidade à insulina. Baseado nisto, mais estudos são necessários para verificar se estas alterações também estão presentes na continuidade da cascata insulínica e na expressão da proteína transportadora de glicose 4 (GLUT4). Os objetivos do presente estudo foram avaliar em ratos com LP: 1) glicemia e insulinemia (n=10); 2) sensibilidade à insulina por meio do índice de HOMA-IR (n=10); 3) grau de fosforilação em serina/treonina da Akt em tecido muscular esquelético gastrocnêmio (GM) (n=6); 4) conteúdo de GLUT4 e seu índice de translocação para membrana plasmática em GM (n=5). Para tanto, foram utilizados 32 ratos Wistar (2 meses de idade) distribuídos em dois grupos: a) ratos do grupo controle, sem a LP; b) ratos com LP induzida em molares superiores direito empregando-se broca em aço carbono dotada de esfera na extremidade com 0,1 mm. A partir dos resultados pôde-se observar que os ratos com LP apresentaram: 1) nenhuma diferença na glicemia e insulinemia; 2) redução na sensibilidade à insulina, avaliado pelo índice de HOMA-IR; 3) diminuição no grau de fosforilação em serina da Akt após estímulo insulínico em GM, mas nenhuma diferença no grau de fosforilação da Akt em treonina; 4) redução do conteúdo de GLUT4 na membrana plasmática e de seu índice de translocação, mas sem alteração no microsoma. A partir desses resultados podemos concluir que a LP promoveu resistência à

insulina, alterou etapas posteriores do sinal insulínico e reduziu o conteúdo de GLUT4 na membrana plasmática e seu índice de translocação.

Palavras-chave: Doenças periapicais. Resistência à insulina. Transportador de glucose tipo 4. Diabetes mellitus tipo 2.

PEREIRA, R.F. **Evaluation of phosphorylation of akt and content of glucose transporter protein glut4 in skeletal muscle of rats with periapical lesion.** 2014. 81f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

ABSTRACT

Currently, there is some consensus in the dental area related to the fact that chronic inflammation in teeth may eventually lead to systemic disorders. Periapical lesion (PL) is characterized as an oral inflammation and it is associated to the increase of proinflammatory cytokines, such as IL-6 and TNF-alpha, that can possibly induce insulin resistance. Insulin resistance can be defined as the state in which there is a glucose uptake decrease by tissue in response to insulin stimulation, however, the mechanisms that cause insulin resistance are not totally understood. Former studies from our laboratory demonstrated that adult rats with periapical lesion showed changes in the initial stage of insulin signaling and lower insulin sensitivity. Based on that, more studies are needed in order to verify whether these changes are also present in the continuity of the insulin signaling cascade and glucose transporter protein 4 (GLUT4) expression. The aims of this study were to evaluate in rats with PL: 1) plasma glucose and insulin levels (n=10); 2) insulin sensitivity by the HOMA-IR index (n=10); 3) serine/ threonine phosphorylation status of Akt in skeletal muscle gastrocnemius (GM) (n=6); 4) content of GLUT4 protein and its translocation index for plasma membrane in GM (n=5). Therefore, 32 Wistar rats (2 months old) were used and divided into two groups: a) control rats without PL b) rats with PL induced in right upper molars by using a carbon steel drill fitted with ball 0.1 mm. From the results it was observed that rats with PL showed: 1) no difference in blood glucose and insulin; 2) decrease in insulin sensitivity assessed by HOMA-IR index; 3) decrease in the serine phosphorylation status of Akt in GM after insulin stimulation, but no difference in the phosphorylation status of Akt in threonine; 4) decrease in the GLUT4 content in the plasma membrane, but no change in the microsome. From these results we conclude that the PL promoted insulin resistance, impaired the later steps of insulin signal and reduced the amount of GLUT4 in the plasma membrane and its translocation index.

Keywords: Periapical diseases. Insulin resistance. Glucose Transporter Type 4. Type 2 diabetes mellitus.

Lista de Figuras

- Figura 1** **As vias de sinalização insulínica.** O receptor de insulina é uma tirosina quinase que se autofosforila e catalisa a fosforilação de proteínas intracelulares como as proteínas IRS, Shc e Cbl. Após a fosforilação, essas proteínas ligam-se a outras moléculas de sinalização por meio de seus domínios SH2, resultando na ativação de vias de sinalização intracelular como a via da PI 3-quinase, a cascata da MAPK e a ativação do TC10 via CAP/Cbl. Essas vias regulam o transporte de glicose, a síntese de glicogênio, lipídeos e proteínas, coordenando e integrando o metabolismo intermediário (CARVALHEIRA *et al.*, 2002). 25
- Figura 2** Análise histológica da região periapical nos grupos controle (CN) e ratos com lesão periapical (LP). Coloração com hematoxilina e eosina (H&E) mostra aparência normal de polpa dentária e tecidos periodontais no grupo CN (A). A lesão foi estabelecida na região periapical no grupo LP (B). Abreviaturas e símbolos: ab, osso alveolar; *, infiltrado inflamatório; dp, polpa dentária; rn, restos de necrose pulpar; pdl, ligamento periodontal. Aumento: 250x; Barra de escala: 100µm. 34
- Figura 3** Massa corpórea dos ratos controle (CN) e ratos com lesão periapical (LP) durante 30 dias. Os valores são expressos como média ± EPM, n=21. 35
- Figura 4** Ingestão alimentar de ratos controle (CN) e ratos com lesão periapical (LP) durante 30 dias. Os valores são expressos como média ± EPM, n=21. 35
- Figura 5** Avaliação do grau de fosforilação em serina e treonina da Akt antes (-) e após (+) o estímulo insulínico no músculo esquelético gastrocnêmio de ratos controle (CN) e ratos com lesão periapical (LP). Em **A** autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 µg). β-actina foi utilizada como controle. Em **B** e **C**, valores do grau de fosforilação em serina e treonina da Akt, respectivamente, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média ± EPM, n=6. * p<0,05 insulina (-) vs. insulina (+); # p<0,05 CN (+) vs. LP (+). 37

Figura 6

Avaliação do Conteúdo de GLUT4 em músculo esquelético de ratos controle (CN) e ratos com lesão periapical (LP). Em **A**, membrana plasmática (PM); em **B** microssoma (M); em **C**, o índice de translocação dos grupos CN e LP. Os resultados foram apresentados como média \pm EPM, n=5. A significância foi considerada quando $p < 0,05$.

Lista de Tabelas

Tabela 1	Glicemia(mmol/L), insulinemia (μ IU/mL) e índice HOMA-IR dos ratos controle (CN) e ratos com lesão periapical (LP).	36
-----------------	--	----

Lista de Abreviaturas

- Akt/PKB: Proteína quinase B
- Akt/PKB α : Proteína quinase B-alfa
- Akt/PKB β : Proteína quinase B-beta
- Akt/PKB γ : Proteína quinase B-gama
- AMPK: Proteína quinase ativada por AMP
- Cbl: *Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene*
- CN: Grupo controle
- dl: Decilitro
- DM: Diabetes Mellitus
- DM1: Diabetes Mellitus tipo 1
- DM2: Diabetes Mellitus tipo 2
- DTT: Ditioneitol
- EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EPM: Erro padrão da média
- FSTL1: Folistatina-like1
- g: Grama
- GLUT4: Proteína transportadora de glicose-4
- GM: Músculo esquelético gastrocnêmio
- GS: Glicogênio sintase
- GSK-3: Glicogênio sintase quinase-3
- HDL-C: Lipoproteína de alta densidade
- HOMA-IR: Modelo de Avaliação da Homeostase - Resistência à Insulina
- IDF: *International Diabetes Federation* IKK: I κ B quinase
- IgG: Imunoglobulina G
- IL-1 α : Interleucina-1 alfa
- IL-10: Interleucina-10
- IL-1 β : Interleucina-1 beta
- IL-4: Interleucina-4
- IL-6: Interleucina-6
- 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
- IRS-5: Substrato-5 do receptor de insulina
- IRS-6: Substrato-6 do receptor de insulina
- IκB: Inibidor do fator de transcrição nuclear kappa B
- JNK: c-Jun amino-terminal kinase
- kDa: Kilodalton
- kg: Quilograma
- KIF3: *Kinesin superfamily protein 3*
- KIF5B: Kinesin 5b
- Kitt: Velocidade de decaimento da glicose
- L: Litro
- LP: Lesão periapical
- LPS: Lipopolissacarídeo
- M: microssoma
- M: Molar
- MAPK: Proteína quinase ativada por Ras-mitógeno
- mg: Miligrama
- MK: Midkine
- mL: Mililitro
- mm: Milímetro
- mM: Milimolar
- mmol: Milimol
- mV: Milivolt
- Myo1c: Myosin 1c
- Myo5a: Myosin-Va
- Myo5b: Myosin VB
- NF-κB: Fator de transcrição nuclear kappa B
- nm: Nanômetro
- OMS: Organização Mundial de Saúde

- p110: Subunidade catalítica da PI3K
- p85: Subunidade regulatória da PI3K
- PAK - *P21-Activated Kinase*
- PDK1: Proteína quinase- 1 dependente de fosfoinosítídeo
- PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinase
- PIP3: Fosfoinosítídeo fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
- PM: membrana plasmática
- pp185: IRS-1/IRS-2
- RI: Receptor de insulina
- RPM: Rotações por minuto
- SB: Solução basal
- SDS: Dodecil sulfato de sódio
- SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida em dodecil sulfato de sódio
- Ser: Serina
- SH2: Domínios com homologia a "Src 2"
- Shc: *Src homology collagen*
- SREBPs: *sterol regulatory element-binding protein*
- TC10: *Small guanosine 5'-triphosphate (GTP) binding protein*
- TEMED: Tetrametil etilenodiamina
- Thr: Treonina
- TLR-4: Receptor Toll-like 4
- TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa
- Tris: Hidroximetil aminometano
- UA: Unidade arbitrária
- V: Volt
- μ L: Microlitro
- μ m: Micrômetro

Sumário

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVO	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1	Animais	28
3.2	Determinação da glicemia (método de glicose-oxidase)	29
3.3	Determinação da insulinemia	29
3.4	Análise do HOMA-IR	30
3.5	Avaliação do grau de fosforilação da Akt (Ser308/Thr473) em músculo esquelético:	30
3.5.1	Preparação das amostras para “Western Blotting”	30
3.5.2	“Western blotting”:	30
3.6	Quantificação do conteúdo da proteína GLUT4 e seu índice de translocação	32
3.7	Análise Estatística	33
4	RESULTADOS	34
4.1	Análise Histológica	34
4.2	Massa Corpórea e Ingestão Alimentar	34
4.3	Glicemia, Insulinemia e HOMA-IR	36
4.4	Avaliação do grau de fosforilação em serina/treonina da Akt no músculo esquelético	36
4.5	Expressão protéica de GLUT4 no músculo esquelético	38
5	DISCUSSÃO	38

6 RESUMO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS	46
7 CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

A possível ligação entre processos orais inflamatórios e saúde sistêmica é um aspecto de grande interesse da comunidade médica e odontológica. Estudos clínicos e experimentais demonstram maior prevalência de lesão periapical (LP) em pacientes com diabetes descontrolado (BENDER; BENDER, 2003; FOUAD, 2003; GARBER *et al.*, 2009; SEGURA-EGEA *et al.*, 2012). Adicionalmente, o estado hiperglicêmico característico do diabetes pode ocasionar efeitos deletérios sobre a condição pulpar, agravando a extensão da LP e a reabsorção óssea alveolar (KOHSAKA *et al.*, 1996). Vários estudos demonstram associação de doença periodontal, um foco de inflamação oral semelhante a LP, e maior incidência de alterações sistêmicas, como por exemplo: aterosclerose, doenças cardiovasculares e respiratórias, osteoporose, resistência à insulina e *diabetes mellitus* (DM) (COLOMBO *et al.*, 2012; MEGSON *et al.*, 2010; PRADHAN; GOEL, 2011; SHRIHARI, 2012; TERPENNING, 2001;). Estes achados evidenciam a necessidade de realizar novos estudos para elucidar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de alterações sistêmicas em pacientes com patologias orais.

Maior concentração de citocinas pró-inflamatórias tem sido relatada na polpa, tecidos periapicais e no soro de pacientes com pulpíte e periodontite apical (JOSHIPURA *et al.*, 2006; PRSO *et al.*, 2007). Neste sentido, estudos anteriores do nosso laboratório, com ratos, comprovaram que a LP promove aumento de fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e alterações na etapa inicial do sinal insulínico (ASTOLPHI *et al.*, 2013), evidenciando que uma inflamação local pode induzir efeitos sistêmicos. Libby (2008) sugerem que citocinas pró-inflamatórias, produzidas localmente na articulação acometida por artrite reumatóide, podem reduzir a sensibilidade à insulina. Adicionalmente, doenças inflamatórias como osteoartrite, lúpus eritematoso e espondilite anquilosante têm sido associadas com aumento da prevalência de doenças cardiovasculares (ABELLA *et al.*, 2014).

Estudos sugerem que inflamação crônica de baixo grau está associada ao desenvolvimento de doenças metabólicas crônicas como aterosclerose e DM (DEPALMA *et al.*, 2003; DUNCAN *et al.*, 2003). O estado de inflamação crônica de baixo grau é caracterizado por situações em que as concentrações plasmáticas de TNF- α ,

interleucina-6 (IL-6) e outras citocinas inflamatórias encontram-se elevadas (COPPACK, 2001; GLEESON *et al.*, 2011). Estudos mostram que um aumento das concentrações plasmáticas destas citocinas inflamatórias é capaz de induzir resistência celular à insulina (DUNCAN *et al.*, 2003).

A resistência à insulina é definida como a incapacidade dos tecidos periféricos responsivos à insulina responderem adequadamente às concentrações circulantes deste hormônio, resultando em diminuição da ação biológica da insulina nesses tecidos. Como consequência, as células beta pancreáticas secretam mais insulina a fim de evitar a hiperglicemia. A sobrecarga da função secretória das células beta do pâncreas pode induzir a falência destas células, o que ocasiona diminuição da secreção de insulina. Este processo está relacionado com o desenvolvimento do *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), o qual é resultado da combinação desses dois fatores: resistência insulínica e prejuízo das células beta em secretar insulina (KAHN *et al.*, 2006; PETERSEN; SHULMAN, 2002).

O DM é considerado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pela Federação Internacional de Diabetes como uma epidemia global, atingindo 387 milhões de pessoas no mundo, e no Brasil, alcançando 8,7% da população na faixa etária entre 20 e 79 anos, totalizando 11,6 milhões de pessoas. Adicionalmente, estima-se que em 2035 o número de pessoas com DM em todo o mundo será superior a 592 milhões (IDF, 2014).

O DM é grupo heterogêneo de doenças metabólicas caracterizado por hiperglicemia crônica devido à falta da ação insulínica (SAAD; ZECCHIN, 2011; THE COMMITTEE... 2010). Os principais tipos de DM são do tipo 1 (DM1) e do tipo 2 (DM2). O DM está relacionado aos distúrbios de ação e/ou secreção de insulina (GROSSI; GENCO, 1998).

O DM1 (representa 5% a 10% dos casos de DM) é frequentemente desenvolvido na infância ou juventude e surge a partir da destruição autoimune das células das ilhotas pancreáticas ocasionando perda da produção de insulina. O DM2, (representa de 90 a 95% dos casos de DM) engloba indivíduos com resistência insulínica. A intolerância à glicose e/ou glicemia de jejum alterada é um indicador de risco para o desenvolvimento futuro de diabetes, podendo isto ser caracterizado como pré-diabetes (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

A hiperglicemia crônica do paciente com DM2 pode promover glicotoxicidade, agravando a resistência à insulina e diminuindo a secreção de insulina (SAAD; ZECCHIN, 2011). Isto pode ocasionar disfunção e falência de diferentes órgãos especialmente os olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012). Além disso, o indivíduo com DM2 pode desenvolver alteração no metabolismo de proteínas, baixos níveis de HDL-C (Lipoproteína de alta densidade), altos níveis de triglicérides, microangiopatia, neuropatia, nefropatia, doenças macrovasculares, aumento do tempo de cicatrização de feridas e risco de infecção (BORGGREVE *et al.*, 2003; ELNER *et al.*, 1995; JENSEN; DECKERT, 1992; LIBMAN *et al.*, 1993; LÖE, 1993; PATTERSON; ANDRIOLE, 1997; TAYLOR *et al.*, 1998; VLASSARA; PALACE, 2002). O DM2 pode acometer indivíduos obesos, uma vez que a obesidade confere resistência à ação periférica da insulina (STEIN; COLDITZ, 2004).

O conceito de inflamação relacionado a distúrbios metabólicos como obesidade e resistência à insulina teve início em 1993, quando Hotamisligil *et al.* (1993) identificaram expressão exacerbada de TNF- α no tecido adiposo de roedores obesos; contudo a neutralização do TNF- α ocasionava redução da resistência insulínica. Desse modo, vários trabalhos sobre obesidade têm confirmado que o excesso de tecido adiposo causa inflamação crônica devido a maiores concentrações séricas de proteína C-reativa, IL-6, proteína ligante de retionol-4 entre outros mediadores bioativos que podem ser candidatos para o desenvolvimento de resistência à insulina (CHAKRABORTY *et al.*, 2010; GHOSH; ASHCRAFT, 2013; HAK *et al.*, 1999; KIM *et al.*, 2012).

O tecido adiposo é atualmente reconhecido como um órgão endócrino capaz de secretar fatores denominados adipocinas. As adipocinas estão ligadas a patogênese da síndrome metabólica e suas comorbidades por meio de seus efeitos sobre a função vascular e inflamação (CONDE *et al.*, 2011; LAGO *et al.*, 2011). Charrière *et al.* (2003) observaram que células em cultura de pré-adipócitos de roedores possuem grande semelhança e eficiência em transformar-se em macrófagos, enfatizando a estreita correlação entre tecido adiposo e sistema imune inato. O tradicional conceito de que o este sistema atua apenas como mecanismo de defesa é relativamente simples. Atualmente, o sistema imune é visto como um sistema regulador que participa do controle de vias metabólicas. Em decorrência disto, foi recentemente criado o termo

“immunometabolism” para demonstrar a importância emergente da interação entre sistema imunológico e processos metabólicos (PAL *et al.*, 2014).

Indivíduos obesos apresentam maior número de macrófagos residentes no tecido adiposo que produzem várias citocinas e contribuem para inflamação local e sistêmica de baixo grau (CANCELLO *et al.*, 2005; WEISBERG *et al.*, 2003). Acredita-se que hipertrofia do adipócito e hipóxia local devido à expansão do adipócito são dois fatores que contribuem para o aumento do acúmulo de macrófagos no tecido adiposo na obesidade (DALMAS *et al.*, 2011; TRAYHURN, 2013). Os macrófagos são classificados em dois fenótipos: M1 (pró-inflamatório) ou M2 (anti-inflamatório). A subpopulação M1 pode ser ativada por lipopolissacarídeo (LPS) e TNF- α e produzir citocinas pró-inflamatórias. O fenótipo M2 pode ser ativado por glicocorticoides, interleucina-4 (IL-4) e interleucina-10 (IL-10) e esta ativação pode promover a produção de citocinas anti-inflamatórias (DALMAS *et al.*, 2011; GRATCHEV *et al.*, 2001; MARTINEZ *et al.*, 2009;). Em roedores, obesidade induzida por dieta geralmente promove alteração do fenótipo de macrófagos residentes no tecido adiposo e polarização do M2 à M1 na condição de animais obesos (LUMENG *et al.*, 2007; NGUYEN *et al.*, 2007). Por outro lado, em ratos não obesos, os macrófagos do tecido adiposo não exibem fenótipo inflamatório, já que, nesse caso, as vias inflamatórias não estão ativadas devido à ausência de obesidade (LUMENG *et al.*, 2007). Ademais, vários estudos têm descrito uma associação entre macrófagos residentes no tecido adiposo e resistência à insulina (WEISBERG *et al.*, 2003; WENTWORTH *et al.*, 2010).

Patologias inflamatórias locais, como a doença periodontal, podem ocasionar hiperglicemia e resistência à insulina (CHIU *et al.*, 2014). A LP, que é também um tipo de doença inflamatória local, pode promover resistência à insulina (ASTOLPHI *et al.*, 2013). A LP ocorre como consequência de vários traumas à polpa do dente, que incluem os físicos, os iatrogênicos, os infecciosos e os decorrentes da terapia endodôntica. Este quadro inflamatório pode ocasionar uma ampla variedade de respostas imunológicas, com intuito de proteger a polpa dentária e regiões periapicais. Entretanto, a regulação da inflamação periapical é extremamente complexa, pois envolve mediadores derivados do hospedeiro, incluindo componentes imunológicos, como anticorpos, citocinas, metabólitos do ácido araquidônico e neuropeptídeos.

Estes fatores em conjunto estão envolvidos na patogênese da LP (STASHENKO *et al.*, 1998).

A exposição crônica do canal pulpar apresenta, em sua maioria, colonização composta por diferentes tipos de bactérias gram-negativas anaeróbias (SUNDQVIST, 1992), dotadas de LPS na parede celular (WOLFF, 1973). LPS possui a capacidade de ativar o *toll like-4* (TLR4), um receptor de superfície celular que atua na ativação da imunidade inata e indução de respostas inflamatórias. O TLR4 é expresso em diferentes tecidos e desempenha função importante no desenvolvimento de alterações crônicas relacionadas à obesidade, como a resistência à insulina (PAL *et al.*, 2012; REYNOLDS *et al.*, 2012).

A ativação de TLR4 pode aumentar o processo inflamatório por meio da produção de citocinas (MEDZHITOV, 2001) principalmente o TNF- α e IL-6 (BAIN *et al.*, 2009; BLETSA *et al.*, 2006). Estas citocinas, ao serem disseminadas para a circulação sistêmica, podem afetar diversos órgãos (MÁRTON *et al.*, 1988; MÁRTON; KISS, 2000) e interferir negativamente com o sinal insulínico desencadeando resistência à insulina (ASTOLPHI *et al.*, 2013; BAIN *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2011).

Os mecanismos que causam resistência à insulina não são totalmente compreendidos, no entanto, estudos têm demonstrado uma série de alterações moleculares na via de sinalização insulínica que são determinantes no estado de resistência insulínica em tecidos periféricos, como músculo esquelético e tecido adiposo (FRÖJDÖ *et al.*, 2009).

A insulina é um hormônio anabólico produzido pelas células beta pancreáticas, que atua em diferentes tecidos, como muscular, adiposo e também no fígado, além de apresentar atividades metabólicas que incluem aumento da captação de glicose, síntese de glicogênio, proteínas e ácidos graxos, entre outros (PAULI *et al.*, 2009).

A sinalização intracelular insulínica inicia-se por meio da interação da insulina com seu receptor – o receptor de insulina (RI) (ROTH, 1973; ROTH *et al.*, 1975). O RI é uma proteína quinase composta por duas subunidades alfa e duas subunidades beta ligadas por pontes dissulfeto, com atividade quinase intrínseca. A subunidade beta do receptor de insulina, quando estimulada pela ação insulínica, é capaz de se autofosforilar e ainda fosforilar substratos do receptor de insulina em resíduos de tirosina (KASUGA *et al.*, 1982a; KASUGA *et al.*, 1982b).

Atualmente já foram descritos vários substratos do receptor de insulina. Com intuito de melhor compreensão do papel fisiológico destas proteínas, vários estudos com camundongos *knockout* para os substratos do receptor de insulina (IRS) foram publicados entre os anos de 1994 e 2003. Araki *et al.* (1994) demonstraram que o camundongo que não expressava IRS-1, apresentava resistência insulínica e atraso no crescimento, porém, não era hiperglicêmico. Em 1998, Withers e colaboradores, estudaram camundongos *knockout* para IRS-2, e identificaram fenótipo diferente do camundongo *knockout* para IRS-1, isto é, hiperglicemia e falência da atividade secretória das células beta pancreáticas, além de perda significativa da massa de células β . Contudo, no estudo de Fantin *et al.* (2000) camundongos *knockout* para IRS-3 e IRS-4 apresentaram metabolismo de glicose quase normais. Adicionalmente, Cai *et al.* (2003) descobriram dois novos substratos do receptor de insulina, o IRS-5 e o IRS-6 que não apresentam função relevante no transporte de glicose mediado por insulina.

A fosforilação do RI em tirosina, resulta principalmente em fosforilação de IRS-1 e IRS-2 (WHITE, 1998), que podem interagir com proteínas portadoras da porção SH2 e ativá-las. Entre essas proteínas, destaca-se a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (FOLLI *et al.*, 1992). A PI3K atua em diversos processos celulares, que incluem regulação da mitogênese, diferenciação celular, além de ser considerada molécula essencial para o transporte de glicose mediado por insulina (CZECH; CORVERA, 1999). Estudos observaram que os inibidores específicos da PI3K promoveram inibição da via de sinalização insulínica (CHEATHAM *et al.*, 1994; OKADA *et al.*, 1994).

A ligação dos IRSs com a subunidade p85 da PI3K ativa a subunidade p110 desta enzima (WHITE; KAHN, 1994). Esta interação induz fosforilação dos fosfoinosítídeos na posição 3 do anel de inositol, originando fosfatidilinositol-3-fosfato, fosfatidilinositol-3,4-difosfato e fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato ou PIP3 (LIETZKE *et al.*, 2000). O PIP3 gerado pela PI3K pode ativar a PDK-1 ("*phosphoinositide-dependent kinase 1*"), uma serina/treonina quinase que regula outra serina/treonina quinase conhecida como proteína quinase B (PKB ou Akt) (ALESSI *et al.*, 1997; LIETZKE *et al.*, 2000).

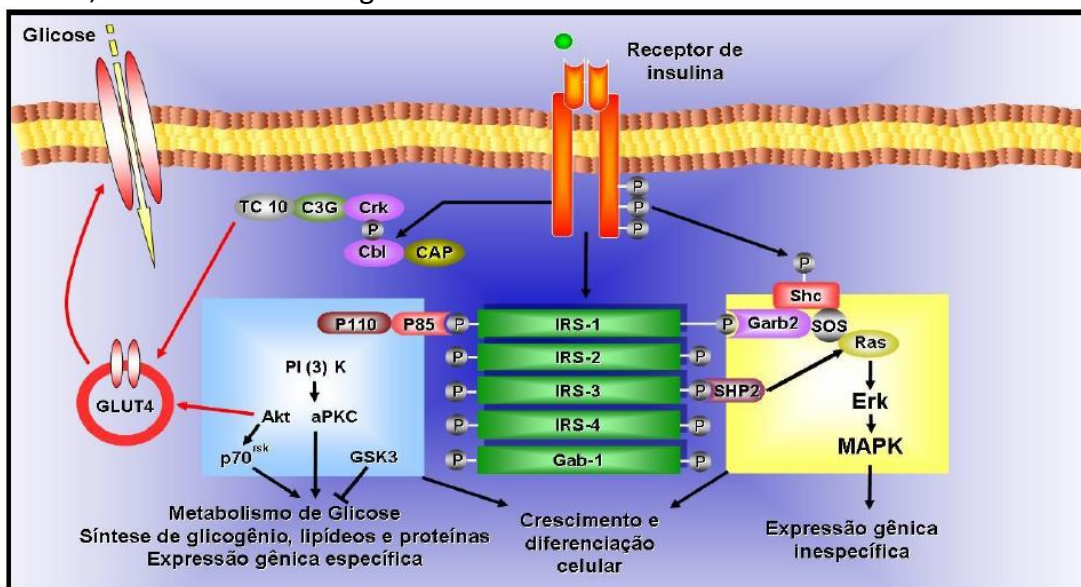
Os estudos envolvendo Akt foram iniciados após a descoberta de um vírus mutante de leucemia em camundongos, que possuía capacidade oncogênica para o desenvolvimento de linfomas de timo, denominado Akt8 (STAAL *et al.*, 1977). Em mamíferos, três genes da Akt/PKB foram identificados, denominados PKB α /Akt1

(JONES *et al.*, 1991), PKB β /Akt2 (CHENG *et al.*, 1992) e PKB γ /Akt3 (BRODBECK *et al.*, 1999), localizado nos cromossomos 14q32, 19q13, e 1q44, respectivamente.

A Akt participa ativamente nas vias de sinalização insulínica mediando os efeitos metabólicos deste hormônio em diferentes tecidos. A fosforilação da Akt diminui a atividade da glicogênio sintase quinase-3 (GSK3) o que resulta em síntese de glicogênio, pois a GSK3 inibe a glicogênio sintase (GS) e, dessa forma, a inibição da GSK3 aumenta a atividade da GS. (CROSS *et al.*, 1995). Ademais, GSK3 promove degradação de SREBPs (*sterol regulatory element-binding protein*) que são fatores que aumentam a expressão de genes envolvidos na biossíntese de lipídeos. Desta maneira, a Akt promove estabilidade de SREBPs, aumentando a síntese de lipídeos (MANNING; CANTLEY, 2007).

Além disso, a Akt apresenta papel fundamental no processo de captação de glicose por meio da estimulação da translocação do transportador de glicose GLUT4 para membrana, ao passo que a inibição da atividade da Akt bloqueia parcialmente a translocação de GLUT4, em tecido adiposo e músculo esquelético (WHITEMAN *et al.*, 2002).

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 ligam-se a outras moléculas de sinalização por meio de seus domínios SH2, resultando na ativação de vias de sinalização intracelular como a via da PI 3-quinase, a cascata da MAPK e a ativação do TC10 via CAP/Cbl. Essas vias regulam o transporte de glicose, a síntese de glicogênio, lipídeos e proteínas e a expressão gênica, coordenando e integrando o metabolismo intermediário.



Fonte: Carvalheira *et al.* (2002)

Como descrito anteriormente a PI3K e Akt participam ativamente do transporte de glicose para célula por meio do controle da translocação do GLUT4, em tecidos específicos. Os GLUTs são proteínas que estão presentes nas superfícies das células, e têm capacidade de realizar fluxo bidirecional de glicose, sendo o gradiente de concentração o fator determinante para indicar a direção do transporte da molécula. Até hoje foram descobertos 14 transportadores de glicose, sendo que as funções de cada isoforma variam de um tecido para outro e são expressos de forma específica de acordo com o tipo celular. As 5 primeiras isoformas são as mais pesquisadas, tanto em situações fisiológicas como patológicas (MACHADO *et al.*, 2006). O GLUT4 é responsável por participar da captação de glicose mediada por insulina nos tecidos muscular e adiposo (LETO; SALTIEL, 2012). Ele se localiza no meio intracelular e por meio da cascata de sinalização insulínica ocorre sua translocação em direção à membrana plasmática (REA; JAMES, 1997). Uma série de investigações tem sido conduzidas com intuito de avaliar o papel do GLUT4 em alterações da sensibilidade insulínica (FAM *et al.*, 2012; ZHU *et al.*, 2013). Um estudo demonstrou que ratos portadores de síndrome metabólica apresentam: 1) redução do conteúdo de GLUT4 (no coração, músculo esquelético e tecido adiposo branco); 2) resistência à insulina; 3) aumento das concentrações plasmáticas de marcadores inflamatórios (LEGUISAMO *et al.*, 2012).

Como mencionado anteriormente, estudos do nosso laboratório comprovaram que ratos adultos com LP apresentam alteração na etapa inicial do sinal insulínico e resistência à insulina. No intuito de averiguar os mecanismos que estão envolvidos nestas alterações, serão investigados as etapas posteriores do sinal insulínico, o conteúdo de GLUT4 e seu índice de translocação para membrana plasmática em músculo esquelético gastrocnêmio (GM) de ratos adultos com LP.

2 OBJETIVO

Sabendo-se que a etapa inicial do sinal insulínico está alterada em ratos com LP, é de fundamental importância averiguar se estas alterações também estão presentes na continuidade da cascata insulínica, na translocação de GLUT4 para membrana plasmática (PM) e no conteúdo desta proteína. Portanto, os objetivos do presente estudo foram avaliar em ratos com LP: 1) glicemia e insulinemia; 2) sensibilidade à insulina por meio do índice de HOMA-IR; 3) grau de fosforilação em serina/treonina da Akt em GM; 4) conteúdo de GLUT4 e seu índice de translocação para membrana plasmática em GM.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 32 ratos Wistar de 2 meses de idade, mantidos em ambiente de 12/12 horas de claro e escuro (período claro iniciado às 7h) e temperatura de 23 +/- 2° C. Os animais foram distribuídos em dois grupos: 1) ratos controle (CN), sem LP; 2) ratos com LP. O trabalho está de acordo com os Princípios Éticos em Uso de Animais e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Protocolo FOA-00940-2013).

Os animais do grupo LP foram anestesiados com associação de Cloridrato de Quetamina (10%, 80mg/kg de peso corpóreo, intraperitoneal) e Xilazina (2%, 10 mg/kg de peso corpóreo, intraperitoneal), e a LP foi induzida por meio de orifício realizado em 1º molar superior direito com auxílio de broca em aço carbono (Broca Long Neck - Maillefer, Dentsply, Terezópolis, RJ, Brasil) dotada de esfera na extremidade com 0,1mm de diâmetro, acoplada à caneta de baixa rotação. Ressaltamos que a exposição pulpar realizada por meio da abertura da cavidade pulpar com brocas, geralmente não induz à dor. A permanência da abertura é o método mais utilizado para o desenvolvimento de lesões periapicais.

Após a indução da LP foram avaliados, três vezes por semana, a ingestão de ração e o peso corporal dos ratos de ambos os grupos. Depois de 30 dias da indução da LP os experimentos foram realizados. Todos os procedimentos experimentais foram realizados em ratos LP e CN submetidos a uma privação alimentar prévia de 14 horas e anestesiados com tiopental sódico (Thiopentax® - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, Brasil, 3%, 5mg/ 100g peso corpóreo, intraperitoneal). Para realização da coleta de sangue dos animais (n=10), foi realizada a laparotomia mediana, coletando-se o sangue pela veia cava inferior, e as amostras de sangue foram transferidas para tubos de plástico heparinizados e mantidas a 4°C até a centrifugação a 800 g (4°C, 15 minutos). O plasma obtido foi armazenado a -70°C até o dia da quantificação de glicemia e insulinemia. Logo após a coleta do sangue também foi retirado o músculo gastrocnêmio para quantificar o conteúdo da proteína GLUT4 e seu índice de translocação para membrana plasmática (n=5). Outro grupo de ratos (n=6) foi utilizado para quantificar, em GM, o grau de fosforilação em serina/treonina da Akt (Ser 473 e Thr 308), após estímulo insulínico. Nestes experimentos, os animais foram

anestesiados com tiopental sódico (Thiopentax® - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, Brasil, 3%, 5mg/ 100g peso corpóreo, intraperitoneal), realizando-se em seguida: laparotomia mediana, com retirada de amostras do GM antes e após (90 segundos) a injeção de 1,5 U de insulina regular (intravenosa pela veia porta), seguindo protocolo de acordo com Saad *et al.* (1993). Após os experimentos, os animais foram eutanasiados por dose anestésica excessiva de tiopental sódico (Thiopentax® - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, Brasil, 3%, 5mg/ 100g peso corpóreo, intraperitoneal).

3.2 Determinação da glicemia (método de glicose-oxidase)

A glicemia foi determinada pelo método da glicose-oxidase, um método enzimático específico para quantificação de glicose (Enzymatic glucose, ANALISA Diagnóstica, Belo Horizonte, Brasil). Neste teste, a glicose é oxidada enzimaticamente pela glicose oxidase, gerando ácido glucônico e água oxigenada (H₂O₂). A H₂O₂, em presença de peroxidase, produz a ligação oxidativa do fenol com a 4-aminoantipirina, dando origem a um composto róseo-avermelhado (quinonimina), com máximo de absorção em 505 nm de comprimento de onda. Para a dosagem de glicemia foram utilizados 10 µL da amostra de plasma ou de padrão (100 mg/dl) e 1,0 mL de reagente enzimático. Essa solução foi bem homogeneizada e colocada em banho-maria a 37°C durante 15 minutos. As absorbâncias do teste e do padrão foram determinadas em 505 nm, acertando o zero com o branco.

Cálculos

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

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

3.3 Determinação da insulinemia

A insulinemia foi quantificada pelo método radioimunológico – RIA KIT (Sensitive Rat Insulin, SRI-13K, Millipore, St Charles, MO, EUA). Em resumo, trata-se de uma reação de competição entre antígenos (insulina fria e insulina marcada) para ligação a um anticorpo específico. Essa reação obedece à lei da ação de massas. Portanto, quanto mais insulina fria estiver presente, mais será formado complexo insulina fria-anticorpo, acarretando queda na quantidade de complexo insulina marcada-anticorpo.

3.4 Análise do HOMA-IR

A resistência à insulina foi avaliada por meio do índice HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment - Insulin Resistance / Modelo de Avaliação da Homeostase - Resistência à Insulina), calculado a partir da fórmula, como segue: $HOMA - IR = \text{glicemia de jejum (mmol/L)} \times \text{insulinemia de jejum } (\mu\text{U/ml}) / 22,5$ (LIMA et al., 1998).

3.5 Avaliação do grau de fosforilação da Akt (Ser308/Thr473) em músculo esquelético

3.5.1 Preparação das amostras para “Western Blotting”

Imediatamente após a extração, os tecidos foram homogeneizados em Polytron (24000 rpm durante 10 segundos) em 2 mL de tampão de extração (Tris 100 mM pH 7,5; EDTA 10 mM; SDS 1%; NaF 100 mM; Pirofosfato de Na 10 mM; Ortovanadato de Na 10 mM; 0,1mg/mL Aprotinina) e mantidos em banho-maria (100°C) durante 10 minutos, transferidos para gelo e, então, centrifugados a 16000g durante 40 minutos (à 4°C). Do sobrenadante foram retiradas alíquotas para determinação da concentração protéica pelo método de Lowry modificado e para estoque em tampão desenvolvido por Laemmli (1970) (azul de bromofenol 0,1%; SDS 10 %; fosfato de sódio 1M pH 7,0; glicerol 50%; DTT 15%).

3.5.2 “Western blotting”

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

Na montagem, o gel de resolução ficou sob o gel de “stacking”, com orientação vertical, num sistema de câmaras que manteve as porções superiores e inferiores do gel em contato com um tampão de corrida (Tris 50 mM; glicina 375 mM; SDS 0,1%; EDTA 1,8 mM).

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

● **Transferência eletroforética**

Após a separação das frações protéicas no gel de poliacrilamida, foi feita a transferência eletroforética dessas frações para uma membrana de nitrocelulose Hybond-C Super (GE Healthcare Buckinghamshire, Germany). A transferência foi realizada sob voltagem constante de 100 V, durante 2 horas, 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, desenvolvido por Kruger e Hammond (1988). A membrana de nitrocelulose foi, primeiramente, incubada na presença de solução bloqueadora (solução basal - SB - NaCl 150 mM; Tris 10 mM; "Tween" 20 0,02%; pH 7,2 - acrescida de 5% de leite desnatado em pó - 0% de gordura) durante 2 horas à temperatura ambiente, e então, lavada com solução basal por três sessões de 10 minutos cada. Em seguida, a membrana foi incubada em solução (SB + 3% de leite desnatado em pó - 0% de gordura) contendo o anticorpo de coelho p-Akt 1/2/3 (Ser473) (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, USA), na diluição de 1:1000 ou anticorpo de coelho anti-fosfotreonina-Akt (Thr308) (Millipore Temecula, CA, USA), na diluição de 1:1000 ou anticorpo de camundongo anti- β -actina (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, USA), utilizado como controle endógeno, na diluição de 1:1000 por 4 horas em

temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizadas três lavagens com solução basal, e as membranas foram incubadas em solução (SB + 1% de leite desnatado em pó - 0% de gordura) com segundo anticorpo contendo peroxidase de "horseradish" ("kit' de quimioluminescência – ECL – GE Healthcare Buckinghamshire, Alemanha), durante 1 hora em temperatura ambiente. Novamente, foram realizadas 3 lavagens das membranas de nitrocelulose com solução basal, com duração de 10 minutos cada lavagem. Após estes procedimentos, as membranas foram levadas até uma câmara escura, onde foi adicionado 1 ml de cada solução de detecção 1 e 2 (do kit de ECL - GE Healthcare Buckinghamshire, Alemanha), e incubou-se por 1 minuto. Por fim, foi drenado o excesso de reagente e a membrana de nitrocelulose foi exposta a filme de RX (Hyperfilm ECL– GE Healthcare Buckinghamshire, Alemanha) dentro de um cassete para autorradiografia (GE Healthcare Buckinghamshire, Alemanha) à prova de luz, durante 10 minutos, em temperatura ambiente. O filme foi processado com solução reveladora e reforçadora GBX (Kodak Brasileira, São Paulo, Brasil) e solução fixadora e reforçadora GBX (Kodak Brasileira, São Paulo, Brasil). A intensidade dos "blots" foi avaliada por densitometria óptica, utilizando-se o programa *Scion Image* (Scion Image-Release Beta 3b, NIH, Frederick, MD, EUA).

3.6 Quantificação do conteúdo da proteína GLUT4 e seu índice de translocação

A detecção das quantidades de proteínas GLUT4 no músculo gastrocnêmio foi realizada utilizando-se eletroforese em gel de poliacrilamida, com a utilização de kit de quimioluminescência (ECL) para detecção das bandas. Quantidades iguais de proteínas foram solubilizadas em tampão de Laemmli, sujeitas a SDS-PAGE (10%) e então transferidas eletroforeticamente para membrana de nitrocelulose Hybond-C Super (GE healthcare, AMERSHAM Biosciences, UK). Após bloqueio com leite desnatado em pó durante 1 hora, as membranas foram incubadas com anticorpo anti-GLUT4 (Chemicon) (diluição 1: 3000 em PBS/BSA 8%), durante 3 horas, a 37°C. Posteriormente foi feita uma incubação com os anticorpos secundários anti-IgG, marcado com peroxidase (HRP), diluído 1: 10000, em solução bloqueadora BSA 1% durante 1 hora. As membranas foram lavadas vigorosamente com tampão PBS + Triton e colocadas em contato com 4ml da combinação da solução A e solução B (Solução A: 8,856 ml de água destilada, 100µl de Luminol 2,5 mM e 44µl de Ácido Cumárico 400mMe 1 ml de Tris

1M pH 8,5; Solução B: 8,9939 água destilada, 6,1µl de Peróxido de Hidrogênio e 1ml de Tris 1M pH 8,5) por 1 minuto e expostas a Hyperfilm® (IGF – Corporation, New Jersey, USA) por períodos de 1 hora a -70°C para detecção das bandas resultantes. As imagens obtidas após revelação serão analisadas por densitometria óptica, utilizando-se um “software” (IMAGE MASTER ID –AMERSHAM Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). O anticorpo anti-GLUT4 utilizado é constituído por antissoro comercial de coelho (Chemicon International, Temecula, Califórnia). Para avaliar o índice de translocação de GLUT4 para membrana plasmática foi realizado o seguinte cálculo:

Índice de translocação de GLUT4 (%) = $\frac{\text{GLUT4 da membrana plasmática} \times 100}{\text{GLUT4 da membrana plasmática} + \text{GLUT4 microsomal}}$

3.7 Análise Estatística

Todos os valores foram apresentados como média ±EPM.

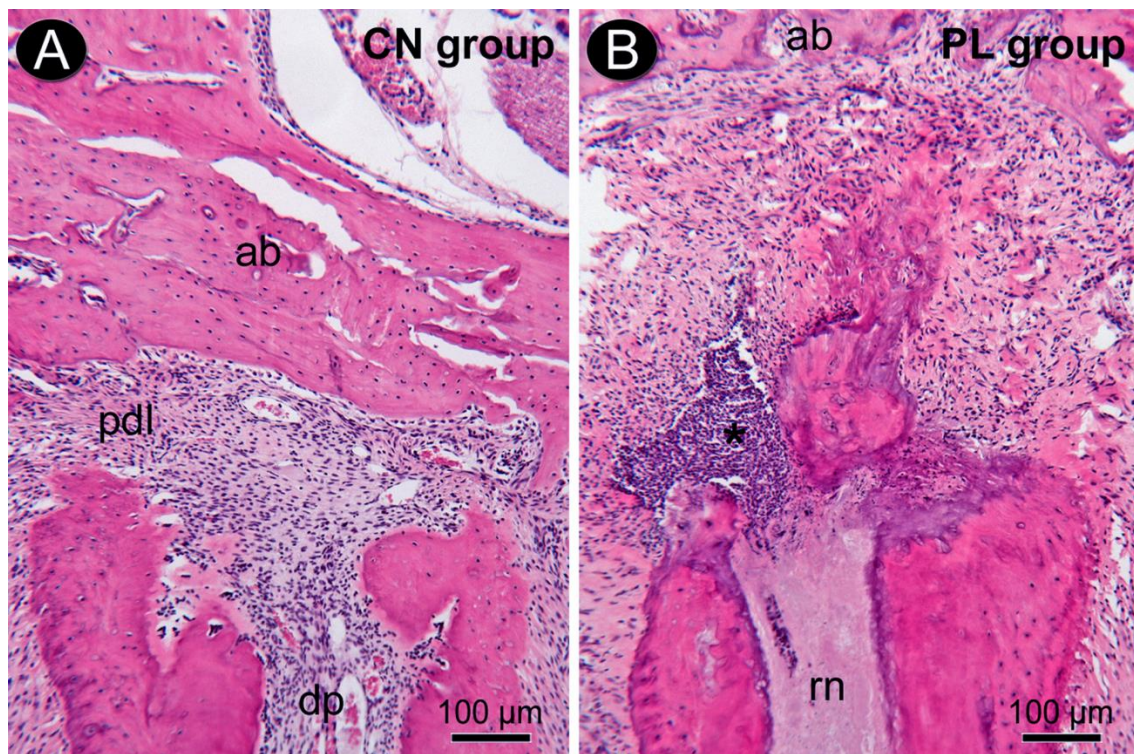
- 1) Para análise do grau de fosforilação da Akt em serina/treonina: a normalidade do conjunto de dados analisados foi verificada. As análises estatísticas foram realizadas por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5% (alpha=5%).
- 2) Para a análise do peso corpóreo, ingestão alimentar, glicemia em jejum, insulinemia, HOMA-IR, conteúdo e índice de translocação de GLUT4: As análises estatísticas foram analisadas pelo teste t de Student. O nível de significância adotado foi de 5% (alpha=5%). As análises estatísticas foram realizadas com o programa estatístico Graph Pad Prism (version 5.0).

4 RESULTADOS

4.1 Análise Histológica

Imagens histológicas da região periapical do primeiro molar superior de ratos do grupo CN e LP após 30 dias da indução da lesão periapical (figura 2).

FIGURA 2 - Análise histológica da região periapical nos grupos controle (CN) e ratos com lesão periapical (LP). Coloração com hematoxilina e eosina (H&E) mostra aparência normal de polpa dentária e tecidos periodontais no grupo CN (A). A lesão foi estabelecida na região periapical no grupo LP (B). Abreviaturas e símbolos: ab, osso alveolar; *, infiltrado inflamatório; dp, polpa dentária; rn, restos de necrose pulpar; pdl, ligamento periodontal. Aumento: 250x; Barra de escala: 100 µm.

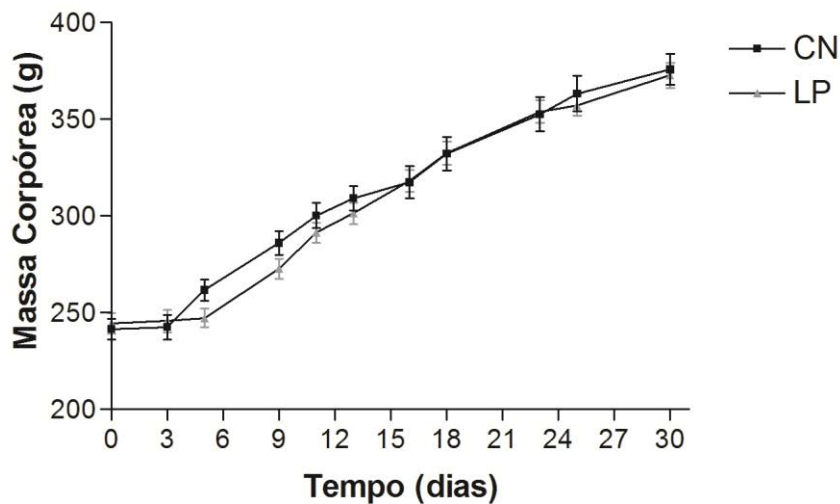


Fonte: do autor

4.2 Massa Corpórea e Ingestão Alimentar

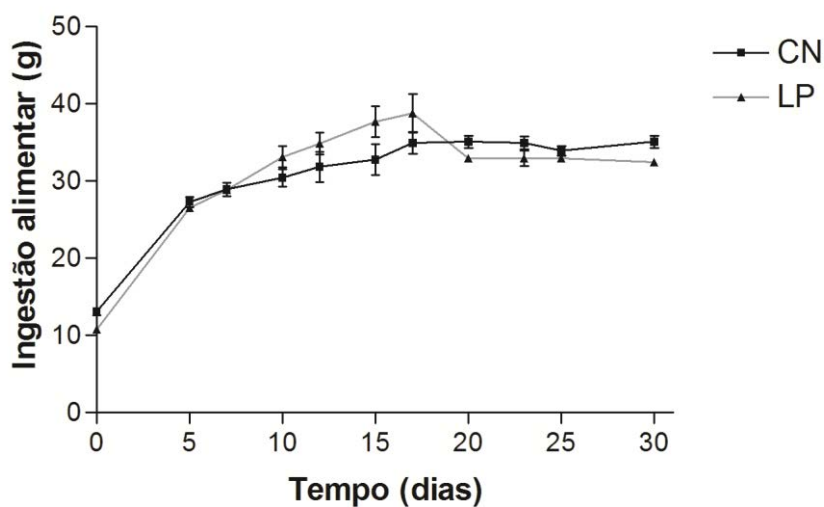
Os ratos com LP não apresentaram diferença tanto na massa corpórea (Figura 3) como na ingestão alimentar (Figura 4) em relação aos ratos CN, desde a indução da LP até a realização dos experimentos.

Figura 3 - Massa corpórea dos ratos controle (CN) e ratos com lesão periapical (LP) durante 30 dias. Os valores são expressos como média \pm EPM, n =21



Fonte: do autor

Figura 4 - Ingestão alimentar de ratos controle (CN) e ratos com lesão periapical (LP) durante 30 dias. Os valores são expressos como média \pm EPM, n=21.



Fonte: do autor

4.3 Glicemia, Insulinemia e HOMA-IR

Os valores da glicemia, insulinemia e HOMA-IR podem ser observados na tabela 1. Não foi encontrada diferença significativa na glicemia e insulinemia entre os grupos estudados. Entretanto, por meio do índice HOMA-IR observou-se que o grupo LP apresentou maior resistência insulínica quando comparado com o grupo CN.

Tabela 1 – Glicemia (mmol/L), insulinemia (μ IU/mL) e índice HOMA-IR dos ratos controle (CN) e ratos com lesão periapical (LP)

	Grupo CN	Grupo LP
Glicemia (mmol/L)	7,08 \pm 0,29	6,78 \pm 0,12
Insulinemia (μ IU/mL)	17,38 \pm 5,94	29,47 \pm 5,20
HOMA-IR	4,17 \pm 1,48	9,79 \pm 1,56*

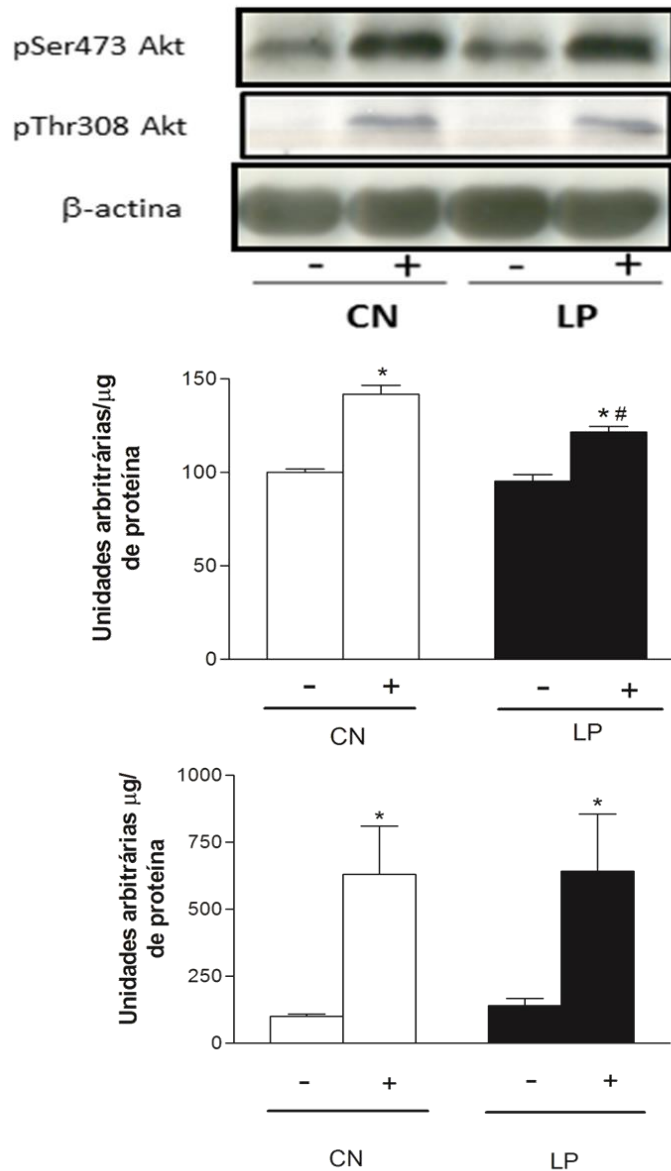
Valores expressos como média \pm EPM, n=10. *p< 0,05 CN vs. LP.

Fonte: do autor

4.4 Avaliação do grau de fosforilação em serina/treonina da Akt no músculo esquelético

Em análise intragrupos, observou-se aumento no grau de fosforilação em serina e treonina da Akt após o estímulo insulínico em relação ao estado basal em GM (p<0,05). Em análise intergrupos, após estímulo insulínico, o grau de fosforilação em serina da Akt foi reduzido (p<0,05) no grupo LP em relação ao grupo CN. Entretanto, não foi observada diferença significativa no grau de fosforilação em treonina da Akt entre os grupos estudados.

Figura 5 - Avaliação do grau de fosforilação em serina e treonina da Akt antes (-) e após (+) o estímulo insulínico no músculo esquelético gastrocnêmio de ratos controle (CN) e ratos com lesão periapical (LP). Em **A** autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 µg). β-actina foi utilizada como controle. Em **B** e **C**, valores do grau de fosforilação em serina e treonina da Akt, respectivamente, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média ± EPM, n=6.* p<0,05 insulina (-) vs. insulina (+); # p<0,05 CN (+) vs. LP (+).

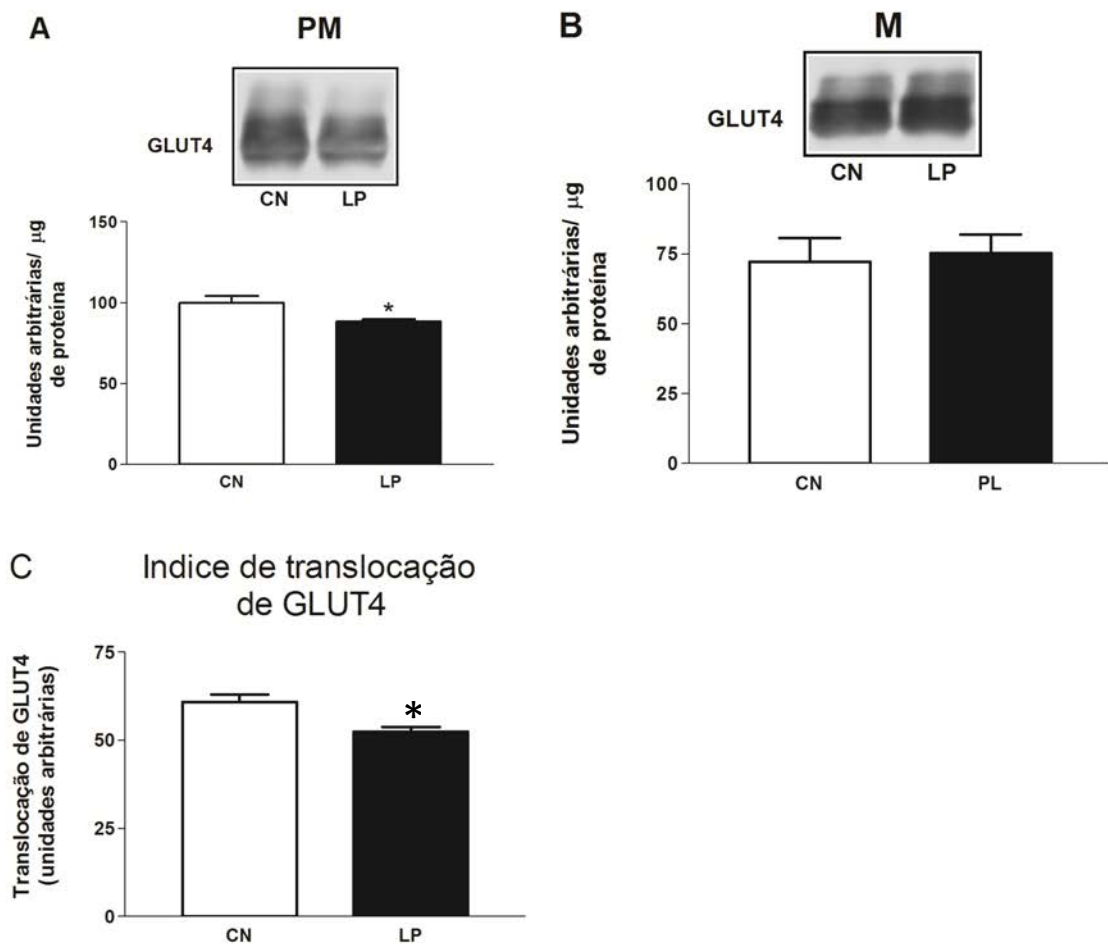


Fonte: do autor

4.5 Expressão protéica de GLUT4 no músculo esquelético

A Figura 6 mostra os resultados da expressão de GLUT4 na membrana plasmática (PM) e no microsossoma (M). Não houve diferença significativa entre os grupos CN e LP em M; no entanto, em PM o grupo LP apresentou um menor valor em relação ao grupo CN ($p < 0,05$). Ademais, foi observada diferença no índice de translocação de GLUT4 para membrana plasmática.

Figura 6 - Avaliação do Conteúdo de GLUT4 em músculo esquelético de ratos controle (CN) e ratos com lesão periapical (LP). Em **A**, membrana plasmática (PM); em **B** microsossoma (M); em **C**, o índice de translocação dos grupos CN e LP. Os resultados foram apresentados como média \pm EPM, $n=5$. * $p < 0,05$.



Fonte: do autor

5 DISCUSSÃO

A LP promoveu resistência à insulina e diminuição na sensibilidade à insulina, no grau de fosforilação em serina da Akt, no conteúdo da proteína GLUT4 na membrana plasmática e no seu índice de translocação em tecido muscular esquelético.

Nossos resultados demonstram que não houve diferença significativa na massa corporal entre o grupo CN e o grupo LP. Esses dados estão de acordo com o trabalho de Astolphi *et al.* (2013) em que ratos adultos com LP não apresentaram diferença na massa corporal em comparação com o grupo controle ao longo de 30 dias. Semelhantemente, com relação à ingestão alimentar não encontramos diferença entre o grupo CN e LP ao longo dos 30 dias de manutenção dos animais. Isto pode indicar que os animais se alimentaram normalmente e provavelmente não sentiram dor decorrente da indução da LP (MCGIVERN; BERNTSON, 1980).

No presente estudo foi observada uma relação entre LP e resistência à insulina. Nossos resultados demonstraram que a sensibilidade à insulina, avaliada pelo HOMA-IR, encontrou-se diminuída nos ratos LP em relação aos ratos CN. Este resultado está de acordo com trabalhos de Bain *et al.* (2009) que detectaram resistência insulínica em ratas com LP crônica e de Astolphi *et al.* (2013) que observaram menor sensibilidade à insulina em ratos adultos com LP, identificada pela taxa de decaimento de glicose (Kitt). Como consequência da resistência insulínica, os níveis plasmáticos de insulina e glicose podem estar elevados (BAIN *et al.*, 2009). Porém, em nosso estudo não observamos diferença significativa nas concentrações plasmáticas de glicose e insulina entre os grupos LP e CN (Tabela 1). Estes resultados corroboram os achados de Colombo *et al.* (2012), que não identificaram alteração tanto na glicemia como na insulinemia em ratos com periodontite, apesar destes animais apresentarem resistência à insulina. Astolphi *et al.* (2013) estudando ratos com LP também não observaram alterações glicêmicas em ratos resistentes à insulina.

A LP induzida por broca foi comprovada pela análise histológica (Figura 2), após 30 dias da indução desta lesão. Pôde-se observar total necrose pulpar, além de reabsorção óssea e cementária. A região do ligamento periodontal apresentou-se desorganizada com infiltrado inflamatório evidente.

A lesão periapical provoca inflamação e resposta imunológica em decorrência dos microorganismos que invadem e destroem a polpa dental (BERGENHOLTZ, 1977). Adicionalmente, Marton e Kiss (1993) relataram alta incidência de macrófagos na LP, sugerindo que estas células são componentes essenciais do granuloma periapical. Os macrófagos desempenham funções produtora e reguladora da inflamação por meio dos seus mediadores solúveis, além de serem a principal fonte das citocinas IL-1 α , IL-1 β e TNF- α (METZGER, 2000).

A LP apresenta diferentes tipos de células inflamatórias, tanto da imunidade inata (neutrófilos, macrófagos e células dendríticas), como da imunidade adaptativa (linfócitos T e B e células plasmáticas). Bactérias e toxinas oriundas do sistema de canais radiculares contaminado causam, primeiramente, reação inflamatória não específica seguida por produção de uma diversidade de mediadores inflamatórios, com o propósito de limitar a disseminação da infecção, além de proteger os tecidos periapicais (DESAI *et al.*, 2011). O resultado entre a ação de microorganismos e células de defesa do hospedeiro leva a uma destruição dos tecidos periapicais (NAIR, 1997). Citocinas inflamatórias, como o TNF- α , presentes na LP podem atuar de maneira sistêmica devido à ligação circulatória entre a polpa dental e tecidos distantes da cavidade oral. Neste sentido, sabe-se que o estado hiperinflamatório da LP pode contribuir para o desenvolvimento de resistência à insulina (ASTOLPHI *et al.*, 2013).

O TNF- α prejudica o sinal insulínico por inibir a fosforilação em tirosina do IRS-1 (AHMAD; GOLDSTEIN, 1997). Astolphi *et al.* (2013) identificaram aumento de TNF- α na circulação sistêmica de ratos com LP, associados à redução da sensibilidade à insulina e sinal insulínico. Dessa maneira, já é bem estabelecido que processos inflamatórios estão relacionados a prejuízos na etapa inicial da via do sinal insulínico.

Outros mecanismos desencadeados por mediadores inflamatórios envolvidos com o desenvolvimento de resistência insulínica incluem a ativação crônica das proteínas c-Jun N-terminal quinase (JNK) e quinase do inibidor do fator de transcrição NF- κ B (IKK) (FERRANTE, 2007). Um aumento da atividade inflamatória é comumente observado na obesidade, na qual a concentração plasmática de TNF- α e de outros marcadores inflamatórios encontram-se elevados, caracterizando esta patologia como

um estado de inflamação crônica de baixo grau (FANTUZZI, 2005). Conforme descrito anteriormente, o TNF- α promove diminuição do sinal insulínico.

Sabe-se que a atividade pró-inflamatória prejudica a etapa inicial da cascata de sinalização insulínica. Dessa forma, estudos utilizando diferentes modelos experimentais vêm sendo realizados, com o intuito de avaliar se o processo inflamatório pode promover alterações em etapas posteriores da cascata de sinalização insulínica, como a ativação da Akt, após estímulo insulínico. A avaliação da fosforilação da Akt é frequentemente utilizada para avaliação do sinal insulínico em estudos envolvendo animais para correlacionar à resistência insulínica (KRISTENSEN *et al.*, 2014; MELO *et al.*, 2014; WATANABE *et al.*, 2011). Em nossos estudos observou-se que a LP promoveu diminuição da fosforilação em serina da Akt, no entanto esta diferença não foi observada na fosforilação em treonina, após estímulo insulínico, quando comparado com o grupo CN.

Watanabe *et al.* (2011) relataram que ratos com periodontite e mutação no TLR4 (apresentando perda da função) submetidos à dieta hiperlipídica apresentaram maior fosforilação da Akt, acompanhada de menor expressão de TNF- α em tecido hepático quando comparados aos animais com atividade preservada de TLR4.

Atualmente, estudos têm demonstrado a influência de novas proteínas relacionadas à inflamação sobre a transdução do sinal insulínico. A midkine (MK) é um fator de crescimento que se liga a heparina e desempenha atividades pleiotrópicas (KADOMATSU *et al.*, 2013). Esta molécula está envolvida com uma variedade de processos biológicos incluindo desenvolvimento neuronal, angiogênese, proliferação e diferenciação celular entre outros (SUEYOSHI *et al.*, 2012; WECKBACH *et al.*, 2012). Ratos deficientes em MK são protegidos contra doenças inflamatórias como encefalomielite e artrite reumatóide (MARUYAMA *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2008).

Fan *et al.* (2014) encontraram aumento nos níveis de MK em tecido adiposo de roedores e no soro de humanos, ambos portadores de obesidade. Neste mesmo trabalho, experimentos *in vitro* com adipócitos 3T3-L1 foram realizados para avaliar o impacto da MK no sinal insulínico, e foi concluído que a MK prejudica o sinal insulínico, uma vez que foi observada redução da fosforilação da Akt e IRS-1, além de menor translocação de GLUT4 para membrana plasmática em relação às células do grupo controle.

A folistatina-like1 (FSTL1), uma nova adipocina pró-inflamatória, foi sugerida por Fan *et al.* (2013) como mediadora da inflamação e resistência à insulina na obesidade. Observou-se que o tratamento de adipócitos *3T3-L1* com FSTL1 recombinante diminuiu o grau de fosforilação da Akt e IRS-1 em resposta a estimulação insulínica. Interessantemente, os estudos citados relataram redução da fosforilação da Akt após estímulo insulínico, apresentando como fator comum atividade alterada de componentes inflamatórios.

Estudos anteriores do nosso laboratório observaram alterações na etapa inicial da via do sinal insulínico, representado por menor fosforilação da pp185 em tecido adiposo de ratos com LP (ASTOLPHI *et al.*, 2013). Ademais, a mesma alteração foi encontrada em tecido adiposo e muscular de ratos com doença periodontal, que é outra fonte de inflamação oral (COLOMBO *et al.*, 2012). Os resultados do presente estudo demonstraram que a LP, modelo de inflamação oral, promoveu alteração na continuidade da via do sinal insulínico.

Kong *et al.* (2013) demonstraram que um composto químico a base de plantas, denominado paeoniflorin, atenuou inflamação induzida por TNF- α e foi capaz de restaurar fosforilação do IRS-1 e Akt em *3T3-L1* adipócitos, indicando que o TNF- α atua diretamente na redução da fosforilação da Akt. Neste sentido, o tratamento de distúrbios inflamatórios como a LP pode atuar na reversão de alterações sistêmicas, visto que as concentrações plasmáticas de citocinas podem ser reduzidas em pacientes submetidos à apicectomia, curetagem (MÁRTON *et al.*, 1988; MÁRTON; KISS, 2000) e exodontia (REN; MALMSTROM, 2007) ou terapia endodôntica convencional (KETTERING; TORABINEJAD, 1984).

O fato de não termos encontrado diferença no grau de fosforilação em treonina da Akt pode ser justificado pela atuação de diferentes proteínas que participam do processo de ativação da Akt. Tsuchiya *et al.* (2014), em seu estudo, demonstraram que a via PDK1 promove a fosforilação da Akt1 em Thr 308 e da Akt2 em Thr 309; e a da PI3K fosforila Akt1 em Thr 308 e Ser 473 e Akt2, apenas em Ser 474. Provavelmente no nosso estudo, a alteração foi via PI3K, promovendo maiores alterações na fosforilação da Akt em serina. Dessa forma, podemos inferir que ativação da Akt é submetida a uma regulação molecular extremamente complexa que é dependente de diferentes proteínas que não foram avaliadas neste estudo.

É de extrema importância que a atividade da Akt esteja preservada, pois esta apresenta função determinante na via de sinalização insulínica por meio da ativação da translocação de GLUT4 para membrana plasmática (LETO; SALTIEL, 2012).

O GLUT4 é um transportador dependente de insulina encontrado nas membranas celulares do músculo esquelético, cardíaco e tecido adiposo. Sem estimulação hormonal, grande parte da proteína GLUT4 permanece internalizada em vesículas citoplasmáticas. Após a estimulação, esses transportadores são translocados para a membrana plasmática, proporcionando um aumento no transporte de glicose. Modificações na expressão do gene que codifica a proteína GLUT4, tanto no tecido adiposo como no músculo esquelético correlacionam-se de maneira direta com aumento ou redução da sensibilidade insulínica (MACHADO *et al.*, 2006). Adicionalmente, o exercício físico pode estimular a translocação de GLUT4 para membrana plasmática das células musculares via AMPK, sendo este, um mecanismo independente de insulina (HAYASHI *et al.*, 1998; KENNEDY *et al.*, 1999).

Segundo Seraphim *et al.* (2001), em modelos de obesidade, a resistência à insulina está associada à menor expressão do transportador de glicose GLUT4 e/ou prejuízo na transdução do sinal insulínico em músculo esquelético e tecido adiposo. Dessa forma, este transportador é de fundamental importância para homeostase glicêmica (CARVALHO *et al.*, 2005; LEGUISAMO *et al.*, 2012).

No presente estudo não foi observada diferença no conteúdo de GLUT4 na fração M no músculo esquelético de ratos do grupo LP após 30 dias de exposição à doença, quando comparados com ratos do grupo controle. Entretanto, constatou-se redução de GLUT4 na fração PM do grupo LP, sugerindo uma redução na captação basal de glicose. Nossos resultados corroboram os achados de De Carvalho Papa *et al.* (2002), que observaram redução no conteúdo de GLUT4 no músculo gastrocnêmio de ratos obesos somente após 7 meses. De maneira semelhante, Leguisamo *et al.* (2012) relataram, em um estudo realizado com um modelo experimental de síndrome metabólica, que houve redução do conteúdo de GLUT4 no músculo esquelético, depois de 3 meses da indução da doença. Dessa maneira, é possível que a ausência de diferença no conteúdo proteico de GLUT4 na fração M observada neste estudo, seja devido ao modelo experimental de 30 dias de exposição a LP.

No presente trabalho, observou-se que a LP foi capaz de promover alterações no índice de translocação de GLUT4 para membrana plasmática. Isto pode ser devido à atuação de diferentes vias de sinalização envolvidas nesse processo. Quando a insulina se liga ao seu receptor presente na superfície de células musculares, inicia-se uma cascata de sinalização intracelular que pode ativar duas vias dependentes da PI3K promovendo a translocação de GLUT4 para membrana plasmática de maneiras distintas (KLIP *et al.*, 2014). A primeira via envolvida é a PI3K/Akt/AS160 – RabGTPase (TUNDUGURU *et al.*, 2014). Após estímulo, a Akt transmite o sinal para AS160, que por sua vez ativa as GTPases Rab8A e Rab13. Essas proteínas quando ativadas pela insulina são consideradas *downstream* da AS160 e participam da regulação do tráfego de GLUT4 para membrana plasmática (SUN *et al.*, 2010).

A família Rho GTPase é composta por pequenas proteínas que ativam diversas vias de sinalização envolvidas com regulação celular em resposta a estímulos extracelulares (BURRIDGE; WENNERBERG, 2004). Tem sido relatado envolvimento de membros dessa família com a translocação de GLUT4 (ISHIKURA; KLIP, 2008). Em adipócitos, o TC10, um membro da família Rho, está envolvido na regulação da translocação de GLUT4 de maneira independente da Akt (CHIANG *et al.*, 2001). Outro membro desta família, identificado como Rac1 tem sido apontado como regulador específico da translocação de GLUT4 no musculo esquelético (CHIU *et al.*, 2011). Chiu *et al.* (2011) sugerem que a função primária da Rac1 na via de sinalização da insulina pode ser a regulação do citoesqueleto de actina. Microtúbulos e polímeros de actina reorganizados servem como filamentos ao longo dos quais as vesículas de GLUT4 são transportadas por proteínas motoras cinesinas (KIF3 e KIF5B) e miosinas (Myo1c, Myo5a e Myo5b), respectivamente (BOSE *et al.*, 2002; IMAMURA *et al.*, 2003; ISHIKURA; KLIP, 2008; SEMIZ *et al.*, 2003; YOSHIZAKI *et al.*, 2007; YIP *et al.*, 2008) Dessa maneira, é provável que uma importante função da Rac1 na translocação de GLUT4 em células musculares é a regulação do citoesqueleto.

Outro possível papel da Rac1 na translocação de GLUT4 é a ativação de uma serina/treonina kinase PAK1 (SATO, 2014).

PAK1 é uma serina/treonina quinase que executa múltiplas funções celulares e fisiológicas. PAK1 foi inicialmente descoberto em 1994, como um novo efetor da família de pequenas GTPases (MANSER *et al.*, 1994). A função da PAK1 tem sido

extensivamente estudada em relação a apoptose, proliferação celular, tumorigênese. Ademais, em resposta ao estímulo insulínico, tem sido demonstrado que PAK1 participa da regulação de citoesqueletos de actina, promovendo à translocação de GLUT4 no músculo esquelético, enquanto nas células beta estimula liberação de insulina (CHIANG; JIN, 2014).

Um estudo recente realizado por Sylow *et al.* (2013) relatou que a sinalização da Rac1-Pak1 é capaz de regular a captação de glicose no tecido muscular. Além disso, esse eixo de sinalização foi prejudicado em condições de resistência à insulina (SYLOW *et al.*, 2013). Adicionalmente, inibição farmacológica da Akt e Rac1, bloqueou completamente a captação de glicose no músculo esquelético (SYLOW *et al.*, 2014). Desse modo, tanto a via da Rac1 quanto a via da Akt aumentam a captação de glicose no músculo esquelético, e como exposto anteriormente, essas vias parecem atuar de forma independente uma da outra.

Conforme descrito acima, vários estudos demonstram a relação entre inflamação local e resistência à insulina. Isto pode ser decorrente de alterações de várias proteínas que influenciam o sinal insulínico, o conteúdo de GLUT4 e a sua translocação para a membrana plasmática. Alterações nestes fatores podem promover o desenvolvimento de resistência à insulina, principal característica do DM2.

6 RESUMO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS

A LP:

- não alterou a ingestão alimentar e peso corpóreo;
- não alterou as concentrações plasmáticas de glicose e insulina;
- reduziu a sensibilidade à insulina;
- reduziu o grau de fosforilação da Akt em serina, porém não alterou a fosforilação desta proteína em resíduos de treonina;
- reduziu o conteúdo de GLUT4 na membrana plasmática e seu índice de translocação, mas não alterou seu conteúdo no citoplasma.

7 CONCLUSÃO

A partir desses resultados podemos inferir que a LP promoveu resistência à insulina, prejudicou etapas posteriores do sinal insulínico e reduziu tanto o conteúdo de GLUT4 na membrana plasmática como seu índice de translocação em músculo esquelético gastrocnêmio. Desta maneira, o presente estudo enfatiza a importância de prevenir lesão periapical para prevenir a resistência à insulina, intimamente relacionada com o DM2.

REFERÊNCIAS

ABELLA, V. et al. Adipokines, metabolic syndrome and rheumatic diseases. **J. Immunol. Res.** v. 2014, p. 343746, 2014.

AHMAD, F.; GOLDSTEIN, B. J. Effect of tumor necrosis factor-alpha on the phosphorylation of tyrosine kinase receptors is associated with dynamic alterations in specific protein-tyrosine phosphatases. **J. Cell. Biochem.** v. 64, n. 1, p. 117-127, Jan. 1997.

ALESSI, D. R. et al. 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the Drosophila DSTPK61 kinase. **Curr. Biol.** v. 7, n. 10, p. 776-789, Oct. 1997.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 35, Suppl. 1, p. S64-S71, Jan. 2012.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes. **Diabetes Care**, v. 37, suppl. 1, p. S14-S80, Jan. 2014.

ARAKI, E. et al. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. **Nature**, v. 372, n. 6502, p. 186-190, Nov. 1994.

ASTOLPHI, R. D. et al. Periapical lesions decrease insulin signal and cause insulin resistance. **J Endod.**, v. 39, n. 5, p. 648-652, May 2013.

BAIN, J. L. et al. Effects of induced periapical abscesses on rat pregnancy outcomes. **Arch. Oral Biol.**, v. 54, n. 2, p. 162-171, Feb. 2009.

BENDER, I. B.; BENDER, A. B. Diabetes mellitus and the dental pulp. **J. Endod.**, v. 29, n. 6, p. 383-389, Jun 2003.

BERGENHOLTZ, G. Effect of bacterial products on inflammatory reactions in the dental pulp. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 85, n. 2, p. 122-129, 1977 Jan-Feb. 1977.

BLETSA, A.; BERGGREEN, E.; BRUDVIK, P. Interleukin-1alpha and tumor necrosis factor-alpha expression during the early phases of orthodontic tooth movement in rats. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 114, n. 5, p. 423-429, Oct. 2006.

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

BOSE, A. et al. Glucose transporter recycling in response to insulin is facilitated by myosin Myo1c. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 821-824, 2002 Dec. 2002.

BRODBECK, D.; CRON, P.; HEMMING, B. A. A human protein kinase Bgamma with regulatory phosphorylation sites in the activation loop and in the C-terminal hydrophobic domain. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 14, p. 9133-9136, Apr. 1999.

BURRIDGE, K.; WENNERBERG, K. Rho and Rac take center stage. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 167-179, Jan. 2004.

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

CANCELLO, R. et al. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. **Diabetes**, v. 54, n. 8, p. 2277-2286, Aug. 2005.

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

CARVALHO, E. et al. Adipose-specific overexpression of GLUT4 reverses insulin resistance and diabetes in mice lacking GLUT4 selectively in muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 289, n. 4, p. E551-E561, Oct. 2005.

CHAKRABORTY, A. et al. Inositol pyrophosphates inhibit Akt signaling, thereby regulating insulin sensitivity and weight gain. **Cell**, v. 143, n. 6, p. 897-910, Dec. 2010.

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

CHEATHAM, B. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. **Mol. Cell. Biol.**, v. 14, n. 7, p. 4902-4911, Jul. 1994.

CHENG, J. Q. et al. AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 19, p. 9267-9271, Oct. 1992.

CHIANG, S. H. et al. Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. **Nature**, v. 410, n. 6831, p. 944-948, Apr. 2001.

CHIANG, Y. T.; JIN, T. p21-Activated protein kinases and their emerging roles in glucose homeostasis. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 306, n. 7, p. E707-E722, Apr. 2014.

CHIU, T. T. et al. Rac1 signalling towards GLUT4/glucose uptake in skeletal muscle. **Cell Signal**, v. 23, n. 10, p. 1546-1554, Oct. 2011.

CHIU, S. Y. et al. Temporal sequence of the bidirectional relationship between hyperglycemia and periodontal disease: a community-based study of 5,885 Taiwanese aged 35–44 years. **Acta Diabetol.**, 2014. no prelo.

COLOMBO, N. H. et al. Periodontal disease decreases insulin sensitivity and insulin signaling. **J. Periodontol.**, v. 83, n. 7, p. 864-870, Jul. 2012.

CONDE, J. et al. Adipokines: biofactors from white adipose tissue. a complex hub among inflammation, metabolism, and immunity. **Biofactors**, v. 37, n. 6, p. 413-420, 2011 Nov/Dec 2011.

COPPACK, S. W. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 60, n. 3, p. 349-356, Aug. 2001.

CROSS, D. A. et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. **Nature**, v. 378, n. 6559, p. 785-789, 1995 Dec. 21-28 1995.

CZECH, M. P.; CORVERA, S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 4, p. 1865-1868, Jan. 1999.

DALMAS, E.; CLÉMENT, K.; GUERRE-MILLO, M. Defining macrophage phenotype and function in adipose tissue. **Trends Immunol.**, v. 32, n. 7, p. 307-314, Jul. 2011.

DE CARVALHO PAPA, P. et al. GLUT4 protein is differently modulated during development of obesity in monosodium glutamate-treated mice. **Life Sci.**, v. 71, n. 16, p. 1917-1928, Sep. 2002.

DEPALMA, R. G. et al. Cytokine signatures in atherosclerotic claudicants. **J. Surg. Res.**, v. 111, n. 2, p. 215-221, May 2003.

DESAI, S.V. et al. Toll-like receptor 2 expression in refractory periapical lesions. **Int Endod J.** v.44, n.10, p.907-916, Oct. 2011.

DUNCAN, B. B. et al. Low-grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. **Diabetes**, v. 52, n. 7, p. 1799-1805, Jul. 2003.

ELNER, S. G. et al. Cytokines in proliferative diabetic retinopathy and proliferative vitreoretinopathy. **Curr. Eye Res.**, v. 14, n. 11, p. 1045-1053, Nov. 1995.

FAM, B. C. et al. Normal muscle glucose uptake in mice deficient in muscle GLUT4. **J. Endocrinol.**, v. 214, n. 3, p. 313-327, Sep 2012.

FAN, N. et al. Midkine, a potential link between obesity and insulin resistance. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e88299, 2014.

FAN, N. *et al.* Follistatin-like 1: a potential mediator of inflammation in obesity. **Mediators Inflamm.**, v. 2013, p. 752519, 2013.

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

FANTUZZI, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 115, n. 5, p. 911-920, May 2005.

FERRANTE, A. W. Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation. **J Intern Med**, v. 262, n. 4, p. 408-14, Oct 2007.

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

FOUAD, A. F. Diabetes mellitus as a modulating factor of endodontic infections. **J. Dent. Educ.**, v. 67, n. 4, p. 459-467, Apr. 2003.

FRÖJDÖ, S.; VIDAL, H.; PIROLA, L. Alterations of insulin signaling in type 2 diabetes: a review of the current evidence from humans. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1792, n. 2, p. 83-92, Feb. 2009.

GARBER, S. E. et al. The effect of hyperglycemia on pulpal healing in rats. **J. Endod.**, v. 35, n. 1, p. 60-62, Jan. 2009.

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

GHOSH, S.; ASHCRAFT, K. An IL-6 link between obesity and cancer. **Front Biosci.**, v. 5, p. 461-478, 2013.

GLEESON, M. et al. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 11, n. 9, p. 607-615, Sep. 2011.

GRATCHEV, A. et al. Alternatively activated antigen-presenting cells: molecular repertoire, immune regulation, and healing. **Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.**, v. 14, n. 5, p. 272-279, 2001 Sep/Oct 2001.

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

HAK, A. E. et al. Associations of C-reactive protein with measures of obesity, insulin resistance, and subclinical atherosclerosis in healthy, middle-aged women. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 19, n. 8, p. 1986-1991, Aug 1999.

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

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

IMAMURA, T. et al. Insulin-induced GLUT4 translocation involves protein kinase C-lambda-mediated functional coupling between Rab4 and the motor protein kinesin. **Mol. Cell. Biol.**, v. 23, n. 14, p. 4892-4900, Jul. 2003.

ISHIKURA, S.; KLIP, A. Muscle cells engage Rab8A and myosin Vb in insulin-dependent GLUT4 translocation. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 295, n. 4, p. C1016-C102525, Oct. 2008.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. Diabetes Atlas 2014.

JENSEN, T.; DECKERT, T. Diabetic retinopathy, nephropathy and neuropathy. Generalized vascular damage in insulin-dependent diabetic patients. **Horm. Metab. Res. Suppl.**, v. 26, p. 68-70, 1992.

JONES, P. F. et al. Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 88, n. 10, p. 4171-4175, May 1991.

JOSHIPURA, K. J. et al. Pulpal inflammation and incidence of coronary heart disease. **J. Endod.**, v. 32, n. 2, p. 99-103, Feb. 2006.

KADOMATSU, K.; KISHIDA, S.; TSUBOTA, S. The heparin-binding growth factor midkine: the biological activities and candidate receptors. **J. Biochem.**, v. 153, n. 6, p. 511-521, Jun. 2013.

KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 840-846, Dec. 2006.

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

KASUGA, M. et al. Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin receptor in a cell-free system. **Nature**, v. 298, n. 5875, p. 667-669, Aug. 1982b.

KENNEDY, J. W.; HIRSCHMAN, M. F.; GERVINO, E. V.; OCEL, J. V.; FORSE, R. A.; HOENIG, S. J.; LAURIE, D. A.; GOODYEAR, J.; HORTON, E. S. Acute exercise induces glut4

translocation in skeletal muscle of normal human subjects and subjects with type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 48, n. 5, p. 1192-1197, May. 1999.

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

KIM, Y. L. et al. Relation of absolute or relative adiposity to insulin resistance, retinol binding protein-4, leptin, and adiponectin in type 2 diabetes. **Diabetes Metab. J.**, v. 36, n. 6, p. 415-421, Dec. 2012.

KLIP, A. et al. Signal transduction meets vesicle traffic: the software and hardware of GLUT4 translocation. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 306, n. 10, p. C879-C886, May 2014.

KOHSAKA, T. et al. Periapical lesions in rats with streptozotocin-induced diabetes. **J. Endod.**, v. 22, n. 8, p. 418-421, Aug. 1996.

KONG, P. R. et al. Effects of paeoniflorin on tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance and changes of adipokines in 3T3-L1 adipocytes. **Fitoterapia**, v. 91, p. 44-50, Dec. 2013.

KRISTENSEN, J. M. et al. Two weeks of metformin treatment induces AMPK-dependent enhancement of insulin-stimulated glucose uptake in mouse soleus muscle. **Am J Physiol Endocrinol. Metab.**, v. 306, n. 10, p. E1099-E11109, May 2014.

KRUGER, N. J.; HAMMOND, J. B. Immunodetection of proteins on "western" blots using (125)i-labeled protein a. **Methods Mol. Biol.**, v. 3, p. 409-417, 1988.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, Aug. 1970.

LAGO, F. et al. Cardiometabolic comorbidities and rheumatic diseases: focus on the role of fat mass and adipokines. **Arthritis Care Res.**, v. 63, n. 8, p. 1083-1090, Aug. 2011.

LEGUISAMO, N. M. et al. GLUT4 content decreases along with insulin resistance and high levels of inflammatory markers in rats with metabolic syndrome. **Cardiovasc. Diabetol.**, v. 11, p. 100, 2012.

LETO, D.; SALTIEL, A. R. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 13, n. 6, p. 383-396, Jun. 2012.

LIBBY, P. Role of inflammation in atherosclerosis associated with rheumatoid arthritis. **Am. J. Med.**, v. 121, n. 10 Suppl 1, p. S21-S31, Oct 2008.

LIBMAN, I. M. et al. Insulin dependent diabetes mellitus in the 21st century and beyond a model disease for global health? (A review). **Diabete Metab.**, v. 19, n. 1 Pt 2, p. 74-79, 1993.

LIETZKE, S. E. et al. Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains. **Mol Cell**, v. 6, n. 2, p. 385-394, Aug. 2000.

LÖE, H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 16, n. 1, p. 329-334, Jan. 1993.

LUMENG, C. N.; BODZIN, J. L.; SALTIEL, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **J. Clin. Invest.**, v. 117, n. 1, p. 175-184, Jan. 2007.

MACHADO, U. F.; SCHAAN, B. D.; SERAPHIN, P. M. Transportadores de glicose na síndrome metabólica. **ArqBrasEndocrinolMetab** v. 50, n. 2, Abril 2006.

MANNING, B. D.; CANTLEY, L. C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. **Cell**, v. 129, n. 7, p. 1261-74, Jun 2007.

MANSER, E. et al. A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. **Nature**, v. 367, n. 6458, p. 40-46, Jan. 1994.

MARTINEZ, F. O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 27, p. 451-483, 2009.

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

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

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

MARUYAMA, K. et al. Midkine, a heparin-binding growth factor, is fundamentally involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 50, n. 5, p. 1420-1429, May 2004.

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

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

MEGSON, E.; KAPELLAS, K.; BARTOLD, P. M. Relationship between periodontal disease and osteoporosis. **Int. J. Evid. Based. Healthc.**, v. 8, n. 3, p. 129-139, Sep. 2010.

MELO, A. M. et al. Hypothalamic endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in offspring of mice dams fed high-fat diet during pregnancy and lactation. **Metabolism**, v. 63, n. 5, p. 682-692, May 2014.

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

NAIR, P.N.R. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. **Periodontol. 2000**, v. 13, p.121-148, 1997.

NGUYEN, M. T. et al. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 48, p. 35279-35292, Nov. 2007.

OKADA, T. et al. Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. Studies with a selective inhibitor wortmannin. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 5, p. 3568-3573, Feb. 1994.

PAL, D. et al. Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. **Nat. Med.**, v. 18, n. 8, p. 1279-1285, Aug. 2012.

PAL, M.; FEBBRAIO, M. A.; WHITHAM, M. From cytokine to myokine: the emerging role of interleukin-6 in metabolic regulation. **Immunol. Cell. Biol.**, v. 92, n. 4, p. 331-339, Apr. 2014.

PAULI, J. R.; CINTRA, D. E.; SOUZA, C. T.; ROPELLE, E. R. Novos mecanismos pelos quais o exercício físico melhora a resistência à insulina no musculo esquelético. **Arq Bras Endocrinol. Metab.**; 53/4, 2009.

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

PETERSEN, K. F.; SHULMAN, G. I. Pathogenesis of skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. **Am J Cardiol**, v. 90, n. 5A, p. 11G-18G, Sep 2002.

PRADHAN, S.; GOEL, K. Interrelationship between diabetes and periodontitis: a review. **JNMA. J. Nepal Med. Assoc.**, v. 51, n. 183, p. 144-153, 2011 Jul/Sep 2011.

PRSO, I. B. et al. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin 6 in human periapical lesions. **Mediators Inflamm.**, v. 2007, p. 38210, 2007.

REA, S.; JAMES, D. E. Moving GLUT4: the biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles. **Diabetes**, v. 46, n. 11, p. 1667-1677, Nov. 1997.

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

REYNOLDS, C. M. et al. Dietary saturated fatty acids prime the NLRP3 inflammasome via TLR4 in dendritic cells-implications for diet-induced insulin resistance. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 56, n. 8, p. 1212-1222, Aug 2012.

ROTH, J. Peptide hormone binding to receptors: a review of direct studies in vitro. **Metabolism**, v. 22, n. 8, p. 1059-1073, Aug. 1973.

ROTH, J. et al. Receptors for insulin, NSILA-s, and growth hormone: applications to disease states in man. **Recent Prog.Horm. Res.**, v. 31, p. 95-139, 1975.

SAAD, M. J. A.; ZECCHIN, H. G. Resistência à insulina no diabetes tipo 2. In: ALBUQUERQUE, R.; PIMAZONI NETO, A. (Ed.) **Diabetes na prática clínica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Diabetes, 2011.

SATOH, T. Rho GTPases in insulin-stimulated glucose uptake. **Small GTPases**, v. 5, p. e28102, 2014.

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

SEMIZ, S. et al. Conventional kinesin KIF5B mediates insulin-stimulated GLUT4 movements on microtubules. **EMBO J.**, v. 22, n. 10, p. 2387-2399, May 2003.

SERAPHIM, P. M.; NUNES, M. T.; MACHADO, U. F. GLUT4 protein expression in obese and lean 12-month-old rats: insights from different types of data analysis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, n. 10, p. 1353-62, Oct. 2001.

SHRIHARI, T. G. Potential correlation between periodontitis and coronary heart disease--an overview. **Gen. Dent.**, v. 60, n. 1, p. 20-24, Jan/Feb 2012.

STAAL, S. P.; HARTLEY, J. W.; ROWE, W. P. Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma. **Proc. Natl. Acad. Sci U S A**, v. 74, n. 7, p. 3065-3067, Jul. 1977.

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

STEIN, C. J.; COLDITZ, G. A. The Epidemic of Obesity. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 89, n.6, p.2522-2525, 2004.

SUEYOSHI, T. et al. Therapeutic approaches targeting midkine suppress tumor growth and lung metastasis in osteosarcoma. **Cancer Lett**, v. 316, n. 1, p. 23-30, Mar 2012.

SUN, Y. et al. Rab8A and Rab13 are activated by insulin and regulate GLUT4 translocation in muscle cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 107, n. 46, p. 19909-19914, Nov. 2010.

SUNDQVIST, G. Ecology of the root canal flora. **J. Endod.**, v. 18, n. 9, p. 427-430, Sep. 1992.

SYLOW, L. et al. Rac1 signaling is required for insulin-stimulated glucose uptake and is dysregulated in insulin-resistant murine and human skeletal muscle. **Diabetes**, v. 62, n. 6, p. 1865-1875, Jun. 2013.

SYLOW, L, et al. Akt and Rac1 signaling are jointly required for insulin-stimulated glucose uptake in skeletal muscle and downregulated in insulin resistance. **Cell Signal**, v. 26, n. 2, p. 323-331, Feb. 2014.

TAYLOR, G. W. et al. Non-insulin dependent diabetes mellitus and alveolar bone loss progression over 2 years. **J. Periodontol.**, v. 69, n. 1, p. 76-83, Jan. 1998.

TERPENNING, M. S. The relationship between infections and chronic respiratory diseases: an overview. **Ann. Periodontol.**, v. 6, n. 1, p. 66-70, Dec. 2001.

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

TRAYHURN, P. Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. **Physiol. Rev.**, v. 93, n. 1, p. 1-21, Jan. 2013.

TUNDUGURU, R. et al. Signaling of the p21-activated kinase (PAK1) coordinates insulin-stimulated actin remodeling and glucose uptake in skeletal muscle cells. **Biochem. Pharmacol.**, Sep. 2014. no prelo.

TSUCHIYA, A. ; KANNO, T. ; NISHIZAKI, T. PI3 kinase directly phosphorylates Akt1/2 at Ser473/474 in the insulin signal transduction pathway. **Journal of Endocrinology** v. 220, p. 49–59, 2014.

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

WANG, J. et al. Inhibition of midkine alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis through the expansion of regulatory T cell population. **Proc. Natl. Acad. Sci U S A**, v. 105, n. 10, p. 3915-3920, Mar. 2008.

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

WECKBACH, L. T. et al. Midkine acts as proangiogenic cytokine in hypoxia-induced angiogenesis. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 303, n. 4, p. H429-H438, Aug 2012.

WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J. Clin. Invest.**, v. 112, n. 12, p. 1796-1808, Dec. 2003.

WENTWORTH, J. M. et al. Pro-inflammatory CD11c+CD206+ adipose tissue macrophages are associated with insulin resistance in human obesity. **Diabetes**, v. 59, n. 7, p. 1648-1656, Jul. 2010.

WHITE, M. F. The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 182, n. 1-2, p. 3-11, May 1998.

WHITE, M. F.; KAHN, C. R. The insulin signaling system. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 1, p. 1-4, Jan 1994.

WHITEMAN, E. L.; CHO, H.; BIRNBAUM, M. J. Role of Akt/protein kinase B in metabolism. **Trends Endocrinol Metab**, v. 13, n. 10, p. 444-451, Dec. 2002.

WITHERS, D. J. et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. **Nature**, v. 391, n. 6670, p. 900-904, Feb. 1998.

WOLFF, S. M. Biological effects of bacterial endotoxins in man. **J. Infect. Dis.**, v. 128, p. Suppl. p.259-264, Jul 1973.

YIP, M. F. et al. CaMKII-mediated phosphorylation of the myosin motor Myo1c is required for insulin-stimulated GLUT4 translocation in adipocytes. **Cell Metab**, v. 8, n. 5, p. 384-98, Nov 2008.

YOSHIZAKI, T. et al. Myosin 5a is an insulin-stimulated Akt2 (protein kinase B beta) substrate modulating GLUT4 vesicle translocation. **Mol. Cell. Biol.**, v. 27, n. 14, p. 5172-5183, Jul. 2007.

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

ZHU, Y. et al. Cardiac PI3K-Akt impairs insulin-stimulated glucose uptake independent of mTORC1 and GLUT4 translocation. **Mol. Endocrinol.**, v. 27, n. 1, p. 172-184, Jan. 2013.

ANEXO A

Parecer de Aprovação da Comissão de Ética na

Experimentação Animal da Faculdade de
Odontologia do *Campus* de Araçatuba – UNESP

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Avaliação da fosforilação da AKT e do conteúdo da proteína transportadora de glicose GLUT4 em músculo esquelético de ratos adultos com lesão periapical" sob responsabilidade da Pesquisadora DÓRIS HISSAKO SUMIDA e colaboração de Renato Felipe Pereira está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo FOA-00940-2013.

CERTIFICATE

We certify that the research "Evaluation of phosphorylation of AKT and content of glucose transporter protein GLUT4 in skeletal muscle of rats with periapical lesion", process number FOA-00940-2013, under responsibility of DÓRIS HISSAKO SUMIDA and with collaboration of Renato Felipe Pereira agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.



Prof. DR. EDILSON ARVOLINO
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

ANEXO B

Artigo submetido à revista Journal of Endodontics

Periapical Lesion Decreases Akt Serine Phosphorylation and plasma membrane GLUT4 content in Rats Skeletal Muscle

Renato Felipe Pereira^a, Max Sander de Oliveira da Mota^a, Maria Sara de Lima Coutinho Mattera^a, Fernando Yamamoto Chiba^b, Cléa Adas Saliba Garbin^b, Edilson Ervolino^a, Luciano Tavares Angelo Cintra^c, Maristela Mitiko Okamoto^d, Ubiratan Fabres Machado^d, Doris Hissako Sumida^a

^a Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas-SBFis - Department of Basic Sciences, Araçatuba Dental School, UNESP - Univ Estadual Paulista, Araçatuba, SP, Brazil

^bDepartment of Child and Social Dentistry, Araçatuba Dental School, UNESP - Univ Estadual Paulista, Araçatuba, SP, Brazil

^cEndodontics, Araçatuba Dental School, UNESP - Univ Estadual Paulista, Araçatuba, SP, Brazil

^dDepartment of Physiology and Biophysics, São Paulo Institute of Biomedical Sciences, USP, *Av. Prof. Lineu Prestes, 2415. CEP: 05508-900*

Corresponding author:

Dr. Doris Hissako Sumida
Department of Basic Sciences
Araçatuba Dental School
UNESP- Univ Estadual Paulista
Rod. Marechal Rondon, km 527/528, Araçatuba, SP, Brazil
Zip Code: 16018-805
TEL: (+55) 18 3636 2819
FAX: (+55) 18 3636 3233

E-mail: dorishs@foa.unesp.br

1 **Abstract**

2 **Introduction:** Periapical lesion (PL) promotes insulin resistance; however, the
3 mechanisms underlying this alteration are not fully understood. Therefore, this
4 study aimed to evaluate the Akt serine phosphorylation status and GLUT4
5 expression levels in the gastrocnemius muscle (GM) of rats with PL.

6 **Methods:** Male Wistar rats (n = 42) were distributed equally into control (CN)
7 and PL groups. The pulpal tissue of the PL group rats were exposed to their
8 oral environment for 30 days. Thereafter, glucose and insulin levels were
9 assessed, followed by homeostasis model assessment- insulin resistance
10 (HOMA-IR). The Akt serine phosphorylation and GLUT4 levels of microsomal
11 (M) and plasma membrane (PM) fractions were evaluated by western blotting,
12 and analyzed statistically thereafter.

13 **Results:** PL lead to decreased insulin sensitivity, as observed by HOMA-IR,
14 decreased Akt serine phosphorylation status after insulin stimulus, and
15 decreased GLUT4 levels in the PM fraction compared to the CN group.
16 However, there was no significant difference in the M fraction between both
17 groups.

18 **Conclusions:** PL decreases insulin sensitivity, Akt phosphorylation, and PM
19 GLUT4 content. The present study indicates that preventing endodontic disease
20 can thwart insulin resistance.

21

22 **Key Words**

23 Diabetes Mellitus; Insulin Resistance; Periapical Lesions; Glucose Transporter
24 Type 4.

25

26 **Introduction**

27 The putative link between oral inflammation and systemic health is of great
28 interest to the medical and dental community. The existence of a bidirectional
29 relationship between endodontic disease and type 2 diabetes mellitus has been
30 studied (1), and some clinical and experimental studies have shown a higher
31 prevalence of periapical lesion (PL) in humans and animals with uncontrolled
32 diabetes (2, 3). Diabetes mellitus is one of the most common chronic diseases
33 worldwide, and 439 million adults are estimated to be diabetic by 2030 (4).

34 Insulin resistance is a hallmark for type 2 diabetes. Reduced insulin-stimulated
35 glucose transport, which manifests insulin resistance (5), is associated with
36 chronic low-grade inflammation in obese patients (6). Moreover, periodontal
37 disease and PL may alter insulin signaling and insulin resistance (7, 8). In
38 concordance with these findings, increased pro-inflammatory cytokine levels
39 correlate with PL, obesity, and cause insulin resistance (9, 10, 11). While the
40 exact mechanisms underlying insulin resistance in patients with PL require
41 elucidation, changes in glucose transporter type 4 (GLUT4) expression levels
42 and translocation in skeletal muscle may be crucial for insulin resistance (12).

43 Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin receptor substrate
44 (IRS)-1 isoform. Subsequently, IRS-1 recruits and activates phosphatidylinositol
45 3-kinase (PI3K) that activates Akt, leading to GLUT4 translocation to the plasma
46 membrane. Akt regulates GLUT4 trafficking through its substrate, AS160, a Rab
47 GTPase activating protein (14). PL causes insulin resistance and impairs the
48 initial stage of insulin signaling possibly by reducing tyrosine phosphorylation of
49 pp185 (IRS-1/2) as observed in the adipose tissue of rats with PL (8). In this
50 study, we hypothesized that PL impairs later steps of insulin signaling and
51 GLUT4 expression. To this end, we determined the levels of glucose and
52 insulin, insulin resistance, and GLUT4 expression in the gastrocnemius muscle
53 (GM) of rats. Moreover, the identification of proteins that are misregulated at the
54 various stages of insulin signaling will help in the development of new
55 preventive and therapeutic strategies to ameliorate insulin resistance.

56

57 **Materials and Methods**

58 **Experimental animals**

59 Forty-two male Wistar rats weighing 250–280 g were used in this study. The
60 animals were kept in temperature-controlled rooms and were given water and
61 food ad libitum. The local ethics committee approved all experimental protocols
62 according to the protocol number 2013/00940.

63

64 **Periapical lesion induction**

65 The animals were randomly distributed into two groups of 21 animals each:
66 control (CN) group and periapical (PL) group. The PL group animals were
67 anesthetized by intraperitoneal injection with 87 mg/kg ketamine (Ketamina
68 Agener; Agener, Embu-Guaçu, SP, Brazil) and 13 mg/kg xylazin (Dorcipec,
69 Vallée, Montes Claros, MG, Brazil). Pulp chambers of the right upper first
70 molars were accessed using a round bur (Long Neck, Dentsply Maillefer,
71 Petrópolis, RJ, Brazil) connected to high-speed rotation equipment. Thirty days
72 exposure to the oral environment induced PL in the dental pulps. Then, the
73 blood and gastrocnemius muscle (GM) tissues were collected after 14 hours
74 fasting from anesthetized rats (50 mg/kg sodium thiopental, Thiopentax,
75 Cristália Itapira, SP, Brazil). The rats were euthanatized after collection.

76

77 **Glycemia, insulinemia and HOMA-IR**

78 Blood was collected in heparinized tubes from 10 animals per group. Plasma
79 was isolated by immediate centrifugation at $3000 \times g$ for 15 min at 4°C , and
80 stored in aliquots at -80°C . The plasma were used to determine glycemia by
81 the glucose oxidase method (Enzymatic glucose, ANALISA Diagnóstica, Belo
82 Horizonte, MG, Brazil) and insulinemia by radioimmunoassay KIT (Sensitive Rat
83 Insulin, SRI-13K, Millipore, St Charles, MO, EUA). Insulin resistance was
84 evaluated by HOMA-IR index (homeostasis model assessment of insulin

85 resistance), calculated by the formula: HOMA-IR = fasting glycemia (mmol/L) ×
86 fasting insulinemia (μU/mL)/22.5 (15).

87

88 **Evaluation of Akt serine phosphorylation status in skeletal muscle**

89 GM was collected from six animals per group before and after administering 1.5
90 U of insulin intravenously at 90 seconds. Tissue samples were prepared
91 according to a previously described method (16) and subjected to Western
92 blotting for quantifying serine phosphorylation, using anti-phosphoserine
93 AktSer473 antibody (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). β-Actin antibody
94 (EMD Millipore Corp, Billerica, USA) was the control. The immunoreactive
95 bands were detected by autoradiography using a chemiluminescent substrate
96 kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Quantitative analysis of the blots
97 was performed using Scion Image-Release Beta 3b software (National
98 Institutes of Health, Frederick, MD).

99

100 **GLUT4 protein analysis**

101 GLUT4 protein was assessed in a total cellular membrane fraction, as
102 previously described by De Carvalho Papa et al (17). Two subcellular
103 membrane fractions of gastrocnemius muscle were prepared as previously
104 described by Papa et al (18). First, tissues were homogenized using a Polytron
105 (Brinkmann Instruments, Westbury, NY) in 10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L
106 EDTA, 250 mmol/L sucrose buffer, pH 7.4, and centrifuged at 3000 × g for 15
107 min. The fat-free supernatant was subjected to a second centrifugation at 12000
108 × g for 15 min. The pellet considered as the plasma membrane (PM) fraction
109 was resuspended in 1 mL of the same buffer. Next, the supernatant was
110 subjected to two consecutive centrifugations at 28000 × g for 15 min, and
111 146000 × g for 75 min. The final pellet was dissolved in 1 mL of the buffer to
112 obtain the microsomal fraction (M). Finally, GM was homogenized in the same
113 buffer, and centrifuged at 1,000 × g for 10 min. The supernatant was saved; the
114 pellet was resuspended in 1/3 of the initial volume of the buffer, and centrifuged

115 again at 1,000 × *g* for 10 min. Both supernatants were mixed and subjected to
116 centrifugation at 150,000 × *g* for 75 min. The final pellet was resuspended as a
117 total membrane fraction in 1 mL of buffer. All procedures were performed at
118 4°C. Total protein in the membrane samples was estimated by Lowry's method
119 (19). Equal amounts of membrane protein were denatured heating in Laemmli's
120 sample buffer (0.5 M Tris–HCl, pH 7.5; 9% SDS; 15% glycerol; 0.05%
121 bromophenol blue; 6% 2-mercaptoethanol), and resolved by 10% SDS-PAGE.
122 Proteins were electrotransferred to nitrocellulose membrane (HYBOND-C
123 Super, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). Non-specific
124 protein binding was reduced by incubating the membrane for 2 h at room
125 temperature in 6% BSA in PBS, pH 7.2). The nitrocellulose membrane was then
126 incubated with anti-GLUT4 antibody for 3 h at 37°C, washed, and incubated
127 with 1.5 L Ci/50 mL of PBS buffer pH 7.2 ¹²⁵I-protein-A (Amersham Pharmacia
128 Biotech, Buckinghamshire, UK) for 2 h at room temperature. After that, the
129 membrane was washed five times in 1% Triton X-100 in PBS for 5 min, and
130 exposed to X-ray film for 2 days. The blots were quantified by densitometry
131 (Image Master 1D®, Pharmacia Biotech, Upsalla, SW), and the results were
132 expressed as arbitrary units (AU).

133

134 **Histological processing of the maxilla**

135 After euthanasia, the maxilla were dissected, decalcified in 10%
136 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) for 60 days, and processed for paraffin
137 embedded histological sections. Latero-lateral, semi-serial sections (4 μm)
138 presented the upper first molar in the longitudinal axis. Hematoxylin and eosin
139 (H&E) staining of the sections allowed studying the dental pulp and periapical
140 region.

141

142 **Statistical Analyses**

143 Graph Pad Prism (version 5.0) software program was used for statistical
144 analysis. Akt serine phosphorylation was determined by analysis of variance

145 (ANOVA), followed by the Tukey post hoc test. Student's t-test was used for
146 analysis of glycemia, insulinemia, HOMA-IR, and GLUT4 content in M and PM
147 fractions. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

148

149 **Results**

150 **Histopathological appearance**

151 The dental pulp and periodontal tissues in the periapical region of the PL group
152 showed complete necrosis when compared to the normal CN group (Figure 1A).
153 The root canal was either empty or occupied by little necrotic remnants. In
154 addition, the periapical region of every dental root displayed PL of variable
155 sizes. The lesion spanned the alveolar bone in this region, where severe bone
156 resorption had occurred and still showed in intense activity (Figure 1B). The
157 lesions had an inflammatory infiltrate consisting predominantly of lymphocytes
158 and macrophages.

159

160 **Glycemia, Insulinemia and HOMA-IR**

161 The values of glycemia, insulinemia, and HOMA-IR are shown in Table 1. The
162 blood glucose and insulin levels were similar in both CN and PL groups.
163 However, the HOMA-IR, calculated from these values, was significantly higher
164 in PL group than in the CN group ($P < 0.05$).

165

166 **Akt serine phosphorylation in GM**

167 Compared to the basal levels, insulin stimulus significantly increased Akt serine
168 phosphorylation in both groups in GM ($P < 0.001$). After insulin stimulus, Akt
169 serine phosphorylation status was significantly lower in the PL group than in the
170 CN group ($P < 0.01$, Figure 2).

171

172 **GLUT4 content in GM**

173 Figure 3 presents the results of GLUT4 expression in the plasma (PM) and
174 microsomal (M) membranes. Both groups had similar GLUT4 expression in the
175 M; however, compared to the CN group, the PL group expressed lower levels of
176 GLUT4 in the PM ($P < 0.05$).

177

178 Discussion

179 In this study, we demonstrated an association between periapical lesions
180 (PL) and insulin resistance. The reduction in insulin sensitivity in PL rats is in
181 concordance with previous findings of higher insulin resistance and decreased
182 insulin sensitivity in rats with chronic PL (8, 21). As a result of insulin resistance,
183 the plasma insulin and glucose levels may be elevated (21). However, we did
184 not observe any elevation in the plasma insulin and glucose levels due to insulin
185 resistance. These results corroborate the findings of Colombo et al (7) that did
186 not observe changes in glycemia of rats with periodontitis, though these animals
187 were insulin resistant and Astolphi et al (8) who also observed no changes in
188 glycemia in insulin resistant rats.

189 The Akt phosphorylation levels indicate the status of insulin signaling as
190 shown in previous animal studies (22-24). Akt serine phosphorylation reduced
191 after insulin stimulus in GM of the PL group compared to that of the CN group.

192 Akt phosphorylation also decreases in other insulin-sensitive tissues
193 such as adipose. Akt phosphorylation diminishes in 3T3-L1 adipocytes from
194 obese ob/ob mice (25), and in adipocytes infiltrating skeletal muscles *in vitro*
195 (26). A periodontitis study associated with high-fat diet identified decreased Akt
196 activity in rat livers (22). In these studies, the researchers attributed the lower
197 Akt activation to the alteration of inflammatory components.

198 PL triggers inflammation and immune response to combat the invading
199 microorganisms at the dental pulp (27). A high incidence of macrophages
200 suggest that they are crucial components of the periapical granuloma (28).
201 Macrophage infiltration and activation trigger the production of pro-inflammatory
202 cytokines such as TNF- α (29). Studies, including our group, have linked TNF- α
203 with impaired insulin signaling. Elevated TNF- α levels inhibit tyrosine

204 phosphorylation of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) associated with obesity
205 (30), periodontitis (7) and periapical lesion (8).

206 Conversely, attenuation of TNF- α -induced inflammation restored tyrosine
207 phosphorylation of IRS-1 and Akt in 3T3-L1 adipocytes, suggesting that TNF- α
208 directly affects Akt phosphorylation. Reduced plasma cytokines in patients
209 undergoing apicoectomy, curettage (32, 33), teeth extraction (34), or
210 conventional endodontic therapy (35) indicate that treatment of inflammatory
211 disorders such as PL can reverse systemic inflammation. Moreover, inhibiting of
212 the Akt protein decreases the GLUT4 translocation to the plasma membrane
213 (36).

214 GLUT4 is a glucose transporter expressed primarily in adipose and
215 muscle tissue (37). Abnormal GLUT4 trafficking may be the cause for
216 decreased glucose uptake in skeletal muscle in insulin resistance conditions
217 (12). There is also reduced GLUT4 in diabetes mellitus and obesity in humans
218 (38) and rodents (39).

219 There was no difference in GLUT4 content in M fraction in rat's GM of PL
220 group after 30 days of exposure to the illness compared to the control rats.
221 However, reduced GLUT4 levels in the PM fraction in rat's GM of PL group
222 compared to the control rats suggests a reduction in basal glucose uptake.
223 These results corroborate the findings of De Carvalho Papa et al (17) that found
224 difference in GLUT4 content in the GM of obese rats only at 7 months.
225 Additionally, an experimental model of metabolic syndrome showed decreased
226 GLUT4 content in GM only after 3 months of disease induction. Thus, the
227 unchanged GLUT4 content in M fraction in this study might be due to
228 insufficient time for disease progression.

229 In conclusion, PL promotes insulin resistance, reduces Akt serine
230 phosphorylation and GLUT4 content of the plasma membrane in gastrocnemius
231 muscle. These data emphasize the importance of preventing endodontic
232 disease to prevent insulin resistance.

233

234 **Acknowledgments**

235 This study was supported by grant (2013/14924-0) from the São Paulo
236 Research Foundation (FAPESP), São Paulo, SP, Brazil. The authors deny any
237 conflicts of interest.

238

239 **References**

- 240 1. Segura-Egea JJ, Castellanos-Cosano L, Machuca G, et al. Diabetes
241 mellitus, periapical inflammation and endodontic treatment outcome. *Med*
242 *Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012;17:e356-e361.
- 243 2. Iwama A, Morimoto T, Tsuji M, et al. Increased number of anaerobic
244 bacteria in the infected root canal in type diabetic rats. *Oral Surgery, Oral*
245 *Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*.
246 2006;101:681–6.
- 247 3. Bender IB, Bender AB. Diabetes mellitus and the dental pulp. *Journal of*
248 *Endodontics*. 2003;29:383-9.
- 249 4. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of
250 diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010;87:4–14.
- 251 5. Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *The Journal of Clinical*
252 *Investigation*. 2000;106:473-81.
- 253 6. Esser N, Legrand-Poels S, Piette J, et al. Inflammation as a link between
254 obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin*
255 *Pract*. 2014;14:187-9.
- 256 7. Colombo NH, Shirakashi DJ, Chiba FY, et al. Periodontal disease
257 decreases insulin sensitivity and insulin signaling. *J Periodontol*.
258 2012;83:864-70.
- 259 8. Astolphi RD, Curbete MM, Colombo NH, et al. Periapical lesions
260 decrease insulin signal and cause insulin resistance. *J Endod*.
261 2013;39:648-652.
- 262 9. Zhang J, Gao Z, Yin J, et al. S6K directly phosphorylates IRS-1 on Ser-
263 270 to promote insulin resistance in response to TNF-(alpha) signaling
264 through IKK2. *J Biol Chem*. 2008;283:35375-353782.
- 265 10. Coelho M, Oliveira T, Fernandes R. Biochemistry of adipose tissue:
266 an endocrine organ. *Arch Med Sci*. 2013;9:191-200.

- 267 11. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J*
268 *Clin Invest.* 2006;116:2308.
- 269 12. Garvey WT, Maianu L, Zhu JH, et al. Evidence for Defects in the
270 Trafficking and translocation of GLUT4 glucose transporters in skeletal
271 muscle as a cause of human insulin resistance. *J Clin Invest.*
272 1998;101:2377-86.
- 273 13. Thirone AC, Huang C, Klip A. Tissue-specific roles of IRS proteins in
274 insulin signaling and glucose transport. *Trends Endocrinol Metab.*
275 2006;17:72–78.
- 276 14. Thong FS, Dugani CB, Klip A. Turning signals on and off: GLUT4 traffic
277 in the insulin-signaling highway. *Physiology (Bethesda).* 2005;20:271–
278 284.
- 279 15. Bonora E, Targher G, Alberiche M, et al. Homeostasis model
280 assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the
281 assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees
282 of glucose tolerance and insulin sensitivity. *Diabetes Care.* 2000;23:57-
283 63.
- 284 16. Carvalho CR, Brenelli SL, Silva AC, et al. Effect of aging on insulin
285 receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase
286 in liver and muscle of rats. *Endocrinology.* 1996;137:151–9.
- 287 17. de Carvalho Papa P, Vargas AM, da Silva JL, et al. GLUT4 protein is
288 differently modulated during development of obesity in monosodium
289 glutamate-treated mice. *Life Sci.* 2002;71:1917–1928.
- 290 18. Papa PC, Seraphim PM, Machado UF. Loss of weight restores GLUT 4
291 content in insulin-sensitive tissues of monosodium glutamate-treated
292 obese mice. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1997;21:1065–70.
- 293 19. Lowry OH, Rosembrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with
294 the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265–275.
- 295 20. Zanquetta MM, Nascimento ME, Mori RC, et al. Participation of beta-
296 adrenergic activity in modulation of GLUT4 expression during fasting and
297 refeeding in rats. *Metabolism.* 2006;55:1538–1545.
- 298 21. Bain JL, Lester SR, Henry WD, et al. Effects of induced periapical
299 abscesses on rat pregnancy outcomes. *Arch Oral Biol.* 2009;54:162–
300 171.

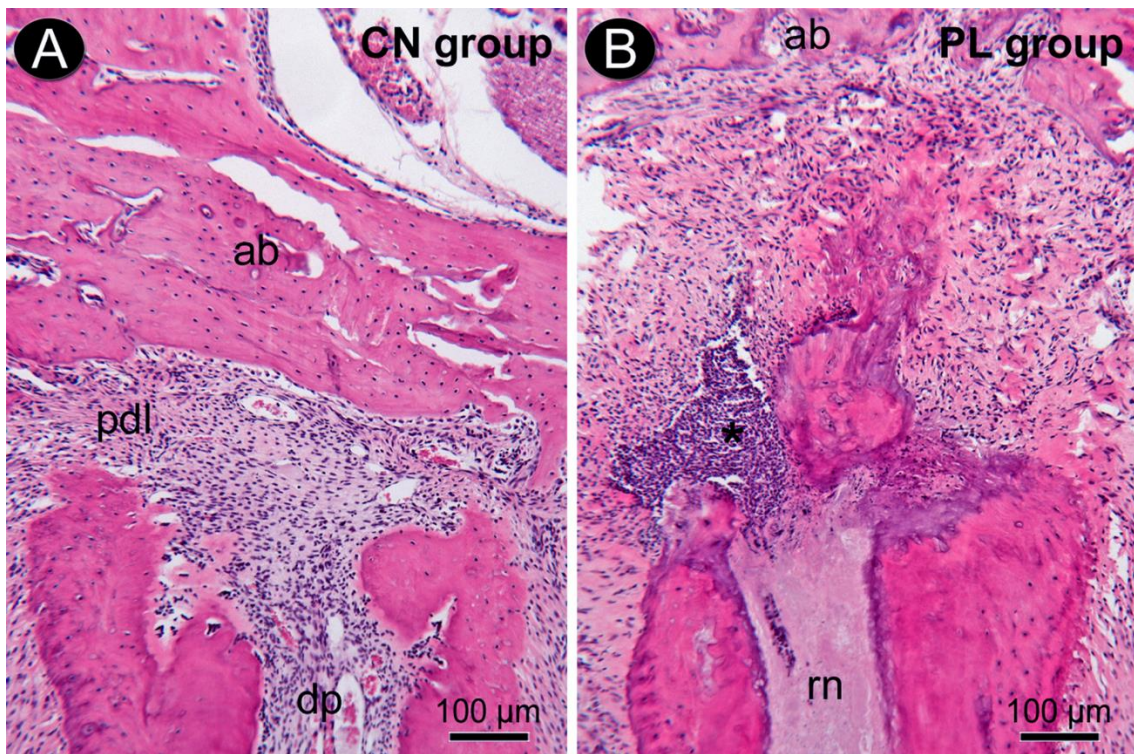
- 301 22. Watanabe K, Iizuka T, Adeleke A, et al. Involvement of toll like receptor 4
302 in alveolar bone loss and glucose homeostasis in experimental
303 periodontitis. *J Periodontal Res.* 2011;46:21–30.
- 304 23. Kristensen JM, Treebak JT, Schjerling P, et al. Two weeks of metformin
305 treatment induces AMPK-dependent enhancement of insulin-stimulated
306 glucose uptake in mouse soleus muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*
307 2014;306:1099–1109.
- 308 24. Melo AM, Benatti RO, Ignacio-Souza LM, et al. Hypothalamic
309 endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in offspring of mice
310 dams fed high-fat diet during pregnancy and lactation. *Metabolism.*
311 2014;63:682–92.
- 312 25. Fan N, Sun H, Wang Y, et al. Midkine, a Potential Link between Obesity
313 and Insulin Resistance. *PLoS One.* 2014;9:e88299.
- 314 26. Seyoum B, Fite A, Abou-Samra AB. Effects of 3T3 adipocytes on
315 interleukin-6 expression and insulin signaling in L6 skeletal muscle cells.
316 *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;410:13–18.
- 317 27. Bergenholtz G. Effect of bacterial products on inflammatory reactions in
318 the dental pulp. *Scand J Dent Res.* 1977;85:122–129.
- 319 28. Marton IJ, Kiss C. Characterization of inflammatory cell infiltrate in dental
320 periapical lesions. *Int Endod J.* 1993;26:131–136.
- 321 29. Metzger Z. Macrophages in periapical lesions. *Endod Dent Traumatol.*
322 2000;16:1–8.
- 323 30. Feinstein R, Kanety H, Papall MZ, et al. Tumor Necrosis Factor- α
324 Suppresses Insulin-induced tyrosine Phosphorylation of Insulin Receptor
325 and Its Substrates. *The Journal of Biological Chemistry.* 1993;268:
326 26055–26058.
- 327 31. Kong P, Chi R, Zhang L, et al. Effects of paeoniflorin on tumor necrosis
328 factor- α -induced insulin resistance and changes of adipokines in 3T3-L1
329 adipocytes. *Fitoterapia.* 2014;91:44–50.
- 330 32. Márton I, Kiss C, Balla G, et al. Acute phase proteins in patients with
331 chronic periapical granuloma before and after surgical treatment. *Oral*
332 *Microbiol Immunol.* 1988;3:95–96.

- 333 33. Márton IJ, Kiss C. Protective and destructive immune reactions in apical
334 periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 2000;15:139–150.
- 335 34. Ren YF, Malmstrom HS. Rapid quantitative determination of C-reactive
336 protein at chair side in dental emergency patients. *Oral Surg Oral Med*
337 *Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;104:49–55.
- 338 35. Kettering JD, Torabinejad M. Cytotoxicity of root canal sealers: a study
339 using HeLa cells and fibroblasts. *Int Endod. J* 1984;17:60–66.
- 340 36. Whiteman EL, Cho H, Birnbaum MJ. Role of Akt/protein kinase B in
341 metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2002;13:444–451
- 342 37. Leto D, Saltiel AR. Regulation of glucose transport by insulin: traffic
343 control of GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13:383–396.38.
- 344 38. Garvey WT, Maianu L, Huecksteadt TP, et al. Pre-translation
345 suppression of a glucose transporter protein causes insulin resistance in
346 adipocytes from patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus
347 and obesity. *J Clin Invest.* 1991;87:1072–1081.
- 348 39. Leguisamo NM, Lehnen AM, Machado UF, et al. GLUT4 content
349 decreases along with insulin resistance and high levels of inflammatory
350 markers in rats with metabolic syndrome. *Cardiovasc Diabetol.*
351 2012;11:100.
- 352

353

354 **Figure legends**

355 **Figure 1:** Histological appearance of the periapical region in CN and PL groups.
356 Hematoxylin and eosin (H&E) staining showed a normal appearance of dental
357 pulp and periodontal tissues in the CN group **(A)** and the lesion established in
358 the periapical region in the PL group **(B)**. Abbreviations and symbols: ab,
359 alveolar bone; *, inflammatory infiltrate; dp, dental pulp; rn, remnants of pulp
360 necrosis; pdl, periodontal ligament. Magnification: 250×; Scale bars: 100 μm.



361

362

363

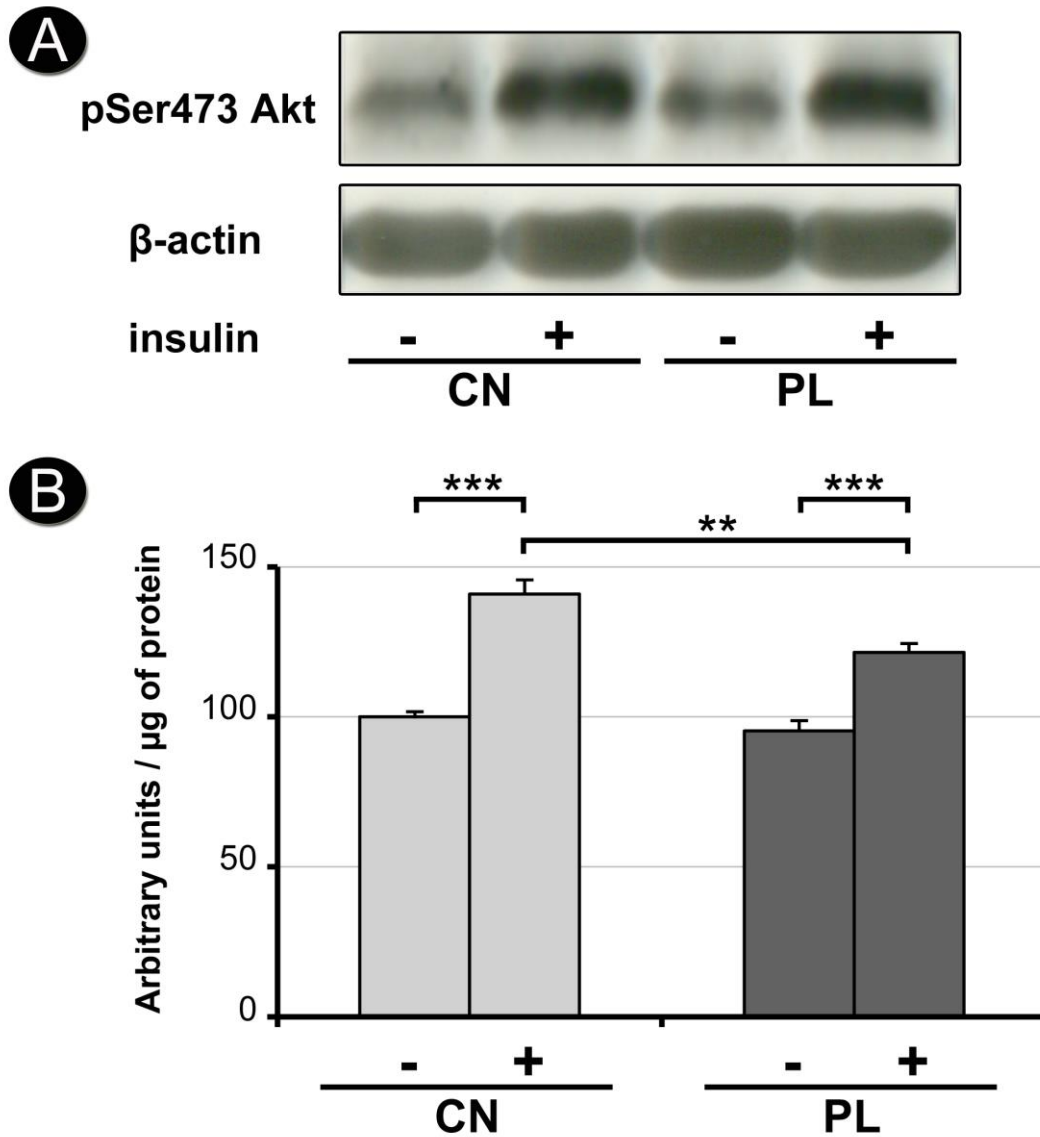
364

365

366

367

368 **Figure 2:** Evaluation of Akt serine phosphorylation status before (-) and after
 369 (+) insulin stimulus in gastrocnemius muscle (GM). In **(A)** typical
 370 autoradiography, equal amounts of protein (185 mg) were subjected to SDS-
 371 PAGE. β -actin was used as a control. In **(B)**, the values of Akt serine
 372 phosphorylation status expressed in arbitrary units are presented as mean \pm
 373 SEM (n = 6). Asterisks indicate the level of statistical significance.



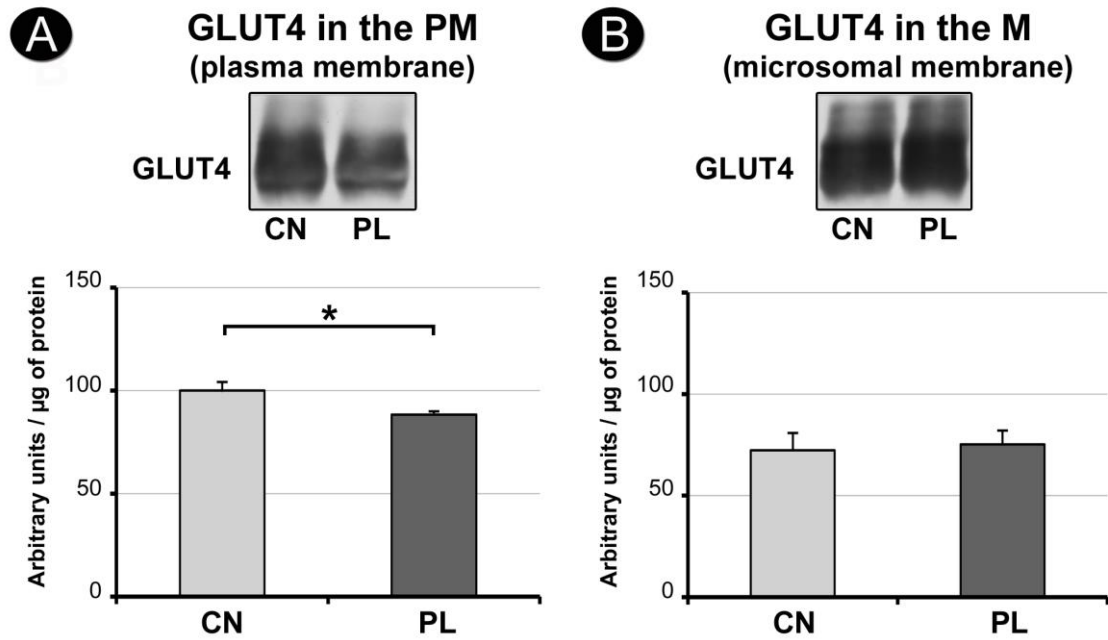
374

375

376

377 **Figure 3** - GLUT4 content in plasma membrane (PM) **(A)** and microsomes
378 membrane (M) **(B)**. The results are presented as mean \pm SEM (n = 5). Asterisks
379 indicate the level of statistical significance.

380



381

382

383

384

385

Table 1: Mean \pm SEM values of glycemia, insulinemia and HOMA-IR of CN and PL groups.

	CN group	PL group
Glycemia (mmol/L)	7.084 \pm 0.2861	6.783 \pm 0.1211
Insulinemia (μ IU/mL)	17.38 \pm 5.943	29.47 \pm 5.204
HOMA-IR	4.174 \pm 1.479	9.792 \pm 1.564*

* $P < 0.05$ CN group vs. PL group