

RENATO FELIPE PEREIRA

**ESTUDO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO
DESENVOLVIMENTO DE RESISTÊNCIA À INSULINA EM
RATOS COM LESÃO PERIAPICAL**

Araçatuba

2018

RENATO FELIPE PEREIRA

**ESTUDO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO DESENVOLVIMENTO DE
RESISTÊNCIA À INSULINA EM RATOS COM LESÃO PERIAPICAL**

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

Orientadora: Profa. Titular Doris Hissako Sumida.

Araçatuba

2018

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP



P436e Pereira, Renato Felipe.
Estudo dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento
de resistência à insulina em ratos com lesão periapical /
Renato Felipe Pereira. – Araçatuba, 2018
73f. : il. ; tab.

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

1. Resistência à insulina 2. Músculo esquelético
3. Periodontite periapical I. T.

CDD 612

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550



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.

2011/2012: Curso de Pós-graduação *Lato Sensu* em Fisiologia do exercício: Fundamentos para a Performance, Reabilitação e Emagrecimento pela Universidade Federal de São Carlos – UFSCar.

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

2016/2017: Doutorado Sanduíche no Exterior no Departamento de Genética Humana na Universidade de Utah – EUA.

2014/2018: Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Fisiológicas, nível de Doutorado, pela Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

Dedicatória

À minha família por sempre acreditarem em mim.

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 Doutorado em Ciências Fisiológicas.

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

À todos os meus familiares, especialmente aos meus pais Antonio e Aparecida por todo o apoio.

Aos amigos do laboratório Fernando Marani, Fernando Yamamoto Chiba, Maria Sara de Lima Coutinho Mattera, Thais Verônica Tsosura, Mariana Lopes Benites, Rodrigo Martins dos Santos, Bruna Soares Tavares, Amanda Gomes Pereira por todo o ensinamento transmitido. Aos alunos de iniciação científica Bianca Belardi, Beatriz Costa, Jhenifer Haiane, Mariana Caioá e Renan Akira, os quais nestes dois anos me prestaram toda ajuda necessária.

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

À Diretoria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP: Prof. Titular Wilson Roberto e ao Vice-Diretor Prof. Tit. João Eduardo Gomes Filho.

Agradecimento especial a Amanda Gomes Pereira pela amizade, companheirismo em todas as horas, por todo conhecimento transmitido, o qual logo mais o tornará uma excelente professora, pesquisadora e pessoa.

Agradecimento especial a equipe do laboratório do Prof. Scott Summers pelos ensinamentos e boa convivência durante o meu estágio de doutorado na Universidade de Utah.

À todos os professores do departamento de Ciências Básicas: Sandra Helena Penha de Oliveira, Ana Cláudia Nakamune, Cristina Antoniali Silva, Wilson Galhego Garcia, Rita Cássica Menegati Dornelles, João Carlos Callera, João César Bedran de Castro, Antônio Hernandes Chaves Neto, Edilson Ervolino, Roberta Okamoto, Mariza Akemi

Matsumoto, Paulo Roberto Botacin, Cláudio Aparecido Casatti, José Américo de Oliveira e Roelf Justino Cruz Rizzolo por somarem seus conhecimentos durante meu aprendizado.

À todos os funcionários da UNESP, que de acordo com suas funções, prestaram sua importante parcela de contribuição nos diferentes estágios de realização desta pesquisa.

Aos funcionários da Biblioteca, Cláudio Hideo Matsumoto, Ana Cláudia Martins Grieger Manzatti, Ana Paula Rimoli de Oliveira, Denise Haruyo Nakamura, Ivone Rosa de Lima Munhoz, Luís Claudio Sedlacek, Luzia Anderlini e Maria Cláudia 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 e Patrick Santos Nogueira da Silva.

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, Camilo Roberto Venâncio, João Batista Alves Correa e Arnaldo César dos Santos

À funcionária Eliseide Maria Ferreira Silva Navega, pela presteza e carinho dedicado aos alunos.

Ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (n^{os} processos: 2014/17619-6 e 2016/07151-2) pela concessão da bolsa de doutorado e Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE).

Saber muito não lhe torna inteligente. A inteligência se traduz na forma que você recolhe, julga, maneja e, sobretudo, onde e como aplica esta informação.

“Carl Sagan”

PEREIRA, R.F. **Estudos dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento de resistencia a insulina em ratos com lesão periapical**. 2018. 73. f Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

RESUMO

Nos últimos anos, a relação entre infecções orais e desordens sistêmicas tem se consolidado como área de grande interesse na comunidade científica médica e odontológica. A lesão periapical (LP) é caracterizada como uma inflamação oral e está associada ao aumento da quantidade de citocinas pró-inflamatórias que possivelmente induzem resistência insulínica (RI). A RI é definida como a incapacidade dos tecidos periféricos em responder adequadamente às concentrações fisiológicas deste hormônio, no entanto, os mecanismos que causam RI não são totalmente compreendidos. Estudos anteriores do nosso laboratório observaram que a LP promove aumento das concentrações plasmáticas de TNF- α , prejuízos na transdução do sinal insulínico e redução do conteúdo de GLUT4 na membrana plasmática em tecido muscular esquelético, indicando uma relação entre LP e RI. Tais achados evidenciam a necessidade de realizar mais estudos para verificar os mecanismos envolvidos nestas alterações. O presente estudo, conduzido em ratos com LP, teve como objetivos: 1) calcular o índice HOMA-IR a partir dos concentrações plasmáticas de glicose e insulina 2) avaliar conteúdo total das proteínas inflamatórias (JNK, IKK α/β e TNF- α) no músculo gastrocnêmio (MG) e o grau de fosforilação de JNK e IKK α/β no mesmo tecido; 3) verificar a presença de macrófagos infiltrados por meio da detecção da proteína F4/80 em MG; 4) quantificar a expressão de fatores de transcrição envolvidos com a diferenciação de linfócitos no baço (T-bet, GATA3 e FOXP3); 5) analisar as concentrações plasmáticas de LPS, HSP70, INF γ , IL-4, TGF- β . Para tanto, foram utilizados 45 ratos Wistar (2 meses de idade) distribuídos em três grupos: a) ratos do grupo controle, sem a LP (CN); b) ratos com LP induzida em primeiro molar superior direito (apenas uma lesão) (1LP); c) ratos com LP induzida em primeiros e segundos molares superiores e inferiores do lado direito (total de quatro lesões) (4LP). A LP foi induzida empregando-se broca em aço carbono dotada de esfera na extremidade com 0,1 mm. A análise estatística foi realizada por análise de

variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5% ($\alpha=5\%$). Os resultados demonstraram uma redução na sensibilidade à insulina e um aumento do conteúdo de macrófagos ao redor das fibras musculares nos grupos LP. O grau de fosforilação de JNK e IKK α/β no MG também foi maior nos grupos LP em relação ao grupo CN. Não foi observada diferença entre os grupos no conteúdo de TNF- α no MG. A expressão gênica de T-bet foi elevada nos grupos LP enquanto que a expressão de FOXP3 mostrou-se reduzida. A expressão de GATA3 foi reduzida no grupo 1LP e elevada no grupo 4LP. Em relação às alterações sistêmicas, foi observado um aumento de LPS, HSP70 e INF- γ nos grupos LP e redução de IL-4 nos mesmos grupos quando comparados ao CN. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos em relação ao TGF- β . Baseados nos resultados do presente estudo, podemos inferir que tanto a imunidade inata como a imunidade adaptativa podem contribuir para a RI observada em ratos com LP. Dentre os possíveis mecanismos responsáveis por essas alterações destaca-se o recrutamento de macrófagos, ativação de vias inflamatórias no tecido muscular e uma modulação da expressão gênica de linfócitos no baço.

Palavras-chave: Resistência à insulina. Músculo esquelético. Periodontite periapical

PEREIRA, R.F. **Study of the mechanisms involved in the development of insulin resistance in rats with periapical lesion.** 2018. 73 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

ABSTRACT

In the last few years, the relationship between oral infections and systemic disorders has been consolidated as an issue of great interest in the medical and dental scientific community. The periapical lesion (PL) is characterized as an oral inflammation and is associated with an increase in the levels of pro-inflammatory cytokines that possibly induce insulin resistance (IR). IR is defined as the inability of peripheral tissues to respond adequately to the physiological concentrations of this hormone, however, mechanisms that cause IR are not fully understood. Previous studies performed by our laboratory have found that PL promotes an increase in plasma TNF- α concentrations, impairment of insulin signal transduction, and reduction of plasma membrane GLUT4 content in skeletal muscle tissue, indicating a relationship between PL and IR. These findings highlight the need for further studies to verify the mechanisms involved in these changes. The present study was conducted in rats with PL and aimed: 1) to calculate the HOMA-IR index from the plasma glucose and insulin levels 2) to evaluate the total content of the inflammatory proteins (JNK, IKK α/β and TNF- α) in the gastrocnemius muscle (GM) and the JNK and IKK α/β phosphorylation status in the same tissue; 3) to verify the presence of infiltrated macrophages by F4/80 protein detection of in GM; 4) to quantify the expression of transcription factors involved in the lymphocytes differentiation into spleen (T-bet, GATA3 and FOXP3); 5) to analyze the plasma concentrations of LPS, HSP70, INF- γ , IL-4, TGF- β . For this purpose, 45 Wistar rats (2 months of age) were distributed in three groups: a) control rats without PL (CN); b) rats with PL induced in the upper right first molar (only one lesion) (1PL); c) rats with PL induced in the first and second upper and lower right molars (total of four lesions) (4PL). PL was induced using a surgical round bur 0.1 mm diameter. Statistical analysis was performed by analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test. The adopted level of significance was 5% ($\alpha = 5\%$). The results demonstrated a reduction in insulin sensitivity and an increase in the macrophages content around the muscle fibers in the PL groups. The JNK and IKK α/β phosphorylation status in GM was

also higher in the PL groups than in the CN group. No difference was observed among groups in TNF- α content in GM. The T-bet gene expression was elevated in the PL groups while the FOXP3 expression was reduced. GATA3 expression was reduced in the 1PL group and elevated in the 4PL group. In relation to the systemic alterations, an increase of LPS, HSP70 and INF- γ and a reduction of IL-4 were observed in the PL groups compared to the CN group. No difference was observed among groups in TGF- β concentrations. Based on the results of the present study, we can suggest that both innate and adaptive immunity may contribute to the IR observed in rats with PL. Among the possible mechanisms responsible for these changes are the macrophages recruitment, inflammatory pathways activation in muscle tissue and a modulation of the gene expression of lymphocytes in the spleen.

Keywords: Insulin resistance. Skeletal muscle. Periapical periodontitis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Massa corpórea e ingestão alimentar dos ratos controle (CN), ratos com uma lesão periapical (1LP) e ratos com quatro lesões periapicais (4LP), desde a indução da LP até o final do experimento. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, n = 15.40

Figura 2. Imagens histológicas da região periapical do primeiro molar superior de ratos do grupo controle (CN) e do grupo com uma lesão periapical (1LP). 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 de rato com LP (B). Abreviaturas e símbolos: oa, osso alveolar; *, infiltrado inflamatório; pd, polpa dentária; rn, restos de necrose pulpar; lp, ligamento periodontal; c, cimento. Aumento: 250 $\times$; Barra de escala: 100 μ m.41

Figura 3. Imunofluorescência para F4/80 de amostras do tecido muscular gastrocnêmio (MG) a partir dos grupos controle (CN), uma lesão periapical (1LP) e quatro lesões periapicais (4LP). Em A, quantificação de células imunomarcadas para F4/80 nos grupos CN, 1LP e 4LP. Fotomicrografias obtidas a partir da análise imunohistoquímica para F4/80 (fluorescência vermelha) obtidas em microscópio confocal a laser representando os seguintes grupos: CN (B e E), 1LP (C e F) e 4LP (D e G). As setas indicam marcação positiva para F4/80 localizado ao redor da fibra muscular. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM (n=5). * p<0,05 CN vs 1LP, 4LP.43

Figura 4. Avaliação do grau de fosforilação da JNK e IKK α/β e do conteúdo de TNF- α no MG de ratos controle (CN), ratos com uma lesão periapical 1LP e ratos com quatro lesões periapicais 4LP. Em A, autorradiografias típicas: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 μ g). As formas não fosforiladas de JNK e IKK α/β e β -actina foram utilizadas como controle. Em B, C e D valores do grau de fosforilação da proteína JNK, IKK α/β e TNF- α respectivamente. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ EPM, n=6. * p<0,05 CN vs 1LP e 4LP.45

Figura 5. Avaliação da expressão gênica de marcadores de linfócitos no baço do grupo Controle (CN), uma lesão periapical (1LP) e quatro lesões periapicais (4LP) obtidos pela técnica de PCR em tempo real. Em A, T-bet; em B, FOXP3; em C, GATA3. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ EPM, n=5. * $p < 0,05$ CN vs 1LP; *** $p < 0,001$ CN vs 4LP; # $p < 0,001$ CN vs 1LP e 4LP; & $p < 0,001$ 1LP vs 4LP .46

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Glicemia (mmol/L), insulinemia (μ IU/mL) e índice HOMA-IR dos ratos controle (CN), 1 Lesão periapical (1LP) e 4 lesões periapicais (4LP). 42

Tabela 2. Concentrações séricas de LPS e HSP70 dos grupos controle (CN), uma lesão periapical (1LP) e quatro lesões periapicais (4LP). 44

Tabela 3. Concentrações séricas de IFN- γ , IL-4 e TGF- β dos grupos controle (CN), uma lesão periapical (1LP) e quatro lesões periapicais (4LP). 44

LISTA DE ABREVIATURA

- 1LP** – Grupo com 1 lesão periapical
- 4LP** – Grupo com 4 lesões periapicais
- AMPK** – Proteína quinase ativada por AMP
- ANOVA** – Análise de variância
- AP-1** – Proteínas ativadoras
- BSA** – Albumina de soro bovino
- C** – Celsius
- CD14** – Cluster de diferenciação 14
- cDNA** – Ácido dextrirribonucleico complementar
- CN** – Grupo controle
- Ct** – ciclo limiar
- DEPC** – Diethylpyrocarbonate
- dL** – Decilitro
- DM** – Diabetes mellitus
- DM1** – Diabetes mellitus tipo 1
- DM2** – Diabetes mellitus tipo 2
- DNA** – Ácido dextrirribonucleico
- DTT** – Ditionitrito
- EDTA** – Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EPM** – Erro padrão da média
- EU** – Unidade de Endotoxina
- F4/80** – Marcador para a identificação de macrófagos
- FOXP3** – Fator de transcrição *forkhead box P3*
- g** – Grama
- GATA3** – Proteína 3 ligante de GATA
- GLUT4** – Transportador de glicose do tipo 4
- h** – horas
- HDL-C** – Lipoproteína de alta densidade

HOMA-IR – Modelo de Avaliação da Homeostase - Resistência à Insulina

HSP – Proteínas de choque térmico

HSP60 – Proteínas de choque térmico 60

HSP70 – Proteínas de choque térmico 70

HSP90 – Proteínas de choque térmico 90

i.m. – intramuscular

i.p. – intraperitoneal

IDF – *International Diabetes Federation*

IFN γ – Interferon gama

I κ B – Inibidor κ B

IKK – I κ B quinase

IKK α – I κ B quinase α

IKK α/β – I κ B quinase α/β

IKK β – I κ B quinase β

IKK γ – I κ B quinase γ

IL-1 – Interleucina-1

IL-10 – Interleucina-10

IL-13 – Interleucina-13

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

JNK – C-jun amino-terminal kinase

kDa – Kilodalton

Kg – kilograma

Kitt – Velocidade de decaimento da glicose

L – Litro

LBP – Proteína ligante de lipopolissacarídeos

LP – Lesão periapical

LPS – Lipopolissacarídeo bacteriano

M – Molar

M1 – Macrófago ativado (pró-inflamatório)

M2 – Macrófago alternativo (anti-inflamatório)

MAPK – Proteína quinase ativada por Ras-mitógeno

MD-2 - Proteína de diferenciação mielóide 2

mg – Miligrama

MG – Músculo esquelético gastrocnêmio

min – Minutos

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mM – Milimolar

mmol – Milimol

mV – Milivolt

MyD88 – Fator de diferenciação mielóide 88

NaCl – Cloreto de sódio

NaF – Fluoreto de sódio

NF- κ B – Fator de transcrição nuclear kappa B

nm – Nanômetro

OMS – Organização Mundial da Saúde

p.c . – Peso corpóreo

p110 – Subunidade catalítica da PI3K

p85 – Subunidade regulatória da PI3K

PBS – Tampão fosfato-salino

PDK-1 – Quinase dependente de fosfoinositida-1

pH – Potencial hidrogeniônico

PI3K – Fosfatidilinositol 3-quinase

PIP3 – Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato

PKB / AKT – Proteína quinase B

qRT-PCR - Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real quantitativa

RI – Resistência à insulina

RNA – Ácido ribonucleico

RPM – Rotações por minuto

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real

RX – Raio X

s – Segundos

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”

STAT6 - Transdutor de sinal e ativador de transcrição 6

T-bet / T-box / TBX21 – Fator de transcrição do fenótipo Th1

TEMED – Tetrametil etilenodiamina

TGF- β – Fator de transformação do crescimento β

Th – Linfócito T helper

Th1 – Linfócito T helper 1

Th2 – Linfócito T helper 2

Thr – Treonina

TIR – Receptor Toll / Interleucina-1

TLR-2 – Receptor Toll-like 2

TLR-4 – Receptor Toll-like 4

TLRs – Receptores Toll-like

TNFR1 – Receptor de fator de necrose tumoral 1

TNF- α – Fator de necrose tumoral α

Treg – T reguladoras

Tris – Hidroximetil aminometano

UV – Ultravioleta

V – Volt

μL – Microlitro

μm – Micrômetro

μU – Microunidades

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 OBJETIVOS GERAIS	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 Animais.....	32
3.2 Análise histológica da região periapical	33
3.3 Determinação da glicemia e insulinemia de jejum	33
3.4 Avaliação da resistência insulínica	33
3.5 Técnica de imunohistoquímica	34
3.6 Determinação das concentrações plasmáticas de mediadores inflamatórios	35
3.7 Avaliação do conteúdo e fosforilação de JNK, IKK α / β e TNF- α	35
3.7.1 Preparação das amostras:	35
3.8 “Western blotting”:	36
3.9 Metodologia de quantificação de fatores de transcrição por meio da técnica de “PCR em tempo real”	37
3.9.1 Extração e quantificação do RNA total e transcrição reversa	37
3.9.2 PCR quantitativo	38
3.10 Análise Estatística	39
4 RESULTADOS	40
4.1 Massa Corpórea e Ingestão alimentar	40
4.2 Análise Histológica	40
4.3 Glicemia, Insulinemia e HOMA-IR	41
4.4 Avaliação do conteúdo de macrófagos no tecido muscular gastrocnêmio (MG)	42
4.5 Análise das concentrações séricas de LPS e HSP70.....	43
4.6 Análise das concentrações séricas de citocinas (IFN- γ , IL-4 e TGF- β)	44
4.7 Avaliação do grau de fosforilação das serina-quinases JNK e IKK α / β e do conteúdo de TNF- α no tecido muscular gastrocnêmio	44
4.8 Avaliação da expressão gênica de marcadores de linfócitos no baço	45
5 DISCUSSÃO	47
6 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS.....	54
ANEXOS	66

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a relação entre infecções orais e desordens sistêmicas tem se consolidado como área de grande interesse na comunidade científica médica e odontológica. Neste sentido, diversos estudos demonstram uma forte correlação entre infecções orais e: doença cardiovascular, baixo peso ao nascimento, resistência à insulina (RI) e diabetes mellitus (DM). (LI, *et al.*, 2000; McGAW, 2002; MATTILA, *et al.*, 2005; SASAKI, *et al.* 2016).

O DM é considerado pela organização mundial da saúde (OMS) e pela federação internacional de diabetes como uma epidemia global, atingindo 424,9 milhões de pessoas no mundo. No Brasil, estima-se que aproximadamente 8,7% da população na faixa etária entre 20 e 79 anos seja portador da doença, totalizando 12,5 milhões de pessoas. Adicionalmente, estima-se, que em 2045, o número de pessoas com DM em todo o mundo será superior a 629 milhões (IDF, 2017). O DM compreende um grupo heterogêneo de doenças e alterações metabólicas, caracterizado principalmente por um quadro de hiperglicemia crônica (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014). Os principais tipos de DM são do tipo 1 (DM1) e do tipo 2 (DM2).

O DM1 representa 5% a 10% dos casos de DM. Antigamente acreditava-se que era uma doença frequentemente desenvolvida na infância ou juventude, hoje sabe-se que metade dos casos ocorre na vida adulta (DUE-CHRISTENSEN, *et al.* 2018), em decorrência da destruição autoimune das células beta das ilhotas pancreáticas, ocasionando perda da produção de insulina. O DM2, representa de 90 a 95% dos casos de DM e a suas etiologias ainda não estão totalmente elucidadas (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014). No entanto, sabe-se que a obesidade, a inatividade física e o envelhecimento desencadeiam ou aceleram o aparecimento dessa doença (JURA, *et al.* 2016; KNIGH, 2012). A hiperglicemia crônica do paciente com DM2 pode promover glicotoxicidade, agravando a intolerância à glicose e reduzindo a secreção de insulina (DEL PRATO, 2009). Isto pode ocasionar disfunção e falência de diferentes órgãos especialmente os olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014). Além disso, o indivíduo com DM2 pode desenvolver alteração no metabolismo proteico, baixos níveis de HDL-C, elevação dos níveis de triglicérides, neuropatia, nefropatia, doenças macro e

microvasculares, aumento do tempo de cicatrização de feridas e aumento do risco de infecções (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). Uma das principais características do DM2 é a Resistência à insulina (RI) (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2009).

A insulina é um hormônio anabólico produzido pelas células beta pancreáticas, que atua em diferentes tecidos como muscular, adiposo e também 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 (ROTH, 1973; ROTH *et al.*, 1975). Este receptor 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 próximos a normalidade. 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 receptor de insulina 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 kinase1*”), 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). 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 contribuindo para o quadro de RI (WHITEMAN *et al.*, 2002).

A RI pode ser definida como a incapacidade dos tecidos periféricos em responder adequadamente às concentrações fisiológicas de insulina (PETERSEN; SHULMAN, 2002). Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de RI não estão completamente elucidados, contudo, estudos clínicos e experimentais demonstram um papel importante da inflamação na etiologia da RI (LUO, *et al.* 2018; SONG, *et al.* 2018; WANG, *et al.* 2018).

Trabalhos que relacionam inflamação a distúrbios metabólicos, como obesidade e RI tem despertado o interesse da comunidade científica. Um estudo pioneiro de Hotamisligil *et al.* (1993) observaram que roedores obesos apresentavam expressão exacerbada de TNF- α no tecido adiposo e RI. Posteriormente, uma série de outros estudos foram conduzidos com objetivo de elucidar a interação entre processos inflamatórios e metabólicos. Atualmente, existe um número crescente de evidências que reforçam o conceito de que a inflamação crônica de baixo grau associada à obesidade desempenha um papel patogênico também no desencadeamento de RI (ZHANG, *et al.* 2018; JIANG, *et al.* 2018). Este estado inflamatório crônico é caracterizado por situações em que as concentrações

plasmáticas de TNF- α , Interleucina - 6 (IL-6) e outras citocinas inflamatórias encontram-se elevadas (BONNET; SCHEEN, 2018).

A obesidade não promove apenas alterações no plasma como citado acima, mas também promove alterações no tecido. Estudos demonstram que indivíduos obesos apresentam aumento no número de macrófagos residentes no tecido adiposo, que são responsáveis pela produção de vários mediadores inflamatórios (WEISBERG *et al.*, 2003; CANCELLO *et al.*, 2007). Ademais, em condições de obesidade, o acúmulo de macrófagos não se limita ao tecido adiposo, podendo também ocorrer em outros órgãos, tais como o fígado, pâncreas, intestino, cérebro (OSBORN; OLEFSKY, 2012) e músculo esquelético (FINK *et al.*, 2014).

Pesquisas realizadas nos últimos 15 anos têm investigado possíveis mecanismos que provocam mudanças na polarização de macrófagos e os efeitos decorrentes dessas alterações sobre a sinalização insulínica em órgãos metabólicos (LAUTERBACH; WUNDERLICH, 2017). Estas células exibem um alto grau de plasticidade funcional, de modo que a natureza de um gatilho inflamatório, assim como as citocinas presentes podem determinar a respectiva polarização e seu estado funcional. (LAUTERBACH; WUNDERLICH, 2017).

Em analogia à nomenclatura linfócitos T helper (Th), Th1 Th2, os macrófagos podem ser classificados em dois fenótipos distintos: M1 classicamente ativados e M2 alternativamente ativados (LUMENG *et al.*, 2007). *In vitro*, estes subconjuntos podem ser induzidos por estimulação com interferon gama (IFN- γ) e LPS para M1 ou interleucina-4 (IL-4) para o M2 (GINHOUX, *et al.* 2016). A dicotomia M1 / M2 é frequentemente utilizada para classificar os macrófagos em pró (M1) ou anti-inflamatórios (M2) (LAUTERBACH; WUNDERLICH, 2017). Dentre as funções desempenhadas pelos macrófagos M1, destaca-se a produção de TNF- α (METZGER, 2000). Saghizadeh (1996) e colaboradores observaram que pacientes diabéticos ou resistentes à insulina apresentam expressão aumentada de TNF- α no músculo esquelético quando comparados com indivíduos normoglicêmicos, sugerindo que esta citocina apresenta papel importante na patogênese da resistência à insulina. O TNF- α prejudica o sinal insulínico por diminuir a fosforilação do IRS-1 em resíduos de tirosina (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1996). Ademais, o TNF- α pode estimular algumas serinas quinases incluindo I κ B quinase (IKK), c-Jun amino-terminal kinase (JNK), que promovem fosforilação do IRS-1 em resíduos serina, resultando em atenuação do sinal insulínico (OSBORN *et al.*, 2012). Por outro lado, os macrófagos M2 estão

associados a reparação tecidual, angiogênese, redução da inflamação e a melhora da sinalização insulina no tecido adiposo (LUMENG *et al.*, 2007; MANTOVANI, *et al.* 2004; NGUYEN, *et al.* 2011). Além dos estudos que relacionam a obesidade a RI, há, na literatura estudos que demonstram uma correlação entre essa resistência hormonal e processos inflamatórios, como por exemplo, a artrite reumatóide e inflamações orais (SILBER, 1989; GLIES *et al.*, 2015; ASTOLPHI *et al.*, 2013). Neste contexto, destaca-se a LP que foi o foco de investigação do presente estudo.

A LP ocorre como consequência de vários insultos à polpa do dente, que incluem traumas físicos, iatrogênicos, infecciosos e 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. A regulação da inflamação periapical é extremamente complexa, pois envolve mediadores do hospedeiro, incluindo componentes imunológicos, como anticorpos, citocinas, metabólitos do ácido araquidônico e neuropeptídeos (STASHENKO *et al.*, 1998).

O processo inflamatório característico da LP apresenta diferentes tipos de bactérias gram-negativas anaeróbias (SUNDQVIST, 1992) dotadas de LPS na parede celular (WOLFF, 1973). Estudos têm relatado que bactérias presentes na cavidade oral podem liberar LPS para circulação sistêmica (GEERTS *et al.*, 2002). Esta substância possui a capacidade de ativar *toll-like receptors* (TLRs), um receptor de superfície celular que atua na ativação da imunidade inata e indução de respostas inflamatórias. O LPS é um ligante específico para TLR2 e TLR4, mas apresenta maior especificidade para o TLR4 (MEDZHITOV, 2001; TAKEUCHI *et al.*, 2002). Quando liberado por bactérias gram-negativas, o LPS associa-se a uma proteína plasmática solúvel chamada proteína ligante de LPS (LBP ou *LPS binding protein*) (POLTORAK *et al.*, 1998; AKIRA *et al.*, 2006), e, posteriormente, liga-se ao co-receptor CD14 por meio da LPB, formando o complexo LPS-CD14. Este complexo, por sua vez, é reconhecido pelo complexo TLR4-MD-2, presente na superfície celular, que é capaz de promover o recrutamento intracelular de moléculas adaptadoras com domínio N-terminal TIR, tais como MyD88. Esta molécula pode ativar as serinas quinases JNK e IKK α/β , que promovem ativação dos fatores de transcrição AP-1 e NF- κ B, respectivamente (OHNISHI *et al.*, 2007; PALSSON-MCDERMOTT; O'NEILL, 2004).

O NF- κ B regula a expressão de diversos genes envolvidos em diferentes processos celulares como respostas inflamatórias e imunes, crescimento e

desenvolvimento celular. Na ausência de um estímulo ativador de NF- κ B, esta proteína está presente no citoplasma de forma inativa associada a uma proteína inibidora, a I κ B (NAPETSCHNIG; WU, 2013). A ativação do NF- κ B pode ocorrer, não somente por exposição das células à LPS, mas também por meio da ação de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-1), ativação dos linfócitos T e B, radiação UV e expressão de produtos gênicos virais (BALDWIN, 1996). Após o estímulo, o complexo I κ B quinase (IKK) é fosforilado e ativado. O complexo IKK é composto por duas subunidades catalíticas IKK- α e IKK- β , além do modulador essencial NF- κ B (NEMO) ou IKK- γ (LI e VERMA, 2002). Após ativação, IKK recruta e fosforila o I κ B que é reconhecido pelo maquinário ubiquitina ligase, o que leva à sua poliubiquitinação e consequente degradação. Desta maneira, os dímeros de NF- κ B translocam-se para o núcleo, ligando-se em sítios específicos do DNA e promovendo a transcrição de um grande número de genes (NAPETSCHNIG; WU, 2013; LI e VERMA, 2002). Além de ativar a via IKK α/β /NF- κ B os TLRs são capazes de ativar a via da JNK (SHOELSON *et al.*, 2006). O grupo de serina/treonina quinases denominado JNK (JNK-1, 2 e 3) pertence à família das Proteínas kinases ativadas por Ras-mitógeno (MAPKs), responsáveis pela regulação de diversas funções celulares. Esta regulação se dá, em grande parte, devido à sua capacidade de controlar a transcrição de genes específicos por meio das proteínas ativadoras- 1 (AP-1) (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005). O AP-1 é um fator de transcrição que, quando ativado, promove a expressão de genes relacionados à imunidade inata (BENNET *et al.*, 2003).

Além do LPS, a via de sinalização dos TLRs pode ser ativada por proteínas de choque térmico (FANG *et al.*, 2011). As proteínas de choque térmico (*heat shock proteins* – HSP) são proteínas caracterizadas como chaperonas por possuírem função importante na adaptação ao estresse e proteção celular, atuando principalmente na síntese e degradação proteica, além de regular processos celulares fundamentais (LIANOS *et al.*, 2015). A família das HSPs é dividida em subfamílias, classificadas de acordo com a massa molecular podendo ser HSPs pequenas (8 a 27 KDa) e HSPs grandes (100 a 110 KDa), dentre as quais se destacam: HSP90, HSP70 e HSP60 (LINDQUIST, CRAING, 1988). A HSP70 apresenta, além de suas funções essenciais como chaperona (PILON, SCHEKEMAN, 1999), efeito anti-inflamatório por inibir a ativação do NF- κ B quando está presente no meio intracelular (HECK *et al.*, 2011). Entretanto, estímulos como necrose celular e produtos bacterianos como o LPS

podem ocasionar a passagem de HSP70 através da membrana para o meio extracelular (DAVIES *et al.*, 2006; MAMBULA *et al.*, 2007).

Estudos sugerem que concentrações plasmáticas elevadas de HSP70 podem estar correlacionados com desordem cardiovascular, fibrose pulmonar, dano renal, estresse oxidativo e inflamação (OGAWA *et al.*, 2008). O desenvolvimento dessas condições pode ocorrer devido à capacidade da HSP70 se ligar a TLR2 e TLR4, promovendo a ativação da via do NF- κ B que, conforme citado acima, induz a expressão de mediadores inflamatórios relacionados com a resistência à insulina (ASEA *et al.*, 2002).

Estudos sugerem que a sensibilidade à insulina pode sofrer ação reguladora pelo sistema imune adaptativo (BRONSART, 2016; WINER; WINER, 2012.). Este sistema é composto por diferentes tipos de células, dentre os quais se destacam os linfócitos B e T (CORTHAY, 2009). Os linfócitos T são classificados em duas classes principais: os linfócitos T auxiliares, também conhecidos como T helper (Th) e os linfócitos T citotóxicos. Os linfócitos Th “naïve”, ao interagirem com células apresentadoras de antígenos, sofrem ativação e podem se diferenciar em diferentes subtipos (ANTIGNANO; ZAPH, 2015). O subtipo Th1 expressa citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e o IFN- γ ; o Th2 expressa principalmente citocinas anti-inflamatórias, como por exemplo interleucina - 4 (IL-4) e interleucina - 13 (IL-13), (LIBBY, 2008; HANSSON, 2005) e as células T reguladoras (Treg) secretam predominantemente a citocina anti-inflamatória, fator de transformação do crescimento - β (TGF- β) (HANSSON, 2009).

As células Th1 apresentam papel central no recrutamento de macrófagos e indução de resistência à insulina em modelos de diabetes, induzido por obesidade. Esses efeitos são contrabalanceados pela função de células Th2 e Treg que mantêm um estado anti-inflamatório e aumentam a sensibilidade à insulina (WALI *et al.*, 2014). A regulação apropriada de células Th é de extrema importância para o controle e prevenção de diversas doenças (ZHAO *et al.*, 2012). Um aumento ou diminuição dos subtipos Th1 ou Th2, bem como das citocinas produzidas por estas células, indicam desequilíbrio que pode ser um dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento de resistência à insulina (PACIFICO *et al.*, 2006; DEIULIIS *et al.*, 2011).

A diversidade de subtipos de células T depende de fatores de transcrição específicos (TANRIVER, DIEFENBACH, 2014). O fator de transcrição T-bet é um membro da família Tbox de fatores de transcrição que regula a diferenciação das

células T em células Th1 por meio da expressão de IFN- γ (SZABO *et al.*, 2000). O T-bet antagoniza o desenvolvimento da linhagem Th2 devido à supressão da atividade dos fatores de transcrição GATA 3 (HWANG *et al.*, 2005; LAZAREVIC *et al.*, 2011). Por sua vez, o fator de transcrição GATA 3 é o principal regulador da diferenciação de células T em células Th2 por meio da expressão de IL-4, interleucina-5 (IL-5) e IL-13 (FARRAR *et al.*, 2002). Sugere-se que as células Th2 podem estar relacionadas com a melhora da sensibilidade à insulina da insulina, por meio da produção de IL-4 (CHANG *et al.*, 2012). O fator de transcrição responsável pela diferenciação de células T em células Treg é o FOXP3+ (*Forkhead box P3*) (BRUCE *et al.*, 2015). O desenvolvimento das células Treg é importante para o controle da resposta imune devido ao seu efeito imunossupressor em desordens inflamatórias (ELLER *et al.*, 2011). Esses efeitos moduladores podem ser decorrentes da ação dos mediadores TGF- β e interleucina-10 (IL-10) que estão relacionados com a imunomodulação desempenhada pelas células Treg (FOUSSAT *et al.*, 2003; GROUX *et al.*, 1997).

As células T encontram-se presentes, principalmente, em órgãos linfoides, como o baço (DUTTON; BRADLEY; SWAIN, 1998). O baço é o maior órgão linfóide do corpo humano, sendo constituído por dois compartimentos distintos morfológica e funcionalmente (CESTA, 2006). A polpa vermelha é considerada o filtro do sangue (NOLTE, *et al.*, 2000) e a polpa branca é o componente imunologicamente ativo (VAN EWIJK; NIEUWENHUIS; 1985). Dessa forma, o baço possui tanto função hematológica, quanto imunológica (CESTA, 2006). A importância deste órgão pode ser observada em indivíduos esplenectomizados, nos quais não se produzem quantidades adequadas de anticorpos para proteção contra bacteremias (BOHNSACK; BROWN, 1986). Outra função importante desempenhada pelo baço está relacionada a sua capacidade de atuar como um reservatório de linfócitos (MARTINS *et al.*, 1998). Neste sentido, a técnica de RT-PCR tem sido utilizada para determinar diretamente a relação T-bet / GATA 3 no baço de roedores, sendo considerada como método de análise do equilíbrio de subpopulações celulares Th1 / Th2 (YONG, *et al.*, 2011). Dessa forma, a avaliação da expressão de fatores de transcrição envolvidos com a diferenciação de linfócitos no baço, poderá nos fornecer pistas sobre a resposta imune adaptativa presente na LP que pode estar intimamente relacionada com prejuízos na transdução do sinal insulínico, redução do conteúdo de GLUT4 na membrana plasmática em tecido muscular esquelético e RI encontrados em ratos com uma LP. (PEREIRA *et al.*, 2016; ASTOLPHI *et al.*, 2013). Contudo,

diferentemente desses estudos anteriores que utilizaram o modelo de indução de LP caracterizado apenas por um foco de infecção endodôntica, no presente estudo também foi utilizado um grupo com indução de quatro focos de infecção com o intuito de averiguar se um maior número de focos de infecção poderia interferir na intensidade do processo inflamatório e, conseqüentemente, nos parâmetros estudados.

2 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o efeito do número de lesão periapicais na resistência insulínica, sinalização inflamatória, conteúdo de macrófagos no músculo esquelético e o perfil linfocitário (T helper) no baço.

2.1 Objetivos específicos

O presente estudo, conduzido em ratos com LP, objetivou analisar:

- 1) Índice HOMA-IR a partir das concentrações plasmáticas de glicose e insulina;
- 2) Conteúdo total das proteínas inflamatórias (JNK, IKK α / β e TNF- α) no tecido muscular esquelético gastrocnêmio (MG);
- 3) Grau de fosforilação de JNK e IKK α / β no MG;
- 4) Presença de macrófagos infiltrados por meio da detecção da proteína F4/80 no MG;
- 5) Expressão de fatores de transcrição envolvidos com a diferenciação de linfócitos no baço (T-bet, GATA3 e FOXP3);
- 6) Concentrações plasmáticas de LPS, HSP70, INF γ , IL-4 e TGF- β .

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 45 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 três grupos: a) ratos do grupo controle, sem a LP; b) ratos com LP induzida em primeiro molar superior direito (apenas uma lesão); c) ratos com LP induzida em primeiros e segundos molares superiores e inferiores do lado direito (total de quatro lesões). As LPs foram induzidas sob anestesia com cloridrato de quetamina (80 mg/Kg p.c., i.m.) e xilazina (10 mg/Kg p.c., i.m.) As polpas dos primeiros e segundos molares superiores e inferiores do lado direito foram expostas, por meio de uma broca de aço carbono (Broca Ln Long Neck- Maillefer, Dentsply) dotada de uma esfera na extremidade com 0,1mm de diâmetro. 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 lesão periapical 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. Os ratos foram submetidos a jejum de 14 horas antes dos procedimentos experimentais, posteriormente foram anestesiados com tiopental sódico (Thiopentax® - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, Brasil, 3%, 5mg/ 100g p.c., i.p.), e, sob anestesia, foi realizada a laparotomia mediana, coletando-se 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 glicose, insulina, LPS e HSP70, INF γ , IL-4, TGF- β (n=10). Neste mesmo grupo foram coletadas amostras de MG para realização da técnica de western blotting (n=6) e amostras do baço foram coletadas para posterior realização da técnica de PCR em tempo real (n=5). Em outro grupo (n=5) de animais foi coletado o MG para a realização da técnica de imunohistoquímica.

3.2 Análise histológica da região periapical

Os ratos de todos os grupos foram eutanasiadas por dose excessiva do anestésico tiopental sódico (Thiopentax, Cristália, Itapira, SP, Brasil; 3%, 5mg/100g peso corpóreo, via intraperitoneal), precedidos pela aplicação de anestésico de bloqueio local (Lidocaína, 4 mg/kg peso corpóreo, via intraperitoneal) 10 minutos antes da aplicação do barbitúrico. As hemimaxilas e hemimandíbulas direitas foram retiradas e colocadas em cassetes histológicos de plásticos devidamente identificados. Em seguida, foram imediatamente embebidas em formaldeído 4%, deixadas nesta solução por 24 horas e depois lavadas em água corrente por 12 horas. Após a fixação, foram desmineralizadas em solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 10% por aproximadamente 3 meses. Posteriormente, as peças foram lavadas em água corrente por 24 horas, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. As peças foram cortadas com cortes semi-seriados, com 4 µm de espessura dos aspectos mesial-distal de todos os primeiros molares superiores do lado direito, realizados em micrômetro (RM2155, Leica Microsystems, BD, Wetzlar, Alemanha). Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina e estudos morfológicos foram realizados na área periapical.

3.3 Determinação da glicemia e insulinemia de jejum

A glicemia foi determinada pelo método de glicose-oxidase com a utilização do reagente enzimático comercial específico (Katal Biotecnológica Ind. Com. Ltda., Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), seguindo as instruções do fabricante. A insulinemia foi avaliada pelo método de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) com a utilização do kit comercial específico (Sensitive Rat Insulin, SRI-13K, Millipore, St Charles, MO, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

3.4 Avaliação da resistência insulínica

Foi avaliada pelo índice HOMA-IR (Modelo de Avaliação da Homeostase - Resistência à Insulina), calculado a partir da fórmula, como segue: $HOMA - IR =$

glicemia de jejum (mmol/L) X insulinemia de jejum ($\mu\text{UI/ml}$) / 22,5) (BONORA et al., 2002).

3.5 Técnica de imunohistoquímica

Preparação tecidual

Ao término do protocolo experimental os animais foram profundamente anestesiados com tiopental sódico (Thiopentax® - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, Brasil, 3%, 5mg/ 100g p.c., i.p.) e submetidos à perfusão transcardíaca com salina heparinizada (em média 150 ml) seguido da infusão de paraformaldeído a 4% recém preparado em tampão fosfato 0,1 M com pH 7,4 (PBS; em média 500 ml). Após o término da perfusão, o músculo gastrocnêmio foi removido e pós-fixado na mesma solução utilizada para perfusão durante 12 horas à 4°C. Em seguida, o material foi crioprottegido em solução de tampão PBS acrescido de 30% de sacarose por 24 horas. Decorrido este período, o tecido muscular foi crio-seccionado com 30 μm de espessura no plano transversal utilizando criostato convencional (Leica CM 1850, Germany) e coletados imediatamente sobre lâminas de vidro gelatinizadas e estocadas a 4°C.

Imunoistoquímica

Para a técnica de imunoistoquímica, os cortes histológicos foram inicialmente lavados 3 vezes de 10 minutos em PBS e, em seguida, as lâminas contendo o tecido muscular foram submetidas ao bloqueio da biotina endógena com PBS acrescido de 0,05% de triton x-100 (PBS “loaded”) e 5% de leite em pó desnatado durante 1 hora. Novamente os cortes histológicos foram submetidos a 3 lavagens de 10 minutos em PBS e então realizou-se o bloqueio das reações inespecíficas com PBS “loaded” acrescido de 5% de BSA “*over night*”. Em seguida, os cortes histológicos foram incubadas em câmara úmida com anticorpo primário anti-F4/80 (1:200, Santa Cruz Biotechnology) diluído em PBS “loaded” com 5% de BSA, permanecendo “*over night*” à temperatura ambiente. Em seguida as lâminas foram lavadas novamente 3 vezes de 10 minutos em PBS e incubados por duas horas com anticorpo secundário biotinilado específico (1:800, Santa Cruz Biotechnology) durante 2 horas à temperatura ambiente. Em prosseguimento, uma nova série de lavagens foram realizadas e os cortes histológicos foram incubados em PBS “loaded” acrescido de

estreptavidina conjugada com Cy3 (1:250, Jackson ImmunoResearch) durante 60 minutos. Finalmente os cortes histológicos foram lavados em PBS e protegidos com lamínula de vidro e meio de montagem aquoso. A imunorreatividade foi analisada em microscópio confocal (Leica TCS SP5 Confocal; Leica) e para análise quantitativa, foram capturadas 30 campos microfotográficos por grupo (6 por animal) utilizando objetiva de 40x e a quantificação foi manualmente realizada utilizando o software *Image J* (National Institutes of Health). Vale ressaltar que a quantificação de células imunorreativas para F4/80 foi relativa ao número total de células musculares visualizadas em cada campo microfotográfico.

3.6 Determinação das concentrações plasmáticas de mediadores inflamatórios

O LPS foi determinado pelo método de LAL (Limulus Amebocyte Lysate) através de kit (Thermo scientific, 88282). As concentrações plasmáticas de HSP70, INF γ , IL-4, TGF- β foram identificados pelo método de ELISA por meio de kit comercial específico para cada análise (HSP70: Enzo Lifesciences, ADI-EKS-715; INF γ : Boster Biological Technology Co., LTD, EK0374; IL-4: Boster Biological Technology Co., LTD, EK0406; TGF- β : Boster Biological Technology Co., LTD, EK0514).

3.7 Avaliação do conteúdo e fosforilação de JNK, IKK α/β e TNF- α

3.7.1 Preparação das amostras:

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

3.8 “Western blotting”:

- **“SDS-PAGE”** - (“Sodium Dodecil Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis”): A primeira etapa do Western blotting consistiu na submissão das amostras à corrida eletroforética em gel de poliacrilamida. Através deste método, foi possível separar proteínas de acordo com seu peso molecular, sem que as unidades protéicas sejam perdidas, permitindo estudos posteriores nessas frações protéicas. Foi utilizado o método desenvolvido por Laemmli e modificado por GARFIN (1990), o qual envolve um sistema descontínuo de dois géis contíguos, mas diferentes: o gel de “stacking” (3,39% T, 2,7% C – acrilamida 3,3%; bisacrilamida 0,09%; Tris 25mM, pH 8,9; EDTA 2,0mM; SDS 0,1%; TEMED 0.111%; persulfato de amônio 0,27%) e o gel de resolução (6,16% T, 2,7% C - acrilamida 10%; bisacrilamida 0,16%; Tris 388mM, pH=6,7; EDTA 2,1mM; 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 50mM; glicina 375mM; SDS 0,1%; EDTA 1,8mM).

No gel de “stacking” foram aplicadas as amostras solubilizadas em tampão de Laemmli. Imediatamente antes da aplicação, as amostras foram fervidas por 4 min. A eletroforese foi realizada em equipamento para mini gel da *Bio Rad* (Mini-Protean, Bio Rad Laboratories, Richmond, CA), e começou com a corrida no gel de “stacking” sob voltagem constante em 30 V até que ocorresse o empacotamento da amostra, o que poderá ser observado na transição dos géis. Posteriormente foi aplicada voltagem constante de 100 V para a corrida no gel de resolução, durante 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 (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England). A transferência foi realizada sob voltagem constante de 100 V, durante 2h, a 4°C,

utilizando-se o tampão de transferência (Tris 25mM, glicina 192mM, metanol 20%, SDS 0,02%).

● **“Immunoblotting”:**

Após a transferência eletroforética, foi iniciado o processo de imunodeteção de proteínas específicas (KRUEGER & HAMMOND, 1988). As membranas de nitrocelulose foram, primeiramente, incubadas na presença de solução bloqueadora (solução basal - SB - NaCl 150 mM; Tris 10 mM; "Tween" 20 0,02%; pH 7,2 - acrescida de 5% de leite desnatado - 0% de gordura) durante 2h à temperatura ambiente, e então, lavada com solução basal por três sessões de 10 min. Em seguida, as membranas foram incubadas em solução (SB + 3% de leite desnatado) contendo os anticorpos anti TNF- α , anti JNK, anti p-JNK, anti IKK- α/β e anti p-IKK- α/β da (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, USA). Posteriormente foram realizadas três lavagens com solução basal, e a membrana foi incubada durante 1h com segundo anticorpo contendo peroxidase de “horseradish” (“kit” de quimioluminescência -ECL- Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England). Novamente, foram realizadas 3 lavagens da membrana de nitrocelulose com solução basal, com duração de 10 min cada lavagem. Adicionou-se 1 ml de cada solução de detecção 1 e 2 (do kit de ECL), e incubou-se por 1 minuto. Por fim, foi drenado o excesso de reagente e as membranas de nitrocelulose foram expostas a filme de RX (Hyperfilm ECL– Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England), durante 10 min à temperatura ambiente. O filme foi processado com solução reveladora e reforçadora GBX (KODAK BRASILEIRA, São Paulo, BR) e solução fixadora e reforçadora GBX (KODAK BRASILEIRA, São Paulo, BR). A intensidade dos “blots” foi avaliada por densitometria óptica, por meio de um programa da Media Cybernetics – GEL-PRO ANALYSER - Hartland, USA.

3.9 Metodologia de quantificação de fatores de transcrição por meio da técnica de “PCR em tempo real”

3.9.1 Extração e quantificação do RNA total e transcrição reversa

A extração de RNA total tecidual foi realizada por meio da adição do reagente Trizol LS (Invitrogen, USA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Para

isso, após remoção do tecido, foram adicionados 1000 μ L do reagente Trizol LS (Invitrogen). Estas amostras permaneceram armazenadas a -80°C até o início dos experimentos. No momento do experimento estas amostras foram homogeneizadas e foram adicionados 200 μ L de clorofórmio (Merck, Germany) em cada amostra. Os tubos foram vigorosamente agitados por 30 segundos, e logo após, mantidos em repouso à temperatura ambiente, por 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 4°C e 13000 G, por 15 minutos. Novos tubos foram nomeados de acordo com as amostras, e ao fim da centrifugação coletamos cerca de 300 μ L da fase aquosa e colocamos no novo tubo. Em seguida, adicionamos nestes novos tubos 500 μ L de álcool isopropílico (Merck), agitamos novamente e armazenamos à -20°C . No dia seguinte, descongelamos estas amostras e centrifugamos a 4°C e 13000G por 15 minutos, depois retiramos o álcool isopropílico, acrescentamos então 500 μ L de etanol 75% (Merck), agitamos e centrifugamos a 4°C e 10000 G por 10 minutos. Em seguida desprezamos o sobrenadante e colocamos os tubos com a borda virada para baixo em uma superfície coberta com papel absorvente, quando os tubos estavam secos nós desviramos e acrescentamos 20 μ L de água DEPC para ressuspender o pellet. Por fim as amostras foram armazenadas à -80°C para posterior quantificação. A concentração de RNA total nas amostras foi determinado por leitura em espectrofotômetro aplicando-se 1 μ L de cada amostra num dispositivo Nanodrop® (ThermoScientific, Wilmington, EUA). Foram consideradas as leituras nos comprimentos de onda de 280 e 260 nm. A concentração das amostras foi fornecida pelo equipamento em ng/ μ L.

A transcrição reversa das amostras de RNA em cDNA foi realizada por meio do kit comercial (SuperScript® II First-Strand Synthesis Super Mix for qRT-PCR, Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. A quantidade de RNA total de partida foi definida com base no volume máximo de amostra recomendado pelo fabricante (12 μ L) multiplicado pela concentração da amostra que obteve menor rendimento.

3.9.2 PCR quantitativo

A expressão quantitativa do RNAm para os diferentes alvos foi realizada por meio de reações de PCR em tempo real, utilizando-se o sistema *Taqman*® (AppliedBiosystems, Life Technologies, EUA) em um aparelho Step One™ Real-Time PCR System (AppliedBiosystems, Life Technologies, United Kingdom). Para esta

reação foram utilizadas sondas inventoriadas marcadas com fluoróforo FAM disponibilizados pela mesma empresa: T-bet (TBX21 (T-bet) Rn01461633_m1), GATA3 (Rn00484683_m1 GATA3) e FOXP3 (Rn01525092_m1). Paralelamente, também foi realizado a amplificação do gene constitutivo com sonda inventoriada, marcada com o fluoróforo VIC, disponibilizada pela mesma empresa: β -actina (Actb - Rn00667869_m1). Alíquotas de 0,5 μ L do DNA complementar sintetizado a partir do RNAm foram utilizadas juntamente com reagentes *Taqman® Gene Expression Mastermix* (AppliedBiosystems, Life Technologies, EUA), e as sondas inventoriadas como determinado pelo fabricante, num volume final de reação de 10 μ L. A reação de amplificação foi de 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, e quarenta ciclo de 15 s a 95 °C a 1 min e 60 °C, conforme recomendado pela empresa. Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (*ciclethreshold* – ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclo a partir do qual a amplificação atinge um dado limiar que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. As médias dos valores de Ct de medidas em duplicatas foram utilizadas para calcular a expressão do gene alvo, com normalização em relação ao controle interno (β -actina), e então comparadas com um controle alvo interno de uma amostra do grupo de células não estimuladas obtendo-se assim o cálculo do aumento da expressão, utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Uma amostra negativa (água), também foi submetida à reação.

3.10 Análise Estatística

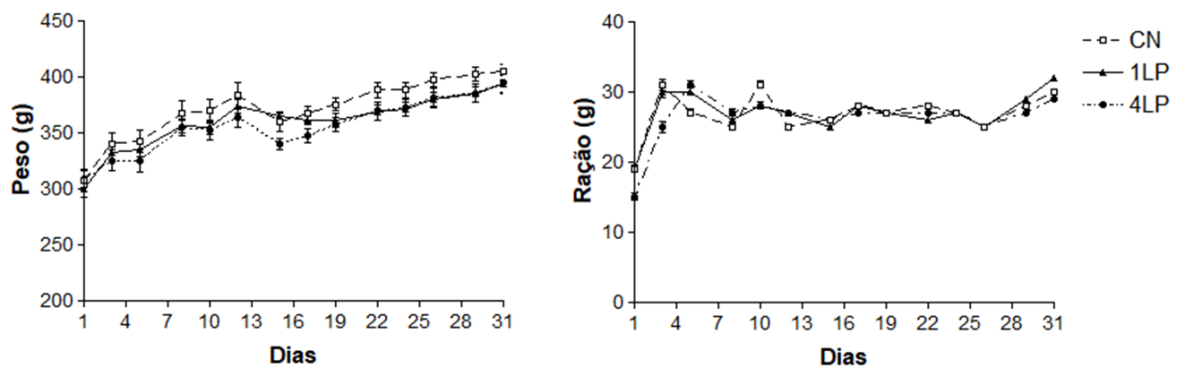
Todos os valores foram apresentados como média $\pm$ EPM. A análise estatística foi feita por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5% (alfa=5%).

4 RESULTADOS

4.1 Massa Corpórea e Ingestão alimentar

Não foi observada diferença na massa corpórea e ingestão alimentar (Figura 1) entre os grupos, desde a indução da LP até a realização dos experimentos.

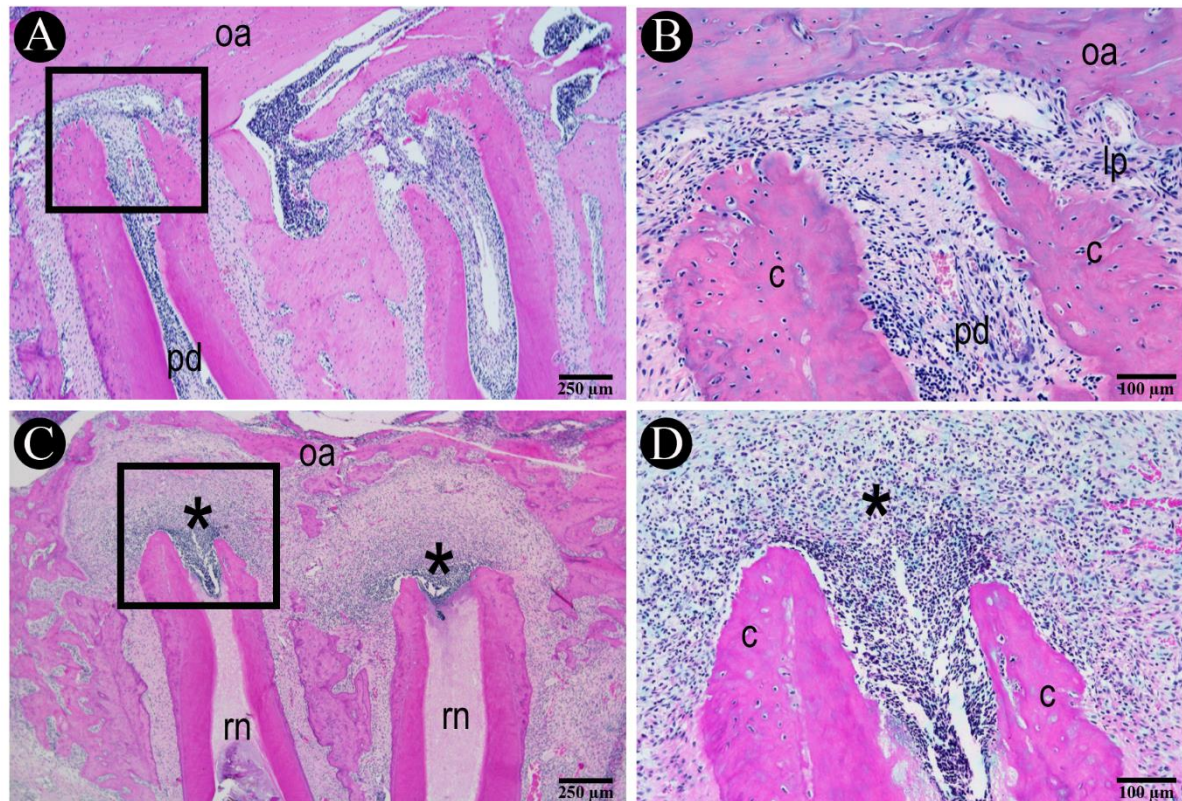
Figura 1. Massa corpórea e ingestão alimentar dos ratos controle (CN), ratos com uma lesão periapical (1LP) e ratos com quatro lesões periapicais (4LP), desde a indução da LP até o final do experimento. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, n = 15.



4.2 Análise Histológica

No grupo CN, o tecido periapical apresentou características consistente com um aspecto normal (Figuras 2A e B). Na figura 2C e D, grupo 1LP no qual observamos a formação de lesão periapical em dente submetido à exposição da polpa ao meio bucal. As lesões mostraram osteólise e foram preenchidos com infiltrado inflamatório.

Figura 2. Imagens histológicas da região periapical do primeiro molar superior de ratos do grupo controle (CN) e do grupo com uma lesão periapical (1LP). 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 de rato com LP (B). Abreviaturas e símbolos: oa, osso alveolar; *, infiltrado inflamatório; pd, polpa dentária; rn, restos de necrose pulpar; lp, ligamento periodontal; c, cemento. Aumento: 250×; Barra de escala: 100 µm.



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 os grupos 1LP e 4LP apresentaram maior resistência insulínica quando comparado com o grupo CN.

Tabela 1 – Glicemia (mmol/L), insulinemia (μ U/mL) e índice HOMA-IR dos ratos controle (CN), 1 Lesão periapical (1LP) e 4 lesões periapicais (4LP)

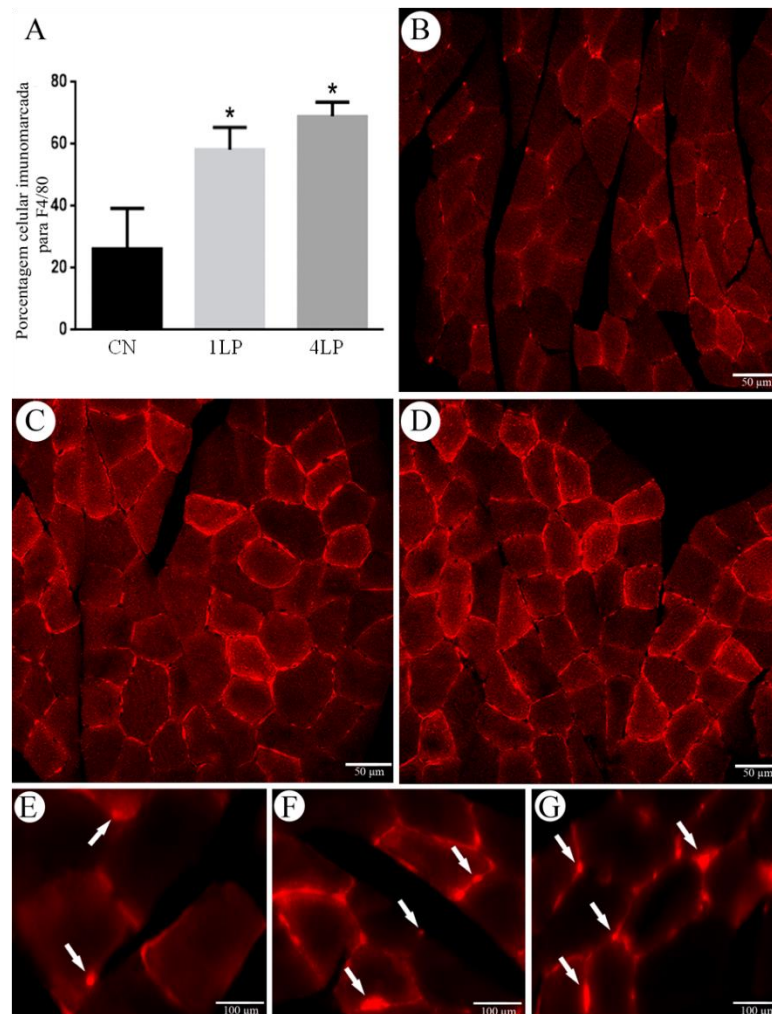
Parâmetros	CN	1LP	4LP
Glicemia (mmol/L)	6,94 $\pm$ 0,33	6,74 $\pm$ 0,14	6,77 $\pm$ 0,21
Insulinemia (μ U/mL)	19,14 $\pm$ 6,35	29,21 $\pm$ 4,21	31,80 $\pm$ 3,12
HOMA-IR	5,42 $\pm$ 1,86	10,18 $\pm$ 0,77*	10,31 $\pm$ 0,97*

Valores expressos como media $\pm$ EPM (n=10) * p<0,05 1LP, 4LP vs CN

4.4 Avaliação do conteúdo de macrófagos no tecido muscular gastrocnêmio (MG)

Por meio da análise imunoistoquímica (Figura 3) observou-se um aumento de células imunomarcadas para F4/80 (proteína específica de macrófagos) ao redor das fibras musculares nos grupos com uma lesão periapical (1LP) e 4 lesões periapicais (4LP) quando comparadas com o grupo controle (CN). Entretanto, não foi observado diferença entre os grupos 1LP e 4LP.

Figura 3. Imunofluorescência para F4/80 de amostras do tecido muscular gastrocnêmio (MG) a partir dos grupos controle (CN), uma lesão periapical (1LP) e quatro lesões periapicais (4LP). Em A, quantificação de células imunomarcadas para F4/80 nos grupos CN, 1LP e 4LP. Fotomicrografias obtidas a partir da análise imunohistoquímica para F4/80 (fluorescência vermelha) obtidas em microscópio confocal a laser representando os seguintes grupos: CN (B e E), 1LP (C e F) e 4LP (D e G). As setas indicam marcação positiva para F4/80 localizado ao redor da fibra muscular. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM (n=5). * $p < 0,05$ CN vs 1LP, 4LP.



4.5 Análise das concentrações séricas de LPS e HSP70

Foi observado um aumento de LPS e HSP70 nos grupos 1LP e 4LP quando comparados ao grupo CN. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos 1LP e 4LP.

Tabela 2 – Concentrações séricas de LPS e HSP70 dos grupos controle (CN), uma lesão periapical (1LP) e quatro lesões periapicais (4LP)

Parâmetros	CN	1LP	4LP
LPS (EU/ml)	0,40±0,07	1,40±0,39*	1,53±0,29*
HSP70 (ng/ml)	0,28±0,01	0,47±0,06*	0,52±0,05*

Valores expressos como média ±EPM (n=10) * p<0,05 CN vs 1LP, 4LP.

4.6 Análise das concentrações séricas de citocinas (IFN- γ , IL-4 e TGF- β)

A tabela 3 demonstra que as concentrações séricas de IFN- γ estavam aumentada nos grupos 1LP e 4LP em relação ao grupo CN. Observou-se também que o aumento desta citocina foi maior em 4LP em relação a 1LP. Com relação aos níveis de IL-4 foi observado uma redução nos grupos 1LP e 4LP em comparação ao CN. Ademais, não foi observado nenhuma diferença entre os grupos estudados referente a citocina TGF- β .

Tabela 3 – Concentrações séricas de IFN- γ , IL-4 e TGF- β dos grupos controle (CN), uma lesão periapical (1LP) e quatro lesões periapicais (4LP).

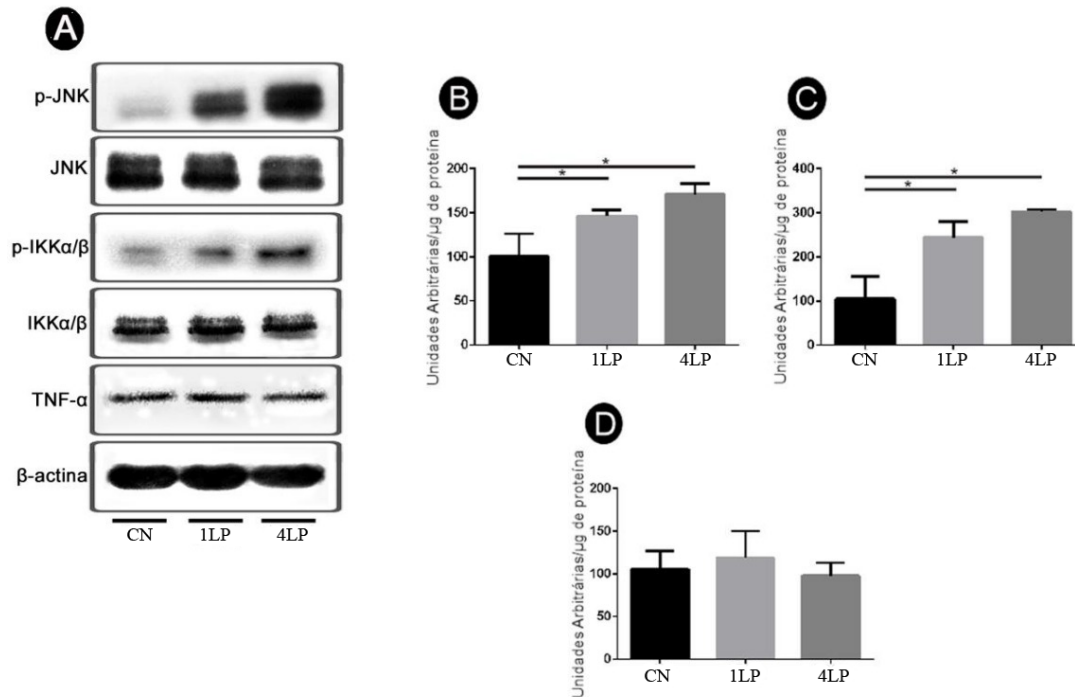
Parâmetros	CN	1LP	4LP
IFN- γ (pg/mL)	10,9 ± 2,33	15,47 ± 4,64* [#]	30,94 ± 4,06*
IL-4 (pg/mL)	25,9 ± 0,39	22,73 ± 0,82*	23,08 ± 0,81*
TGF- β (pg/mL)	121,6 ± 15,83	175,5 ± 13,38	166 ± 17,69

Valores expressos como média ± EPM, n=10. *p < 0,01 CN vs 1LP, 4LP; # p < 0,05 1LP vs 4LP.

4.7 Avaliação do grau de fosforilação das serina-quinases JNK e IKK α/β e do conteúdo de TNF- α no tecido muscular gastrocnêmio

Conforme observado na Figura 4, o grau de fosforilação da JNK e IKK α/β no tecido muscular gastrocnêmio (MG) foi significativamente maior nos grupos 1LP e 4LP em relação ao grupo CN. Não foi observada diferença nestes parâmetros entre os grupos 1LP e 4LP. Em relação ao conteúdo de TNF- α não foi observado diferença estatística entre os grupos (Figura 4).

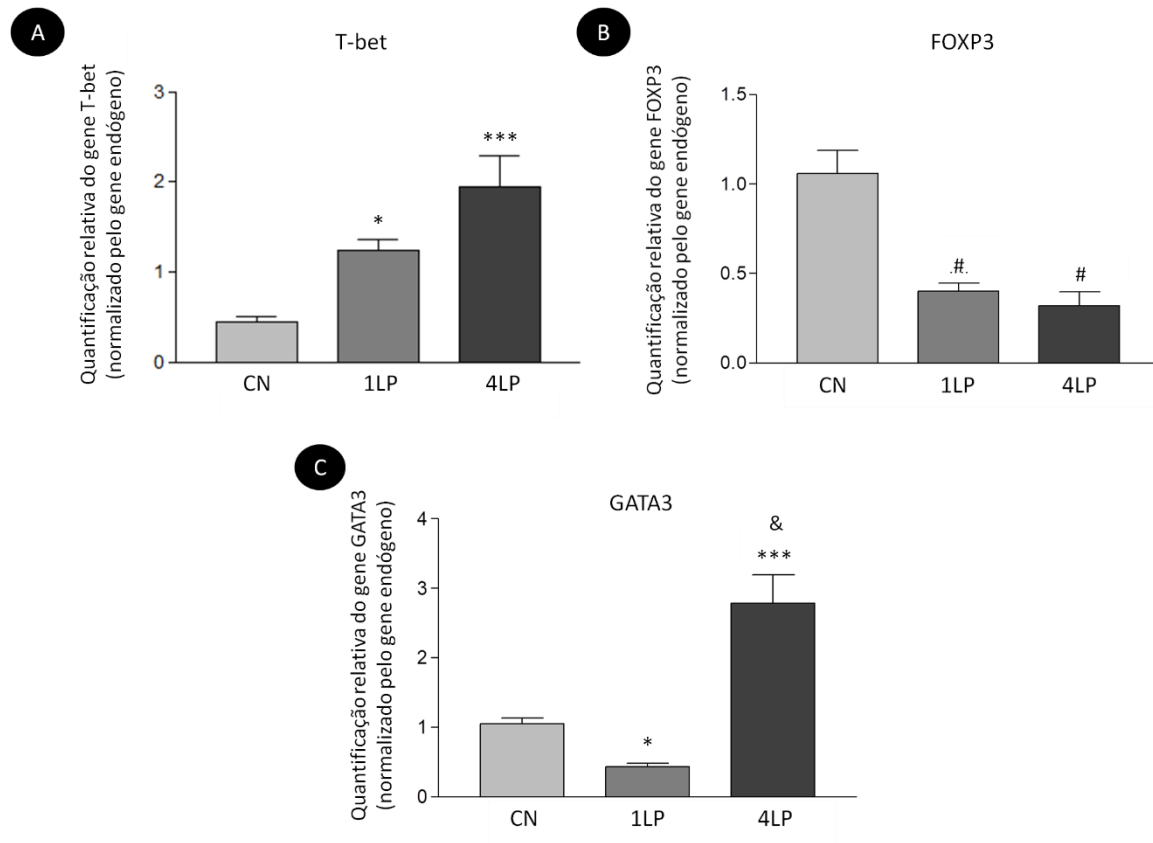
Figura 4. Avaliação do grau de fosforilação da JNK e IKK α / β e do conteúdo de TNF- α no MG de ratos controle (CN), ratos com uma lesão periapical 1LP e ratos com quatro lesões periapicais 4LP. Em A, autorradiografias típicas: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 μ g). As formas não fosforiladas de JNK e IKK α / β e β -actina foram utilizadas como controle. Em B, C e D valores do grau de fosforilação da proteína JNK, IKK α / β e TNF- α respectivamente. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ EPM, n=6. * p<0,05 CN vs 1LP e 4LP.



4.8 Avaliação da expressão gênica de marcadores de linfócitos no baço

A figura 5A demonstra que houve um aumento da expressão do gene T-bet nos grupos 1LP e 4LP quando comparado com o grupo CN, no entanto, não foi observado diferença entre os grupos 1LP e 4LP. A figura 5B mostra que o grupo 1LP apresentou menor expressão de GATA3 quando comparado ao grupo CN. Por outro lado, foi observado um aumento da expressão do GATA3 no grupo 4LP quando comparado com o grupo CN e 1LP. Com relação a expressão de FOXP3 (Figura 5C) foi observado uma redução nos grupos 1LP e 4LP quando comparados com o grupo CN. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos 1LP e 4LP.

Figura 5. Avaliação da expressão gênica de marcadores de linfócitos no baço do grupo Controle (CN), uma lesão periapical (1LP) e quatro lesões periapicais (4LP) obtidos pela técnica de PCR em tempo real. Em A, T-bet; em B, FOXP3; em C, GATA3. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ EPM, n=5. * $p<0,05$ CN vs 1LP; * $p<0,001$ CN vs 4LP; # $p<0,001$ CN vs 1LP e 4LP; & $p<0,001$ 1LP vs 4LP.**



5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que a indução de LP em ratos com 1 e 4 focos de infecção promoveu aumento das concentrações séricas de marcadores inflamatórios, maior conteúdo de macrófagos, ativação de vias inflamatórias no tecido muscular esquelético e modulação da expressão gênica de linfócitos no baço.

Na avaliação da massa corporal e ingestão alimentar observamos que não houve diferença significativa entre os grupos estudados. Esses dados estão de acordo com estudos prévios do nosso laboratório (ASTOLPHI, 2013; PEREIRA, 2014) que também não verificaram diferença nesses parâmetros. Isto pode indicar que os animais se alimentaram normalmente e provavelmente não sentiram dor (MCGIVERN; BERNTSON, 1980).

No presente estudo, a indução da lesão periapical mostrou-se efetiva nos animais dos grupos 1LP e 4LP, nos quais observou-se a presença de desorganização do ligamento periodontal na região apical, presença de infiltrado inflamatório, além de reabsorção dental e do tecido osso alveolar. O infiltrado inflamatório presente na LP é composto por células da imunidade inata (macrófagos, neutrófilos e células dendríticas) e da imunidade adaptativa (linfócitos T e B). Bactérias e toxinas oriunda do sistema de canais radiculares podem contaminar este local causando reação inflamatória e síntese de mediadores inflamatórios, com o propósito de combater a infecção e proteger os tecidos periapicais (DESAI *et al.*, 2011). Como resultado da ação dos microrganismos e da resposta imune local, ocorre destruição dos tecidos periapicais (NAIR, 1997).

Estudos clínicos e experimentais demonstraram maior prevalência de LP em pacientes com diabetes descontrolado (BENDER; BENDER, 2003; FOUAD, 2003; GARBER *et al.*, 2009; SEGURA-EGEA *et al.*, 2012). Esses efeitos podem estar relacionados ao estado hiperglicêmico característico do diabetes que pode ocasionar efeitos deletérios sobre a polpa dental, agravando a severidade da LP e a reabsorção óssea alveolar (KOHSAKA *et al.*, 1996). Atualmente sabe-se que a inflamação pode piorar o DM principalmente por liberar citocinas pró-inflamatórias que podem causar resistência insulínica (SHOELSON; GOLDFINE, 2006; AGRAWAL; KANT, 2014).

O presente estudo demonstrou que os grupos 1LP e 4LP apresentaram maior resistência à insulina em relação ao grupo CN, conforme demonstrado pela análise

do índice HOMA-IR. Estes dados estão de acordo com estudos anteriores que mostraram que ratos com LP exibem resistência à insulina avaliada tanto pelo índice HOMA-IR, quanto pelo teste de tolerância à insulina, após 30 dias de exposição a LP (PEREIRA *et al.*, 2016; ASTOLPHI *et al.*, 2012). Outros estudos, utilizando modelos de RI, como obesidade, evidenciaram maior conteúdo de macrófagos no músculo esquelético, correlacionando isso com diminuição da sensibilidade à insulina (FINK *et al.*, 2014; VARMA *et al.*, 2009).

O estudo de Boon *et al.* (2015) com indivíduos magros saudáveis, também observou que em apenas 5 dias de dieta hiperlipídica, aumentou a expressão do RNAm de marcadores de macrófagos no músculo esquelético e reduziu a expressão da proteína transportadora de glicose GLUT4 neste tecido. Similarmente, Patsouris *et al.* (2014) demonstraram aumento do conteúdo de macrófagos no músculo esquelético de pacientes diabéticos de maneira independente do índice de massa corpórea (IMC). Esses dados corroboram os resultados do presente estudo, uma vez que foi observado aumento do conteúdo de macrófagos (avaliado por meio da detecção da proteína F4/80) no tecido muscular em ratos com LP, na ausência de obesidade, destacando o papel chave dessas células na etiologia da resistência à insulina. Convém salientar que somente a detecção da F4/80 não é capaz de informar detalhes sobre a polarização (M1/M2) dos macrófagos, embora evidências demonstrem que em condições de obesidade, os macrófagos infiltrados no tecido muscular exibem fenótipo característico de polarização M1 (PATSOIRIS *et al.*, 2014; FINK *et al.*, 2014; KHAN *et al.*, 2015; WU; BALLANTINE, 2017). Assim, é possível aventar que no presente modelo de estudo, também caracterizado como uma condição de inflamação crônica de baixo grau, o fenótipo predominante seria o M1. Futuros estudos devem ser realizados com objetivo de identificar a polarização de macrófagos no tecido muscular na LP. Este assunto vem sendo considerado de extrema importância, pois a reprogramação da polarização M1 em direção a polarização M2 pode representar uma estratégia promissora para o tratamento da homeostase glicêmica em pacientes com DM e RI (LAUTERBACH; WUNDERLICH, 2017).

Conforme relatado anteriormente a inflamação causa resistência insulínica e devido a isso, estudou-se a via inflamatória. A partir dos dados do presente estudo detectou-se aumento do grau de fosforilação das proteínas da IKK α/β e JNK no MG de ratos com 1 e 4 LP. Estes resultados estão de acordo com o estudo de Yaspelkis

et al. (2009) que observaram maior grau de fosforilação da IKK α/β no músculo esquelético de ratos tratados com dieta hiperlipídica por 12 semanas, e também, o estudo de Todd *et al.* 2007 que identificaram aumento da atividade da JNK no músculo esquelético de ratos submetidos a 3 semanas de dieta hiperlipídica. Kaneto *et al.* (2004) relataram que o tratamento de ratos diabéticos com inibidores da JNK melhorou a sensibilidade à insulina dos animais. De modo semelhante, os estudos de Yuan *et al.*, 2001 e Hundal *et al.*, 2002 relataram que a inibição da IKK- β , pela administração de salicilatos, melhora a ação da insulina em ratos obesos e humanos diabéticos. Além disso, já foi demonstrado que camundongos modificados geneticamente, para não expressar IKK- β ou JNK ficam protegidos da resistência à insulina induzida por obesidade (KIM *et al.*, 2001; YUAN *et al.*, 2001; HIROSUME *et al.*, 2002; SINGH *et al.*, 2009).

Ao avaliar o conteúdo de TNF- α no tecido muscular não foram observadas diferenças neste parâmetro entre os grupos estudados. Este resultado sugere que a alteração no sinal insulínico no MG observado em estudos anteriores (ASTOLPHI *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2016) não foi devido a alterações na expressão local de TNF- α , provavelmente pelo aumento das concentrações plasmáticas de TNF- α circulante. Além de estimular efeitos inibitórios na transdução do sinal insulínico, o TNF- α pode interagir com TNFR1 no músculo esquelético (HARDIN *et al.*, 2008) e, dessa forma, estimular a via do NF- κ B (TRACEY *et al.*, 2008) e/ ou das MAPK (AGGARWAL *et al.*, 2003) que, conforme descrito anteriormente, estão relacionadas à fosforilação da IKK e JNK, que podem prejudicar a ação insulínica.

Além da expressão de TNF- α no MG, o presente estudo investigou a concentração sérica de LPS e HSP70 que também podem prejudicar a ação da insulina. Salientamos que o nosso laboratório foi pioneiro em avaliar as concentrações plasmáticas de LPS e HSP70 em modelos de LP. Os resultados demonstraram que os grupos 1LP e 4LP apresentaram aumento significativo tanto de LPS como de HSP70, quando comparados com o grupo CN. Pesquisas sobre diabetes sugerem que a elevação crônica das concentrações de LPS pode exercer papel fundamental no desenvolvimento de resistência à insulina (WATANABE *et al.*, 2011; LIANG *et al.*, 2013). Dentre os possíveis mecanismos envolvidos nesta alteração, destaca-se a capacidade do LPS de se ligar ao receptor TLR4, o que pode desencadear a ativação

de vias de sinalização inflamatórias relacionadas com a inibição do sinal insulínico (LIANG *et al.*, 2013).

Outro mediador que exerce papel ativo na modulação da inflamação são as proteínas de choque térmico. O estudo de Goodman *et al.* (2014) relatou maior expressão de 44 genes de proteínas de choque térmico em granulomas periapicais em comparação com tecidos periodontais saudáveis. A elevação das concentrações plasmáticas de HSP70 observada no presente modelo de estudo pode indicar que o aumento da expressão local de HSPs está associado a maiores concentrações desta proteína no soro. De modo interessante, estudos demonstram que as concentrações séricas de HSP70 são maiores em pacientes diabéticos (NAKHJAVANI *et al.* 2011; HUNTER-LAVIN *et al.*, 2004). Asea *et al.* (2002) relataram que HSP70 pode se ligar ao receptor TLR4, sugerindo um possível envolvimento desta proteína no desenvolvimento de resistência à insulina.

Com relação aos marcadores de imunidade adaptativa, nossos resultados demonstraram que os animais dos grupos 1LP e 4LP apresentaram aumento da resposta Th1 representado por maior expressão de T-bet no baço e elevação das concentrações plasmáticas de INF- γ . Um estudo realizado com animais *knockout* para o gene T-bet, tratados com dieta hipercalórica demonstrou que mesmo com ganho de peso e incremento da adiposidade, os animais foram protegidos da RI (STOLARCZYK *et al.*, 2014). Os autores atribuíram a ausência de resistência à insulina à redução da produção de INF- γ . Esses resultados são consistentes com estudos que relataram que a deficiência de IFN- γ pode melhorar a homeostase glicêmica em condições de obesidade (ROCHA *et al.*, 2008; WONG *et al.*, 2011; O'ROURKE *et al.*, 2012). Adicionalmente, o tratamento de adipócitos (3T3-L1) com INF- γ reduz o sinal insulínico e captação de glicose (WADA *et al.*, 2011).

As funções das células Th1 são antagonizadas pela subpopulação Th2 que apresentam o fator de transcrição GATA3 e a IL-4 como marcadores específicos. Os achados da presente pesquisa demonstraram uma redução de IL-4 nos dois grupos com LP. Chang *et al.* (2012) relataram que o tratamento com IL-4 promove melhora da sensibilidade à insulina, da tolerância à glicose e, simultaneamente, reduz o peso corporal de ratos obesos. Esses achados sugerem que a IL-4 desempenha efeitos benéficos na homeostase glicêmica. Ainda em relação ao fenótipo Th2, foi observado redução da expressão de GATA3 no grupo 1LP comparado ao grupo controle. O papel das células Th2 na sensibilidade insulínica foi demonstrado no estudo de Gonzales *et*

al. (2010). Neste estudo foi desenvolvido um modelo de inativação de resposta Th2 por meio da inibição da proteína STAT-6, no qual observou-se que os animais com deficiência da resposta Th2 eram mais propensos à resistência à insulina. Assim, a redução da resposta Th2 observada a partir dos parâmetros analisados no presente estudo pode contribuir para entender os mecanismos envolvidos na RI observada em animais com LP (ASTOLPHI *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2016). Paradoxalmente, o grupo 4LP apresentou um aumento na expressão de GATA3. A explicação para este resultado pode estar relacionada à produção endógena de melatonina pelas células inflamatórias.

Sabe-se que os linfócitos T têm capacidade de sintetizar melatonina em processos inflamatórios intensos no intuito de amenizar o processo inflamatório (REITER *et al.*, 2000; CARRILLO, *et al.*, 2004) e esta indolamina estimula a expressão de GATA3 (KIM; CHO, 2017). Adicionalmente, o estudo de (KÜHLWEIN; IRWIN, 2001) demonstrou que a melatonina não afeta a produção de INF- γ (que está relacionado com resposta Th1) podendo justificar o aumento de T-bet no grupo 4LP. Dessa forma, é possível aventar que o grupo 4LP produziu maior quantidade de melatonina em relação ao grupo 1LP, levando ao aumento da expressão de GATA3. Outro estudo relacionado à inflamação, como esofagite apresentou os mesmos resultados do presente estudo, ou seja, aumento do conteúdo T-bet e GATA3 (WRIGHT *et al.*, 2018).

Diferentemente das células Th1 e Th2, que supostamente prejudicam e melhoram a sensibilidade à insulina, respectivamente, o papel das células Treg ainda se encontra indefinido. Vale ressaltar que no presente trabalho foram avaliadas a expressão de FOXP3 no baço e as concentrações plasmáticas de TGF- β como marcadores das células Treg. Nossos resultados demonstraram uma redução da expressão de FOXP3 nos grupos 1LP e 4LP e inalteração de TGF- β no plasma. Eller *et al.* (2011) avaliaram o papel das células Treg na RI. O estudo conduzido em pacientes obesos com e sem RI e em indivíduos magros saudáveis demonstrou que os indivíduos obesos apresentaram menor expressão de células Treg no timo, independente da presença de RI. Com objetivo de compreender o papel dessas células na RI, os autores utilizaram ratos *knockout* (para o gene que expressa o receptor da leptina - db/db) associado a um tratamento que induzia depleção das células Treg. Observou-se que os animais que tiveram depleção destas células eram menos sensíveis a insulina do que o grupo controle. Adicionalmente, os autores

identificaram aumento de marcadores característicos de fenótipo Th1 (INF- γ , TNF- α) no tecido adiposo dos animais que não expressavam Treg. Posteriormente, notou-se que ao realizar a transferência de células Treg a partir de animais saudáveis, havia melhora da sensibilidade à insulina. Esses dados indicam papel importante dessas células na manutenção da sensibilidade à insulina, mostrando-se coerente com os achados do presente estudo que observou redução da expressão de células Treg no baço de ratos com LP e RI.

Apesar do TGF- β ser liberado pelas células Treg e estas células ocasionarem a diminuição da expressão de células Th1 (que estão relacionadas com RI), a literatura mostra que esse TGF- β pode ter efeito antagônico em relação à ação insulínica. Assim, o estudo de Yadav *et al.* (2011) demonstrou que a administração de inibidores do TGF- β em camundongos *knockout* para o gene da leptina e camundongos tratados com dieta hiperlipídica promoveu redução na glicemia de jejum e melhora nos testes de tolerância à glicose e à insulina nesses animais. Ademais, neste mesmo estudo foi verificada correlação positiva entre TGF- β , índice de massa corpórea e adiposidade, indicando piora no perfil metabólico. Entretanto, em nossos estudos, como não houve alteração do TGF- β (citado acima), não podemos inferir que ela esteja relacionada com RI encontrada nos modelos com 1LP e 4LP.

6 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados do presente estudo, podemos inferir que tanto a imunidade inata como a imunidade adaptativa podem contribuir para a RI observada em ratos com LP. Dentre os possíveis mecanismos responsáveis por essas alterações destaca-se o recrutamento de macrófagos, ativação de vias inflamatórias no tecido muscular e uma modulação da expressão gênica de linfócitos no baço. Esses resultados podem auxiliar a elucidar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de resistência à insulina a partir de uma inflamação localizada, como a LP.

REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, B.B.; et al. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. **Nat Rev Immunol.**, v. 3, n. 9, p. 745-75, Sep. 2003.
- AGRAWAL, N.K. KANT, S. Targeting inflammation in diabetes: Newer therapeutic options. **World J Diabetes**, v. 15, p. 697-710, Oct. 2014.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783-801, Feb. 2006.
- 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. 32, p. 62-7, Jan. 2009
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 37, p. 81-90, Jan 2014.
- ANTIGNANO, F.; ZAPH, C. Regulation of CD4 T-cell differentiation and inflammation by repressive histone methylation. **Immunol Cell Biol**, v.93, p. 245-52, Mar. 2015.
- 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.
- ASEA A.; REHLI, M.; KABINGU, E.; et al. Novel Signal Transduction Pathway Utilized by Extracellular HSP70. **J Biol Chem**, v. 277, n. 17, p. 15028–15034, 2002.
- 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.
- ASTOLPHI, R. D. Avaliação do sinal insulínico em ratos com lesão periapical. 2013. 55 f. Dissertação (Mestrado em ciências fisiológicas). Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2013.
- BALDWIN, A. S. Jr. "The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights". **Annu Rev Immunol.** v. 14, p. 649-83, 1996.
- BENDER, I. B.; BENDER, A. B. Diabetes mellitus and the dental pulp. **J. Endod.**, v. 29, n. 6, p. 383-389, Jun 2003.
- BENNETT, B. L.; SATOH, Y.; LEWIS, A. J. JNK: a new therapeutic target for diabetes. **Curr. Opin. Pharmacol**, v. 3, n. 4, p. 420-425, Aug. 2003.
- BOHNSACK, J.F.; BROWN, E.J. The role of the spleen in resistance to infection. **Annu Rev Med**, v. 37, p. 49-59, 1986.

BONNET, F.; SCHEEN, A.J. Effects of SGLT2 inhibitors on systemic and tissue low-grade inflammation: The potential contribution to diabetes complications and cardiovascular disease. **Diabetes Metab**, v. 18, p. 30176-9, Sep. 2018.

BONORA, E. et al. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. **Diabetes Care**, v. 23, n. 1, p. 57-63, Jan. 2000.

BOON, M.R.; BAKKER, L.E.; HAKS, M.C.; et al. Short-term high-fat diet increases macrophage markers in skeletal muscle accompanied by impaired insulin signalling in healthy male subjects. **Clin Sci (Lond)**, V 128, p. 143-51.

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.

BRUCE, M. H. *et al.* Induction of antigen specific CD4+CD25+Foxp3+T regulatory cells from naïve natural thymic derived T regulatory cells. **Int Immunopharmacol**, v.15, p. 1567-5769, 2015.

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.

CARRILLO, V.A., *et al.* Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. **FASEB J**, v. 18, p. 537-9, mar. 2004.

CESTA, M.F. Normal structure, function, and histology of the spleen. **Toxicol Pathol**, v. 34, p. 455-65, 2006.

CHANG, Y.H., *et al.* Regulation of glucose/lipid metabolism and insulin sensitivity by interleukin-4. **Int J Obes (Lond)**, v. 36, p. 993-8, Jul. 2012.

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.

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

DAVIES, E. L. *et al.* Heat shock proteins form part of a danger signal cascade in response to lipopolysaccharide and GroEL. **Clin Exp Immunol**, v. 145, p.183-189, 2006.

DEIULIIS, J. *et al.* Visceral Adipose Inflammation in Obesity Is Associated with Critical Alterations in Tregulatory Cell Numbers. **PLoS ONE**, v.6, n.1, 2011.

DEL PRATO, S. Role of glucotoxicity and lipotoxicity in the pathophysiology of Type 2 diabetes mellitus and emerging treatment strategies. **Diabet Med.**, V. 26, p. 1185-92, Dec. 2009.

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.

DUE-CHRISTENSEN, M.; ZOFFMANN, V.; WILLAING, I.; HOPKINS, D.; FORBES, A. The Process of Adaptation Following a New Diagnosis of Type 1 Diabetes in Adulthood: A Meta-Synthesis. **Qual Health Res.**, V. 28, p. 245-258, Jan. 2018.

DUTTON, R.W.; BRADLEY, L.M.; SWAIN, S.L. T cell memory. **Annu Rev Immunol**, v. 16, p. 201-23, 1998.

ELLER, K., A. KIRSCH, *et al.* Potential role of regulatory T cells in reversing obesity-linked insulin resistance and diabetic nephropathy. **Diabetes**, v.60, n.11, p. 2954-1962, 2011.

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.

FANG, H. *et al.* Toll-like receptor 4 (TLR4) is essential for Hsp70-like protein 1 (HSP70L1) to activate dendritic cells and induce Th1 response. **J Biol Chem.** v. 286, n. 35, p.30393-400, 2011.

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.

FARRAR, J.D.; *et al.* T helper subset development: roles of instruction, selection, and transcription. **J Clin Invest**, v. 109, p.431-435, 2002.

FINK L.N., *et al.* Pro-inflammatory macrophages increase in skeletal muscle of high fat-fed mice and correlate with metabolic risk markers in humans. **Obesity (Silver Spring)**. v. 22, p. 747–757, 2014.

FINK, L.N.; COSTFORD, S.R.; LEE, Y.S. *et al.* “Pro-inflammatory macrophages increase in skeletal muscle of high fat-fed mice and correlate with metabolic risk markers in humans”. **Obesity (Silver Spring)**. V.22, n. 2, p747-757, 2014.

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. 22171-221777, 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.

- FOUSSAT, A. et al. comparative study between T regulatory type 1 and CD4+CD25+ T cells in the control of inflammation. **J Immunol.** v. 171, p. 5018-5026, 2003.
- 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.
- GEERTS, S. O. et al. Systemic release of endotoxins induced by gentle mastication: Association with periodontitis severity. **J Periodontol.** v.73, n.1, p.73-78, 2002.
- GINHOUX, F.; SCHULTZE, J.L.; MURRAY, P.J.; OCHANDO, J.; BISWAS, S.K. New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. **Nat Immunol.**, V. 17, p. 39-40, Jan. 2016.
- GLIES, J. T. et al. Insulin resistance in rheumatoid arthritis: disease-related indicators and associations with the presence and progression of subclinical atherosclerosis. **Arthritis Rheumatol.** v.67, n.3, p.626-636, 2015
- GOODMAN, S. C. et al. Expression of Heat Shock Proteins in Periapical Granulomas. **J Endod.** v. 40, n. 6, p.830-836, 2014.
- GONZALES, R.R.R.; et al. IL-4/STAT6 immune axis regulates peripheral nutrient metabolism and insulin sensitivity. **PNAS**, v.107, n.52, p. 22617–22622, 2010.
- GROUX, H.; et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. **Nature**, v. 389, p.737-742, 1997.
- HANSSON, G.K. Atherosclerosis--an immune disease: The Anitschkov Lecture 2007. **Atherosclerosis**, v.202, n.1, p. 2-10, 2009.
- HANSSON, G.K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **N Engl J Med**, v. 16, n. 352, p.1685-95, 2005.
- HARDIN, B.J.; et al. TNF- α acts via TNFR1 and muscle-derived oxidants to depress myofibrillar force in murine skeletal muscle. **J Appl Physiol**, v. 104, n. 3, p. 694-699, Mar. 2008.
- HECK, T. G. et al. HSP70 expression: does it a novel fatigue signalling factor from immune system to the brain Cell **Biochem Funct**, v.29, p. 215-226, 2011.
- HEVENER, A.L., et al. Macrophage PPAR gamma is required for normal skeletal muscle and hepatic insulin sensitivity and full antidiabetic effects of thiazolidinediones. **J Clin Invest**, v. 117, p. 1658–1669, 2007.
- HIROSUMI, J. et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. **Nature.**, v. 420, n. 6913, p.:333–336, Nov. 2002.

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

HOTAMISLIGIL, G. S. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. **Science**, v. 271, n. 5249, p. 665-658, 1996.

HUNDAL, R.S.; PETERSEN, K.F.; MAYERSON, A.B, et al. Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in type 2 diabetes. **J Clin Invest**, v. 109, p. 1321-6, 2002.

HUNTER- LAVIN, C.; HUDSON, P.R.; MUKHERJEE, S.; DAVIES, G.K.; WILLIAMS, C.P.; HARVEY, J.N.; CHILD, D.F.; WILLIAMS, J.H.; et al. Folate supplementation reduces serum hsp70 levels in patients with type 2 diabetes. **Cell Stress Chaperones**, v. 9, p. 344-9, 2004.

HWANG ES, SZABO SJ, SCHWARTZBERG PL, GLIMCHER LH. T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA3. **Science**. v. 307, n. 5708, p.430-433, 2005.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. Diabetes Atlas 2017.

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.

JIANG, N.; LI, Y.; SHU, T.; WANG, J. Cytokines and inflammation in adipogenesis: an updated review. **Front Med.**, Aug. 2018.

JURA, M.; KOZAK, L.P. Obesity and related consequences to ageing. **Age (Dordr)**, V. 38, p. 23, Feb. 2016.

KANETO, H.; NAKATANI, Y.; KAWAMORI, D.; MIYATSUKA, T.; MATSUOKA, T.A, et al. Involvement of oxidative stress and the JNK pathway in glucose toxicity. **Nat Med**, v. 1, p. 165-74, 2004.

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.

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.

KHAN I.M., *et al.* Intermuscular and perimuscular fat expansion in obesity correlates with skeletal muscle T cell and macrophage infiltration and insulin resistance. **Int J Obes (Lond)**, v.39, p. 1607–1618, 2015.

Kim JK, Kim YJ, Fillmore JJ, Chen Y, Moore I, Lee J, et al. Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. **J Clin Invest**, 2001. 108(3): p. 437-46.

KIM T-H, CHO S-G. Melatonin-induced KiSS1 expression inhibits triple-negative breast cancer cell invasiveness. **Oncology Letters**, v. 14, n. 2, p. 2511-2516, 2017.

KNIGHT, J.A. Physical inactivity: associated diseases and disorders. **Ann Clin Lab Sci**, v. 42, p. 320-37, 2012.

KOHN, A. D.; TAKEUCHI, F.; ROTH, R. A. Akt, a pleckstrin homology domain containing kinase, is activated primarily by phosphorylation. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 36, p. 21920-21926, Sep. 1996.

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

KÜHLWEIN, E.; IRWIN, M. Melatonin modulation of lymphocyte proliferation and Th1/Th2 cytokine expression. **J Neuroimmunol**, v. 117, p. 51-7, Jul. 2001.

LAUTERBACH, M.A.; WUNDERLICH, F.T. Macrophage function in obesity-induced inflammation and insulin resistance. **Pflugers Arch**, v. 469, p. 385-396, Apr. 2017.

LAZAREVIC V.; CHEN X.; SHIM J.H.; et al. T-bet represses T(H)17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding ROR γ t. **Nat Immunol**, v. 12, n.1, p. 96-104, 2011.

LI, Q.; VERMA, IM. "NF-Kb regulation in the immune system". **Nat Rev Immunol**. v. 12, n. 2, p. 975, 2002.

LI, X.; KOLLTVEIT, K.M.; TRONSTAD, L.; OLSEN, I. Systemic diseases caused by oral infection. **Clin Microbiol Rev**. V. 13, p. 547–58, 2000.

LIANG, H.; HUSSEY, S.E.; SANCHEZ-AYILA, A.; et al. Effect of lipopolysaccharide on inflammation and insulin action in human muscle. **PLoS One**, v. 8, 2013.

LIANOS, G.D; ALEXIOU, G.A; MANGANO, A.; et al. "The role of heat shock proteins in câncer". **Cancer Letters**. v.360, n.2, p114-118,2015.

LIBBY, P.*et al.* Role of Inflammation in Atherosclerosis Associated with Rheumatoid Arthritis. **Am J Med**.; 121(10 Suppl 1):S21-31, 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.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E.A. The heat-shock proteins. **Annu. Rev Genet**, v.22, p.631-77, 1988.

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

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

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

LUO, D. *et al.* Angiopoietin-like 8 Improves Insulin Resistance and Attenuates Adipose Tissue Inflammation in Diet-Induced Obese Mice. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**. Sep. 2018.

MAMBULA, S. S.; *et al.* Mechanisms for Hsp70 secretion: Crossing membranes without a leader. **Methods**, v.43, p. 168-175, 2007.

MANTOVANI, A. *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol.**, v. 25, p. 677-86, Dec. 2004.

MARTINS, F.O.A.; MELLO, J.R.; CORREA, O.R. The spleen is an important site of T cell activation during human hepatosplenic schistosomiasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 159-64, 1998.

MATTILA, K.J., *et al.* Dental infections and cardiovascular diseases: a review. **J Periodontol**, v. 26, p. 2085–8, 2005.

MCGAW, T. Periodontal disease and preterm delivery of low-birth-weight infants. **J Can Dent Assoc.** v. 68, p. 165–9, 2002.

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

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

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

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

NAKHJAVANI, M.; MORTEZA, A.; ESTEGHAMATI, A.; KHALILZADEH, O.; ZANDIEH, A.; SAFARI, R.; *et al.* Serum lipoprotein(a) levels are greater in female than male patients with type-2 diabetes. **Lipids**, v. 46, p. 349-56, 2011.

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

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, p. 35279–35292, 2007.

NGUYEN, K.D. *et al.* Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. **Nature**, v. 20, p. 104-8, Nov. 2011.

NOLTE, M.A. *et al.* Isolation of the intact white pulp. Quantitative and qualitative analysis of the cellular composition of the splenic compartments. **Eur J Immunol**, v. 30, p. 626-34, Feb. 2000.

O'ROURKE, R. W.; WHITE, A. E.; METCALF, M. D.; *et al.* Systemic inflammation and insulin sensitivity in obese IFN- γ knockout mice. **Metabolism**, V. 61, p. 1152-1161, 2012.

OGAWA, F. *et al.* Serum levels of heat shock protein 70, a biomarker of cellular stress, are elevated in patients with systemic sclerosis: association with fibrosis and vascular damage. **Clin Exp Rheumatol**, v.26, n.4, p.659-662, 2008.

OHNISHI, T.; MUROI, M.; TANAMOTO, K. The lipopolysaccharide-recognition mechanism in cells expressing TLR4 and CD14 but lacking MD-2. **FEMS Immunol Med Microbiol** v. 51, p, 84-91, 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.

OSBORN, O.; JERROLD M OLEFSKY, J.M. "The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease". **Nature Medicine** v. 18, n 3, p.363-374, 2012.

PACIFICO, L.; *et al.* Increased T-helper interferon-g-secreting cells in obese children. v. 154, p. 691-697, 2006

PALSSON-MCDERMOTT, E.M.; O'NEILL, L.A. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. **Immunology** v. 113, p. 153-162, 2004.

PATSOURIS D, *et al.* Insulin resistance is associated with MCP1-mediated macrophage accumulation in skeletal muscle in mice and humans. **PLoS One**, v. 9, p. 110 -653, 2014.

PATSOURIS, D.; CAO, J.J.; VIAL, G.; *et al.* Insulin Resistance is Associated with MCP1-Mediated Macrophage Accumulation in Skeletal Muscle in Mice and Humans. **PLoS ONE**, v. 9, p. 1-14, 2014.

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.

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 músculo esquelético. **Arq Bras Endocrinol. Metab**, p. 53-4, 2009.

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. 81 f. Dissertação (Mestrado em ciências fisiológicas). Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2014.

PEREIRA, R.F.; DE OLIVEIRA DA MOTA, M.S.; DE LIMA COUTINHO MATTERA, M.S. et al. Periapical lesions decrease Akt serine phosphorylation and plasma membrane GLUT4 content in rat skeletal muscle. **Clin Oral Investig.**, v. 20, n. 7, Sep., 2016.

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.

PILON, M.; SCHEKMAN, R. Protein Translocation: How Hsp70 Pulls It Off. **Cell**. v.97, p. 679-682, 1999.

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

REITER RJ. et al. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 917, p. 376-86, 2000.

ROCHA, V.Z.; FOLCO, E.J.; SUKHOVA, G.; SHIMIZU, K.; GOTSMAN, I.; VERNON, A.H.; LIBBY, P.; et al. Interferon-gamma, a Th1 cytokine, regulates fat inflammation: a role for adaptive immunity in obesity. **Circ Res**, v. 103, p. 467-76, 2008.

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.

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

SAGHIZADEH, S. H. M.; et al. The Expression of TNF α by Human Muscle. **J Clin Invest**, v. 97, n. 4, p. 1111–1116, 1996.

SASAKI, H.; HIRAI, K.; MARTINS, C.M.; FURUSHO, H.; BATTAGLINO, R.; HASHIMOTO, K. Interrelationship Between Periapical Lesion and Systemic Metabolic Disorders. **Curr Pharm**, v. 22, p. 2204-15, Dec. 2016.

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.

SHEOLSON, S.E.; LEE, J.; GOLDFINE, A.B. Inflammation and insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 116, p. 1793-801, Jul. 2006.

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

SILBER, S.J. Apparent fertility of human spermatozoa from the caput epididymidis. **J Androl.**, v. 4, p. 263-9, Jul-aug. 1989.

SINGH, R. et al. Differential Effects of JNK1 and JNK2 Inhibition on Murine Steatohepatitis and Insulin Resistance. *Hepatology* (Baltimore, Md), v. 49, n. 1. p. 87-96, 2009.

SONG, M. *et al.* Adipocyte-Derived Exosomes Carrying Sonic Hedgehog Mediate M1 Macrophage Polarization-Induced Insulin Resistance via Ptch and PI3K Pathways. **Cell Physiol Biochem.**, v. 48, p. 1416-1432, Jul. 2018.

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.

STOLARCZYK, E.; LORD, G.M.; HOWARD, J.K.; et al. The immune cell transcription factor T-bet: A novel metabolic regulator. **Adipocyte**, v.13, p. 58-62, 2014.

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

SZABO, S.J; KIM, S. T.; COSTA, G. L.; ZHANG, X.; FATHMAN, C.G.; GLIMCHER, L.H. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage. **Commitment Cell**, v. 100, n.6, p. 655-669, 2000.

TANRIVER, Y.; DIEFENBACH, A. Transcription factors controlling development and function of innate lymphoid cells. **Int Immunol**, v. 26, n. 3, p. 119–128, 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.

TODD, MK. et al. Thiazolidinediones enhance skeletal muscle triacylglycerol synthesis while protecting against fatty acid-induced inflammation and insulin resistance. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 292, n. 2, p. 485-493, Feb. 2007.

TRACEY, D.; et al. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. **Pharmacol Ther**, v. 117, n. 2, p. 244-279, Feb. 2008.

VAN EWIJK, K.; NIEUWENHUIS, P. Compartments, domains and migration pathways of lymphoid cells in the splenic pulp. **Experientia**, v. 15, p. 199-208, Feb. 1985.

VARMA, V.; YAO-BORENGASSER, A.; RASOULI, N. "Muscle inflammatory response and insulin resistance: synergistic interaction between macrophages and fatty acids leads to impaired insulin action". **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v. 296, p. 1300–1310, 2009.

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

WADA, T.; et al. Both type I and II IFN induce insulin resistance by inducing different isoforms of SOCS expression in 3T3-L1 adipocytes. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 300, p. 1112-1123, 2011.

WALI, J. A.; et al. Linking obesity with type 2 diabetes: the role of T-bet. **Diabetes Metab Syndr Obes** v.7, p.331-340, 2014.

WANG, M. *et al.* C1q/TNF-related protein-6 is associated with insulin resistance and the development of diabetes in Chinese population. **Acta Diabetol**, v. 7, Aug. 2018.

WATANABE, K.; IIZUKA, T.; ADELEKE, A.; et al. Involvement of toll-like receptor 4 in alveolar bone loss and glucose homeostasis in experimental periodontitis". **J Periodontal**, v. 46. p. 21-30, 2011.

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.

WELLEN KE, HOTAMISLIGIL GS. Inflammation, stress, and diabetes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 5, p. 1111-1119, 2005.

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.

WINER, S.; WINER, D.A. The adaptive immune system as a fundamental regulator of adipose tissue inflammation and insulin resistance. **Immunol Cell Biol.**, V. 90, p. 755-62, Sep. 2012.

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

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

Wong N, Fam BC, Cempako GR, et al. Deficiency in interferon-gamma results in reduced body weight and better glucose tolerance in mice. **Endocrinology**. 2011;152(10):3690–3699.

WRIGHT, BL. et al. Increased GATA-3 and T-bet expression in eosinophilic esophagitis versus gastroesophageal reflux disease. **J Allergy Clin Immunol.**, v. 141, n. 5, p. 1919-1921, 2018.

WU, H.; BALLANTYNE, C.M. Skeletal muscle inflammation and insulin resistance in obesity. **J Clin Invest**, v. 127, p. 43-54, Jan. 2017.

YASPELKIS, B.B.; KVASHA, I.A.; FIGUEROA, T.Y.; et al. High-fat feeding increases insulin receptor and IRS-1 coimmunoprecipitation with SOCS-3, IKK α /beta phosphorylation and decreases PI-3 kinase activity in muscle. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 296, p. 1709-15, 2009.

YONG, J. *et al.* Correlation between the ratio of T-bet/GATA3 and the levels of IL-4 and IFN- γ in patients with allergic asthma. **Mol Med Rep**, v. 4, p. 663-6, Jul-Aug. 2011.

YUAN, M.; KONSTANTOPOULOS, N.; LEE, J.; et al. Reversal of obesity and diet induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikk β . **Science**, v. 293, p. 1673-7, 2001

ZHANG, C. *et al.* More than an Anti-diabetic Bariatric Surgery, Metabolic Surgery Alleviates Systemic and Local Inflammation in Obesity. **Obes Surg.**, v. 28, p. 3658-3668, Nov. 2018.

ZHAO, G.; et al. Effects of moderate and high intensity exercise on T1/T2 balance. **Exerc Immunol Rev**, V.18, p. 98-114, 2012.

ANEXOS

ANEXO A- Comitê de Ética

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **“Estudo dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento de resistência à insulina em ratos com lesão periapical”**, Processo FOA nº 00745-2015, sob responsabilidade de Dóris Hissako Sumida apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 09 de Dezembro de 2015.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 31 de Dezembro de 2018.

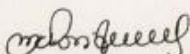
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 30 de Janeiro de 2019.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **“Study about the mechanisms involved in the development of insulin resistance in rats with periapical lesion”**, Protocol FOA nº 00745-2015, under the supervision of Dóris Hissako Sumida presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on December 09, 2015.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: December 31, 2018.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: January 30, 2019.



Profa. Adj. Maria Cristina Rosifini Alves Rezende
Vice-Coordenadora da CEUA
CEUA Vice-Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br

ANEXO B

ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO JOURNAL OF ENDODONTICS

Basic Research—Biology

Periapical Lesions Increase Macrophage Infiltration and Inflammatory Signaling in Muscle Tissue of Rats



Renato Felipe Pereira, MSc,* Luciano Tavares Angelo Cintra, Prof,[†]
 Gestter Willian Lattari Tessarin, MSc,[‡] Fernando Yamamoto Chiba, PhD,[§]
 Maria Sara de Lima Coutinho Mattered, MSc,* Natalia Francisco Scaramelle,^{||}
 Thais Verônica Saori Tsosura, MSc,^{||} Edilson Ervolino, Prof,^{||}
 Sandra Helena Penha de Oliveira, Prof,* and Doris Hissako Sumida, Prof*

Abstract

Introduction: Our previous studies have shown that periapical lesions (PLs) in rats cause systemic disorders such as increased tumor necrosis factor- α plasma levels, insulin resistance, and impairment in insulin signal transduction in muscle tissue. However, the mechanisms involved in these alterations are not fully understood. Under chronic inflammatory conditions such as obesity, it has been shown that the skeletal muscle is affected by inflammation, and the number of resident macrophages that are associated with impairments of insulin action and sensitivity is increased. This study aimed to investigate the presence of macrophages, activation of inflammatory pathways in muscle tissue, glycemia, and insulinemia of rats with PLs. **Methods:** Sixty Wistar rats were distributed into a control group; a group with 1 PL (1PL), which was induced in the right maxillary first molar; and a group with 4 PLs (4PL), which were induced in the right upper and lower first and second molars. We quantified macrophage content by immunohistochemistry for the F4/80 protein. We evaluated Jun N-terminal kinase and IKK α/β phosphorylation status in the muscle tissue by Western blotting. Serum levels of lipopolysaccharide (LPS) and HSP70 and plasma levels of glucose and insulin were assessed by using commercial kits. **Results:** The 1PL and 4PL groups showed increase in macrophage content, IKK α/β , and Jun N-terminal kinase phosphorylation status, serum LPS and HSP70 levels, and insulin resistance and no changes in glycemia and insulinemia compared with the control group. There was no difference in these parameters between the 1PL and 4PL groups. **Conclusions:** PLs promoted an increase in macrophage infiltration, activation of inflammatory pathways in mus-

cle tissue, and serum concentrations of HSP70 and LPS in rats. The present study improves the knowledge on the impact of oral inflammations on the development of systemic alteration, which can induce insulin resistance. (*J Endod* 2017;43:982–988)

Key Words

Inflammation, insulin resistance, periapical lesion, systemic disorders

Clinical and experimental studies have shown an association between periapical lesions (PLs) and systemic disorders such as diabetes and insulin resistance (1–4). Insulin resistance occurs when normal or elevated levels of insulin cause a decreased biological response (5). Studies have reported a critical role of inflammation in the etiology of insulin resistance (6). In PLs, a local inflammatory process occurs in the dental pulp and periapical region (7). However, there is evidence that inflammatory marker levels are elevated in the serum of rats and humans with PLs, indicating that these markers can act systemically (8–10). Increased levels of inflammatory markers in the plasma are characterized as a state of chronic low-grade inflammation that is usually associated with obesity and can contribute to the development of insulin resistance (11). Furthermore, in obesity, there is evidence that muscle tissue is affected by an increase in the number of resident macrophages (12). F4/80 protein is known as a highly specific cell surface marker for murine macrophages (13). Macrophages express toll-like receptor 4 (TLR4) that can induce inflammatory responses by activating innate immunity, thereby contributing to the pathogenesis of insulin resistance (14). Studies show that macrophages can be activated by several factors including cytokines and bacterial endotoxins such as lipopolysaccharide (LPS) (15). LPS is a cell membrane component of gram-negative bacteria and plays a key role in activation of inflammation and periapical bone resorption (16). Another

Significance

The present results suggest that oral inflammation may promote systemic disorders, resulting in alterations in concentrations of proinflammatory mediators in serum and in the metabolism of peripheral tissues such as muscle tissue, which has a key role in glucose homeostasis.

From the *Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas-SBFis, Department of Basic Sciences, [†]Department of Restorative Dentistry, [§]Department of Child and Social Dentistry, and ^{||}Department of Basic Sciences, São Paulo State University (Unesp), School of Dentistry, Araçatuba; and [‡]São Paulo State University (Unesp), Institute of Biosciences, Botucatu, Brazil.

Address requests for reprints to Dr Fernando Yamamoto Chiba, Dental School of Araçatuba, UNESP, University Estadual Paulista, R. José Bonifácio, 1193, CEP 16015-050, Araçatuba, SP, Brazil. E-mail address: fernando_chiba@hotmail.com
 0099-2399/\$ - see front matter

Copyright © 2017 American Association of Endodontists.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2017.01.030>

Basic Research—Biology

mediator that plays an active role in the modulation of inflammation is heat shock protein (HSP) 70, which presents an anti-inflammatory effect in the intracellular environment (17) and a proinflammatory effect in the extracellular environment (18) that may contribute to the development of insulin resistance (19).

Our previous studies have shown that PL in rats causes insulin resistance and impairs insulin signal transduction in muscle tissue (3, 4). However, the mechanisms involved are not fully understood. Because PL promotes an inflammatory state similar to that in obesity, this study aimed to investigate the presence of infiltrated macrophages by detection of F4/80 protein and to evaluate inflammatory pathways related to inhibition of insulin signal transduction in muscle tissues of rats with 1 or 4 teeth with PL. In addition, we quantified serum HSP70 and LPS levels, which are possible inducers of insulin resistance. The results of this study may help understand the interrelationship between local inflammation and systemic disorders.

Materials and Methods

Sixty male Wistar albino rats weighing 250–280 g were used in the study. The animals were housed with a 12-hour light/dark cycle (lights on at 7:00 AM) in temperature-controlled rooms ($23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$) and were given access to water and food (23% from protein, 4% fat, and 58% from carbohydrate) (Presença; Paulínia, São Paulo, Brazil) *ad libitum*. All experiments were approved by the local ethics committee according to protocol number 00745-2015.

Animal Preparation and Death

The 60 animals were randomly distributed into 3 groups (Fig. 1), with 20 animals in each group: a control group (CN), a group with 1 periapical lesion (1PL), and a group with 4 periapical lesions (4PL).

The rats were anesthetized by intraperitoneal injection with ketamine (Ketamina Agener; Embu Guacu, SP, Brazil) and xylazine (Dorcipec; Vallee, Montes Claros, MG, Brazil). To induce PLs, dental pulps of the right maxillary first molar (1PL) and of the right upper and lower first and second molars (4PL) were exposed to the oral environment on the occlusal surface by using a surgical round bur (Long Neck Maillefer; Dentsply, Petropolis, RJ, Brazil). For 30 days, body weight per rat was measured weekly. At 30 days after pulp exposure, the rats ($n = 9$) were subjected to a 14-hour fast, followed by anesthesia via intraperitoneal injection with sodium thiopental (Thiopentax; Cristalia, Itapira, SP, Brazil), and blood was collected. Subsequently, the animals ($n = 9$) were killed via overdose of the same anesthetic, and jaws were removed and fixed for 48 hours in 4% formaldehyde (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) diluted in phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4, 0.1 mol/L; Sigma-Aldrich). Gastrocnemius skeletal muscle was collected from 6 other animals to evaluate Jun N-terminal kinase (JNK) and IKK α/β phosphorylation status by Western blotting method. For immunohistochemical analysis of F4/80, the other animals ($n = 5$) were perfused as described by Da Silva et al (20). Immediately after the perfusion, the gastrocnemius muscle was post-fixed for 4 hours in 4% formaldehyde diluted in PBS.

Histologic Processing of the Rat Jaws

The right maxillae and mandible were decalcified in ethylenediamine tetraacetic acid (10%; Sigma-Aldrich) for 60 days, processed in conventional manner, and embedded in paraffin. The parasagittal histologic sections of right maxillae first molar (1PL) or right upper and lower first and second molars (4PL) were obtained in microtome (RM2155; Leica Microsystems, BD, Wetzlar, Germany) with 4- μm -thick sections. The sections were stained with hematoxylin-eosin and

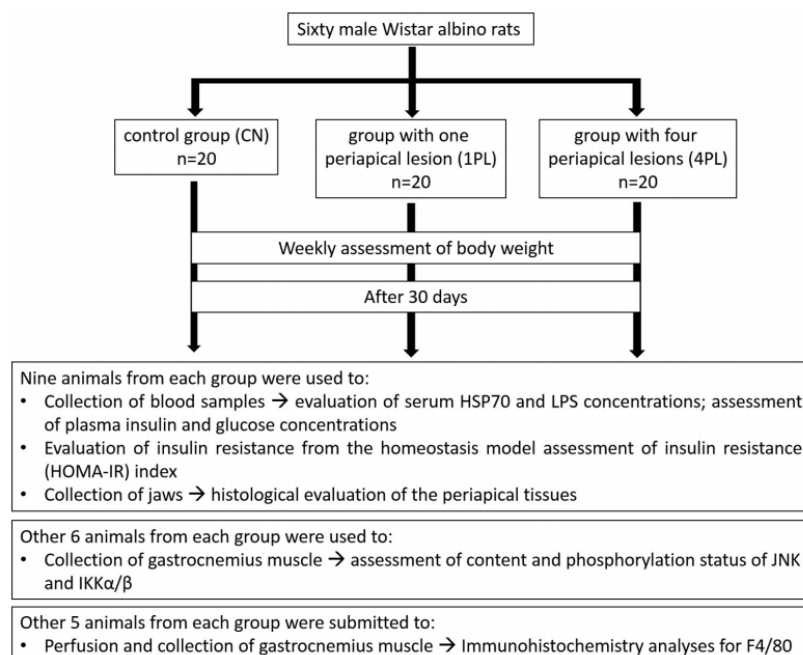


Figure 1. Flowchart showing step-by-step distribution of animals of CN group, 1PL group, and 4PL group to collection of blood samples, gastrocnemius muscle, and jaws used in the experiments.

Basic Research—Biology

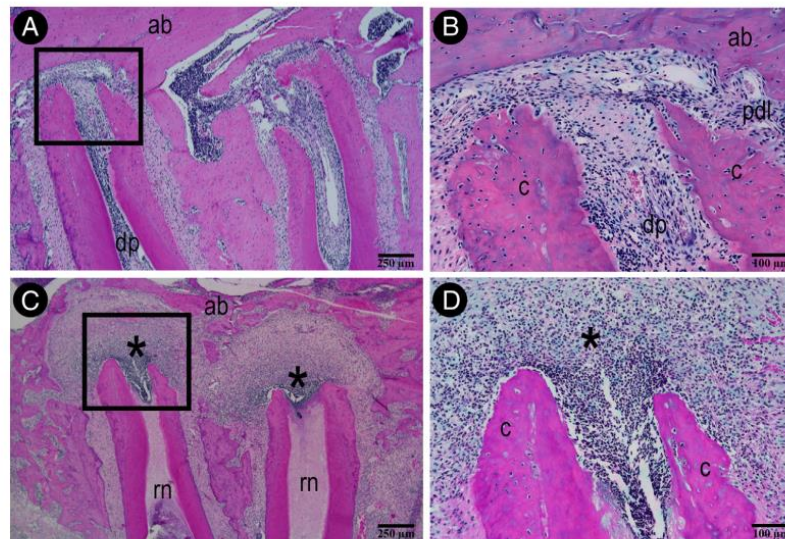


Figure 2. Photomicrography in light microscopy of histologic section of rat maxillae stained with hematoxylin-eosin in CN (A and B) and PL (C and D) groups. CN showed normal-appearing dental tissues. PL showed intense inflammatory infiltrate, predominantly mononucleate (*asterisk*). ab, alveolar bone; c, cement; dp, dental pulp; pdl, periodontal ligament; rn, remnants of pulp necrosis. Original magnification: (A and C), $\times 50$; (B and D), $\times 250$. Scale bars: (A and C), 250 μm ; (B and D), 100 μm .

analyzed by brightfield microscopy (Axio Lab A1; Carl Zeiss, TH, Oberkochen, Germany) to study the dental pulp and periapical region.

Immunohistochemistry for F4/80 in Muscle

The right gastrocnemius muscle was cryoprotected in 30% sucrose (overnight) at 4°C. Transversal histologic sections with 30- μm thickness were obtained in a cryostat device (CM1850UV; Leica, HE, Germany) and collected on histologic slides. The sections were washed in PBS (0.1 mol/L, pH 7.4; Sigma-Aldrich), and nonspecific binding sites were blocked with PBS containing 3% bovine albumin serum (Sigma-Aldrich) overnight at 4°C. Later, the muscle sections were incubated in a solution of Triton X-100 (0.3%; Sigma-Aldrich), normal donkey serum (Sigma-Aldrich), and rabbit polyclonal anti-F4-80 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) overnight at 4°C. Subsequently, the sections were incubated in solution with biotinylated secondary goat anti-rabbit antibody (Santa Cruz Biotechnology) for 2 hours at room temperature, rinsed in PBS, incubated in streptavidin conjugated with Cy3 (1:500; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) at room temperature for 1 hour, rinsed again in PBS, and coverslipped with buffered glycerol solution. The sections were imaged under a confocal laser scanning microscope (Leica TCS SP5 Confocal; Leica). For immunohistochemistry analyses, each image (32 per group) was acquired with $\times 40$ objective, and the cells that showed immunofluorescence for F4/80 (red fluorescence) were counted manually by using Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD) for the number of immunolabeled cells in relationship to the total number of cells per visual field.

Assessment of Content and Phosphorylation Status of JNK and IKK α/β

Samples from the gastrocnemius muscle were collected from 6 animals from each group. Tissue samples were prepared according to the

method described by Carvalho et al (21) and subjected to Western blotting for quantification of content and phosphorylation status of JNK and IKK α/β by using antibodies against p-IKK α/β , p-JNK, IKK α/β , and JNK (Santa Cruz Biotechnology Inc). Immunoreactive bands were detected by autoradiography using a chemiluminescent substrate system (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) according to the manufacturer's instructions. Quantitative analysis of the blots was conducted by using Scion Image software (Scion Image-Release Beta 3b; National Institutes of Health).

Serum HSP70 and LPS Concentrations

To determine the HSP70 and LPS serum concentrations, blood samples were collected ($n = 9$) from the inferior vena cava after the rats had fasted overnight for 8–12 hours. The blood samples were centrifuged immediately after collection at 1800g for 15 minutes at 4°C to obtain serum. For quantification of serum LPS concentration, samples were diluted 1/40 to 1/100 and heated for 10 minutes at 70°C. LPS was quantified by using a commercially available Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL) according to the manufacturer's protocol. Circulating HSP70 was assessed by using EKS-715 high-sensitivity HSP70 kit according to the manufacturer's instructions (Enzo Life Sciences, Lausen, Switzerland).

Glycemia, Insulinemia, and Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance Index

Blood samples were collected from the inferior vena cava to measure plasma glucose and insulin concentrations. After centrifugation, supernatant was collected and maintained at -80°C until use. Plasma samples from 9 animals per group were used for determination of glycemia by the oxidase glucose method (Enzymatic glucose; ANALISA Diagnóstica, Belo Horizonte, MG, Brazil) and of insulinemia by

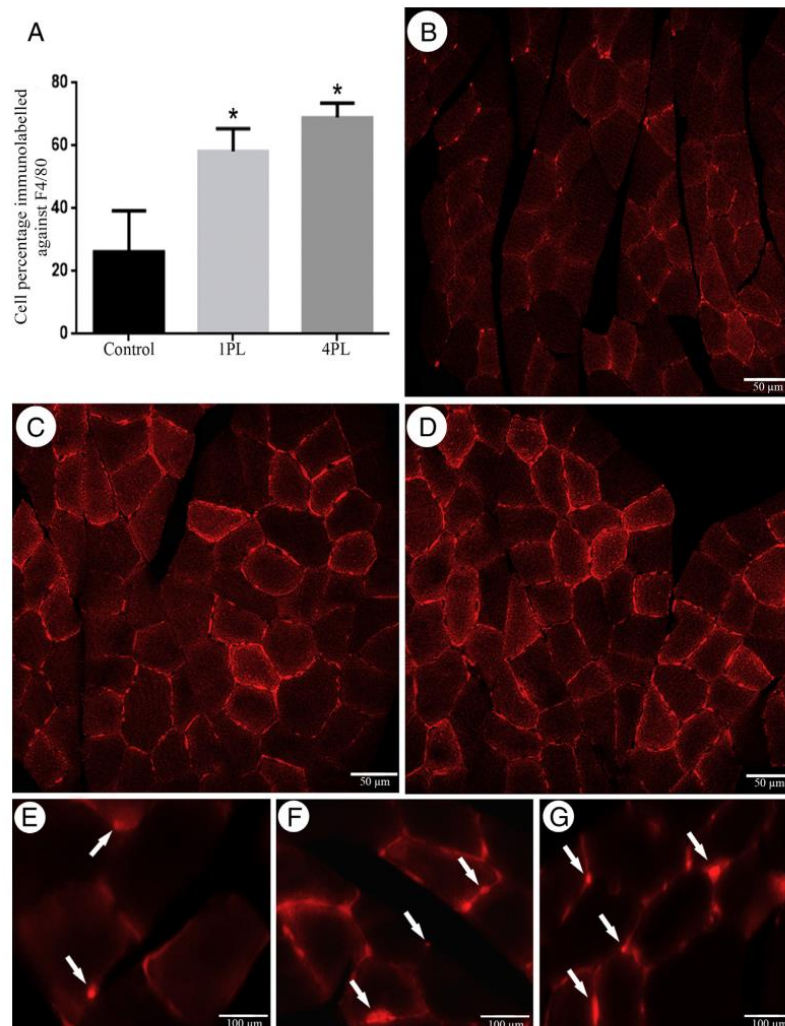


Figure 3. Immunofluorescence for F4/80 (red) in gastrocnemius muscle tissue from CN group, 1PL group, and 4PL group. (A) Percentage of immunolabeled cells for F4/80 in CN, 1PL, and 4PL groups. The cell photomicrographs, obtained from immunohistochemical analyses for F4/80 (red fluorescence) under confocal laser scanning microscope, represent the following groups: CN (B and E), 1PL (C and F), and 4PL (D and G) groups. Arrows indicate cells F4/80+ located around the muscular fibers. Values are presented as mean $\pm$ SEM ($n = 5$). * $P < .05$ compared with CN group.

radioimmunologic assay (Coat-A-Count; DPC Diagnostic Products, Los Angeles, CA). Insulin resistance was evaluated by homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) index, calculated by the formula: $\text{HOMA-IR} = \text{fasting glycemia (mmol/L)} \times \text{fasting insulinemia } (\mu\text{IU/mL}) / 22.5$ (22).

Statistical Analyses

The normality of the data set was verified for all analyses. Analysis of variance was performed, followed by Tukey post hoc test ($P < .05$). Data were expressed as the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM), and data analysis was performed with a statistical program (Graph Pad Prism version 6.0; GraphPad Software Inc, San Diego, CA).

Results

Assessment of Body Weight of the Rats

We found no difference in the body weights evaluated on the first, fifteenth, and thirtieth day after induction of PL among the groups.

Histologic Evaluation of the Periapical Tissues

In the CN group, the periapical tissue showed characteristics consistent with a normal aspect (Fig. 2A and B). In both PL groups we observed the formation of PL in teeth subjected to exposure of the pulp to the oral environment. The lesions showed osteolysis and were filled with inflammatory infiltrate, predominantly mononuclear (Fig. 2C and D).

Basic Research—Biology

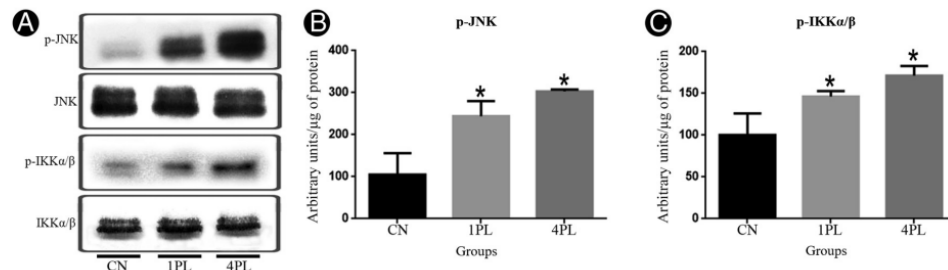


Figure 4. Evaluation of JNK and IKK α/β phosphorylation status in gastrocnemius muscle (GM). (A) Typical autoradiography: equal amounts of protein (185 μ g) were subjected to sodium dodecylsulfate–polyacrylamide gel electrophoresis; JNK and IKK α/β total content were used as controls. (B and C) Values of JNK and IKK α/β phosphorylation status expressed in arbitrary units are presented as mean $\pm$ SEM ($n = 6$), respectively. * $P < .05$ compared with CN group.

Immunohistochemical Analysis of F4/80

The immunohistochemical results revealed the presence of immunolabeled cells for F4/80 in control, 1PL, and 4PL groups (Fig. 3B–G). Increase in the number of immunolabeled cells for F4/80 around the fibers of gastrocnemius muscle in both the 1PL and 4PL groups (Fig. 3C, D, F, and G) were observed when compared with that in the CN group. We observed significant differences between CN and 1PL ($P < .05$) and between CN and 4PL ($P < .05$). However, no statistical difference was observed between the 1PL and 4PL groups (Fig. 3A).

Assessment of Content and Phosphorylation Status of JNK and IKK α/β

We observed an increase in JNK and IKK α/β phosphorylation status ($P < .05$) in the 1PL and 4PL groups compared with that in the CN group (Fig. 4A–C). We found no difference in these parameters between 1PL and 4PL groups.

Serum HSP70 and LPS Concentrations

We found higher levels of LPS and HSP70 in 1PL and 4PL groups compared with that in the CN group (Table 1). We found no difference in these parameters between 1PL and 4PL groups.

Glycemia, Insulinemia, and HOMA-IR Index

The glycemia, insulinemia, and HOMA-IR data are shown in Table 2. There are no differences in blood glucose and insulin levels between CN and PL groups. However, the HOMA-IR calculated from these values was significantly higher in 1PL and 4PL groups than in the CN group. We found no difference in these parameters between 1PL and 4PL groups.

Discussion

The present study demonstrates that rats with 1 or 4 teeth with PL showed increase in the number of infiltrating macrophages, IKK α/β and JNK phosphorylation status in the muscle tissue, and serum LPS and HSP70 levels, and insulin resistance and no changes in glycemia and insulinemia compared with the CN rats.

It was observed that 1PL and 4PL groups showed insulin resistance as demonstrated by the HOMA-IR index. These data are in agreement with previous studies that showed that rats with PL exhibit insulin resistance assessed both by HOMA-IR index and by insulin tolerance test after 30 days of exposure to PL (2–4). Studies have shown that macrophage contents in skeletal muscle of obese animals and humans are correlated with impairment in insulin sensitivity (12, 23). The present study demonstrates that 1PL and 4PL groups showed higher macrophage content in the muscle tissue compared with the CN group (Fig. 3). Recent study (24) showed that only 5 days of high-fat diet consumption can promote an increase in RNA expression of macrophage markers and a decrease in expression of glucose transporter type 4 in skeletal muscle in healthy lean men, probably because the high-fat diet leads to inflammatory processes in the muscle, which contributes to the development of insulin resistance by releasing proinflammatory cytokines. Moreover, Parsoturis et al (25) observed that increased macrophage infiltration in muscle tissue correlated with insulin resistance in patients with diabetes, regardless of body mass index. These data corroborate our results of increased macrophage infiltration in the skeletal muscle of rats with PL in the absence of obesity (Table 3), highlighting the key role of macrophages in insulin resistance etiology.

LPS and HSP70 play an active role in inflammation, which is closely related to development of insulin resistance. For this reason, we quantified the levels of serum LPS and HSP70 to verify the relationship of these mediators with insulin resistance, which was observed in previous studies performed in rats with PL. Our results show that the levels of serum LPS and HSP70 increased in the 1PL and 4PL groups compared with those in the control group (Table 1). Studies suggest that chronic elevation of circulating LPS levels has a key role in the pathogenesis of insulin resistance (26, 27). This is probably due to the interaction of LPS with TLR4, which results in activation of inflammatory pathways and negatively affects the insulin signal (27).

Recent study demonstrated that HSP gene expression is increased in periapical granulomas compared with that in healthy periodontal tissue (28). Thus, the results of the present study indicate that a local increase in HSP gene expression can result in increased concentration of this protein in the serum. Notably, studies showed increase in levels of

TABLE 1. Concentrations of Serum LPS and HSP70 in CN, 1PL, and 4PL Groups

	CN	1PL	4PL
LPS (endotoxin unit/mL)	0.40 $\pm$ 0.07	1.40 $\pm$ 0.39*	1.53 $\pm$ 0.30*
HSP70 (ng/mL)	0.28 $\pm$ 0.01	0.47 $\pm$ 0.06*	0.53 $\pm$ 0.05*

Values are presented as mean $\pm$ SEM ($n = 9$).

* $P < .05$ compared with CN group.

Basic Research—Biology

TABLE 2. Glycemia, Insulinemia, and HOMA-IR Index in CN, 1PL, and 4PL Groups

	CN	1PL	4PL
Glycemia (mmol/L)	6.94 ± 0.33	6.74 ± 0.14	6.77 ± 0.21
Insulinemia (μU/mL)	19.14 ± 6.35	29.21 ± 4.21	31.80 ± 3.12
HOMA-IR	5.42 ± 1.86	10.18 ± 0.77*	10.31 ± 0.97*

Values are presented as mean ± SEM (n = 9).

*P < .05 compared with CN group.

plasma HSP70 in patients with diabetes (29, 30) and a positive correlation of this marker with other chronic diseases (31). Furthermore, it has been demonstrated that HSP70 can activate TLR4, indicating a possible involvement of this protein in the development of insulin resistance (32). These data indicate that LPS and HSP70 have a fundamental role in the association between insulin resistance and PL.

To assess the molecular mechanisms involved in insulin resistance in PL, we evaluated the phosphorylation status of JNK and IKK in the rat muscle tissue. Our results demonstrate that the 1PL and 4PL groups showed higher phosphorylation of these proteins compared with the CN group. The findings of the present study are in agreement with studies that observed the relationship between insulin resistance and JNK and IKK activation (33, 34). Kaneto et al (35) demonstrated that treatment of diabetic rats with JNK inhibitors improved insulin sensitivity of the animals. Similarly, the studies of Yuan et al (36) and Hundal et al (37) showed that IKK inhibition by administration of salicylate improves insulin action in obese diabetic humans and rats, respectively. Therefore, because insulin resistance is related to local and systemic inflammatory processes, it is possible that the mechanisms involved in the development of insulin resistance in rats with PL involve a crosstalk between immunoinflammatory response in PL and the skeletal muscle tissue.

In the present study, rats with 1 and 4 teeth with PL were used to simulate the conditions observed in the population because epidemiologic studies performed in different populations demonstrated wide variation in the number of teeth with PL in the same person (38, 39). Recently, Cintra et al (10) evaluated whether apical periodontitis in a single tooth or in 4 teeth promotes changes in levels of inflammatory mediators in the serum and verified that levels of serum interleukin (IL)-6, IL-17, IL-23, and tumor necrosis-α increased only in rats with apical periodontitis in 4 teeth compared with those in control rats. However, a previous study showed that the presence of only 1 tooth with PL is enough to promote an increase in concentrations of plasma tumor necrosis factor-α (2). In our study, we also observed that only one focus of PL was able to promote an increase in the concentrations of serum HSP70 and LPS, which could induce systemic alterations related to increase in activation of inflammatory pathways.

This is the first study to demonstrate the existence of a crosstalk between PL and muscle tissue. Our results showed that 30 days of exposure to PL promoted macrophage infiltration, activation of inflammatory pathways in muscle tissue, and increased concentrations of serum HSP70 and LPS in rats. The present results suggest that oral inflammation may promote systemic disorders, resulting in alteration in concentrations of proinflammatory mediators in the serum and in the

metabolism of peripheral tissues such as muscle tissue, which has a key role in glucose homeostasis.

The present study improves the knowledge on the impact of oral inflammations on development of systemic alterations that can induce insulin resistance, thus contributing to the development of new therapeutic approaches.

Acknowledgments

The authors thank Shelly Favorito de Carvalho from Electron Microscopy Center (EMC) of the Institute of Biosciences of Botucatu, UNESP, for assistance in the capture of confocal microscopy images for this manuscript.

This study was supported by a grant (2014/17619-6) from the São Paulo Research Foundation (FAPESP), São Paulo, SP, Brazil.

The authors deny any conflicts of interest related to this study.

References

- López-López J, Jané-Salas E, Estrugo-Devesa A, et al. Periapical and endodontic status of type 2 diabetic patients in Catalonia, Spain: a cross-sectional study. *J Endod* 2011;37:598–601.
- Astolph RD, Curbete MM, Colombo NH, et al. Periapical lesions decrease insulin signal and cause insulin resistance. *J Endod* 2013;39:648–52.
- Astolph RD, Curbete MM, Chiba FY, et al. Periapical lesions decrease insulin signaling in rat skeletal muscle. *J Endod* 2015;41:1305–10.
- Pereira RF, de Oliveira da Mota MS, de Lima Coutinho Motta MS, et al. Periapical lesions decrease Akt serine phosphorylation and plasma membrane GLUT4 content in rat skeletal muscle. *Clin Oral Invest* 2016;20:1625–30.
- Wilcox G. Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev* 2005;26:19–39.
- Coope A, Torsoni AS, Velloso LA. Mechanisms in endocrinology: metabolic and inflammatory pathways on the pathogenesis of type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol* 2016;174:r175–87.
- Fouad AF, Acosta AW. Periapical lesion progression and cytokine expression in an LPS hyporesponsive model. *Int Endod J* 2001;34:506–13.
- Gomes MS, Blattner TC, Sant'Ana Filho M, et al. Can apical periodontitis modify systemic levels of inflammatory markers? a systematic review and meta-analysis. *J Endod* 2013;39:1205–17.
- Zhang H, Bain JL, Caskey CP, et al. Effects of gender on serum biomarkers of systemic inflammation coincident to experimentally-induced periapical lesions. *Arch Oral Biol* 2011;56:168–76.
- Cintra LT, Samuel RO, Azuma MM, et al. Multiple apical periodontitis influences serum levels of cytokines and nitric oxide. *J Endod* 2016;42:747–51.
- Heilbronn LK, Campbell LV. Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity. *Curr Pharm Des* 2008;14:1225–30.
- Fink LN, Costford SR, Lee YS, et al. Pro-inflammatory macrophages increase in skeletal muscle of high fat-fed mice and correlate with metabolic risk markers in humans. *Obesity (Silver Spring)* 2014;22:747–57.
- Lin H, Faunce DE, Stacey M, et al. The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific effector regulatory T cells in peripheral tolerance. *JEM* 2005;201:1615–25.
- Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, et al. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 2006;116:3015–25.
- Metzger Z. Macrophages in periapical lesions. *Endod Dent Traumatol* 2000;16:1–8.
- Narayanan LL, Vaishnavi C. Endodontic microbiology. *J Conserv Dent* 2010;13:233–9.
- Ran R, Lu A, Zhang L, et al. Hsp70 promotes TNF-mediated apoptosis by binding IKK gamma and impairing NF-kappa B survival signaling. *Genes Dev* 2004;18:1466–81.
- Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, et al. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependent pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med* 2000;6:435–42.

TABLE 3. Body Weight (g) of the CN and PL Groups of Rats

Groups	First day	Fifteenth day	Thirtieth day
CN	266.4 ± 2.08	336.1 ± 1.93	405.9 ± 2.13
1PL	266.9 ± 1.78	337.6 ± 1.63	408.1 ± 1.87
4PL	266.4 ± 1.81	336.4 ± 1.81	407.0 ± 1.89

Values are presented as mean ± SEM (n = 20).

Basic Research—Biology

19. Krause M, Heck TG, Bittencourt A, et al. The chaperone balance hypothesis: the importance of the extracellular to intracellular HSP70 ratio to inflammation-driven type 2 diabetes, the effect of exercise, and the implications for clinical management. *Mediators Inflamm* 2015;2015:249205.
20. Da Silva AV, Torres KR, Haemmerle CA, et al. The Edinger-Westphal nucleus II: hypothalamic afferents in the rat. *J Chem Neuroanat* 2013;54:5–19.
21. Carvalho CR, Brenelli SL, Silva AC, et al. Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. *Endocrinology* 1996;137:151–9.
22. Bonora E, Targher G, Alberiche M, et al. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. *Diabetes Care* 2000;23:57–63.
23. Varma V, Yao-Borengasser A, Rasouli N, et al. Muscle inflammatory response and insulin resistance: synergistic interaction between macrophages and fatty acids leads to impaired insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;296:E1300–10.
24. Boon MR, Bakker LE, Haks MC, et al. Short-term high-fat diet increases macrophage markers in skeletal muscle accompanied by impaired insulin signalling in healthy male subjects. *Clin Sci (Lond)* 2015;128:143–51.
25. Patsouris D, Cao JJ, Vial G, et al. Insulin resistance is associated with MCP1-mediated macrophage accumulation in skeletal muscle in mice and humans. *PLoS One* 2014; 9:e110653.
26. Watanabe K, Iizuka T, Adeleke A, et al. Involvement of toll-like receptor 4 in alveolar bone loss and glucose homeostasis in experimental periodontitis. *J Periodontol Res* 2011;46:21–30.
27. Liang H, Hussey SE, Sanchez-Avila A, et al. Effect of lipopolysaccharide on inflammation and insulin action in human muscle. *PLoS One* 2013;8:e63983.
28. Goodman SC, Letra A, Dorn S, et al. Expression of heat shock proteins in periapical granulomas. *J Endod* 2014;40:830–6.
29. Nakhjavani M, Morteza A, Khajeali L, et al. Increased serum HSP70 levels are associated with the duration of diabetes. *Cell Stress Chaperones* 2010;15:956–94.
30. Hunter-Lavin C, Hudson PR, Mukherjee S, et al. Folate supplementation reduces serum hsp70 levels in patients with type 2 diabetes. *Cell Stress Chaperones* 2004; 9:344–9.
31. Qu B, Jia Y, Liu Y, et al. The detection and role of heat shock protein 70 in various nondisease conditions and disease conditions: a literature review. *Cell Stress Chaperones* 2015;20:885–92.
32. Asea A, Rehli M, Kabingu E, et al. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* 2002;277: 15028–34.
33. Jiao P, Ma J, Feng B, et al. FFA-induced adipocyte inflammation and insulin resistance: involvement of ER stress and IKK β pathways. *Obesity (Silver Spring)* 2011; 19:483–91.
34. Pal M, Febbraio MA, Lancaster GI. The roles of c-Jun NH2-terminal kinases (JNKs) in obesity and insulin resistance. *J Physiol* 2016;594:267–79.
35. Kaneto H, Nakatani Y, Miyatsuka T, et al. Possible novel therapy for diabetes with cell-permeable JNK-inhibitory peptide. *Nat Med* 2004;10:1128–32.
36. Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, et al. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of I κ B β . *Science* 2001; 293:1673–7.
37. Hundal RS, Petersen KF, Mayerson AB, et al. Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 2002;109:1321–6.
38. Huuonen S, Suominen AL, Vehkalahhti MM. Prevalence of apical periodontitis in root filled teeth: findings from a nationwide survey in Finland. *Int Endod J* 2017; 50:229–36.
39. Marotta PS, Fontes TV, Armada L, et al. Type 2 diabetes mellitus and the prevalence of apical periodontitis and endodontic treatment in an adult Brazilian population. *J Endod* 2012;38:297–300.