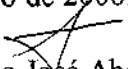


KAREN CRISTIANE HIGA

Este exemplar corresponde à versão final da
Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação Fisiopatologia
Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
UNICAMP, para obtenção do título de Mestre
em Fisiopatologia Médica, Área de
Concentração Medicina Experimental do(a)
aluno(a) **Karen Cristiane Higa**
Campinas, 31 de julho de 2006.


Prof(a). Dr(a). Mario José Abdalla Saad
Orientador(a)

**A INFLUÊNCIA DA PERIODONTITE NA VIA DE
SINALIZAÇÃO DA INSULINA EM MÚSCULO E FÍGADO
DE RATOS MACHOS WISTAR**

CAMPINAS

2006

**BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO
COLEÇÃO
UNICAMP**

KAREN CRISTIANE HIGA

**A INFLUÊNCIA DA PERIODONTITE NA VIA DE
SINALIZAÇÃO DA INSULINA EM MÚSCULO E FÍGADO
DE RATOS MACHOS WISTAR**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para a obtenção do título de
Mestre em Fisiopatologia Médica, área de concentração
em Medicina Experimental*

ORIENTADOR: PROF. DR. MÁRIO JOSÉ ABDALLA SAAD

CAMPINAS

2006

UNIDADE BC
Nº CHAMADA 7/UNICAMP
H533i
V _____ EX _____
TOMBO BC/ 70019
PROC. 16-PP0123-06
C _____
PREÇO 11.00
DATA 17/11/06
BIB-ID 391741

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

H533i

Higa, Karen Cristiane

A influência da periodontite na via de sinalização da insulina em músculo e fígado de ratos machos wistar / Karen Cristiane Higa. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : Mário José Abdalla Saad

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Periodontite . 2. Resistência a Insulina. 3. Doença periodontal. 4. Diabetes. I. Saad, Mário José Abdalla. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Periodontitis modulates insulin signaling, c-jun N-terminal kinase activity, IKK activity, and insulin receptor substrate-1 (ser 307) phosphorylation in muscle and liver of wistar rats

Keywords: • Periodontitis

- Insulin resistance
- Periodontal diseases
- Diabetes

Área de concentração: Medicina Experimental

Titulação: Mestrado em Fisiopatologia Médica

Banca examinadora: Prof Dr Mário José Abdalla Saad

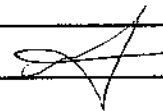
Profa. Dra. Carla Roberta Oliveira

Prof Dr Roger Frigério Castilho

Data da defesa: - 31-07-2006

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Mário José Abdalla Saad



MEMBROS:

- 1. Profa. Dra. Carla Roberta Oliveira**
- 2. Prof. Dr. Roger Frigério Castilho**

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 31/07/2006

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que abençoou cada etapa deste trabalho.

Agradeço ao prof. Dr. Mário José Abdalla Saad por sua orientação brilhante e pelo seu otimismo durante as dificuldades do trabalho.

À amiga Patrícia Prada pelo seu apoio em ensinar as técnicas do laboratório.

À amiga Rosa Mourão pelo seu apoio e dedicação no trabalho.

À amiga Érika Uthiama pelo seu apoio nas etapas iniciais do trabalho.

Ao prof. Dr. Spolidório, prof. Carlos Nassar e prof. Patrícia Nassar pelo seu auxílio na indução da periodontite.

Ao prof. Everardo Magalhães Carneiro pelo seu auxílio nas dosagens bioquímicas.

Ao apoio técnico dos amigos Luis Janieri, Márcio Alves da Cruz e Jósimo Pinheiro.

À todos os colegas e amigos do Laboratório de Biologia Molecular pela colaboração.

Às amigas do Centro Cultural Altavila pelo apoio e companheirismo.

Aos meus pais e a toda família que sempre me apoiaram e dedico esta tese como agradecimento por todo carinho.

Agradeço a CAPES pela bolsa de mestrado.

*“Tudo por Amor! Este é o caminho da santidade,
da felicidade.*

*Enfrenta com essas miras as tuas tarefas
intelectuais, as ocupações mais altas do espírito e
as coisas mais terra-a-terra, essas coisas, essas que
necessariamente temos de cumprir todos, e viverás
alegre e com paz.”*

(São Josemaria Escrivá)

	PÁG.
RESUMO	<i>xii</i>
ABSTRACT	<i>xv</i>
1- INTRODUÇÃO	17
2- OBJETIVOS	24
3-MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1- Animais	27
3.2- Materiais	27
3.3- Métodos	29
3.3.1- Indução da periodontite através da colocação da ligadura.....	29
3.3.2- Método da análise radiográfica.....	30
3.3.3- Avaliação da sensibilidade à insulina pelo ITT.....	30
3.3.4- Avaliação da produção de insulina basal e glicemia pelo oGTT.....	30
3.3.5- Nível tecidual e grau de fosforilação de proteínas envolvidas na sinalização da insulina.....	31
3.3.5.1- Procedimentos com animais para a extração das proteínas teciduais, após o estímulo insulínico in vivo.....	31
3.3.5.2- Imunoprecipitação.....	32
3.3.5.3- Immunoblotting.....	32
3.3.6- Análise estatística.....	33
4- RESULTADOS	34
4.1- Características gerais dos animais	35

4.2- Efeito da periodontite na sinalização insulínica em ratos.....	36
4.2.1- Sinalização da insulina no músculo esquelético de ratos controles e com periodontite.....	36
4.2.2- Sinalização da insulina no fígado de ratos controle e com periodontite.....	38
5- DISCUSSÃO.....	63
6- CONCLUSÃO.....	69
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
8- APÊNDICE.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	microlitro
μCi	microCuri
aa	aminoácido
ADP	adenosina difosfato
Akt/PKB	proteína serina/treonina quinase B
APS	proteína adaptadora com homologia a plectrina e a Src 2
ATP	adenosina trifosfato
BAD	membro da família Bcl-2
Cbl	Proto oncogene
DAF 16	Proteína associada ao receptor de insulina em <i>Caenorhabditis elegans</i>
DM 2	Diabetes Mellitus tipo 2
DNA	ácido desoxirribonucléico
Dock	Proteína envolvida na transmissão de sinal em neurônios dos olhos até o cérebro
DTT	ditiotriol
EDTA	ácido etilendinitrilotetracético
ERK	proteína quinase extracelular
PFK2	6-Fosfofrutose 2-quinase
GSK-3	Glicogênio Sintase Quinase-3
GLUT	transportador de glicose
^{125}I	iodo marcado radioativamente na posição 125
IGF-1	fator de crescimento 1 estimulado pela insulina

IL1- β	interleucina 1 β
IR	receptor de insulina
IRS-1	substrato 1 do receptor de insulina
IRS-2	substrato 2 do receptor de insulina
IRS-3	substrato 3 do receptor de insulina
IRS-4	substrato 4 do receptor de insulina
ITT	teste de tolerância à insulina
JNK	Quinase Jun N-terminal
K _{itt}	velocidade de desaparecimento da glicose
MAPK	proteína quinase ativadora da mitogênese
NF- $\kappa\beta$	fator nuclear $\kappa\beta$
oGTT	teste oral de tolerância à glicose
PI 3-k	fosfatidilinositol 3- quinase
PMSF	fenil-metil-sultunil-fluoreto
SDS-PAGE	gel de poliacrilamida e sódio dodecil-sulfato para eletroforese
SH2	segunda homologia ao Src
TNF α	fator de necrose tumoral
Tris	tri (hidroximetil)-aminometano

LISTA DE TABELAS

	<i>PÁG.</i>
Tabela 1-	36

	PÁG.
Figura 1 A.....	40
Figura 1 B.....	41
Figura 2 A.....	42
Figura 2 B.....	43
Figura 3 A.....	44
Figura 4 A.....	45
Figura 4 B.....	46
Figura 5 (A-B).....	47
Figura 5 (C-D).....	48
Figura 5 (E-F).....	49
Figura 5 (G-H).....	50
Figura 5 (I-J).....	51
Figura 5 (K).....	52
Figura 5(L).....	53
Figura 5 (M).....	54
Figura 6 (A-B).....	55
Figura 6 (C-D).....	56
Figura 6 (E-F).....	57
Figura 6 (G-H).....	58
Figura 6 (I-J).....	59
Figura 6 (K).....	60
Figura 6 (L).....	61
Figura 6 (M).....	62

RESUMO

Existem indicações de que há uma relação bidirecional entre diabetes mellitus e doença periodontal. Tanto o diabetes quanto a doença periodontal podem estimular a liberação crônica de citocinas pró-inflamatórias que têm um efeito deletério nos tecidos periodontais e na sensibilidade à insulina. Entretanto, não se investigou ainda o efeito da doença periodontal na via de sinalização insulínica.

Portanto, os objetivos do presente estudo são: avaliar o efeito da doença periodontal na via de transmissão do sinal insulínico em ratos Wistar machos.

Utilizou-se a extração de tecidos hepáticos e muscular após estimulação com insulina e imunoprecipitação seguida de “immunoblotting” com anticorpos anti receptor de insulina, anti-IRS-1, anti-IRS-2, antifosfotirosina, anti-p-Akt, anti-p-ERK 1/2, anti-p-JNK1/2, anti-I κ B- α e anti- fosfoserina 307 IRS-1 nos grupos controle e com periodontite. Os resultados mostraram que a concentração do receptor de insulina, do IRS-1, do IRS-2, da Akt, da JNK1/2, da ERK 1/2 estimulada e não estimulada pela insulina no fígado e músculo permaneceram inalteradas nos dois grupos.

No músculo, os animais com periodontite estimulados com insulina sofreram uma redução de 15 $\pm$ 33% na fosforilação em tirosina do receptor de insulina, de 55 $\pm$ 3% na fosforilação em tirosina do IRS-1, de 48 $\pm$ 1,5% na fosforilação em tirosina do IRS-2, de 34 $\pm$ 2,8% na fosforilação em serina da Akt e de 20 $\pm$ 1% na fosforilação em tirosina da ERK1/2 ($p < 0,05$). Além disso, nos ratos com periodontite houve um aumento de 40 $\pm$ 0,4% na fosforilação em tirosina da JNK 1/2, de 60 $\pm$ 5,4% na fosforilação em serina 307 do IRS-1 e a expressão do I κ B- α foi reduzida em 70 $\pm$ 4,2% ($p < 0,05$).

No fígado, os animais com periodontite estimulados com insulina sofreram uma redução de 62 $\pm$ 2% na fosforilação em tirosina do receptor de insulina, de 45 $\pm$ 3,8% na fosforilação em tirosina do IRS-1, de 55 $\pm$ 0,5% na fosforilação em tirosina do IRS-2, de 31 $\pm$ 3% na fosforilação em serina da Akt e de 22 $\pm$ 4% na fosforilação em tirosina da ERK1/2 ($p < 0,05$). Além disso, nos ratos com periodontite houve um aumento de 50 $\pm$ 0,5% na fosforilação em tirosina da JNK 1/2, de 40 $\pm$ 4% na fosforilação em serina 307 do IRS-1 e a expressão do I κ B- α foi reduzida em 55 $\pm$ 4,2% ($p < 0,05$).

Além disso, ao realizar o teste de tolerância a glicose (ITT), o Kitt dos ratos com periodontite apresentaram valores menores como de $2,17 \pm 0,38$ em relação aos controles $4,88 \pm 0,56$. No teste oral de tolerância a glicose (oGTT) a área sobre a curva da glicemia dos ratos com periodontite foi 18,7% maior em relação aos controles e a área sobre a curva da insulinemia dos ratos com periodontite foi 43,4% maior em relação aos controles. Tais resultados sugerem que alterações na via de sinalização da insulina no fígado e no músculo, podem estar envolvidas na resistência a insulina apresentada nesse modelo animal.

ABSTRACT

Traditional thinking/paradigms have maintained that periodontitis is an oral disease and that the tissue destructive response remains localized within the periodontium, limiting effects of the disease to oral tissues supporting the teeth. Recent studies have indicated that periodontitis may produce any number of alterations in systemic health and in the present study we investigated the pathophysiological relationships between periodontitis and insulin resistance. However, the exact molecular mechanism is unknown. We have examined the levels and the tyrosine phosphorylation status of insulin receptor (IR), IRS-1, IRS-2, ERK1/2, JNK1/2, the serine phosphorylation status of Akt, IRS-1 and the expression of $I\kappa\beta$ - α , in liver and muscle of rats with periodontitis by immunoblotting with specific antibodies.

The results show that the levels of the insulin receptor, IRS-1, IRS-2, Akt, JNK1/2, ERK 1/2 with and without insulin stimulation remain unchanged in both tissues.

In the muscle, animals with periodontitis, the insulin stimulated IR tyrosine phosphorylation was decreased to $15\pm 33\%$, the IRS-1 tyrosine phosphorylation was decreased to $55\pm 3\%$, the IRS-2 tyrosine phosphorylation was decreased to $48\pm 1,5\%$, the Akt serine phosphorylation was decreased to $34\pm 2,8\%$, the ERK1/2 tyrosine phosphorylation was decreased to $20\pm 1\%$ ($p < 0,05$). In addition, rats with periodontitis had an increase of $40\pm 0,4\%$ in tyrosine phosphorylation of JNK 1/2, $60\pm 5,4\%$ in serine phosphorylation of IRS-1 and the expression of $I\kappa\beta$ - α was reduced in $70\pm 4,2\%$ ($p < 0,05$).

In the liver, animals with periodontitis insulin stimulated had a decrease of $62\pm 2\%$ in tyrosine phosphorylation of insulin receptor, the IRS-1 tyrosine phosphorylation was decreased to $45\pm 3,8\%$, the IRS-2 tyrosine phosphorylation was decreased to $55\pm 0,5\%$, the Akt serine phosphorylation was decreased to $31\pm 3\%$, the ERK1/2 tyrosine phosphorylation was decreased to $22\pm 4\%$ ($p < 0,05$). In addition, rats with periodontitis had an increase of $50\pm 0,5\%$ in tyrosine phosphorylation of JNK 1/2, $40\pm 4\%$ in serine phosphorylation of IRS-1 and the expression of $I\kappa\beta$ - α was reduced in $55\pm 4,2\%$ ($p < 0,05$).

In addition, the thirty minute insulin tolerance test (ITT), the rats with periodontitis had a decrease of 50% in the value of K_{ITT} . In the oral glucose tolerance test (oGTT) the area under the glucose curve was 18,7% higher in rats with periodontitis and the area under the insulin curve was 43,4% higher in rats with periodontitis. These data suggest that periodontitis impairs insulin signaling in muscle and liver of rats Wistar.

1- INTRODUÇÃO

O sistema de sinalização da insulina tem um papel importante em vários processos fisiológicos como o metabolismo de carboidratos e lipídeos, a reprodução, o crescimento celular e a sobrevivência celular (WHITE 2003). Em 1924 o conceito de resistência à insulina foi formulado em relação a pacientes com Diabetes mellitus. Só após 1950, foi proposto que várias anormalidades metabólicas, como estresse, injúrias ou infecções estavam relacionadas a perda tecidual de sensibilidade à insulina (CARLSON, 2003). A resistência à insulina é definida como o estado patológico no qual células alvo falham em responder a níveis normais de insulina circulante. (KAHN e FLIER, 2000; MATTHAEI et al., 2000; CARLSON, 2003). A infecção, o trauma físico ou câncer pode desencadear a resistência à insulina pela mediação de citocinas inflamatórias (LODDICK e ROTHWELL, 1999; HOTAMISLIGIL et al. , 1996; YOSHIKAWA et al. , 1999). Outra causa da resistência à insulina pode ser a variação genética que é exacerbada pela idade e/ou obesidade sendo que este estado patológico contribui a múltiplas desordens, como a intolerância a glicose, hiperlipidemia, hipertensão, mortalidade cardiovascular, infertilidade, síndrome do ovário policístico e diabetes tipo 2 (KAHN e FLIER, 2000). Na resistência à insulina as células β pancreáticas podem secretar insulina suficiente para compensar a sensibilidade reduzida a insulina. Se houver falência do pâncreas, o indivíduo poderá desenvolver Diabetes tipo 2 (KAHN, 1998).

A periodontite é um tipo de inflamação bucal, sendo uma infecção crônica causada por bactérias Gram negativas. A doença caracteriza-se por gengivite, destruição do tecido periodontal, perda do osso alveolar e, em casos severos, uma exfoliação dos dentes. Sabe-se que o principal patógeno periodontal, *Porphyromonas gingivalis*, pertence a flora microbiana. A infecção libera endotoxinas que ativam a cascata pró-inflamatória. As citocinas liberadas pela inflamação levam à destruição dos tecidos periodontais e à reabsorção óssea. Estudos recentes têm indicado que a periodontite pode produzir alterações sistêmicas no organismo. Há associações entre a periodontite e o infarto cerebral, as doenças coronarianas, a pneumonia e o diabetes (IACOPINO e CUTLER, 2000). Sendo assim, a periodontite pode causar alterações na via de sinalização da insulina por ativar a cascata inflamatória.

O controle da glicemia é governado pelo balanço entre o consumo e o fornecimento de glicose. O fornecimento é feito pela absorção de glicose no intestino e por sua produção pelo fígado. O consumo é feito através da captação pelos tecidos periféricos. A insulina aumenta a captação de glicose no músculo e inibe a produção hepática de glicose. Este hormônio polipeptídico, anabólico é produzido por células β do pâncreas. O seu efeito predomina no fígado e no músculo. Além de ter como efeitos imediatos o aumento da captação de glicose e da síntese protéica, bloqueia a neoglicogênese, a glicogenólise, a lipólise, a proteólise e previne a apoptose. Os efeitos tardios levam a expressão de genes relacionados a síntese protéica, a proliferação e a diferenciação celular. (KAHN et al., 1993)

A insulina inicia seus efeitos biológicos ligando-se ao receptor de membrana específico (FREYCHET et al., 1971; CUATRECASAS, 1972; KAHN e CRETIAZ, 1985). A concentração do receptor pode variar dependendo do tecido, e está distribuído por todo organismo. Os eritrócitos possuem em torno de 40 receptores, nos hepatócitos e adipócitos há mais de 20000 receptores (KAHN, 1985). O receptor de insulina é uma glicoproteína transmembrana composta por duas subunidades α (com peso molecular de 135 kDa cada uma) e duas subunidades β (com peso molecular de 95 kDa cada uma) ligadas entre si por pontes dissulfeto formando a estrutura heterotetramérica β - α - α - β (WHITE, 1998). A subunidade α é extracelular, possui o sítio de ligação da insulina na porção amino terminal e apresenta regiões ricas em resíduos de cisteína que participam da formação das pontes dissulfeto entre as subunidades. A subunidade β é uma cadeia peptídica transmembrana sendo a responsável pela transmissão do sinal para proteínas intra-celulares (WHITE, 1998).

Quando a insulina se liga à subunidade α do receptor, a subunidade β começa a se autofosforilar em múltiplos resíduos de Tirosina (1158,1162,1163) (EBINA et al., 1985), tornando-se capaz de fosforilar outros substratos em resíduos de Tirosina (KASUGA et al., 1982). Sabe-se que previamente à ligação do hormônio, a subunidade α exerce um efeito negativo sobre a atividade quinase do receptor, o qual é suprimido pelas alterações conformacionais da subunidade α com a ligação da insulina. A

subunidade β é constituída por 402 aminoácidos e contém quatro regiões relacionadas as suas ações: região justamembranar, importante na ligação com os substratos e na internalização do receptor (CARPENTIER et al., 1993); a região catalítica, que contém o sítio de ligação do ATP; a região da autofosforilação em Tirosina e a região COOH-terminal, onde se encontram as maiores diferenças entre os receptores de insulina e os do “Insulin like growth factor-1” (IGF-1), e por este motivo, tem sido implicada como responsável pela diferenciação entre os efeitos metabólicos e de crescimento da insulina (TAKATA et al., 1988). Esta região contém dois sítios de fosforilação em Tirosina adicionais, bem como locais de fosforilação em Serina e Treonina. A região GLY-X-GLY-X-X-GLY, onde X pode ser qualquer aa, que forma a sequência responsável pela ligação com o ATP. Além desses sítios de fosforilação há outros sítios no mesmo receptor que atuam inibindo a transmissão do sinal insulínico. Como a fosforilação em Serina e Treonina no receptor (VAN OBBERGHEN, 1994). O receptor de insulina ativado induz a fosforilação em Tirosina de uma série de substratos importantes incluindo os membros da família IRS, “insulin receptor substrates”, ou substratos do receptor da insulina. Há quatro isoformas: IRS-1, IRS-2, IRS-3 e IRS-4. Há outros substratos do IR, como as proteínas GAB-1, GAB-2, SHC, CBL, APS, SH2B, DOCK 1 e DOCK 2 (WHITE, 2003).

As proteínas IRSs são as proteínas estruturalmente caracterizadas por possuírem um domínio NH₂-terminal homólogo à plecstrina (domínio PH ou pleckstrin homology) envolvido no direcionamento das IRS à membrana celular e as proximidades do IR. O domínio PH se liga a grupos fosfatidilinosítídeos específicos eletricamente carregados na membrana celular próximos do receptor de insulina. Outro domínio é o PTB, domínio de ligação a fosfoTirosina, que é essencial para o reconhecimento da sequência NPXpY (Asparagina -Prolina - qualquer aa - fosfoTirosina) na subunidade β do receptor de insulina. Assim a o domínio PH e PTB contribuem para a interação da IRS com o IR. Durante a interação com o receptor de insulina, a proteína IRS é fosforilada em vários de seus resíduos de Tirosina e contidas na parte COOH terminal. Os sítios do IRS nos quais há fosforilação em Tirosina estão inseridos em sequências repetitivas YMXM e YXXM (Y: Tirosina, M : metionina, X : qualquer aa). Assim, quando fosforiladas criam sítios de ligação para proteínas com domínios SH2 (SAAD, 1994).

Camundongos homozigotos para o IRS-2 tiveram um déficit de crescimento e resistência à insulina. (ARAKI et al., 1994; TAMEMOTO et al., 1994).

Em um SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio) de fígado de camundongos com deficiência do gene IRS-1 verificou-se uma proteína de 190kDa que parecia compensar a deficiência do IRS-1; esta proteína foi denominada IRS-2. Em 1995, o IRS-2 foi clonado (SUN et al., 1995).

Por outro lado, o papel do IRS-2 em camundongo está relacionado com o crescimento cerebral, o controle de peso corpóreo, a homeostase da glicose e a fertilidade em fêmeas (SUN et al., 1995). Sabe-se que o IRS-3, 60 kDa, está relacionado ao tecido adiposo (LAVAN et al., 1997). Estudos indicam que o IRS-4, 160 kDa, está presente em células renais embrionárias humanas (HEK) (FANTIN et al., 1998). Assim, as IRS têm funções distintas quanto a homeostase glicêmica sendo o IRS-1 e IRS-2 mais importantes para os efeitos metabólicos da insulina.

O clamp-euglicêmico em animais com deficiência de IRS-1 e de IRS-2 indicou que o transporte de glicose estava prejudicado no músculo e no tecido adiposo em animais deficientes em IRS-1 e no fígado em animais deficientes em IRS-2 (PREVIS, 2000; ARAKI et al., 1994; TAMEMOTO et al., 1994; KIDO et al., 2000). Assim, IRS-1 e IRS-2 modulam os efeitos metabólicos dependentes da insulina, conforme os tecidos específicos.

Após a estimulação com insulina as proteínas IRS e shc são fosforiladas em resíduos de Tirosina (WHITE, 2002). Assim, há duas vias específicas de sinalização que são ativadas e influenciam-se mutuamente. Uma delas é a cascata p 42/p44 MAPK. Esta cascata tem início com a ativação da Ras pela Shc ou pelas IRSs ativadas, levando à estimulação sequencial das proteínas quinases citoplasmáticas Raf-1, MEK e p42/p44 MAPK (ERK 1/2, quinases reguladoras da sinalização extracelular). Esta cascata termina por fosforilar fatores de transcrição nucleares que modulam a expressão de genes relacionados ao crescimento, à proliferação e à diferenciação celular (DAVIS, 1994; L'ALLEMAIN, 1994). Outra cascata é conhecida como a via da PI3-quinase / PKB (fosfatidilinositol 3-quinase/ proteína quinase B) responsável pelo controle de transporte de

glicose, glicólise, síntese de glicogênio, síntese protéica, inibição por apoptose e crescimento celular (SHEPHERD et al., 1998).

Em estudo *in vivo* em culturas de células e em tecidos animais, o IRS-1 e o IRS-2 fosforilados associam-se à enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase) ativando-a (FOLLI et al., 1992). A enzima PI3-K possui duas subunidades uma catalítica de 110 kDa e outra regulatória de 85 kDa que contém duas porções SH2 e uma SH3 que tem uma afinidade as fosfoTirosinas (CARPENTER e CANTLEY, 1990). A subunidade catalítica tem duas funções, uma delas é a atividade catalítica quinase que converte PI (4, 5)P₂, um inositol fosfolipídio na membrana plasmática em PI (3,4,5) trifosfato e PI (3,4) bi-fosfato – PIP₂, que recruta a Akt e PDK 1 para a membrana plasmática onde o PDK1 ativa a Akt. Outra função é de exercer uma atividade Serina – quinase capaz de fosforilar p 85 e IRS-1 em resíduos de Serina podendo exercer o papel modulador negativo na sinalização da insulina (TANTI et al., 1994). Quando a Akt é fosforilada no resíduo em Treonina 308 e Serina 473 se torna ativa, sendo capaz de fosforilar seus substratos celulares (ALESSI et al., 1996).

Estudos têm demonstrado uma possível associação entre a ativação da Akt e a estimulação da translocação de GLUT 4 (transportador de glicose 4) dos estoques intracelulares para a superfície celular (TANTI et al., 1997; WANG et al., 1999). A Akt também promove a síntese de glicogênio ao inibir a GSK-3 (Glicogênio sintase quinase –3) (ALESSI et al., 1996; COFFER et al. 1998). Outro substrato da Akt é a PFK 2 (6 –fosfofrutose 2 – quinase) e a fosforilação da PFK 2 estimula a glicólise (DEPREZ et al., 1997). A FOXO 1 é fosforilada pela Akt e acumulada no citosol. Esta proteína inibe a gliconeogênese hepática e a diferenciação dos adipócitos, enquanto promove a função da célula β pancreática (NAKAE et al., 2003; KITAMURA et al., 2002; PUIGSERVER et al., 2003). A ativação da Akt fosforila o substrato BAD e induz um forte sinal anti-apoptótico, promovendo a sobrevivência celular (ATALIOTIS e MERCOLA, 1997). Outro estudo mostrou que a Akt pode regular o tônus vasomotor pois a eNOS é estimulada pela Akt e produz NO no endotélio (LUO et al., 2000).

Geralmente, a resistência à insulina é uma consequência do sinal de sinalização desregulado que pode ter várias causas: a perda da especificidade ou a degradação de elementos da via da insulina (SUN et al., 1999); a elevada atividade ou expressão de proteínas ou fosfatases lipídicas, como a PTP1B, SHIP2 e pTen, diretamente inibe a sinalização da insulina (ISHIHARA et al., 1999; CLEMENT et al., 2001). Modificações covalentes das proteínas IRS por fosforilação em Serina estão implicadas na resistência à insulina associada com a obesidade e infecções. A via da inflamação pode causar uma modulação negativa na via de sinalização da insulina. O TNF α ao se ligar ao seu receptor desencadeia a ativação da cascata enzimática. Os receptores de TNF podem levar a 2 tipos de vias de transdução de sinal. A primeira via induz à apoptose e a segunda via leva ao recrutamento das proteínas TRAFs. Estas levam à ativação de fatores de transcrição, tais como NF- κ B e JNK (Jun N terminal quinase) que promovem a sobrevivência celular e a diferenciação celular. (DEMPSEY et al., 2003).

A JNK ativada (p-JNK) em camundongos queimados, promoveu a fosforilação da IRS-1 em Ser-307, localizada no domínio PTB, inibindo a interação entre o IRS-1 e o receptor de insulina, inativando esta enzima na cascata de sinalização de insulina. A p-JNK tem o peso molecular de 46-54 kDa. (ZHANG Q. et al., 2005).

O NF- κ B é uma enzima envolvida em funções como a sobrevivência celular, a inflamação e as respostas imunes inatas e adaptativas. O complexo IK β -NF- κ B é fosforilado e ubiquitinado. Com a degradação do IK β , o NF- κ B migra para o núcleo ativando a transcrição de genes e de proteínas inflamatórias (DEMPSEY et al., 2003). Assim, quando a via de sinalização da inflamação é ativada ocorre um decréscimo da expressão de IK β - α com peso molecular de 35-37 kDa.

Assim, uma inflamação crônica localizada como a periodontite pode ter efeitos sistêmicos, causando resistência à insulina, ou seja, modulando negativamente a via de sinalização da insulina.

2- OBJETIVOS

O objetivo deste estudo é:

Avaliar o efeito da doença periodontal na sensibilidade à insulina na modulação das proteínas da via de sinalização da insulina como o IR, IRS-1, IRS-2, Akt, ERK e a ativação da JNK e da IKK em fígado e músculo de ratos.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Animais

Todos os experimentos envolvendo animais estavam de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentos com Animais (COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade de Campinas. Os ratos são acondicionados em ambiente mantido a 25°C, com ciclos escuro - claro fixos (12/12 horas), recebendo água potável e dieta ad libitum.

São utilizados ratos Wistar machos com 6 semanas de idade, fornecidos pelo Biotério Central da Unicamp. Os animais são separados em: grupo controle estimulado e não estimulado com insulina e o grupo que receberá indução da doença periodontal estimulado e não estimulado com insulina.

3.2- Materiais

São utilizados reagentes e aparelhos para eletroforese em dodecil sulfato de sódio e gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) adquiridos da Bio-rad (Richmond, CA, USA).

Metano hidroximetilamina (TRIS), fenilmetilsulfonilfluoreto (PSMF), aprotinina, ditioneitol (DTT), triton X-100, tween 20 e glicerol são adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo). A proteína A com iodo radioativo (¹²⁵I) é adquirida da Amersham (Amersham, UK) e a proteína A sepharose 6 MB é adquirida da Pharmacia (Uppsala, Suécia). A membrana de nitrocelulose (Hybond ECL, 0.45 µm) é obtida da Amersham (Aylesbury, UK). A insulina regular humana (Humulin R) utilizada é da Biobrás (BH, Brasil). Os anticorpos anti IR, IRS-1 e IRS-2, anti-ERK1/2, anti-JNK1/2, anti-fosfotirosina, anti-p ERK1/2, anti-p-JNK 1/2, anti-IκB são adquiridos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) e o anticorpo AKT/PKB, anti-fosfoserina Akt e anti-serina 307 IRS-1 da Upstate Biotechnology (Lake Placid, N. Y., USA).

As soluções que são utilizadas são descritas a seguir:

Tampão de extração A (extrato total): é utilizado para extração das proteínas celulares dos tecidos que são estudados. Contém: trisma base pH 7,5 (hidroximetil amino metano) a 100 mM, SDS (dodecil-sulfato de sódio) a 10% EDTA (ácido etileno-diamino tetracético) a 10 mM, fluoreto de sódio a 100 mM, pirofosfato de sódio a 100 mM e ortovanadato de sódio a 10 mM.

Tampão de Laemmli (5X): é utilizado para estocar o material extraído e para sua posterior aplicação no gel de poliacrilamida para eletroforese de sódio dodecil-sulfato (SDS-PAGE) a 6%. Contém: azul de bromofenol a 0,1%, fosfato de sódio a 1M pH 7,0, glicerol a 50%, SDS a 10%.

Solução tampão de extração B, para imunoprecipitação: para extração de proteínas, para imunoprecipitação dos tecidos estudados. Contém: trisma base a 100 mM, EDTA a 10 mM, pirofosfato de sódio a 10 mM, fluoreto de sódio a 100 mM, ortovanadato de sódio a 10 mM, PMSF a 2 mM (diluído em álcool etílico), triton 1% e 0,1 mg/mL de aprotinina. Esta solução é mantida 4°C. O ortovanadato, PMSF e a aprotinina são acrescentados no momento do uso.

Solução tampão para a lavagem do imunoprecipitado: contém: trisma base a 100 EDTA a 10 mM, ortovanadato de sódio a 2 mM, triton 1% .

Solução tampão utilizada na eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE): contém: trisma base a 200 mM, glicina a 1,52 M, EDTA a 7,18 mM, SDS a 0,4%. Para uso a solução é diluída 1:4.

Solução tampão para transferência: utilizada para transferência das proteínas separadas no SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose. Contém: trisma base a 25 mM, glicina a 192 mM, metanol a 20% e SDS a 0,02% para facilitar a eluição de proteínas de alto peso molecular.

Solução tampão para SDS-PAGE , gel de resolução (resolving): utilizada para a manufatura do SDS-PAGE, gel de resolução, em tampão composto de EDTA a 4 mM, SDS a 2%, trisma base a 750 mM, com pH ajustado para 8,9 com ácido clorídrico.

Solução tampão para SDS-PAGE, gel de empilhamento (stacking): utilizada na confecção do SDS-PAGE, gel de empilhamento das proteínas. Contém: EDTA a 4mM, SDS a 2%, trisma base a 50 mM, com pH ajustado para 6,7 com ácido fosfórico.

Solução basal: solução básica utilizada para o manuseio da membrana de nitrocelulose após transferência das proteínas. Contém: cloreto de sódio 150 mM, trisma base 10 mM, Tween 20 a 0,02%.

Solução bloqueadora: utilizada para incubar a membrana de nitrocelulose logo após a transferência. Contém 5% de leite em pó desnatado (Molico) e azida sódica a 0,02%, dissolvidos em solução basal.

Solução para anticorpos: solução na qual se diluem os anticorpos específicos. Contém 0,3% de leite em pó desnatado e azida sódica a 0,02%, diluídos em solução basal.

Solução com proteína A marcada com ^{125}I : permite a visualização das bandas em autoradiografia, contém 0,1% de leite desnatado, dissolvida em solução basal com 2 μCi de proteína A ^{125}I .

3.3- Métodos

3.3.1- Indução da periodontite através da colocação da ligadura

Os ratos foram anestesiados com ketamina e diazepam, nas respectivas dosagens de 0,8 mL/100g e 0,4 mL/100g de peso corpóreo, via intramuscular. Após a anestesia, os animais são posicionados em uma mesa operatória, realizando a abertura da cavidade bucal. Em seguida, como auxílio de uma sonda exploradora nº 5 , foi realizado o afastamento temporário entre o primeiro e o segundo molares inferiores esquerdos, onde realizou-se a colocação da ligadura (um fio de algodão de cor preta, nº24, marca Corrente) com o auxílio de uma pinça clínica adaptada, atuando assim como um irritante gengival que favorece o acúmulo de biofilme bacteriano. (Nassar *et al.*, 2003).

3.3.2- Método para análise radiográfica

Após o sacrifício dos animais e a dissecação das hemimandíbulas, foram realizadas as tomadas radiográficas com o uso de um aparelho de R-X da marca Dabi-Atlante, modelo Spectro com 70 Kvp e 8 mA, combinado com a utilização do sistema radiográfico digital Sensy-A-Ray 3.11, mantendo-se uma distância foco/filme de 50 cm e tempo de exposição de 0,3 s. As imagens digitais foram analisadas em três medidas no programa Sion, tendo sido retirada uma média entre elas através de uma medida linear que percorria a distância da junção cimento-esmalte até a crista óssea alveolar do lado mesial do primeiro molar inferior do rato com as medições em milímetros.

3.3.3- Avaliação da sensibilidade à insulina pelo ITT

O teste de tolerância à insulina (ITT) foi realizado após jejum de 6 horas para avaliar a sensibilidade periférica à insulina no animal intacto. Foi administrada insulina cristalina (1,5U/kg, i.p.) e o sangue foi coletado pela ponta da cauda nos tempos: 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos. A glicemia foi avaliada através de fitas reativas medidas em glicosímetro.

3.3.4- Avaliação da produção de insulina basal e glicemia pelo o GTT

O teste oral de tolerância à glicose o GTT foi realizado após jejum de 12 horas para avaliar a produção de insulina basal e glicemia. Primeiramente os animais foram anestesiados com 250µL de Diazepan e 250µL de Ketamina via intra-peritoneal. Em seguida, os ratos receberam uma solução oral de 25% de glicose (1,75 g/ kg peso corpóreo) e o sangue foi coletado pela ponta da cauda nos tempos: 0, 15, 30, 60, 90 e 120 min para determinação da concentração de insulina e glicemia. A glicemia foi avaliada através de fitas reativas medidas em glicosímetro. A insulinemia foi determinada por radioimunoensaio.

3.3.5- Nível tecidual e grau de fosforilação de proteínas envolvidas na sinalização da insulina

3.3.5.1- Procedimentos com animais para a extração das proteínas teciduais, após estímulo insulínico in vivo

Após 28 dias da indução da periodontite, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com 0,5 mL de thiopental sódico (50mg/kg de peso corpóreo) e utilizados após a boliação do reflexo corneano e retirada da pata à dor.

A veia porta foi exposta por laparotomia mediana e a incisão ampliada para expor a musculatura da pata traseira, afim de extrair o músculo gastrocnêmio. No grupo sem estimulação de insulina foi injetado na veia porta 400µL de solução salina 0,9% e no grupo com estimulação de insulina foi injetada solução salina, contendo 200µL de salina regular e 200µL de insulina.

A fosforilação máxima do IRS-1, após a infusão com insulina na veia porta, deu-se entre 30 e 60 segundos, no fígado, e entre 1 e 4 minutos no músculo.(SAAD et al., 1992).

Aos 30 segundos da injeção, foi retirado um fragmento do fígado com cerca de 1 cm de diâmetro. Noventa segundos após a injeção, houve a extração do fragmento de músculo gastrocnêmio com cerca de 0,5cm de diâmetro. Cada fragmento foi imediatamente colocado no tampão de extração A, na proporção de 5 partes de tampão para 1 de tecido, houve a homogenização com o “polytron”, as amostras recebem triton e foram mantidas em gelo.

O material extraído e homogeneizado, foi mantido em gelo para o transporte, centrifugado a 11000 rpm por 20 minutos, a 4°C, para remoção do material insolúvel, e sobrenadante foi estocado em tampão Laemmli, contendo 200mM de DTT em uma proporção de 5:1 (uma parte de Laemmli para quatro de material extraído). Outra pequena porção do sobrenadante foi utilizada para quantificação da concentração proteica de cada amostra, através do método de Biureto.

3.3.5.2- Imunoprecipitação

A imunoprecipitação é uma técnica sensível, muito usada para mensurar proteínas associadas. Ela permite uma detecção mais precisa das proteínas, pois diminui a interferência com outras proteínas. Como a técnica é muito manual, pode ser passível de erros pelo laboratorista tendo assim uma baixa reprodutibilidade. Os tecidos estudados foram extraídos e homogenizados no tampão de extração B, em banho de gelo e mantidos nesta temperatura durante todo o processo. Após a centrifugação por 20 minutos, a 11.000 rpm a 4°C, foi usado o sobrenadante para imunoprecipitação com anticorpos anti-IR, anti-IRS-1 e anti-IRS-2. Os volumes das amostras foram normalizados por concentração proteica e o volume do anticorpo aplicado foi fixo (10 µL/amostra).

As amostras foram incubadas por 12-14h, a 4°C, acrescentou-se, a seguir, proteína-A Sepharose (50 µL) por 2 horas, a 4°C, por 15 minutos. Os precipitados foram lavados por três vezes com solução tampão. As proteínas foram tratadas com tampão de Laemmli, contendo 100 mM de DTT, aquecidas em água fervente por 5 minutos e então submetidas a eletroforese em SDS-PAGE a 8%.

3.3.5.3- Immunoblotting

Duzentos e cinquenta microgramas de extrato tecidual por amostra foram aplicados no gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de 2 mm de espessura, balizado por marcador de alto peso molecular da Bio Rad que contém: miosina (205 kDa), β galactosidase (116 kDa), BSA (85 kDa) e ovalbumina (47 kDa). Foi realizada eletroforese em cuba de minigel da Bio Rad, com solução tampão previamente diluída. O SDS-PAGE foi submetido a 25 volts por 2 horas e depois a 120 volts por mais 2 horas. A seguir, as proteínas separadas no SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, utilizou-se o equipamento de eletrotransferência do minigel da Bio Rad que foi mantido em voltagem constante de 120 volts por 2 horas, como descrito por TOWBIN, *et al.* 1979.

Posteriormente foi realizado “immunoblotting” típico com anticorpos antifosfotirosina. Para investigação do grau de fosforilação das enzimas Akt, JNK, ERK e expressão do I κ B- α não foi necessário imunoprecipitação. Foi utilizado extrato total dos homogenizados dos tecidos e os anticorpos respectivos no “immunoblotting”.

Após a transferência as membranas foram incubadas em solução bloqueadora por duas horas à temperatura ambiente e lavadas com solução basal por três sessões de dez minutos. Em seguida, incubadas com anticorpo específico por 12 horas à 4°C, novamente lavadas com solução basal e então incubadas com a proteína A marcada com ¹²⁵I por 2 horas. O excesso de proteína A foi lavado com solução basal e as membranas foram expostas ao filme de raio X (Kodak XAR-Rochester, NY) com intensificador (Cronex Lightining Plus intensifying screens – DuPont, Wilmington, DE). O cassete foi mantido à temperatura de -80°C. Após 12 a 48 horas os filmes foram revelados na forma convencional.

3.3.6- Análise estatística

Para a análise das auto-radiografias e visualização das bandas foi utilizada densitometria óptica com o equipamento Eagle Eye scanner (Stratagene). Com estes dados foi realizada análise estatística comparando a média e o erro padrão da média dos valores obtidos da leitura das bandas. O teste estatístico ONE-WAY-ANOVA foi realizado para avaliar a diferença dos quatro grupos estudados.

Após obtidas as médias das medidas da distância da junção cimento-esmalte à crista óssea alveolar, estas foram analisadas estatisticamente pelos testes ANOVA e TUKEY, como forma de observar a significância entre os resultados (Nassar *et al.*, 2003).

Na avaliação da sensibilidade à insulina pelo ITT, o K_{ITT} (velocidade de desaparecimento da glicose após injeção de insulina) foi calculado e a comparação entre os dois grupos foi feita pelo teste T.

No teste oral de tolerância à glicose, a avaliação da produção de insulina basal e glicemia pelo o GTT teve como análise estatística a comparação entre os dois grupos pelo teste T.

4- RESULTADOS

4.1- Características gerais dos animais

A tabela 1 demonstra as características gerais dos animais utilizados nos experimentos, tais como peso, dosagens de glicemia e insulina plasmática em jejum e perda óssea alveolar.

A média do peso dos animais com periodontite foi similar a dos animais controles (c: $235,2 \pm 36,82$ g vs p: $241,2 \pm 23,40$ g). Indicando que a inflamação oral não influenciou na massa corpórea.

Durante o oGTT os níveis de glicemia dos animais com periodontite foram maiores que os dos animais controles. Animais com periodontite apresentaram uma maior área sobre a curva da glicemia que os animais controles (c: $12898,5 \pm 11,7$ vs p: $14873,4 \pm 9,9$, $p < 0.05$) (Fig. 1A, 1B). Quanto a insulinemia, no tempo 15 min, dos ratos controles apresentaram um pico $0,613$ ng/mL, enquanto que nos ratos com periodontite o pico se deu no tempo de 30 min com $0,751$ ng/mL (Fig. 2A, 2B). Os animais com periodontite foram mais resistentes a insulina que os ratos controles, como foi expressado por sua maior área sobre a curva da insulinemia (c: $31,37 \pm 0,08$ vs p: $72,30 \pm 0,13$, $p < 0.05$).

A figura 3 demonstra, graficamente, a velocidade de desaparecimento da glicose (Kitt), realizado durante os 30 min de administração da insulina. A Kitt apresenta-se significativamente menor nos animais com periodontite em relação aos controles (Kitt c: $4.88 \pm 0.56\%/min$ vs Kitt p: $2.17 \pm 0.38\%/min$, $n=5$, $p=0.05$) (Fig. 3).

Após 28 dias da indução da ligadura, o grupo com periodontite mostrou um aumento significativo na perda óssea alveolar quando comparado com o grupo controle (c: $0,016 \pm 0,001$ vs p: $0,032 \pm 0,001$, $p < 0.0001$) (Fig. 4A, 4B).

Tabela1- Características gerais dos animais

Grupos	Peso (g)	Área da glicemia (mg/dL.min)	Área da insulinemia (ng/mL.min)	Kitt (%/min)	Média da perda óssea alveolar (mm)
Controle	235,2±36,82 (n=5)	12898,5±11,7 b (n=5)	31,37±0,08 b (n=5)	4.88±0.56 b (n=5)	0,016±0,001a (n=5)
Periodontite	241,2±23,40 (n=5)	14873,4±9,9 b (n=5)	72,30±0,13 b (n=5)	2.17±0.38 b (n=5)	0,032±0,001a (n=5)

Os resultados são expressos como Média ± SEM (erro padrão). O número de animais é mostrado entre parênteses. Os valores de p menores que 0.05 foram considerados significativos.

A p<0.0001 vs controles

b p<0.05 vs controles

4.2- Efeito da periodontite na sinalização insulínica em ratos

4.2.1- Sinalização da insulina no músculo esquelético de ratos controles e com periodontite

Quando se realizou a imunoprecipitação das amostras de tecido muscular com anticorpo anti-receptor de insulina e *immunoblotting* com anticorpo anti-fosfotirosina, houve diferença na fosforilação da subunidade beta de 95 kDa do receptor induzida pela insulina entre os grupos estudados (p: 85±7% vs c: 100±4%, n=5; Fig.5A). As amostras de músculo foram submetidas ao *immunoblotting* com anticorpo contra a porção COOH-terminal do receptor de insulina e não observou-se alteração significativa na concentração protéica deste receptor nos animais com periodontite comparado com os animais controles. (Fig. 5B).

A fosforilação do IRS-1 foi estudada através da imunoprecipitação das amostras com anticorpo contra IRS-1 e , a seguir *immunoblotting* com anticorpo anti-fosfotirosina. Houve um decréscimo significativo na fosforilação em tirosina do IRS-1 em músculos de ratos com periodontite em relação aos ratos controles.(Fig. 5C, c+: 100±5% vs l+: 68±2%, n=5, p<0.05, c-: 55±3% vs l-: 16±2,1%, n=5, p<0.05).

Ao medir a concentração de IRS-1 em músculo, realizou-se o *immunoblotting* com anticorpo específico contra e observou-se que não havia mudança na concentração desta proteína entre os grupos estudados. (Fig. 5D).

Animais com periodontite apresentaram uma redução na fosforilação do IRS-2 em relação ao grupo controle sob estímulo insulínico agudo. Animais sem o estímulo agudo insulínico o grupo controle apresentou maior fosforilação em tirosina do IRS-2 em relação ao grupo (c: 100±5% vs p: 53±1,5%, c-: 12±1,15% vs p-: 15±1,5%, n=5, p<0.05; Fig. 5E). As concentrações teciduais de IRS-2 foram verificadas por *immunoblotting* com anticorpos anti-IRS-2, e não apresentaram diferenças entre os grupos (Fig. 5F).

Animais com periodontite mostraram uma redução na fosforilação em em serina da Akt em relação ao grupo controle. Em animais sem estímulo insulínico o grupo controle apresentou maior fosforilação em serina da Akt em relação ao grupo com periodontite (c: 100±4% vs p: 66±1,2%; c-: 11±1% vs p-: 31±1%, p<0.05, n=5. Fig. 5G). A concentração protéica de Akt total foi verificada com incubação das membranas com anticorpos anti-Akt (Fig. 5H). Não havia diferença entre a concentração total de Akt no músculo esquelético desses dois grupos.

A fosforilação em tirosina da ERK1/2 em músculos esqueléticos de ratos com periodontite foi mais reduzida que em ratos com periodontite. Em animais sem estímulo insulínico o grupo controle apresentou maior fosforilação da ERK ½ em relação ao grupo com periodontite (c: 100±4% vs p: 80±3%; c-: 71±1% vs p-: 57±5%, p<0.05, n=5; Fig. 5 I). Quando o immunoblotting foi feito com anti-ERK1/2 (Fig. 5 J) as concentrações protéicas da ERK1/2 em músculo não mudaram em ambos os grupos .

A fosforilação em serina 307 do IRS-1 em músculo esquelético de ratos com periodontite foi aumentada em relação ao grupo controle (c: $100 \pm 8\%$ vs p: $160 \pm 2,6\%$, $n=5$, $p<0.05$; Fig. 5 K) (Fig. 2H, $n=5$).

Houve diferença significativa na fosforilação da JNK no músculo entre os dois grupos, o grupo com periodontite apresentou uma maior fosforilação em relação ao grupo controle indicando uma ativação na via da inflamação (p: $140 \pm 0,4\%$ vs c: $100 \pm 0,8\%$, $n=5$; Fig. 5 L).

A expressão do $I\kappa B-\alpha$ foi reduzida em músculo do grupo com periodontite, indicando uma ativação na via $IKK/ I\kappa B-\alpha / NF\kappa B$. (p: $30 \pm 5\%$ vs c: $100 \pm 0,8\%$, $n=5$; Fig. 5 M).

4.2.2- Sinalização da insulina no fígado de ratos controles e com periodontite

As amostras de fígado foram submetidas ao *immunoblotting* com anticorpo anti-receptor de insulina e não observou-se alteração significativa na concentração protéica deste receptor nos animais com periodontite em relação ao grupo controle (Fig. 6 B). Na imunoprecipitação de amostras do tecido hepático com o anticorpo anti-receptor de insulina e *immunoblotting* com anticorpo anti-fosfotirosina, os animais com periodontite apresentaram uma redução na fosforilação em tirosina do receptor de insulina em relação ao grupo controle (p: $76 \pm 3\%$ vs c: $100 \pm 5\%$, p-: $66 \pm 2\%$ vs c-: $32 \pm 5\%$, $n=5$, $p<0.05$; $n=5$; Fig. 6 A).

Ao verificar a fosforilação em tirosina do IRS-1 no tecido hepático, sob o estímulo insulínico agudo, os ratos com periodontite apresentaram uma redução na fosforilação em relação ao grupo controle. Sem o estímulo insulínico, houve uma diferença significativa entre os grupos (c: $100 \pm 4\%$ vs p: $55 \pm 0,2\%$, p-: $11 \pm 0,1\%$ vs c-: $50 \pm 0,2\%$, $p<0.05$, $n=5$; Fig. 6 C). as mesmas membranas foram estripadas e submetidas ao *immunoblotting* com anticorpo anti-IRS-1 para avaliar a concentração do IRS-1 nestes tecidos (Fig. 6 D). Não houve diferença estatisticamente significativa na concentração proteica do IRS-1 no fígado de ambos os grupos.

Após o estímulo insulínico agudo, houve diferentes aumentos na fosforilação em tirosina do IRS-2 entre os dois grupos de animais, os animais com periodontite apresentaram uma menor fosforilação (c: $100 \pm 1,5\%$ vs p: $45 \pm 1\%$; p-: $15 \pm 1\%$ vs c-: $12 \pm 2\%$, $p < 0.05$, $n=5$; Fig. 6 E). As concentrações teciduais de IRS-2 foram avaliadas por *immunoblotting* com anticorpo anti-IRS-2 e não houve diferença entre os dois grupos (Fig. 6 F).

As concentrações basais de Akt no fígado não foram diferentes entre os dois grupos. Após o estímulo insulínico, a fosforilação em serina da Akt no fígado foi mais reduzida no grupo com periodontite (c: $100 \pm 8\%$ vs p: $69 \pm 5\%$, p-: $27 \pm 1\%$ vs c-: $30 \pm 2\%$, $p < 0.05$, $n=5$; Fig. 6 G). Quando estas membranas foram submetidas ao *immunoblotting* com anticorpo anti-Akt, como mostrado na figura (Fig. 6 H) não houve diferença entre esses dois grupos, indicando que as concentrações de Akt não mudaram com a indução da periodontite em ratos machos Wistar.

Usando anticorpos monoclonais anti-tirosina fosforilada da ERK1 e ERK2, os níveis de ativação da ERK1/2 foram examinados no tecido hepático no estado basal e após estimulação da insulina em experimentos *in vivo*. Após a injeção de insulina na veia porta, a fosforilação em tirosina da ERK1/2 foi maior em ratos controles que em relação a ratos com ligadura. Em condições basais, o grupo controle apresentou uma menor fosforilação da ERK $\frac{1}{2}$ em relação ao grupo com periodontite (c: $100 \pm 8\%$ vs p: $78 \pm 4\%$ p-: $73 \pm 2\%$ vs c-: $68 \pm 4\%$, $p < 0.05$, $n=5$)(Fig. 6 I). Os níveis teciduais dessas proteínas quinases foram similares (Fig. 6 J).

A fosforilação do IRS-1 em serina 307 no fígado promoveu uma maior fosforilação em ratos com periodontite em relação ao grupo controle, mostrando que há uma modulação negativa na via da insulina. (c: $100 \pm 8\%$ vs p: $140 \pm 12\%$, $n=5$, $p < 0.05$). (Fig. 6 K).

Houve uma diferença na fosforilação em tirosina da JNK no fígado em ambos os grupos (p: $150 \pm 2,5\%$ vs c: $100 \pm 2\%$, $n=5$, $p < 0.05$; Fig. 6 L), indicando que a JNK está mais ativada no grupo com periodontite.

A expressão do $I\kappa\beta$ - α foi reduzida no tecido hepático do grupo com periodontite. (p: $45 \pm 6\%$ vs c: $100 \pm 0,8\%$, $n=5$, $p < 0.05$; Fig. 6 M).

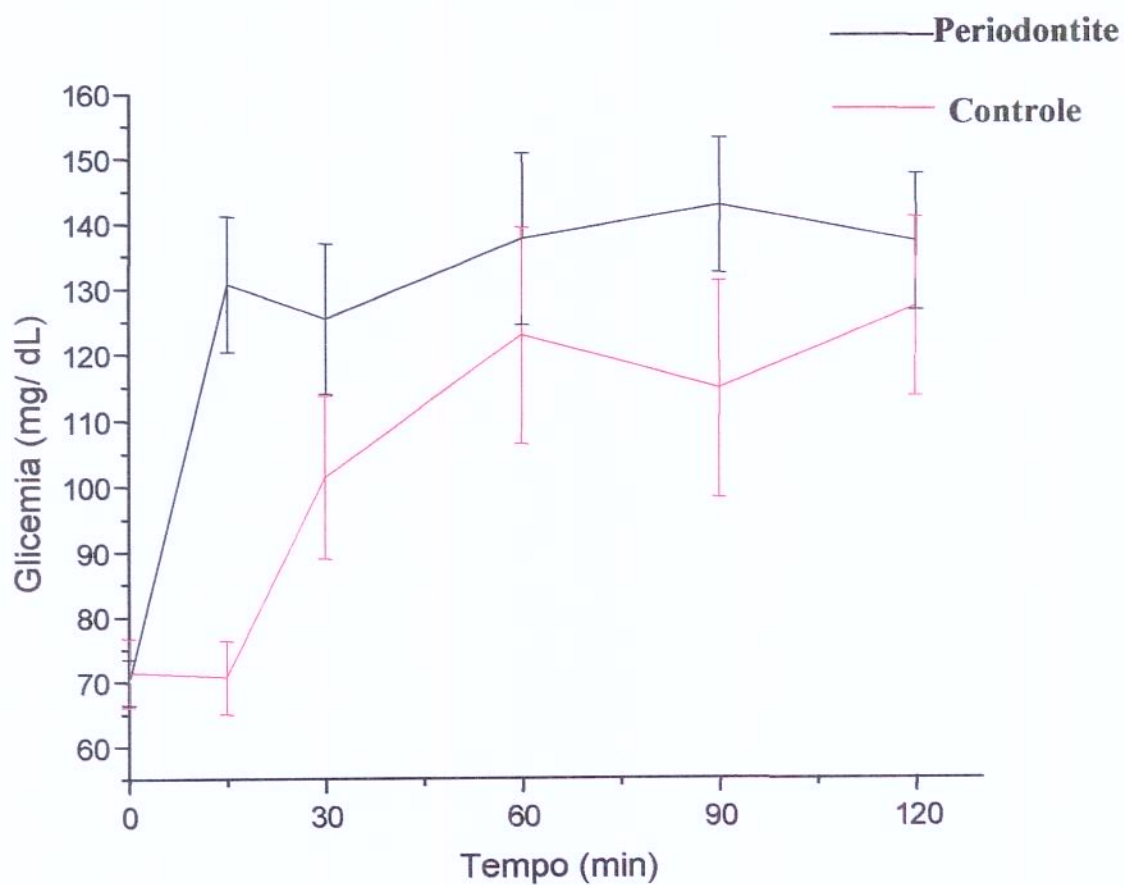


Figura 1 A- Gráfico da glicemia (mg/dL) em função do tempo (min) realizado no teste oral de tolerância a glicose (o GTT) em ratos machos Wistar. Média das glicemias $\pm$ SEM, n= 5.

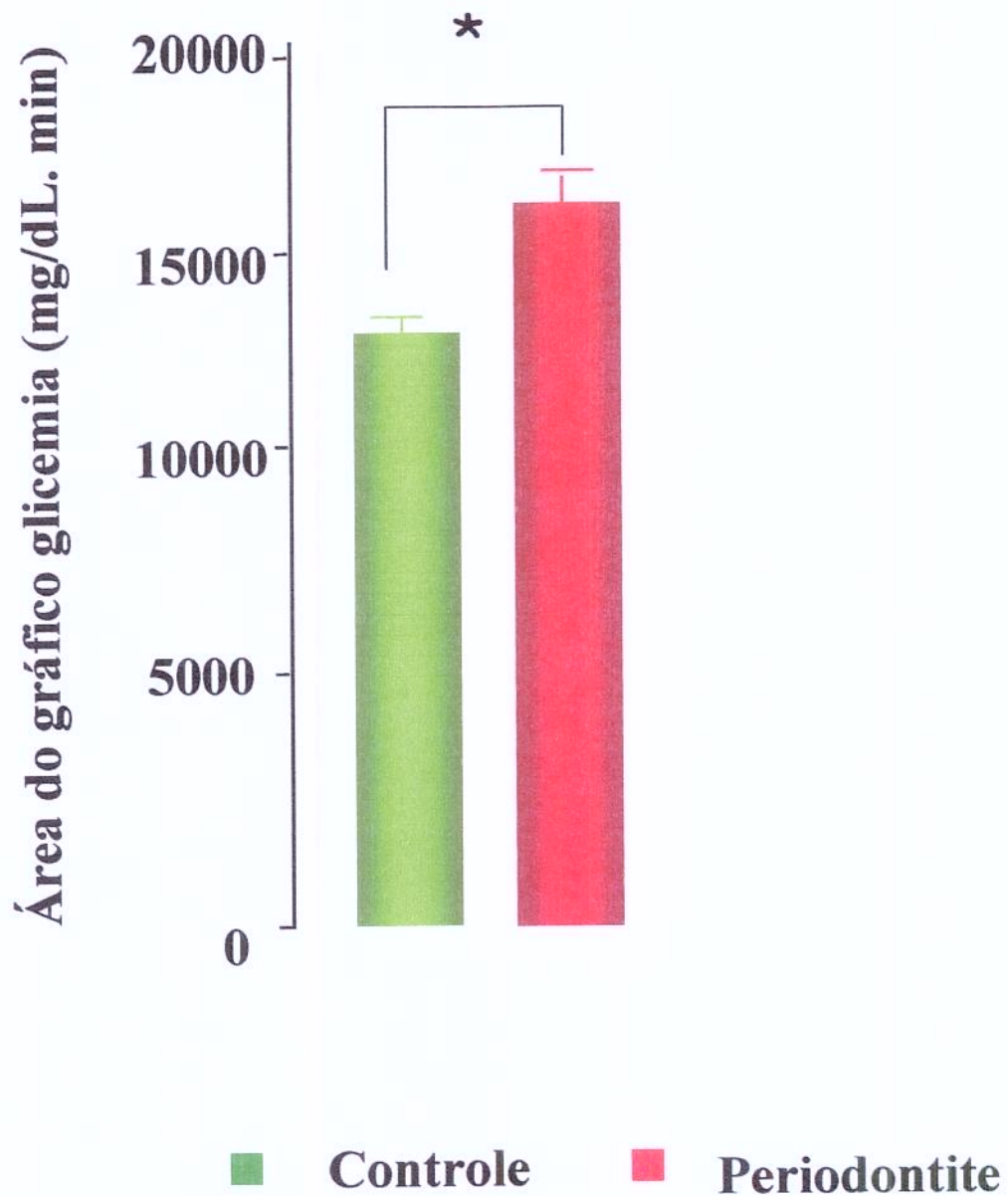


Figura 1 B- Gráfico em barras da área sobre a curva da glicemia (mg/dL.min) do teste oral de tolerância a glicose (oGTT). Área $\pm$ SEM,* $p < 0,05$.n=7

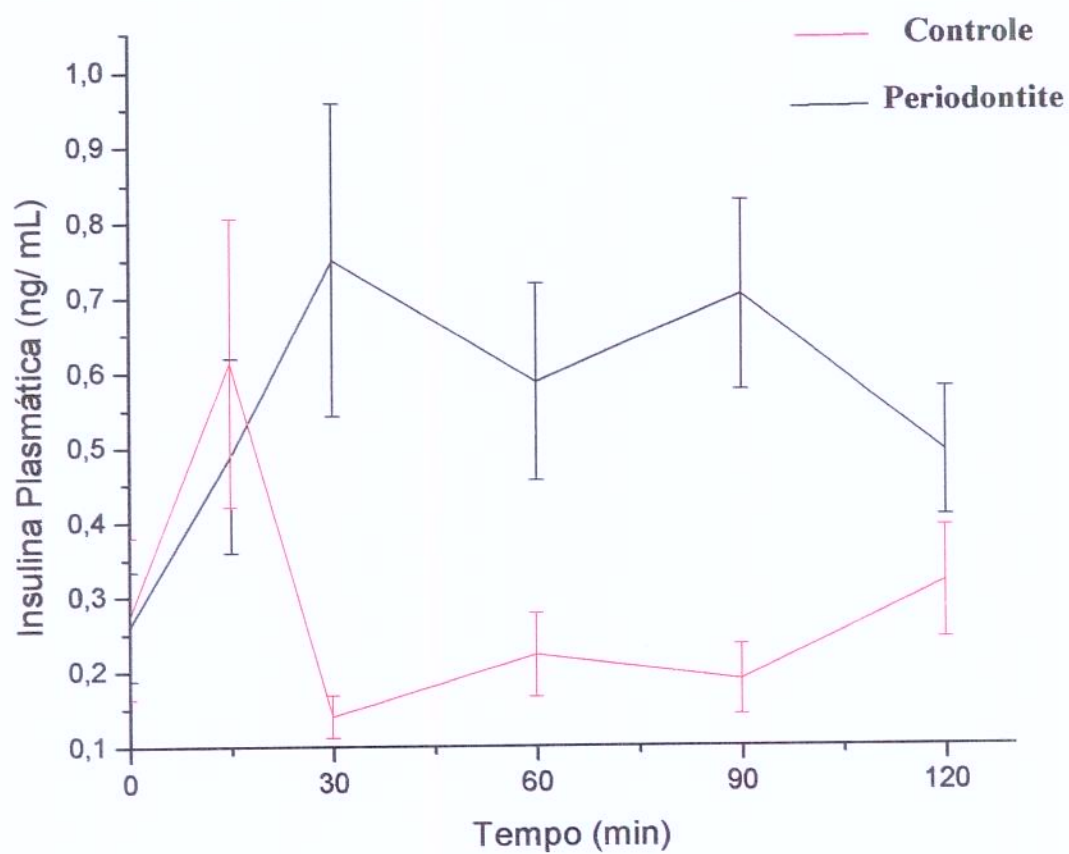


Figura 2 A- Gráfico da insulinemia (ng/mL) em função do tempo (min) realizado no teste oral de tolerância a glicose (o GTT) em ratos machos Wistar. Média das insulinemias $\pm$ SEM, n= 7.

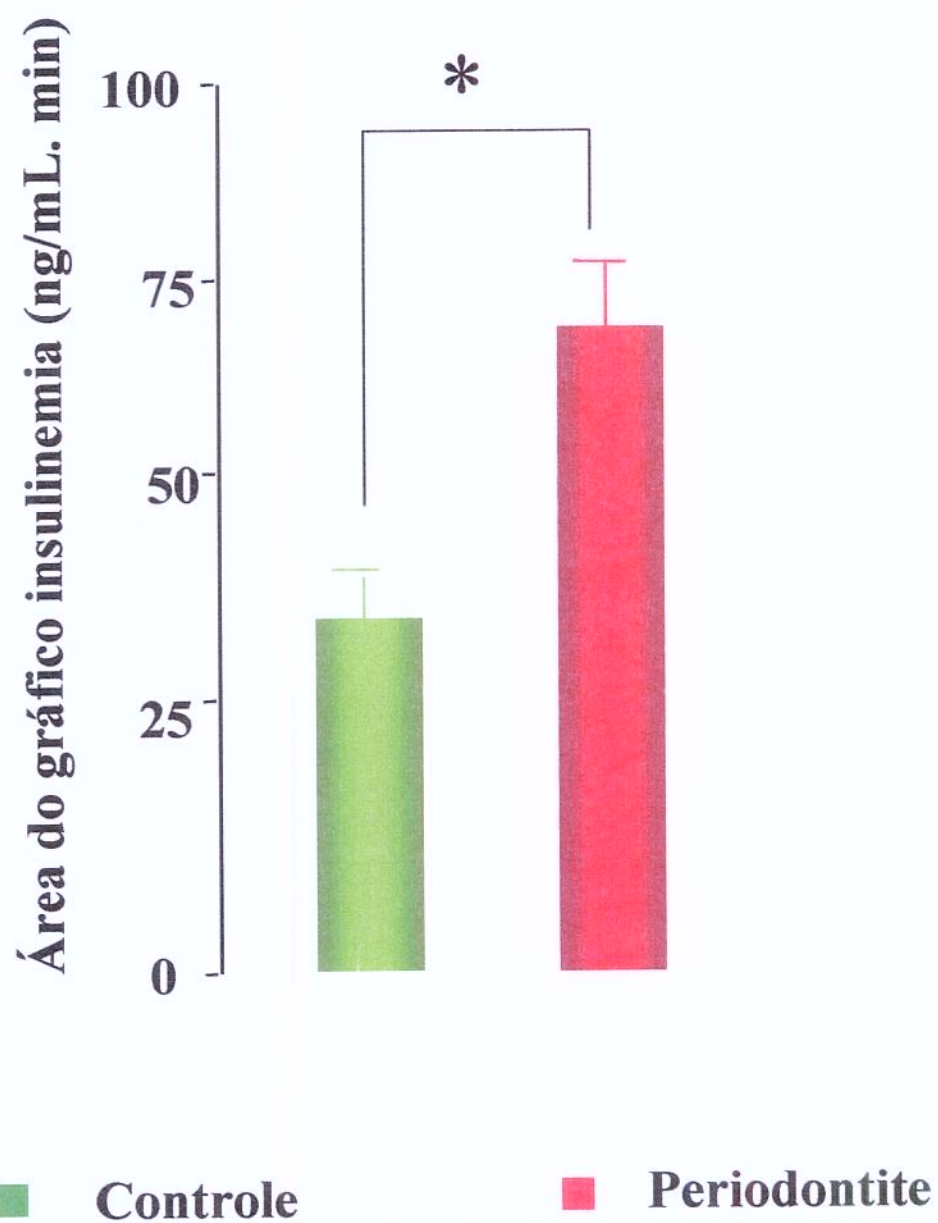


Figura 2 B- Gráfico em barras da área sobre a curva da insulinemia (ng/mL.min) do teste oral de tolerância a glicose (oGTT). Área $\pm$ SEM, * $p < 0,05$. n=7

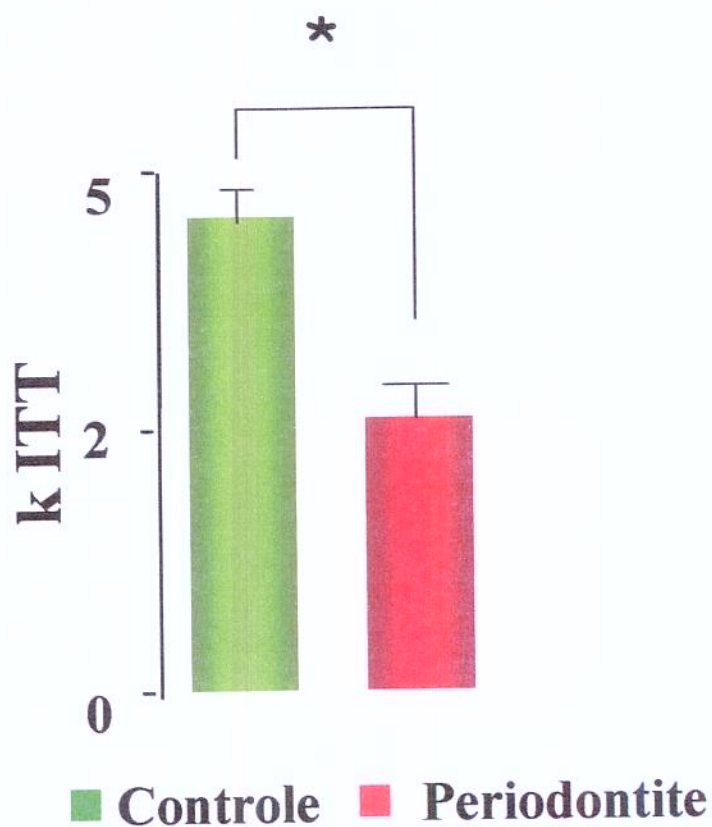


Figura 3 A- Gráfico em barras da velocidade de desaparecimento da glicose (K_{ITT}) em ratos controles e com periodontite. O K_{ITT} de cada rato foi calculado como está previamente descrito em Métodos e os resultados são expressos como a média $\pm$ SEM (erro padrão). A significância estatística é expressa como * $p < 0,05$. $n=5$.



Controle



Periodontite

Figura 4 A- Radiografias demonstrativas da distância da junção cimento-esmalte a crista óssea alveolar (CEJ- COA) do primeiro molar esquerdo da mandíbula de ratos Wistar.

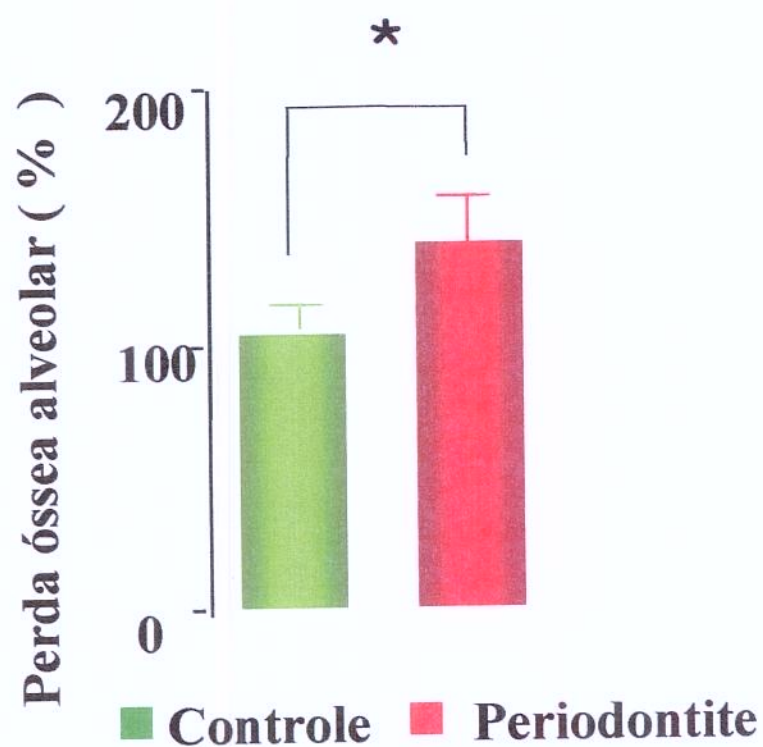


Figura 4 B- Gráfico em barras da perda óssea alveolar em porcentagem, considerando como 100% o grupo controle. A distância da junção cimento-esmalte a crista óssea alveolar (CEJ- COA) do primeiro molar esquerdo da mandíbula de ratos Wistar de cada rato foi calculado como está previamente descrito em Métodos e os resultados são expressos como a média $\pm$ SEM (erro padrão). A significância estatística é expressa como * $P < 0,05$. $n=10$.

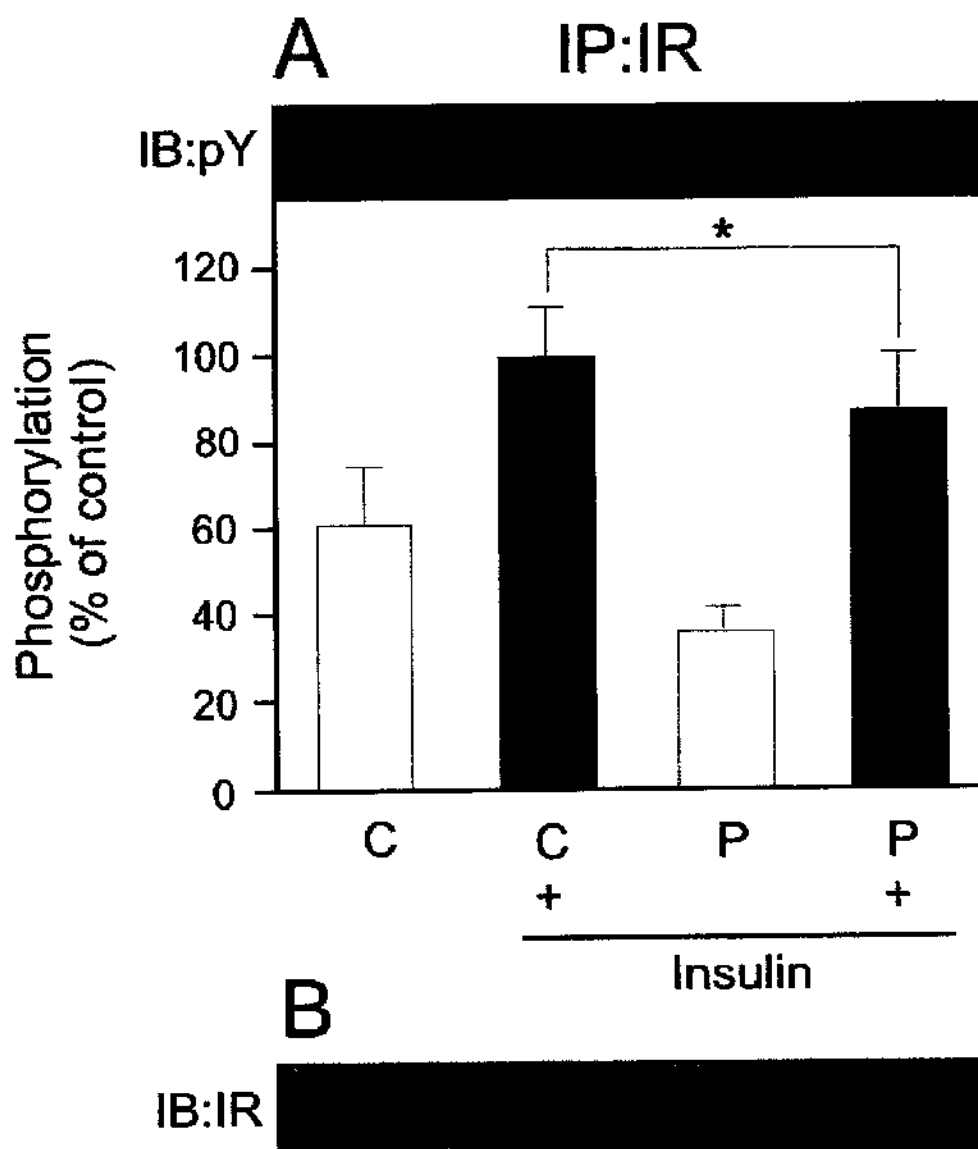


Figura 5 A-B- Sinalização da insulina em músculo de ratos com periodontite (P) e ratos controles (C). Fosforilação em tirosina do receptor de insulina com (+) e sem estímulo de insulina (A). Expressão do receptor de insulina (B). Os resultados são expressados como Média $\pm$ SEM (erro padrão), * $p < 0,05$. $n=5$.

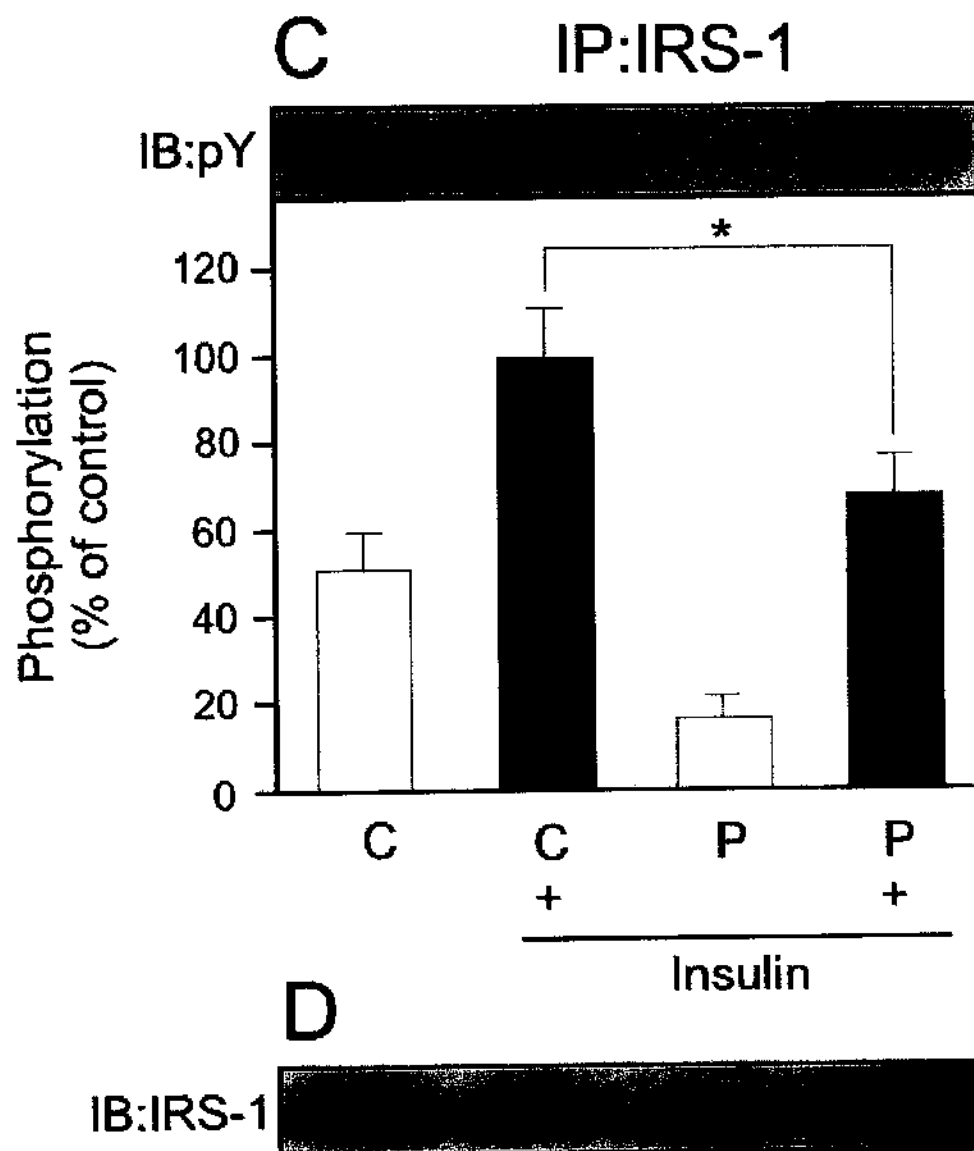


Figura 5 C-D- Sinalização da insulina em músculo de ratos com periodontite (P) e ratos controles (C). Fosforilação em tirosina do IRS-1 com (+) e sem estímulo de insulina (C). Expressão do IRS-1 (D). Os resultados são expressados como Média $\pm$ SEM (erro padrão), * $p < 0,05$. $n=5$.

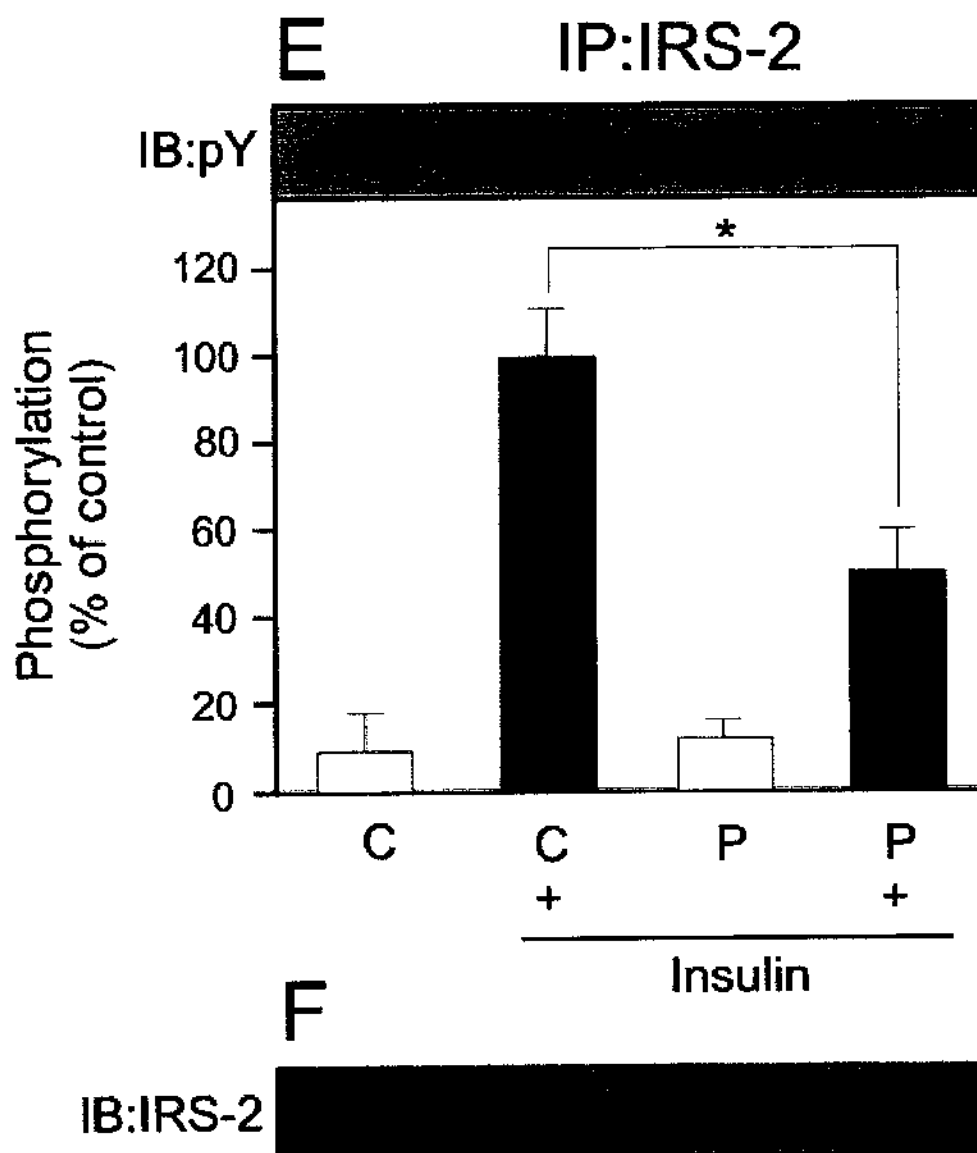


Figura 5 E-F- Sinalização da insulina em músculo de ratos com periodontite (P) e ratos controles (C). Fosforilação em tirosina do IRS-2 com (+) e sem estímulo de insulina (E). Expressão do IRS-2 (F). Os resultados são expressados como Média $\pm$ SEM (erro padrão), * $p < 0,05$. $n=5$.

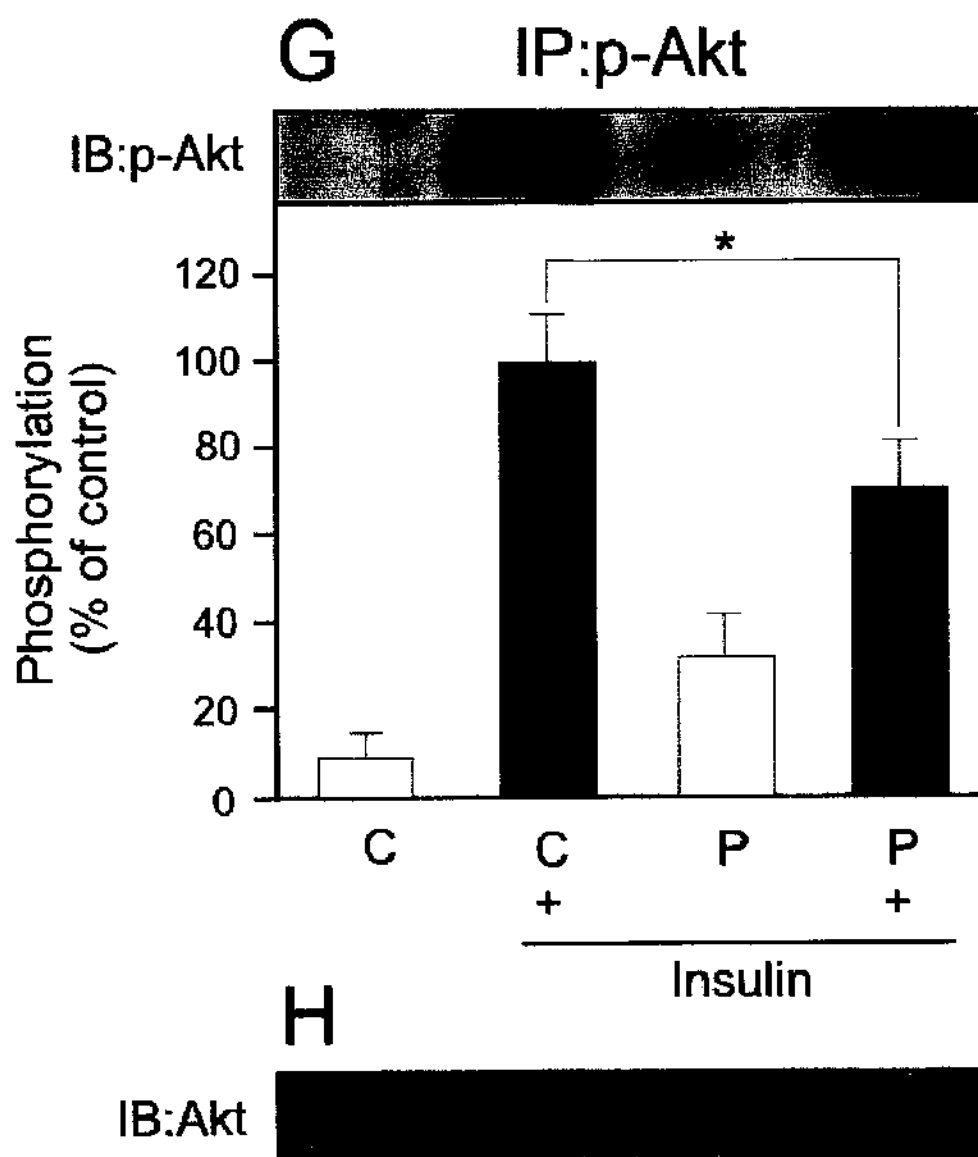


Figura 5 G-H- Sinalização da insulina em músculo de ratos com periodontite (P) e ratos controles (C). Fosforilação em serina do Akt com (+) e sem estímulo de insulina (G). Expressão da Akt (H). Os resultados são expressados como Média $\pm$ SEM (erro padrão), * $p < 0,05$. $n = 5$.

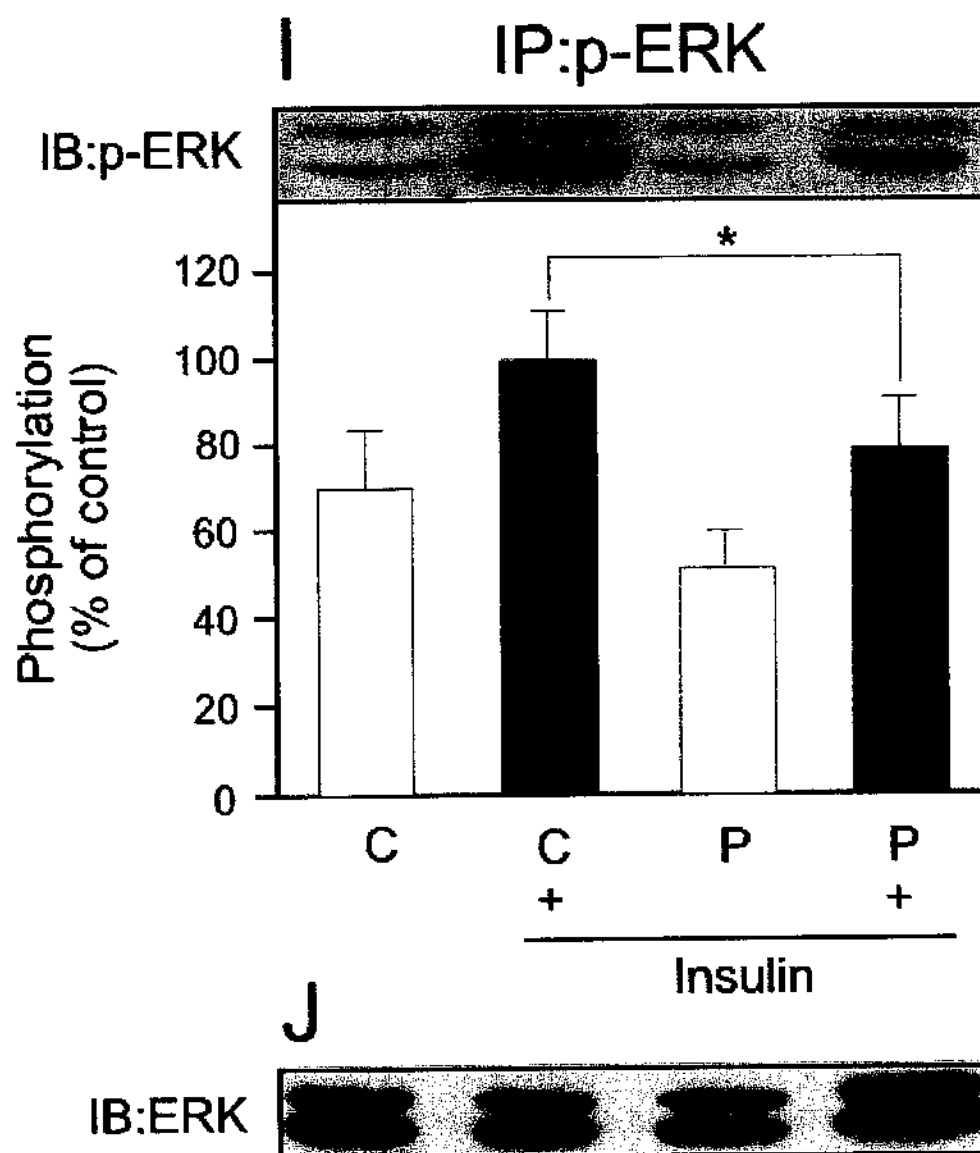


Figura 5 I-J- Sinalização da insulina em músculo de ratos com periodontite (P) e ratos controles (C). Fosforilação em tirosina da ERK ½ com (+) e sem estímulo de insulina (I). Expressão da ERK (J). Os resultados são expressados como Média $\pm$ SEM (erro padrão), * $p < 0,05$. $n = 5$.

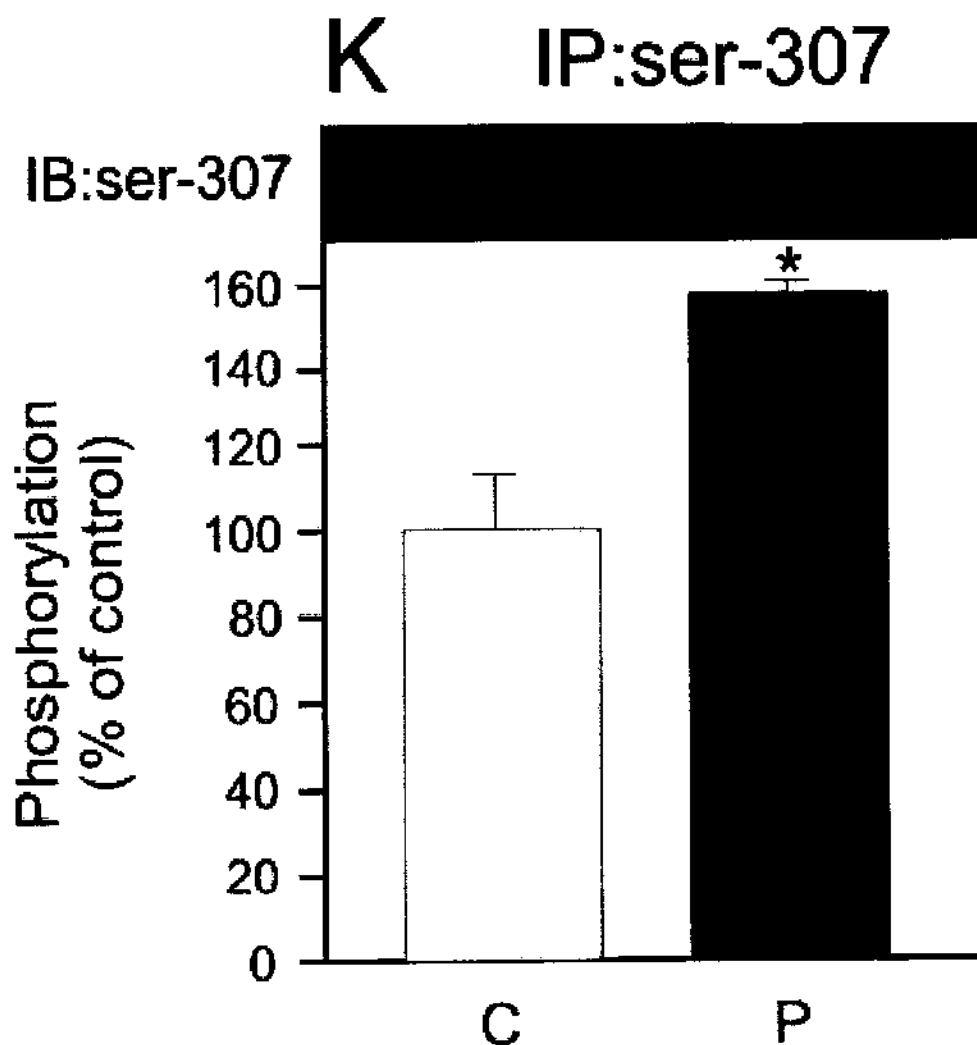


Figura 5 K- Sinalização da insulina em músculo de ratos com periodontite (P) e ratos controles (C). Fosforilação em serina 307 do IRS-1 estimulação. Os resultados são expressados como Média $\pm$ SEM (erro padrão), * $p < 0,05$. $n=5$.

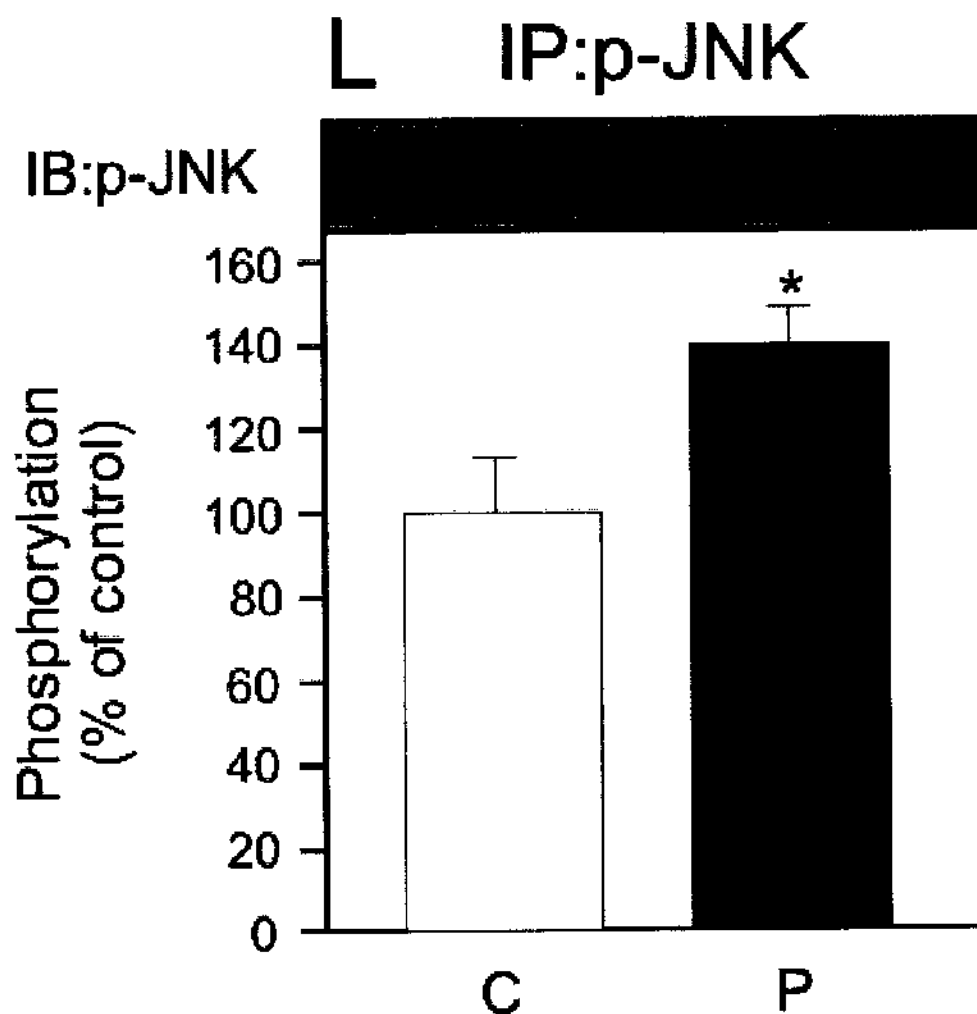


Figura 5 L- Sinalização da insulina em músculo de ratos com periodontite (P) e ratos controles (C). Fosforilação em tirosina da JNK (L). Os resultados são expresso como Média $\pm$ SEM (erro padrão), * $p < 0.05$, $n = 5$.

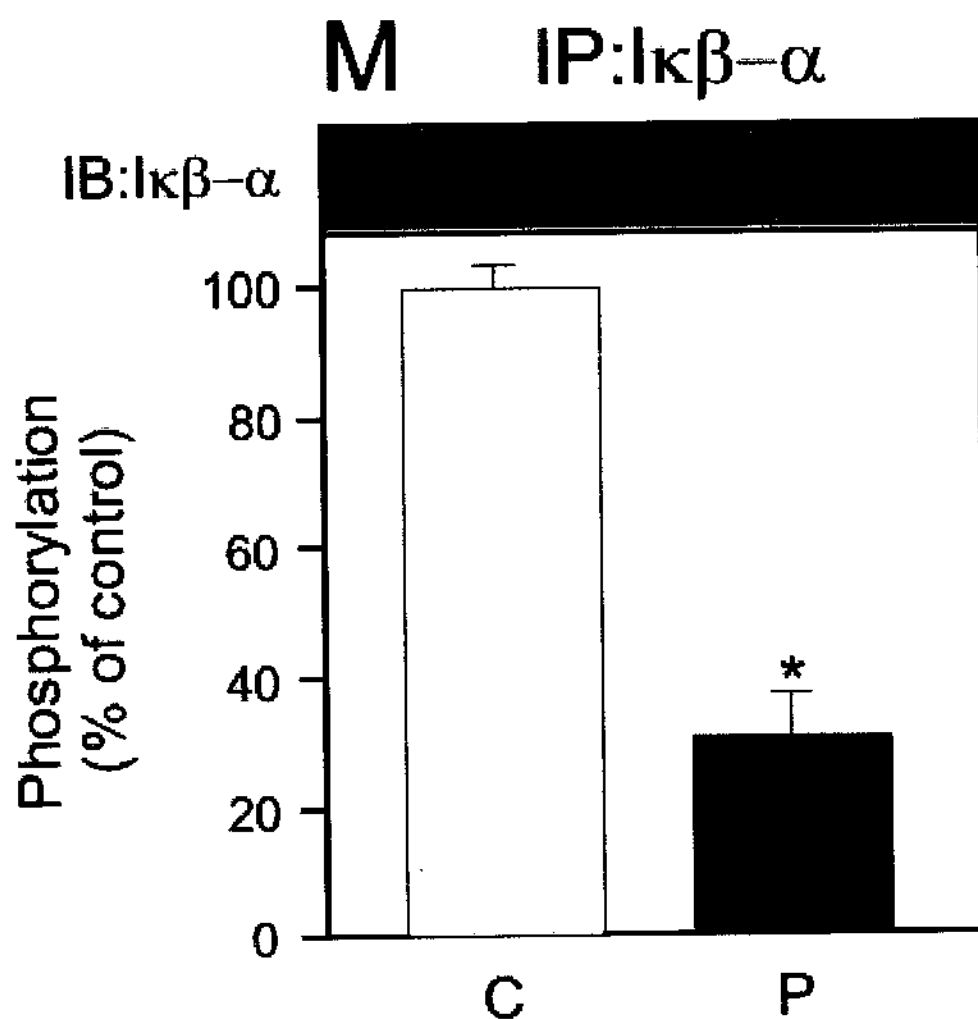


Figura 5 M- Sinalização da insulina em músculo de ratos com periodontite (P) e ratos controle (C). Expressão do IK β - α . Os resultados são expressos como Média $\pm$ SEM (erro padrão), * $p < 0.05$. $n = 5$.

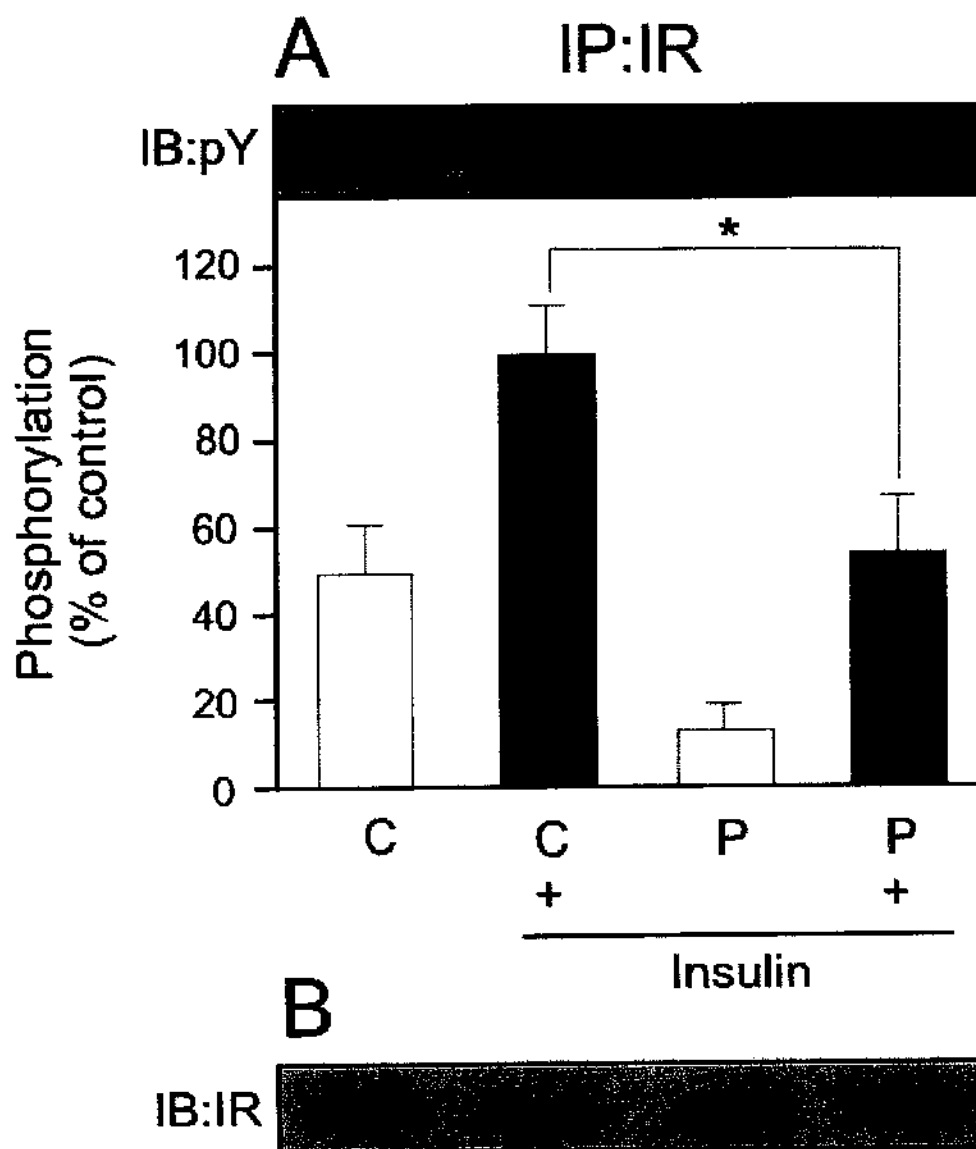


Figura 6A-B- Sinalização da insulina em fígado de ratos com periodontite (P) e ratos controles (C). Fosforilação em tirosina do receptor de insulina com (+) e sem estímulo de insulina (A). Expressão do receptor de insulina (B). Os resultados são expressados como Média $\pm$ SEM (erro padrão), * $p < 0,05$. $n=5$

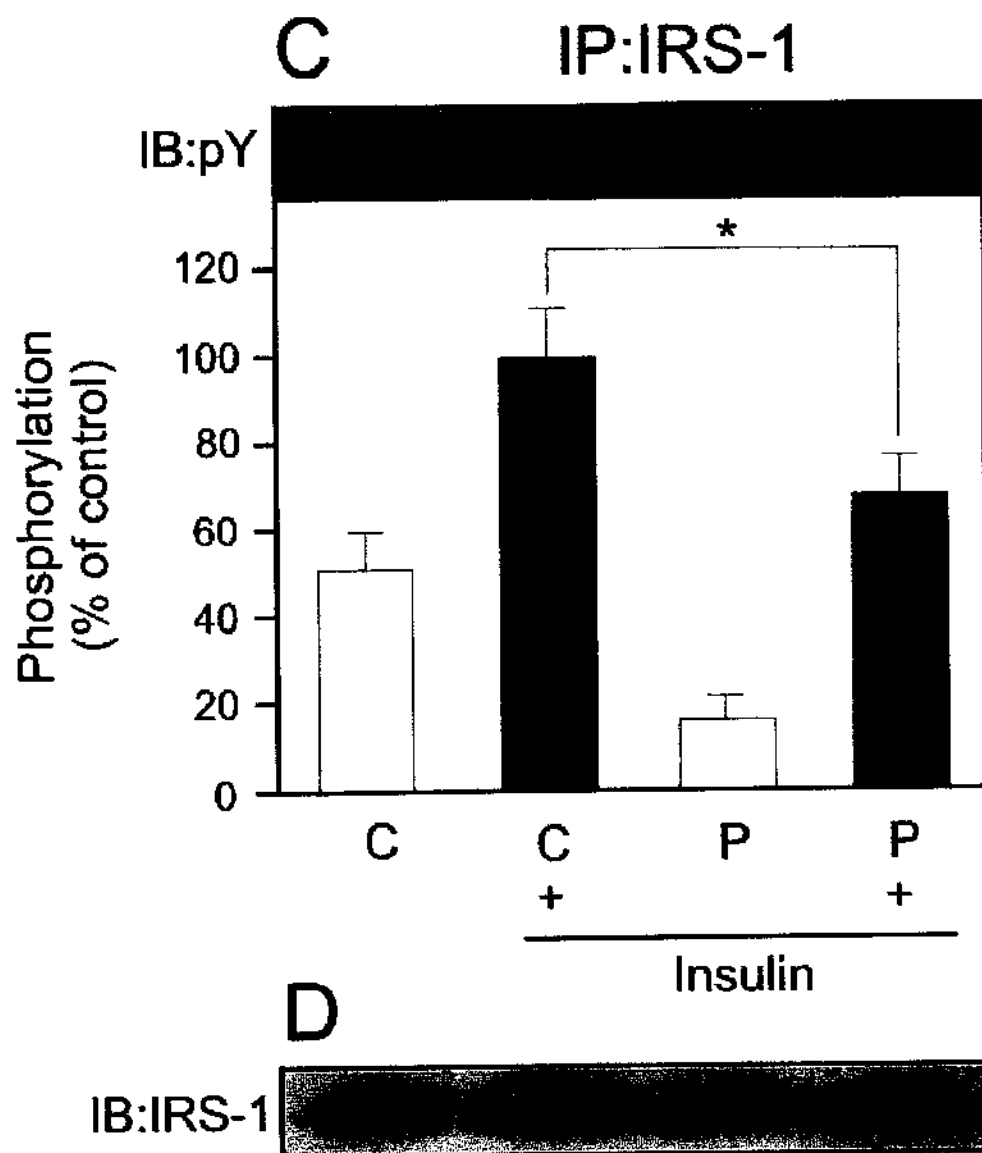


Figura 6 C-D- Sinalização da insulina em fígado de ratos com periodontite (P) e ratos controles (C). Fosforilação em tirosina do IRS-1 com (+) e sem estímulo de insulina (C). Expressão do IRS-1 (D). Os resultados são expressados como Média $\pm$ SEM (erro padrão), * $p < 0,05$. $n=5$

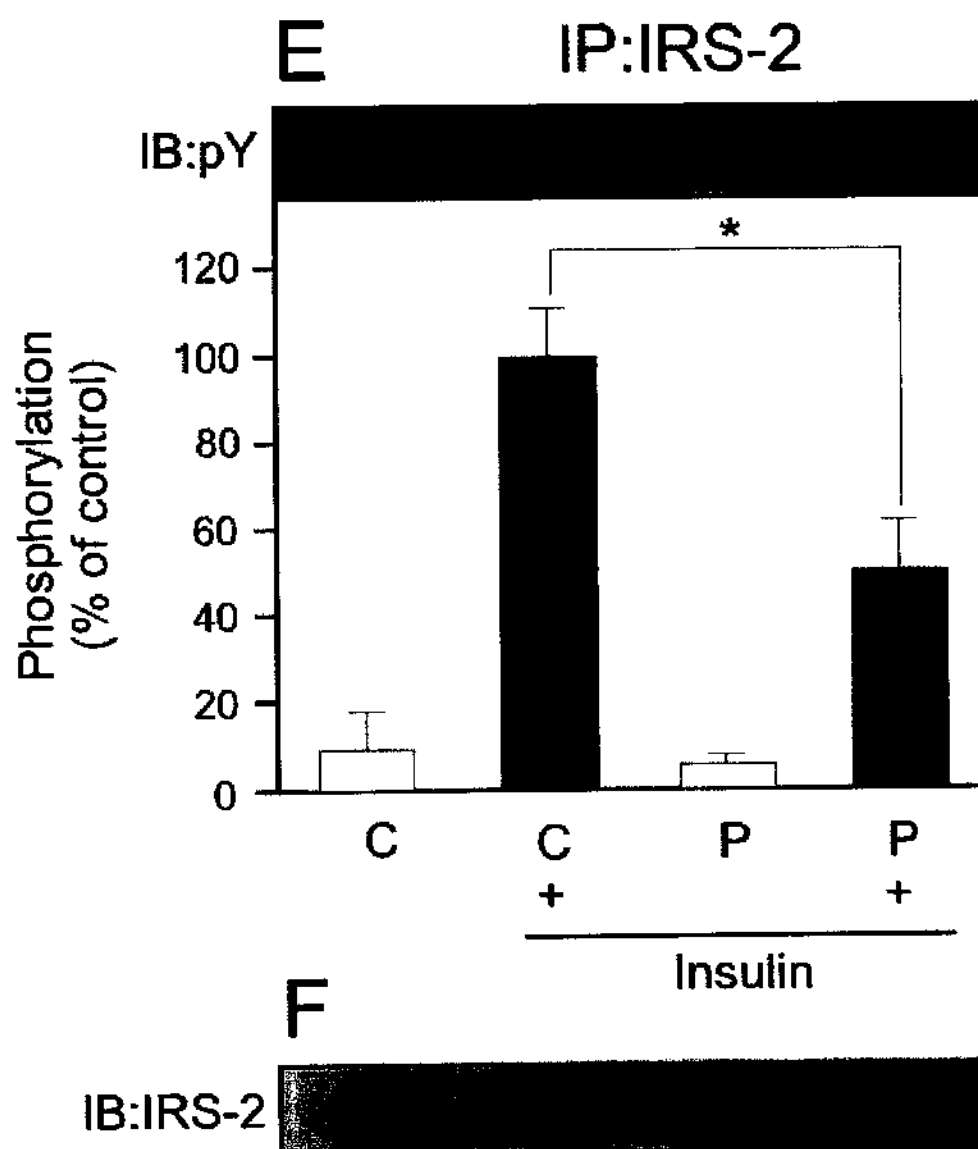


Figura 6 E-F- Sinalização da insulina em fígado de ratos com periodontite (P) e ratos controles (C). Fosforilação em tirosina do IRS-2 com (+) e sem estímulo de insulina (E), Expressão do IRS-2 (F). Os resultados são expressados como Média $\pm$ SEM (erro padrão), * $p < 0,05$, $n=5$

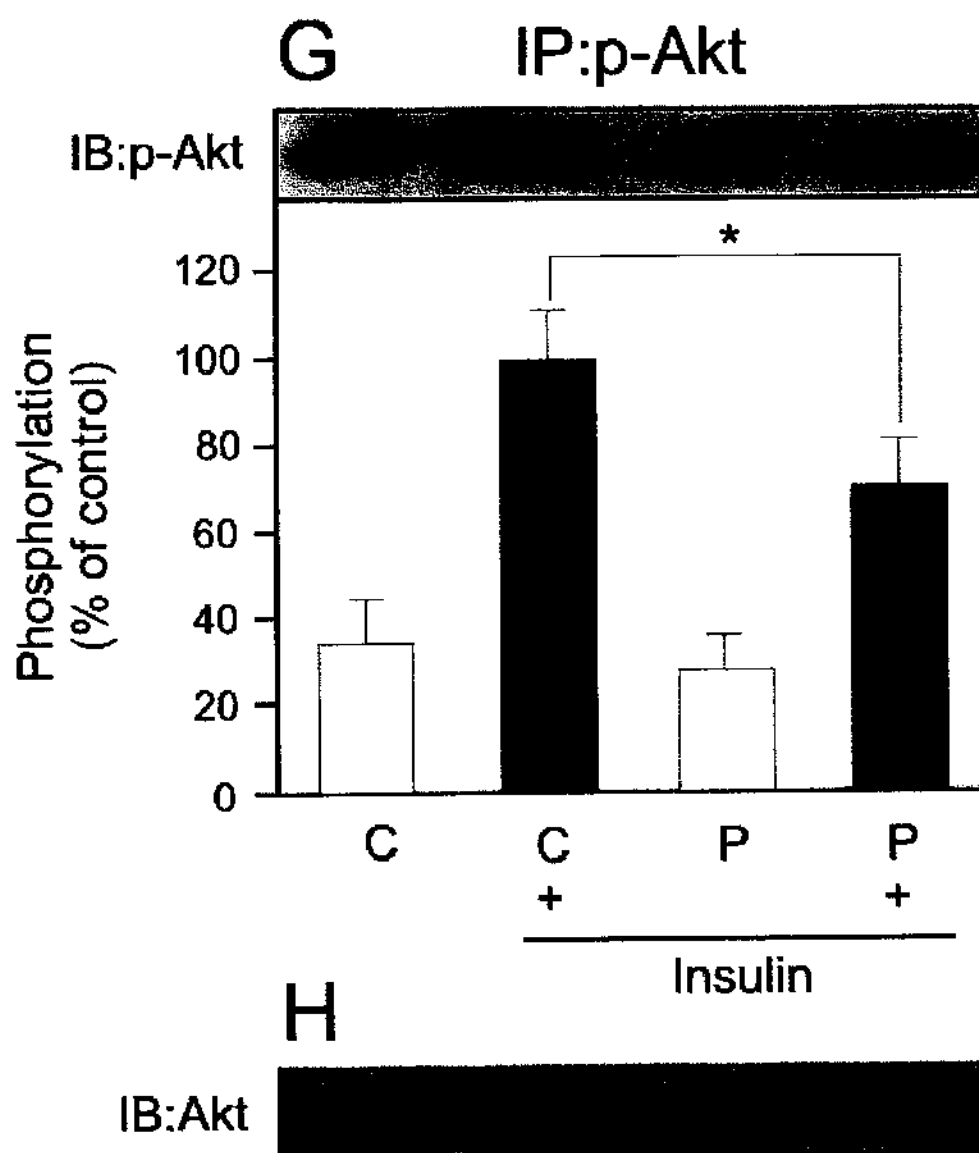


Figura 6 G-H- Sinalização da insulina em fígado de ratos com periodontite (P) e ratos controles (C). Fosforilação em tirosina da Akt com (+) e sem estímulo de insulina (G), expressão da Akt (H). Os resultados são expressados como Média $\pm$ SEM (erro padrão), * $p < 0,05$, $n=5$

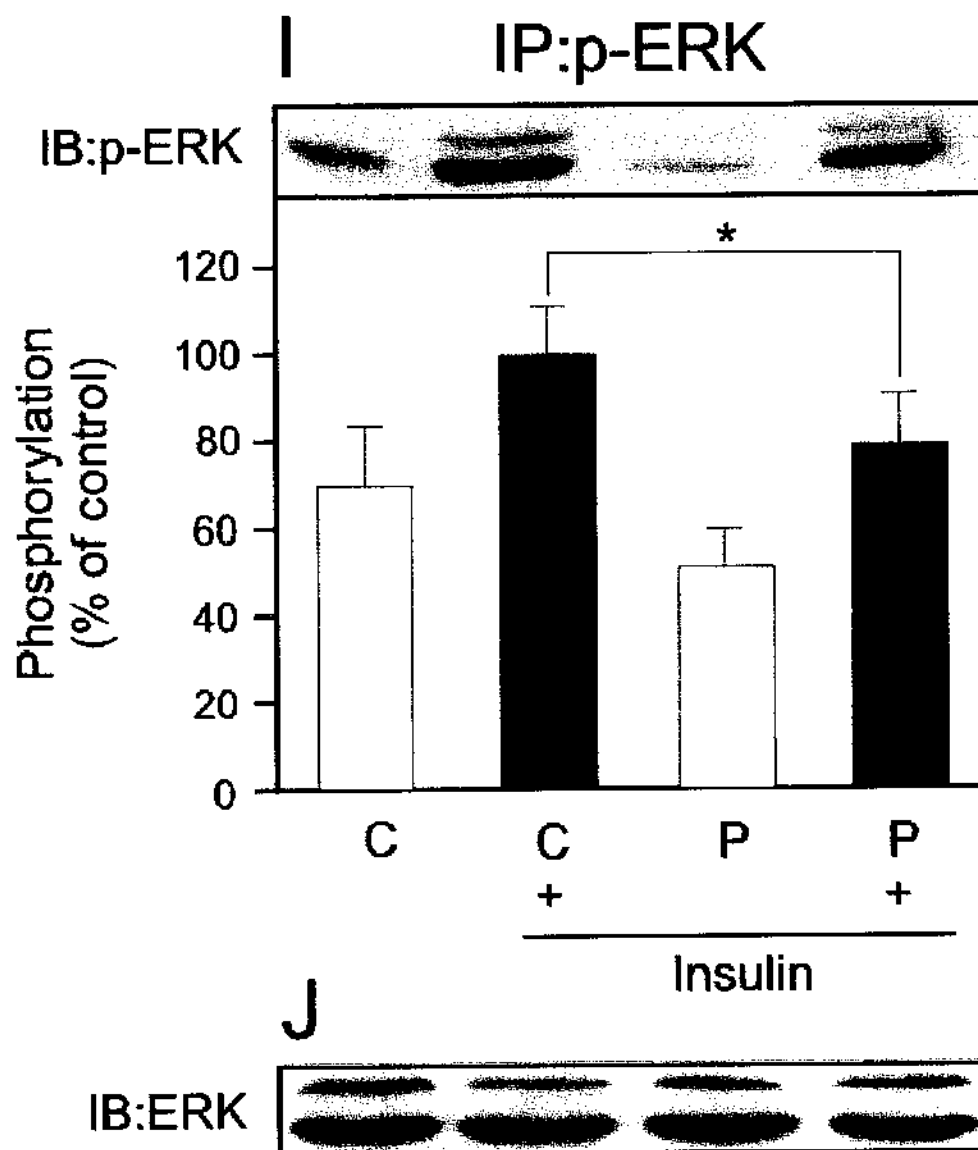


Figura 6 I-J- Sinalização da insulina em fígado de ratos com periodontite (P) e ratos controles (C). Fosforilação em tirosina ERK ½ com (+) e sem estímulo de insulina (I). Expressão da ERK ½ (J). Os resultados são expressados como Média $\pm$ SEM (erro padrão), * $p < 0,05$. $n=5$

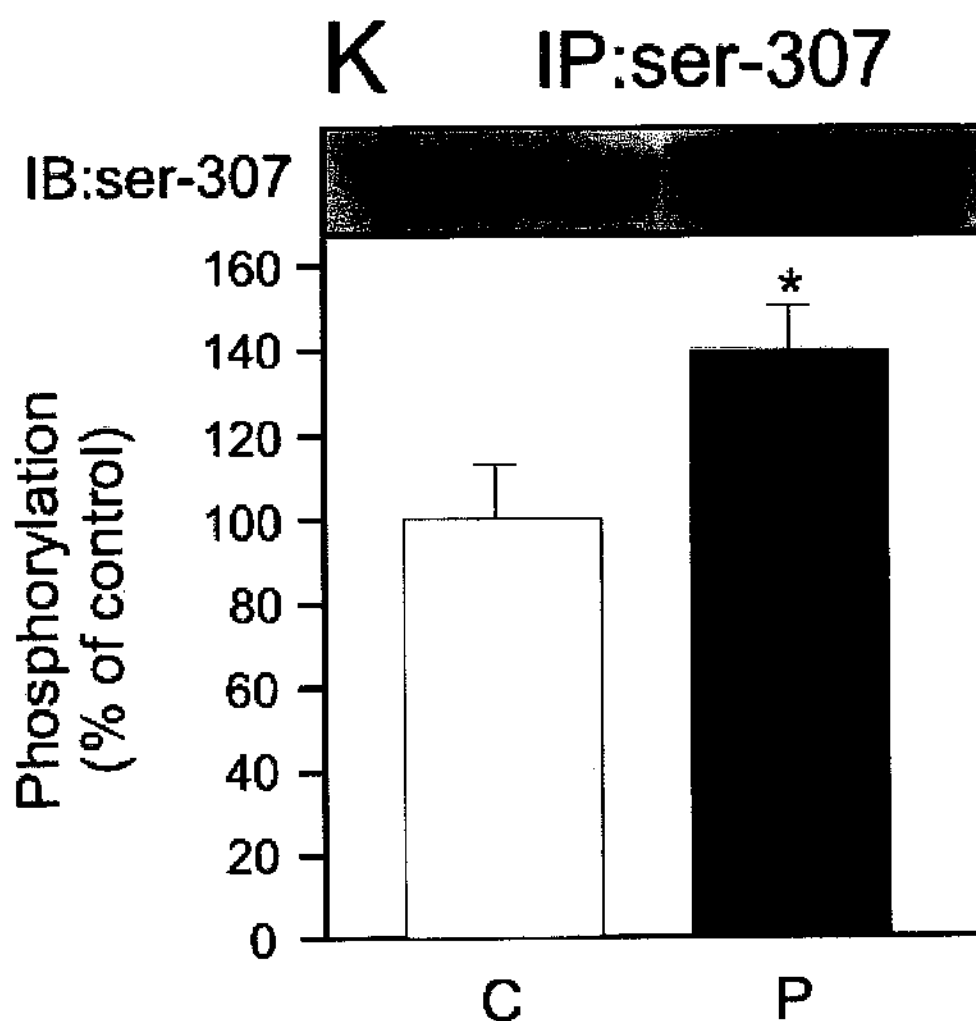


Figura 6 K- Sinalização da insulina em fígado de ratos com periodontite (P) e ratos controles (C). Fosforilação em serina 307 do IRS-1. Os resultados são expressados como Média $\pm$ SEM (erro padrão), * $p < 0,05$. $n=5$

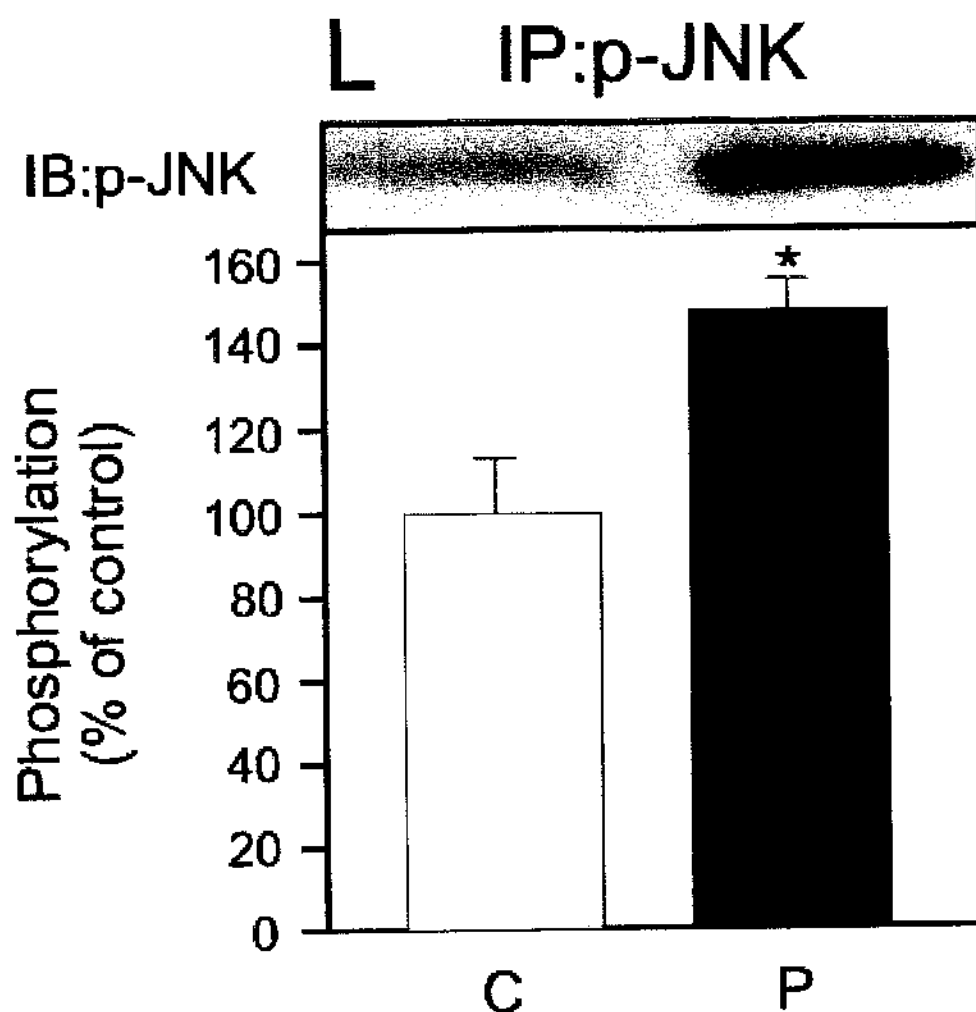


Figura 6 L- Sinalização da insulina em fígado de ratos com periodontite (P) e ratos controles (C). Fosforilação em tirosina da JNK com estimulação de insulina (L). Os resultados são expressos como Média $\pm$ SEM (erro padrão), * $p < 0,05$. $n=5$

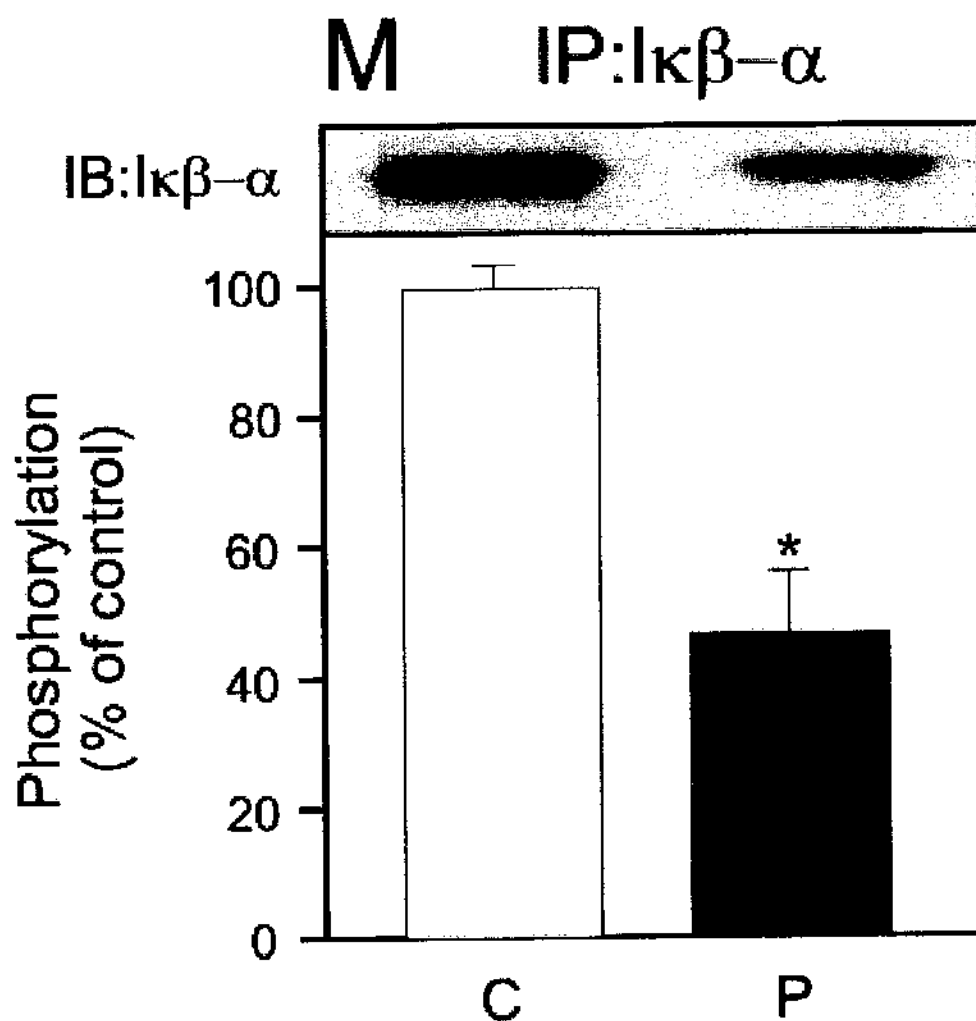


Figura 6 M- Sinalização da insulina em fígado de ratos com periodontite (P) e ratos controles (C). Expressão do IK β - α . Os resultados são expressos como Média $\pm$ SEM (erro padrão), * $p < 0,05$. $n=5$

5- DISCUSSÃO

A periodontite é uma infecção oral inflamatória crônica, causada por bactérias gram-negativas. Inicia-se com uma inflamação gengival, progride para destruição do tecido periodontal e gera a perda do osso alveolar (IACOPINO, 2000).

Além do Diabetes Mellitus 2 e da Síndrome Metabólica outras entidades clínicas também estão associadas a resistência à insulina como a doença hepática gordurosa não alcoólica, a hiperuricemia, a doença renal crônica, a insuficiência cardíaca, o ovário policístico e o câncer (CARVALHEIRA & SAAD, 2006). No estudo verificamos se a periodontite, sendo uma inflamação local, pode levar a alterações sistêmicas como um estado de resistência à insulina.

A insulina tem uma participação importante no metabolismo de carboidratos, de proteínas e de lipídeos. Em resposta ao aumento da concentração sérica de glicose sanguínea, as células β das ilhotas pancreáticas liberam a insulina na corrente circulatória, que é conduzida aos tecidos alvos.

Em animais, os órgãos com maior importância na homeostase da glicose são o fígado e o músculo. No fígado, a insulina estimula o armazenamento de glicogênio e inibe a glicogenólise. No músculo, a insulina estimula a captação, armazenamento e utilização de glicose. Somando-se a estes efeitos principais, a insulina também estimula o metabolismo da glicose em outros tecidos que têm pequeno ou nenhum papel na homeostase da glicose como um todo. A insulina age nestes tecidos como fator de crescimento e modifica ou aumenta a função de outros reguladores do metabolismo destas células (KAHN & FLIER, 2000).

Ao se ligar ao seu receptor tetramérico, a insulina inicia suas ações metabólicas e promotoras de crescimento. O receptor possui duas subunidades alfa e duas subunidades beta, a insulina liga-se a subunidade alfa e esta muda de conformação, estimulando assim a capacidade Tirosina quinase na subunidade β . O receptor se auto-fosforila em resíduos de Tirosina e fosforila outros substratos. Estas proteínas citoplasmáticas são chamadas Substrato 1 do Receptor de Insulina (IRS-1) (SUN et al., 1991; SUN et al., 1992). Em 1995, descreveu-se o IRS-2, esta proteína ao ser purificada teve seu cDNA determinado, tendo aproximadamente 45% de homologia com o IRS-1. Parece que o IRS-2 atua sinergicamente

com o IRS-1 na ativação da PI 3-quinase, tendo um papel importante nos eventos que controlam o transporte de glicose (SUN et al., 1995).

Os IRSs (1 e 2) fosforilados associam-se à enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-quinase), ativando-a (FOLLI et al., 1992; SAAD et al., 1993). A associação/ativação da PI 3-quinase ativa a enzima Serina/Treonina quinase AKT que parece exercer papel importante no controle do metabolismo de glicose. Outra Serina-quinase ativada nas etapas iniciais da ação insulínica, distal aos IRSs, é a MAPK, que possui diversas subfamílias, entre elas as ERKs (1 e 2). Esta via regula principalmente os efeitos mitogênicos da insulina.

A metodologia utilizada neste trabalho é a seguinte: estimulação com insulina na veia porta dos ratos *in vivo*; extração e homogeneização dos tecidos hepático e muscular em tampões com inibidores de fosfatases e proteases que promovem condições apropriadas para imunoprecipitação e realização do *immunoblotting* com anticorpos específicos. Esta metodologia permite avaliar a fosforilação, ou seja, a atividade quinase do receptor de insulina e de seus substratos, nestes dois tecidos importantes para a homeostase da glicose (SAAD et al., 1989).

O objetivo do protocolo experimental é realizar um estudo da fosforilação em Tirosina do IR, IRS-1 e IRS-2; da fosforilação em Serina/Treonina da AKT; da fosforilação em Tirosina da ERKs (1e2); da ativação da JNK e da IKK e da fosforilação em Serina 307 do IRS-1, em ratos com periodontite, modelo de resistência à insulina estudado.

Para caracterizar a resistência à insulina neste grupo de animais, utiliza-se o teste de tolerância a insulina (ITT). A técnica do *clamp* euglicêmico ou hiperglicêmico é feita para determinação da ação da insulina *in vivo* em humanos e em animais sendo um método bastante sensível e de difícil execução. Ao comparar em indivíduos obesos e em diabéticos os resultados do teste de tolerância à insulina e os resultados obtidos com o *clamp*, observa-se uma boa correlação. Assim, o ITT que determina a velocidade de desaparecimento da glicose pode ser um bom método alternativo de avaliação da sensibilidade à insulina (BONORA et al., 1989).

na via de sinalização da insulina gerando o quadro de resistência a insulina no fígado e músculo de ratos machos Wistar.

O mecanismo da resistência a insulina não é compreendido inteiramente, em ratos com estimulação da insulina avaliamos a fosforilação em Tirosina do receptor de insulina, do IRS-1, do IRS-2 e do Akt no fígado e no músculo dos ratos com periodontite.

No tecido muscular, há uma diminuição na fosforilação em Tirosina do IR, do IRS-1 e do IRS-2. Há também uma diminuição na fosforilação em Serina da Akt. Estes resultados também foram observados em outros modelos de resistência à insulina como em camundongos com elevadas concentrações de LPS (CARVALHO-FILHO M. A. et al., 2006). Além disso, há uma diminuição da fosforilação da ERK 1/2, via de crescimento ativada pela insulina, que também é observada em ratos submetidos à baixas temperaturas (GASPARETTI A L. et al., 2003).

No tecido hepático, tanto a fosforilação em Tirosina do IR, do IRS-1, do IRS-2 e da ERK 1/2 quanto a fosforilação em Serina da Akt apresentam uma redução indicando uma inibição da via de sinalização da insulina que também ocorreu em ratos submetidos à baixas temperaturas (GASPARETTI A L. et al., 2003).

Sabe-se que um dos mecanismos inibitórios da via de sinalização da insulina é a fosforilação em Serina do IRS-1 devido a ativação da via da JNK e da via do IKK. No estudo atual, ratos com periodontite possuem um aumento da fosforilação da JNK e da ativação da IKK, indicada através da maior degradação do $I\kappa\beta$ - α , estas enzimas são ativadas pela inflamação como foi observado em músculos de camundongos que sofreram queimaduras (ZHANG Q. et al., 2005) e no fígado e no músculo de ratos que receberam dieta com restrição de sal e dieta cafeteria (PRADA P. O. et al., 2005), animais com resistência à insulina.

Como a técnica de *immunoblotting* é manual e passível de erros por quem realiza, os resultados dos animais com periodontite que não apresentaram modulação negativa na via de sinalização da insulina foram desconsiderados.

Pelos resultados desse estudo, observa-se que animais com periodontite, apresentam resistência à insulina pela modulação negativa das enzimas chaves da sinalização desta (IR, IRS-1, IRS-2, Akt) e há paralelamente uma ativação de enzimas da via da inflamação (JNK , IKK) que ocasiona uma fosforilação em Serina 307 do IRS-1, inibindo a transmissão do sinal insulínico em fígado e em músculo de ratos machos Wistar.

6- CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem as seguintes conclusões:

- O método da ligadura induziu a periodontite em 28 dias de ligadura, como mostra as radiografias.
- A periodontite induziu resistência a insulina, comprovada pelo ITT e pelo o GTT .
- As concentrações do IR, do IRS-1 , do IRS-2, da Akt e da ERK $\frac{1}{2}$ permaneceram inalteradas, nos animais com periodontite tanto no fígado como no músculo.
- A fosforilação em Tirosina do IR, IRS-1, IRS-2 e ERK $\frac{1}{2}$ e a fosforilação em Serina da Akt foram reduzidas em animais com periodontite tanto no músculo quanto no fígado.
- Houve ativação da JNK $\frac{1}{2}$ e da IKK, enzimas da via da inflamação, e houve um aumento da fosforilação em Serina 307 do IRS-1 no músculo e no fígado de animais com periodontite, indicando resistência à insulina observada neste modelo.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P et al. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *The EMBO Journal* 1996; 15: 6541-51.
- Araki E, Lipes MA, Patti ME, Bruning JC, Haag B, Johnson RS et al. Alternative pathway of insulin signaling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* 1994; 372: 186-90.
- Ataliotis P, Mercola M. Distribution and functions of platelet-derived growth factors and their receptors during embryogenesis. *International Review of cytology* 1997; 172: 95-127.
- Bonora E, Manicardi V, Zavaroni I, Coscelli C, Butturini U. Relationships between insulin secretion, insulin metabolism and insulin resistance in mild glucose intolerance. *Diabetes Metab* 1987; 13:116-121.
- Carlson G L. Insulin resistance in sepsis. *British Journal of Surgery* 2003; 90:259-60.
- Carpenter CL, Cantley IC. Phosphoinositide kinases. *Biochemistry* 1990; 29:11147-11156.
- Carpentier JL, Paccaud JP, Backer J, Gilbert A, Orci L, Kahn CR. Two steps of insulin receptor internalization depend on different domains of β -subunit. *J Cell Biol* 1993; 122:1243-1252.
- Carvalho JBC, Saad MJA. Insulin resistance/ hiperinsulinemia associated diseases not included in the metabolic syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006; 50(2):360-7.
- Carvalho-Filho MA, Ueno M, Carvalho JB, Velloso LA, Saad MJA. Targeted disruption of iNOS prevents LPS induced S-nitrosation of IR/IRS-1 and Akt and insulin resistance in muscle of mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 25 (4).
- Clement S, Krause U, Desmedt F, Tanti JF, Behrends J, Schurmans S et al. The lipid phosphatase SHIP2 controls insulin sensitivity. *Nature* 2001; 409: 92-97.
- Coffer PJ, Jin J, Woodgett JR. Protein kinase B (c-Akt): A multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *The Biochemical Journal* 1998; 335:1-13.
- Cuatrecasas P. Affinity chromatography and purification of insulin receptor of liver cell membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972, 69:1277-81.

- Davis RJ. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 1994, 268:14553-6.
- Dempsey WP, Doyle SE, He JQ, Cheng G. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2003, 14: 193-209
- Deprez J, Vertommen D, Alessi DR, Hue L, Rider MH. Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other protein kinases of insulin signaling cascades. *The Journal of Biological Chemistry* 1997; 272: 17269-75.
- Ebina Y, Ellis L, Jarnagin K, Edery M, Graf L, Clauser E et al. The human insulin receptor c DNA : the structural basis for hormone-activated transmembrane signaling. *Cell* 1985; 40: 747-758.
- Fantin VR, Sparling JD, Slot JW, Keller SR, Lienhard GE, Lavan BE. Characterization of insulin receptor substrate 4 in human embryonic kidney 293 cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 10726-32.
- Folli F, Saad MJA, Backer JM, Kahn CR. Insulin stimulation phosphatidylinositol 3-kinase activity and association with IRS-1 in liver and muscle of intact rat. *J Biol Chem* 1992; 267: 22171-22177.
- Freychet P, Roth J, Neville DM. Insulin receptor in the liver: specific binding of (125I) insulin to the plasma membrane and its relation to insulin bioactivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971, 68: 1833-7.
- Gasparetti AL. Cold exposure induces tissue-specific modulation of the insulin-signaling pathway in *Rattus norvegicus*. *J Physiol* 2003, 552: 149-162.
- Holzhausen M, Rossa Jr. C, Marcantonio Jr E, Nassar PO, Spolidorio DMP, Spolidorio LC.. Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature induced periodontitis in rats. *J Periodontol* 2002; 73: 1030–1036.
- Hotamisligil GS, Peraldi P, Budvari A, Ellis RW, White MF, Spiegelman B M. IRS-1 mediated inhibition of Insulin Receptor Tyrosine kinase activity in TNF α and obesity induce insulin resistance. *Science* 1996; 271: 665-668.

- Iacopino AM, Cutler CW. Pathophysiological relationships between periodontitis and systemic disease: recent concepts involving serum lipids. *J Periodontol* 2000; 71:1375-81.
- Ishihara H, Sasaoka T, Hori H, Wada T, Hirai H, Haruta T, Langlois WJ, Kobayashi M. Molecular cloning of rat SH2-containing inositol phosphatase 2 (SHIP2) and its role in the regulation of insulin signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 260: 265-272.
- Johnson JH. Effects of local irritation and dextran sulphate administration on periodontium of the rat. *J Periodontal Res* 1975; 10 (6): 236-244.
- Kahn CR, Crettaz M. Insulin receptors and the molecular mechanism of insulin action. *Diabetes Metab Rev* 1985; 1: 35-32.
- Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 2000;106: 473-481.
- Kahn BB. Type 2 diabetes: When insulin secretion fails to compensate for insulin resistance. *Cell* 1998; 92: 593-596.
- Kahn SE, Prigeon RL, McCulloch DK, Beard JC, Palmer JP, Porte JR et al. Quantification of the relationship between insulin sensitivity and β -cell function in human subjects. Evidence for a hyperbolic function. *Diabetes* 1993; 42:1663-1672.
- Kasuga M, Karlsson FA, Kahn CR. Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-Dalton subunit of its own receptor. *Science* 1982; 215: 185-7.
- Kido Y, Burks DJ, Withers DJ, Ren JM, White MF et al. Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1 and IRS-2. *J Clin Invest* 2000; 105:199-205.
- Kitamura T, Nakae J, Kitamura Y, Kido Y, White MF, Arden CK, Accili D et al. The forkhead transcription factor *Foxo1* links insulin signaling to *Pdx1* regulation of pancreatic β cell growth. *J Clin Invest* 2002; 110:1839-1847.
- L'Allemain G. Deciphering the Map kinase pathway. *Progress in Growth Factor Research* 1994; 5, 291-334.
- Lavan BE, Lane WS, Lienhard GE. The 60-kDa Phosphotyrosine Protein in Insulin-treated Adipocytes Is a New Member of the Insulin Receptor Substrate Family *J Biol Chem* 1997; 272: 11439-11443.

- Loddick SA, Rothwell NJ. Mechanisms of tumor necrosis factor α action on neurodegeneration: Interaction with insulin-like growth factor-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 9449-9451.
- Luo Z, Fujio Y, Kureishi Y, Rudic DR, Fulton D, Sessa WC, Walsh K et al. Acute modulation of endothelial Akt/PKB activity alters nitric oxide-dependent vasomotor activity in vivo. *J Clin Invest* 2000; 106: 493-499.
- Matthaei S, Stumvoll M, Kellerer M, Haring HU. Pathophysiology and pharmacological treatment of insulin resistance. *Endoc Rev* 2000; 21(6):585-618.
- Nakae J, Kitamura T, Kitamura Y, Biggs WH 3RD, Arden KC, Accili D. The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Dev Cell* 2003; 4: 119-29.
- Nassar CA, Nassar PO, Inagaki NS, Girelli CJ. The effect of antiinflammatory drug in the development of induced periodontal disease. Radiographic evaluation in rats. *Rev Odontol*. 2003;32 (2): 125-130.
- Prada PO, Coelho MS, Zecchin HG, Dolnokoff MS, Gasparetti AL, Furukawa LN, Saad MJ, Heimann JC. Low salt intake modulates insulin signaling, JNK activity and IRS-1 ser 307 phosphorylation in rats tissues. *J Endocrinol* 2005; 185 (3):429-37.
- Previs S, Withers DJ, White Ren JM, White MF, Shulman G. Contrasting effects of IRS-1 *versus* IRS-2 gene disruption on carbohydrate and lipid metabolism *in vivo*. *The Journal of Biological Chemistry* 2000; 275: 38990-94.
- Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Dong H, Accili D, Spiegelman MB. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 interaction. *Nature* 2003, 423: 550-5553.
- Saad MJA, Araki E, Miralpeix M, Rothenberg PL, White MF, Kahn CR. Regulation of insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. *J Clin Invest* 1992; 90: 1839-1849.
- Saad MJA, Folli F, Kahn J, Kahn CR. Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexametasone-treated rats. *J Clin Invest* 1993; 92: 2065-2072.

Saad MJA, Pimenta WP, Paccola GMGF. Effect of glucose ingestion on peripheral glucose metabolism in normal man. *Diabete & Met* 1989; 15:5-10.

Saad MJ, Folli F, Araki E, Hashimoto N, Csermely P, Kahn CR. Regulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-F442A adipocytes. Effects of differentiation, insulin, and dexamethasone. *Mol Endocrinol* 1994; 8(5):545-57.

Shepherd PR, Withers DJ, Siddle K. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochemical Journal* 1998; 333: 471-490.

Sun XJ, Rothenberg PA, Kahn CR & AL. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 1991; 352:73-77.

Sun XJ, Miralpeix M, Myers MGJ, Glasheen E, Backer JM, Kahn CR, White MF. Expression and function of IRS-1 in signal transmission. *J Biol Chem* 1992; 266:22662-22672.

Sun, X.-J.; Wang, L.-M.; Zhang, Y.; Yenush, L.; Myers, M. G. Jr.; Glasheen, E.; Lane, W. S.; Pierce, J. H.; White, M. F. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature*, 377: 173-177, 1995.

Sun, X. J.; Goldberg, J. L.; Qiao, L. Y.; Mitchell, J. J. Insulin-induced insulin receptor substrate-1 degradation is mediated by the proteasome degradation pathway. *Diabetes* 48: 1359-1364, 1999.

Takata Y, WEBSTER NJG, OLEFSKY JM. Mutation of two carboxyl terminal tyrosines results in an insulin receptor with normal metabolic signaling properties. *J Biol Chem* 1988; 263: 8912-17.

Tamemoto H, Kadowaki T, Terauchi Y, Ueki K, Kaburagi Y, Satoh S. et al. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 1994; 372(6502):182-6.

Tanti JF, Gremeaux T, Van Obberghen E, Le Marchand-Brustel Y. Insulin receptor substrate -1 is phosphorylated by serine kinase activity of phosphorylated by serine kinase activity of phosphatidylinositol 3-kinase. *Bio Chem J* 1994; 304:17-21.

- Tanti JF, Grillo S, Gremaux T, Coffe PJ, Van Obberghen, E, Le Marchand-Brustel Y. Potencial role of protein kinase B in glucose transporter 4 translocation in adipocytes. *Endocrinology* 1997; 138, 2005-10.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J 1979 Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350-4354.
- Van Obberghen E. Signalling through the insulin receptor and the insulin-like growth factor-1 receptor. *Diabetologia* 1994, 37 Suppl. 2: S 125-34.
- Wang Q, Somwar R, Bilan PJ, Liu Z, Jin J, Woodgett JR et al. Protein kinase B / Akt participates in Glut 4 translocation by insulin in L6 myoblasts. *Molecular and Cellular Biology* 1999; 19: 4008-18.
- White MF. The IRS signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem* 1998; 182: 3-11.
- White MF. IRS proteins and the common path to diabetes. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism* 2002; 283: 413- 422.
- White MF. Insulin signaling in health and disease. *Science* 2003, 302:1710-11.
- Yoshikawa T, Noguchi Y, Satoh S. Inhibition of IRS-1 phosphorylation and the alterations of Glut 4 in isolated adipocytes from cachectic tumor-bearing rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, 256: 676-681.
- Zhang Q, Carter EA, Ma BY, White M, Fischman AJ, Tompkins RG. Molecular mechanism(s) of burn-induced insulin resistance in murine skeletal muscle: role of IRS phosphorylation. *Life Sci* 2005; 77(24):3068-77.
- Zecchin HG, Bezerra RMN, Carnevalheira JBC, Carnevalho-Filho MA, Metzke K, Franchini KG, Saad MJA. Insulin signalling pathways in aorta and muscle from two animal models of insulin resistance-the obese middle-aged and the spontaneously hypertensive rats. *Diabetologia* 2003; 46:479-491.

8- APÊNDICE

Periodontitis Modulates Insulin Signaling, c-Jun N-terminal Kinase Activity, IKK Activity, and Insulin Receptor Substrate-1^{ser 307} Phosphorylation in Muscle and Liver of Wistar Rats

Karen Cristiane Higa^a, Rosa Mourão^a, Patrícia Oliveira Prada^a, Patrícia Nassar^b, Luis Carlos Nassar^b, Luis Carlos Spolidório^b, and Mario José Abdalla Saad^a

^aDepartment of Internal Medicine, State University of Campinas, ^bDepartment of Physiology and Pathology, Araraquara Dental School, São Paulo State University

Corresponding author: M. J. A. Saad, Departamento de Clínica Médica, FCM-UNICAMP, Cidade Universitária, Campinas, São Paulo, 13083-970, Brazil. Phone/Fax: 55-19-3788-8950, e-mail: msaad@fcm.unicamp.br

Fax : + 55-19-37888950

Abstract

Periodontitis has been associated with insulin resistance, but the molecular mechanisms of this association have not yet been established. Involvements of c-jun N-terminal kinase (JNK) activity and IKK activity have been implicated in the induction of insulin resistance by increasing inhibitory IRS-1^{ser307} phosphorylation. In this study, we evaluated the regulation of insulin signaling, JNK and IKK activation and IRS-1^{ser307} phosphorylation by immunoprecipitation and immunoblotting in the liver and muscle of rats with periodontitis induced by ligature for 28 days. Chronic inflammatory periodontal disease (periodontitis) leads to gingival inflammation, destruction of periodontal tissues and loss of alveolar bone. Periodontitis increased blood glucose and plasma insulin levels during the OGTT, and reduced the glucose disappearance rate in the insulin tolerance test, characterizing a state of insulin resistance. In periodontitis rats we observed a reduction in insulin-induced IR, IRS-1, IRS-2, Akt phosphorylation in liver and muscle, compared to controls. JNK and IKK activity and IRS-1^{ser307} phosphorylation were higher in the tissues of rats with periodontitis. In summary, the insulin resistance, induced by periodontitis, is accompanied by activation of the JNK and IKK pathways and IRS-1^{ser307} phosphorylation. The impairment of the insulin signaling in these tissues may lead to insulin resistance in periodontitis.

Introduction

Many studies provide evidence that inflammatory states may induce a chronic state of insulin resistance, even if subjects have not previously had diabetes [1-3].

Chronic inflammatory periodontal disease [periodontitis] represents a primarily anaerobic Gram-negative oral infection that leads to gingival inflammation, destruction of periodontal tissues, loss of alveolar bone and eventual exfoliation of teeth in severe cases [4-5]. Recent studies have indicated that periodontitis may produce alterations in systemic health and severe periodontal disease often coexists with severe diabetes mellitus [6]. It is possible that periodontal disease may aggravate diabetes because periodontal infection may induce a state of insulin resistance [7]. However, the molecular mechanism by which periodontitis induces insulin resistance has not yet been investigated.

At the molecular level, insulin signaling initiates when activation of the IR results in tyrosine phosphorylation of IRS proteins. Phosphorylated IRSs then bind proteins containing Src homology 2 domains, such as the p85 regulatory subunit of phosphatidylinositol 3 kinase [PI-3K] [8,9]. Downstream from PI-3K, the serine/threonine kinase Akt triggers insulin effects on the liver, such as glycogen synthesis and the suppression of hepatic glucose production. Akt on the muscle effects glycogen synthesis and migration of GLUT 4 to the cellular membrane.

In addition, a second postreceptor insulin signaling pathway involves the phosphorylation of Shc and activation of Ras, Raf, MEK and mitogen-activated protein (MAP) kinases (Erk 1 and 2), which is related to cellular growth [10-11].

The inhibition of signaling downstream of the insulin receptor is a primary mechanism through which inflammatory signaling leads to insulin resistance. Exposure of cells to TNF α or elevated levels of free fatty acids stimulates inhibitory phosphorylation of serine residues of IRS-1 [12-13].

Several serine/threonine kinases are activated by inflammatory or stressful stimuli and contribute to the inhibition of insulin signaling, including JNK and inhibitor of NF κ B kinase (IKK β). The 3 members of the JNK group of serine/threonine kinases, JNK-1, -2, and -3, belong to the MAPK family and regulate multiple activities in development

and cell function, mainly through their ability to control transcription by phosphorylating activator protein-1 (AP-1) proteins, including c-Jun and JunB [15]. JNK has recently emerged as a central metabolic regulator, playing an important role in the development of insulin resistance in obesity. In response to stimuli such as ER stress, cytokines, and fatty acids, JNK is activated, where upon it associates with and phosphorylates IRS-1 on Ser307, impairing insulin action [16,17,18]. IKK β can affect insulin signaling through at least 2 pathways. Firstly, it can directly phosphorylate IRS-1 on serine residues [19,20]. Secondly, it can phosphorylate inhibitor of NF κ B, thus activating NF κ B, a transcription factor that, among other targets, stimulates production of multiple inflammatory mediators, including TNF and IL-6 [21]. Mice heterozygous for IKK β are partially protected against insulin resistance due to lipid infusion, high-fat diet, or genetic obesity [22, 23].

It is known that periodontitis increases production of TNF α and interleukins [24], which have been reported to lower insulin sensitivity [25], probably through activation of JNK and NF κ B pathways. In this study, we evaluated the effect of periodontitis on insulin sensitivity, insulin signaling and JNK and NF κ B activation in the liver and muscle of male Wistar rats.

EXPERIMENTAL/ MATERIALS AND METHODS

Materials

Male Wistar rats were provided by the State University of Campinas Central Breeding Center [Campinas, Brazil]. Anti-pY, anti-IR β , anti-IRS-1, anti-IRS-2, anti-Akt1/2, anti-phospho-JNK, and anti-JNK1, anti-I κ B- α , anti-phospho-ERK, anti-ERK1/2 and anti-IKK β antibodies were from Santa Cruz Technology [Santa Cruz, CA]. Anti-phospho-Akt was from Cell Signaling Technology [Beverly, MA]. Anti-phospho-IRS-1^{ser307} was obtained from Upstate Biotechnology, Inc. [Lake Placid, NY]. Human recombinant insulin was from Eli Lilly and Co. [Indianapolis, IN]. Routine reagents were purchased from Sigma Chemical Co. [St. Louis, MO] unless specified elsewhere.

[¹²⁵I]Protein A was obtained from Amersham [Amersham Biosciences Group, Little Chalfont, UK].

Experimental animals

All experiments were approved by the Ethics Committee at the State University of Campinas. Six-week-old male Wistar rats were divided into two groups with similar body weights [156 ± 4 g], control group and periodontitis group and both were assigned to receive a standard rodent chow and water *ad libitum*.

Protocol of experimental periodontal disease

Animals were subjected to experimental periodontitis. After general anesthesia with intramuscular injection of 0.05ml/100g body weight of ketamine [Francotar[®], Virbac do Brazil Ind. e Com. Ltda, São Paulo, Brazil] and 0.1ml/100g body weight of Diazepam, a cotton thread ligature was surgically placed around the cervix of the mandibular first molar on the left side. The ligature was knotted on the vestibular side, so that it remained subgingivally in the palatinal side [26, 27].

Radiographic analysis

The mandibles were carefully removed, and soaked in 4% paraformaldehyde for 48 h. Then, in order to measure the amount of bone, standardized digital radiographs were obtained with the use of a computerized imaging system, CDR^R [Francotar[®]] [27]. Electronic sensors were exposed at 65 KV and 10 mA. The source-to-film distance was always set at 50 cm. The amount of alveolar bone loss, expressed by the distance from the alveolar bone crest to the cemento–enamel junction, was measured [in mm] three times, in different days and by the same examiner, for each mesial surface of the mandibular first molars on each radiograph [27].

Experimental animals and research protocols

Six-week-old male Wistar rats [*R. norvegicus*] from the University of Campinas Central Animal Breeding Center were used in the experiments. The rats were allowed ad libitum access to standard rodent chow and water. Food was withdrawn 12 h before the experiments. All experiments were conducted in accordance with the principles and procedures described by the National Institutes of Health Guidelines for the Care and Use of Experimental Animals and were approved by the State University of Campinas Ethical Committee.

Glucose tolerance test (GTT)

Oral GTT was performed, after 25 days of ligature-induction. Food was withdrawn 6 h before the test and the rats were anesthetized. An unchallenged sample was collected (time 0), and then a solution of 25% glucose (1.75 g/kg body weight) was administered by gavage. Blood samples were collected from the tail at 15, 30, 60, 90, and 120 min for determination of glucose and insulin concentrations [28].

Insulin tolerance test (ITT)

To perform an intraperitoneal ITT, food was withdrawn 6 h before the test and the rats were anesthetized. An unchallenged sample was collected (time 0), and then insulin (150 U/kg body weight) was injected into the peritoneal cavity, and blood samples were collected at 5, 10, 15, 20, 25 and 30 min from the tail for serum glucose determination. The constant rate for glucose disappearance (Kitt) was calculated using the formula, $0.693/t_{1/2}$. Glucose half-time ($t_{1/2}$) was calculated from the slope of the least-square analysis of plasma glucose concentrations during the linear decay phase [29].

Tissue extraction and immunoprecipitation

Rats were anesthetized with sodium thiopental and used 10–15 min later. As soon as anesthesia was assured by the loss of pedal and corneal reflexes, the abdominal cavity was opened, the portal vein was exposed, and 0.2 ml normal saline with or without insulin (200 µg) were injected. At 30 sec after the insulin injection, the liver was removed, and 90 sec later, muscle was removed, minced coarsely, and homogenized immediately in

extraction buffer, as described elsewhere [30]. Extracts were then centrifuged at 11,000 rpm and 4 °C for 20 min to remove insoluble material, and the supernatants were used for immunoprecipitation with α -IR, α -IRS-1 and -2, and protein A-Sepharose 6MB (Pharmacia, Uppsala, Sweden).

Protein analysis by immunoblotting

The precipitated proteins and/or whole-tissue extracts were treated with Laemmli sample buffer [31] containing 100 mM dithiothreitol and heated in a boiling water bath for 5 min, after which they were subjected to SDS-PAGE in a Bio-Rad miniature slab gel apparatus (Mini-Protean). For total extracts, 250 μ g of proteins were subjected to SDS-PAGE. Electrotransfer of proteins from the gel to nitrocellulose was performed for 120 min at 120 V in a Bio-Rad Mini-Protean transfer apparatus [32]. Nonspecific protein binding to the nitrocellulose was reduced by preincubating the filter for 2 h in blocking buffer (5% non-fat dry milk, 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.02% Tween 20). The nitrocellulose blot was incubated with specific antibodies overnight at 4 °C and then incubated with 125 I-labeled protein A. The results were visualized by autoradiography with preflashed Kodak XAR film. Band intensities were quantified by optical densitometry (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA; model GS300).

Statistical analysis

Experiments were always carried out by studying the groups of animals in parallel control animals vs. periodontitis animals). Data are means $\pm$ SEM accompanied by the indicated number of independent experiments. For comparisons, one-way ANOVA was used; where F ratios were significant, further comparisons were made using the Bonferroni test. The significance level was set at a p value of less than 0.05 .

RESULTS

Animal characteristics

The body weights were similar in the two groups (c: 235 ± 36 g vs p: 241 ± 23 g). The periodontitis rats demonstrated an increase in the area of blood glucose (c: $12899 \pm 11,7 \text{ mg/dL.min}$ vs p: $14873 \pm 9,9 \text{ mg/dL.min}$ $p < 0.05$) (Fig. 1A, 1B). Animals with periodontitis were more insulin resistant than the control rats, as expressed by their higher area of serum insulin concentrations (c: $31.4 \pm 0,08$ vs p: $72.3 \pm 0,13 \text{ ng/ml.min}$ $p < 0.05$) (Fig. 2A, 2B) and lower plasma glucose disappearance rates measured by the thirty minute insulin tolerance test (K_{it} c: $4.88 \pm 0.56\%/min$ vs K_{it} p: $2.17 \pm 0.38\%/min$, $n=5$ each, $p=0.05$) (Fig. 3A, 3B). At 28 days of ligature, this group showed significant increases in mean bone loss when compared with the group control (c: 0.016 ± 0.001 vs p: 0.032 ± 0.001 , $p < 0.0001$) (Fig. 4A, 4B).

Insulin signalling in skeletal muscle from control and animals with periodontitis

There was no difference in the IR β protein expression in the muscle of control and periodontitis rats (Fig. 5B). Animals with periodontitis showed a significantly reduced insulin-stimulated IR tyrosine phosphorylation in muscle when compared with the control group (p: $85 \pm 7\%$ vs c: $100 \pm 4\%$, $n=5$; Fig. 5A).

There was no difference in the IRS-1 protein expression in the muscle of control and periodontitis rats (Fig. 5D). Animals with periodontitis showed a significantly reduced insulin-stimulated IRS-1 tyrosine phosphorylation in muscle when compared with the control group (Fig. 5C, c: $100 \pm 5\%$ vs p: $68 \pm 2\%$, $n=5$, $p < 0.05$).

There was no difference in the IRS-2 protein expression in the muscle of control and periodontitis rats (Fig. 5F). Animals with periodontitis showed a significantly reduced insulin-stimulated IRS-2 tyrosine phosphorylation in muscle when compared with the control group (c: $100 \pm 5\%$ vs p: $53 \pm 2\%$, $n=5$; Fig. 5E).

Insulin-stimulated Akt serine phosphorylation was significantly decreased in animals with periodontitis when compared with the control group (c: $100 \pm 4\%$ vs p: $66 \pm 1\%$, $n=5$, $p < 0.05$; Fig. 5G). Akt protein levels did not differ among the groups in this study (Fig. 5H).

Insulin-stimulated ERK1/2 tyrosine phosphorylation showed a significant decrease in muscle from animals with periodontitis when compared with the control group (c: $100 \pm 4\%$ vs p: $80 \pm 3\%$, n=5; Fig. 5 I). ERK 1/2 protein levels did not differ among the groups in this study (Fig. 5 J).

IRS-1 serine 307 phosphorylation in skeletal muscle from animals with periodontitis demonstrated a significant increase when compared with control group (c: $100 \pm 8\%$ vs p: $160 \pm 3\%$, n=5, $p < 0.05$; Fig. 5K).

JNK $\frac{1}{2}$ phosphorylation was significantly increased in muscle from animals with periodontitis when compared with the control group (p: $140 \pm 1\%$ vs c: $100 \pm 1\%$, n=5; Fig. 5 L).

The expression of I κ B- α was reduced in muscle in the periodontitis group when compared with the control group (p: $30 \pm 5\%$ vs c: $100 \pm 1\%$, n=5; Fig. 5 M).

Insulin signalling in liver from ligature rats and control animals

There was no difference in the IR β protein expression in the liver of control and periodontitis rats (Fig. 6B). Animals with periodontitis showed a significantly reduced insulin-stimulated IR tyrosine phosphorylation in liver when compared with the control group (p: $38 \pm 3\%$ vs c: $100 \pm 5\%$, n=5; Fig. 6 A).

There was no difference in the IRS-1 protein expression in the liver of control and periodontitis rats (Fig. 6D). Animals with periodontitis showed a significantly reduced insulin-stimulated IRS-1 tyrosine phosphorylation in liver when compared with the control group (c: $100 \pm 4\%$ vs p: $55 \pm 1\%$, n=5; Fig. 6 C).

There was no difference in the IRS-2 protein expression in the liver of control and periodontitis rats (Fig. 6 F). Animals with periodontitis demonstrated a significantly reduced insulin-stimulated IRS-2 tyrosine phosphorylation in muscle when compared with control group animals (c: $100 \pm 2\%$ vs p: $45 \pm 1\%$, n=5; Fig. 6 E).

Insulin-stimulated Akt serine phosphorylation was significantly decreased in animals with periodontitis when compared with the control group (c: $100 \pm 8\%$ vs p: $69 \pm 5\%$, n=5, $p > 0.05$, Fig. 6 G). Akt protein levels did not differ among the groups in this study (Fig. 6 H).

Insulin-stimulated ERK1/2 tyrosine phosphorylation was significantly decreased in liver of animals with periodontitis when compared with the control group (c: $100 \pm 8\%$ vs p: $78 \pm 4\%$, $n=5$, Fig. 6 I). ERK 1/2 protein levels did not differ among the groups in this study (Fig. 6 J).

IRS-1 serine 307 phosphorylation in liver from animals with periodontitis showed a significant increase when compared with the control group (c: $100 \pm 8\%$ vs p: $140 \pm 12\%$, $n=5$, $p<0.05$). (Fig. 6 K, $n=5$).

JNK $\frac{1}{2}$ phosphorylation showed a significant increase in liver from animals with periodontitis when compared with the control group (p: $150 \pm 3\%$ vs c: $100 \pm 2\%$, $n=5$; Fig. 6 L).

The expression of $I\kappa\beta$ - α was reduced in the liver of the periodontitis group when compared with the control group (p: $30 \pm 5\%$ vs c: $100 \pm 1\%$, $n=5$; Fig. 6 M).

DISCUSSION

Chronic inflammatory periodontal disease (periodontitis) represents a primarily anaerobic gram-negative oral infection that leads to gingival inflammation, destruction of periodontal tissues and loss of alveolar bone [24]. In the present study, we induced periodontitis in rats and showed that these animals developed a state of insulin resistance, characterized by altered insulin signaling in liver and muscle.

We induced periodontitis in rats through a cotton ligature in the lower left first molar to induce this experimental disease. The periodontitis was characterized by a loss of alveolar bone. Animals with periodontitis demonstrated metabolic characteristics of insulin resistance. They presented higher insulin levels during the OGTT and reduced glucose disappearance rate in the ITT, characterizing a state of reduced insulin sensitivity. The mechanism underlying this insulin resistance is not fully understood, thus, in the present study we evaluated the *in vivo* insulin stimulated tyrosine phosphorylation of the insulin receptor, IRS-1, IRS-2 and Akt in the liver and muscle of rats with periodontitis.

In rats with periodontitis there was a decrease in insulin-induced IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation accompanied by a decrease in Akt phosphorylation in liver and muscle. These findings may be of biological significance since IRS-1/2 /Akt pathway is

linked to activation of glucose transport in muscle and glycogen synthesis in liver and muscle [33-36]. A reduction in the activation of this pathway in rats with periodontitis may have a role in insulin resistance in these animals [37].

There are a number of possible mechanisms that may lead to an impairment of the insulin-signaling pathway in rats with periodontal disease. Our results show that increased serine phosphorylation of IRS-1 may be one of these mechanisms. Serine phosphorylation of IRS proteins is believed to be a major mechanism of suppression of IRS-1 activity that contributes to insulin resistance [38, 39]. Regulation of serine phosphorylation of IRS proteins has been one of the fields of interest in the search for the molecular mechanism of insulin resistance that may occur, at least in part, by inducing IRS-1 serine phosphorylation.

JNK and IKK β are serine kinases that mediate interleukin and TNF- α signaling [40 and 41]. Recently, these kinases have been linked to the regulation of insulin signaling by several studies [41-44]. It is suggested that JNK and IKK β may contribute to insulin resistance by phosphorylating IRS-1 at serine 307, and that this phosphorylation leads to the inhibition of the IRS-1 function [16, 41, 43 and 44]. In this study, we observed that JNK and IKK β were activated in animals with periodontitis suggesting a possible mechanism for the observed increase in IRS-1 serine phosphorylation at Ser³⁰⁷, indicating that these serine kinases may have a role in periodontitis-induced insulin resistance.

In summary, our results demonstrated that ligature-induced periodontitis is associated with insulin resistance and downregulation of the IR/IRSs/Akt pathway in the liver and muscle, accompanied by an increase in JNK and IKK β activation and in IRS-1 serine phosphorylation at Ser³⁰⁷, suggesting a possible molecular mechanism for the reduced insulin sensitivity.

Acknowledgements

We thank Mr. Luis Janieri, Mr. Márcio Alves da Cruz and Mr. Jósimo Pinheiro for their technical assistance.

REFERENCES

- 1.Kahn BB and Flier JS. Obesity and insulin resistance, *The Journal of Clinical Investigation* 2000;106 (4): 473–481.
- 2.Matthaei S, Stumvoll M, Haring HU et al. Pathophysiology and pharmacological treatment of insulin resistance. *Endocrine Reviews* 2000;21(6):585–618.
3. Carlson GL. Insulin resistance in sepsis. *British Journal of Surgery* 2003; 90 (3): 259–260.
4. Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology and progression of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol* 1992; 63:322-331.
5. Liljenberg B, Lindhe J, Jonsson R et al. Microbiological, histopathological, and immunohistochemical characteristics of progressive periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1994; 21: 720-727.
- 6.Loe H. Periodontal disease: the sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1996; 16:329-334.
- 7.Grossi S, Genco R. Periodontal Disease and diabetes mellitus: A two- Way relationship . *Annals of Periodontology* 1998 ; 3: 51-61.
- 8.Meyer MM, Levin K and Klein HH. Insulin signalling in skeletal muscle of subjects with or without type II-diabetes and first degree relatives of patients with the disease. *Diabetologia* 2002; 45:813–822.
- 9.Pratipanawatr W, DeFronzo RA, Mandarino LJ et al. Skeletal muscle insulin resistance in normoglycemic subjects with a strong family history of type 2 diabetes is associated with decreased insulin-stimulated insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation. *Diabetes* 2001; 50:2572–2578.
10. Sasaoka T, Ishiki M and Sawa T et al. Comparison of the insulin and insulin-like growth factor 1 mitogenic intracellular signaling pathways. *Endocrinology* 1996;137: 4427–4434.

11. Sasaoka DW, Rose BH and Olefsky JM. Evidence for a functional role of Shc proteins in mitogenic signaling induced by insulin, insulin-like growth factor-1, and epidermal growth factor. *J Biol Chem* 1994; 269: 13689–13694.
12. Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature* 1998; 396:77-80.
13. Hotamisligil GS et al. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996; 271:665-668.
14. Zick Y. Role of Ser/Thr kinases in the uncoupling of insulin signaling. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27(Suppl. 3):S56-S60.
15. Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 2000; 103:239-252.
16. Aguirre V, Davis R, White MF. The c-Jun NH(2)- terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J. Biol. Chem.* 2000; 275; 9047-9054.
17. Ozcan U et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 2004; 306:457-461.
18. Gao Z et al. Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 2004; 18:2024-2034.
19. Yin MJ, Yamamoto Y, and Gaynor RB. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature* 1998; 396:77-80
20. Gao Z et al. Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. *J Biol Chem* 2002; 277:48115-48121.
21. Shoelson SE, Lee J, and Yuan M. Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27(Suppl. 30):S49-S52.
22. Yuan M. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science* 2001; 293:1673-1677.

23. Kim JK. Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J Clin Invest* 2001; 108:437-446.
24. Iacopino MA, Cutler WC. Pathophysiological relationships between periodontitis and systemic disease: Recent concepts involving serum lipids. *J Periodontol* 2000; 71: 1375-1382.
25. Hotamisligil. The role of TNF- α and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *Genes & Obesity* 1999; 245:621-625.
26. Sallay K, Behling UH, Nowotny A et al. Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat. *J Periodont Res* 1982 ;17: 263-274.
27. Holzhausen M, Nassar PO, Spolidorio LC et al. Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature induced periodontitis in rats. *J Periodontol* 2002; 73: 1030-1036.
28. Ohki Y, Orimo H, Ohkawa T et al. Indexes of insulin resistance using the oral glucose tolerance test (O-GTT) in Japanese children and adolescents. *J. Nippon Med. Sch.* 2004; Apr; 71(2):84-7.
29. Bonora E, Manicardi V, Butturini U. Relationships between insulin secretion, insulin metabolism and insulin resistance in mild glucose intolerance. *Diabetes Metab* 1987; 13:116-121 .
30. Torsoni MA, Saad MJ, Velloso LA et al. Molecular and functional resistance to insulin in hypothalamus of rats exposed to cold. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285:E216-E223 .
31. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
32. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:4350-4354.
33. Tanti JF, Grillo S, Le Marchand-Brustel Y et al. Potencial role of protein kinase B in glucose transporter 4 translocation in adipocytes. *Endocrinology* 1997;138: 2005-10.

34. Wang Q, Somwar R, Woodgett JR et al. Protein kinase B / Akt participates in Glut 4 translocation by insulin in L6 myoblasts. *Molecular and Cellular Biology* 1999; 19: 4008-18.
35. Alessi DR, Andjelkovic M, Cohen P et al. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *The EMBO Journal* 1996; 15: 6541-51.
36. Coffey PJ, Jin J, Woodgett JR. Protein kinase B (c- Akt): A multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *The Biochemical Journal* 1998; 335:1-13.
37. Carvalho CR, Brenelli SL Saad MJ et al. Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. *Endocrinology* 1996; 137:151-159.
38. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001; 414:799-806.
39. Miden A, Lin A, Claret FX, Abo A, et al. Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* 1995; 81:1147-1157.
40. Derijard B, Hibi M, Wu IH et al. JNK 1 : a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun transcriptional activity by small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* 1994; 76:1025-1037.
42. Hirosumi J, Tuncman G, Hotamisligil GS et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 2002; 420: 333-336.
43. Aguirre V, Shoelson SE, White MF et al. Phosphorylation of Ser 307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J. Biol. Chem.* 2002; 277:1531-1537.
44. Rui L, Aguirre V, With MF. Insulin /IGF-1 and TNF-alpha stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser307 via distinct pathways. *J. Clin. Invest.* 2001; 107: 181-189.

Table 1- Characteristics of ligature and control groups.

Groups	Body weight (g)	Area of Blood glucose (mg/dl.min)	Area of Serum insulin (ng/ml.min)	K _m (%/min)	Mean alveolar bone loss (mm)
Control	235,2±36,82 (n=5)	12898,5±11,7 b (n=5)	31,37±0,08 b (n=5)	4.88±0.56 b (n=5)	0,016±0,001a (n=5)
Periodontitis	241,2±23,40 (n=5)	14873,4±9,9 b (n=5)	72,30±0,13 b (n=5)	2.17±0.38 b (n=5)	0,032±0,001a (n=5)

Data are given as means ± SEM. p values of less than 0.05 were considered to be significantly different.

^ap<0.0001 vs young controls

^bp<0.05 vs young controls

Legend

The area of blood glucose (c: 12898,5 vs p: 15873,45, $p<0.05$) (Fig. 1A, 1B). The area of serum insulin concentrations (c: 31,37 vs p: 72,30, $p<0.05$) (Fig. 2A, 2B). The plasma glucose disappearance rates measured by the thirty minute insulin tolerance test (K_{itt} c: $4.88\pm0.56\%/min$ vs K_{itt} p: $2.17\pm0.38\%/min$, $n=5$ each, $p=0.05$) (Fig. 3A, 3B). The alveolar bone loss (c: $0,016\pm0,001$ vs p: $0,032\pm0,001$, $p<0.0001$) (Fig. 4A, 4B).

Fig. 5A–M. Insulin signalling in skeletal muscle of ligature and control Wistar rats. Insulin-stimulated insulin receptor tyrosine phosphorylation (A), insulin receptor expression (B), insulin-stimulated IRS-1 tyrosine phosphorylation (C), IRS-1 expression (D), insulin-stimulated IRS-2 tyrosine phosphorylation (E), IRS-2 expression (F), insulin-stimulated Akt serine phosphorylation (G), Akt expression (H), insulin-stimulated ERK1/2 tyrosine phosphorylation (I) and ERK1/2 expression (J), IRS-1 serine 307 phosphorylation (K) JNK tyrosine phosphorylation (L), JNK expression (M). Values are shown as the means $\pm$ SEM and are expressed as a percentage of the insulin-stimulated control (100%). *, $p<0.05$; **, $p<0.0001$.

Fig. 6 A–M. Insulin signalling in liver of ligature and control Wistar rats. Insulin-stimulated insulin receptor tyrosine phosphorylation (A), insulin receptor expression (B), insulin-stimulated IRS-1 tyrosine phosphorylation (C), IRS-1 expression (D), insulin-stimulated IRS-2 tyrosine phosphorylation (E), IRS-2 expression (F), insulin-stimulated Akt serine phosphorylation (G), Akt expression (H), insulin-stimulated ERK1/2 tyrosine phosphorylation (I) and ERK1/2 expression (J) IRS-1 serine 307 phosphorylation (K) JNK tyrosine phosphorylation (L), JNK expression (M). Values are shown as the means $\pm$ SEM and are expressed as a percentage of the insulin-stimulated control (100%). *, $p<0.05$; **, $p<0.0001$.