

MARIA SARA DE LIMA COUTINHO MATTERA

**AVALIAÇÃO DA FOSFORILAÇÃO DA AKT E DO
CONTEÚDO DA PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE
GLICOSE GLUT4 EM TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO
DE RATOS ADULTOS, PROLES DE RATAS COM DOENÇA
PERIODONTAL**

MARIA SARA DE LIMA COUTINHO MATTERA

**AVALIAÇÃO DA FOSFORILAÇÃO DA AKT E DO
CONTEÚDO DA PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE
GLICOSE GLUT4 EM TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO
DE RATOS ADULTOS, PROLES DE RATAS COM DOENÇA
PERIODONTAL**

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

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

M435a Mattera, Maria Sara de Lima Coutinho.
Avaliação da fosforilação da AKT e do conteúdo da proteína transportadora de glicose GLUT4 em tecido muscular esquelético de ratos adultos, proles de ratas com doença periodontal / Maria Sara de Lima Coutinho Mattera. - Araçatuba, 2015
83f. : il.; tab. + 1 CD-ROM

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

1. Doenças periodontais 2. Transportador de glicose tipo 4 3. Resistência à insulina 4. Diabetes mellitus tipo 2 5. Inflamação I. Título.

CDD 612

Dados Curriculares

Nascimento: 08.04.1991, Bilac-SP.

Filiação: Maria Alice de Lima Coutinho

Luiz Carlos Coutinho

2009/2013: Curso de Graduação em Farmácia e Bioquímica pela Universidade Paulista – UNIP.

2013/2015: Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia do *Campus* de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

Dedico este trabalho

Ao meu esposo, amor, amigo e companheiro de todas as horas, Rafael Wilian Mattera, que sempre me incentivou e me apoiou incondicionalmente.

Aos meus pais Maria Alice e Luiz Carlos pelo carinho, paciência, amor e por serem a minha fortaleza, pois devo a eles minha formação pessoal e profissional. Sou eternamente grata aos senhores.

A toda minha família e aos grandes amigos que sempre estiveram presentes em toda a jornada.

Agradecimentos

A Deus, por estar presente em toda a minha vida e nunca me desamparar.

À minha orientadora, Doris Hissako Sumida, pela confiança em mim depositada e pelos ensinamentos transmitidos ao longo destes dois anos de mestrado e mais três anos de iniciação científica. Anos que foram primordiais para meu crescimento não só científico como pessoal. A professora Doris é uma orientadora completa, pois ela se preocupa tanto com nosso crescimento intelectual como pessoal. Várias vezes ela, mesmo ocupada, cedia seu tempo para dar conselhos pessoais e levantar nosso ânimo. A minha gratidão e admiração a esta amiga e mãe científica será eterna.

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

À coordenadora do Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Profa. Adj. Sandra Helena Penha de Oliveira.

À diretora e vice-diretor da Faculdade de Odontologia do *Campus* de Araçatuba – UNESP, Profa. Adj. Ana Maria Pires Soubhia e Prof. Titular Wilson Roberto Poi.

A todos os amigos e colegas de laboratório, em especial ao Max Sander de Oliveira da Mota, Fernando Yamamoto Chiba, Renato Felipe Pereira, Natália Francisco Scaramele, Thaís Verônica Saori Tsosura, Jéssica Cristiane Bonilha, Rita de Cássia Alves Nunes, Mariana Lopes Benites, Nayara Rodrigues Alves, Natália Vieira Magalhães, Kelly Cristina dos Santos, Amanda Gomes, Lara Mariano Pinheiro e Leonardo Raniel Figueiredo. Estendo também estes agradecimentos aos colegas que um dia participaram deste grupo de pesquisa: Daisy Jaqueline Shirakashi, Natália Helena Colombo, Patrícia Juvêncio Dias, Alana Carvalho, Rafael Dias Astolpho, Aline Pedro de Melo Yamamoto e Mariane Dias Curbete, pelo companheirismo.

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

Ao Prof. Edilson Ervolino, à Profa. Cristina Antoniali da Silva e à Profa. Leda Maria Pescinini Salzedas, pelo apoio e pelos ensinamentos.

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

Ao Prof. Titular Ubiratan Fabres Machado e à Dra. Maristela Mitiko Okamoto, por permitir o acesso a seu laboratório e auxílio na realização da avaliação do conteúdo de GLUT4.

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

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

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

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

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

Ao meu irmão Levi Danilo Coutinho e a minha cunhada Jéssica Castilho, por estarem presentes nas minhas conquistas.

A minha nova família, Rosameire Mattera, José Carlos Mattera e Rodrigo Mattera, Alécio Mattera e Luzia Mattera que me acolheram de uma forma especial.

Aos meus avós José Arlindo de Lima, Alice de Lima, Laouresto Coutinho (in memoriam) e Maria Coutinho (in memoriam) pelos conselhos que só a experiência pode dar.

A todos, que me ajudaram direta ou indiretamente para conclusão do mestrado, meu muito obrigada pela indispensável ajuda na execução de cada uma das etapas deste trabalho e por amenizarem a aspereza do caminho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro (Bolsa Mestrado – Processo 2013- 08783-4).

Elevo os meus olhos para os montes; de onde me vem o socorro?

O meu socorro vem do Senhor, que fez os céus e a terra.

Salmos 121:1-2

MATTERA, M.S.L.C. **Avaliação da fosforilação da Akt e do conteúdo da proteína transportadora de glicose GLUT4 em tecido muscular esquelético de ratos adultos, proles de ratas com doença periodontal.** 2015. 83f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

RESUMO

A hipótese da programação fetal sugere que estímulos ou agressões durante a vida intrauterina podem resultar em alterações permanentes na fisiologia e metabolismo da descendência, aumentando o risco de doenças na vida adulta. Estudos demonstraram que tanto a doença periodontal (DP) como o aumento do tecido adiposo elevam a concentração plasmáticas de citocinas. E citocinas, como por exemplo, o TNF- α , têm sido relacionadas com a redução da expressão de GLUT4 e resistência à insulina. Sabendo que o GLUT4 é importante para homeostase glicídica, o objetivo do presente estudo foi avaliar em ratos, proles de ratas com doença periodontal ao nascimento, a massa corpórea, e na vida adulta: 1) massa corpórea ao longo de 75 dias de idade; 2) o conteúdo da proteína transportadora de glicose GLUT4 e o seu índice de translocação em tecido muscular esquelético gastrocnêmio (MG); 3) o grau de fosforilação em serina da Akt em MG. As ratas foram distribuídas em dois grupos: a) com doença periodontal (DP), no qual esta doença foi induzida por meio de ligadura com fio de seda ao redor do 1º molar inferior de ambos os lados; b) ratas controle (CN). Após 7 dias da colocação da ligadura, as ratas de ambos os grupos foram colocadas para acasalamento, verificou-se diariamente, por esfregaço vaginal, o dia da copulação. As ratas prenhas foram separadas em caixas individuais. A massa corpórea da prole foi avaliada ao nascimento e durante os 75 dias de idade. Quando os filhotes machos destas ratas completaram 75 dias, realizou-se: 1) dosagem de glicemia e insulinemia; 2) avaliação da proteína transportadora de glicose GLUT4 e seu índice de translocação em MG; 3) avaliação do grau de fosforilação em serina da Akt em MG. Os resultados demonstraram que a doença periodontal materna promove em sua prole ao nascimento baixo peso e na vida adulta: 1) nenhuma alteração nas concentrações plasmáticas de glicose; 2) aumento nas concentrações plasmáticas de insulina; 3) redução na sensibilidade insulínica; 4) diminuição do conteúdo da proteína transportadora de glicose GLUT4 na membrana plasmática e do seu índice de translocação em MG; 5)

diminuição no grau de fosforilação em serina da Akt em MG. Portanto, podemos concluir que a DP materna promove baixo peso ao nascimento e alterações na fase final da sinalização da insulina no músculo esquelético em ratos adultos proles. Estes resultados demonstram o impacto que a doença periodontal tem em curto prazo sobre a vida intrauterina, e em longo prazo na predisposição a certas doenças na fase adulta da prole. Isso reforça a importância que a manutenção da saúde bucal materna tem sobre a saúde geral da prole.

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

MATTERA, M.S.LC. **Evaluation of Akt phosphorylation and glucose transporter protein 4 (GLUT4) content in gastrocnemius skeletal muscle tissue of adult rats, offspring of rats with periodontal disease.** 2015. 83f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

ABSTRACT

The fetal programming hypothesis suggests that intrauterine stimuli or aggression can induce metabolic and physiology changes in offspring, increasing the diseases risk in adulthood. Studies have demonstrated that periodontal disease (PD) and adipose tissue augmentation enhance the cytokines levels. Cytokines such as TNF- α have been associated with reduced GLUT4 expression and insulin resistance. Knowing that GLUT4 is important for glucose homeostasis, the aim of present study was to evaluate in adult rats, offspring of rats with periodontal disease: 1) birth weight and during the 75 days of age; 2) GLUT4 content and its translocation index in gastrocnemius skeletal muscle tissue (GM); 3) Akt serine phosphorylation status in MG. Female Wistar rats were distributed into a control group (CN, n = 4) and a experimental periodontal disease group (PD, n = 4), in which the disease is induced by ligation with silk thread around the 1st molar. Seven days after ligature placement, animals from both groups mated and daily vaginal smears were taken to verify the presence of sperm. Pregnant rats were kept in individual cages. The body weights of the offspring were measured once weekly from birth until 75 days of age. When male offspring of these rats completed 75 days, the experiments were performed: 1) assessment of plasma concentrations of glucose and insulin; 2) evaluation of the GLUT4 content and its translocation index in GM; 3) Akt serine phosphorylation status in GM. The results showed that maternal periodontal disease causes in their offspring low birth weight, and in adulthood: 1) no changes in glycemia; 2) increase in insulinemia; 3) insulin resistance; 4) decrease in GLUT4 content in the plasma membrane and its translocation index in GM; 5) reduction in the Akt serine phosphorylation status in GM. Therefore, we can conclude that maternal periodontal disease causes low birth weight and alterations in the final stage of insulin signaling in skeletal muscle of adult offspring. These findings demonstrate the impact that periodontal disease has on the intrauterine environment in the short-term, and on the long-term predisposition to certain diseases in adulthood of the offspring. This reinforces the importance of maintaining maternal oral health in ensuring the overall health of the offspring.

Keywords: Periodontal diseases. Insulin resistance. Glucose transporter type 4. Type 2 diabetes mellitus. Inflammation.

Lista de Figuras

- Figura 1** **As vias de sinalização insulínica.** O receptor de insulina é uma tirosina quinase que se autofosforila e catalisa a fosforilação de proteínas intracelulares como as proteínas IRS, Shc e Cbl. Após a fosforilação, essas proteínas ligam-se a outras moléculas de sinalização por meio de seus domínios SH2, resultando na ativação de vias de sinalização intracelular como a via da PI 3-quinase, a cascata da MAPK e a ativação do TC10 via CAP/Cbl. Essas vias regulam o transporte de glicose, a síntese de glicogênio, lipídeos e proteínas, coordenando e integrando o metabolismo intermediário (CARVALHEIRA *et al.*, 2002). 24
- Figura 2** Análises radiográficas e histológicas dos primeiros molares inferiores no grupo CN (Figura 2A, 2B e 2C) e no grupo DP (Figura 2D, 2E e 2F). Observa-se que os aspectos radiográficos (2A) e histológicos (Figura 2B e 2C) são compatíveis com um padrão normal no grupo CN, e o que grupo DP apresenta perda óssea alveolar (Figura 2D e 2E) e uma grave resposta inflamatória local (Figura 2E e 2F). Abreviações e símbolos: oa, osso alveolar; tc, tecido conjuntivo; pd, polpa dentária; lp, ligamento periodontal. 35
- Figura 3** Massa corpórea ao nascimento de ratos, proles de ratas controle (PCN) e proles de ratas com doença periodontal (PDP). Os valores são expressos como média \pm EPM, n = 18. * p<0,05 PDP vs. PCN 36
- Figura 4** Massa corpórea semanal de ratos, proles de ratas controle (PCN) e proles de ratas com doença periodontal (PDP) desde o nascimento até 75 dias de idade. Os valores são expressos como média \pm EPM, n = 18. 37
- Figura 5** Ingestão alimentar (média) de ratos, proles de ratas controle (PCN) e proles de ratas com doença periodontal (PDP) do desmame até o final do experimento. Valores expressos como média \pm EPM, n=18. 37
- Figura 6** Avaliação do grau de fosforilação em serina da Akt antes (-) e após (+) o estímulo insulínico em tecido muscular gastrocnêmio de ratos adultos proles de ratas controle (PCN) e de ratas com doença periodontal (PDP). Em **A** autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas a SDS-PAGE (185 μ g). β actina foi utilizada como controle. Em **B**, valores do grau de fosforilação em serina da Akt, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média \pm EPM, n=8. * p <0.05 insulina (-) vs. insulina (+); # p <0.05 PCN (+) vs. PDP (+). 39
- Figura 7** Conteúdo de GLUT4 na membrana plasmática (PM), no microsossoma-enriquecido (M) e o índice de translocação, dos grupos proles de ratas controle (PCN) e proles de ratas com doença periodontal (PDP). Os resultados foram apresentados como média \pm EPM, n=5. A significância foi considerada quando p<0,05. * p<0,05 PCN vs PDP 41

Lista de tabelas

Tabela 1	Perda óssea alveolar e suporte ósseo das ratas mães controle (CN) e ratas mães com doença periodontal (DP).	36
Tabela 2	Peso absoluto (g) e relativo (por 100g de peso corpóreo) do tecido adiposo branco periepididimal (TAB) e músculo gastrocnêmio (MG).	38
Tabela 3	Glicemia (mmol/L), insulinemia (μ UI/mL) e HOMA-IR.	38

Lista de Abreviaturas

- 4-AF: 4-aminofenazona
- A: Ápice
- AMPK: Proteína quinase AMP ativada
- AS160: Substrato da AKT de 160 kDa
- Akt /PKB: Proteína quinase B
- Akt 1: Proteína quinase B 1
- Akt 2: Proteína quinase B 2
- Akt 3: Proteína quinase B 3
- ATF-4: *Activating transcription factor-4*
- ATF-6: *Activating transcription factor-6*
- B: Defeito osso interproximal mais profundo
- BPN: baixo peso ao nascimento
- C: Cúspides
- CAP: Proteínas associadas à Cbl
- Cbl: *Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene*
- CEJ: Junção cimento-esmalte
- CN: Grupo-controle
- CpG: Dinucleotídeo citosina guanina
- DM: Diabetes Mellitus
- DM1: Diabetes Mellitus tipo 1
- DM2: Diabetes Mellitus tipo 2
- DNA: Ácido desoxirribonucléico
- DP: Doença periodontal
- DTT: Ditioneitol
- EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
- eIF2 α : *Eukaryotic translation initiation factor-2*
- EPM: Erro padrão da média
- ERE: Estresse do retículo endoplasmático
- ERK: Quinases reguladas por sinais extracelulares
- ERK1: Quinases reguladas por sinais extracelulares 1

- ERK2: Quinases reguladas por sinais extracelulares 2
- GLUT4: Proteína transportadora de glicose GLUT4
- GOD: Glicose oxidase
- HDAC-1: Histona desacetilase-1
- HDL: Lipoproteína de alta densidade
- HOMA-IR: Modelo de Avaliação da Homeostase - Resistência à Insulina
- IDF: *International Diabetes Federation*
- IL-1: Interleucina -1
- IL-1 β : Interleucina -1 β
- IL-1ra: antagonista do receptor de IL-1
- IL-4: Interleucina-4
- IL-6: Interleucina-6
- IL-10: Interleucina-10
- IL-13: Interleucina-13
- IPF-1: Fator promotor da insulina-1
- IRS: Substrato do receptor de insulina
- IRS-1: Substrato 1 do receptor de insulina
- IRS-2: Substrato 2 do receptor de insulina
- JNK: c-Jun N-terminal quinase
- JNK 1: c-Jun N-terminal quinase 1
- JNK 2: c-Jun N-terminal quinase 1
- JNK 3: c-Jun N-terminal quinase 1
- kDa: kilodalton
- k β (IKK β): Quinase inibidora do fator nuclear K β
- LBP: Proteína ligante de LPS
- LPS: Lipopolissacarídeos
- M: Microssomais - enriquecidas
- MAPK: Proteína quinase ativada por Ras-mitógeno
- MG: músculo esquelético gastrocnêmio
- MTA: Macrófagos do tecido adiposo
- OMS: Organização mundial da saúde
- PAMPs: Padrões moleculares associados à patógenos

- PBP: Nascimento prematuro de bebês com baixo peso
- PCN: Proles de ratas-controle
- PCR: Proteína C-reativa
- PDP: Proles de ratas com doença periodontal
- PDK1: Proteína quinase- 1 dependente de fosfoinositideo
- PDX-1: Duodenopancreático homeobox 1
- PERK: *PKR-like ER-regulated kinase*
- PGE2: Prostaglandina E2
- PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinase
- PKC ζ : Proteína quinase C atípica
- PM: Membrana plasmática
- POD: Peroxidase
- pp185: Substrato do receptor de insulina (IRS-1/IRS-2)
- p85 α : subunidade regulatória (alfa) da PI3K
- p110 β : subunidade catalítica (beta) da PI3K
- PTB: parto prematuro
- PTP1B: Proteína tirosina fosfatase 1B
- RAGE: Receptor para produtos finais de glicação avançada
- RCIU: Restrição de crescimento intrauterino
- RNAm: Ácido ribonucleico mensageiro
- ROS: Espécies reativas de oxigênio
- SB: Solução basal
- SDS: Dodecil sulfato de sódio
- SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida em dodecil sulfato de sódio
- SH2: Domínios com homologia a Src 2
- Shc: Substrato do receptor de insulina, possuidora do domínio SH2, cuja estrutura lembra àquela do colágeno (*Src homology collagen*)
- SIN3A: Transcription regulator family member A
- SK6 (p70S6k): Proteína serina/treonina quinase
- SOP: Suporte ósseo periodontal
- Src: Família de proteína tirosina quinase originalmente identificada por homologia com a proteína oncogênica PP60 (v-Src) do vírus do sarcoma de *rous*.

- TAB: Tecido adiposo branco periepididimal
- TEMED: Tetrametil etilenodiamina
- TC10: *Small guanosine 5'-triphosphate (GTP) binding protein*
- TLRs: Receptores Toll-like
- TLR-4: Receptor Toll-like 4
- TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa
- TP: Tratamento periodontal
- TPO: Trombopoetina
- Tris: Tris(hidroximetil)aminometano
- USF-1: *Upstream stimulatory factor 1*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 Animais	28
3.2 Análise radiográfica da perda óssea alveolar e suporte ósseo periodontal	29
3.3 Análise histológica da perda óssea alveolar	29
3.4 Determinação da glicemia (método de glicose-oxidase)	30
3.5 Determinação de insulinemia	30
3.6 Análise do HOMA-IR	30
3.7 Avaliação do grau de fosforilação da Akt (Ser473) em músculo esquelético	30
3.7.1 Preparação das amostras	30
3.7.2 “Western blotting”	31
3.8 Quantificação do conteúdo de proteína GLUT4	32
3.9 Análise estatística	33
4 RESULTADOS	34
4.1 Análise radiográfica e histológica da inflamação e reabsorção óssea	34
4.2 Análise radiográfica do osso alveolar	36
4.3 Avaliação da massa corpórea (g)	36
4.4 Ingestão alimentar	37
4.5 Peso dos tecidos	38
4.6 Glicemia, Insulinemia e HOMA-IR	38
4.7 Avaliação da fosforilação em serina da Akt	39
4.8 Expressão de GLUT4	40
5 DISCUSSÃO	42
6 RESUMOS DOS PRINCIPAIS RESULTADOS	49
7 CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS	51
ANEXOS	63

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, tem sido verificado que processos inflamatórios e patógenos bucais, principalmente os provenientes de doenças periodontais, influenciam no início e/ou progressão de várias etapas de doenças sistêmicas (COLLINS *et al.*, 1994; DENTINO *et al.*, 2013; LUNARDELLI; PERES, 2005; QURESHI *et al.*, 2005;). As periodontopatias têm sido apontadas, por diversos estudos, como fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, acidentes cérebro-vasculares, complicações na gravidez (HAN *et al.*, 2014), pneumonias e diabetes mellitus (DM) (IACOPINO; CUTLER, 2000; QURESHI *et al.*, 2005).

Uma relação bidirecional entre periodontite e DM tem sido estabelecida na literatura. Ou seja, as complicações sistêmicas do DM promovem alterações das condições periodontais (ALMEIDA ABDO *et al.*, 2013; BORGNAKKE *et al.*, 2013) e ao mesmo tempo a homeostase glicêmica pode ser afetada pela doença periodontal (DP) (TAYLOR; BORGNAKKE, 2008).

O biofilme, gengivite e periodontite estão inter-relacionados, pois o acúmulo supragengival de biofilme microbiano pode progredir a infecções subgengivais e DP. No pior dos casos, a DP pode envolver a inflamação tanto dos tecidos de suporte (gengiva), quanto de sustentação (cimento, osso alveolar e ligamentos periodontais). Em adultos, o ambiente microbiano subgengival associado à cárie dentária contém principalmente bactérias anaeróbicas gram-negativas (por exemplo, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*). Sem tratamento, a doença periodontal pode levar à perda progressiva do osso alveolar, resultando no afrouxamento e a subsequente perda de dentes. Os efeitos patogênicos da DP são causados pelos micro-organismos que aderem às superfícies do dente e pela resposta inflamatória agressiva contra esses micro-organismos (SRINIVAS; PARRY, 2012).

A etiologia da periodontite sugere que a infecção bacteriana seja a causa primária desta doença e esta patologia é o resultado da interação entre patógenos e hospedeiros (ÜSTÜN *et al.*, 2013). Esta interação promove a ativação de monócitos pelos linfócitos T que iniciam a produção de grandes quantidades de mediadores inflamatórios, tais como interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) (HERNÁNDEZ *et al.*, 2011). Estas citocinas ocasionam a ativação de osteoclastos, propiciando reabsorção óssea, bem como aumento de colagenase, o que favorece maior destruição das fibras do ligamento do periodonto, promovendo assim, a uma destruição do osso e do tecido (IACOPINO, 1995; LALLA; LAMSTER; SCHMIDT, 1998; LALLA *et al.*, 2000).

Segundo Wang e Ohura (2002), amostras de soros de pacientes com periodontite são positivas para anticorpos contra vários componentes estruturais de *P. gingivalis*, como: proteína de membrana externa, cápsula, fimbrias, produtos bacterianos biologicamente ativos, lipopolissacarídeo (LPS) e hemaglutinina. Sendo que, o LPS é absorvido nas superfícies das raízes e nos tecidos gengivais de pacientes com doença periodontal.

O LPS se liga primeiro à proteína ligante de LPS (LBP), solúvel no sangue ou líquido extracelular, e este complexo serve para facilitar a ligação de LPS a CD14, que existe como uma proteína plasmática solúvel e como uma proteína de membrana ligada a glicofosfatidilinositol na maioria das células, exceto no endotélio. Uma vez que o LPS se liga a CD14, LBP se dissocia, e o complexo LPS-CD14 se associa fisicamente a toll-like receptor 4 (TLR4) (ABBAS; LICHTAN; PILLAI, 2008).

O TLR4 é um receptor da superfície celular que gera respostas imunes inatas pela sua capacidade em detectar agentes patogênicos por meio de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que resulta na indução de cascatas de sinalização da ativação do fator de transcrição e cinase. Estas cascatas de ativação podem conduzir à geração de fatores de transcrição (NF- κ B e AP-1), citocinas pró-inflamatórias (como TNF- α e IL-6), quimiocinas, eicosanóides, e as espécies reativas de oxigênio (ROS), todos os efetores da imunidade inata. Notavelmente, o TLR4 é expresso em vários componentes celulares dos tecidos alvo da insulina, incluindo fígado, tecido adiposo, músculo esquelético, vasos, células β pancreáticas e cérebro (KIM; SEARS, 2010). Além disso, as vias de TLR4 ativadas inibem outras vias de sinalização, por exemplo, a sinalização insulínica por promover a fosforilação em serina do IRS1 (KIM; SEARS, 2010). As sinalizações dos TLRs estão na base do desenvolvimento de inflamação crônica e resistência à insulina no músculo esquelético, demonstrando que patógenos podem promover alterações sistêmicas (KIM; SEARS, 2010).

Segundo Ercan *et al.* (2013) patógenos periodontais podem chegar à cavidade amniótica e causar resultados adversos na gravidez, incluindo nascimento pré-termo, pré-eclâmpsia e baixo peso ao nascimento. Estes patógenos também foram relacionados com infecções na placenta em mulheres hipertensas (SWATI *et al.*, 2012).

Jeffcoat *et al.* (2011) observaram que o tratamento periodontal (TP) em grávidas reduziu a incidência de parto prematuro (PTB). Além do mais, estes mesmos autores evidenciaram que gestantes resistentes ao TP apresentaram uma maior incidência de PTB.

Arteaga-Guerra, Cerón-Souza e Mafla (2010) evidenciaram que a doença periodontal associada a estresse materno ocasionou: baixo peso ao nascimento (BPN), PTB e nascimento

premature de bebês com baixo peso (PBPN), em 13%, 4,3% e 21,7% dos casos estudados, respectivamente. Porém, quando a doença periodontal foi estudada de maneira isolada, encontrou-se somente associação da DP materna ao PTB e ao PBPN.

Amarilyo *et al.* (2011) mostraram que o sangue do cordão umbilical de crianças com restrição do crescimento intrauterino apresentaram elevadas concentrações de IL-6, TNF- α , proteína C-reativa (PCR) e trombopoietina (TPO). A restrição do crescimento intrauterino (RCIU) pode ocasionar resistência à insulina (GREEN; ROZANCE; LIMESAND, 2010). Estas perturbações ambientais no feto podem conduzir a um fenótipo do DM do tipo 2 (DM2) por afetar a expressão de genes essenciais para o desenvolvimento do pâncreas que são susceptíveis a modificações epigenéticas. Existem pelo menos dois mecanismos distintos, pelos quais a informação epigenética pode ser herdada: modificações de histonas e metilação do DNA (PINNEY; SIMMONS, 2010). Estas modificações podem ocorrer durante a embriogênese ou na vida pós-natal precoce.

Os mecanismos patogênicos que têm sido propostos como causa de PTB e BPN em consequência da infecção periodontal, são a translocação de bactérias ou produtos bacterianos (por exemplo, o LPS) para a unidade fetoplacental, desencadeando a liberação local de mediadores bioquímicos ou citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1, IL-6 e prostaglandina E2 (PGE2), sendo hematogenicamente translocado de maneira direta para a unidade fetoplacental (GANDHIMADHI; MYTHILI, 2010).

Portanto, estímulos e agressões ambientais sobre a mãe são sinalizados para o feto em desenvolvimento. As condições existentes podem ser suficientemente severas para resultar na perda da gravidez, ou, alternativamente, o feto pode desenvolver respostas adaptativas para garantir a sobrevivência imediata. Uma dessas respostas pode ser uma desaceleração do crescimento que resultará em menor peso no momento do parto. Outros aspectos da resposta adaptativa, que pode ser localizada em órgãos e tecidos específicos, servirão para modificar a fisiologia e o metabolismo e, portanto, as funções dos tecidos. Essas respostas adaptativas, para superar o desafio da vida fetal, podem aumentar o risco de doenças futuras, como por exemplo, o DM (LANGLEY-EVANS; MCMULLEN, 2010). Este fenômeno é conhecido como “programming” ou programação fetal, ou seja, estímulos ou agressões durante a vida intrauterina podem resultar em alterações permanentes na fisiologia e metabolismo da descendência, aumentando o risco de doenças na vida adulta (BARKER, 1995)

Um dos primeiros estudos sobre programação fetal foi o estudo de Ravelli *et al.* (1999) que demonstrou que a restrição nutricional durante o período gestacional causada pela

diminuição de oferta calórica durante o final da Segunda Guerra Mundial na Holanda, no período de 1944 a 1945, causou obesidade abdominal em sua descendência adulta.

Horáková, Janoutová e Janout (2005) relataram que a relação entre baixo peso ao nascimento e resistência à insulina ou diabetes na vida adulta pode ser um resultado da má nutrição fetal devido a reservas nutricionais precárias da mãe e inadequado fluxo sanguíneo no útero ou falta de nutrientes na placenta. A má nutrição pode atuar diretamente em tecidos responsivos a insulina, como fígado, músculos esqueléticos e pâncreas. Desnutrição fetal e subsequente baixo peso ao nascimento é um fenômeno interessante, relacionado com o problema da resistência à insulina, síndrome metabólica e DM2.

O DM é considerado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pela Federação Internacional de Diabetes como uma epidemia global, atingindo 387 milhões de pessoas no mundo, e no Brasil, alcançando 8,7% da população na faixa etária entre 20 e 79 anos, totalizando 11,6 milhões de pessoas. Adicionalmente, estima-se que em 2035 o número de pessoas com DM em todo o mundo será superior a 592 milhões (IDF, 2014). Há dois tipos principais de DM são do tipo 1 (DM1) e DM2.

No DM1 ou diabetes insulino dependente, a produção de insulina do pâncreas é insuficiente, pois as células das ilhotas pancreáticas sofrem destruição autoimune. No DM2, o pâncreas é capaz de produzir insulina, porém o corpo é incapaz de responder adequadamente aos seus efeitos, provocando um acúmulo de glicose no sangue (hiperglicemia) e com a progressão da doença pode ocorrer diminuição na secreção de insulina. Ocorre com maior frequência nos adultos e idosos, mas, recentemente, tem sido observado um aumento da doença em crianças e adolescentes. O DM pode levar a várias complicações sistêmicas como: alteração no metabolismo de proteínas, baixos níveis de colesterol HDL, altos níveis de triglicérides, microangiopatia, neuropatia, nefropatia, doenças macrovasculares, aumento do tempo de cicatrização de feridas e risco de infecção (BORGREVE; DE VRIES; DULLAART, 2003; ELNER *et al.*, 1995; JENSEN; DECKERT, 1992; LIBMAN *et al.*, 1993; LÖE, 1993; PATTERSON; ANDRIOLE, 1997; TAYLOR *et al.*, 1998; VLASSARA; PALACE, 2002;).

Um dos fatores que podem causar o DM2 é o ambiente fetal (LUO; XIAO; NUYT, 2010; REYNOLDS; PHILLIPS, 1998). Estudos realizados em animais evidenciaram que complicações intrauterinas podem danificar o funcionamento das células β (GREEN; ROZANCE; LIMESAND, 2010), levando ao desenvolvimento de DM2 na vida adulta.

Acredita-se que a resistência insulínica seja um evento desencadeante no desenvolvimento do DM2 por ser a primeira anormalidade detectável desta doença (GABBAY; CESARINI; DIB, 2003).

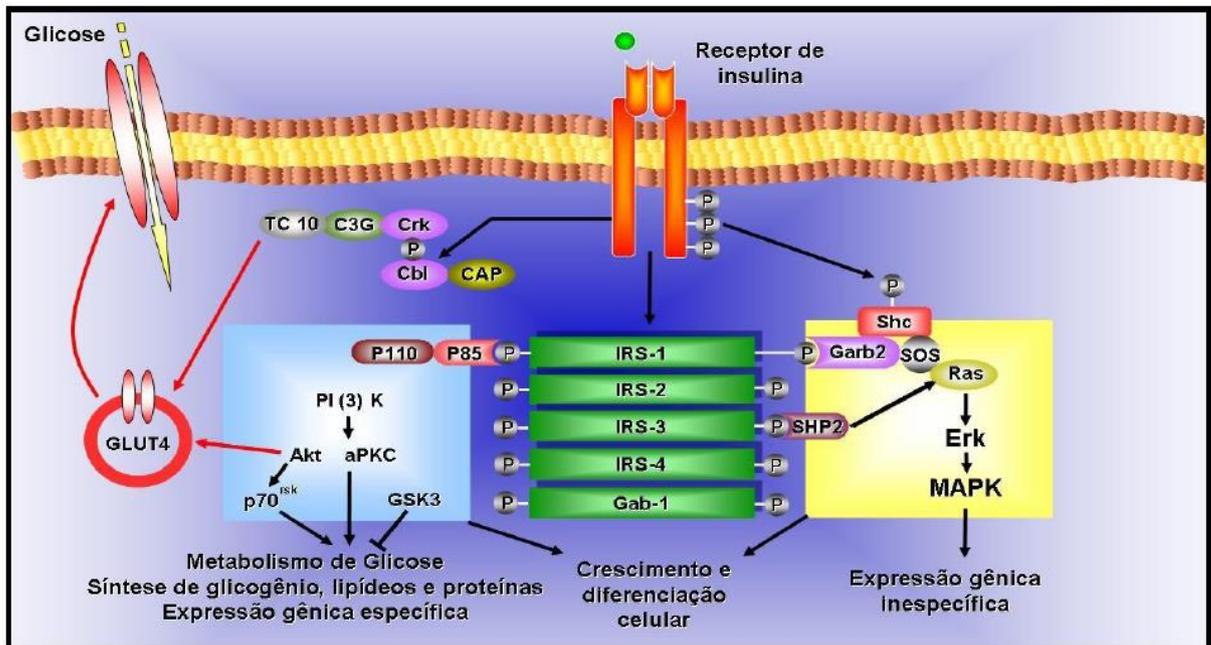
A insulina é um hormônio anabólico secretado pelas células β pancreáticas, tendo como papel principal a captação de glicose, atuando em diferentes tecidos, como muscular, adiposo e também no fígado (CARVALHEIRA *et al.*, 2002). Este hormônio exerce seu efeito por meio de ligação a um receptor específico na membrana plasmática (Figura 1). O receptor de insulina é uma glicoproteína heterotetramérica constituído por duas subunidades alfa e duas subunidades beta, ligadas por pontes de dissulfeto (KASUGA *et al.*, 1982a). A subunidade alfa é inteiramente extracelular, com peso molecular de 135 kDa, e contém o sítio de ligação da insulina. A subunidade beta é uma proteína transmembrânica (95 kDa) responsável pela transdução do sinal insulínico (KASUGA *et al.*, 1982a, 1982b).

Kasuga *et al.* (1982b, 1982c) descreveram que a subunidade beta do receptor de insulina é uma proteína quinase, estimulada pela insulina, sendo capaz de autofosforilar-se e de fosforilar outros substratos em aminoácidos tirosina. Essa atividade do receptor de insulina é importante para a ação insulínica (EBINA *et al.*, 1987). O receptor, uma vez fosforilado em decorrência de sua ativação por insulina, passa a fosforilar substratos intracitoplasmáticos, como por exemplo a pp185. Este foi o primeiro substrato do receptor de insulina estudado, com peso molecular de aproximadamente 185 kDa (WHITE; TAKAYAMA; KAHN, 1985). Sun *et al.* (1991) observaram que em células transfectadas com o receptor de insulina humano há um expressivo aumento da fosforilação da pp185, coincidindo com aumento da ação insulínica.

Em 1991, Sun *et al.* clonaram a pp185 e denominaram-na de substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) e, após três anos, demonstrou-se que outra proteína também migrava na altura da banda desta proteína, que foi denominada de substrato 2 do receptor de insulina (IRS-2) (ARAKI *et al.*, 1994; SUN *et al.*, 1995; TAMEMOTO *et al.*, 1994). Quando o IRS-1 e o IRS-2 estão fosforilados, podem interagir com proteínas contendo a porção SH2 e ativá-las. Entre essas proteínas está uma enzima, a fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-k). Alessi *et al.* (1997) demonstraram que esta proteína ativada pode induzir a ativação de outras proteínas como a proteína quinase-1 dependente de fosfoinosítideo (PDK1) e esta pode fosforilar e ativar a Akt (ou proteína quinase B – PKB). Esta proteína tem três diferentes isoformas - Akt1, Akt2 e Akt3 - e todas são ativadas pela fosforilação em treonina e serina (BELLACOSA *et al.*, 1998; KOHN; TAKEUCHI; ROTH, 1996). A fosforilação da Akt

auxilia na translocação de GLUT4 para membrana plasmática para facilitar a entrada da glicose em células musculares e adipócitos (WHITEMAN; CHO; BIRNBAUM, 2002).

Figura 1 - As vias de sinalização insulínica. O receptor de insulina é uma tirosina quinase que se autofosforila e catalisa a fosforilação de proteínas intracelulares como as proteínas IRS, Shc e Cbl. Após a fosforilação, essas proteínas ligam-se a outras moléculas de sinalização por meio de seus domínios SH2, resultando na ativação de vias de sinalização intracelular como a via da PI 3-quinase, a cascata da MAPK e a ativação do TC10 via CAP/Cbl. Essas vias regulam o transporte de glicose, a síntese de glicogênio, lipídeos e proteínas, coordenando e integrando o metabolismo intermediário.



Fonte: Carvalheira *et al.* (2002)

O transportador de glicose insulino-sensível, GLUT4, é um dos 14 membros da família de GLUTs. Cada um destes transportadores apresenta uma afinidade distinta e especificidade para hexoses particulares, assim como a distribuição do tecido original, localização subcelular e função fisiológica (LETO; SALTIEL, 2012).

O GLUT4 é predominantemente expresso em células musculares e adipócitos e tem como função propiciar a captação de glicose insulino-mediada (LEHNEN *et al.*, 2010; MACHADO; SCHAAN; SERAPHIM, 2006). Ratos transgênicos que carecem ou superexpressam o GLUT4, respectivamente, diminuem ou aumentam a sensibilidade à insulina (BERGLUND *et al.*, 2012; CARVALHO *et al.*, 2005; KATZ *et al.*, 1996). Assim sendo, este transportador é de fundamental importância para a manutenção da homeostase da glicose (CARVALHO *et al.*, 2005; LEGUISAMO *et al.*, 2012).

Outra forma de ativar a translocação de GLUT4 é por meio do exercício físico via AMPK, sendo este, um mecanismo independente de insulina (HAYASHI *et al.*, 1998). A AMPK é uma proteína heterotrimérica formada por uma subunidade catalítica (α) e duas subunidades regulatórias (β e γ) (HARDIE; CARLING, 1997; HARDIE *et al.*, 2003). A contração muscular promove a hidrólise de ATP necessário para produção de energia, resultando na diminuição de ATP e um aumento de AMP. Este aumento de AMP ativa a AMPK por promover a fosforilação da sua subunidade α em resíduo de treonina 172 (HARDIE; CARLING, 1997). Esta fosforilação causa a ativação do substrato da PKB a AS-160, promovendo a translocação de GLUT4 para a membrana plasmática, o que possibilita o transporte de glicose para o músculo (MCGEE *et al.*, 2003).

A resistência insulínica pode estar presente em outra patologia como obesidade, uma vez que os adipócitos, além de promover o armazenamento de gordura, também secretam vários fatores denominados adipocinas. Estas adipocinas, em sua grande maioria, estão relacionadas, direta ou indiretamente, com o DM2 (TORRES-LEAL *et al.*, 2010). Dentre elas, destacam-se a adiponectina, o TNF- α , a IL-6 e a resistina. A adiponectina, ao contrário das demais adipocinas, age como fator protetor para doenças cardiovasculares e aumenta a sensibilidade à insulina (HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004). Por outro lado, o TNF- α , a IL-6 e a resistina, promovem resistência insulínica.

O tratamento com TNF- α causa diminuição tanto na fosforilação em tirosina do receptor de insulina e no IRS-1 *in vivo* (FEINSTEIN *et al.*, 1993) como na captação de glicose em cultura celular de adipócitos (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1994). Esta redução da fosforilação em tirosina do IRS-1 pode ser devido a uma maior taxa de fosforilação em serina deste substrato. Sabe-se que esta fosforilação em serina do IRS-1 diminui o sinal insulínico (KANETY *et al.*, 1995).

A exposição crônica ao IL-6 acarreta deficiência da translocação de GLUT-4 para a membrana plasmática e defeitos na sinalização do substrato receptor de insulina. Portanto, o tratamento crônico com essa citocina prejudica completamente a fosforilação em tirosina de IRS-1 e IRS-2 e a fosforilação em serina do Akt, sem alterar a quantidade total desta proteína. (NIETO-VAZQUEZ *et al.*, 2008) Além disso, IL-6 produz fosforilação do IRS-1 em resíduos Ser307 de uma maneira JNK dependente. Convém salientar, que nem sempre a IL-6 possui efeitos pró-inflamatórios. Durante o exercício físico, a contração muscular promove a produção de IL-6 por fibras musculares, por meio de uma via independente de TNF- α , que estimula o aparecimento de citocinas anti-inflamatórias, tais como, IL-10 e IL-1ra

(antagonista do receptor de IL-1), e inibe a produção TNF- α (PEDERSEN; FISCHER, 2007; PETERSEN; PEDERSEN, 2005). A duração do exercício é o fator mais importante que determina a amplitude da produção da IL-6 pelos músculos esqueléticos (PETERSEN; PEDERSEN, 2005).

Por meio da técnica de citometria de fluxo, Xie *et al.* (2010) avaliaram que concentrações significativas de citocinas inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 β e IL-6, em células 3T3-L1 (pré-adipócitos) reduzem a expressão de GLUT4. Estas citocinas inflamatórias têm um papel importante na regulação do metabolismo da glicose. E a ativação excessiva das vias inflamatórias pode representar uma etapa fundamental no desenvolvimento da resistência à insulina (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005).

Estudos anteriores de Shirakashi (2012), do nosso laboratório, demonstraram em ratos que a doença periodontal materna pode promover programação fetal, pois se observou na prole adulta de ratas com DP aumentos tanto no grau de fosforilação em serina do IRS-1 no tecido adiposo (que ocasiona a diminuição do sinal insulínico, conforme citado acima) como nas concentrações plasmáticas de TNF- α , IL-6 e resistina (TORRES-LEAL *et al.*, 2010).

Sabendo que TNF- α pode diminuir a expressão e translocação de GLUT4 em tecido muscular tornam-se necessários estudos complementares para análise do conteúdo da proteína transportadora de glicose GLUT4 e da fosforilação em serina da Akt, sendo que esta fosforilação tem um papel fundamental para a translocação de GLUT4, em tecido muscular esquelético gastrocnêmio.

2 OBJETIVOS

Avaliar em ratos adultos, proles de ratas com doença periodontal: 1) o peso ao nascimento e durante os 75 dias de idade; 2) o conteúdo da proteína transportadora de glicose GLUT4 e seu índice de translocação em tecido muscular esquelético gastrocnêmio (MG); 3) o grau de fosforilação em serina da Akt em MG; 4) glicemia e insulinemia.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

O trabalho está de acordo com os Princípios Éticos em Uso de Animais e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Protocolo FOA-00863-2013).

Foram utilizadas 8 ratas (2 meses de idade com 200g) e 3 ratos Wistar (3 meses de idade com 350g), mantidos em ambiente de 12/12 horas de claro e escuro (período claro iniciado às 7:00 horas) e temperatura de $23 \pm 2^\circ \text{C}$. As ratas foram distribuídas em dois grupos: 1) com doença periodontal (DP), nas quais esta doença foi induzida por meio de ligadura com fio de seda ao redor do 1º molar inferior; 2) ratas controle (CN). Após a colocação da ligadura foram avaliados, três vezes por semana, a ingestão de ração e o peso corporal das ratas de ambos os grupos. Após 7 dias da colocação da ligadura, as ratas de ambos os grupos foram colocadas para acasalamento; verificou-se diariamente, por esfregaço vaginal, o dia da copulação.

As ratas prenhas foram separadas em caixas individuais, após o nascimento, a ninhada foi distribuída em proles de ratas com doença periodontal (PDP) e proles de ratas-controle (PCN), e o número de filhotes foi pareado (para as mães ficarem com a mesma quantidade de filhotes). Desde o dia do nascimento até o final do experimento foi avaliado o peso corporal (uma vez por semana) dos filhotes machos de ambos os grupos. A ingestão alimentar destes grupos foi aferida a partir do desmame (três vezes por semana) até a realização dos experimentos. Quando os filhotes machos DP e CN destas ratas completaram 75 dias, os experimentos foram realizados.

Os ratos proles controle (PCN) e proles DP (PDP) foram submetidos a jejum de 14 horas antes dos procedimentos experimentais. Estes animais foram anestesiados com tiopental sódico (Thiopentax® - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, Brasil, 3%, 5mg/ 100g p.c., i.p.), e, sob anestesia, foi realizada laparotomia mediana, coletou-se sangue pela veia cava inferior. As amostras de sangue foram transferidas para tubos de plástico heparinizados e mantidas a 4°C até a centrifugação a 800g (4°C , 15 minutos). O plasma obtido foi armazenado a -70°C até o dia da quantificação das concentrações plasmáticas de glicose e insulina (n=10). Coletaram-se os tecidos adiposo branco periepididimal (n = 10) e MG (n = 10) e aferiram-se os seus pesos absolutos (g) e seus pesos relativos (por 100 g de peso corporal). O MG esquerdo foi utilizado para quantificação do conteúdo de proteína GLUT4 (n=5).

Outro grupo de animais (n=8) foi utilizado para quantificar o grau de fosforilação em serina da Akt, após estímulo insulínico. Nestes experimentos, os animais foram anestesiados conforme descrito acima, realizando-se em seguida: laparotomia mediana, com retirada de amostras do tecido MG antes e após 90s a injeção de 1,5 U de insulina regular (i.v. veia porta). Após os experimentos, todos os animais foram eutanasiados por dose excessiva de anestésico (Tiopentax® 3% - Cristália, Itapira/ SP – 150 mg/Kg p.c., i.p).

3.2 Análise radiográfica da perda óssea alveolar e suporte ósseo periodontal

Após o desmame, aproximadamente 57 dias após a instalação da ligadura, as ratas mães de ambos os grupos foram eutanasiadas. As hemi-mandíbulas direita e esquerda foram dissecadas e fixadas por 24h em formaldeído 4%. Para obtenção das imagens radiográficas foi utilizado o aparelho de raios-X GE-100 (General Electric, Milwaukee, EUA), operando com 70 kvp, 10 mA e tempo de exposição de 0,10 segundos. A imagem digital foi obtida diretamente com placa óptica digital (Digora, Soredex, Orion Corporation, Helsinki, Finland). As leituras das placas ópticas foram realizadas em equipamentos de laser scanner sensibilizados, e as imagens foram analisadas usando um software (Windows Digora 1.51, Soredex, Orion Corporation, Helsinki, Finland). Análises radiográficas foram realizadas para detectar a perda óssea alveolar de acordo com o descrito por Holzhausen *et al.*, (2002). A distância entre a junção cimento-esmalte (CEJ) e a altura do osso alveolar foi determinada na superfície da raiz mesial do primeiro molar inferior esquerdo e direito, com o auxílio de um software (Windows Digora 1.51, Soredex, Orion Corporation, Helsinki, Finland). O suporte ósseo periodontal foi analisado como descrito por Pontes Andersen *et al.*, (2006). As medidas foram realizadas eletronicamente na mesial e distal do primeiro molar inferior direito e esquerdo. Uma linha foi desenhada conectando as cúspides (C) do primeiro molar ao ápice (A) da raiz correspondente. Uma segunda linha foi traçada a partir do ápice (A) ao nível do osso correspondente ao defeito ósseo interproximal mais profundo (B). As distâncias foram medidas em milímetros, e o suporte ósseo periodontal (SOP) foi calculado segundo a fórmula $SOP = (AB / AC) \times 100\%$.

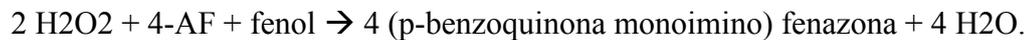
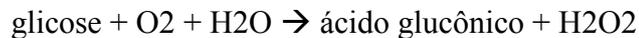
3.3 Análise histológica da perda óssea alveolar

As hemimandíbulas direita e esquerda coletadas das ratas mães de ambos os grupos foram embebidas em formaldeído 4% por 24h. A descalcificação foi realizada em EDTA 10% (pH 7,4) por aproximadamente 3 meses. Foram feitos cortes sequenciais com 5 µm de

espessura ao longo do eixo dos dentes no sentido mesio-distal, e os cortes foram corados com hematoxilina e eosina. Estudos morfológicos foram realizados na gengiva e osso alveolar.

3.4 Determinação da glicemia (método de glicose-oxidase)

Esse é um método enzimático, específico para quantificação de glicose (Analisa Diagnóstica, São Paulo, Brasil). No método de glicose-oxidase a glicose é oxidada enzimaticamente pela glicose oxidase (GOD) gerando ácido glucônico e água oxigenada. A H_2O_2 , em presença de peroxidase (POD), produz a ligação oxidativa do fenol com a 4-amino fenazona (4-AF), dando origem a um cromógeno com máximo de absorção em 505nm de comprimento de onda. Devem ser consideradas as seguintes reações resumidas:



3.5 Determinação de insulinemia

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

3.6 Análise do HOMA-IR

A resistência à insulina foi avaliada por meio do índice HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment - Insulin Resistance / Modelo de Avaliação da Homeostase - Resistência à Insulina), calculado a partir da fórmula, como segue: $HOMA - IR = \text{glicemia de jejum (mmol/L)} \times \text{insulinemia de jejum } (\mu\text{IU/ml}) / 22,5$ (BONORA *et al.*, 2000).

3.7 Avaliação do grau de fosforilação da Akt (Ser473) em músculo esquelético:

3.7.1 Preparação das amostras

Imediatamente após a extração, os tecidos foram homogeneizados em Polytron (24000 rpm durante 10 segundos) em 2 mL de tampão de extração (Tris 100 mM pH 7,5; EDTA 10 mM; SDS 1%; NaF 100 mM; Pirofosfato de Na 10 mM; Ortovanadato de Na 10 mM; 0,1mg/mL Aprotinina) e mantidos em banho-maria (100°C) durante 10 minutos, transferidos

para gelo e, então, centrifugados a 16000g durante 40 minutos (à 4°C). Do sobrenadante foram retiradas alíquotas para determinação da concentração protéica pelo método de Lowry *et al.*, (1951) modificado e para estoque em tampão desenvolvido por Laemmli (azul de bromofenol 0,1%; SDS 10 %; fosfato de sódio 1M pH 7,0; glicerol 50%; DTT 15%).

3.7.2 “Western blotting”

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

A primeira etapa do “Western blotting” consistiu na submissão das amostras (185 µg de proteína em cada poço) a uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Através deste método, foi possível separar proteínas de acordo com seu peso molecular, sem que as unidades protéicas fossem perdidas, permitindo estudos posteriores nessas frações protéicas. Foi utilizado o método desenvolvido por Laemmli e modificado por Garfin (1990), o qual envolve um sistema descontínuo de dois géis contínuos, mas diferentes em sua composição: o gel de “stacking” (3,39% T, 2,7% C - acrilamida 3,3%; bisacrilamida 0,09%; Tris 25 mM, pH 8,9; EDTA 2,0 mM; SDS 0,1%; TEMED 0,111%; Persulfato de amônio 0,27%) e o gel de resolução (6,16% T, 2,7% C - acrilamida 6%; bisacrilamida 0,16%; Tris 388 mM, pH=6,7; EDTA 2,1 mM; SDS 0,1%; TEMED 0.115%; Persulfato de amônio 0,17%; glicerol 10%). Na montagem, o gel de resolução ficou sob o gel de “stacking”, com orientação vertical, num sistema de câmaras que manteve as porções superiores e inferiores do gel em contato com um tampão de corrida (Tris 50 mM; glicina 375 mM; SDS 0,1%; EDTA 1,8 mM).

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

- **Transferência eletroforética**

Após a separação das frações protéicas no gel de poliacrilamida, foi feita a transferência eletroforética dessas frações para uma membrana de nitrocelulose Hybond-C

Super (GE Healthcare Buckinghamshire, Germany). A transferência foi realizada sob voltagem constante de 100 V, durante 2 horas, a 4°C, utilizando-se o tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, SDS 0,02%).

● **“Immunoblotting”**

Após a transferência eletroforética, foi iniciado o processo de imunodeteção de proteínas específicas, desenvolvido por Kruger e Hammond (1988). A membrana de nitrocelulose foi, primeiramente, incubada na presença de solução bloqueadora (solução basal - SB - NaCl 150 mM; Tris 10 mM; "Tween" 20 0,02%; pH 7,2 - acrescida de 5% de leite desnatado em pó - 0% de gordura) durante 2 horas à temperatura ambiente, e então, lavada com solução basal por três sessões de 10 minutos cada. Em seguida, a membrana foi incubada em solução (SB + 3% de leite desnatado em pó - 0% de gordura) contendo o anticorpo de coelho p-Akt 1/2/3 (Ser473) (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, USA), na diluição de 1:1000, ou anticorpo de camundongo anti- β -actina (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, USA), utilizado como controle endógeno, na diluição de 1:1000 por 4 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizadas três lavagens com solução basal, e as membranas foram incubadas em solução (SB + 1% de leite desnatado em pó - 0% de gordura) com segundo anticorpo contendo peroxidase de “horseradish” (“kit” de quimioluminescência – ECL – GE Healthcare Buckinghamshire, Alemanha), durante 1 hora em temperatura ambiente. Novamente, foram realizadas 3 lavagens das membranas de nitrocelulose com solução basal, com duração de 10 minutos cada lavagem. Após estes procedimentos, as membranas foram levadas até uma câmara escura, onde foi adicionado 1 ml de cada solução de detecção 1 e 2 (do kit de ECL - GE Healthcare Buckinghamshire, Alemanha), e incubou-se por 1 minuto. Por fim, foi drenado o excesso de reagente e a membrana de nitrocelulose foi exposta a filme de RX (Hyperfilm ECL– GE Healthcare Buckinghamshire, Alemanha) dentro de um cassete para autorradiografia (GE Healthcare Buckinghamshire, Alemanha) à prova de luz, durante 10 minutos, em temperatura ambiente. O filme foi processado com solução reveladora e reforçadora GBX (Kodak Brasileira, São Paulo, Brasil) e solução fixadora e reforçadora GBX (Kodak Brasileira, São Paulo, Brasil). A intensidade dos “blots” foi avaliada por densitometria óptica, utilizando-se o programa Scion Image (Scion Image-Release Beta 3b, NIH, Frederick, MD, EUA).

3.8 Quantificação do conteúdo de proteína GLUT4

As amostras do tecido MG foram homogeneizadas em tampão de sacarose de pH 7,4 (10 mmol/L de Tris-HCl, 1 mmol/L de EDTA e 250 mmol/L de sacarose) e submetidas a centrifugação diferencial para se obter as frações: membrana plasmática (PM) e microssomais-enriquecidas (M) do tecido muscular esquelético (MITSUMOTO; KLIP, 1992). Quantidades iguais de proteína de membrana ou microssomais-enriquecidas foram aplicadas num gel de SDS a 10%. Os “blots” foram quantificados por densitometria (ImageQuant TL, Amersham Biosciences UK Limited).

Para avaliar o índice de translocação de GLUT4 para membrana plasmática foi realizado o seguinte cálculo:

Índice de translocação de GLUT4 = $(PM\ GLUT4 \times 100 / (PM\ GLUT4 + M\ GLUT4))$
(DOLNIKOFF *et al.*, 2001).

3.9 Análise estatística

Todos os valores foram apresentados como média \pm EPM.

1) Para análise do grau de fosforilação em serina da Akt, ingestão alimentar e da massa corpórea dos ratos durante os 75 dias de vida: a normalidade do conjunto de dados analisados foi verificada. As análises estatísticas foram realizadas por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey. As diferenças entre os grupos foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

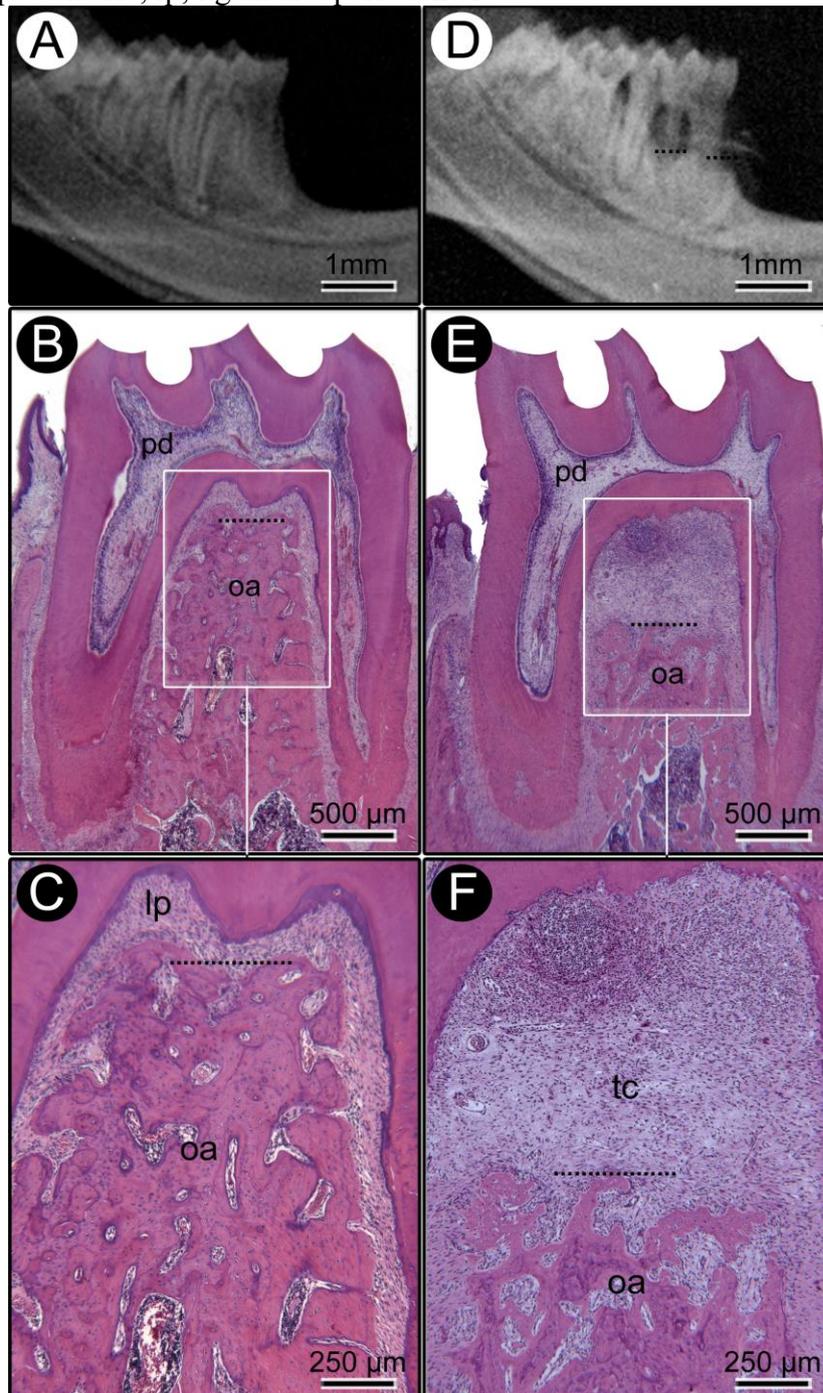
2) Para a análise da massa corpórea ao nascimento, peso dos tecidos, glicemia em jejum, insulinemia, HOMA-IR, conteúdo e índice de translocação de GLUT4: a normalidade do conjunto de dados analisados também foi verificada. As análises estatísticas foram analisadas pelo teste t de Student. As análises estatísticas foram realizadas com o programa estatístico Graph Pad Prism (version 5.0). As diferenças entre os grupos foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Análise radiográfica e histológica da inflamação e reabsorção óssea

Na análise radiográfica e histológica das ratas mães CN observou-se tecidos dentários e periodontais normais (Figura 2A, 2B e 2C). Entretanto, na análise radiográfica de ratas mães com DP, observa-se diminuição da radiopacidade do osso alveolar na região do primeiro molar (Figura 2D). Na análise histológica, houve comprometimento acentuado da integridade e da estrutura do epitélio juncional e sulcular, um intenso infiltrado inflamatório composto predominantemente de células polimorfonucleares e mononucleares, esteve presente no tecido conjuntivo da região interproximal e da bifurcação. Todas as amostras de ratas mães com DP apresentaram perda óssea acentuada. O osso do septo interdental e interradicular apresentou contorno muito irregular, com lacunas de reabsorção e osteoclastos em plena atividade. Algumas áreas de reabsorção radicular externa foram observadas na maioria dos espécimes (Figura 2E e 2F).

Figura 2 - Análises radiográficas e histológicas dos primeiros molares inferiores no grupo CN (Figura 2A, 2B e 2C) e no grupo DP (Figura 2D, 2E e 2F). Observa-se que os aspectos radiográficos (2A) e histológicos (Figura 2B e 2C) são compatíveis com um padrão normal no grupo CN, e o que grupo DP apresenta perda óssea alveolar (Figura 2D e 2E) e uma grave resposta inflamatória local (Figura 2E e 2F). Abreviações e símbolos: oa, osso alveolar; tc, tecido conjuntivo; pd, polpa dentária; lp, ligamento periodontal.



Fonte: do autor

4.2 Análise radiográfica do osso alveolar

As ratas mães com doença periodontal apresentaram maior perda óssea e menor suporte ósseo que o grupo de ratas controle.

Tabela 1 - Perda óssea alveolar e suporte ósseo das ratas mães controle (CN) e ratas mães com doença periodontal (DP).

	CN	DP
Perda óssea (mm)	0,8500 ± 0,05976	1,517 ± 0,1621*
Suporte ósseo (%)	59,25 ± 1,228	50,14 ± 2,691*

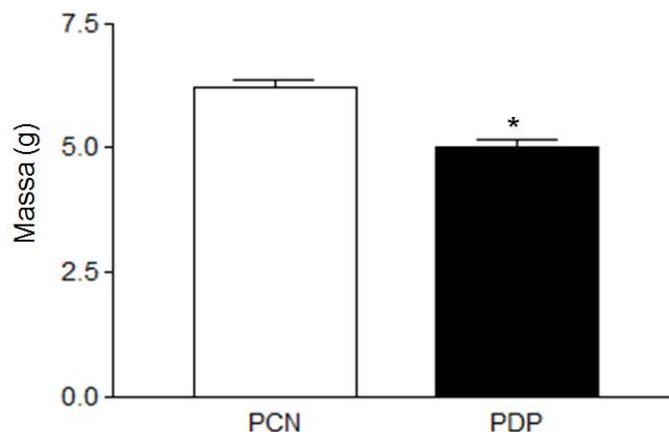
Valores expressos como média ± EPM, n=4. *p < 0.05

Fonte: do autor

4.3 Avaliação da massa corpórea (g)

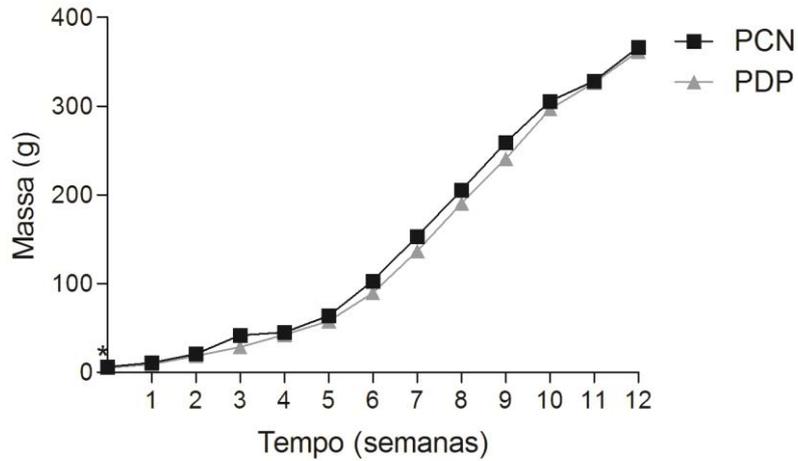
Os resultados da massa corpórea dos grupos proles de ratas controle (PCN) e proles de ratas com doença periodontal (PDP) foram avaliados semanalmente, desde o nascimento até 75 dias de idade. Houve diferença estatística na massa corpórea ao nascimento (Figura 3), porém não houve diferença nestes parâmetros entre os grupos até os 75 dias (Figura 4).

Figura 3 – Massa corpórea ao nascimento de ratos, proles de ratas controle (PCN) e proles de ratas com doença periodontal (PDP). Os valores são expressos como média ± EPM, n = 18. * p<0,05 PDP vs. PCN



Fonte: do autor

Figura 4 - Massa corpórea semanal de ratos, proles de ratas controle (PCN) e proles de ratas com doença periodontal (PDP) desde o nascimento até 75 dias de idade. Os valores são expressos como média \pm EPM, $n = 18$.

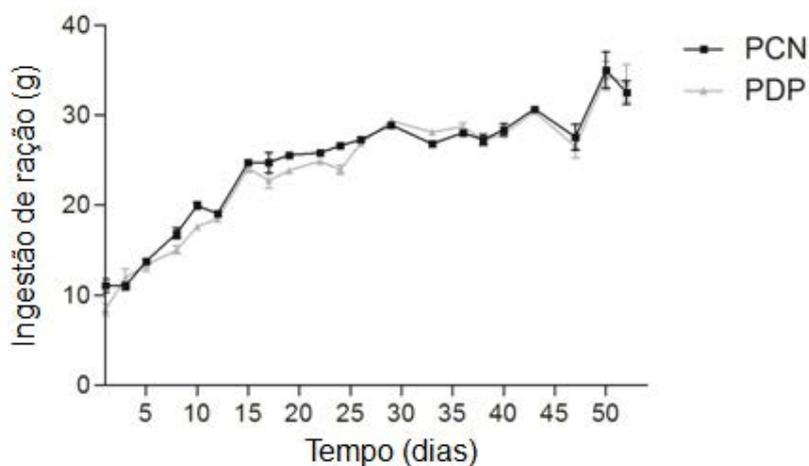


Fonte: do autor

4.4 Ingestão alimentar

A Figura 5 mostra a ingestão alimentar de PCN e PDP do desmame até o final do experimento. Não houve diferença significativa entre os grupos na ingestão alimentar durante este período.

Figura 5 - Ingestão alimentar (média) de ratos, proles de ratas controle (PCN) e proles de ratas com doença periodontal (PDP) do desmame até o final do experimento. Valores expressos como média \pm EPM, $n=18$.



Fonte: do autor

4.5 Peso dos tecidos

Na Tabela 2, observa-se um aumento do tecido adiposo branco periepididimal (TAB) tanto no peso absoluto (g) como no peso relativo (por 100 g de peso corporal) no grupo PDP em relação ao grupo PCN. Por outro lado, houve uma diminuição tanto no peso absoluto (g) como no peso relativo (por 100 g de peso corporal) no tecido muscular gastrocnêmio (MG) no grupo PDP quando comparado com o grupo PCN.

Tabela 2 - Peso absoluto (g) e relativo (por 100g de peso corpóreo) do tecido adiposo branco periepididimal (TAB) e músculo gastrocnêmio (MG)

Tecidos	PCN	PDP
TAB g	3,084 ± 0,1616	3,794 ± 0,2383*
TAB g/100g p.c	0,8490 ± 0,04441	1,057 ± 0,07542*
MG g	2,266 ± 0,05452	2,053 ± 0,04657*
MG g/100g p.c	0,6159 ± 0,01788	0,5715 ± 0,008890*

Valores expressos como média ± EPM, n=10. * p<0,05 comparado ao controle

Fonte: do autor

4.6 Glicemia, Insulinemia e HOMA-IR

A Tabela 3 mostra as concentrações plasmáticas de glicose, insulinemia e os valores de HOMA-IR dos grupos PCN e PDP. Não houve diferença significativa entre os grupos nas concentrações plasmáticas de glicose, porém houve entre as concentrações de insulinemia e dos valores de HOMA-IR entre os grupos.

Tabela 3 – Glicemia (mmol/L), insulinemia (μUI/mL) e HOMA-IR

Parâmetros	PCN	PDP
Glicemia (mg/dL)	5,865 ± 0,1319	5,813 ± 0,2600
Insulinemia (μUI/mL)	12,24 ± 2,021	21,00 ± 3,174*
HOMA-IR	3,204 ± 0,4800	6,092 ± 1,181*

Os valores são expressos como média ± EPM, n =10. *p<0,05

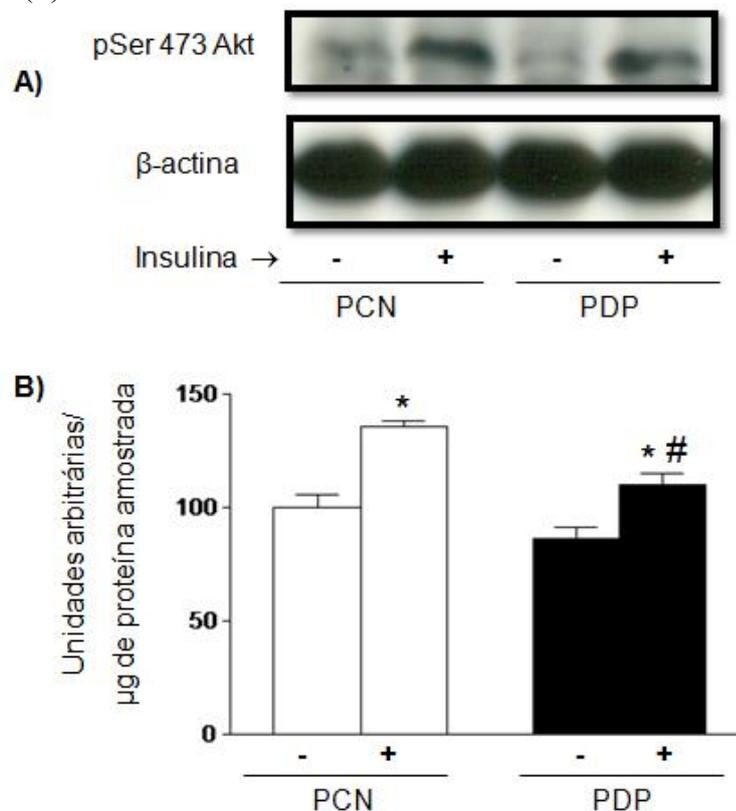
Fonte: do autor

4.7 Avaliação da fosforilação em serina da Akt

A Figura 6A mostra autorradiografia típica referente ao grau de fosforilação em serina da Akt, antes e após o estímulo insulínico, em tecido muscular de ratos adultos, proles de ratas com doença periodontal. A Figura 6B mostra os resultados, expressos em unidades arbitrárias por μg de proteína amostrada.

Nas avaliações intragrupos, verificou-se que após o estímulo insulínico houve diferença no grau de fosforilação em serina da Akt com relação ao estado basal em ambos os grupos. Na avaliação intergrupos observou-se uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no grau de fosforilação da Akt no grupo prole de ratas com doença periodontal (PDP) em relação ao grupo PCN, após estímulo insulínico, em tecido muscular.

Figura 6 - Avaliação do grau de fosforilação em serina da Akt antes (-) e após (+) o estímulo insulínico em tecido muscular gastrocnêmio de ratos adultos proles de ratas controle (PCN) e de ratas com doença periodontal (PDP). Em **A** autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas a SDS-PAGE (185 μg). β actina foi utilizada como controle. Em **B**, valores do grau de fosforilação em serina da Akt, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média \pm EPM, $n=8$. * $p < 0,05$ insulina (-) vs. insulina (+); # $p < 0,05$ PCN (+) vs. PDP (+).

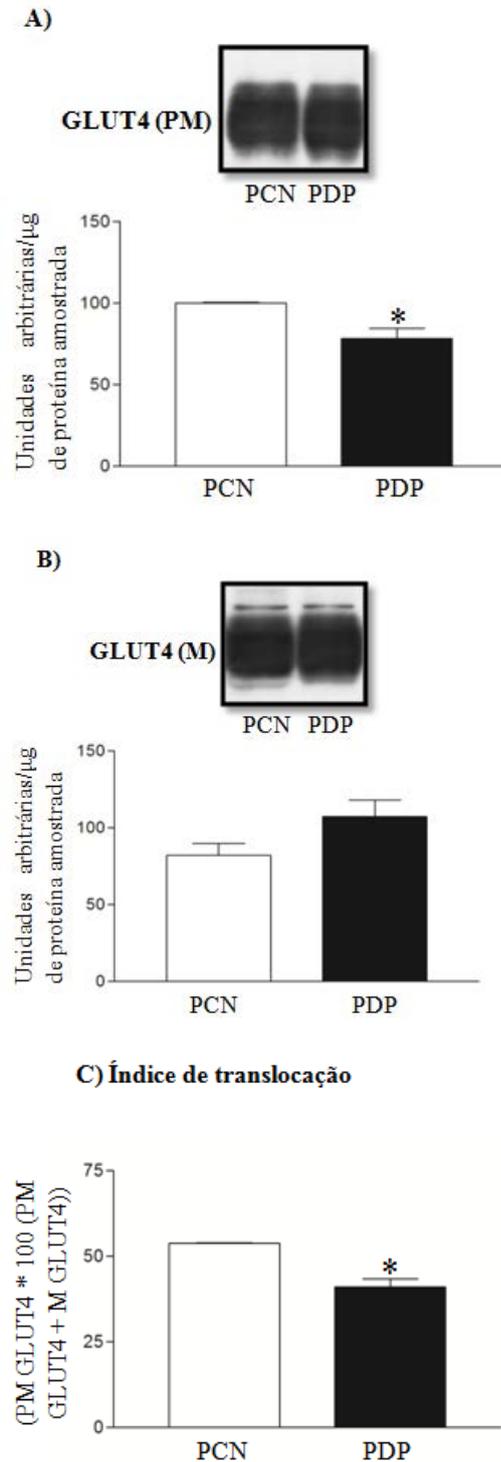


Fonte: do autor

4.8 Expressão de GLUT4

A Figura 7 mostra a expressão de GLUT4 na membrana plasmática (PM), no microsoma-enriquecido (M) e o índice de translocação. Não houve diferença entre os grupos em M; no entanto, o grupo PDP apresentou valores menores ($p < 0,05$) em PM e no índice de translocação em relação ao grupo PCN.

Figura 7 – Conteúdo de GLUT4 na membrana plasmática (PM), no microsossoma-enriquecido (M) e o índice de translocação, dos grupos proles de ratas controle (PCN) e proles de ratas com doença periodontal (PDP). Os resultados foram apresentados como média \pm EPM, n=5. A significância foi considerada quando $p < 0,05$. * $p < 0,05$ PCN vs PDP



Fonte: do autor

5 DISCUSSÃO

A doença periodontal materna promoveu em sua prole baixo peso ao nascimento e na sua vida adulta: resistência insulínica, diminuição no grau de fosforilação da Akt em serina, no conteúdo de GLUT4 na membrana plasmática e no seu índice de translocação em tecido muscular esquelético.

Os resultados demonstram que há uma associação entre doença periodontal materna e BPN (Figura 3). Isto corrobora alguns estudos que evidenciaram que doença periodontal materna promove BPN (GUIMARÃES *et al.*, 2012; HAERIAN-ARDAKANI *et al.*, 2013; MANNEM; CHAVA, 2011). Por outro lado, outros autores não encontraram diferenças no peso ao nascimento em proles de mães com DP (DAVENPORT *et al.*, 2002). Porém, ao avaliarmos semanalmente o peso durante os 75 dias de idade, não houve alteração entre os grupos (Figura 4). Este achado está de acordo com os estudos de Jensen *et al.* (2008) que verificaram que humanos nascidos com baixo peso não apresentaram diferença no peso na idade adulta. Por outro lado, observamos diferenças nos pesos do tecido muscular esquelético gastrocnêmio e do tecido adiposo branco periepididimal (gordura visceral), aos 75 dias de idade, no qual constatamos uma diminuição no peso absoluto e relativo do tecido muscular no grupo PDP em relação ao PCN e um aumento no tecido adiposo no peso relativo e absoluto (Tabela 2). Apesar de ter evidenciado diferenças no peso destes tecidos, não foram observadas alterações no peso corpóreo, como também na ingestão alimentar entre os grupos avaliados (Figura 5). Resultado semelhante foi evidenciado no estudo de Shirakashi *et al.* (2013) no qual relata que o aumento do tecido adiposo pode ter compensado a diminuição do peso do tecido muscular e por isso não se observou variação no peso corpóreo dos ratos adultos, proles de ratas com DP.

Este aumento de adiposidade representa um fator importante, pois estudos conduzidos em adipócitos de roedores e humanos demonstraram que a obesidade promove maior produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , associado ao aumento da presença de macrófagos neste tecido (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993; HOTAMISLIGIL *et al.*, 1995; WEISBERG *et al.*, 2003).

O acúmulo de macrófagos no tecido adiposo (MTA) é dependente de localização anatômica, ou seja, há maior infiltração de macrófagos no tecido visceral (CANCELLO *et al.*, 2006), sendo identificados como a fonte primária de produção de citocinas inflamatórias e um componente essencial na progressão da resistência à insulina na obesidade (Lumeng *et al.*,

2008). Tem sido sugerido que os MTA influenciam em uma variedade de processos no tecido adiposo, incluindo adipogênese, a angiogênese, e a resposta à hipóxia. A polarização de macrófagos depende dos fenótipos de ativação (MANTOVANI *et al.*, 2004), como por exemplo, estimulação do LPS e IFN- γ , que leva os macrófagos a assumirem um perfil de ativação clássica pró-inflamatória também conhecida como M1 (MARTINEZ *et al.*, 2014). No entanto, sob a influência de outros fenótipos de ativação, como citocinas do linfócito T_H2 (IL-4 ou IL-13), os macrófagos assumem um estado de ativação alternativa (M2) e produzem fatores imunossupressores, tais como a IL-10 (MARTINEZ *et al.*, 2008; MURRAY *et al.*, 2014). Em ratos não obesos os MTA estão polarizados principalmente em M2, enquanto em ratos obesos os MTA têm um perfil predominante de M1 (LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007).

Como comentado acima, o grupo PDP apresentou diminuição no peso do tecido muscular, e este resultado está de acordo com diversos autores que demonstraram que indivíduos com BPN têm menor massa muscular na idade adulta (GALE *et al.*, 2001; KENSARA *et al.*, 2005; YLIHÄRSILÄ *et al.*, 2007). O prejuízo no crescimento muscular é relevante no contexto de um risco tardio para a resistência à insulina, uma vez que o músculo esquelético é um dos principais determinantes da sensibilidade à insulina, responsável por 90% da captação de glicose estimulada por este hormônio (HALES; BARKER, 2001). Nos seres humanos, há dados que indicam que associação de baixo peso e diminuição da massa muscular pode promover um quadro futuro de resistência à insulina (SRIKANTHAN; KARLAMANGLA, 2011).

Dessa forma a DP materna promovendo BPN também pode ocasionar diminuição do tecido muscular na vida adulta da prole. Isto pode ser explicado pelo mecanismo de programação fetal (BARKER, 1995).

A presença da DP representa uma oportunidade única para os patógenos orais e seus produtos para ganhar acesso à circulação sistêmica. As toxinas bacterianas são conhecidas por provocarem respostas imunitárias que podem perturbar a homeostase do sistema e, em alguns casos, resultar em desfechos fatais para o indivíduo (SOUTHERLAND; TAYLOR; OFFENBACHER, 2005).

Segundo Rovin, Costich e Gordon (1966), o melhor modelo para indução da doença periodontal é a união de dois fatores: a colonização bacteriana e a colocação da ligadura. Entretanto, no presente estudo a doença periodontal materna foi induzida apenas pela colocação de ligadura e a comprovação da efetividade da indução desta doença foi confirmada

pelas análises radiográficas, histológicas (Figura 2) e avaliação de perda óssea alveolar (Tabela 1).

Conforme descrito anteriormente, a DP é ocasionada por bactérias gram-negativas que agem na circulação sanguínea levando a produção de PGE₂, TNF- α e a IL-1 β que atravessam a barreira corioamniônica atingindo o fluido amniótico (OFFENBACHER *et al.*, 1996).

Em uma análise sorológica a *P. gingivalis* (bactéria gram-negativa) é a bactéria mais abundante em babuínos fêmeas prenhas com periodontite induzida por ligadura (CAPPELLI *et al.*, 2009). Ratos infectados por via subcutânea com *P. gingivalis* em estágios diferentes de gestação apresentaram níveis elevados de IL-6 e TNF- α no soro e na placenta, menor ganho de peso materno e baixo peso fetal quando comparados aos controles não infectados. O processo infeccioso foi mais intenso e generalizado em ratos infectados, antes ou no meio da gravidez quando comparado com os grupos infectados no início da gravidez (MICHELIN *et al.*, 2012).

Há indícios de que a periodontite durante a gravidez pode aumentar as bactérias ou mediadores inflamatórios (IL-6 e TNF- α) que penetram na corrente circulatória e causam uma ruptura prematura da membrana e nascimento pré-termo, e como consequência, BPN (GALVÃO; RÖSING; FERREIRA, 2003).

Estudos epidemiológicos relatam uma relação entre BPN e alta predisposição à hipertensão arterial, dislipidemia e diabetes na idade adulta. Conforme comentado anteriormente, acredita-se que a resistência insulínica seja um evento desencadeante no desenvolvimento do DM2 por ser a primeira anormalidade detectável desta doença (GABBAY; CESARINI; DIB, 2003.) Esta doença pode apresentar hiperinsulinemia para compensar a resistência insulínica (IRLES *et al.*, 2015).

No presente estudo observamos aumento de insulinemia, nenhuma alteração na glicemia e redução na sensibilidade insulínica, avaliada pelo índice de HOMA-IR, no grupo PDP em relação ao grupo PCN (Tabela 3). Estes resultados estão de acordo com a teoria “*fetal salvage*”, no qual o feto desnutrido desenvolve resistência à insulina periférica, por meio de uma redistribuição de nutrientes, tais como a glicose, a favor de órgãos essenciais, como o cérebro, levando a redução permanente da função ou do número de transportador de glicose do músculo esquelético. Em consequência desta diminuição da sensibilidade periférica à insulina há um estímulo nas células β para produzir quantidades maiores de insulina para atingir a glicemia normal o que levaria a eventual esgotamento de células β (HOFMAN *et al.*, 1997; CIANFARANI; GERMANI; BRANCA, 1999).

A capacidade de manter níveis normais de glicose no sangue envolve uma interação complexa entre a secreção de insulina pelas células β do pâncreas e capacidade de resposta à insulina metabólica no músculo esquelético, fígado e tecido adiposo (WEI *et al.*, 2008). O músculo esquelético é particularmente importante, uma vez que compreende cerca de 40-50% da massa corporal e é responsável por aproximadamente 20-30% do consumo de oxigênio em repouso e medeia mais de 75% de toda a glicose mediada pela insulina disponível em condições fisiológicas normais (STUMP *et al.*, 2006). Ademais, a contração muscular pode promover captação de glicose via AMPK, conforme descrito acima.

Revedo o que já foi descrito anteriormente, em tecidos sensíveis à insulina, este hormônio liga-se ao seu receptor e aumenta a atividade do receptor da insulina de tirosina-quinase, promovendo a fosforilação de substratos de receptores da insulina (IRS-1, IRS-2). A fosforilação da tirosina do IRS-1 resulta na interação da subunidade p85 reguladora da PI3K e ativa a subunidade p110 catalítica. Isto conduz à ativação proteína quinase B (PKB/Akt) e fosforilação do seu substrato, AS160, facilitando a translocação de GLUT4 para sarcolema e possibilitando a entrada de glicose. Portanto, a manutenção das respostas adequadas da via IRS-PI3K-Akt é crucial para o normal metabolismo de glicose mediada pela insulina em tecidos sensíveis à mesma (WEI *et al.*, 2008).

A fosforilação da Akt é importante para o metabolismo de glicose no músculo, por isso o presente estudo avaliou esta etapa da cascata insulínica e verificou que o grupo PDP com BPN apresentou uma diminuição no grau de fosforilação da Akt em serina, após estímulo insulínico, em tecido muscular esquelético gastrocnêmio (Figura 6). Estes resultados estão de acordo com Jensen *et al.* (2008) que observaram que humanos com BPN exibem uma diminuição na fosforilação de proteínas como Akt, após o estímulo insulínico em tecido muscular.

Outro fator que contribui com a resistência insulínica é a proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B), pois esta proteína pode promover desfosforilação em tirosina do IRS-1, diminuindo assim o sinal insulínico (ZABOLOTNY *et al.*, 2008). A PTP1B é importante na regulação da ação da insulina e da leptina e tem sua expressão aumentada em tecidos alvos da insulina em modelos de animais com resistência insulínica, obesidade e diabetes (ZABOLOTNY *et al.*, 2008). O TNF- α age como um regulador positivo na expressão da PTP1B (ZABOLOTNY *et al.*, 2008). Além disso, ratos deficientes em PTP1B apresentam aumento da sensibilidade insulínica (ELCHEBLY *et al.*, 1999).

No DM2, distúrbios na translocação de GLUT4 no músculo foram associadas à resistência à insulina (MAIANU; KELLER; GARVEY, 2001; THAMOTHARAN *et al.*, 2005). Ao avaliarmos conteúdo da proteína transportadora de glicose GLUT4 em tecido muscular esquelético gastrocnêmio, observamos diminuição de GLUT4 no grupo prole de ratas com doença periodontal na fração PM e no índice de translocação, entretanto não houve diferença significativa na fração M (Figura 7). Esta diminuição no índice de translocação pode ser explicada pela diminuição da fosforilação em serina da Akt, uma vez que esta fosforilação é necessária para a translocação de GLUT4.

Ozanne *et al.* (2005) avaliaram que em humanos adultos, com baixo peso ao nascimento, apresentaram diminuição na expressão de proteínas que compõem a via de sinalização insulínica, como a proteína quinase C atípica (PKC ζ), a p85 α , a p110 β e o GLUT4 em tecido muscular.

Citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-1 β ativam vias intracelulares da c-Jun amino-terminal kinase (JNK) e do I κ B kinase β /fator nuclear κ B (IKK β /NF- κ B) por meio de mecanismos mediados por receptores clássicos da membrana plasmática. Estes incluem o TLR e o receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE). Os receptores são ativados por produtos microbianos, dieta rica em gordura e pela obesidade (SHOELSON; LEE; GOLDFINE, 2006). A ativação da JNK promove a fosforilação do IRS-1 em locais de serina (SHOELSON; LEE; GOLDFINE, 2006) e prejudica a atividade da Akt promovendo resistência insulínica (KANETO *et al.*, 2005).

O subgrupo JNK das proteínas quinases ativadas por mitógenos é codificada por três genes: JNK1, JNK2 e JNK3 (TUNCMAN *et al.*, 2006). Nos estados de resistência insulínica e obesidade, as atividades JNK e IKK β estão aumentadas por ativarem fatores de transcrição pró-inflamatórios. Isto leva à fosforilação de serina do substrato do receptor de insulina que interfere com a ação insulínica. Verificou-se que os ratos deficientes em JNK1, mas não em JNK2 têm adiposidade reduzida e melhoram sensibilidade à insulina (TUNCMAN *et al.*, 2006).

De acordo com Plomgaard *et al.* (2005), a infusão de TNF- α em humanos aumenta a fosforilação de p70 S6 quinase (S6K), quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK: ERK1 e ERK2), JNK, e a fosforilação em serina do IRS-1, comprometendo a captação de glicose, devido à diminuição do AS160, responsável pela regulação da translocação de GLUT4.

Lumeng, Deyoung e Saltiel, (2007) constataram que o aumento de macrófagos promoveu a redução da expressão e da translocação de GLUT4 em adipócitos “*in vitro*”. E que o tratamento destes adipócitos com anticorpos anti- TNF- α aumentou a expressão e a translocação de GLUT4. E também verificou que a interação entre macrófagos e adipócitos pode modificar a capacidade de resposta à insulina e metabolismo da glicose nesta célula.

Outros modelos de “programming” como alterações nutricionais, podem levar à resistência insulínica na prole. Segundo Westermeier *et al.* (2014) a obesidade pré-gestacional materna está relacionada a um aumento no risco de obesidade, de resistência insulínica e à presença de marcadores precoces de doenças cardiovasculares na prole. Uma das explicações é que a obesidade materna, em consequência de efeitos estressores causados por excesso de nutrientes, leva ao estresse do retículo endoplasmático (ERE) em células endoteliais da veia umbilical humana, envolvendo ativação de proteínas de ERE, como a PERK e ATF6. A ATF6 é libertada a partir de membranas do retículo endoplasmático e, em seguida, processada no complexo de Golgi por clivagem proteolítica, promovendo a sua translocação nuclear. Por sua vez, a PERK autofosforilada é capaz de fosforilar eIF2 α , levando à translocação para o núcleo de ATF4. Além disso, eIF2 α também pode ser fosforilada pela PKR, que também é uma proteína dependente do ERE. Estudos sugerem que as translocações nucleares de ATF6 e ATF4 podem ser capazes de alterar a sinalização da insulina e levar a resistência insulínica em células endoteliais da veia umbilical humana por meio de redução da fosforilação da AKT. Em paralelo, a ativação da PKR pode causar atenuação da sinalização insulínica pela fosforilação inibitória do IRS-1 (WESTERMEIER *et al.*, 2014).

Outro estudo, que também evidenciou a existência do “programming”, demonstrou que a dieta materna (durante a prenhez) com baixo teor de sódio promove em sua prole (macho e fêmea) BPN e, apenas a prole fêmea, aumento da adiposidade na vida adulta (LOPES *et al.*, 2008). Estes resultados também reforçam a influência do ambiente intrauterino no desenvolvimento de distúrbios na prole.

Outras alterações que causam o “programming” são as modificações epigenéticas conforme descritas anteriormente. O duodenopancreático homeobox 1 (PDX1), também denominado fator promotor da insulina 1 (IPF-1), é um fator de transcrição que regula o desenvolvimento do pâncreas e diferenciação de células β (LING; GROOP, 2009; VAXILLAIRE; FROGUEL, 2008). Mutações no gene deste fator podem causar uma forma de diabetes monogênica (LING; GROOP, 2009; VAXILLAIRE; FROGUEL, 2008). A RCIU, devido à insuficiência útero-placentária, foi associada com o silenciamento epigenético

progressivo de PDX1 (PARK *et al.*, 2008). Na vida pós-natal precoce, antes do início da diabetes, o estado de RCIU induz desacetilação das histonas H3 e H4, o que é facilitado pelo recrutamento de histona-desacetilase 1 (HDAC1) e Sin3A para o promotor proximal de PDX1 (PARK *et al.*, 2008). A desacetilação destas histonas é acompanhada pela perda de ligação do fator de transcrição chave, como o “upstream stimulatory factor 1” (USF-1), ao gene da PDX1 (PARK *et al.*, 2008). Após o aparecimento da diabetes no indivíduo adulto que apresentou RCIU foi observada a metilação da ilha de CpG no promotor proximal, o que resulta no silenciamento completo e permanente do *locus* PDX1 (PARK *et al.*, 2008).

Estas modificações epigenéticas podem também ocorrer na vida pós-natal precoce. Conforme descrito por Liu *et al.* (2013) ratos fêmeas hipernutridas (em decorrência da diminuição proposital do número filhotes), durante o período de amamentação, apresentaram ganho de peso, aumento dos níveis de insulina, glicose e leptina. Além disso, esta hipernutrição resultou na hipermetilação específica do dinucleotídeo CpG (dinucleotídeo 5'-CpG-3') na região proximal dos genes promotores do IRS1 e GLUT4 e, conseqüentemente, uma redução nos níveis de RNAm de GLUT4 e do IRS1 no tecido muscular esquelético na prole adulta.

Vários estudos sobre o “programming” reforçam a relevância de se manter uma dieta materna adequada durante o período pré-gestacional, gestacional e pós-gestacional para a manutenção da saúde geral de sua prole na vida adulta (LOPES *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2013; PARK *et al.*, 2008; WESTERMEIER *et al.*, 2014).

O presente estudo demonstrou que não só a dieta, mas também uma doença bucal, como a DP materna, pode promover resistência insulínica na vida adulta de sua prole, demonstrando a importância da prevenção desta doença bucal, principalmente durante o período gestacional.

6 RESUMO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS

A doença periodontal materna em sua prole adulta:

- promoveu baixo peso ao nascimento;
- não alterou a massa corpórea do nascimento até 75 dias de idade;
- não alterou a ingestão alimentar;
- não alterou as concentrações plasmáticas de glicose;
- promoveu um aumento das concentrações plasmáticas de insulina;
- ocasionou resistência insulínica;
- não alterou a expressão de GLUT4 em M;
- diminuiu a expressão de GLUT4 em PM;
- reduziu o índice de translocação;
- diminuiu o grau de fosforilação em serina da Akt.

7 CONCLUSÃO

Doença periodontal materna promove baixo peso ao nascimento e alterações na fase final da sinalização da insulina no músculo esquelético em ratos proles adultos. Estes resultados demonstram o impacto que a doença periodontal tem em curto prazo sobre a vida intrauterina, e em longo prazo na predisposição a certas doenças na fase adulta da prole, o que reforça a importância que a manutenção da saúde bucal materna tem sobre a saúde geral dessa prole.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- ALESSI, D. R. et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balph. **Curr. Biol.**, v. 7, n. 4, p. 261-269, Apr. 1997.
- ALMEIDA ABDO, J. et al. Influence of dyslipidemia and diabetes mellitus on chronic periodontal disease. **J. Periodontol.**, v. 84, n. 10, p. 1401-1408, Oct. 2013.
- AMARILYO, G. et al. Increased cord serum inflammatory markers in small-for-gestational-age neonates. **J. Perinatol.**, v. 31, n. 1, p. 30-32, Jan. 2011.
- ARAKI, E. et al. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. **Nature**, v. 372, n. 6502, p. 186-190, Nov. 1994.
- ARTEAGA-GUERRA, J. J.; CERÓN-SOUZA, V.; MAFLA, A. C. Dynamic among periodontal disease, stress, and adverse pregnancy outcomes. **Rev. Salud Publica**, v. 12, n. 2, p. 276-286, Apr. 2010.
- BARKER, D. J. Fetal origins of coronary heart disease. **BMJ**, v. 311, n. 6998, p. 171-174, Jul. 1995.
- BELLACOSA, A. et al. Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. **Oncogene**, v. 17, n. 3, p. 313-325, Jul. 1998.
- BERGLUND, E. D. et al. Regulation of endogenous glucose production in glucose transporter 4 over-expressing mice. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e52355, 2012.
- BONORA, E. et al. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. **Diabetes Care**, v. 23, n. 1, p. 57-63, Jan. 2000.
- BORGGREVE, S. E.; DE VRIES, R.; DULLAART, R. P. Alterations in high-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus: role of lipolytic enzymes, lecithin: cholesterol acyltransferase and lipid transfer proteins. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 33, n. 12, p. 1051-1069, Dec. 2003.

- BORGNAKKE, W. S. et al. Effect of periodontal disease on diabetes: systematic review of epidemiologic observational evidence. **J. Periodontol.**, v. 84, n. 4 Suppl, p. S135-S152, Apr. 2013.
- CANCELLO, R. et al. Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. **Diabetes**, v. 55, n. 6, p. 1554-1561, Jun. 2006.
- CAPPELLI, D. et al. Periodontitis in pregnancy: clinical and serum antibody observations from a baboon model of ligature-induced disease. **J. Periodontol.**, v. 80, n. 7, p. 1154-1165, Jul. 2009.
- CARVALHEIRA, J. B. et al. Characterization of selective insulin resistance to insulin signaling in the hypothalamus of obese Zucker rats'. **Diabetes**, v. 51, p. A41, 2002.
- CARVALHO, E. et al. Adipose-specific overexpression of GLUT4 reverses insulin resistance and diabetes in mice lacking GLUT4 selectively in muscle. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 289, n. 4, p. E551-E561, Oct. 2005.
- CIANFARANI, S.; GERMANI, D.; BRANCA, F. Low birthweight and adult insulin resistance: the "catch-up growth" hypothesis. **Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.**, v. 81, n. 1, p. F71-F73, Jul. 1999.
- COLLINS, J. G. et al. Effects of a Porphyromonas gingivalis infection on inflammatory mediator response and pregnancy outcome in hamsters. **Infect. Immun.**, v. 62, n. 10, p. 4356-4361, Oct. 1994.
- DAVENPORT, E. S. et al. Maternal periodontal disease and preterm low birthweight: case-control study. **J. Dent. Res.**, v. 81, n. 5, p. 313-318, May 2002.
- DENTINO, A. et al. Principles of periodontology. **Periodontol. 2000**, v. 61, n. 1, p. 16-53, Feb. 2013.
- DOLNIKOFF, M. et al. Decreased lipolysis and enhanced glycerol and glucose utilization by adipose tissue prior to development of obesity in monosodium glutamate (MSG) treated-rats. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 25, n. 3, p. 426-433, Mar. 2001.

EBINA, Y. et al. Replacement of lysine residue 1030 in the putative ATP-binding region of the insulin receptor abolishes insulin- and antibody-stimulated glucose uptake and receptor kinase activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 84, n. 3, p. 704-708, Feb. 1987.

ELCHEBLY, M. et al. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. **Science**, v. 283, n. 5407, p. 1544-1548, Mar 1999.

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

ERCAN, E. et al. Evaluation of periodontal pathogens in amniotic fluid and the role of periodontal disease in pre-term birth and low birth weight. **Acta Odontol. Scand.**, v. 71, n. 3-4, p. 553-559, May/Jul. 2013.

FEINSTEIN, R. et al. Tumor necrosis factor-alpha suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 35, p. 26055-26058, Dec. 1993.

GABBAY, M.; CESARINI, P. R.; DIB, S. A. Diabetes melito do tipo 2 na infância e adolescência: revisão da literatura. **J. Pediatr.**, v. 79, n. 3, p. 201-208, May/Jun. 2003.

GALE, C. R. et al. Intrauterine programming of adult body composition. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 86, n. 1, p. 267-272, Jan. 2001.

GALVÃO, M. P.; RÖSING, C. K.; FERREIRA, M. B. Effects of ligature-induced periodontitis in pregnant Wistar rats. **Pesqui. Odontol. Bras.**, v. 17, n. 1, p. 51-55, 2003 Jan/Mar. 2003.

GANDHIMADHI, D.; MYTHILI, R. Periodontal infection as a risk factor for preterm low birth weight. **J. Indian Soc. Periodontol.**, v. 14, n. 2, p. 114-120, Apr. 2010.

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

GREEN, A. S.; ROZANCE, P. J.; LIMESAND, S. W. Consequences of a compromised intrauterine environment on islet function. **J. Endocrinol.**, v. 205, n. 3, p. 211-224, Jun. 2010.

GUIMARÃES, A. N. et al. Very low and low birth weight associated with maternal periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 39, n. 11, p. 1024-1031, Nov. 2012.

- HAERIAN-ARDAKANI, A. et al. Relationship between maternal periodontal disease and low birth weight babies. **Iran. J. Reprod. Med.**, v. 11, n. 8, p. 625-630, Aug. 2013.
- HALES, C. N.; BARKER, D. J. The thrifty phenotype hypothesis. **Br. Med. Bull.**, v. 60, p. 5-20, 2001.
- HAN, Y. W. et al. Periodontal disease, atherosclerosis, adverse pregnancy outcomes, and head-and-neck cancer. **Adv. Dent. Res.**, v. 26, n. 1, p. 47-55, May 2014.
- HARDIE, D. G. et al. Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. **FEBS Lett.**, v. 546, n. 1, p. 113-120, Jul. 2003.
- HARDIE, D. G.; CARLING, D. The AMP-activated protein kinase-fuel gauge of the mammalian cell ? **Eur. J. Biochem.**, v. 246, n. 2, p. 259-273, Jun. 1997.
- HAYASHI, T. et al. Evidence for 5' AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport. **Diabetes**, v. 47, n. 8, p. 1369-1373, Aug. 1998.
- HERMSDORFF, H. H.; MONTEIRO, J. B. Gordura visceral, subcutânea ou intramuscular: onde está o problema? **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 48, n. 6, p. 803-811, Dec. 2004.
- HERNÁNDEZ, M. et al. Host-pathogen interactions in progressive chronic periodontitis. **J. Dent. Res.**, v. 90, n. 10, p. 1164-1170, Oct. 2011.
- HOFMAN, P. L. et al. Insulin resistance in short children with intrauterine growth retardation. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 82, n. 2, p. 402-406, Feb. 1997.
- HOLZHAUSEN, M. et al. Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature-induced periodontitis in rats. **J. Periodontol.**, v. 73, n. 9, p. 1030-1036, Sep. 2002.
- HOTAMISLIGIL, G. S. et al. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, v. 95, n. 5, p. 2409-2415, May 1995.
- HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, n. 5091, p. 87-91, Jan. 1993.

HOTAMISLIGIL, G. S. et al. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 11, p. 4854-4858, May. 1994.

HORÁKOVÁ, D.; JANOUTOVÁ, G.; JANOUT, V. Insulin resistance and birth weight. **Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.**, v. 149, n. 1, p. 173-176, Jun. 2005.

IACOPINO, A. M. Diabetic periodontitis: possible lipid-induced defect in tissue repair through alteration of macrophage phenotype and function. **Oral Dis**, v. 1, n. 4, p. 214-229, Dec. 1995.

IACOPINO, A. M.; CUTLER, C. W. Pathophysiological relationships between periodontitis and systemic disease: recent concepts involving serum lipids. **J. Periodontol.**, v. 71, n. 8, p. 1375-1384, Aug. 2000.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. Diabetes Atlas 2014.

IRLES, E. et al. Enhanced glucose-induced intracellular signaling promotes insulin hypersecretion: Pancreatic beta-cell functional adaptations in a model of genetic obesity and prediabetes. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 404C, p. 46-55, Jan. 2015.

JEFFCOAT, M. et al. Periodontal infection and preterm birth: successful periodontal therapy reduces the risk of preterm birth. **BJOG**, v. 118, n. 2, p. 250-256, Jan. 2011.

JENSEN, C. B. et al. Altered PI3-kinase/Akt signalling in skeletal muscle of young men with low birth weight. **PLoS One**, v. 3, n. 11, p. e3738, 2008.

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

KANETO, H. et al. Oxidative stress, ER stress, and the JNK pathway in type 2 diabetes. **J. Mol. Med.**, v. 83, n. 6, p. 429-439, Jun. 2005.

KANETY, H. et al. Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). Possible mechanism for suppression of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 40, p. 23780-23784, Oct. 1995.

- KASUGA, M. et al. The structure of insulin receptor and its subunits. Evidence for multiple nonreduced forms and a 210,000 possible proreceptor. **J. Biol. Chem.**, v. 257, n. 17, p. 10392-10399, Sep. 1982a.
- KASUGA, M.; KARLSSON, F. A.; KAHN, C. R. Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. **Science**, v. 215, n. 4529, p. 185-187, Jan. 1982b.
- KASUGA, M. et al. Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin receptor in a cell-free system. **Nature**, v. 298, n. 5875, p. 667-669, Aug. 1982c.
- KATZ, E. B. et al. The metabolic consequences of altered glucose transporter expression in transgenic mice. **J. Mol. Med.**, v. 74, n. 11, p. 639-652, Nov. 1996.
- KENSARA, O. A. et al. Fetal programming of body composition: relation between birth weight and body composition measured with dual-energy X-ray absorptiometry and anthropometric methods in older Englishmen. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 82, n. 5, p. 980-987, Nov. 2005.
- KIM, J. J.; SEARS, D. D. TLR4 and Insulin Resistance. **Gastroenterol. Res. Pract.**, v. 2010, p.212563, 2010.
- KOHN, A. D.; TAKEUCHI, F.; ROTH, R. A. Akt, a pleckstrin homology domain containing kinase, is activated primarily by phosphorylation. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 36, p. 21920-21926, Sep. 1996.
- KRUGER, N. J.; HAMMOND, J. B. Molecular comparison of pyrophosphate- and atp-dependent fructose 6-phosphate 1-phosphotransferases from potato tuber. **Plant. Physiol.**, v. 86, n. 3, p. 645-648, Mar. 1988.
- LALLA, E. et al. Blockade of RAGE suppresses periodontitis-associated bone loss in diabetic mice. **J. Clin. Invest.**, v. 105, n. 8, p. 1117-1124, Apr. 2000.
- LALLA, E.; LAMSTER, I. B.; SCHMIDT, A. M. Enhanced interaction of advanced glycation end products with their cellular receptor RAGE: implications for the pathogenesis of accelerated periodontal disease in diabetes. **Ann. Periodontol.**, v. 3, n. 1, p. 13-19, Jul. 1998.
- LANGLEY-EVANS, S. C.; MCMULLEN, S. Developmental origins of adult disease. **Med. Princ. Pract.**, v. 19, n. 2, p. 87-98, 2010.

- LEGUISAMO, N. M. et al. GLUT4 content decreases along with insulin resistance and high levels of inflammatory markers in rats with metabolic syndrome. **Cardiovasc. Diabetol.**, v. 11, p. 100, 2012.
- LEHNEN, A. M. et al. The beneficial effects of exercise in rodents are preserved after detraining: a phenomenon unrelated to GLUT4 expression. **Cardiovasc. Diabetol.**, v. 9, p. 67, 2010.
- LETO, D.; SALTIEL, A. R. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 13, n. 6, p. 383-396, Jun. 2012.
- LIBMAN, I. M. et al. Insulin dependent diabetes mellitus in the 21st century and beyond a model disease for global health? (A review). **Diabete Metab.**, v. 19, n. 1, Pt 2, p. 74-79, 1993.
- LING, C.; GROOP, L. Epigenetics: a molecular link between environmental factors and type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 58, n. 12, p. 2718-2725, Dec. 2009.
- LIU, H. W. et al. Developmental programming in skeletal muscle in response to overnourishment in the immediate postnatal life in rats. **J. Nutr. Biochem.**, v. 24, n. 11, p. 1859-1869, Nov. 2013.
- LÖE, H. Periodontal disease: the sixth complication of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 16, n. 1, p. 3293-34, Jan. 1993.
- LOPES, K. L. et al. Perinatal salt restriction: a new pathway to programming adiposity indices in adult female Wistar rats. **Life Sci.**, v. 82, n. 13-14, p. 728-732, Mar. 2008.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, n. 1, p. 265-275, Nov. 1951.
- LUMENG, C. N.; BODZIN, J. L.; SALTIEL, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **J. Clin. Invest.**, v. 117, n. 1, p. 175-184, Jan. 2007.
- LUMENG, C. N.; DEYOUNG, S. M.; SALTIEL, A. R. Macrophages block insulin action in adipocytes by altering expression of signaling and glucose transport proteins. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v. 292, n. 1, p. E166-E174, Jan. 2007.

LUMENG, C. N. et al. Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. **Diabetes**, v. 57, n. 12, p. 3239-46, Dec. 2008.

LUNARDELLI, A. N.; PERES, M. A. Is there an association between periodontal disease, prematurity and low birth weight? A population-based study. **J. Clin. Periodontol.**, v. 32, n. 9, p. 938-946, Sep. 2005.

LUO, Z. C.; XIAO, L.; NUYT, A. M. Mechanisms of developmental programming of the metabolic syndrome and related disorders. **World J. Diabetes**, v. 1, n. 3, p. 89-98, Jul. 2010.

MACHADO, U. F.; SCHAAN, B. D.; SERAPHIM, P. M. Transportadores de glicose na síndrome metabólica. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 50, n. 2, p. 177-189, Apr. 2006.

MAIANU, L.; KELLER, S. R.; GARVEY, W. T. Adipocytes exhibit abnormal subcellular distribution and translocation of vesicles containing glucose transporter 4 and insulin-regulated aminopeptidase in type 2 diabetes mellitus: implications regarding defects in vesicle trafficking. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 86, n. 11, p. 5450-5456, Nov. 2001.

MANNEM, S.; CHAVA, V. K. The relationship between maternal periodontitis and preterm low birth weight: A case-control study. **Contemp. Clin. Dent.**, v. 2, n. 2, p. 88-93, Apr. 2011.

MANTOVANI, A. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol.**, v. 25, n. 12, p. 677-686, Dec. 2004.

MARTINEZ, F. O. et al. Macrophage activation and polarization. **Front. Biosci.**, v. 13, p. 453-461, 2008.

MARTINEZ, P. et al. Macrophage polarization alters the expression and sulfation pattern of glycosaminoglycans. **Glycobiology**, Dec. 2014.

MCGEE, S. L. et al. Exercise increases nuclear AMPK alpha2 in human skeletal muscle. **Diabetes**, v. 52, n. 4, p. 926-928, Apr. 2003.

MICHELIN, M. C. et al. Porphyromonas gingivalis infection at different gestation periods on fetus development and cytokines profile. **Oral Dis.**, v. 18, n. 7, p. 648-654, Oct. 2012.

MITSUMOTO, Y.; KLIP, A. Development regulation of the subcellular distribution and glycosylation of GLUT1 and GLUT4 glucose transporters during myogenesis of L6 muscle cells. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 7, p. 4957-4962, Mar. 1992.

MURRAY, P. J. et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 14-20, Jul. 2014.

NIETO-VAZQUEZ, I. et al. Dual role of interleukin-6 in regulating insulin sensitivity in murine skeletal muscle. **Diabetes**, v. 57, n. 12, p. 3211-3221, Dec. 2008.

OFFENBACHER, S. et al. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. **J. Periodontol.**, v. 67, n. 10, Suppl, p. 1103-1113, Oct. 1996.

OZANNE, S. E. et al. Low birthweight is associated with specific changes in muscle insulin-signalling protein expression. **Diabetologia**, v. 48, n. 3, p. 5475-52, Mar. 2005.

PARK, J. H. et al. Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1. **J. Clin. Invest.**, v. 118, n. 6, p. 2316-2324, Jun. 2008.

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

PEDERSEN, B. K.; FISCHER, C. P. Physiological roles of muscle-derived interleukin-6 in response to exercise. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, v. 10, n. 3, p. 265-271, May 2007.

PETERSEN, A. M.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **J. Appl. Physiol.**, v. 98, n. 4, p. 1154-1162, Apr. 2005.

PINNEY, S. E.; SIMMONS, R. A. Epigenetic mechanisms in the development of type 2 diabetes. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 21, n. 4, p. 223-229, Apr. 2010.

PLOMGAARD, P. et al. Tumor necrosis factor-alpha induces skeletal muscle insulin resistance in healthy human subjects via inhibition of Akt substrate 160 phosphorylation. **Diabetes**, v. 54, n. 10, p. 2939-2945, Oct. 2005.

PONTES ANDERSEN, C. C. et al. Periodontitis deteriorates metabolic control in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. **J. Periodontol.**, v. 77, n. 3, p. 350-356, Mar. 2006.

- QURESHI, A. et al. Periodontal infection: a potential risk factor for pre-term delivery of low birth weight (PLBW) babies. **J. Pak. Med. Assoc.**, v. 55, n. 10, p. 448-452, Oct. 2005.
- RAVELLI, A. C. et al. Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 70, n. 5, p. 811-816, Nov. 1999.
- REYNOLDS, R. M.; PHILLIPS, D. I. Long-term consequences of intrauterine growth retardation. **Horm. Res.**, v. 49, Suppl 2, p. 28-31, 1998.
- ROVIN, S.; COSTICH, E. R.; GORDON, H. A. The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats. **J. Periodontal Res.**, v. 1, n. 3, p. 193-204, 1966.
- SHIRAKASHI, D.J. Avaliação da via inibitória do sinal insulínico em ratos adultos, proles de ratas com doença periodontal. 2012. 107 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2012
- SHIRAKASHI, D. J. et al. Maternal periodontal disease in rats decreases insulin sensitivity and insulin signaling in adult offspring. **J. Periodontol.**, v. 84, n. 3, p. 407-414, Mar. 2013.
- SHOELSON, S. E.; LEE, J.; GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, v. 116, n. 7, p. 1793-1801, Jul. 2006.
- SOUTHERLAND, J. H.; TAYLOR, G. W.; OFFENBACHER, S. Diabetes and periodontal infection: making the connection. **Clinical Diabetes**, v. 23, n. 9, p. 171-177, 2005.
- SRIKANTHAN, P.; KARLAMANGLA, A. S. Relative muscle mass is inversely associated with insulin resistance and prediabetes. Findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 96, n. 9, p. 2898-2903, Sep. 2011.
- SRINIVAS, S. K.; PARRY, S. Periodontal disease and pregnancy outcomes: time to move on? **J. Womens Health**, v. 21, n. 2, p. 121-125, Feb. 2012.
- STUMP, C. S. et al. The metabolic syndrome: role of skeletal muscle metabolism. **Ann. Med.**, v. 38, n. 6, p. 389-402, 2006.
- SUN, X. J. et al. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. **Nature**, v. 352, n. 6330, p. 73-77, Jul. 1991.

- SUN, X. J. et al. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. **Nature**, v. 377, n. 6545, p. 173-177, Sep. 1995.
- SWATI, P. Simultaneous detection of periodontal pathogens in subgingival plaque and placenta of women with hypertension in pregnancy. **Arch. Gynecol. Obstet.**, v. 285, n. 3, p. 613-619, Mar. 2012.
- TAMEMOTO, H. et al. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. **Nature**, v. 372, n. 6502, p. 182-186, Nov. 1994.
- TAYLOR, G. W.; BORGNAKKE, W. S. Periodontal disease: associations with diabetes, glycemic control and complications. **Oral Dis.**, v. 14, n. 3, p. 191-203, Apr. 2008.
- TAYLOR, G. W. et al. Non-insulin dependent diabetes mellitus and alveolar bone loss progression over 2 years. **J. Periodontol.**, v. 69, n. 1, p. 76-83, Jan. 1998.
- THAMOTHARAN, M. et al. GLUT4 expression and subcellular localization in the intrauterine growth-restricted adult rat female offspring. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 288, n. 5, p. E935-E947, May 2005.
- TORRES-LEAL, F. L. et al. The role of inflamed adipose tissue in the insulin resistance. **Cell Biochem. Funct.**, v. 28, n. 8, p. 623-631, Dec. 2010.
- TSAOUSIDOU, E. et al. Distinct roles for JNK and IKK activation in agouti-related peptide neurons in the development of obesity and insulin resistance. **Cell Rep.**, v. 9, n. 4, p. 1495-1506, Nov. 2014.
- TUNCMAN, G. et al. Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 103, n. 28, p. 10741-10746, Jul 2006.
- ÜSTÜN, K. et al. Periodontal disease in patients with psoriatic arthritis. **Inflammation**, v. 36, n. 3, p. 665-669, Jun. 2013.
- VAXILLAIRE, M.; FROGUEL, P. Monogenic diabetes in the young, pharmacogenetics and relevance to multifactorial forms of type 2 diabetes. **Endocr. Rev.**, v. 29, n. 3, p. 254-264, May 2008.

- VLISSARA, H.; PALACE, M. R. Diabetes and advanced glycation endproducts. **J. Intern. Med.**, v. 251, n. 2, p. 87-101, Feb. 2002.
- WANG, P. L.; OHURA, K. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide signaling in gingival fibroblasts-CD14 and Toll-like receptors. **Crit. Rev. Oral. Biol. Med.**, v. 13, n. 2, p. 132-142, 2002.
- WEI, Y. et al. Skeletal muscle insulin resistance: role of inflammatory cytokines and reactive oxygen species. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 294, n. 3, p. R673-R680, Mar. 2008.
- WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J. Clin. Invest.**, v. 112, n. 12, p. 1796-1808, Dec. 2003.
- WELLEN, K. E.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, stress, and diabetes. **J. Clin. Invest.**, v. 115, n. 5, p. 1111-1119, May 2005.
- WESTERMEIER, F. et al. Programming of fetal insulin resistance in pregnancies with maternal obesity by ER stress and inflammation. **Biomed Res. Int.**, v. 2014, p. 917672, 2014.
- WHITE, M. F.; TAKAYAMA, S.; KAHN, C. R. Differences in the sites of phosphorylation of the insulin receptor in vivo and in vitro. **J. Biol. Chem.**, v. 260, n. 16, p. 9470-9478, Aug. 1985.
- WHITEMAN, E. L.; CHO, H.; BIRNBAUM, M. J. Role of Akt/protein kinase B in metabolism. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 13, n. 10, p. 444-451, Dec. 2002.
- XIE, L. et al. Interactive changes between macrophages and adipocytes. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 17, n. 4, p. 651-659, Apr. 2010.
- YLIHÄRSILÄ, H. et al. Birth size, adult body composition and muscle strength in later life. **Int. J. Obes.**, v. 31, n. 9, p. 1392-1399, Sep. 2007.
- ZABOLOTNY, J. M. et al. Protein-tyrosine phosphatase 1B expression is induced by inflammation in vivo. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 21, p. 14230-14241, May 2008.

ANEXO A

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



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

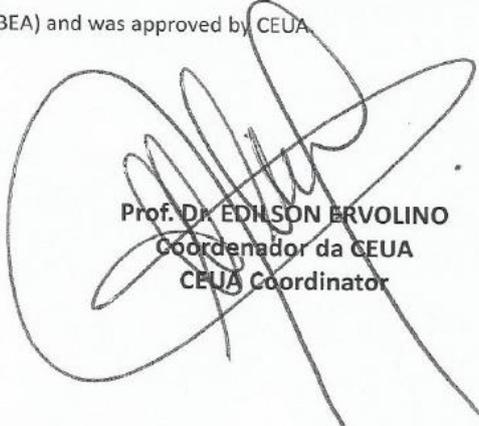
Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Avaliação do conteúdo de Glut4 e seu índice de translocação para membrana plasmática em tecido muscular de ratos adultos, proles de ratas com doença periodontal" sob responsabilidade da Pesquisadora DÓRIS HISSAKO SUMIDA e colaboração de Maria Sara de Lima Coutinho, Fernando Yamamoto Chiba, Rita de Cássia Alves Nunes, Max Sander de Oliveira da Mota e Jéssica Cristina Bonilha está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo FOA-00863-2013.

CERTIFICATE

We certify that the research "Evaluation of Glut4 content and its translocation to the plasmatic membrane in muscle tissue of adult rats, offspring of rats with periodontal disease", process number FOA-00863-2013, under responsibility of DÓRIS HISSAKO SUMIDA and with collaboration of Maria Sara de Lima Coutinho, Fernando Yamamoto Chiba, Rita de Cássia Alves Nunes, Max Sander de Oliveira da Mota and Jéssica Cristina Bonilha agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.



Prof. DR. EDILSON ERVOLINO
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

ANEXO B

Artigo submetido à revista Journal of Periodontology

Maternal periodontal disease decreases Akt phosphorylation and plasma membrane GLUT4 content in skeletal muscle of adult offspring

Running title: Maternal periodontal disease decreases GLUT4 in offspring

One-sentence summary describing the key finding(s) from the study: Maternal periodontal disease in rats induced low birth weight, insulin resistance, decreased plasma membrane GLUT4 content and translocation index, and reduced Akt phosphorylation in the skeletal muscle of the adult offspring.

3001 words, four figures and two tables

ABSTRACT

Background: The fetal programming hypothesis suggests that intrauterine stimuli can induce metabolic changes in offspring, increasing the disease risk in adulthood. Periodontal disease may enhance serum cytokine levels. Cytokines such as TNF- α have been associated with reduced GLUT4 expression, decreased Akt phosphorylation, and insulin resistance. This study evaluated the glucose transporter protein GLUT4 and Akt serine phosphorylation status in the gastrocnemius skeletal muscle (GSM), glycemia, insulinemia, and the change in body weight in offspring of rats with periodontal disease.

Methods: Female Wistar rats were distributed into a control group (CN, n = 4) and an experimental periodontal disease group (PD, n = 4), in which a ligature was placed around the mandibular first molars. Seven days after ligature placement, both groups were mated with normal male rats. The ligatures remained throughout pregnancy until weaning, after which the male offspring were distributed into groups: CN-o, control rat offspring (n = 18); and PD-o, periodontal disease rat offspring (n = 18). The body weight from 0–75 days of age was measured. At 75 days, the glycemia, insulinemia, and GLUT4 content and Akt serine phosphorylation in the GSM were measured in the offspring.

Results: The PD-o group showed a low birth weight (LBW), unchanged glycemia, increased insulinemia, insulin resistance, decreased GLUT4 content in the plasma membrane and translocation index, and reduced Akt serine phosphorylation status after insulin stimulation.

Conclusions: Maternal periodontal disease causes LBW, insulin resistance, and alterations in the final stage of insulin signaling in the skeletal muscle of adult offspring.

KEY WORDS: periodontal disease, diabetes mellitus, glucose transporter type 4, low birth weight, inflammation

INTRODUCTION

Periodontal disease is a local inflammatory process characterized by the release of toxic products, such as lipopolysaccharides, by pathogens and the host immune response comprising neutrophil, macrophage, and lymphocyte infiltration, and the release of cytokines such as tumor necrosis factor-alpha (TNF- α).¹

During pregnancy, periodontal pathogens in the oral cavity can reach the amniotic cavity and cause adverse outcomes such as low birth weight (LBW).² There is a correlation between LBW and an increased predisposition to hypertension, coronary heart disease, and diabetes in adulthood.³⁻⁵ This is explained by the fetal programming mechanism, in which environmental stimuli within the uterus affect fetal growth and health, not only during gestation, but also during adult life.^{3,6,7}

Pregnant women with periodontitis showed increased serum TNF- α and interleukin (IL)-6 concentrations.⁸ Excessive TNF- α concentration causes insulin resistance by modifying the insulin signal transduction.⁹ This hormonal pathway occurs through binding between insulin and the α -subunit of its receptor, which triggers autophosphorylation of the β -subunit followed by stimulation of tyrosine kinase activity, tyrosine phosphorylation of the insulin receptor substrate (IRS), and recruitment of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). Ultimately, this pathway triggers activation of several serine/threonine kinases, most notably Akt, which enables glucose uptake into the cells by translocating the glucose transporter (GLUT4) from the intracellular compartment to the plasma membrane.^{10,11}

Shirakashi et al.¹² showed that maternal periodontal disease altered the initial steps of the insulin-signaling pathway, as indicated by a reduction in pp185 tyrosine phosphorylation in the gastrocnemius skeletal muscle (GSM) and white adipose tissue.

Therefore, this study evaluated the relationship between maternal periodontal disease, LBW, and alterations in the final stage of insulin signaling in the GSM of their offspring, as abnormal insulin activity in muscle represents an early marker for an increased risk of diabetes.

MATERIALS AND METHODS

Animals

This study followed the Ethical Principles and Guidelines for Animal Experimentation, and was approved by the local ethics committee (protocol number 00863-

2013). The Wistar rats were housed with a 12-hour light/dark cycle (lights on at 07:00), ambient temperature of $23 \pm 2^\circ\text{C}$, and food and water available *ad libitum*.

Experimental design

Eight Wistar female rats (approximately 200 g each) were randomly divided into two groups: CN, control group (n = 4); and PD, experimental periodontal disease group (n = 4). In the PD group, periodontal disease was induced by installing a ligature (4-0 silk[¶] thread) onto the cervical region of the mandibular first molars bilaterally, as described by Rodini et al.¹³ Seven days later, the rats in both groups were mated with normal male rats. Vaginal smears were taken daily to verify the presence of sperm. After confirming pregnancy, the female rats were housed individual. The ligature was maintained throughout pregnancy until weaning the offspring.

After birth, the numbers of offspring in the CN and PD groups were matched so that each mother had the same number of offspring. After weaning, the adult female rats were euthanized (thiopental[#] overdose, 150 mg/kg), and the male offspring were studied to avoid any effect from hormonal oscillation during the estrous cycle in the juvenile female rats. The male offspring were distributed into two groups: CN-o, which were the offspring of the control rats (n = 18); and PD-o, which were the offspring of the rats with experimental periodontal disease (n = 18). The body weights of the offspring were measured once weekly from birth until 75 days of age, and experiments were performed once the offspring were 75 days-old.

Animals were fasted for 14 hours prior to experiments and anesthetized with sodium thiopental[#] (3%, 50 mg/kg, intraperitoneal). Experiments were performed 10–15 min later.

A median laparotomy was performed in rats from the CN-o (n = 10) and PD-o (n = 10) groups, and blood samples (4 mL) were taken from the inferior vena cava. The blood samples were then transferred into tubes containing heparin.^{**} Plasma was prepared by centrifuging the blood at $3000 \times g$ for 15 min at 4°C , and stored in aliquots at -70°C until glucose and insulin quantification.

The periepididymal white adipose tissue and left GSM were collected, and the absolute weight (g) and relative weight (per 100 g of body weight) of these tissues (n = 10) were measured. The left GSM (n = 5) was used to measure the GLUT4 protein content. After this procedure, the animals were euthanized. Finally, the remaining animals from the CN-o (n

= 8) and PD-o (n = 8) groups were used to evaluate the Akt serine phosphorylation status in the GSM following insulin^{††} administration (1.5 U, intravenously).

Radiographic and histological analysis of maternal periodontal tissues

The periodontal health (CN group) or effectiveness of periodontal disease induction (PD group) was confirmed using radiographic and histological analysis of the maternal jaws.

The adult female rats were euthanized after weaning the offspring, and the right and left hemi-mandibles were dissected and fixed for 24 h in 4% formaldehyde. The mandibles were radiographed at a 70 kvp, 10 mA, and 0.10 s exposure. The source-to-film distance was always set at 40 cm. The digital image was obtained directly with an optical digital plate^{†††}, and the optical plates were read in sensitized laser scanner equipment.^{§§} The images were analyzed to verify the presence of alveolar bone loss in the first molars.

After obtaining the radiographic images, the hemi-mandibles were demineralized in 10% EDTA^{||} (pH 7.4) for 3 months. The specimens were processed conventionally and embedded in paraffin. Semi-serial sections (5 µm) were obtained in the distal-mesial direction and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Histological analysis was performed as described by Garcia et al.¹⁴ A certified histologist (EE) evaluated to the following parameters: nature and degree of inflammation; extent of the inflammatory process; presence and extent of tissue necrosis; presence, extent, and nature of bone, cementum, and dentin resorption; state of the vasculature; extracellular matrix structure of the periodontal tissues; and cellularity pattern of the periodontal tissues.

Plasma glycemia, insulinemia, HOMA-IR index, and TNF- α concentrations in offspring

Using the 10 plasma samples in each group (CN-o and PD-o), the glucose concentrations were measured by the glucose oxidase method^{¶¶}, and insulinemia was measured by radioimmunoassay.^{###} Insulin resistance was evaluated by the HOMA-IR index (homeostasis model assessment of insulin resistance), which was calculated according to the following formula: $\text{HOMA-IR} = \text{fasting glycemia (mmol/L)} \times \text{fasting insulinemia } (\mu\text{IU/mL})/22.5$.¹⁵

Evaluation of Akt serine phosphorylation status in skeletal muscle of offspring

The GSM was collected from eight animals in each group (CN-o and PD-o) before and 90 seconds after administering 1.5U of regular insulin (intravenously through the portal vein).

The tissue samples were prepared as described by Carvalho et al.¹⁶, and the Akt serine phosphorylation status following insulin stimulus was quantified using Western blotting and antiphosphoserine AKTSer473 antibody.^{***} β -actin^{***} served as the loading control. Immunoreactive bands were detected by autoradiography using a chemiluminescent substrate system,^{†††} according to the manufacturer's instructions. The blots were quantitatively analyzed using software.^{†††}

GLUT4 protein analysis in offspring

Tissue samples were homogenized in sucrose buffer pH 7.4 (10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, and 250 mmol/l sucrose) and subjected to differential centrifugations to obtain the plasma membrane (PM) and microsomal-enriched (M) fractions of the GSM.¹⁷ Equal amounts of the membrane and microsomal-enriched protein fractions were resolved on a 10% SDS gel. The blots were quantified by densitometry.^{§§§} In the GLUT4 protein analysis, the ponceau stained membrane was used as a loading control. The translocation index was calculated as follows: Translocation index of GLUT4 = $PM \times 100 / (PM + M)$ ¹⁸

Statistical analysis

The body weight at 75 days and the Akt serine phosphorylation status were assessed by analysis of variance, followed by the Tukey post-hoc test when the analysis of variance suggested a significant difference between the groups ($p < 0.05$).

The birth weight, periepididymal white adipose tissue and GSM weights, glycemia, insulinemia, HOMA-IR, and the GLUT4 content in the M and PM fractions and its translocation index were analyzed using the Student t test. A *P*-value of <0.05 was considered statistically significant.

The normality of the dataset was verified for all analyzes. Data were expressed as the mean \pm standard error (SEM), and data analysis was performed with a statistical program.^{|||}

RESULTS

Radiographic and histological examination of maternal periodontal tissues

On radiographic and histological examination, the CN group exhibited characteristics consistent with a normal condition of the dental and periodontal tissues (Fig. 1A, 1B, and 1C). Radiographic examination of the PD group showed alveolar bone loss and decreased alveolar bone radiopacity in the first molar region (Fig. 1D). Histologic examination showed severe

impairment in the integrity and structure of the junctional and sulcular epithelium. Significant inflammatory infiltrate, predominantly comprising composed of mononuclear cells and polymorphonuclear cells, was present in the connective tissue of the interproximal and furcation region. All specimens showed marked bone loss. The bone of the interdental and interradicular septa had a very irregular outline, numerous resorption lacunae, and fully active osteoclasts. Areas of external root resorption were observed in most of the specimens (Fig. 1E and 1F).

Assessment of body weight and tissue weight in offspring

The PD-o group had a significantly lower birth weight ($p < 0.0001$) compared to the CN-o group (Fig. 2A). There was no difference in the mean body weight, evaluated weekly from birth until 75 days of age, between the CN-o and PD-o groups (Fig. 2B). There was a significant increase in the absolute and relative weights of the periepididymal white adipose tissue in the PD-o group compared to the tissue weights in the CN-o group ($p < 0.05$). However, the absolute and relative weights of the GSM was significantly decreased ($p < 0.05$) in the PD-o group compared to the GSM weights in the CN-o group (Table 1).

Glycemia, insulinemia, and HOMA-IR index of offspring

There was no statistical difference in fasting glycemia between the groups. However, the insulinemia values were increased in the PD-o group compared to the concentrations in the CN-o group. Furthermore, the HOMA-IR index, calculated from these parameters, was significantly higher ($p < 0.05$) in the PD-o group than the index in the CN-o group (Table 2).

Akt serine phosphorylation status of offspring

The magnitude of Akt serine phosphorylation after insulin stimulation increased significantly from baseline in both groups in the GSM ($p < 0.05$). The Akt serine phosphorylation after insulin stimulation was significantly lower ($p < 0.01$) in the PD-o group than the phosphorylation level in the CN-o group (Fig. 3).

GLUT4 content in skeletal muscle of offspring

Figures 4A, 4B, and 4C show the GLUT4 content analysis in the PM and M, and the GLUT4 translocation index, respectively. There was no difference between the groups in M;

however, the PD-o group showed a significantly lower PM ($p < 0.01$) and translocation index ($p < 0.001$) than those in the CN-o group.

DISCUSSION

Several studies have correlated maternal periodontal disease, LBW, and premature birth.¹⁹⁻²¹ Thus, our goal was to establish a relationship between maternal periodontal disease, LBW, and changes in the final stage of the insulin signaling in the muscle tissue of their offspring. The results of this study demonstrate that maternal periodontal disease causes LBW, insulin resistance, decreased in Akt serine phosphorylation, and changes in the translocation index and GLUT4 content in GSM.

LBW was observed in the experimental group. This result is consistent with those of several studies where maternal periodontal disease caused LBW.²²⁻²⁴ There was no difference in the mean weight during the 75 days-old of follow-up between the groups; similarly, Jensen et al.²⁵ found no difference in the weight in adulthood in humans with LBW. However, when evaluating the GSM weight at the time of euthanasia at 75 days of age, we observed a decreased GSM weight in the PD-o group. Although this change in GSM weight did not affect the overall body weight, according to Shirakashi et al.¹², increased in adipose tissue may have offset the decreased muscle tissue weight. Increased adipose tissue promotes increases in free fatty acids and inflammatory cytokines²⁶, and decreased muscle tissue is a risk for insulin resistance.²⁷

In the present study, we observed an increased fasting insulinemia and decreased insulin sensitivity in the PD-o group using the HOMA-IR index, and found no difference in the fasting glycemia between the groups. These results are consistent with the fetal salvage hypothesis. Children who experience intrauterine growth restriction (IUGR) develop peripheral insulin resistance through a redistribution of nutrients such as glucose favoring the essential organs, which permanently reduces the number or function of glucose transporters in skeletal muscle. As a result of this decreased peripheral insulin sensitivity, pancreatic β -cells are stimulated to produce larger amounts of insulin to achieve normal glycemia, which leads to their eventual depletion.^{28, 29} Additionally, studies by Amarilyo et al.³⁰ showed that the umbilical cord blood of children with IUGR contained high concentrations of IL-6, TNF- α , C-reactive protein, and thrombopoietin.

Defects in glucose regulation defines type-2 diabetes³¹, and inflammatory cytokines, such as TNF- α , are elevated in the adult offspring of rats with PD.¹² Excessive TNF- α levels

cause insulin resistance by modifying the insulin signal transduction.⁹ The present study found a LBW and decreased in Akt phosphorylation status after insulin stimulation in the GSM of the PD-o group. These results are consistent with those of Jensen et al.²⁵, who observed that adult humans with LBW had decreased phosphorylation of proteins such as Akt at Ser 473 after insulin stimulation of muscle tissue.

According to Plomgaard et al.⁹, TNF- α infusion in humans increases phosphorylation of p70 S6 kinase (S6K), extracellular signal-regulated protein (ERK: ERK1 and ERK2), and c-Jun amino-terminal kinase (JNK), and simultaneously increases the serine phosphorylation of IRS-1. This impairs glucose uptake by decreasing the Akt substrate 160 (AS160), which is responsible for the cascade regulating GLUT4 translocation.

Insulin-mediated glucose uptake in cardiac and skeletal muscle, and adipose tissue is performed by the insulin-sensitive glucose transporter, GLUT4.³² This uptake requires translocation of GLUT4 from the M fraction to the PM fraction, and the Akt protein is essential in mediating this process.³³ Transgenic mice lacking or overexpressing GLUT4 exhibit a decrease or increase insulin sensitivity, respectively^{31, 34, 35}; thus, this transporter is critical in maintaining glucose homeostasis.³⁶ In the evaluation of the GLUT4 content of the in GSM, we observed a decrease in the PM fraction and translocation index of the PD-o group, but there was no significant difference in the M fraction. This can be explained by the decreased Akt serine phosphorylation within the same tissue, as this protein activation is required for GLUT4 translocation.

Using flow cytometry, Xie et al.³⁷ found that significantly elevated concentrations of inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in 3T3-L1 cells (pre-adipocytes) reduced the GLUT4 expression. These cytokines play an important role in the regulation of glucose metabolism, and excessive activation of these inflammatory pathways may represent a critical step in the development of insulin resistance.³⁸ Ozanne et al.³⁹ verified that the muscle tissue of adult humans with LBW showed decreased expression of proteins within the insulin signaling pathway, including protein kinase C (PKC) ζ , p85 α , p110 β , and GLUT4. In another model of fetal programming, a low sodium maternal diet resulted in LBW in the offspring and increased adiposity in the adult female offspring. This finding reinforces the results of the present study in demonstrating the influence of intra-uterine disturbances on the adult offspring.⁴⁰ The results of this study emphasizes the importance of addressing maternal periodontal disease in order to prevent adverse outcomes in adult offspring.

CONCLUSIONS

Maternal periodontal disease causes low birth weight and alterations in the final stage of insulin signaling in skeletal muscle of adult offspring. These findings demonstrate the impact that periodontal disease has on the intrauterine environment in the short-term, and on the long-term predisposition to certain diseases in adulthood of the offspring. This reinforces the importance of maintaining maternal oral health in ensuring the overall health of the offspring.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants (2013/08783-4) from the São Paulo Research Foundation (FAPESP), São Paulo, SP, Brazil, Pro-Rectorate of Research of UNESP (PROPe-UNESP), and Foundation for the Development of UNESP (FUNDUNESP). We thank Associate Professor Dr. Guilherme de Paula Nogueira^{¶¶¶} and laboratory technician, Mrs. Devani Mariano Pinheiro,^{¶¶¶} for help in the insulinemia evaluation.

FOOTNOTES

¶ Seda-Silk, Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brazil.

Thiopentax®, Cristália, Itapira, Brazil.

** Liquemine, Hoffmann-La Roche, Basle, Switzerland.

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

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

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

|| UltraPure™ EDTA, Invitrogen, Scotland, UK.

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

Sensitive Rat Insulin, SRI-13K, Millipore, St Charles, MO, EUA.

*** Santa Cruz Biotechnology. Inc, Santa Cruz, CA, USA.

††† GE Healthcare, Buckinghamshire, UK.

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

§§§ ImageQuant TL, GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK.

||| Graph Pad Prism (version 5.0), GraphPad Software, Inc, San Diego, CA, USA.

¶¶¶ Department of Support, Animal Production and Health, Veterinary Medicine School of Araçatuba, São Paulo State University - UNESP, Brazil.

REFERENCES

1. Lin D, Smith MA, Champagne C, Elter J, Beck J, Offenbacher S. Porphyromonas gingivalis infection during pregnancy increases maternal tumor necrosis factor alpha, suppresses maternal interleukin-10, and enhances fetal growth restriction and resorption in mice. *Infect Immun* 2003;71:5156-5162.
2. Ercan E, Eratalay K, Deren O, et al. Evaluation of periodontal pathogens in amniotic fluid and the role of periodontal disease in pre-term birth and low birth weight. *Acta Odontol Scand* 2013;71:553-559.
3. Barker DJ. The long-term outcome of retarded fetal growth. *Clin Obstet Gynecol* 1997;40:853-863.
4. Hales CN, Barker DJ, Clark PM, et al. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ* 1991;303:1019-1022.
5. Barker DJ, Eriksson JG, Forsén T, Osmond C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int J Epidemiol* 2002;31:1235-1239.
6. Barker DJ. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ* 1995;311:171-174.
7. Langley-Evans SC, McMullen S. Developmental origins of adult disease. *Med Princ Pract* 2010;19:87-98.
8. Sert T, Kırzıoğlu FY, Fentoğlu O, Aylak F, Mungan T. Serum placental growth factor, vascular endothelial growth factor, soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 and -2 levels in periodontal disease, and adverse pregnancy outcomes. *J Periodontol* 2011;82:1735-1748.
9. Plomgaard P, Bouzakri K, Krogh-Madsen R, Mittendorfer B, Zierath JR, Pedersen BK. Tumor necrosis factor- α induces skeletal muscle insulin resistance in healthy human subjects via inhibition of Akt substrate 160 phosphorylation. *Diabetes* 2005;54:2939-2945.
10. Bevan P. Insulin signalling. *J Cell Sci* 2001;114:1429-1430.
11. Rowland AF, Fazakerley DJ, James DE. Mapping insulin/GLUT4 circuitry. *Traffic* 2011;12:672-681.
12. Shirakashi DJ, Leal RP, Colombo NH, et al. Maternal periodontal disease in rats decreases insulin sensitivity and insulin signaling in adult offspring. *J Periodontol* 2013;84:407-414.
13. Rodini CO, Batista AC, Dionísio TJ, Santos CF, Cunha FQ, Lara VS. Morphologic evaluation and expression of matrix metalloproteinases-2 and 9 and nitric oxide during experimental periodontal disease in rat. *J Mol Histol* 2008;39:275-282.
14. Garcia VG, Novaes VC, de Almeida JM, et al. Evaluation of the progression and treatment of experimental periodontitis in rats subjected to chemotherapy with 5-fluorouracil. *Support Care Cancer* 2014.
15. Bonora E, Targher G, Alberiche M, et al. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. *Diabetes Care* 2000;23:57-63.
16. Carvalho CR, Brenelli SL, Silva AC, Nunes AL, Velloso LA, Saad MJ. 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.
17. Mitsumoto Y, Klip A. Development regulation of the subcellular distribution and glycosylation of GLUT1 and GLUT4 glucose transporters during myogenesis of L6 muscle cells. *J Biol Chem* 1992;267:4957-4962.
18. Dolnikoff M, Martín-Hidalgo A, Machado UF, Lima FB, Herrera E. Decreased lipolysis and enhanced glycerol and glucose utilization by adipose tissue prior to

- development of obesity in monosodium glutamate (MSG) treated-rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001;25:426-433.
19. Offenbacher S, Katz V, Fertik G, et al. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. *J Periodontol* 1996;67:1103-1113.
 20. Khader YS, Ta'ani Q. Periodontal diseases and the risk of preterm birth and low birth weight: a meta-analysis. *J Periodontol* 2005;76:161-165.
 21. Guimarães AN, Silva-Mato A, Miranda Cota LO, Siqueira FM, Costa FO. Maternal periodontal disease and preterm or extreme preterm birth: an ordinal logistic regression analysis. *J Periodontol* 2010;81:350-358.
 22. Guimarães AN, Silva-Mato A, Siqueira FM, Cyrino RM, Cota LO, Costa FO. Very low and low birth weight associated with maternal periodontitis. *J Clin Periodontol* 2012;39:1024-1031.
 23. Mannem S, Chava VK. The relationship between maternal periodontitis and preterm low birth weight: A case-control study. *Contemp Clin Dent* 2011;2:88-93.
 24. Haerian-Ardakani A, Eslami Z, Rashidi-Meibodi F, et al. Relationship between maternal periodontal disease and low birth weight babies. *Iran J Reprod Med* 2013;11:625-630.
 25. Jensen CB, Martin-Gronert MS, Storgaard H, Madsbad S, Vaag A, Ozanne SE. Altered PI3-kinase/Akt signalling in skeletal muscle of young men with low birth weight. *PLoS One* 2008;3:e3738.
 26. Boden G. Obesity and free fatty acids. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2008;37:635-646, viii-ix.
 27. Hales CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull* 2001;60:5-20.
 28. Hofman PL, Cutfield WS, Robinson EM, et al. Insulin resistance in short children with intrauterine growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:402-406.
 29. Cianfarani S, Germani D, Branca F. Low birthweight and adult insulin resistance: the "catch-up growth" hypothesis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1999;81:F71-73.
 30. Amarilyo G, Oren A, Mimouni FB, Ochshorn Y, Deutsch V, Mandel D. Increased cord serum inflammatory markers in small-for-gestational-age neonates. *J Perinatol* 2011;31:30-32.
 31. Berglund ED, Li CY, Ayala JE, McGuinness OP, Wasserman DH. Regulation of endogenous glucose production in glucose transporter 4 over-expressing mice. *PLoS One* 2012;7:e52355.
 32. Huang S, Czech MP. The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metab* 2007;5:237-252.
 33. Welsh GI, Hers I, Berwick DC, et al. Role of protein kinase B in insulin-regulated glucose uptake. *Biochem Soc Trans* 2005;33:346-349.
 34. Katz EB, Burcelin R, Tsao TS, Stenbit AE, Charron MJ. The metabolic consequences of altered glucose transporter expression in transgenic mice. *J Mol Med (Berl)* 1996;74:639-652.
 35. Carvalho E, Kotani K, Peroni OD, Kahn BB. Adipose-specific overexpression of GLUT4 reverses insulin resistance and diabetes in mice lacking GLUT4 selectively in muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;289:E551-561.
 36. Leguisamo NM, Lehnen AM, Machado UF, et al. GLUT4 content decreases along with insulin resistance and high levels of inflammatory markers in rats with metabolic syndrome. *Cardiovasc Diabetol* 2012;11:100.
 37. Xie L, Ortega MT, Mora S, Chapes SK. Interactive changes between macrophages and adipocytes. *Clin Vaccine Immunol* 2010;17:651-659.
 38. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 2005;115:1111-1119.

39. Ozanne SE, Jensen CB, Tingey KJ, Storgaard H, Madsbad S, Vaag AA. Low birthweight is associated with specific changes in muscle insulin-signalling protein expression. *Diabetologia* 2005;48:547-552.
40. Lopes KL, Furukawa LN, de Oliveira IB, Dolnikoff MS, Heimann JC. Perinatal salt restriction: a new pathway to programming adiposity indices in adult female Wistar rats. *Life Sci* 2008;82:728-732.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 Radiographs and photomicrographs of the mandibular first molars in the control (CN) (A-C) and periodontal disease (PD) (D-F) groups. The radiographic (A) and histological (B-C) characteristics are consistent with a normal pattern in the CN group and alveolar bone loss (D-E) and severe local inflammation (E-F) in the PD group. Abbreviations and symbols: ab, alveolar bone; ct, connective tissue; dp, dental pulp; pdl, periodontal ligament. H&E staining. Scale bars: A and D, 1000 μ m; B and E, 500 μ m; C and F, 250 μ m.

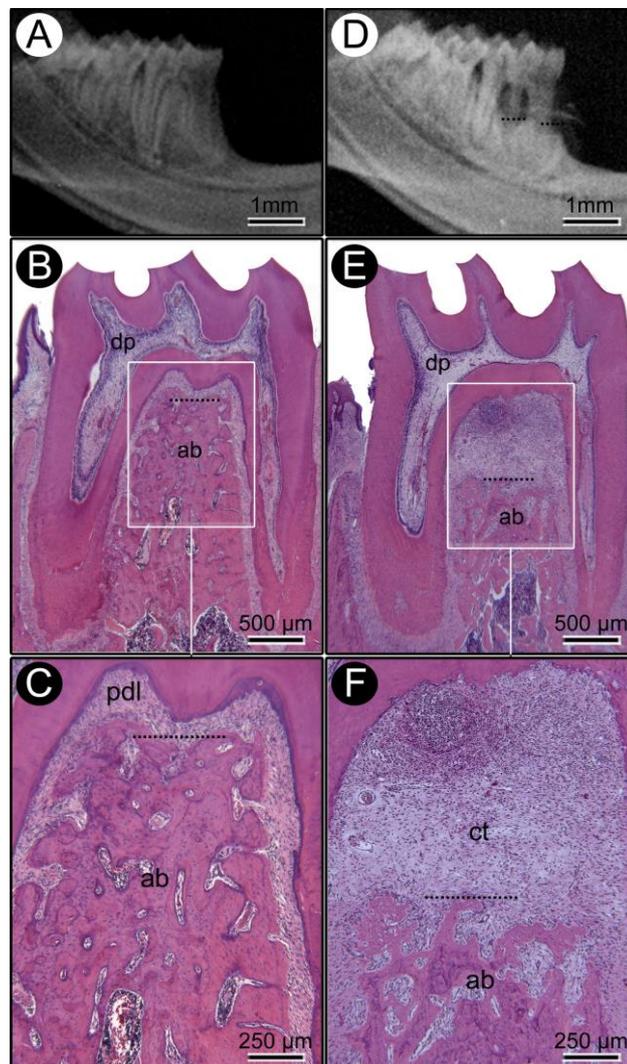


Figure 2 Body weight of offspring in the control (CN-o) and periodontal disease (PD-o) groups at birth (A) and weekly until 75 days of age (B). Values are presented the as mean \pm standard error (n = 18 per group). *** p < 0.0001

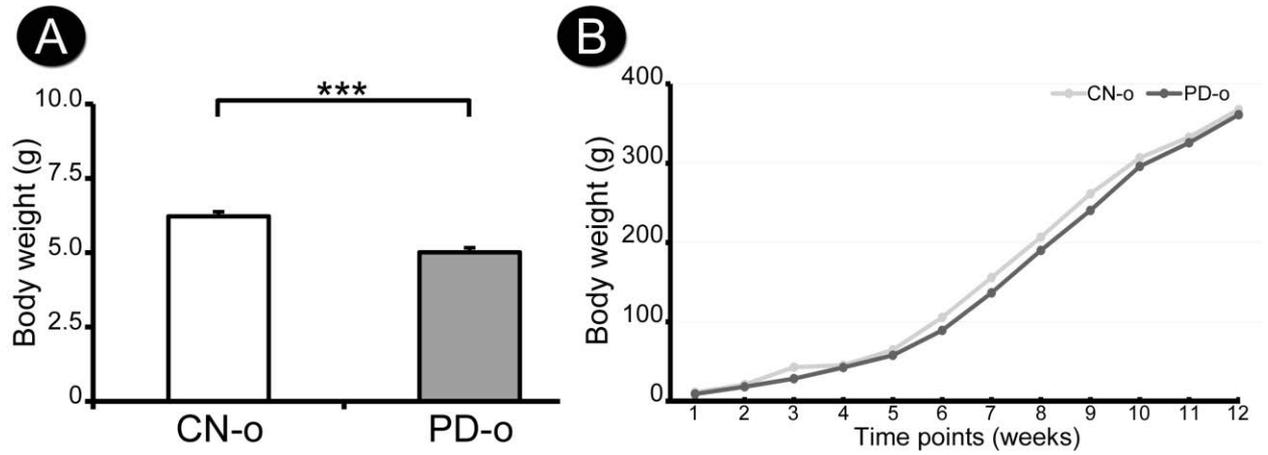


Figure 3 Evaluation of Akt serine phosphorylation status before (-) and after (+) insulin stimulation in the gastrocnemius muscle of rats in the control (CN-o) and periodontal disease (PD-o) groups. **(A)** Typical autoradiography: equal amounts of protein were analyzed by SDS-PAGE (185 mg). β -actin was used as the loading control. **(B)** Akt serine phosphorylation status (expressed in arbitrary units) are presented as the mean \pm standard error (n = 8 per group). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001

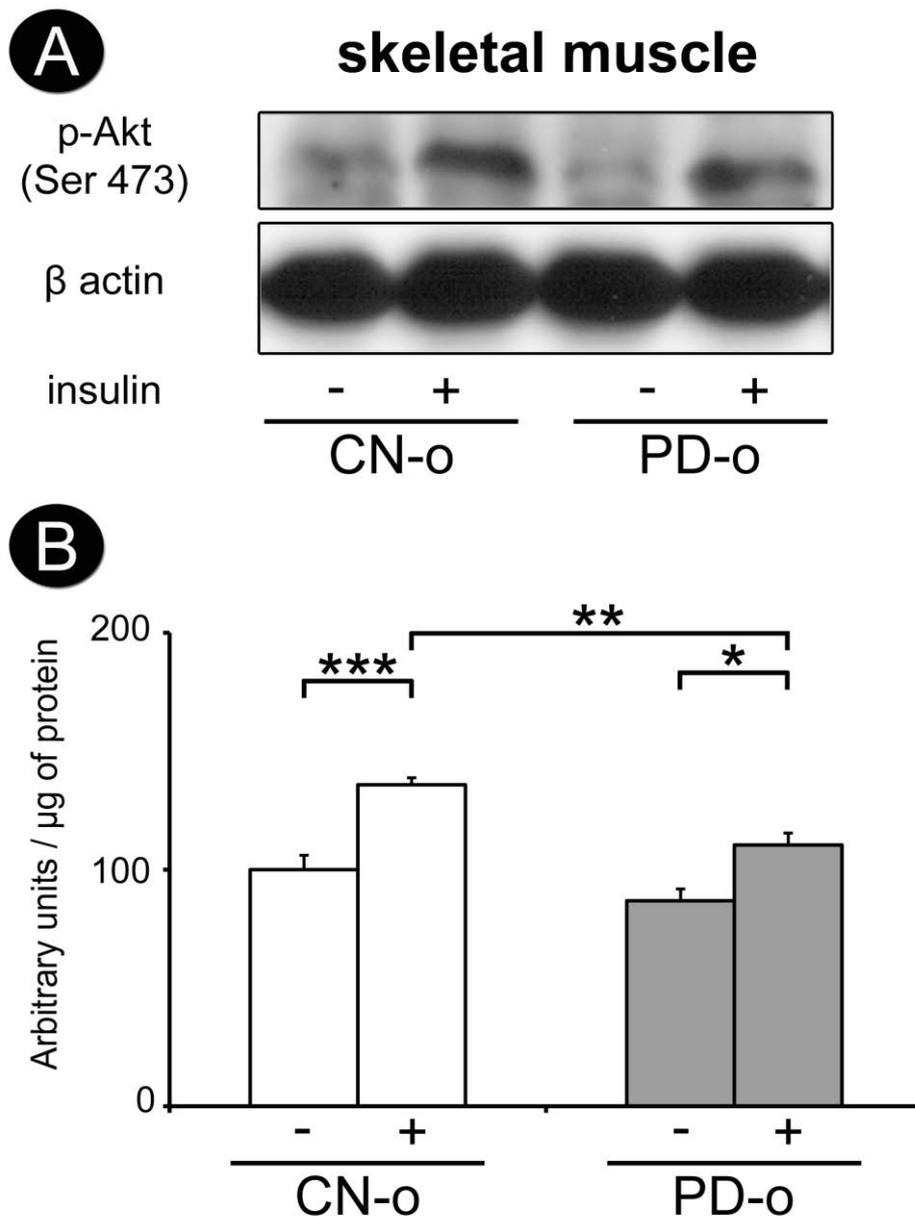
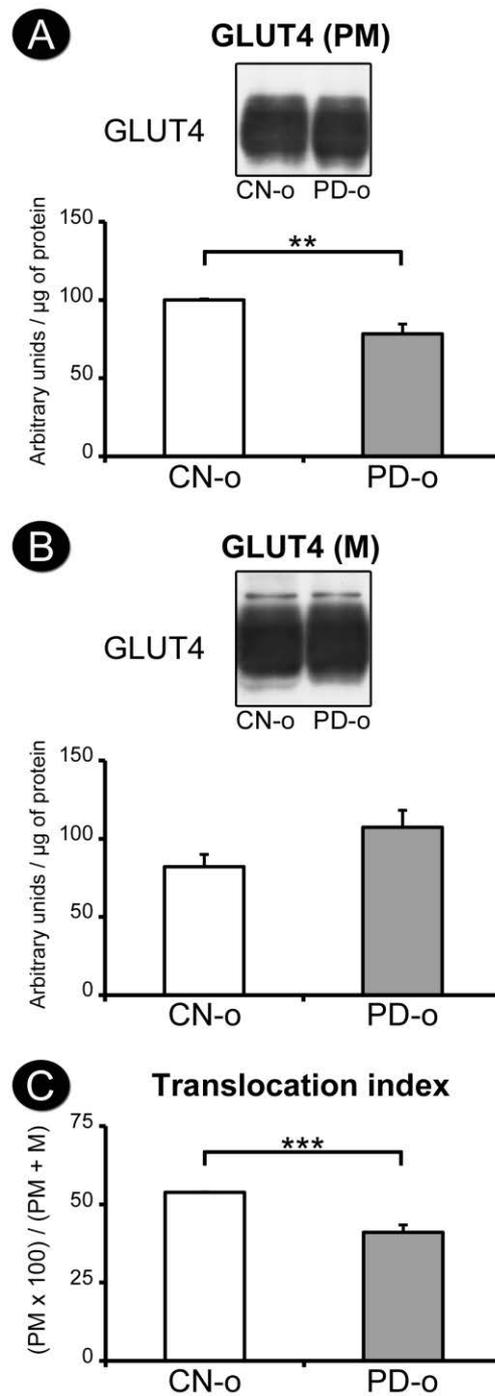


Figure 4 GLUT4 content in the plasma membrane (PM) (A) and microsomal-enriched (M) (B) fractions of the gastrocnemius muscle. (C) GLUT4 translocation index in the offspring of the control (CN-o) and experimental periodontal disease (PD-o) groups. The results are presented as mean \pm standard error (n = 5 per group). ** p < 0.01, ***p < 0.001



TABLES

Table 1 Absolute and relative weights of the periepididymal white adipose tissue and gastrocnemius skeletal muscle.

Tissue	CN-o	PD-o
WAT g	3.084 ± 0.1616	3.794 ± 0.2383*
WAT g/100g of body weight	0.8490 ± 0.04441	1.057 ± 0.07542*
GSM g	2.266 ± 0.05452	2.053 ± 0.04657*
GSM g/100g of body weight	0.6159 ± 0.01788	0.5715 ± 0.008890*

* $p < 0.05$ compared with the control group. Values are presented as the mean ± standard error (n = 10). CN-o, control group offspring; PD-o, periodontal disease offspring; WAT, periepididymal white adipose tissue; GSM, gastrocnemius skeletal muscle.

Table 2 Glycemia, insulinemia, and HOMA-IR Index in offspring of control rats and offspring of rats with experimental periodontal disease

Parameters	CN-o	PD-o
Glycemia	5.865 ± 0.1319	5.813 ± 0.2600
Insulinemia	12.34 ± 2.021	22.82 ± 3.661*
HOMA-IR	3.204 ± 0.4800	6.092 ± 1.181*

* $p < 0.05$ compared with the control group. Values are presented as the mean ± standard error (n = 10 per group). Plasma glucose measured in mmol/L and insulin in $\mu\text{IU/mL}$. CN-o, control group offspring; PD-o, periodontal disease offspring; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance.