

THAÍS VERÔNICA SAORI TSOSURA

**AVALIAÇÃO DAS VIAS INSULÍNICA E INFLAMATÓRIA EM
TECIDOS MUSCULAR ESQUELÉTICO E ADIPOSEO DE
RATOS ADULTOS, PROLES DE RATAS COM LESÃO
PERIAPICAL**

THAÍS VERÔNICA SAORI TSOSURA

**AVALIAÇÃO DAS VIAS INSULÍNICA E INFLAMATÓRIA EM
TECIDOS MUSCULAR ESQUELÉTICO E ADIPOSE DE
RATOS ADULTOS, PROLES DE RATAS COM LESÃO
PERIAPICAL**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof.^a Titular Doris Hissako Sumida

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

T882a Tsosura, Thaís Verônica Saori.
Avaliação das vias insulínica e inflamatória em tecidos muscular esquelético e adiposo de ratos adultos, proles de ratas com lesão periapical / Thaís Verônica Saori Tsosura. - Araçatuba, 2019
84 f. : il. ; tab.

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

1. Periodontite periapical 2. Desenvolvimento fetal
3. Resistência à insulina 4. Inflamação I. T.

CDD 612

DADOS CURRICULARES

Nascimento: 13.09.1993, Campinas – SP

Filiação: Rubens Tadao Tsosura

Cacilda Sayuri Ando Tsosura

2013/2016: Curso de Graduação em Biomedicina pelo Centro Universitário Católico Salesiano *Auxilium* – UniSALESIANO, Araçatuba – SP

2017/2019: 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

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho, com muito carinho à minha família, em especial aos meus pais, **Rubens Tadao Tsosura** e **Cacilda Sayuri Ando Tsosura**, a quem devo grande parte de minhas conquistas.*

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação de mestrado contou com importantes apoios e incentivos, sem os quais não se teria tornado uma realidade.

À minha orientadora, **Prof.^a Doris Hissako Sumida** por ter me recebido com grande carinho em seu laboratório, durante a minha graduação até a finalização do meu mestrado, e ter acreditado em meu trabalho desde o primeiro momento. Obrigada pela orientação, conselhos, paciência, confiança e incentivo que foram fundamentais para realizar e prosseguir este estudo. Assim, espero contar com a sua orientação durante o doutorado que pretendo realizar. Eternamente grata por todo o apoio.

Agradeço imensamente à minha família, especialmente aos meus pais, **Rubens Tadao Tsosura** e **Cacilda Sayuri Ando Tsosura**, exemplos de honestidade e dedicação. Obrigada pela paciência, carinho e apoio incondicional em todos os momentos. Palavras são escassas para expressar a grande admiração e o amor que tenho por vocês!

À minha irmã, **Karin Vanessa Kaori Tsosura**, por todo afeto, companheirismo e cumplicidade que foram essenciais para a fase pela qual passei.

Aos meus avós, **Shigueru Ando** e **Youko Akama Ando**, pelo amor e pela torcida imensa.

Ao **Fernando Yamamoto Chiba**, meu namorado, melhor amigo e companheiro de todas as horas por sempre estar ao meu lado nos momentos bons ou difíceis. Obrigada pela constante presença. Amo você!

Ao **Prof. Luciano Tavares Angelo Cintra**, por ter sido tão solícito em todos os momentos. Obrigada por todas as suas contribuições valiosas para a realização deste estudo. Estendo meus agradecimentos à sua aluna, **Letícia Citelli Conti**, pela imensa ajuda e solicitude.

À **Prof.^a Sandra Helena Penha de Oliveira**, pelos pareceres semestrais do projeto.

À coordenadora e à vice-coordenadora do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba / UNESP, **Prof.^a Cristina Antoniali Silva** e **Prof.^a Sandra Helena Penha de Oliveira**.

Aos professores do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba / UNESP, **Prof.^a Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune**, **Prof. Antonio Hernandes Chaves Neto**, **Prof.^a Cristina Antoniali Silva**, **Prof.^a Doris Hissako Sumida**, **Prof. João Carlos Callera**, **Prof. João César Bedran de Castro**, **Prof.^a Rita Cássia Menegati Dornelles**, **Prof.^a Sandra Helena Penha de Oliveira** e **Prof. Wilson Galhego Garcia**.

Aos professores do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, em especial, **Prof. Fernando Rodrigues de Moraes Abdulkader**, **Prof.^a Maria Tereza Nunes**, **Prof. Thiago dos Santos Moreira** e **Prof. Ubiratan Fabres Machado**, pelos ensinamentos transmitidos.

Aos professores da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – UNESP em especial, **Prof.^a Márcia Marinho** e **Prof.^a Suely Regina Mogami Bomfim**, pelo conhecimento compartilhado.

Aos professores membros da banca do Exame Geral de Qualificação, **Prof. Antonio Hernandes Chaves Neto** e **Prof.^a Sandra Helena Penha de Oliveira**, pelos pertinentes apontamentos que engrandeceram este estudo.

Aos membros titulares e suplentes da Banca Examinadora de defesa da Dissertação, **Prof. Paulo Tambasco de Oliveira**, **Prof.^a Rossana Abud Cabrera Rosa**, **Prof. Carlos Antonio de Miranda Bomfim** e **Prof.^a Maria Aparecida Visconti**, que prontamente aceitaram o convite.

A **todos os professores** que fizeram parte da minha formação, os meus sinceros agradecimentos.

Aos amigos do laboratório de Endocrinologia, mestrandos, doutorandos e pós-doutorandos: **Amanda Gomes Pereira, Bruna Tavares Soares, Fernando Yamamoto Chiba, Fernando Marani, Maria Sara de Lima Coutinho Mattera, Mariana Lopes Benites, Marina Tuppy, Max Sander de Oliveira da Mota, Renato Felipe Pereira, Rita de Cássia Alves Nunes e Rodrigo Martins dos Santos**; e aos alunos de iniciação científica: **Andressa Caroline Hernandes Magalhães, Beatriz Costa E Silva Pinheiro, Bianca Elvira Belardi, Bruno Simão Bernardi, Jhenifer Haiane Pereira Mateus e Renan Akira Fujii de Oliveira**, pelo apoio e pela convivência agradável, pelos momentos compartilhados de estresse e também de alegria e descontração, durante o desenvolvimento, em equipe, de todos os projetos do laboratório. Muito obrigada a todos! Vocês são incríveis!! Foi uma verdadeira honra fazer parte dessa equipe.

Às minhas amigas, **Natália Francisco Scaramele e Daniela de Souza Silva**, pelos divertidos momentos, pela amizade e companheirismo.

Aos **colegas do curso** de pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba / UNESP.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) e a Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA) pela oportunidade da realização e conclusão da minha iniciação científica e do meu mestrado.

Ao diretor e vice-diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, **Prof. Wilson Roberto Poi e Prof. João Eduardo Gomes Filho**.

Aos **funcionários** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP pelos serviços prestados.

À secretária do Departamento de Ciências Básicas, **Eliseide Maria Ferreira Silva Navega**, pela presteza e carinho dedicados aos alunos.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba / UNESP, **Cristiane Regina Lui Mattos, Lilian Sayuri Mada e Valéria**

Queiroz Marcondes Zagatto, pela atenção dispensada e grande disposição em atender.

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

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

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

Aos **animais** utilizados, que foram essenciais para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**), pela concessão da bolsa de estudos e apoio financeiro (Processos n^{os}: 2017/01128-1 e 2016/24829-2), que foram imprescindíveis para a execução do projeto de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) e Fundação para Desenvolvimento da UNESP (**FUNDUNESP**), que proporcionaram os recursos necessários para a realização das pesquisas em nosso laboratório.

À Pró-Reitoria de Pós-graduação da UNESP (**PROPG-UNESP**), pelo apoio financeiro durante as viagens para realização de disciplinas em São Paulo.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma, em qualquer etapa, para a realização deste trabalho.

A todos, muito obrigada!

EPÍGRAFE

“O sucesso é a soma de pequenos esforços repetidos dia após dia.”

Robert Collier

TSOSURA, T. V. S. **AVALIAÇÃO DAS VIAS INSULÍNICA E INFLAMATÓRIA EM TECIDOS MUSCULAR ESQUELÉTICO E ADIPOSO DE RATOS ADULTOS, PROLES DE RATAS COM LESÃO PERIAPICAL.** 2019. 84 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

RESUMO

A programação fetal sugere que estímulos adversos quando aplicados durante o início do desenvolvimento fetal podem alterar o metabolismo da prole, aumentando o risco de doenças na sua vida adulta. Estudos demonstraram que a doença periodontal materna em ratas promove resistência insulínica (RI) em sua prole adulta. Entretanto, estudos que investigaram os efeitos da lesão periapical (LP) materna sobre a saúde da prole são escassos. A LP é uma inflamação no ápice da raiz dental ocasionada geralmente a partir de infecção por bactérias advindas do sistema de canal radicular. Esta patologia está associada com o aumento de fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) que pode estimular quinase do inibidor kappa B (IKK) e c-Jun amino-terminal quinase (JNK), as quais promovem a fosforilação do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) em resíduos de serina, resultando na atenuação do sinal insulínico (SI), contribuindo com a RI. Nesse contexto, tornou-se fundamental investigar se a LP materna também promove RI em sua prole adulta. Em vista disso, os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos da LP materna em ratas sobre as concentrações plasmáticas de glicose, insulina e TNF- α , sensibilidade à insulina e as vias insulínica e inflamatória no músculo gastrocnêmio (MG) e tecido adiposo branco periepididimal (TABp) de sua prole adulta. Para tanto, as 15 ratas Wistar (2 meses de idade) foram distribuídas em 3 grupos: 1) ratas controle; 2) ratas com uma LP induzida em primeiro molar superior direito; 3) ratas com quatro LPs induzidas em primeiros e segundos molares superiores e inferiores do lado direito. A LP foi induzida empregando-se broca em aço carbono dotada de esfera de 0,1 mm na extremidade. Após 30 dias de exposição pulpar, as ratas de todos os grupos foram colocadas para acasalamento com ratos saudáveis. Quando os filhotes machos de todas as ratas completaram 75 dias de idade, realizaram-se os seguintes experimentos: 1) dosagem de glicemia e insulinemia, seguido pelo cálculo do Modelo de Avaliação da Homeostase da Resistência à Insulina (HOMA-IR); 2)

análise da concentração plasmática de TNF- α pelo método de ensaio de imunoabsorção enzimática e 3) avaliação do grau de fosforilação em tirosina da pp185, do grau de fosforilação em serina do IRS-1 e do grau de fosforilação de IKK α/β e JNK no MG e TABp pelo método de *Western blotting*. A análise estatística foi feita por análise de variância, seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Os resultados demonstraram que a LP materna promove em sua prole adulta: 1) RI; 2) prejuízo na transdução da etapa inicial do SI no MG e TABp; 3) aumento nas concentrações plasmáticas de insulina e TNF- α ; 4) maior grau de fosforilação de IKK α/β no MG e TABp; 4) inalteração na glicemia de jejum; 5) nenhuma mudança no grau de fosforilação de JNK no MG e TABp. Esses resultados demonstram que a LP materna está associada a RI e promove importantes alterações nas vias de SI e inflamação na vida adulta de sua prole. Isso reforça a importância que a manutenção da saúde bucal materna tem sobre a saúde geral da prole.

Palavras-chave: Periodontite periapical. Desenvolvimento fetal. Resistência à insulina. Inflamação.

TSOSURA, T. V. S. **Assessment of insulin signaling and inflammatory pathways in skeletal muscle and adipose tissues of adult rats, offspring of the rats with periapical lesion.** 2019. 84 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

ABSTRACT

Fetal programming suggests that adverse stimuli applied during early fetal development can alter metabolism of the offspring, increasing the risk of disease in adulthood. Studies have shown that maternal periodontal disease in rats promotes insulin resistance (IR) in their adult offspring. However, there is a scarcity of research that investigated the relationship between maternal periapical lesion (PL) and health of offspring. PL is inflammatory process around the apex of a tooth root, caused by bacterial infection of the pulp and root canal system. This pathology is associated with increased tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) which may stimulate inhibitor of kappa B kinase (IKK) and c-Jun amino-terminal kinase (JNK), which promote phosphorylation of substrate insulin receptor 1 (IRS-1) on serine residues, resulting in insulin signal (IS) attenuation, contributing to IR. In this context, it has become essential to investigate whether maternal PL also promotes IR in their offspring. This study aimed to investigate the effects of maternal PL in rats on plasma concentrations of glucose, insulin and TNF- α , insulin sensitivity and the insulin and inflammatory signaling pathways in gastrocnemius muscle (GM) and periepididimal white adipose tissue (pWAT) of their adult offspring. Fifteen female Wistar rats (2 months old) were distributed in 3 groups: 1) control rats; 2) rats with 1 PL, which was induced in the right maxillary first molar; 3) rats with 4 PL, which were induced in the right upper and lower first and second molars. PL was induced using a surgical round bur 0.1 mm diameter. After 30 days of pulp exposure, female rats of all groups were mated with normal male rats. When the male offspring of rats of all rats reached 75 days old, the experiments were performed: 1) measures of glycemia and insulinemia, followed by Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance (HOMA-IR), 2) analysis of plasma concentration of TNF- α by enzyme-linked immunosorbent assay method, and 3) evaluation of the pp185 tyrosine, IRS-1 serine, IKK α/β and JNK phosphorylation status in GM and pWAT by western blot method. Statistical analysis was performed by analysis of variance, followed by Tukey post hoc test ($p < 0.05$).

The results showed that maternal PL promotes in its adult offspring: 1) IR, 2) impairment in the transduction of the initial steps of IS in the GM and pWAT, 3) increased plasma concentrations of insulin and TNF- α , 4) greater IKK α / β phosphorylation status in GM and pWAT, 4) unchanged fasting glycemia; 5) no change in the JNK phosphorylation status in GM and pWAT. These results demonstrate that maternal PL is associated with IR and promotes important alterations in IS and inflammation pathways in adult offspring. This reinforces the importance that the maintenance of maternal oral health has on the general health of offspring.

Keywords: Periapical periodontitis. Fetal development. Insulin resistance. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Indução da lesão periapical com o auxílio de uma broca (LN Long Neck, Dentisply Maillefer, Ballaigues- Suíça), em baixa rotação 32
- Figura 2** Esquema representativo da metodologia utilizada no presente trabalho 33
- Figura 3** Representação histológica (coloração hematoxilina e eosina) da região periapical do grupo controle (CN), do grupo com 1 lesão periapical (LP1) e do grupo com 4 lesões periapicais (LP4) (aumento original x100). As imagens A, B e C representa o grupo CN. As regiões apical e periapical estão livres de infiltrado inflamatório (ampliação original x400). As imagens D, E e F representa o grupo LP1. Presença de moderado infiltrado inflamatório em torno do ápice dentário (ampliação original x400). As imagens G, H e I representa o grupo LP4. Presença de intenso infiltrado inflamatório e áreas de reabsorção dentinária (ampliação original x400) 40
- Figura 4** (A) Massa corpórea semanal ratos, proles de ratas controle (PCN), proles de ratas com uma lesão periapical (PLP1) e proles de ratas com quatro lesões periapicais (PLP4), avaliada desde o nascimento até 75 dias de idade. (B) Ingestão alimentar dos grupos PCN, PLP1 e PLP4, avaliada semanalmente desde o desmame (terceira semana) até o final do experimento. Os valores são apresentados como média \pm EPM de 16 animais por grupo. ** $p < 0,01$ PLP4 vs. PCN e PLP1; *** $p < 0,001$ PLP4 vs. PCN e PLP1; # $p < 0,001$ PCN vs. PLP4 41
- Figura 5** Avaliação do grau de fosforilação em tirosina da pp185 (pTyr) antes (-) e após (+) o estímulo insulínico no músculo gastrocnêmio (A e B) e no tecido adiposo branco periepidual (C e D) de proles de ratas controle (PCN), 44

proles de ratas com uma lesão periapical (PLP1) e proles de ratas com quatro lesões periapicais (PLP4). Em A e C, autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS PAGE (185 µg). β-actina foi utilizada como controle. Em B e D, os valores do grau de fosforilação em tirosina da pp185 (expressos em unidades arbitrárias) são apresentados como média ± EPM de 6 animais por grupo. * p<0,05 insulina (-) vs. insulina (+); ** p<0,01 insulina (-) vs. insulina (+); *** p<0,001 insulina (-) vs. insulina (+); # p<0,001 PCN (+) vs. PLP1 (+) e PLP4 (+); & p<0,05 PCN (+) vs. PLP1 (+) e PLP4 (+)

Figura 6

Avaliação do grau de fosforilação em serina do IRS-1 (Ser307) antes (-) e após (+) o estímulo insulínico no músculo gastrocnêmio (A e B) e no tecido adiposo branco periepídidimal (C e D) de proles de ratas controle (PCN), proles de ratas com uma lesão periapical (PLP1) e proles de ratas com quatro lesões periapicais (PLP4). Em A e C, autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS PAGE (185 µg). IRS-1 foi utilizada como controle. Em B e D, os valores do grau de fosforilação em serina do IRS-1 (expressos em unidades arbitrárias) são apresentados como média ± EPM de 6 animais por grupo. *** p<0,001 insulina (-) vs. insulina (+); # p<0,05 PCN (+) vs. PLP4 (+); & p<0,001 PLP1 (+) vs. PLP4 (+)

45

Figura 7

Avaliação do grau de fosforilação de IKKα/β no músculo gastrocnêmio (A e B) e no tecido adiposo branco periepídidimal (C e D) de proles de ratas controle (PCN), proles de ratas com uma lesão periapical (PLP1) e proles de ratas com quatro lesões periapicais (PLP4). Em A e C, autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 µg). IKKα/β foi utilizada como controle. Em B e D, os valores do grau de fosforilação de IKKα/β (expressos em unidades arbitrárias)

46

são apresentados como média \pm EPM de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ PCN vs. PLP4

Figura 8

Avaliação do grau de fosforilação de JNK no músculo gastrocnêmio (A e B) e no tecido adiposo branco periepídídimo (C e D) de proles de ratas controle (PCN), proles de ratas com uma lesão periapical (PLP1) e proles de ratas com quatro lesões periapicais (PLP4). Em A e C, autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 μ g). JNK foi utilizada como controle. Em B e D, os valores do grau de fosforilação do JNK (expressos em unidades arbitrárias) são apresentados como média \pm EPM de 6 animais por grupo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Peso absoluto (g) e peso relativo (g/100g p.c) do músculo gastrocnêmio (MG) e dos tecidos adiposos brancos periepididimal (TABp) e retroperitoneal (TABr) de ratos, proles de ratas controle (PCN), proles de ratas com uma lesão periapical (PLP1) e proles de ratas com quatro lesões periapicais (PLP4) aos 75 dias de idade	42
Tabela 2	Glicemia (mmol/L), insulinemia (μ UI/mL), Modelo de Avaliação da Homeostase da Resistência à Insulina (HOMA-IR) e concentração plasmática de TNF- α (pg/mL) dos grupos proles de ratas controle (PCN), proles de ratas com uma lesão periapical (PLP1) e proles de ratas com quatro lesões periapicais (PLP4)	43

LISTA DE ABREVIATURAS

μm : Micrómetro

AgRP: Neurônio peptídeo relacionado ao gene agouti

Akt /PKB: Proteína quinase B

AP-1: Proteína ativadora-1

BPN: Baixo peso ao nascimento

CD14: Cluster de diferenciação 14

CN: Ratas do grupo controle

DM2: Diabetes mellitus 2

DP: Doença periodontal

DTT: Ditioneitol

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática

EPM: Erro padrão da média

GLUT4: Transportador de glicose tipo 4

Grb10: Proteína ligada a receptor de fator de crescimento 10

Grb14: Proteína ligada a receptor de fator de crescimento 14

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

IFN- γ : Interferon- γ

IKK: Quinase do inibidor kappa B

IKK α/β : Quinase do inibidor kappa B α/β

IKK α : Quinase do inibidor kappa B α

IKK β : Quinase do inibidor kappa B β

IKK γ : Quinase do inibidor kappa B γ

IL-1 β : Interleucina 1 β

IL-4: Interleucina-4

IL-6: Interleucina 6

iNOS: Óxido nítrico sintase induzível

IRS-1: Substrato-1 do receptor de insulina

IRS-2: Substrato-2 do receptor de insulina

IR β : Subunidade β do receptor de insulina

JNK: c-Jun N-terminal quinase

kDa: Kilodalton

LBP: Proteína ligante de LPS

LP: Lesão periapical

LP1: Ratas do grupo com uma lesão periapical

LP4: Ratas do grupo com quatro lesões periapicais

LPS: Lipopolissacarídeos

M1: Macrófagos classicamente ativados

M2: Macrófagos alternativamente ativados

MAPKs: Proteínas quinases ativadas por mitógenos

MD2: Proteína de diferenciação mielóide 2

MG: Músculo gastrocnêmio

mM: Milimolar

mmol: Milimol

MTA: Macrófagos do tecido adiposo

mV: Milivolt

Na: Sódio

NaCl: Cloreto de sódio

NaF: Fluoreto de sódio

NF-kB: Fator nuclear kappa B

ng: Nanograma

P. g.: *Porphyromonas gingivalis*

p110: Subunidade catalítica da PI3K

p85: Subunidade regulatória da PI3K

PC-1: Glicoproteína-1 de membrana plasmática celular

PCN: Proles de ratas controle

pg: Picograma

PI3K: Fosfatidilinositol-3-quinase

PLP1: Proles de ratas com uma lesão periapical

PLP4: Proles de ratas com quatro lesões periapicais

POMC: Neurônio pró-opiomelanocortina

pp185: Substrato do receptor de insulina (IRS-1/IRS-2)

PTP1B: Proteína tirosina fosfatase 1 B

RI: Resistência insulínica

RPM: Rotações por minuto

S6K1: Proteína ribossômica S6 quinase beta-1

SB: Solução basal

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida em dodecil sulfato de sódio

Ser: Serina

SH2: Domínios com homologia a Src 2

SI: Sinal insulínico

SOCS1: Supressor da sinalização de citocinas 1

SOCS3: Supressores da sinalização de citocinas 3

TABp: Tecido adiposo branco periepididimal

TABr: Tecido adiposo retroperitoneal

TEMED : Tetrametil etilenodiamina

TLR: Receptores do tipo toll

TLR4: Receptore do tipo toll 4

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

TRIS: Tris(hidroximetil)aminometano

Tyr: Tirosina

UI: Unidades Internacionais

V: Volt

XIAP: Inibidor da apoptose ligado ao cromossomo X

Ym1: Proteína 3 quitinase-3-like

μ g: Micrograma

μ UI: Microunidades internacionais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos específicos	30
3 MATERIAL E MÉTODO	31
3.1 Animais	31
3.2 Análise histológica da região periapical	33
3.3 Coleta de sangue e tecidos	34
3.4 Determinação da glicemia e insulinemia de jejum	35
3.5 Avaliação da resistência insulínica	35
3.6 Determinação da concentração plasmática de TNF- α	36
3.7 Avaliação das proteínas das vias insulínica e inflamatória	36
3.7.1 Preparação das amostras	36
3.7.2 “Western blotting”	36
3.8 Análise estatística	38
4 RESULTADOS	39
4.1 Análise histológica da região periapical	39
4.2 Massa corpórea e ingestão alimentar	41
4.3 Peso dos tecidos	42
4.4 Glicemia, insulinemia, HOMA-IR e concentração plasmática de TNF- α	43
4.5 Avaliação do grau de fosforilação em tirosina da pp185 no MG e TABp	44
4.6 Avaliação do grau de fosforilação em serina do IRS-1 no MG e TABp	45
4.7 Avaliação do grau de fosforilação de IKK α/β no MG e TABp	46
4.8 Avaliação do grau de fosforilação de JNK no MG e TABp	47
5 DISCUSSÃO	48
6 RESUMO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS	57
7 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXOS	70

1 INTRODUÇÃO

A gravidez constitui um período em que a mulher sofre uma série de alterações fisiológicas que atuam sobre todo o organismo, inclusive na cavidade oral (DE OLIVEIRA *et al.*, 2014; HEMALATHA *et al.*, 2013). Durante a gestação, as mulheres tornam-se mais susceptíveis às doenças bucais, tais como cárie dentária, gengivite e doença periodontal (DP) (KANDAN; MENAGA; KUMAR, 2011) devido às mudanças na dieta (introdução de mais carboidratos e/ou maior frequência alimentar), hiperacidez do meio bucal devido a vômitos, alterações hormonais, que associadas à desatenção na manutenção da higiene bucal favorecem a instalação das doenças bucais (MELO *et al.*, 2007). Em decorrência disso, as gestantes são consideradas pacientes de risco temporário odontológico (VASCONCELOS *et al.*, 2012). Contudo, há uma certa resistência por parte das gestantes ao tratamento odontológico, por acreditarem que a intervenção trará riscos para o desenvolvimento e vida do bebê (SEBASTIANI *et al.*, 2010).

O segundo trimestre da gestação constitui período ideal e mais seguro para realizar tratamento odontológico (POLETTO *et al.*, 2008; KANDAN; MENAGA; KUMAR, 2011). Mesmo assim, o receio e o despreparo constituem principais motivos que levam os cirurgiões-dentistas a se recusarem a prestar assistência odontológica às gestantes (MOIMAZ *et al.*, 2007; GARBIN *et al.*, 2011). A postergação do atendimento odontológico para o puerpério tardio, ao invés de sanar o problema logo ao ser diagnosticado, pode ocasionar um dano maior em função do desenvolvimento das doenças bucais (SEBASTIANI *et al.*, 2010).

A saúde bucal durante o período gestacional tem íntima relação com a saúde geral da gestante e pode influenciar no bem-estar do bebê (GARBIN *et al.*, 2011). Acredita-se que patógenos periodontais, produtos bacterianos e/ou mediadores inflamatórios oriundos de infecções orais podem atingir a unidade feto-placentária por meio da circulação sanguínea (SAINI, 2010; GANDHIMADHI; MYTHILI, 2010). Nesse sentido, Ercan e colaboradores (2013) detectaram a presença de patógenos periodontais, como *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter reto*, *Tannerella forsythia* e *Fusobacterium nucleatum* tanto nas amostras da placa subgengival como no líquido amniótico de mulheres com periodontite generalizada que tiveram parto pré-termo.

Evidências científicas têm constatado a associação entre DP materna e resultados gestacionais adversos, incluindo baixo peso ao nascimento (MATTERA *et al.*, 2016), parto pré-termo e restrição do crescimento intrauterino (SIQUEIRA *et al.*, 2007). Ademais, os estudos de Shirakashi *et al.* (2013) e Mattera *et al.* (2016) demonstraram que ratos adultos, proles de ratas com DP apresentam diminuição na sensibilidade à insulina e alterações na transdução da via de sinalização insulínica em tecidos periféricos, contribuindo para o desenvolvimento de resistência insulínica (RI). Tais achados evidenciam que estímulos maternos adversos podem induzir alterações no desenvolvimento da prole, aumentando o risco de doenças na sua vida adulta (LANGREY-EVANS; McMULLEN, 2010; CALKINS; DEVASKAR, 2011). Este fenômeno denomina-se programação fetal (BARKER, 1995).

Durante o período de desenvolvimento, o embrião ou feto é altamente sensível à influência de perturbações no ambiente intrauterino (LANGLEY-EVANS; MCMULLEN, 2010). Em resposta a um ambiente hostil, o organismo em desenvolvimento estabelece respostas adaptativas para garantir a sobrevivência imediata (LANGLEY-EVANS, 2006; LANGLEY-EVANS; MCMULLEN, 2010). Uma dessas respostas pode ser a desaceleração do crescimento que resultará em menor peso ao nascimento. Outros aspectos da resposta adaptativa podem ser localizados em órgãos e tecidos específicos, que servirão para modificar a fisiologia e o metabolismo e, portanto, as funções dos tecidos. No entanto, essas respostas adaptativas podem aumentar o risco de doenças futuras (LANGLEY-EVANS; MCMULLEN, 2010).

Um dos primeiros achados epidemiológicos sobre a programação fetal surgiu a partir do estudo de coorte histórica da Fome Holandesa (1944-1945) em Amsterdã, no final da Segunda Guerra Mundial (RAVELLI *et al.*, 1976). Neste estudo foi demonstrado que filhos de mulheres expostas à escassez alimentar durante o início do período gestacional (ocasionada pela diminuição de oferta calórica) apresentaram incidência mais alta de obesidade aos dezenove anos de idade. Adicionalmente, estudos posteriores relataram diminuição na tolerância à glicose e hiperinsulinemia em adultos, cujas mães foram expostas à fome durante o período gestacional em comparação com adultos nascidos no ano anterior ou posterior a Fome Holandesa (RAVELLI *et al.*, 1998).

As perturbações que ocorrem com a mulher durante a gestação, tais como alterações na nutrição, no fluxo sanguíneo uteroplacentário e nas

concentrações plasmáticas de citocinas e de cortisol, podem programar o feto para desenvolver doenças na vida adulta (JANSSON; POWELL, 2007). Além destas perturbações, conforme comentado anteriormente, estudos têm demonstrado que a inflamação oral materna, como a DP, também implica negativamente à saúde da prole (SHIRAKASHI *et al.*, 2013; MATTERA *et al.*, 2016). Contudo, a literatura mostra-se escassa em relação a estudos que investigaram os efeitos da lesão periapical (LP) materna sobre a saúde da prole.

Hafez *et al.* (2017) realizaram um estudo no qual examinaram a saúde bucal de puérperas da região rural do distrito de Mangochi, localizado no sudeste do Malawi (África Oriental). Dentre 1.016 puérperas que participaram deste estudo, 240 (23,6%) apresentaram pelo menos uma infecção periapical. Ademais, 89,6% das participantes que tiveram infecções periapicais também apresentaram cárie dentária, denotando ser comum a presença destas duas patologias bucais.

A cárie dentária constitui doença bucal prevalente em gestantes (MOIMAZ *et al.*, 2007), tendo em vista que estas apresentam 2,9 vezes maior risco de desenvolverem a cárie dentária do que mulheres não grávidas (RAKCHANOK *et al.*, 2010). A progressão desta doença resulta na formação de uma cavidade na coroa ou na superfície radicular com exposição pulpar que se não for tratada pode levar ao desenvolvimento de LP (LUCAS, 2010).

A LP trata-se de uma inflamação no ápice da raiz dental ocasionada geralmente a partir de infecção por bactérias advindas do sistema de canal radicular (SEGURA-EGEA; MARTIN-GONZALEZ; CASTELLANOS-COSANO, 2015; SASAKI *et al.*, 2016). Esta patologia ocorre como consequência de vários estímulos nocivos à polpa do dente, como traumas físicos, químicos ou processos iatrogênicos (SIQUEIRA, RÔÇAS, 2007; GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2012). Contudo, a cárie dentária compreende o principal meio pelo qual os microrganismos adentram o canal pulpar (STASHENKO *et al.*, 1994). O canal radicular infectado é uma fonte persistente de patógenos bacterianos que estimulam secundariamente a resposta inflamatória na região que circunda o ápice radicular denominada região periapical (SASAKI *et al.*, 2016).

Inicialmente, ocorre contaminação predominantemente por microrganismos aeróbios facultativos e, posteriormente, devido às alterações no ambiente pulpar, tais como comprometimento do suprimento sanguíneo, baixa tensão de oxigênio e disponibilidade de nutrientes, prevalecem os microrganismos

anaeróbios gram-negativos (SUNDQVIST, 1992; BARTHEL *et al.*, 1997; LUCISANO *et al.*, 2014). A parede celular dos microrganismos gram-negativos possui endotoxinas denominadas lipopolissacarídeos (LPS) (PALSSON-MCDERMOTT; O'NEILL, 2004; LU *et al.*, 2008), as quais podem ser reconhecidas por receptores do tipo *Toll* (TLR), especialmente os receptores do tipo *Toll* 4 (TLR4), presentes em células do sistema imune inato e induzir resposta inflamatória (MEDZHITOV, 2001; TAKEUCHI *et al.*, 2002; KIM; SEARS, 2010).

O LPS liga-se inicialmente à proteína solúvel sintetizada pelos hepatócitos chamada proteína ligante de LPS (LBP) (DING; JIN, 2013). Esta ligação facilita a associação posterior ao correceptor cluster de diferenciação 14 (CD14) encontrado na superfície dos macrófagos. O CD14 facilita a transferência de LPS para o complexo receptor TLR4 / MD-2 e modula o reconhecimento de LPS (WRIGHT *et al.*, 1990). Dessa forma, inicia-se a transdução da cascata de sinalização levando a ativação de fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa B (NF- κ B) e a proteína ativadora-1 (AP-1), e indução da expressão de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, eicosanóides e espécies reativas de oxigênio (KIM; SEARS, 2010).

O NF- κ B é um importante regulador do processo inflamatório em resposta a lesões e infecções. No estado latente, NF- κ B encontra-se inativo no citoplasma, associado à proteína inibitória I κ B (NAPETSCHNIG; WU, 2013). A ativação do NF- κ B pode ocorrer, não somente por exposição das células ao LPS, mas também por meio da ação de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α pela via clássica (ou via canônica) (WAJANT; SCHEURICH, 2011). A ativação da via clássica do NF- κ B envolve a estimulação da atividade do quinase do inibidor kappa B (IKK). Esse complexo é composto por duas subunidades catalíticas IKK α e IKK β , além do modulador essencial NF- κ B (NEMO) ou IKK γ (LI *et al.*, 2002). O IKK ativado fosforila o I κ B em serina, levando à adição de ubiquitina pela ação da ubiquitina ligase e degradação pelo proteossoma (FRANCO, 2010). Dessa forma, o complexo NF- κ B / I κ B é desfeito, permitindo a translocação do NF- κ B para o núcleo com subsequente ligação em sítios específicos do DNA para regular inúmeros genes (GUPTA *et al.* 2005), dentre eles, a codificação de mediadores pró-inflamatórios, tais como TNF- α , IL-6 e interleucina 1 β (IL-1 β) (CHEN *et al.*, 2015).

Além de ativar a via IKK α/β / NF- κ B, os TLRs e as citocinas pró-inflamatórias (como TNF- α e IL-1 β) são capazes de ativar a via da c-Jun amino-terminal quinase (JNK) (SHOELSON *et al.*, 2006). O grupo de serina/treonina

quinases denominado JNK (JNK1, 2 e 3) pertence ao membro das proteínas da família das quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), responsáveis pela regulação de diversas funções celulares. A JNK ativada induz a expressão de genes pró-inflamatórios pelo acionamento da AP-1 (CHEN *et al.*, 2015).

As citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , podem promover alterações na transdução do sinal insulínico, levando à resistência insulínica (RI) (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1996; COLOMBO *et al.*, 2012). A RI é definida como a incapacidade dos tecidos periféricos responsivos à insulina responderem adequadamente às concentrações circulantes deste hormônio, resultando em diminuição da ação biológica da insulina nesses tecidos. Como consequência, as células beta pancreáticas secretam mais insulina a fim de evitar a hiperglicemia. A sobrecarga da função secretória das células beta do pâncreas induz a falência dessas células, o que ocasiona diminuição da secreção de insulina. Este processo está relacionado com o desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 2 (DM2), o qual é resultado da combinação desses dois fatores: RI e prejuízo das células beta em secretar insulina (PETERSEN, SHULMAN, 2002; KAHN; HULL; UTZCHNEIDER., 2006).

Em condições normais, a insulina exerce seu efeito por meio da ligação a um receptor específico localizado na membrana plasmática. O receptor de insulina é uma glicoproteína heterotetramérica formada por duas subunidades α e duas subunidades β , ligadas por pontes dissulfeto. A subunidade α é totalmente extracelular e contém o sítio de ligação da insulina. A subunidade β é uma proteína transmembrânica responsável pela transdução do SI (KAHN; WHITE, 1988). Além disso, quando estimulada pela insulina, esta subunidade confere atividade quinase, capaz de autofosforilar-se e de fosforilar outros substratos em aminoácidos tirosina (KAHN, 1985; KAHN; WHITE, 1988).

A ativação do receptor de insulina leva a fosforilação de vários substratos intracitoplasmáticos, como por exemplo a pp185 (IRS-1 / IRS-2). Este foi o primeiro substrato do receptor de insulina estudado, com peso molecular de aproximadamente 185 kDa (WHITE; TAKAYAMA; KAHN, 1985). Em 1991, Sun *et al.* clonaram a pp185 e nomearam-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, denominada IRS-2.

Estudos constataram que camundongos nocaute para IRS-1 apresentavam retardo no crescimento e RI, porém não eram hiperglicêmicos em virtude da hiperinsulinemia (ARAKI *et al.*, 1994; TAMEMOTO *et al.*, 1994). Por outro lado, camundongos nocaute para o IRS-2 apresentavam hiperglicemia e falência da atividade secretora das células beta pancreáticas devido à redução significativa da massa destas células (WITHE, 1998). Estes achados demonstram que o IRS-1 e o IRS-2 são fundamentais no processo de crescimento embrionário e pós-natal, com o IRS-1 tendo o papel predominante. Embora tanto o IRS-1 quanto o IRS-2 estejam envolvidos no metabolismo de carboidratos em tecidos periféricos, o IRS-2 desempenha papel principal no desenvolvimento de células beta e na compensação para resistência periférica à insulina (KADOWAKI, 2000). Assim, sugere-se que as proteínas IRS possuem funções complementares, ao invés de redundantes.

Quando o IRS-1 e o IRS-2 estão fosforilados, criam sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios com homologia a Src 2 (SH2), como a enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-k). A PI3-k é formada pela subunidade catalítica (p110) e subunidade reguladora (p85) com domínios SH2 que interagem com a tirosina fosforilada (SALTIEL; KAHN, 2001). Tal enzima possui como alvo, a proteína quinase B (PKB) também denominada de Akt.

A Akt se apresenta sob três isoformas (Akt1, 2 e 3), as quais são semelhantes em estrutura, porém distintas na função (YU; LITTLEWOOD; BENNETT, 2015). Todas as isoformas são ativadas pela fosforilação em serina e treonina (KOHN *et al.* 1996; BELLACOSA *et al.* 1998) que medeiam as ações da insulina participando ativamente nas vias de sinalização insulínica. A Akt apresenta papel fundamental no processo de captação de glicose por meio da estimulação da translocação do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) (WHITEMAN *et al.*, 2002). O transportador de glicose insulino-sensível, GLUT4 é predominantemente expresso em adipócitos e células musculares cardíacas e esqueléticas e tem como função propiciar a captação de glicose insulino-mediada (MACHADO; SCHAAN; SERAPHIM, 2006; LEHNEN *et al.*, 2010).

O TNF- α prejudica o SI por diminuir a fosforilação do IRS-1 em resíduos de tirosina (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1996). Ademais, o TNF- α pode estimular serinas quinases, incluindo IKK e JNK, as quais promovem a fosforilação do IRS-1 em resíduos de serina, resultando em atenuação do SI (OSBORN, 2012). Nesse sentido, estudos do nosso laboratório (ASTOLPHI *et al.*, 2013; ASTOLPHI *et al.*,

2015; PEREIRA *et al.*, 2016) observaram que ratos adultos com LP apresentam aumento na concentração plasmática de TNF- α e prejuízo na transdução do SI em tecidos periféricos, verificado pela redução no grau de fosforilação em tirosina da pp185 (etapa inicial do SI) no tecido adiposo branco e músculo gastrocnêmio (MG), aumento no grau de fosforilação em serina do IRS-1 (via inibitória do SI) no MG, redução no grau de fosforilação em serina da Akt (etapa final do SI) no MG e diminuição no conteúdo de GLUT4 na membrana plasmática no MG. Ademais, no estudo de Pereira *et al.* (2017) foi demonstrado que a indução de LP em ratos promove aumento no grau de fosforilação de JNK e IKK α/β (via inflamatória) no MG. Estes achados evidenciam que a resposta inflamatória decorrente da LP está associada com RI.

Até o presente momento, não existe na literatura trabalhos que avaliaram o efeito da LP materna sobre o SI na vida adulta da prole. Desse modo, tornou-se fundamental investigar a sensibilidade à insulina e a transdução do SI em tecidos periféricos de ratos adultos, proles de ratas com LP, pois alterações nas etapas da via de sinalização insulínica podem ocasionar RI, uma das principais características do DM2. Ademais, conforme mencionado anteriormente, sabe-se que a ativação de vias inflamatórias contribui com a RI, tornando de extrema importância averiguar se a LP materna aumenta a atividade das proteínas inflamatórias no músculo esquelético e tecido adiposo branco de sua prole adulta.

Salientamos que no presente projeto foram utilizados grupos de animais com um (exposição pulpar do primeiro molar superior) e quatro (primeiros e segundos molares superiores e inferiores do lado direito) focos de LP. Isto irá possibilitar um modelo de estudo similar ao observado na população, permitindo a obtenção de dados mais fidedignos, pois estudos epidemiológicos demonstram que a população brasileira apresentou uma média de 2,7 LPs presentes por indivíduo (MAROTTA *et al.*, 2012), denotando ser comum a presença de mais de um foco de infecção em um mesmo paciente. Os resultados desse projeto poderão contribuir para um melhor entendimento de como inflamações orais maternas podem causar desordens sistêmicas na prole.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da LP materna em ratas sobre sensibilidade à insulina, concentração plasmática de citocina pró-inflamatória e vias insulínica e inflamatória de sua prole adulta. Ademais, verificar se o aumento no número de foco de infecção endodôntica materna ocasiona piora nesses parâmetros na prole adulta.

2.2 Objetivos específicos

Verificar em ratos adultos, proles de ratas com 1 ou 4 LPs:

- glicemia e insulinemia de jejum;
- sensibilidade à insulina (HOMA-IR);
- concentração plasmática de TNF- α ;
- grau de fosforilação em tirosina da pp185 (IRS-1 / IRS-2), após estímulo insulínico, no músculo gastrocnêmio (MG) e tecido adiposo branco periepididimal (TABp);
- grau de fosforilação em serina do IRS-1, após estímulo insulínico, no MG e TABp;
- grau de fosforilação de JNK no MG e TABp;
- grau de fosforilação de IKK α / β no MG e TABp.

3 MATERIAL E MÉTODO

O trabalho está de acordo com os Princípios Éticos em Uso de Animais e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/UNESP (Protocolo FOA-00157-2017) (Anexo A).

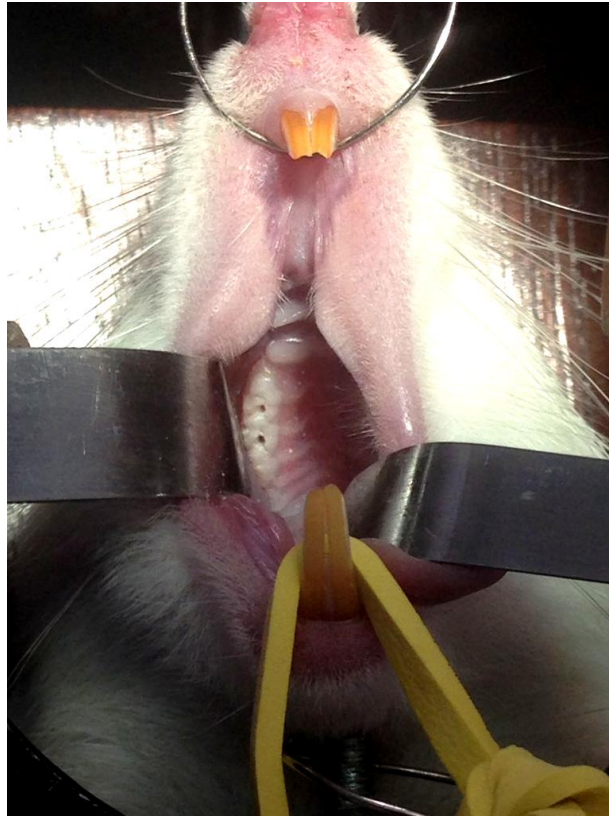
3.1 Animais

No presente estudo foram utilizados 15 ratas (2 meses de idade) e 8 ratos (3 meses de idade) da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/UNESP. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Ciências Básicas sob condições padronizadas de temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), ciclo claro/escuro (12/12 horas diárias, com período claro iniciado às 7:00 horas), umidade ($55 \pm 10\%$), alimentados durante todo o período experimental com ração padrão para ratos (Presence, Paulínia, São Paulo, SP, Brasil) e água *ad libitum*.

As ratas foram distribuídas em três grupos ($n = 5$): A) ratas controle (CN); B) ratas com LP induzida em primeiro molar superior direito (apenas uma lesão) (LP1); C) ratas com LPs induzidas em primeiros e segundos molares superiores e inferiores do lado direito (total de quatro lesões) (LP4).

As LPs foram induzidas sob anestesia com cloridrato de quetamina (Dopalen, Sespo Indústria e Comércio Ltda, Paulínia/São Paulo, Brasil; 80 mg/Kg peso corpóreo, via intramuscular) e xilazina (Anasedan, Sespo Indústria e Comércio Ltda, Paulínia/São Paulo, Brasil; 10 mg/Kg peso corpóreo, via intramuscular). As polpas dos molares foram expostas por meio de uma broca de aço carbono (Broca Ln Long Neck- Maillefer, Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil) dotada de uma esfera na extremidade com 0,1 mm de diâmetro (Fig. 1). Ressaltamos que a exposição pulpar realizada por meio da abertura da cavidade pulpar com brocas geralmente não induz à dor. A permanência da abertura é o método mais utilizado para o desenvolvimento de LPs.

Figura 1 - Indução da lesão periapical em rata com o auxílio de uma broca (LN Long Neck, Dentisply Maillefer, Ballaigues- Suíça), em baixa rotação.



Fonte: do autor

Decorridos 30 dias de exposição pulpar, as ratas de todos os grupos foram colocadas para acasalamento. A confirmação da copulação foi realizada pela colpocitologia, observando a presença de espermatozoides no esfregaço vaginal.

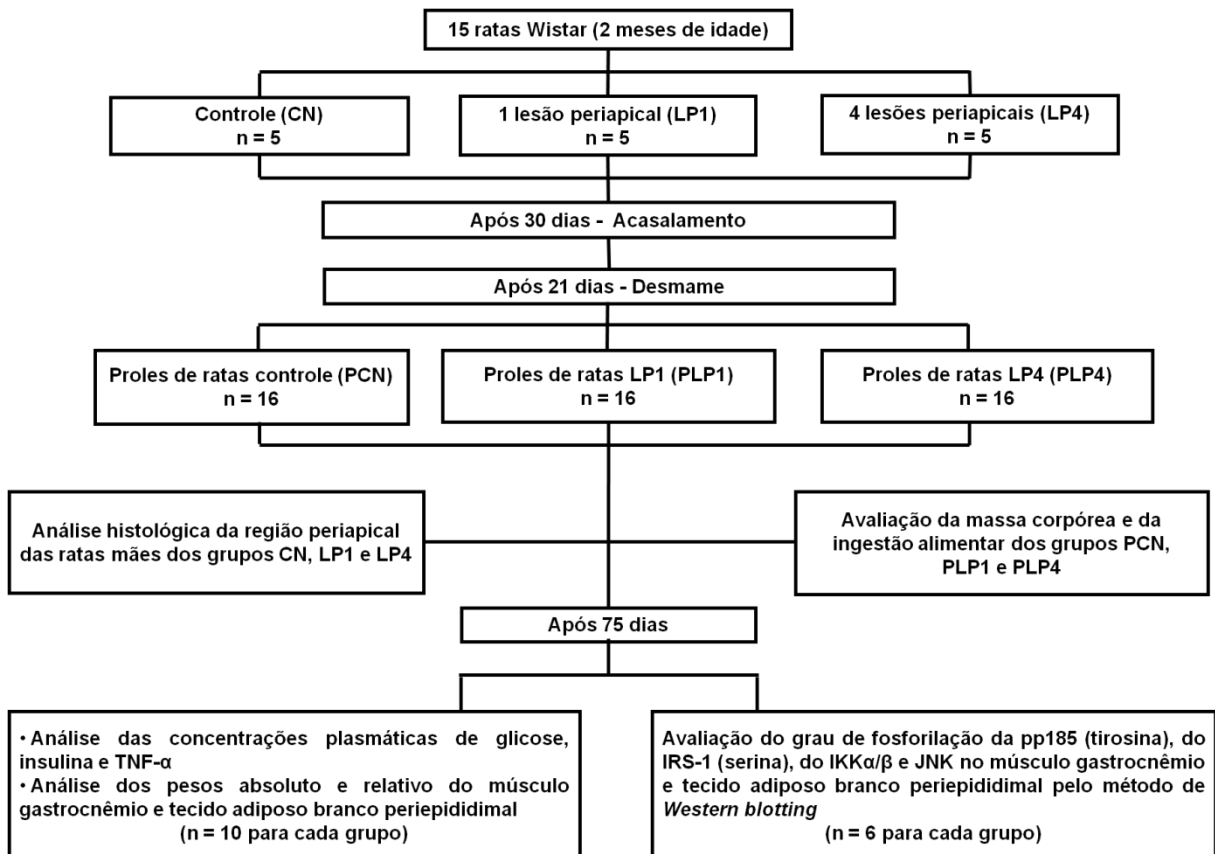
As ratas prenhes foram separadas em caixas individuais e após o nascimento, a ninhada foi distribuída em três grupos: 1) proles de ratas controle (PCN); 2) proles de ratas com uma LP (PLP1) e 3) proles de ratas com quatro LPs (PLP4). O número de filhotes foi ajustado para 6 por mãe lactante, a fim de evitar o efeito do tamanho da ninhada. Quando a ninhada não apresentava 6 ratos machos, na mesma foram acrescentadas ratas fêmeas para manutenção desse número de filhotes por rata mãe.

Os filhotes foram mantidos com a mãe até o desmame (21 dias após o nascimento). Após o desmame, apenas os filhotes machos foram mantidos para a posterior análise.

Desde o dia do nascimento até a realização dos experimentos foi avaliado, semanalmente, a massa corpórea dos filhotes machos de todos os grupos.

A ingestão alimentar destes filhotes foi aferida, três vezes por semana, a partir do desmame (21 dias após o nascimento) até a realização dos experimentos. Quando os filhotes machos PCN, PLP1 e PLP4 completaram 75 dias de idade, iniciaram-se os experimentos.

Figura 2 - Esquema representativo da metodologia utilizada no presente trabalho.



Fonte: do autor

3.2 Análise histológica da região periapical

Após o desmame, as ratas mães de todos os grupos foram eutanasiadas por dose excessiva do anestésico tiopental sódico (Thiopentax, Cristália, Itapira, SP, Brasil; 3%, 5mg/100g peso corpóreo, via intraperitoneal), precedidos pela aplicação de anestésico de bloqueio local (Lidocaína, 4 mg/kg peso corpóreo, via intraperitoneal) 10 minutos antes da aplicação do barbitúrico. As hemimaxilas e hemimandíbulas direitas foram retiradas e colocadas em cassetes histológicos de

plásticos devidamente identificados. Em seguida, foram imediatamente embebidas em formaldeído 4%, deixadas nesta solução por 24 horas e depois lavadas em água corrente por 12 horas. Após a fixação, foram desmineralizadas em solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 10% por aproximadamente 3 meses. Posteriormente, as peças foram lavadas em água corrente por 24 horas, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina.

As peças foram cortadas com cortes semi-seriados, com 4 μ m de espessura dos aspectos mesial-distal de todos os primeiros molares superiores do lado direito, realizados em micrótomo (RM2155, Leica Microsystems, BD, Wetzlar, Alemanha). Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina e estudos morfológicos foram realizados na área periapical.

3.3 Coleta de sangue e tecidos

Os ratos PCN, PLP1 e PLP4 foram submetidos a jejum de 12 horas antes dos procedimentos experimentais. Estes animais foram anestesiados com tiopental sódico (Thiopentax, Cristália, Itapira, SP, Brasil; 3%, 5mg/100g peso corpóreo, via intraperitoneal), precedidos pela aplicação de anestésico de bloqueio local (Lidocaína, 4 mg/kg peso corpóreo, via intraperitoneal) 10 minutos antes da aplicação do barbitúrico e os experimentos foram realizados 10-15 minutos após a anestesia.

Um grupo de ratos PCN, PLP1 e PLP4 (n = 10 animais por grupo) foi submetido a laparotomia mediana para a coleta de sangue (4 mL) pela veia cava inferior. As amostras de sangue foram transferidas para tubos de plástico heparinizados (BV Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, EUA) e centrifugadas a 3.000 g por 15 minutos a 4 °C. Os plasmas obtidos foram aliquotados e armazenados a – 80 °C até o dia da quantificação das concentrações plasmáticas de glicose, insulina e TNF- α . Neste mesmo grupo de ratos PCN, PLP1 e PLP4 (n = 10 animais por grupo) foram removidos o MG direito e os tecidos adiposos periepididimal (TABp) e retroperitoneal para avaliação do peso absoluto (gramas) e peso relativo (por 100 g de peso corporal) destes tecidos. Após este procedimento, os animais foram eutanasiados por dose excessiva do anestésico tiopental sódico (Thiopentax, Cristália, Itapira, SP, Brasil; 3%, 5mg/100g peso corpóreo, via intraperitoneal),

precedidos pela aplicação de anestésico de bloqueio local (Lidocaína, 4 mg/kg peso corpóreo, via intraperitoneal) 10 minutos antes da aplicação do barbitúrico.

Outro grupo de ratos PCN, PLP1 e PLP4 (n = 6 animais por grupo) foi utilizado para analisar as proteínas envolvidas nas vias insulínica e inflamatória pelo método de *Western blotting*. Para tanto, os animais previamente anestesiados foram submetidos à laparotomia mediana, com retirada de amostras dos tecidos antes e após a administração intravenosa pela veia porta de 1,5 UI de insulina regular (Humulin, Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, EUA) em tempos variáveis (90 segundos para o MG e 120 segundos para o TABp), seguindo protocolo de acordo com Saad *et al.* (1993) para avaliar após a estimulação insulínica, o grau de fosforilação em tirosina da pp185 (IRS-1/IRS-2) e o grau de fosforilação em serina do IRS-1 no MG e TABp. Salienta-se que para avaliar o grau de fosforilação de IKK α/β e JNK no MG e TABp foram utilizadas amostras de tecidos sem estímulo insulínico. Posteriormente, os animais foram eutanasiados por dose anestésica excessiva utilizando tiopental sódico (Thiopentax, Cristália, Itapira, SP, Brasil; 3%, 5mg/100g peso corpóreo, via intraperitoneal), precedidos pela aplicação de anestésico de bloqueio local (Lidocaína, 4 mg/kg peso corpóreo, via intraperitoneal) 10 minutos antes da aplicação do barbitúrico.

3.4 Determinação da glicemia e insulinemia de jejum

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

3.5 Avaliação da resistência insulínica

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

glicemia de jejum (mmol/L) X insulinemia de jejum ($\mu\text{UI/mL}$) / 22,5) (BONORA *et al.*, 2000).

3.6 Determinação da concentração plasmática de TNF- α

Foi realizada pelo método de ELISA com a utilização de kit comercial específico (Invitrogen Corporation, Camarillo, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

3.7 Avaliação das proteínas das vias insulínica e inflamatória

3.7.1 Preparação das amostras

Imediatamente após a extração, os tecidos (MG e TAB periepididimal) foram homogeneizados em Polytron (24.000 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) e mantidos em banho-maria (100 °C) durante 10 minutos. Decorrido o tempo, foram transferidos para gelo e então centrifugados (4 °C, 16.000 g, 40 minutos). Do sobrenadante foram retiradas alíquotas para determinação da concentração proteica pelo método de Lowry (Bio-Rad Protein Assay - Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA) (LOWRY *et al.*, 1951) e para estoque em tampão de Laemmli (azul de bromofenol 0,1%; SDS 10 %; fosfato de sódio 1M pH 7,0; glicerol 50%; DTT15%).

3.7.2 “Western blotting”

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

A primeira etapa do *Western blotting* consistiu na submissão das amostras a uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida. Por meio deste método, é possível separar proteínas de acordo com seu peso molecular, sem que as unidades proteicas sejam perdidas, permitindo estudos posteriores nessas frações proteicas. Foi utilizado o método desenvolvido por Laemmli (1970) e modificado por Garfin (1990), o qual envolve um sistema descontínuo de dois géis contíguos, mas diferentes: o gel de “stacking” (3,39% T, 2,7% C - acrilamida 3,3%;

bisacrilamida 0,09%; Tris 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 fica sob o gel de “stacking”, com orientação vertical, num sistema de câmaras que mantem 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), e foi iniciado com a corrida no gel de “stacking” sob voltagem constante em 30 mV até que ocorresse o empacotamento da amostra, o que pode ser observado na transição dos géis. Posteriormente foi aplicada voltagem constante de 100 V para a corrida no gel de resolução, durante 2 horas. Juntamente com as amostras, sempre foi colocado um padrão de proteínas de conhecidos pesos moleculares (marcadores).

- **“Electrophoretic transfer”**

Após a separação das frações protéicas no gel de poliacrilamida, foi feita a transferência eletroforética dessas frações para uma membrana de nitrocelulose Hybond-C Super (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England). 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 (KRUGER; 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 - 0% de gordura) durante 2 horas à temperatura ambiente, e então lavada com solução basal por três sessões de 10 min. Em seguida, a membrana foi incubada em solução (SB + 3% de leite desnatado) contendo o anticorpos antifosfotirosina, antifosfoserina-IRS-1(Ser307), anti JNK, anti p-JNK, anti IKK- α/β , anti p-IKK- α/β e anti- β -actina, todas da marca Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, EUA, por 4 horas em temperatura

ambiente. Posteriormente foram realizadas três lavagens com solução basal e a membrana foi incubada durante 1 hora com segundo anticorpo contendo peroxidase de “horseradish” (“kit” de quimioluminescência, ECL – Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England). Novamente, foram realizadas 3 lavagens da membrana de nitrocelulose com solução basal, com duração de 10 min cada lavagem. Adicionou 1 mL de cada solução de detecção 1 e 2 (do kit de ECL) e foi incubada por 1 minuto. Por fim, foi drenado o excesso de reagente e a membrana de nitrocelulose foi exposta a filme radiográfico (Hyperfilm ECL – Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England), durante 10 minutos à 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 Análise estatística

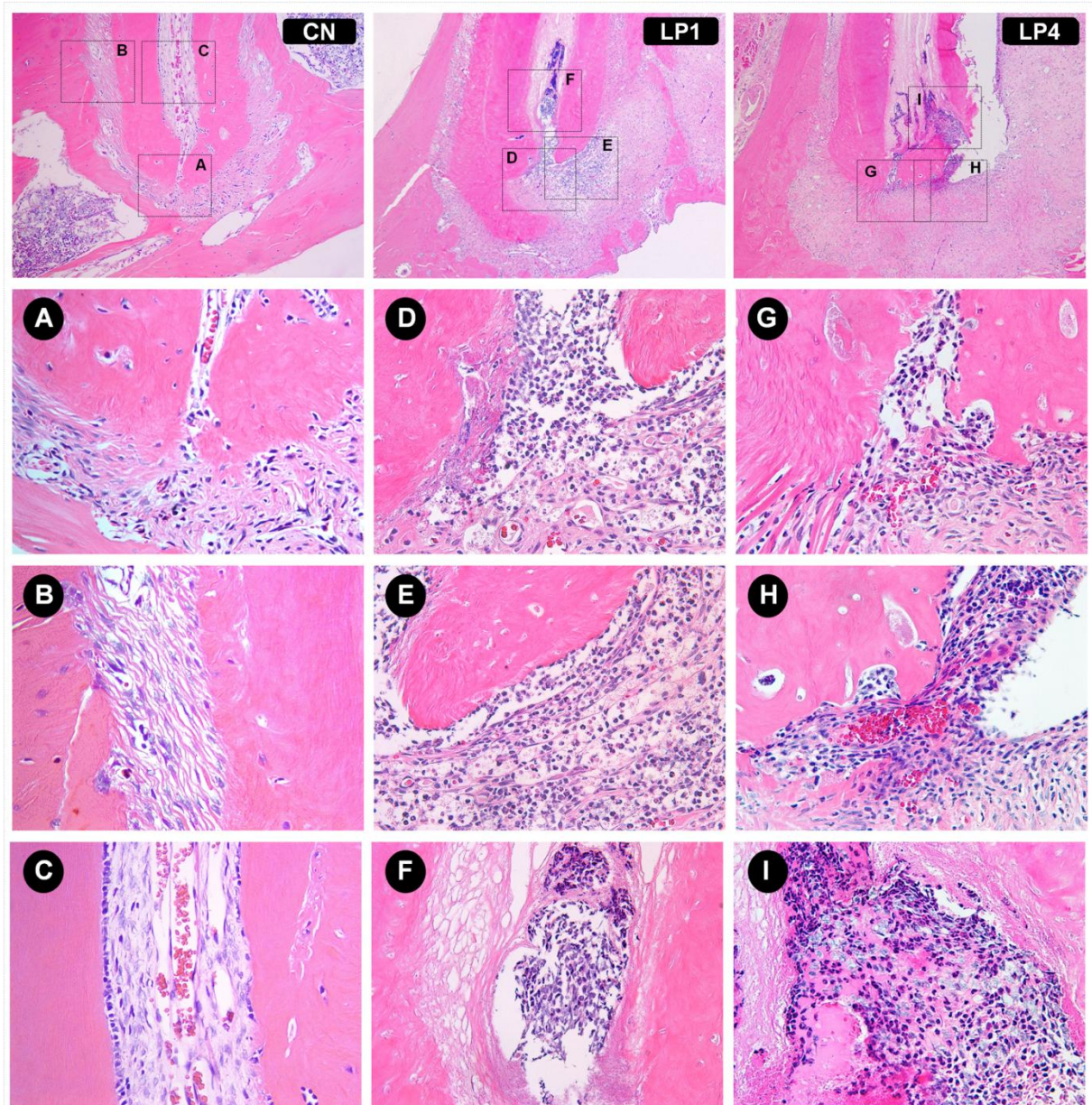
Todos os valores foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi feita por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5% (alfa = 5%).

4 RESULTADOS

4.1 Análise histológica da região periapical

No grupo CN, o forame apical (Fig. 3A), o ligamento periodontal (Fig. 3B) e o canal radicular (Fig. 3C) apresentaram características compatíveis com aspecto normal. No entanto, em ambos os grupos de ratas com LP (grupos LP1 e LP4), as polpas dentárias apresentaram necrose e as LPs foram estabelecidas. As infiltrações de células inflamatórias na área ao redor do ápice dentário puderam ser observadas nos grupos LP1 e LP4 (Fig. 3D, E e G). Extensas áreas de reabsorção dentinária foram observadas apenas no grupo LP4 (Fig. 3H e I).

Figura 3 – Representação histológica (coloração hematoxilina e eosina) da região periapical do grupo controle (CN), do grupo com 1 lesão periapical (LP1) e do grupo com 4 lesões periapicais (LP4) (aumento original x100). As imagens A, B e C representam o grupo CN. As regiões apical e periapical estão livres de infiltrado inflamatório (ampliação original x400). As imagens D, E e F representam o grupo LP1. Presença de moderado infiltrado inflamatório em torno do ápice dentário (ampliação original x 400). As imagens G, H e I representam o grupo LP4. Presença de intenso infiltrado inflamatório e áreas de reabsorção dentinária (ampliação original x 400).



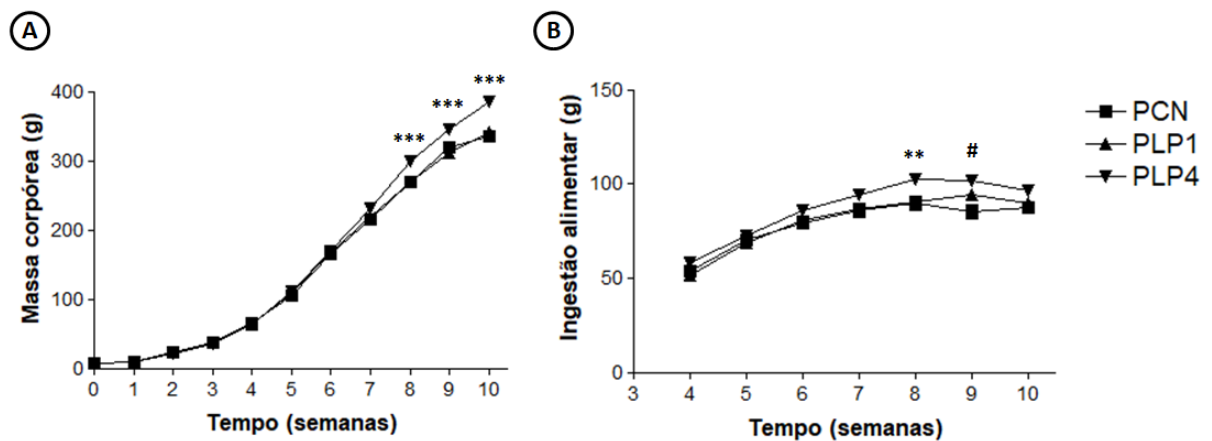
Fonte: do autor

4.2 Massa corpórea e ingestão alimentar

Não houve diferença na massa corpórea, ao nascimento, entre os grupos. Entretanto, o grupo PLP4 apresentou aumento na massa corpórea, da 8ª até a 10ª semana, comparado aos grupos PCN e PLP1. Por outro lado, não houve diferença estatística entre estes dois últimos grupos nesse mesmo período (Fig. 4A).

Não houve diferença na ingestão alimentar, desde o desmame (na 3ª semana de vida) até o final do experimento, entre os grupos PCN e PLP1. No entanto, o grupo PLP4 apresentou maior consumo alimentar na 8ª semana em relação aos grupos PCN e PLP1, bem como na 9ª semana em relação ao grupo PCN (Fig. 4B).

Figura 4 – (A) Massa corpórea semanal de ratos, proles de ratas controle (PCN), proles de ratas com uma lesão periapical (PLP1) e proles de ratas com quatro lesões periapicais (PLP4), avaliada desde o nascimento até 75 dias de idade. (B) Ingestão alimentar dos grupos PCN, PLP1 e PLP4, avaliada semanalmente desde o desmame (terceira semana) até o final do experimento. Os valores são apresentados como média \pm EPM de 16 animais por grupo. ** $p < 0,01$ PLP4 vs. PCN e PLP1; * $p < 0,001$ PLP4 vs. PCN e PLP1; # $p < 0,001$ PCN vs. PLP4**



Fonte: do autor

4.3 Peso dos tecidos

O grupo PLP4 apresentou aumento tanto no peso absoluto como no peso relativo de TABp e de TABr em relação ao grupo PCN. Entretanto, não houve diferença neste parâmetro entre os grupos PCN e PLP1 e entre os grupos PLP1 e PLP4.

Com relação ao MG, não houve diferença entre os grupos.

Tabela 1 – Peso absoluto (g) e peso relativo (g/100g p.c) do músculo gastrocnêmio (MG) e dos tecidos adiposos brancos periepididimal (TABp) e retroperitoneal (TABr) de ratos, proles de ratas controle (PCN), proles de ratas com uma lesão periapical (PLP1) e proles de ratas com quatro lesões periapicais (PLP4) aos 75 dias de idade.

Tecidos	PCN	PLP1	PLP4
TABp g	3,81 ± 0,31	4,93 ± 0,33	5,33 ± 0,39 *
TABp g/100g p.c	0,98 ± 0,07	1,22 ± 0,06	1,32 ± 0,09 *
TABr g	3,50 ± 0,32	4,49 ± 0,31	5,32 ± 0,50 **
TABr g/100g p.c	0,90 ± 0,08	1,17 ± 0,08	1,32 ± 0,12 *
MG g	1,91 ± 0,05	1,98 ± 0,04	2,06 ± 0,02
MG g/100g p.c	0,49 ± 0,01	0,51 ± 0,01	0,52 ± 0,01

Valores expressos como média ± EPM de 10 animais por grupo. * p<0,05 PCN vs. PLP4; ** p<0,01 PCN vs. PLP4

4.4 Glicemia, insulinemia, HOMA-IR e concentração plasmática de TNF- α

Não houve diferença na glicemia de jejum entre os grupos. Entretanto, houve aumento tanto na insulinemia de jejum como no valor de HOMA-IR nos grupos PLP1 e PLP4 em relação ao grupo PCN. Comparando-se PLP1 e PLP4 observou-se aumento significativo nestes dois parâmetros, acima citados, no grupo de ratos adultos, proles de ratas com 4 lesões.

Houve aumento na concentração plasmática de TNF- α nos grupos PLP1 e PLP4 em relação ao grupo PCN. Entretanto, não houve diferença neste parâmetro entre os grupos PLP1 e PLP4.

Tabela 2 – Glicemia (mmol/L), insulinemia (μ UI/mL), Modelo de Avaliação da Homeostase da Resistência à Insulina (HOMA-IR) e concentração plasmática de TNF- α (pg/mL) dos grupos proles de ratas controle (PCN), proles de ratas com uma lesão periapical (PLP1) e proles de ratas com quatro lesões periapicais (PLP4).

Parâmetros	PCN	PLP1	PLP4
Glicemia (mmol/L)	7,37 \pm 0,26	7,81 \pm 0,29	8,00 \pm 0,25
Insulinemia (μ UI/mL)	15,95 \pm 2,54	32,05 \pm 2,18 [#]	63,05 \pm 0,68 ^{***}
HOMA-IR	5,24 \pm 0,78	11,29 \pm 0,95 [#]	22,40 \pm 0,57 ^{***}
TNF- α (pg/mL)	8,16 \pm 0,32	9,93 \pm 0,30 [*]	10,58 \pm 0,61 ^{**}

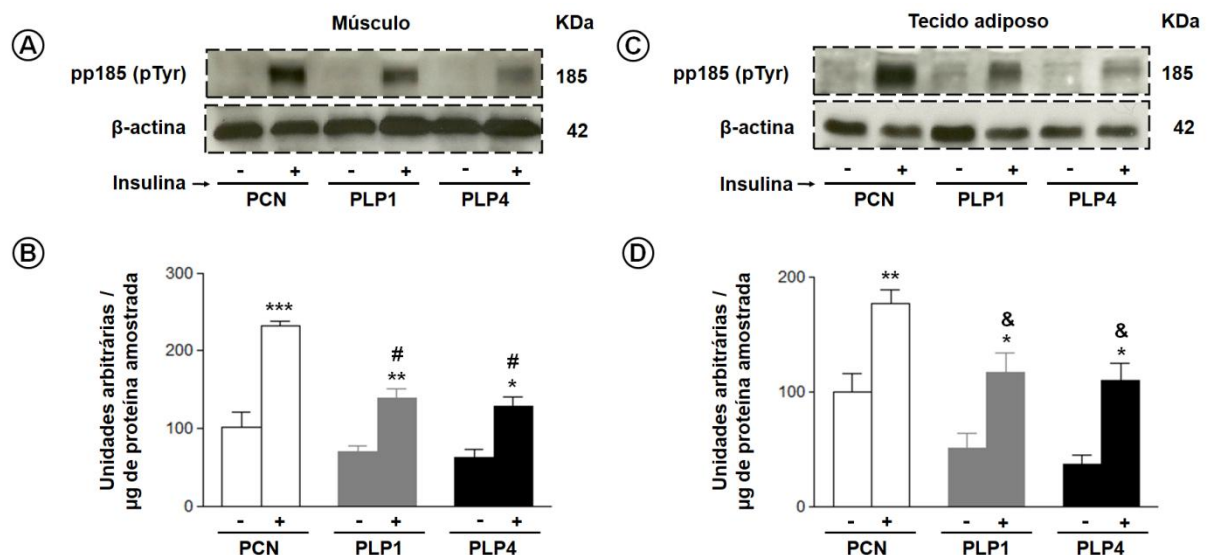
Valores expressos como média \pm EPM de 10 animais por grupo. * p<0,05 PCN vs. PLP1; ** p<0,01 PCN vs. PLP4; *** p<0,001 PLP4 vs. PCN e PLP1; # p<0,001 PCN vs. PLP1

4.5 Avaliação do grau de fosforilação em tirosina da pp185 no MG e TABp

Em análise intragrupos, observou-se aumento no grau de fosforilação em tirosina da pp185, após o estímulo insulínico, com relação ao estado basal em todos os grupos e tecidos.

Em análise intergrupos, após estímulo insulínico, o grau de fosforilação em tirosina da pp185 foi reduzido nos grupos PLP1 e PLP4 em relação ao grupo PCN em ambos os tecidos (Fig. 5B e D). Entretanto, não houve diferença nesse parâmetro entre os grupos PLP1 e PLP4.

Figura 5 – Avaliação do grau de fosforilação em tirosina da pp185 (pTyr) antes (-) e após (+) o estímulo insulínico no músculo gastrocnêmio (A e B) e no tecido adiposo branco periepídídimo (C e D) de proles de ratos controle (PCN), proles de ratos com uma lesão periapical (PLP1) e proles de ratos com quatro lesões periapicais (PLP4). Em A e C, autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS PAGE (185 µg). β-actina foi utilizada como controle. Em B e D, os valores do grau de fosforilação em tirosina da pp185 (expressos em unidades arbitrárias) são apresentados como média ± EPM de 6 animais por grupo. * p<0,05 insulina (-) vs. insulina (+); ** p<0,01 insulina (-) vs. insulina (+); * p<0,001 insulina (-) vs. insulina (+); # p<0,001 PCN (+) vs. PLP1 (+) e PLP4 (+); & p<0,05 PCN (+) vs. PLP1 (+) e PLP4 (+)**



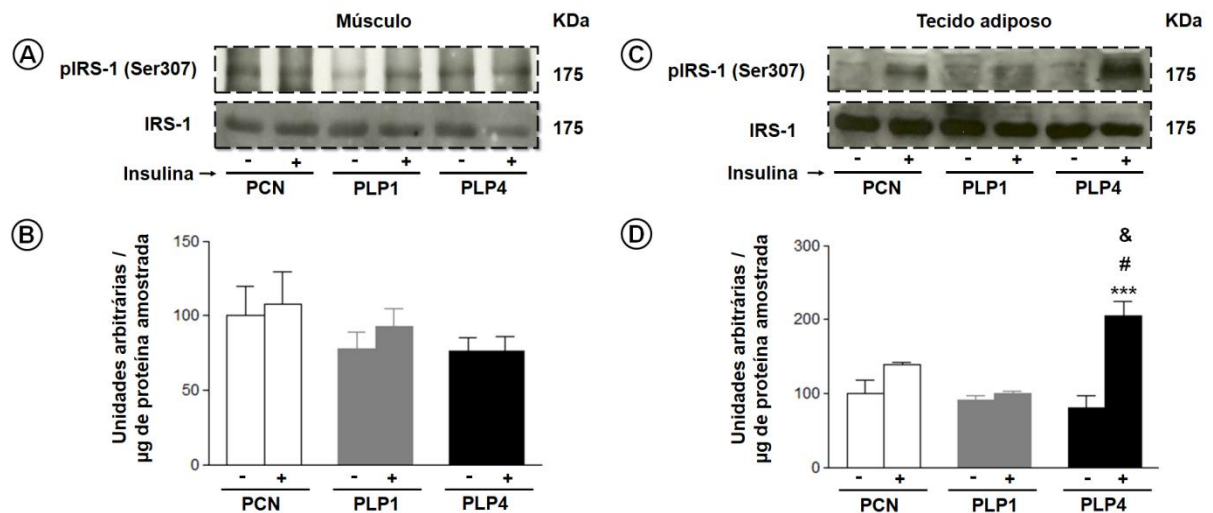
Fonte: do autor

4.6 Avaliação do grau de fosforilação em serina do IRS-1 no MG e TABp

Em análise intragrupos, observou-se aumento no grau de fosforilação em serina do IRS-1, após o estímulo insulínico, com relação ao estado basal, apenas no grupo PLP4 no TABp.

Em análise intergrupos constatou-se aumento no grau de fosforilação em serina do IRS-1 após estimulação insulínica no grupo PLP4 quando comparado aos grupos PCN e PLP1 no TABp. Entretanto, não houve diferença neste parâmetro no MG.

Figura 6 – Avaliação do grau de fosforilação em serina do IRS-1 (Ser307) antes (-) e após (+) o estímulo insulínico no músculo gastrocnêmio (A e B) e no tecido adiposo branco periepídídimo (C e D) de proles de ratas controle (PCN), proles de ratas com uma lesão periapical (PLP1) e proles de ratas com quatro lesões periapicais (PLP4). Em A e C, autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS PAGE (185 µg). IRS-1 foi utilizada como controle. Em B e D, os valores do grau de fosforilação em serina do IRS-1 (expressos em unidades arbitrárias) são apresentados como média ± EPM de 6 animais por grupo. * p<0,001 insulina (-) vs. insulina (+); # p<0,05 PCN (+) vs. PLP4 (+); & p<0,001 PLP1 (+) vs. PLP4 (+)**

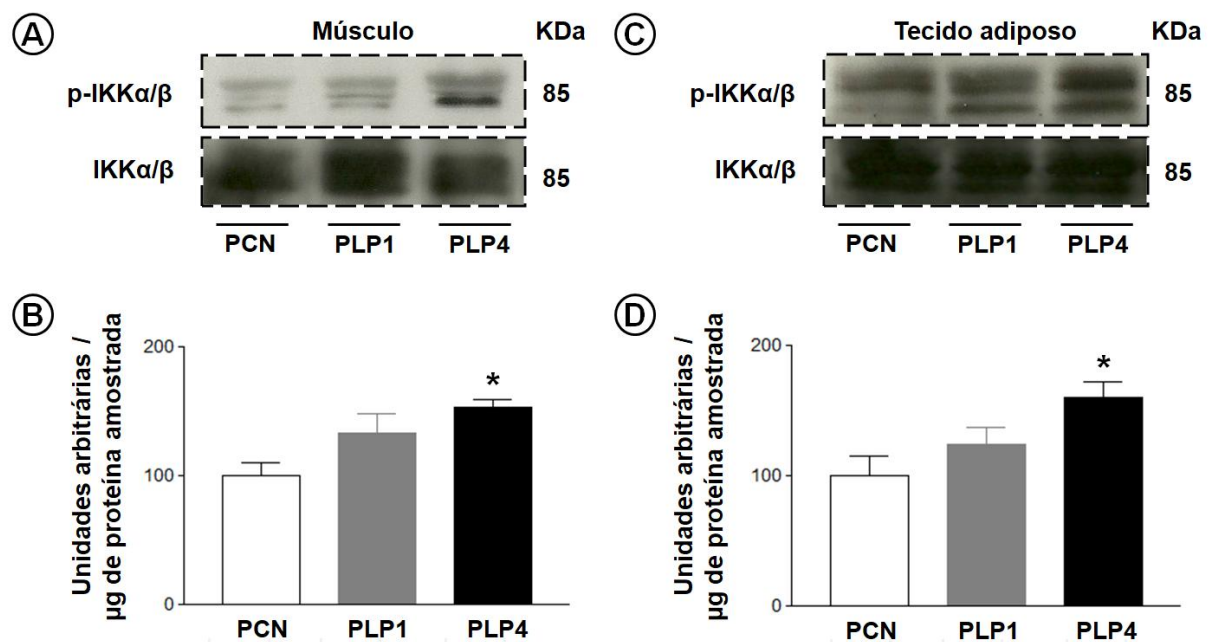


Fonte: do autor

4.7 Avaliação do grau de fosforilação de IKK α / β no MG e TABp

Houve aumento no grau de fosforilação de IKK α / β no grupo PLP4 em relação ao grupo PCN em ambos os tecidos analisados. Entretanto, não houve diferença neste parâmetro tanto entre os grupos PCN e PLP1 como entre os grupos PLP1 e PLP4.

Figura 7 – Avaliação do grau de fosforilação de IKK α / β no músculo gastrocnêmio (A e B) e no tecido adiposo branco periepídídimo (C e D) de proles de ratas controle (PCN), proles de ratas com uma lesão periapical (PLP1) e proles de ratas com quatro lesões periapicais (PLP4). Em A e C, autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 μ g). IKK α / β foi utilizada como controle. Em B e D, os valores do grau de fosforilação de IKK α / β (expressos em unidades arbitrárias) são apresentados como média \pm EPM de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ PCN vs. PLP4

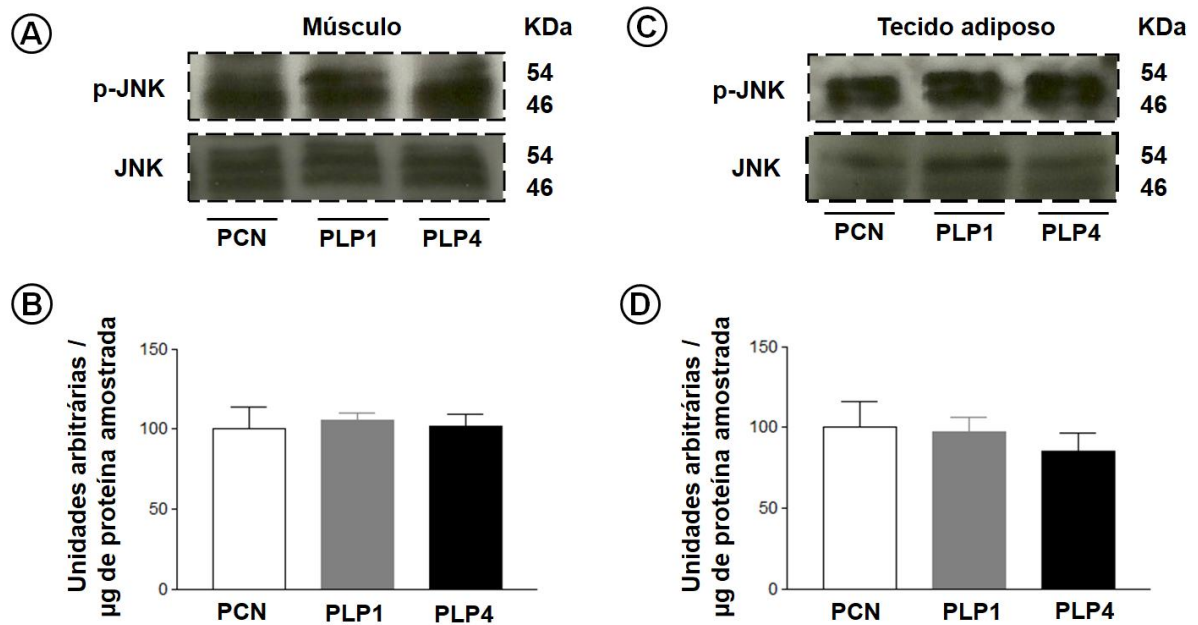


Fonte: do autor

4.8 Avaliação do grau de fosforilação de JNK no MG e TABp

Não houve diferença no grau de fosforilação de JNK entre os grupos, em ambos os tecidos analisados.

Figura 8 – Avaliação do grau de fosforilação de JNK no músculo gastrocnêmio (A e B) e no tecido adiposo branco periepídídimo (C e D) de proles de ratas controle (PCN), proles de ratas com uma lesão periapical (PLP1) e proles de ratas com quatro lesões periapicais (PLP4). Em A e C, autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 µg). JNK foi utilizada como controle. Em B e D, os valores do grau de fosforilação do JNK (expressos em unidades arbitrárias) são apresentados como média ± EPM de 6 animais por grupo.



Fonte: do autor

5 DISCUSSÃO

O presente estudo revelou que a LP materna em um único dente ou em quatro dentes em ratas está associada a RI, aumento nas concentrações plasmáticas de insulina e TNF- α e diminuição no grau de fosforilação em tirosina da pp185 (após estímulo insulínico) no MG e TABp de proles adultas. No entanto, somente a LP materna em quatro dentes promoveu aumento, tanto no grau de fosforilação em serina do IRS-1 (após estímulo insulínico) no TABp, quanto no grau de fosforilação de IKK α/β no MG e TABp de proles adultas. Ademais, tivemos incremento na RI e insulinemia na prole adulta em decorrência do aumento do número de foco de infecção endodôntica materna.

As imagens histológicas da região periapical materna comprovaram a instalação das LPs em ratas, as quais foram induzidas por meio da abertura coronária com auxílio de uma broca de aço esférica e subsequente exposição pulpar. Stashenko *et al.* (1994) revelaram que as lesões expandem-se rapidamente nos primeiros 7 a 20 dias após a exposição pulpar (fase aguda) e desacelera a partir deste período (fase crônica). No presente estudo, ao redor de 79 dias de exposição pulpar, observou-se necrose da polpa dentária (Fig. 3F e I) e presença de infiltração de células inflamatórias na área ao redor do ápice dentário (Fig. 3D, E e G) em ambos os grupos de ratas mães com LP (LP1 e LP4). Entretanto, extensas áreas de reabsorção dentinária foram verificadas apenas no grupo LP4 (Fig. 3H), demonstrando que a destruição dos tecidos periapicais foi exacerbada com o aumento do estímulo agressor (número de focos de infecção endodôntica). Estes achados estão de acordo com o estudo de Pereira *et al.*, (2017), o qual também constatou que a metodologia utilizada no presente estudo para a indução experimental de LP em roedores foi efetiva na instalação desta inflamação oral.

Evidências científicas relataram que a LP materna está associada às complicações gestacionais como pré-eclâmpsia (KHALIGHINEJAD *et al.*, 2017) e nascimento de bebês prematuros com baixo peso (LEAL *et al.*, 2015; HARJUNMA *et al.*, 2015). Entretanto, no presente estudo não foi verificada diferença na massa corpórea ao nascimento, entre os grupos (Fig. 4A).

Ao analisarmos semanalmente a evolução da massa corporal, o grupo PLP1 não demonstrou diferença estatística neste parâmetro, desde o nascimento até o final do experimento, quando comparado ao grupo PCN (Fig. 4A). Entretanto, o grupo PLP4 apresentou aumento na massa corpórea, a partir da 8ª semana de idade, comparado aos grupos PCN e PLP1 (Fig. 4A). Sugere-se que o aumento na ingestão alimentar verificado no grupo PLP4 (Fig. 4B) pode ter propiciado acúmulo de adiposidade visceral, indicado pelo aumento no peso dos tecidos adiposos brancos periepídídimal e retroperitoneal (Tabela 1), contribuindo para o aumento da massa corpórea neste grupo de animais.

Em estudos conduzidos com modelo experimental de injeção intraperitoneal de LPS (endotoxina bacteriana) em ratas durante o período gestacional foram verificados que proles destas ratas apresentam aumento na massa corpórea, na adiposidade visceral e na ingestão alimentar (NILSSON *et al.*, 2001; WEI *et al.*, 2007), e diminuição na tolerância à glicose na vida adulta (NILSSON *et al.*, 2001; GAO *et al.*, 2014). Estes achados demonstram que o período pré-natal pode ser importante para o desenvolvimento de obesidade e RI na vida adulta (NILSSON *et al.*, 2001).

Os resultados mostraram que os grupos PLP1 e PLP4 apresentaram aumento na insulinemia de jejum e nos valores do índice de HOMA-IR, indicando RI nestes grupos de animais em relação ao grupo PCN. Ademais, o número de focos

de infecção endodôntica materna promoveu uma piora nestes parâmetros avaliados, ou seja, o grupo PLP4 apresentou maior RI e insulinemia de jejum em relação ao grupo PLP1. Por outro lado, não houve diferença na glicemia de jejum entre todos os grupos avaliados (Tabela 2), que pode ser resultante do aumento compensatório na secreção de insulina pelas células beta pancreáticas para manter a normoglicemia nos grupos PLP1 e PLP4. Resultados similares foram observados nos estudos de Shirakashi *et al.* (2013) e Mattera *et al.* (2016), os quais relataram que ratos adultos, proles de ratas com DP (outra inflamação oral) apresentaram RI. Sabe-se que a contínua RI pode provocar esgotamento das células beta pancreáticas, ocasionando uma grande diminuição na secreção de insulina, promovendo hiperglicemia e desenvolvimento de DM2 (KUMAR *et al.*, 2013).

A RI e a hiperinsulinemia crônica podem prejudicar a regulação do consumo energético (HAN *et al.* 2008). No estudo coorte, Han *et al.* (2008) observaram que crianças com sobrepeso, RI e hiperinsulinemia apresentavam maior consumo energético, após jejum noturno. Ademais, estes autores constataram que a cada redução de 10% na sensibilidade à insulina promovia aumento de 27 kcal no consumo energético nestas crianças. Estes dados são compatíveis com a ideia de que a resistência periférica à insulina pode significar resistência central ao hormônio e perda da regulação do apetite.

O hipotálamo é uma região do cérebro envolvida no controle central do apetite. Em particular, o núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo está localizado adjacente à eminência mediana, um órgão circunventricular rico em capilares fenestrados. Essa característica anatômica facilita o acesso de hormônios e nutrientes circulantes ao ARC. Em vista disso, o ARC é considerado uma importante área do hipotálamo que detecta sinais metabólicos periféricos (YU; KIM, 2012).

No ARC, há duas populações neuronais funcionalmente antagônicas: 1) neurônios que expressam neuropeptídeos orexígenos (neuropeptídeo Y – NPY e peptídeo relacionado ao gene agouti – AgRP); 2) neurônios que expressam neuropeptídeos anorexígenos (proopiomelanocortina – POMC e transcrito regulado pela cocaína e anfetamina – CART) (YU; KIM, 2012). A ligação da insulina ao seu receptor em neurônios do ARC estimula a via IRS/PI3K/Akt. A fosforilação da Akt promove inativação do fator de transcrição Forkhead box O1 (FoxO1), levando à diminuição na expressão de AgRP e aumento na expressão de POMC, resultando em ação anorexígena (KHANH *et al.*, 2014). Esse mecanismo molecular mostra o papel importante da insulina no controle central do apetite. Diante deste contexto, é possível sugerir que a RI e hiperinsulinemia observadas no grupo PLP4 possam estar associadas à maior ingestão alimentar nestes animais.

Com o intuito de investigar os mecanismos moleculares envolvidos na RI em ratos adultos, proles de ratas com LP, realizou-se a análise da expressão de proteínas da etapa inicial do SI no MG e TABp. Os resultados indicaram diminuição no grau de fosforilação em tirosina da pp185 (após estímulo insulínico) nos grupos PLP1 e PLP4 quando comparados com o grupo PCN, resultando na atenuação do SI em tecidos periféricos (Fig. 3). Resultados semelhantes foram observados por Shirakashi *et al.* (2013), que realizaram um estudo em modelo experimental de DP materna. Verificou-se que proles adultas destas ratas tiveram redução no grau de fosforilação em tirosina da pp185 (após estímulo insulínico) no MG e TABp. Shirakashi *et al.* (2013) relataram que a diminuição do SI estava associada ao aumento na concentração plasmática de TNF- α .

Conforme mencionado anteriormente, o excesso de TNF- α tem implicação no desenvolvimento da RI (PLOMGAARD *et al.*, 2005). De fato, estudos

demonstraram que a infusão sérica prolongada de TNF- α inibe a captação de glicose mediada por insulina em tecidos periféricos (LANG *et al.*, 1992; PLOMGAARD *et al.*, 2005). Por outro lado, a neutralização do TNF- α pela proteína IgG do receptor TNF- α (agente neutralizante do TNF- α) resultou em melhora da sensibilidade à insulina em roedores obesos-diabéticos (HOTAMISLIGIL; SPIEGELMAN, 1994).

No presente estudo foi verificado aumento na concentração plasmática de TNF- α nos grupos PLP1 e PLP4 em comparação com o grupo PCN. Entretanto, não houve diferença estatística neste parâmetro entre os grupos PLP1 e PLP4 (Tabela 2). Zhang *et al.* (2008) demonstraram que o TNF- α , por intermédio do IKK β , pode ativar a proteína ribossômica S6 quinase beta-1 (S6K1/p70S6K) que promove a fosforilação de IRS-1 em múltiplos resíduos de serina. Interessantemente, os resultados do presente estudo mostraram aumento no grau de fosforilação de IKK α/β no MG e TABp somente no grupo PLP4 em comparação com o grupo PCN.

A fosforilação em serina do IRS-1 é um dos principais mecanismos moleculares envolvidos na RI, pois prejudica a interação entre o receptor insulínico e o IRS, resultando na atenuação do SI (AGUIRRE *et al.*, 2002). Nesse contexto, no intuito de averiguar que mecanismos promoveram a diminuição no grau fosforilação em tirosina da pp185 no MG e TABp de ratos adultos, proles de ratas com LP, foi realizada a análise do grau de fosforilação em serina de IRS-1 nestes tecidos. Os resultados revelaram aumento no grau de fosforilação em serina do IRS-1 (após estímulo insulínico) no TABp somente no grupo PLP4 em comparação com os grupos PCN e PLP1 (Fig. 6C e D). Isso pode ser uma consequência do aumento de adiposidade visceral (retroperitoneal e periepididimal) no grupo PLP4. De fato, Zhang *et al.* (2008) relataram aumento no grau de fosforilação em serina do IRS-1

no tecido adiposo de camundongos obesos. As adipocinas e outras moléculas secretadas pelo tecido adiposo visceral podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento da RI (PAPAETIS *et al.*, 2015).

A expansão dos adipócitos na obesidade está associada com o aumento de infiltração de macrófagos no tecido adiposo (GAO *et al.*, 2014). O acúmulo de macrófagos no tecido adiposo é dependente de localização anatômica, ou seja, há maior infiltração de macrófagos no tecido adiposo visceral (CANCELLO *et al.*, 2006). Nos tecidos, os macrófagos são ativados em resposta a combinações de estímulos, adquirindo fenótipos funcionais especializados (MARTINEZ; GORDON, 2014). Os macrófagos são classificados em M1 (macrófagos classicamente ativados) e M2 (macrófagos alternativamente ativados), os quais apresentam diferentes ativadores, marcadores e funções. Na presença de LPS e interferon- γ (IFN- γ), os macrófagos assumem perfil pró-inflamatório (M1) e secretam citocinas como IL-1 β , TNF- α e IL-6. Por outro lado, na presença de interleucina-4 (IL-4) e interleucina-13 (IL-13), os macrófagos diferenciam-se em M2. Estas células secretam citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina-10 (IL-10) (LOCATI; MANTOVANI; SICA, 2013). No estudo de Lumeng, Bodzin e Saltiel (2007) foi verificado que macrófagos do tecido adiposo (MTA) de camundongos magros tiveram expressão aumentada de proteína 3 quitinase-3-like (Ym1), arginase 1 e IL-10, que são característicos de macrófagos M2. Por outro lado, MTA de camundongos obesos tiveram expressão aumentada de genes característicos de macrófagos M1, tais como TNF- α e óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Devido à sua capacidade de produzir mediadores inflamatórios, os MTA desses camundongos podem contribuir para a inflamação crônica de baixo grau (CANCELLO *et al.*, 2006).

Os fatores derivados de macrófagos alteram a função dos adipócitos,

induzindo respostas inflamatórias e diminuindo a sensibilidade à insulina (GAO *et al.*, 2014). A IL-1 β é uma das principais citocinas pró-inflamatórias secretadas por monócitos e macrófagos (SIMS; SMITH, 2010). Estudos têm demonstrado que IL-1 β também está envolvida no desenvolvimento da RI associada à obesidade (BING, 2015). Em um estudo de caso-controle, os indivíduos com aumento nas concentrações plasmáticas de IL-1 β e IL-6 estavam associados ao risco elevado de desenvolver DM2 do que os indivíduos com aumento isolado de IL-6 no plasma (SPRANGER *et al.*, 2006). Adicionalmente, a expressão de IL-1 β está aumentada no tecido adiposo visceral de indivíduos obesos (JUGE-AUBRY *et al.*, 2004) e no tecido adiposo epididimal de camundongos obesos resistentes à insulina (LAGATHU *et al.*, 2006). No estudo de Lagathu *et al.* (2006) foi demonstrado que a exposição prolongada de adipócitos a IL-1 β (dose de 0,1 e 20 ng/mL) não ocasionou alteração no conteúdo de proteínas relacionadas à via de sinalização insulínica, tais como Akt, subunidade β do receptor insulínico (IR β) e IRS1. Contudo, promoveu diminuição no grau de fosforilação em serina da Akt e no grau de fosforilação em tirosina de IR β e IRS1 de maneira dose-dependente, prejudicando a transdução do SI. Diante destes achados, podemos sugerir que outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e IL-1 β , podem estar envolvidas na RI verificada em proles de ratas com LP, uma vez que houve diferença estatística na insulinemia de jejum e nos valores de HOMA-IR entre os grupos PLP1 e PLP4, entretanto, não houve diferença estatística na concentração plasmática de TNF- α entre estes dois grupos. Portanto, o aumento exacerbado na insulinemia de jejum e nos valores de HOMA-IR não foram dependentes da concentração plasmática de TNF- α . Assim, mais estudos são necessários para elucidar melhor a relação entre a inflamação oral materna e RI na prole adulta.

Neste estudo não houve diferença no grau de fosforilação em serina do IRS-1 no MG entre os grupos avaliados, demonstrando que a diminuição no SI observada nos grupos PLP1 e PLP4 no MG não está relacionada com este parâmetro (Fig. 6A e B). Dessa forma, sugere-se que outras proteínas estejam envolvidas na diminuição do SI no MG, tais como supressores da sinalização de citocinas 1 e 3 (SOCS1 e SOCS3) (UEKI *et al.*, 2004), glicoproteína-1 de membrana plasmática celular (PC-1) (MADDUX; GOLDFINE, 2000), proteínas ligadas a receptor de fator de crescimento 10 e 14 (Grb10 e Grb14) (BOUCHER *et al.*, 2014) e proteína tirosina fosfatase 1 B (PTP1B), as quais diminuem a atividade tirosina quinase do receptor insulínico, resultando no bloqueio de sua interação com proteínas IRSs (EGAWA *et al.*, 2001).

Como mencionado anteriormente, o grupo PLP4 apresentou aumento no grau de fosforilação de IKK α / β no MG e TABp quando comparado com o grupo PCN (Fig. 7). Estudos demonstraram que o IKK (consistindo de duas subunidades catalíticas IKK α / IKK β e uma subunidade reguladora IKK- γ), uma vez ativado, pode fosforilar o I κ B e levar à sua degradação pelo proteassoma. Isso permite a translocação do NF- κ B do citoplasma para o núcleo da célula (TAK; FIRESTEIN, 2001; ISRAËL, 2010), induzindo a expressão de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α . (TAK; FIRESTEIN, 2001). Assim, é possível sugerir que o aumento na concentração plasmática de TNF- α observado no grupo PLP4 pode estar associado ao aumento no grau de fosforilação de IKK α / β .

No presente estudo não houve diferença no grau de fosforilação de JNK entre os grupos avaliados em ambos os tecidos (Fig. 8). Tang *et al.* (2001) mostraram que o IKK modula negativamente a atividade de JNK, provavelmente por meio da indução de genes alvo de NF- κ B que codificam proteínas, como o inibidor

da apoptose ligado ao cromossomo X (XIAP), que interfere com a ativação da JNK mediada pelo TNF- α . Esses achados revelam que as vias de sinalização NF-kB e JNK estão funcionalmente interconectadas (SCHWABE, BRENNER, 2006). Estes dados podem ser a razão pela qual não foi encontrada nenhuma diferença no grau de fosforilação da JNK, pois a via de sinalização da IKK pode ter sobrepujada a via de sinalização da JNK.

Com base nos resultados do presente estudo, sugere-se que a LP materna está associada a determinadas alterações no desenvolvimento da prole adulta, tais como RI, incremento na insulinemia de jejum, maior grau de fosforilação em serina do IRS-1 e aumento no grau de fosforilação de IKK α/β . Ademais, algumas alterações, como RI e fosforilação em serina do IRS-1 foram mais pronunciadas quando houve um aumento no número de dentes (maternos) com LP. Alterações neste grupo (PLP4) podem ter sido agravadas pelo aumento do peso e acúmulo de adiposidade visceral. Portanto, é importante reforçar a prevenção da LP materna para manter a saúde geral da prole.

6 RESUMO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS

A LP materna em um único dente ou em quatro dentes promoveu em sua prole adulta:

- aumento nas concentrações plasmáticas de insulina e TNF- α ;
- nenhuma alteração na glicemia de jejum;
- diminuição na sensibilidade à insulina;
- diminuição no grau de fosforilação em tirosina da pp185 (após estímulo insulínico) no MG e TABp;
- nenhuma alteração no grau de fosforilação em serina do IRS-1 (após estímulo insulínico) no MG;
- nenhuma alteração no grau de fosforilação de JNK no MG e TABp.

Ademais, tivemos incremento na RI e insulinemia na prole adulta em decorrência do aumento do número de foco de infecção endodôntica materna. No entanto, apenas LP materna em quatro dentes ocasionou em sua prole adulta:

- aumento na massa corpórea, ingestão alimentar e adiposidade visceral;
- aumento no grau de fosforilação em serina do IRS-1 (após estímulo insulínico) no TABp;
- aumento no grau de fosforilação de IKK α/β no MG e TABp.

7 CONCLUSÃO

A LP materna está associada a importantes alterações metabólicas, como a RI, na vida adulta de sua prole. Salienta-se que houve incremento na RI e insulinemia na prole adulta em decorrência do aumento do número de foco de infecção endodôntica materna.

Os mecanismos moleculares pelos quais a inflamação bucal materna pode causar RI na prole ainda não são totalmente compreendidos. No entanto, com base em nossos achados, é possível afirmar que o aumento na concentração plasmática de TNF- α (PLP1 e PLP4) e ativação de via inflamatória (somente para o grupo PLP4) possam estar envolvidos na RI em ratos adultos, proles de ratas com LP. Isso reforça a importância que a manutenção da saúde bucal materna tem sobre a saúde geral da prole.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRRE, V. *et al.* Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 2, p. 1531-1537, 2002.
- 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, 1994.
- ASTOLPHI, R. D. *et al.* Periapical lesions decrease insulin signal and cause insulin resistance. **J. Endod.**, v. 39, n. 5, p. 648-652, 2013.
- ASTOLPHI, R.D. *et al.* periapical lesions decrease insulin signaling in rat skeletal muscle. **Clin. Oral Investig.**, v. 20, n. 7, p. 1625-1630, 2015.
- BARKER, D. J. Fetal origins of coronary heart disease. **BMJ**, v. 311, n. 6998, p. 171-174, 1995.
- BARTHEL, C. R. *et al.* TNF-alpha release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated Escherichia coli LPS. **Int. Endod. J.**, v. 30, n. 3, p. 155-9, 1997.
- BELLACOSA, A; CHAN, T. O; AHMED, N. N. Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of PH domain. **Oncogene**, v. 17, p. 313-325, 1998.
- BING, C. Is interleukin-1 β a culprit in macrophage-adipocyte crosstalk in obesity?. **Adipocyte**, v. 4, n. 2, p. 149-152, 2015.
- 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, 2000.
- BOUCHER, J.; KLEINRIDDERS, A.; KAHN, C. R. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. **Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.**, v. 6, pii: a009191, 2014.
- CALKINS, K.; DEVASKAR, S. U. Fetal Origins of Adult Disease. **Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care**, v. 41, n. 6, p.158-176, 2011.

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, 2006.

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

CHEN, L. *et al.* Mechanisms linking inflammation to insulin resistance. **Int J Endocrinol.**, 2015.

DE OLIVEIRA, E. C. *et al.* Atendimento odontológico a gestantes: A importância do conhecimento da saúde bucal. **Rev. de Iniciação Científica da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 4, n. 1, p. 11-23, 2014.

DING, P. H.; JIN, L. The role of lipopolysaccharide-binding protein in innate immunity: a revisit and its relevance to oral/periodontal health. **J. Periodont. Res.**, v. 49, p. 1-9, 2014.

EGAWA, K. *et al.* Protein-tyrosine phosphatase-1B negatively regulates insulin signaling in I6 myocytes and Fao hepatoma cells. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 10207-10211, 2001.

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, 2013.

FRANCO, D. G. Fator de transcrição nuclear kappa B no sistema nervoso central: do fisiológico ao patológico. **Revista da Biologia**, v. 4, 2010.

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, 2010.

GAO, M. *et al.* Prenatal exposure to lipopolysaccharide results in local RAS activation in the adipose tissue of rat offspring. **PLoS One**, v. 31, n. 9, p. e111376, 2014.

GARBIN, C. A. S. *et al.* Saúde coletiva: promoção de saúde bucal na gravidez. **Rev. Odontol. UNESP**, v. 40, n. 4, p. 161-165, 2011.

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

GRAUNAITE, I.; LODIENE, G.; MACIULSKIENE, V. Pathogenesis of apical periodontitis: A literature review. **J. Oral Maxillofac. Res.**, v. 2, n. 4, e1, Jan. 2012.

GUO, S. Decoding insulin resistance and metabolic syndrome for promising therapeutic intervention. **J. Endocrinol.**, v. 220, p. E1-3, 2014.

GUPTA, S. *et al.* Role of NF- κ B signaling pathway in increased tumor necrosis factor- α -induced apoptosis of lymphocytes in aged humans. **Cell Death Differ.**, v. 12, p. 177–183, 2005.

HAFEZ, S. The association of dental caries and periapical lesions with anthropometric measurements in postpartum women in Mangochi, Malawi. 2017.

HAN, J. C. *et al.* Insulin resistance, hyperinsulinemia, and energy intake in overweight children. **J. Pediatr.**, v. 152, n. 5, p. 612-617, 2008.

HARJUNMAA, U. *et al.* Association between maternal dental periapical infections and pregnancy outcomes: results from a cross-sectional study in Malawi. **Trop Med Int Health.**, v. 20, n. 11, p. 1549-1558, 2015.

HEMALATHA, V. T. *et al.* Dental considerations in pregnancy-a critical review on the oral care. **J. Clin. Diagn. Res.**, v. 7, n. 5, p. 948-953, 2013.

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

HOTAMISLIGIL, G. S.; SPIEGELMAN, B. M. Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. **Diabetes**, v. 43, p. 1271-1278, 1994.

ISRAËL, A. The IKK complex, a central regulator of NF- κ B activation. **Cold. Spring Harb. Perspect. Biol.**, v. 2, p. a000158, 2010.

JANSSON, T.; POWELL, T. L. Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. **Clin. Sci.**, v. 113, n. 1, p. 1-13, 2007.

JUGE-AUBRY, C. E. *et al.* Regulatory effects of interleukin (IL)-1, interferon-beta, and IL-4 on the production of IL-1 receptor antagonist by human adipose tissue. **J Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 89, n. 6, p. 2652-2658, 2004.

KADOWAKI, T. Insights into insulin resistance and type 2 diabetes from knockout mouse models. **J. Clin. Invest.**, v. 106, n. 4, p. 459-465, 2000.

KAHN, C.R. The molecular mechanism of insulin action. **Annu Rev. Med.**, v. 36, p. 429-51, 1985.

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

KAHN, C. R.; WHITE, M. F. The insulin receptor and the molecular mechanism of insulin action. **J. Clin. Invest.**, v. 82, n. 4, p. 1151-1156, 1988.

KANDAN, P. M.; MENAGA, V.; KUMAR, R. R. Oral health in pregnancy (guidelines to gynaecologists, general physicians & oral health care providers). **J. Pak. Med. Assoc.**, v. 61, n. 10, p. 1009-1014, 2011.

KHALIGHINEJAD, N. *et al.* Apical periodontitis, a predictor variable for preeclampsia: a case-control study. **J. Endod.**, v. 43, p. 10, p.1611-1614, 2017.

KHANH, D. V. *et al.* Leptin and insulin signaling in dopaminergic neurons: relationship between energy balance and reward system. **Front Psychol.**, v. 5, p. 846, 2014.

KIM, J. J.; SEARS, D. D. TLR4 and Insulin Resistance. **Gastroenterol Res Pract.**, pii: 212563, 2010.

KRUGER, N. J.; HAMMOND, J. B. Molecular comparison of pyrophosphate- and atpdependent fructose 6-phosphate 1-phosphotransferases from potato tuber. **Plant. Physiol.**, v. 86, n. 3, p. 645-648, 1988.

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, p. 21920-6, 1996.

KUMAR, H. *et al.* Correlation of insulin resistance, beta cell function and insulin sensitivity with serum sFas and sFasL in newly diagnosed type 2 diabetes. **Acta Diabetol.**, v. 50, n. 4, p. 511-518, 2013.

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

LAGATHU, C. *et al.* Long-term treatment with interleukin-1beta induces insulin resistance in murine and human adipocytes. **Diabetologia**, v. 49, n. 9, p. 2162-2173, 2006.

LANG, C. H.; DOBRESCU, C.; BAGBY, G. J. Tumor necrosis factor impairs insulin action on peripheral glucose disposal and hepatic glucose output. **Endocrinology**, v. 130, p. 43-52, 1992.

LANGLEY-EVANS, S. C. Developmental programming of health and disease. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 65, n. 1, p. 97-105, 2006.

LANGLEY-EVANS, S. C.; McMULLEN, S. Developmental origin of adult disease. **Med. Princ. Pract.**, v. 19, p. 87-98, 2010.

LEAL, A. S. *et al.* Association between chronic apical periodontitis and low-birth-weight preterm births. **J. Endod.**, v. 41, n. 3, p. 353-357, 2015.

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, n. 1, 2010.

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

LOCATI, M.; MANTOVANI, A.; SICA, A. Macrophage activation and polarization as an adaptive component of innate immunity. **Adv. Immunol.**, v. 120, p. 163-184, 2013.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-75, 1951.

LU, Y.C. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, v. 42, n. 2, p. 145-151, 2008.

LUCAS, S. *et al.* Study of dental caries and periapical lesions in a mediaeval population of the southwest France: differences in visual and radiographic inspections. **Homo**, v. 61, n. 5, p. 359-372, 2010.

LUCISANO, M. P. *et al.* Role of endotoxin in the etiology of periapical lesions: molecular mechanisms involved in endotoxin's recognition and cell activation. **Rev. Gauch. Odontol.**, v. 62, n. 3, 2014.

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, 2007.

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

MADDUX, B. A.; GOLDFIN, I. D. Membrane Glycoprotein PC-1 Inhibition of insulin receptor function occurs via direct interaction with the receptor α -subunit. **Diabetes**, v. 49, p. 13-19, 2000.

MAROTTA, P. S. *et al.* Type 2 diabetes mellitus and the prevalence of apical periodontitis and endodontic treatment in an adult Brazilian population. **J Endod.**, v. 38, n. 3, p. 297-300, 2012.

MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000 Prime Reports**, v. 6, p. 13, 2014.

MATTERA, M. S. L. C. *et al.* Maternal periodontitis decreases plasma membrane GLUT4 content in skeletal muscle of adult offspring. **Life Sci.**, v. 148, p. 194-200, 2016.

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

MELO, N. S. F. *et al.* Hábitos alimentares e de higiene oral influenciando a saúde bucal da gestante. **Cogitare Enferm.**, v. 12, n. 2, p. 189-197, 2007.

MOIMAZ, S. A. S. *et al.* O acesso de gestantes ao tratamento odontológico. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v. 19, n. 1, p. 39-45, 2007.

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

NILSSON, C. *et al.* Maternal endotoxemia results in obesity and insulin resistance in adult male offspring. **Endocrinology**, v. 142, n. 6, p. 2622-2630, 2001.

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

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

PAPAETIS, G. S.; PAPAKYRIAKOU, P.; PANAGIOTOU, T. N. Central obesity, type 2 diabetes and insulin: exploring a pathway full of thorns. **Arch. Med. Sci.**, v. 11, p. 463-482, 2015.

PEREIRA, R. F. *et al.* Periapical lesions decrease Akt serine phosphorylation and plasma membrane GLUT4 content in rat skeletal muscle. **Clin. Oral Investig.**, v. 20, n. 7, 2016.

PEREIRA, R. F. *et al.* Periapical lesions increase macrophage infiltration and inflammatory signaling in muscle tissue of rats. **J. Endod.**, v. 43, n. 6, p. 982-988, 2017.

PETERSEN, K. F.; SHULMAN, G. I. Pathogenesis of skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. **The Am. J. Cardiol.**, v. 90, (Supp11), p. 11-18, 2002.

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, p. 2939-2945, 2005.

POLETTO, V. C. *et al.* Atendimento odontológico em gestantes: uma revisão da literatura. **Stomatós**, v. 14, n. 26, p. 64-75, 2008.

RAKCHANOK, N. *et al.* Dental caries and gingivitis among pregnant and non-pregnant women in Chiang Mai, Thailand. **Nagoya J. Med. Sci.**, v. 72, n. 1-2, p. 43-50, 2010.

RAVELLI, G. P.; STEIN, Z. A.; SUSSER, M. W. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. **N. Engl. J. Med.**, v. 295, n. 7, p. 349-353, 1976.

RAVELLI, A. C. *et al.* Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. **Lancet**, v. 351, n. 9097, p. 173-177, 1998.

SAAD, M. J. *et al.* Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. **J. Clin. Invest.**, v. 92, n. 4, p. 2065-2072, 1993.

SAINI, R. *et al.* Periodontitis: A risk for delivery of premature labor and low-birth-weight infants. **J. Nat. Sci. Biol. Med.**, v. 1, n. 1, p. 40-42, 2010.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Review article Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, p. 799-806, 2001.

SASAKI, H. *et al.* Interrelationship Between Periapical Lesion and Systemic Metabolic Disorders. **Curr. Pharm. Des.**, v. 22, n. 15, p. 2204-2215, 2016.

SEBASTIANI, C. *et al.* Conhecimento das gestantes sobre alterações bucais e tratamento odontológico durante a gravidez. **Odontol. Clin. Cient.**, v. 9, n. 2, p. 155-160, 2010.

SEGURA-EGEA, J. J.; MARTÍN-GONZÁLEZ, J.; CASTELLANOS-COSANO, L. Endodontic medicine: connections between apical periodontitis and systemic diseases. **Int. Endod. J.**, v. 48, n. 10, p. 933-951, 2015.

SHOELSON, S. E.; LEE, J.; GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, v. 116, n. 7, p. 1793-1801, 2006.

SIMS, J. E.; SMITH, D. E. The IL-1 family: regulators of immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 10, n. 2, p. 89-102, 2010.

SIQUEIRA, F. M. *et al.* Intrauterine growth restriction, low birth weight, and preterm birth: adverse pregnancy outcomes and their association with maternal periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 78, n. 12, p. 2266-2276, 2007.

SIQUEIRA, J. F. JR.; RÔÇAS, I. N. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. **Braz. Dent. J.**, v. 18, n. 4, p. 267-280, 2007.

SCHWABE, R. F.; BRENNER, D. A. Mechanisms of Liver Injury. I. TNF-alpha-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. **Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.**, v. 290, p. 583-589, 2006.

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, 2013.

SPRANGER, J. *et al.* Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. **Diabetes**, v. 52, n. 3, p. 812-817, 2006.

STASHENKO, P. *et al.* Pathogenesis of induced rat periapical lesions. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 78, n. 4, p. 494-502, 1994.

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, 1991.

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

TAK, P. P.; FIRESTEIN, G. S. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. **J. Clin. Invest.**, v. 107, p. 7-11, 2001.

TAKEUCHI, O. *et al.* Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. **J. Immunol.**, v. 169, p. 10-14, 2002.

TAMEMOTO, H. *et al.* Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. **Nature**, v. 372, n. 6502, p. 182-186, 1994.

TANG, G. *et al.* Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. **Nature**, v. 414, p. 313-317, 2001.

UEKI, K.; KONDO, T.; KAHN, C. R. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. **Mol. Cell Biol.**, v. 24, p. 5434-5446, 2004.

VASCONCELOS, R.G. *et al.* Atendimento odontológico a pacientes gestantes: Como proceder com segurança. **Rev. Bras. Odontol.**, v. 69, n. 1, p. 120-4, jan./jun. 2012.

YU, J. H.; KIM, M. S. Molecular mechanisms of appetite regulation. **Diabetes Metab J.**, v. 36, n. 6, p. 391-398, 2012.

YU, H.; LITTLEWOOD, T.; BENNETT, M. Akt isoforms in vascular disease. **Vascul. Pharmacol.**, v. 71, p. 57-64, 2015.

WAJANT, H.; SCHEURICH, P. TNFR1-induced activation of the classical NF-κB pathway. **FEBS J.**, v. 278, n. 6, p. 862-876, 2011.

WEI, Y.; LI, X.; ZHOU, J. Prenatal exposure to lipopolysaccharide results in increases in blood pressure and body weight in rats. **Acta Pharmacol. Sin.**, v. 28, n. 5, p. 651-656, 2007.

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

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, 2002.

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, 1985.

WRIGHT, S. D. *et al.* CD18-deficient cells respond to lipopolysaccharide in vitro. **J. Immunol.**, v. 144, n. 7, p. 2566-2571, 1990.

ZHANG, J. *et al.* S6K directly phosphorylates IRS-1 on Ser-270 to promote insulin resistance in response to TNF-(alpha) signaling through IKK2. **J. Biol. Chem.**, v. 283, p. 35375-35382, 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 ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Avaliação das vias insulínica e inflamatória em tecidos muscular esquelético e adiposo de ratos adultos, proles de ratas com lesão periapical**", Processo FOA nº 00157-2017, sob responsabilidade de Dóris Hissako Sumida apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 15 de Março de 2017.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 01 de Julho de 2017.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Agosto de 2019.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Assessment of insulin signaling and inflammatory pathways in skeletal muscle and adipose tissues of adult rats, offspring of the rats with periapical lesion**", Protocol FOA nº 00157-2017, under the supervision of Dóris Hissako Sumida presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on March 15, 2017.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: July 01, 2017.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: August 01, 2019.




Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

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

ANEXO B

Artigo publicado na revista International Endodontic Journal

Maternal apical periodontitis is associated with insulin resistance in adult offspring

T. V. S. Tsosura¹ , F. Y. Chiba², M. S. L. C. Mattera¹, R. F. Pereira¹, L. T. A. Cintra³ , L. C. Conti³, R. M. dos Santos¹ , J. H. P. Mateus¹, C. A. S. Garbin² & D. H. Sumida¹

¹Department of Basic Sciences, Multicenter Postgraduate Program in Physiological Sciences, SBFis; ²Department of Children and Social Dentistry; and ³Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, São Paulo State University (UNESP), Araçatuba, Brazil

Abstract

Tsosura TVS, Chiba FY, Mattera MSLC, Pereira RF, Cintra LTA, Conti LC, dos Santos RM, Mateus JHP, Garbin CAS, Sumida DH. Maternal apical periodontitis is associated with insulin resistance in adult offspring. *International Endodontic Journal*.

Aim To investigate the plasma concentrations of glucose, insulin and tumour necrosis factor- α (TNF- α) of rats with maternal apical periodontitis (AP) and to explore the effect of maternal inflammation on the initial steps of insulin signalling and the inflammatory pathway in the gastrocnemius muscle (GM) and pericardial white adipose tissue (pWAT) of adult offspring.

Methodology Fifteen female Wistar rats were distributed into a control group (CN), a group with 1 tooth with AP (1AP) and a group with 4 teeth with AP (4AP). Thirty days following induction of AP, female rats from all groups were mated with healthy male rats. When male offspring reached 75 days of age, plasma concentrations of glucose, insulin and TNF- α were quantified. Insulin resistance was evaluated by the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) index. Phosphorylation status of pp185 tyrosine, insulin receptor substrate 1 (IRS-1)

serine, I κ B kinase α/β (IKK α/β) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) in the GM and pWAT were measured by Western blot. Analysis of variance was performed, followed by the Tukey's *post hoc* test. *P* values <0.05 were considered to be statistically significant.

Results Maternal AP promoted insulin resistance, impaired the initial steps of insulin signalling, significantly increased plasma concentrations of insulin ($P < 0.001$) and TNF- α ($P < 0.05$), and enhanced IKK α/β phosphorylation in the GM and pWAT ($P < 0.05$) of adult offspring. However, maternal AP did not affect fasting glycaemia and JNK phosphorylation in the GM and pWAT of adult offspring.

Conclusions Maternal AP was associated with insulin resistance in adult offspring through alterations in insulin signalling and inflammation pathways. The study provides information on the impact of maternal AP on the development of metabolic alterations such as insulin resistance in adult offspring and reinforces the importance of preventing maternal AP in order to maintain the general health of offspring.

Keywords: apical periodontitis, foetal development, inflammation, insulin resistance.

Received 19 November 2018; accepted 11 February 2019

Correspondence: Thaís Verônica Saori Tsosura, São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araçatuba, São Paulo, Brazil-R. José Bonifácio, 1193, 16015-050, Araçatuba-SP, Brazil (Tel: (+55) 18 3636 2819; Fax: (+55) 18 3636 3233; e-mail: thaís_tsosura@hotmail.com).

Introduction

The foetal programming phenomenon suggests that adverse stimuli applied during early foetal development can result in physiological and metabolic changes in offspring, thereby increasing the risk of diseases in adulthood (Hocher 2014).

Oral inflammation due to bacterial infections is a source of bacteria and inflammatory mediators that can eventually spread systemically through the bloodstream and reach the foetoplacental unit (Ren & Du 2017). Indeed, Ercan *et al.* (2013) detected the presence of periodontal pathogens in the amniotic fluid and subgingival plaque samples of pregnant women with generalized periodontitis. Studies have shown the association amongst maternal periodontal disease (PD) and low birthweight (Mattera *et al.* 2016), preterm birth and intrauterine growth restriction (Skjueira *et al.* 2007). However, there is a shortage of studies that investigate the relationship between maternal apical periodontitis (AP) and health of offspring.

Bain *et al.* (2013) demonstrated that rat pups born from mothers with AP had significantly higher concentrations of tumour necrosis factor- α (TNF- α) in brain tissues as compared with those born from healthy mothers. Elevated TNF- α concentration is associated with insulin resistance (IR) (Plomgaard *et al.* 2005). TNF- α can activate inflammatory pathway proteins such as I κ B kinase (IKK) and c-Jun N-terminal kinase (JNK), which promote insulin receptor substrate 1 (IRS-1) serine phosphorylation (Johnson & Olefsky 2013), thus leading to insulin signalling (IS) attenuation (Aguirre *et al.* 2002).

Insulin receptor substrates 1 and 2 (collectively known as pp185 proteins) play a critical role in IS transduction (Shaw 2011) and glucose uptake in skeletal muscles and adipose tissues (Thirone *et al.* 2006). Shirakashi *et al.* (2013) reported that adult offspring of rats with PD demonstrate IR and impairment in the initial steps of IS in the gastrocnemius muscle (GM) and the periepididymal white adipose tissue (pWAT). This suggested that localized oral inflammation during the gestational period can induce significant alterations in the IS pathway in adult offspring. Therefore, it was hypothesized that maternal AP is able to promote IR in adult offspring. To this end, glucose, insulin and TNF- α plasma concentrations were analysed, as well as IR, the initial steps of IS, and the inflammatory pathways related to inhibition of IS transduction in the GM and pWAT of adult offspring of rats with AP.

Materials and methods

Animals

This study followed the Ethical Principles and Guidelines for Animal Experimentation and was approved by

the local ethics committee of São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araçatuba, Brazil (protocol number 2017-00157). Wistar albino rats were kept on a 12-h light/dark cycle (lights on at 07:00) at 23 ± 2 °C; food (Presença, Paulínia, São Paulo, SP, Brazil), and water was available *ad libitum*.

Experimental design

Two-month-old female Wistar rats were distributed into three groups of five animals each: the control group (CN), the group with a single AP (1AP) and the group with 4 AP (4AP). Animals in the 1AP and 4AP groups were anaesthetized by administering an intramuscular injection containing ketamine (80 mg kg⁻¹; Dopalen, Sespo Indústria Com Ltda, São Paulo, SP, Brazil) and xylazine (10 mg kg⁻¹; Anasedan, Sespo Indústria Com Ltda). To induce AP, the pulps of the first right maxillary molar (1AP), the first and second right maxillary, and the mandibular molars (4AP) were exposed to the oral environment through the occlusal surface using a surgical round bur measuring 0.1 mm in diameter (Broca LN Long Neck, Dentsply Indústria Com Ltda, Petrópolis, RJ, Brazil). Thirty days later, female rats from all groups were mated with healthy male rats. After confirming pregnancy, female rats were housed individually.

A total of 63 (29 males), 59 (30 males) and 62 (27 males) rat pups were born from the five pregnant rats of the CN, 1AP and 4AP groups, respectively. On the day of delivery, the number of pups from CN, 1AP and 4AP groups was matched so that each mother had equivalent numbers. After weaning, only the male pups were kept for further analysis.

Male pups were distributed into three groups of 16 animals each: offspring of the CN rats (CN-o), offspring of 1AP rats (1AP-o) and offspring of 4AP rats (4AP-o). The body weights of offspring were measured once weekly from birth until 75 days of age. Food intake was evaluated weekly from weaning until 75 days of age. All experiments were performed once the offspring reached 75 days of age.

Animals were fasted for 12 h prior to experimentation and anaesthetized with sodium thiopental (50 mg kg⁻¹, intraperitoneal; Thiopentax, Cristália, Itapira, SP, Brazil).

A median laparotomy was performed in 10 animals from each group, and blood samples were taken via inferior vena cava punctures. Plasma was prepared by centrifuging the blood at 3000 *g* for 15 min at 4 °C and was stored in aliquots at -80 °C for

glucose, insulin and TNF- α quantification. The left GM, pWAT and retroperitoneal white adipose tissue (rWAT) were removed from all animals to assess the absolute and relative weight of these tissues. Following this, animals were euthanized by sodium thiopental overdose.

The remaining animals ($n = 6$ /group) were used to evaluate the initial steps of IS and the inflammatory pathway proteins in GM and pWAT via Western blot.

Glycaemia, insulinemia, HOMA-IR index and plasma concentration of TNF- α in offspring

Glycaemia was measured by the glucose oxidase method (Enzymatic glucose, ANALISA Diagnóstica, Belo Horizonte, MG, Brazil). Plasma concentrations of insulin and TNF- α were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay using specific commercial kits (Insulin: Sensitive Rat Insulin, Millipore, St. Charles, MO, USA; TNF- α : Invitrogen Corporation, Camarillo, CA, USA); assays were performed as per manufacturer's recommended protocols. IR was evaluated by the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) index, which was calculated according to the following formula: $\text{HOMA-IR} = \text{fasting glycaemia (mmol L}^{-1}) \times \text{fasting insulinemia (}\mu\text{IU mL}^{-1}) / 22.5$ (Bonora *et al.* 2000).

Western blot analysis in offspring

Six animals from each group were anaesthetized before median laparotomy was performed to remove the GM and pWAT before and after intravenous (portal vein) administration of 1.5 U regular insulin (Humulin, Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA) at variable times (90 s for the GM and 120 s for the pWAT). Tissue samples were prepared according to methods described by Carvalho *et al.* (1996) and were subjected to Western blot for quantification of: (i) pp185 tyrosine phosphorylation using the antiphosphotyrosine antibody, (ii) IRS-1 serine phosphorylation using the antiphosphoserine IRS-1 307 antibody, (iii) IRS-1 content using anti-IRS1 and (iv) IKK α / β and JNK phosphorylation and content using antibodies against p-IKK α / β , p-JNK, IKK α / β and JNK, respectively. β -actin served as the loading control. All primary antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

Immunoreactive bands were detected by autoradiography using an enhanced chemiluminescence detection system (ECL Kit, Amersham; GE Healthcare,

Chalfont St. Giles, UK) according to manufacturer's instructions. Quantitative analysis of the blots was conducted using the Scion Image software (Scion Image—Release Beta 3b; National Institutes of Health, Frederick, MD, USA).

Histological analysis of the periapical region and plasma concentration of TNF- α in mother rats

After weaning, mother rats were euthanized by sodium thiopental overdose and blood samples were collected and the plasma was prepared according to the procedure described above and stored in aliquots at -80°C for quantification of TNF- α . Subsequently, maxillary and mandibular molars of rats were immediately dissected, post-fixed in neutral-buffered formalin for 24 h, and decalcified in 10% buffered ethylenediaminetetraacetic acid (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) for 3 months. Specimens were processed conventionally and embedded in paraffin. The first molar was sectioned semiserially (thickness: $4\ \mu\text{m}$) along its longitudinal axis by a microtome (RM2155, Leica Microsystems, BD, Wetzlar, Germany). Tissue sections were stained with haematoxylin-eosin, and were analysed by optical microscopy (DM 4000 B, Leica).

Statistical analyses

Normality of the data set was verified for all analyses. Analysis of variance was performed, followed by the Tukey's *post hoc* test. P values < 0.05 were considered to be statistically significant. Data were expressed as the mean \pm SEM, and data analysis was performed with the GraphPad Prism version 6.0 statistical program (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA).

Results

Confirmation of AP induction and plasma TNF- α concentration in mother rats

In the CN group, the periapical tissue revealed characteristics consistent with a normal aspect (Fig. 1a,b,c). However, inflammatory cell infiltration areas surrounding the tooth apex can be observed in both AP groups (Fig. 1d,e,f,g) and dentine resorption was observed only in the 4AP group (Fig. 1h,i).

Regarding the plasma concentration of TNF- α , there was a significant increase ($P < 0.05$) in this parameter in the 1AP and 4AP groups compared to

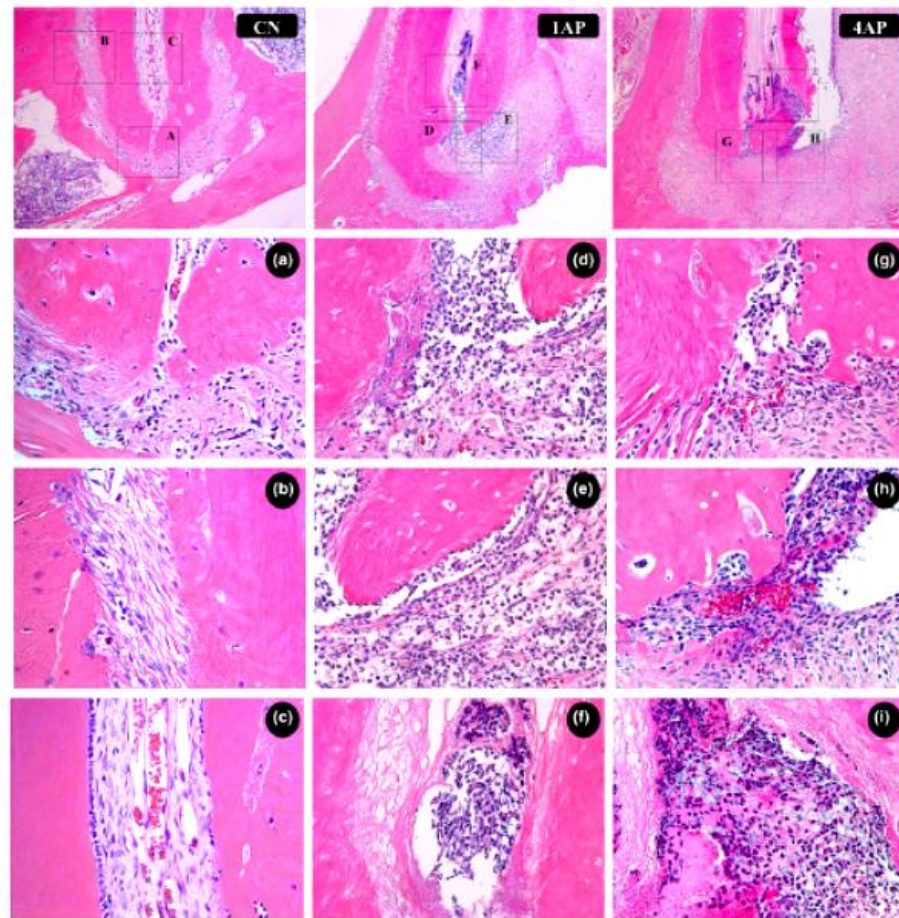


Figure 1 Histologic images of healthy molar [control (CN) group] and molar with apical periodontitis [1 apical periodontitis (1AP) and 4 apical periodontitis (4AP) groups], stained with haematoxylin-eosin (original magnification $\times 100$). (a–c) the CN group; apical and periapical regions are free of inflammatory infiltrate (original magnification $\times 400$). (d–f) the 1AP group; moderate inflammatory cell infiltration in the area surrounding the tooth apex was observed (original magnification $\times 400$). (g–i) the 4AP group; prominent presence of inflammatory cells; dentine resorption areas were observed (original magnification $\times 400$).

the CN group. However, there was no difference between the 1AP and 4AP groups (Table 1).

Body weight and food intake of offspring

There was no difference in body weight at birth amongst the groups. However, the 4AP-o group had a

significant increase ($P < 0.001$) in body weight from the 8th week to the 10th week, as compared with those in the CN-o and 1AP-o groups (Fig. 2a). On the other hand, there was no difference between these last two groups during the same time period (Fig. 2a).

There was no difference in food intake between the CN-o and the 1AP-o groups from weaning until (third

week) the end of experimental period. However, the 4AP-o group had greater food intake in the 8th week ($P < 0.01$) as compared with that in the CN-o and 1AP-o groups, as well as in the 9th week ($P < 0.001$) as compared with that in the CN-o group (Fig. 2b).

Table 1 Plasma concentration of TNF- α of mother rats

Parameter	CN	1AP	4AP
TNF- α (pg mL ⁻¹)	4.39 \pm 0.23	5.67 \pm 0.32 ^a	6.18 \pm 0.42 ^b

^a $P < 0.05$ CN vs. 1AP.

^b $P < 0.01$ CN vs. 4AP.

Values are presented as the mean \pm SEM ($n = 5$ animals per group).

1AP, group with a single AP; 4AP, group with four AP; CN, control group; TNF- α , tumour necrosis factor alpha.

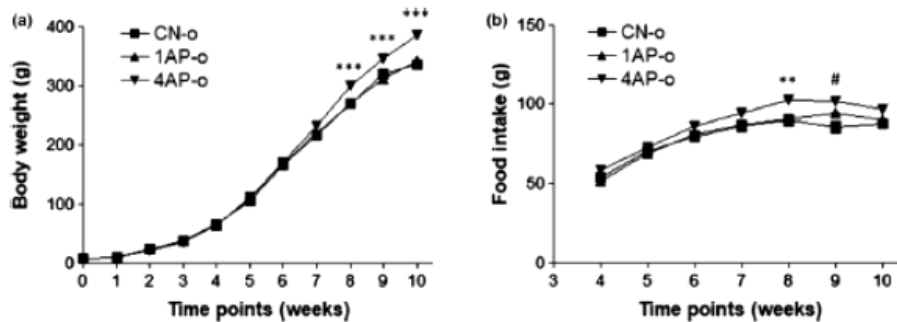


Figure 2 (a) Body weight of the offspring of control rats (CN-o), rats with 1 apical periodontitis (1AP-o) and rats with 4 apical periodontitis (4AP-o), assessed weekly from birth until 75 days of age. (b) Food intake of CN-o, 1AP-o and 4AP-o groups, assessed weekly from weaning (third week) until the end of the experiment. Values are presented as mean \pm SEM ($n = 16$ animals per group). ** $P < 0.01$ 4AP-o vs. CN-o and 1AP-o; *** $P < 0.001$ 4AP-o vs. CN-o and 1AP-o; # $P < 0.001$ CN-o vs. 4AP-o.

Table 2 Absolute and relative weights of the periepididymal and retroperitoneal white adipose tissues and gastrocnemius muscle of offspring

Tissues	CN-o	1AP-o	4AP-o
pWAT g	3.81 \pm 0.31	4.93 \pm 0.33	5.33 \pm 0.39 ^a
pWAT g 100 g ⁻¹ of body weight	0.98 \pm 0.07	1.22 \pm 0.06	1.32 \pm 0.09 ^a
rWAT g	3.50 \pm 0.32	4.49 \pm 0.31	5.32 \pm 0.50 ^b
rWAT g 100 g ⁻¹ of body weight	0.90 \pm 0.08	1.17 \pm 0.08	1.32 \pm 0.12 ^a
GM g	1.91 \pm 0.05	1.98 \pm 0.04	2.06 \pm 0.02
GM g 100 g ⁻¹ of body weight	0.49 \pm 0.01	0.51 \pm 0.01	0.52 \pm 0.01

^a $P < 0.05$ CN-o vs. 4AP-o.

^b $P < 0.01$ CN-o vs. 4AP-o.

Values are presented as the mean \pm SEM ($n = 10$ animals per group).

1AP-o, one apical periodontitis offspring; 4AP-o, four apical periodontitis offspring; CN-o, control group offspring; GM, gastrocnemius muscle; pWAT, periepididymal white adipose tissue; rWAT, retroperitoneal white adipose tissue.

($P < 0.001$) in fasting insulinemia and HOMA-IR values in the 1AP-o and 4AP-o groups as compared with that in the CN-o group ($P < 0.001$). Furthermore, there was a significant difference ($P < 0.001$) between the 1AP-o and 4AP-o groups (Table 3).

There was a significant increase in plasma concentrations of TNF- α in the 1AP-o ($P < 0.05$) and 4AP-o ($P < 0.01$) groups in relation to that in the CN-o group; however, no difference was observed between the 1AP-o and 4AP-o groups (Table 3).

pp185 tyrosine and IRS-1 serine phosphorylation status in the GM and pWAT of offspring

Following insulin stimulation, there was a significant increase ($P < 0.05$) in pp185 tyrosine phosphorylation in all groups and tissues; pp185 tyrosine phosphorylation was lower in both GM and pWAT of 1AP-o and 4AP-o as compared with that in CN-o; no difference was observed between the 1AP-o and the 4AP-o groups (Fig. 3b,e).

After insulin stimulation, higher IRS-1 serine phosphorylation was observed in pWAT tissue of the 4AP-o group as compared with those in CN-o ($P < 0.05$) and 1AP-o ($P < 0.01$) groups. However, no difference was observed between CN-o and 1AP-o groups (Fig. 3f).

In the GM, no difference in IRS-1 serine phosphorylation was detected amongst the groups following insulin stimulation (Fig. 3c).

IKK α/β and JNK phosphorylation status in the GM and pWAT of offspring

Greater ($P < 0.05$) IKK α/β phosphorylation in the 4AP-o group was observed as compared with that in the CN-o group in both tissues. However, no differences were observed between the CN-o and 1AP-o

groups, and between the 1AP-o and 4AP-o groups (Fig. 4b,e).

There was no difference in JNK phosphorylation amongst the groups in both tissues (Fig. 4c,f).

Discussion

The present study revealed that maternal AP in a single tooth or in four teeth promoted IR, impaired the initial steps of IS in GM and pWAT and led to increased plasma concentration of TNF- α of adult offspring. However, only maternal AP in four teeth induced increased IRS-1 serine phosphorylation in the pWAT, and IKK α/β phosphorylation in the GM and pWAT in adult offspring.

The results revealed that there was an increase in the plasma concentration of TNF- α in the 1AP and 4AP groups compared to the CN group. However, there was no difference between the 1AP and 4AP groups. This increase in the plasma concentration of pro-inflammatory cytokines in the group of mother rats with AP, also verified in the study by Bain *et al.* (2009), provides evidence of the influence of the periapical inflammatory process on a systemic level. It has been proposed that adverse stimuli during intrauterine life may result in developmental adaptations, leading to changes in offspring metabolism, which in turn leads to an increased risk of disease in adulthood. It is suggested that the epigenetic regulation of gene expression patterns plays a crucial role in programming adult disease development (Chen & Zhang 2011).

In the present study, although low birthweight was not observed in the 1AP-o and 4AP-o groups, these animals developed IR in adulthood. There was a significant increase in body weight from 8 weeks of age onwards in the 4AP-o group as compared with those in the CN-o and 1AP-o groups. It is suggested that

Table 3 Glycaemia, insulinemia, HOMA-IR index and plasma concentration of TNF- α of offspring

Parameters	CN-o	1AP-o	4AP-o
Glycaemia (mmol L ⁻¹)	7.37 \pm 0.26	7.81 \pm 0.29	8.00 \pm 0.25
Insulinemia (μ U mL ⁻¹)	15.95 \pm 2.54	32.05 \pm 2.18 ^a	63.05 \pm 0.68 ^b
HOMA-IR	5.24 \pm 0.78	11.29 \pm 0.95 ^a	22.40 \pm 0.57 ^b
TNF- α (pg mL ⁻¹)	8.16 \pm 0.32	9.93 \pm 0.30 ^c	10.58 \pm 0.61 ^d

^a $P < 0.001$ CN-o vs. 1AP-o.

^b $P < 0.001$ 4AP-o vs. CN-o and 1AP-o.

^c $P < 0.05$ CN-o vs. 1AP-o.

^d $P < 0.01$ CN-o vs. 4AP-o.

1AP-o: 1 apical periodontitis offspring; 4AP-o: 4 apical periodontitis offspring; CN-o: control group offspring; HOMA-IR: homeostasis model assessment of insulin resistance; TNF- α : tumour necrosis factor alpha.

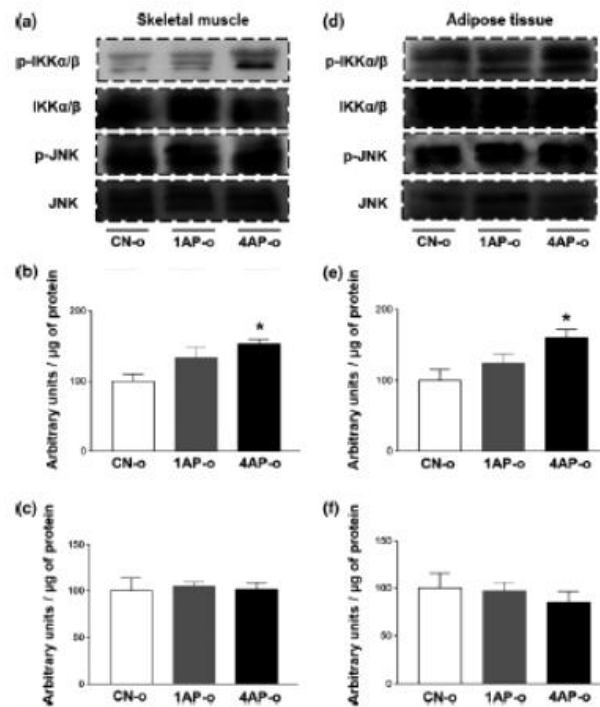


Figure 4 Evaluation of IKK α / β and JNK phosphorylation status in the gastrocnemius muscle and periepididymal white adipose tissues of control (CN-o), 1 apical periodontitis (1AP-o) and 4 apical periodontitis (4AP-o) offspring groups. (a and d) Typical autoradiography: equal amounts of protein (185 μ g) were subjected to sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. IKK α / β and total JNK were used as controls. Values of IKK α / β (b and e) and JNK (c and f) phosphorylation status (expressed in arbitrary units) are presented as mean \pm SEM, $n = 6$ animals per group. * $P < 0.05$ CN-o vs. 4AP-o.

The results revealed increased fasting insulinemia and HOMA-IR index in the 1AP-o and 4AP-o groups as compared with that in the CN-o group, which suggested that rats with AP yield IR offspring. It was noted that the alterations observed in the 1AP-o and 4AP-o groups became more prominent with increased number of teeth with maternal AP. On the other hand, there was no difference in fasting glycaemia amongst the groups, which may be due to a compensatory increase in pancreatic β -cell insulin secretion for maintenance of euglycaemia in the 1AP-o and 4AP-o groups. It should be noted that continuous IR leads to β -cell exhaustion and decreased insulin secretion, which ultimately results in hyperglycaemia and development of type 2 diabetes mellitus (Kumar *et al.* 2013).

In order to investigate the mechanisms involved in IR in adult offspring of rats with AP, the initial steps of IS in the GM and pWAT were analysed. The results indicated a decrease in pp185 tyrosine phosphorylation following insulin stimulation in the 1AP-o and 4AP-o groups when compared with that in the CN-o group. Similar results were observed by Shirakashi *et al.* (2013), who conducted a study in a maternal PD experimental model. It was found that adult offspring of these rats exhibit reduction in pp185 tyrosine phosphorylation after insulin stimulation in the GM and pWAT. Shirakashi *et al.* (2013) demonstrated that the decrease in IS was associated with increased plasma concentration of TNF- α .

Elevated TNF- α concentrations have been implicated in the development of IR (Plomgaard *et al.*

2005). Indeed, neutralization of TNF- α with a soluble TNF- α receptor IgG protein (TNF- α neutralizing agent) results in improved insulin sensitivity in obese diabetic rodents (Hotamisligil & Spiegelman 1994).

In the present study, an increase in the plasma concentration of TNF- α was observed in the 1AP-o and 4AP-o groups as compared with that in the CN-o group. Zhang *et al.* (2008) demonstrated that TNF- α , through IKK β , can activate S6K1 (p70S6K), which promotes IRS-1 phosphorylation in multiple serine residues. In this study, only the 4AP-o group had an increase in IRS-1 serine phosphorylation in the pWAT and IKK α/β phosphorylation in the GM and pWAT as compared with CN-o group. This can be a consequence of increased visceral adiposity in the 4AP-o group. Indeed, Zhang *et al.* (2008) reported elevated IRS-1 serine phosphorylation in adipose tissue from obese mice. Adipokines and other molecules secreted by visceral adipose tissue can play an important role in the development of IR (Papaetis *et al.* 2015). However, in this study, there was no change in IRS-1 serine phosphorylation amongst the groups in the GM. Thus, it is suggested that other proteins are involved in the reduction of the IS in GM of 1AP-o and 4AP-o groups, such as suppressor of cytokine signalling 1 and 3-SOCS-1 and SOCS-3 (Ueki *et al.* 2004) and protein tyrosine phosphatase 1B-PTB1B (Egawa *et al.* 2001).

Studies demonstrated that I kappa B kinase (IKK) complex once activated can phosphorylate the inhibitors of κ B (I κ B) to induce its degradation by the proteasome. This allows for translocation of nuclear factor kappa B (NF- κ B) from the cytoplasm to the nucleus of the cell (Tak & Firestein 2001, Israël 2010), which induces expression of TNF- α (Tak & Firestein 2001). Thus, it is possible to suggest that the pronounced increase in plasma concentration of TNF- α observed in the 4AP-o group was associated with increased IKK α/β phosphorylation.

There was no difference in JNK phosphorylation amongst the groups. Tang *et al.* (2001) has shown that IKK negatively modulates JNK activity, most likely through induction of NF- κ B target genes that encode proteins such as X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis-XIAP, which interferes with TNF- α -mediated JNK activation. These findings revealed that the NF- κ B and JNK signalling pathways are functionally interconnected, and that these signalling pathways interact in a complex network at several levels; activation of one pathway often depends on inactivation of another pathway, which suggested that cells

are capable of directing TNF- α -induced signals towards the appropriate response (Schwabe & Brenner 2006). These data may be the reason that no difference in JNK phosphorylation was found, as the IKK signalling pathway overrode the JNK signalling pathway.

The results demonstrated that maternal AP is associated with an increase in the plasma concentration of TNF- α in their adult offspring, although these offspring were not directly exposed to an inflammatory process. Pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α , can activate inflammatory signalling pathways that attenuate the insulin signal (Johnson & Olefsky 2013), contributing to the development of IR. The molecular mechanisms by which maternal oral inflammation can cause IR in the offspring are not yet fully understood. However, based on the present findings, it is possible that activation of inflammatory signalling pathways may be involved in IR in adult offspring of rats with AP. In addition, studies have shown that epigenetic modifications of the key genes involved in the insulin signalling pathway in skeletal muscle could result in the development of IR in adult rats subjected to overnutrition during the suckling period (Liu *et al.* 2013). Epigenetic mechanisms provide the means of regulating gene transcription that allow the foetus to adapt to a variety of conditions. Although this prepares the foetus for optimal short-term survival, it also has the potential to compromise later aspects of metabolic health (Joss-Moore *et al.* 2010). In this context, more studies are needed to investigate the molecular mechanisms involved in the association between maternal AP and IR in adult offspring.

Although studies have shown an increase in TNF- α serum concentration in parturient women with PD and premature labour compared with parturient women controls (El-Gharib *et al.* 2010), it is still too early to extrapolate the present findings to humans, since the literature is scarce in relation to studies that investigated the effects of maternal AP on offspring health, therefore this suggests the need for more studies, particularly in humans.

Considering the systemic effect of inflammatory mediators and the complexity of inflammatory signalling, it should be emphasized that impairment in the insulin signal transduction pathway, IR and increase in plasma TNF- α concentration observed in adult offspring may not be the only metabolic abnormalities associated with maternal AP, since studies have revealed the association amongst inflammation

and other systemic disorders, such as cardiovascular disease (Libby 2006), type 2 diabetes (Calle & Fernandez 2012), Alzheimer's disease and Parkinson's disease (Alam *et al.* 2016).

Conclusion

Maternal AP was associated with alterations in the development of adult offspring. These changes, including the IR, IRS-1 serine phosphorylation and IKK α / β phosphorylation, were more pronounced when there was an increase in the number of (maternal) teeth with AP. Alterations in this group (4AP-o) may have been aggravated by increased weight and accumulation of visceral adiposity. Therefore, it is important to reinforce the importance of preventing maternal AP in order to maintain the general health of offspring.

Acknowledgements

This work was supported by São Paulo Research Foundation – FAPESP (grant numbers #2014/26517-2, #2016/24829-2, #2017/01128-1, #2017/18397-5).

Conflict of interest

The authors have stated explicitly that there are no conflicts of interest in connection with this article.

References

- Aguirre V, Werner ID, Graud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF (2002) Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 1531–7.
- Alam Q, Alam MZ, Mushtaq G *et al.* (2016) Inflammatory process in Alzheimer's and Parkinson's diseases: central role of cytokines. *Current Pharmaceutical Design* **22**, 541–8.
- Bain JL, Lester SR, Henry WD, Nafel JP, Johnson RB (2009) Effects of induced periapical abscesses on rat pregnancy outcomes. *Archives of Oral Biology* **54**, 162–71.
- Bain JL, Lester SR, Henry WD, Pongetti JL, Blackman ME, Johnson RB (2013) Association between maternal periapical lesions and brain inflammation in rat pups. *Archives of Oral Biology* **58**, 266–71.
- Bonori E, Targher G, Alberiche M *et al.* (2000) 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* **23**, 57–63.
- Calle MC, Fernandez MI. (2012) Inflammation and type 2 diabetes. *Diabetes & Metabolism* **38**, 183–91.
- Carvalho CR, Brenelli SL, Silva AC, Nunes AL, Veloso LA, Saad MJ (1996) Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. *Endocrinology* **137**, 151–9.
- Chen M, Zhang L (2011) Epigenetic mechanisms in developmental programming of adult disease. *Drug Discovery Today* **16**, 1007–18.
- Figawa K, Maegawa H, Shimizu S *et al.* (2001) Protein-tyrosine phosphatase-1B negatively regulates insulin signaling in 16 myocytes and Fao hepatoma cells. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 10207–11.
- H-Gharib MN, Nassar MM, Habyary MT, Elhawary TM, Elshourbagy SH (2010) Link between periodontal diseases, inflammatory markers and preterm low birth weight infants. *Clinical Medicine Insights: Reproductive Health* **4**, 23–8.
- Ircan E, Eratalay K, Deren O *et al.* (2013) Evaluation of periodontal pathogens in amniotic fluid and the role of periodontal disease in pre-term birth and low birth weight. *Acta Odontologica Scandinavica* **71**, 553–9.
- Gao M, Zhang X, Chen X *et al.* (2014) Prenatal exposure to lipopolysaccharide results in local RAS activation in the adipose tissue of rat offspring. *PLoS One* **9**, e111376.
- Hocher B (2014) More than genes: the advanced fetal programming hypothesis. *Journal of Reproductive Immunology* **104–105**, 8–11.
- Hotamisligil GN, Spiegelman BM (1994) Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* **43**, 1271–8.
- Israel A (2010) The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. *Gold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**, a000158.
- Johnson AMF, Olefsky JM (2013) The Origins and drivers of insulin resistance. *Cell* **152**, 673–84.
- Joss-Moore LA, Metcalfe DB, Albertine KH, McKnight RA, Lane RH (2010) Epigenetics and fetal adaptation to perinatal events: diversity through fidelity. *Journal of Animal Science* **88**, E216–22.
- Kumar H, Mishra M, Bajpai S *et al.* (2013) Correlation of insulin resistance, beta cell function and insulin sensitivity with serum sFas and sFasL in newly diagnosed type 2 diabetes. *Acta Diabetologica* **50**, 511–8.
- Libby P (2006) Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *The American Journal of Clinical Nutrition* **83**, 456S–60S.
- Liu HW, Mahmood S, Srinivasan M, Smiraglia DJ, Patel MS (2013) Developmental programming in skeletal muscle in response to overnourishment in the immediate postnatal life in rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **24**, 1859–69.
- Mattera MSLC, Chiba FY, Mota MS *et al.* (2016) Maternal periodontitis decreases plasma membrane GLUT4 content

- in skeletal muscle of adult offspring. *Life Sciences* **48**, 194–200.
- Nilsson C, Larsson BM, Jennische E et al. (2001) Maternal endotoxemia results in obesity and insulin resistance in adult male offspring. *Endocrinology* **142**, 2622–30.
- Papaetis GS, Papakyriakou P, Panagiotou TN (2015) Central obesity, type 2 diabetes and insulin: exploring a pathway full of thorns. *Archives of Medical Science* **11**, 463–82.
- Plomgaard P, Bouzakri K, Krogh-Madsen R, Mittendorfer B, Zierath JR, Pedersen BK (2005) Tumor necrosis factor- α induces skeletal muscle insulin resistance in healthy human subjects via inhibition of Akt substrate 160 phosphorylation. *Diabetes* **54**, 2939–45.
- Ren H, Du M (2017) Role of maternal periodontitis in preterm birth. *Frontiers in Immunology* **8**, 139.
- Schwabe RF, Brenner DA (2006) Mechanisms of Liver Injury. I. TNF- α -induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **290**, 583–9.
- Shaw LM (2011) The insulin receptor substrate (IRS) proteins: at the intersection of metabolism and cancer. *Cell Cycle* **10**, 1750–6.
- Shirakashi DJ, Leal RP, Colombo NH et al. (2013) Maternal periodontal disease in rats decreases insulin sensitivity and insulin signaling in adult offspring. *Journal of Periodontology* **84**, 407–14.
- Siqueira FM, Costa LD, Costa JE, Haddad JP, Lana AM, Costa FO (2007) Intrauterine growth restriction, low birth weight, and preterm birth: adverse pregnancy outcomes and their association with maternal periodontitis. *Journal of Periodontology* **12**, 2266–76.
- Tak PP, Firestein GS (2001) NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *The Journal of Clinical Investigation* **107**, 7–11.
- Tang G, Minemoto Y, Dibling B et al. (2001) Inhibition of JNK activation through NF- κ B target genes. *Nature* **414**, 313–7.
- Thirone AC, Huang C, Klip A (2006) Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signaling and glucose transport. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **17**, 72–8.
- Ueki K, Kondo T, Kahn CR (2004) Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. *Molecular and Cellular Biology* **24**, 5434–46.
- Wei YL, Li XH, Zhou JZ (2007) Prenatal exposure to lipopolysaccharide results in increases in blood pressure and body weight in rats. *Acta Pharmacologica Sinica* **28**, 651–6.
- Zhang J, Gao Z, Yin J, Quon MJ, Ye J (2008) S6K directly phosphorylates IRS-1 on Ser-270 to promote insulin resistance in response to TNF- α signaling through IKK2. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 35375–82.