



BIANCA ELVIRA BELARDI

**AVALIAÇÃO DAS VIAS INSULÍNICA E INFLAMATÓRIA EM
TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO DE RATOS ADULTOS,
PROLES DE RATAS COM LESÃO ENDO-PERIODONTAL
VERDADEIRA**

Araçatuba

2022

BIANCA ELVIRA BELARDI

**AVALIAÇÃO DAS VIAS INSULÍNICA E INFLAMATÓRIA EM
TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO DE RATOS ADULTOS,
PROLES DE RATAS COM LESÃO ENDO-PERIODONTAL
VERDADEIRA**

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

Orientadora: Profa. Titular Dóris Hissako Matsushita

Coorientadora: Maria Sara de Lima Coutinho
Mattera

Araçatuba

2022

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

B426a Belardi, Bianca Elvira.
Avaliação das vias insulínica e inflamatória em tecido muscular esquelético de ratos adultos, proles de ratas com lesão endo-periodontal verdadeira / Bianca Elvira Belardi. - Araçatuba, 2022
78 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba
Orientadora: Profa. Dóris Hissako Matsushita
Coorientadora: Profa. Maria Sara de Lima Coutinho
Mattera

1. Periodontite periapical 2. Resistência à insulina
3. Doenças periodontais 4. Inflamação I. T.

CDD 612

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

DADOS CURRICULARES

Nascimento: 02.08.1995 – Araçatuba – SP

Filiação: Maria Selma de Araújo Belardi

Antônio Belardi

2016/2020: Curso de Graduação em Biomedicina pelo Centro universitário católico UniSALESIANO Araçatuba – SP.

2020/2022: 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 aos meus queridos pais, **Antônio Belardi** e **Maria Selma de Araújo Belardi** e à minha irmã, **Sabrina Pâmela Belardi**, por estarem sempre ao meu lado me apoiando e incentivando a nunca desistir dos meus sonhos.

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 Titular Doris Hissako Matsushita** pela oportunidade de ser orientada e de fazer parte do seu grupo de pesquisa desde a graduação, por sempre confiar e acreditar no meu potencial e por todos os ensinamentos transmitidos. Serei eternamente grata pela confiança depositada em mim.

Agradeço imensamente a minha família: minha Mãe **Maria Selma**, meu pai **Antônio** e minha irmã **Sabrina**, que estiveram ao meu lado em todos os momentos desta jornada e que sempre acreditaram e fizeram parte da realização dos meus sonhos.

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

Ao **Prof. Dr. Luciano Ângelo Tavares Cintra**, pelos ensinamentos e por ter cedido equipamentos necessários para realização de parte deste trabalho.

Aos amigos do laboratório de Endocrinologia, mestrandos, doutorandos e pós doutorandos: **Maria Sara de Lima Coutinho Mattera, Thais Verônica Saori Tsosura, Rodrigo Martins dos Santos, Lara Tesch Bravo e Nubia Ramos Carvalho**; e aos alunos de iniciação científica: **Ana Carolina Carnevalli, Ana Flavia Hernandez, Letícia Trabalon, Julia Ogata Santelli, Nayara Gabriely Dourado e Heloisa Macedo Sampaio**, pelos bons momentos compartilhados, pelas risadas, pela compreensão e pelo apoio que foi dado por todos vocês durante minha trajetória. Muito obrigada a todos! Foi e sempre será uma honra fazer parte dessa equipe.

À todos os professores do departamento de Ciências Básicas: **Sandra Helena Penha de Oliveira, Ana Cláudia Nakamune, Cristina Antoniali Silva, Wilson Galhego Garcia, Rita Cássica Menegati Dornelles, João Carlos Callera, Antônio Hernandes Chaves Neto, Edilson Ervolino**, por somarem seus conhecimentos durante meu aprendizado.

Aos professores membros da banca do Exame Geral de Qualificação, **Prof. Fernando Yamamoto Chiba** e **Prof.^a Titular 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, Maria Sara de Lima Coutinho Mattera, Prof.^a Associada Flávia Lombardi Lopes e Gestter willian lattari tesarin**, que prontamente aceitaram o convite.

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

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. Titular Glauco Issamu Miyahara** e **Prof. Titular Alberto Carlos Botazzo Delbem**.

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

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

Aos funcionários do Setor de Biotério, **João Batista Alves Correa e Arnaldo César dos Santos**.

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

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão da bolsa de estudos e apoio financeiro (Processo nº 2019/27662-0), o qual foi imprescindível 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.

A todos que contribuíram de alguma forma para a conclusão deste trabalho.

A todos, muito obrigada!

EPÍGRAFE

O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem!

“Guimarães Rosa”

BELARDI, B.E. AVALIAÇÃO DAS VIAS INSULÍNICA E INFLAMATÓRIA EM TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO DE RATOS ADULTOS, PROLES DE RATAS COM LESÃO ENDO-PERIODONTAL VERDADEIRA, 2022 (78) Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

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 tanto a doença periodontal (DP) quanto a periodontite apical (PA) materna em ratas promovem resistência insulínica (RI) em sua prole adulta. Entretanto, estudos que investigaram os efeitos da lesão endo-periodontal (LEP) materna sobre a saúde da prole são escassos e, nestes casos, o impacto poderia ser ainda maior. Sabe-se que a polpa e o periodonto possuem um vínculo estreito, e que estão intimamente conectados por estruturas anatômicas como o forame apical, canais acessórios e túbulos dentinários, podendo interferir na saúde um do outro. A LEP verdadeira é um processo infecto inflamatório que se estende para o tecido pulpar e periodontal simultaneamente, cada um com sua origem. Além disto, estas patologias, avaliadas de formas isoladas, estão associadas com o aumento de fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) que pode estimular quinase do inibidor kappa B (IKK) e c-Jun aminoterminal 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 na prole adulta. Nesse contexto, tornou-se fundamental investigar se a LEP verdadeira, pode promover RI de maior grau em sua prole adulta. Em vista disso, o objetivo deste estudo foram avaliar em ratas mães com LEP: 1) marcadores ósseos como a fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) e osteocalcina (OCN) no local das lesões maternas. Ademais, os objetivos deste estudo foram avaliar em ratos adultos, proles de ratas com LEP: 1) glicemia e insulinemia; 2) via insulínica; 3) vias inflamatórias no músculo gastrocnêmio (MG). Para tanto, as 28 ratas Wistar (2 meses de idade) foram distribuídas em 4 grupos: 1) ratas controle; 2) ratas com uma PA induzida no primeiro molar superior direito; 3) ratas com uma DP induzida no segundo molar superior direito; 4) ratas com LEP, no qual a DP foi induzida no segundo molar superior direito,

e a PA no primeiro molar superior direito. A PA foi induzida por meio da exposição do tecido pulpar ao meio bucal, empregando-se broca em aço carbono dotada de esfera de 0,1 mm na extremidade. A DP foi induzida por meio de ligadura com fio de seda estéril. Após 30 dias da indução das inflamações bucais, as ratas de todos os grupos foram colocadas para acasalamento com ratos saudáveis. Após o desmame, as ratas mães foram sacrificadas e foram coletadas as hemimaxilas (do lado direito) para realização do seguinte experimento: 1) avaliação de TRAP e OCN no local das lesões maternas pela técnica de imunoistoquímica. As análises estatísticas foram feitas por meio do teste de Mann-Whitney e teste *t* de student ($p < 0,05$). Quando os filhotes machos de todas as ratas completaram 75 dias de idade, realizou-se os seguintes experimentos: 1) Avaliação da massa corpórea e ingestão alimentar; 2) Avaliação da glicemia e insulinemia de jejum e do índice de HOMA-IR; 3) conteúdo total de TNF- α no MG; 4) avaliação do grau de fosforilação de IKK α/β e JNK no MG; 5) Avaliação do grau de fosforilação da pp185 (tirosina) e do IRS-1 (serina) no MG pelo método de *western blotting*. A análise estatística foi feita por análise de variância (*One way* para os experimentos dos itens 1, 2, 3 e 4; *Two way* para o item 5, acima descritos) seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As análises histológica e imunoistoquímicas do local das lesões maternas demonstraram que: 1) houve aumento do infiltrado inflamatório no grupo LEP quando comparado ao grupo DP; 2) não houve diferença neste parâmetro entre os grupos de ratas mães com PA e LEP; 3) observou-se maior padrão de imunomarcacão para OCN no grupo LEP quando comparado ao grupo PA; 4) não foram encontradas diferenças estatísticas neste parâmetro a partir da primeira semana nos grupos PDP e P-LEP e durante os 75 dias de vida nos grupos PPA e PCN; 5) Verificou-se maior imunomarcacão para TRAP no grupo LEP em comparação aos grupos PA e DP. Ademais, as análises realizadas nas proles mostraram que: 1) a DP e a LEP materna promovem baixo peso ao nascimento (BPN) de sua prole; 2) não houve BPN no grupo PPA; 3) não foram observadas diferenças estatísticas na massa corpórea e ingestão alimentar a partir da primeira semana nos grupos PDP e P-LEP e durante os 75 dias de vida nos grupos PPA e PCN; 4) os grupos PPA, PDP e P-LEP apresentaram aumento na insulinemia e RI em relação ao grupo PCN; 5) a comparação entre os grupos com inflamações orais mostrou que o grupo P-LEP apresentou uma maior insulinemia e RI quando comparado aos demais grupos; 6) inalteração na glicemia de jejum entre os grupos avaliados; 7) proles de ratas com DP e LEP apresentaram aumento no grau de fosforilação de IKK α/β no MG em

comparação a proles de ratas CN e com PA; 8) os grupos PDP e P-LEP apresentaram aumento do conteúdo de TNF- α no MG em relação aos grupos PCN e PPA; 9) os grupos PPA, PDP e P-LEP apresentaram redução da fosforilação em tirosina da pp185 quando comparados ao grupo PCN. Ademais, neste mesmo parâmetro, o grupo P-LEP apresentou redução mais acentuada em comparação aos demais grupos; 10) não houve diferença no grau de fosforilação em serina do IRS-1 entre os grupos avaliados. Estes achados mostram que a associação da PA e DP materna (LEP) promoveu alterações mais exacerbadas na imunomarcação de TRAP em relação as mães com PA ou DP, avaliadas separadamente. Paralelamente, na prole adulta resultados semelhantes foram observados no grupo P-LEP que apresentou alteração mais expressiva em RI, sinalização insulínica e vias inflamatórias em relação aos grupos PPA e PDP. Os resultados do presente estudo demonstram que a presença conjunta da PA e DP na mãe pode promover uma reabsorção mais acentuada em relação as doenças estudadas separadamente. Similarmente, as proles adultas de ratas com LEP (P-LEP) apresentam alterações sistêmicas mais expressivas em relação a proles de ratas com PA ou DP. Estes dados reforçam que a manutenção de uma boa saúde bucal materna é de suma importância para prevenir doenças locais como PA e DP que podem promover alterações sistêmicas na prole adulta, prejudicando sua saúde geral.

Palavras-chave: Periodontite periapical. Resistência à insulina. Doenças Periodontais. Inflamação.

BELARDI, B.E. EVALUATION OF MATERNAL TRUE ENDODONTIC-PERIODONTAL LESION ON INSULIN AND INFLAMMATORY PATHWAY IN ADULT OFFSPRING, (78) Dissertação (Mestrado) – School of Dentistry of Araçatuba, São Paulo State University, 2022.

ABSTRACT

Fetal programming suggests that adverse stimuli when applied during early fetal development can alter offspring metabolism, increasing the risk of disease in adulthood. Studies have shown that both maternal periodontal disease (PED) and apical periodontitis (AP) in rats promote insulin resistance (IR) in their adult offspring. However, studies investigated the effects of maternal endodontic-periodontal lesions (EPL) on offspring health are scarce and, in these cases, the impact could be even more. The pulp and periodontium are known to have a close bond, and are intimately connected by anatomical structures such as the apical foramen, accessory canals, and dentinal tubules, which may interfere with each other's health. True EPL is an inflammatory process that extends to the pulp and periodontal tissue simultaneously, each with its origin. In addition, these pathologies, evaluated in isolation, are associated with increased tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) that can stimulate I κ B kinase (IKK) and c-Jun N-terminal protein kinase (JNK), which promote phosphorylation of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) in serine residues, resulting in attenuation of the insulin signal (IS), contributing to IR in adult offspring. In this context, it has become essential to investigate if true EPL can promote more insulin resistance in its adult offspring. In view of this, the aim of this study will be to evaluate in female rats with EPL: 1) bone markers such as tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and osteocalcin (OCN) at the site of maternal injuries. Furthermore, the aims of this study were evaluated in adult rats, offspring of rats with EPL: 1) glycemia and insulinemia; 2) insulin pathways; 3) inflammatory pathways in the gastrocnemius muscle (MG). Therefore, the 28 Wistar rats (2 months old) were distributed in 4 groups: 1) control rats; 2) rats with a AP induced in the first right upper molar; 3) rats with an induced PED in the right upper second molar; 4) rats with EPL, in which PED was induced in the upper right second molar, and AP in the upper right first molar. The AP was induced by exposing the pulp tissue to the oral environment, using a carbon steel drill with a 0.1 mm sphere at the end. PED was induced by ligation with sterile silk thread. After 30 days of inducing oral inflammation, rats from all groups were placed for mating with healthy rats. After weaning, the mother rats was sacrificed and the hemimaxyls (on the right side) will be collected to perform the following experiment: 10 1) Evaluation of TRAP and OCN at the site of maternal injuries by the immunohistochemical technique. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test and Student's *t* test ($p < 0.05$). When the male offspring of all rats completed 75 days of age, the following experiments were performed: 1) Assessment of body weight and food intake; 2) glycemia, insulinemia and the HOMA-IR index; 3) total TNF- α content in MG; 4) IKK α/β and JNK phosphorylation status in MG; 5) pp185

(tyrosine) and IRS-1 (serine) phosphorylation status in MG by *western blotting* method. Statistical analysis was performed using variance analysis (One way for analysis of experiments in items 1, 2, 3 and 4; Two way for item 5, described above) followed by Tukey's test ($p < 0.05$). Histological and immunohistochemical analyzes of the site of maternal lesions showed that: 1) there was an increase in the inflammatory infiltrate in the EPL group when compared to the PED group; 2) there was no difference in this parameter between the groups of mother rats with AP and EPL; 3) a higher pattern of immunostaining for OCN was observed in the EPL group when compared to the AP group; 4) no statistical differences were found in this parameter between the groups of mother rats with EPL and PED; 5) There was greater immunostaining for TRAP in the EPL group compared to the AP and PED groups. Furthermore, the analyzes performed on the offsprings showed that: 1) maternal PED and EPL promote low birth weight (LBW) in the offspring; 2) there was no LBW in the AP-o group; 3) there were no statistical differences in body mass and food intake among the groups evaluated during the 75-day period; 4) the AP-o, PED-o and EPL-o groups showed an increase in insulinemia and IR in relation to the CN-o group; 5) the comparison among the groups with oral inflammation showed that the EPL-o group had higher insulinemia and IR when compared to the other groups; 6) unaltered fasting glucose among the evaluated groups; 7) the offspring of rats with PED and EPL showed an increase of IKK α/β phosphorylation status in MG in relation to the offspring of CN and AP rats; 8) the PED and EPL groups showed an increase in TNF- α content in the MG in relation to the CN-o and AP-o groups; 9) the AP-o, PED-o and EPL-o groups showed reduced tyrosine phosphorylation of pp185 when compared to the CN-o group. Furthermore, in this same parameter, the EPL-o group showed a more accentuated reduction in relation to the other groups; 10) there was no significant difference in IRS-1 serine phosphorylation status among the evaluated groups. The results of the present study demonstrate that the association of AP and PED promotes more pronounced changes both locally and systemically in the adult offspring. Maintaining good maternal oral health is very important to prevent local diseases such as AP and PED that can promote systemic changes in adult offspring, impairing their general health.

Keywords: Periodontal Diseases; Insulin Resistance; Apical Periodontitis; Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Indução da PA, DP e LEP. As PAs foram induzidas em ratas com o auxílio de uma broca (LN Long Neck, Dentisply Maillefer, Ballaigues- Suíça), em baixa rotação. As DPs foram induzidas com e fio de seda estéril 4-0 (Seda-Silk, Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brasil). 33
- Figura 2** Esquema representativo da metodologia utilizada no presente trabalho. 34
- Figura 3** Imagens representativas das análises histológica e imunoistoquímicas das regiões periodontal e periapical 79 dias após a indução das lesões maternas. A coloração H.E (Hematoxilina-eosina) nos grupos CN, PA e DP (a, a1; c, c1) mostra as regiões periapical e periodontal livres de infiltrado inflamatório (ampliação de 100x e 400x, respectivamente); setas indicam infiltrado de células inflamatórias. O grupo PA denota infiltrado inflamatório intenso ao redor do ápice (b, b1) e o grupo DP apresenta infiltrado inflamatório moderado no tecido gengival (d, d1). Ambos os grupos denotando ruptura do ligamento periodontal e área de reabsorção óssea (ampliação de 100x e 400x). O grupo LEP (e, e1) demonstrou intenso infiltrado inflamatório, além de extensa área de reabsorção óssea alveolar (aumento de 100x e 400x). (a2–e3). Imagens de imunohistoquímica dos grupos PA controle, PA, DP controle, DP e LEP. Expressão in situ de OCN e TRAP em ratas mães dos grupos (a2, a3) PA controle; (b2, b3) grupo PA; (c2, c3) Grupo DP controle; (d2, d3) grupo DP e (e2, e3) grupo LEP, respectivamente. 42

Figura 4 A) Massa corpórea ao nascimento dos grupos proles de ratas controle (PCN), proles de ratas com periodontite apical (PPA), proles de ratas com doença periodontal (PDP) e proles de ratas com lesão endo-periodontal verdadeira (P-LEP). B) Massa corpórea dos grupos PCN, PPA, PDP e P-LEP, avaliada semanalmente durante 75 dias. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, n = 18. * p < 0,05 PDP e P-LEP quando comparados aos grupos PCN e PPA. 46

Figura 5 Ingestão alimentar (média) dos grupos proles de ratas controle (PCN), proles de ratas com periodontite apical (PPA), proles de ratas com doença periodontal (PDP) e proles de ratas com lesão endo-periodontal verdadeira (P-LEP) avaliada a partir do desmame até os 75 dias de vida. 47

Figura 6 Avaliação do conteúdo de TNF- α e grau de fosforilação de JNK e IKK α/β no músculo gastrocnêmio de ratos adultos, proles de ratas controle (PCN), proles de ratas com periodontite apical (PPA), proles de ratas com doença periodontal (PDP) e proles de ratas com lesão endo-periodontal verdadeira (P-LEP). (A) Autoradiografias típicas: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 μ g). Utilizou-se como controle: JNK, IKK α/β e β -actina (B, C, D). O conteúdo de TNF- α e grau de fosforilação de JNK e IKK α/β (expresso em unidades arbitrárias) são apresentados como a média $\pm$ EPM, n = 8. * p<0,05 PDP em comparação aos grupos PCN, PPA e P-LEP; # p<0,05 P-LEP em comparação aos grupos PCN, PPA e PDP. 48

Figura 7 Avaliação do grau de fosforilação da pp185 em tirosina (pTyr) e serina (Ser), antes (-) e após (+) estímulo insulínico, no músculo gastrocnêmio (B e D) de proles de ratas controle (PCN), proles de ratas com PA (PPA), proles de ratas com DP (PDP), e proles de ratas com LEP (P-LEP). Em A e C, autorradiografias típicas: quantidades iguais de proteína foram analisadas (185 µg). β-actina foi usada como controle. Em B e D, os valores do grau de fosforilação em tirosina da pp185 e em serina do IRS-1 (expressos em unidades arbitrárias) são apresentados como média ± erro padrão, n = 8 animais por grupo. * p <0,05 PPA e PDP em comparação com os grupos PCN e P-LEP. # p <0,05 P-LEP em comparação com os grupos PCN, PPA e PDP.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Análises histológica e imunoistoquímicas da PA e LEP. Os escores observados para histologia em cada grupo experimental são expressos na forma de medianas e intervalos interquartis (II). A tabela também apresenta o número de células OCN e TRAP-positivas por milímetro no perímetro da lesão. Para os valores histométricos os dados são expressos em forma de média e desvio padrão. 43
- Tabela 2** Análises histológica e imunoistoquímicas da DP e LEP. Os escores observados para histologia em cada grupo experimental são expressos na forma de medianas e intervalos interquartis (II). A tabela também apresenta o número de células OCN e TRAP-positivas por milímetro no perímetro da lesão. Para os valores histométricos os dados são expressos em forma de média e desvio padrão. 44
- Tabela 3** Glicemia, insulinemia e índice HOMA-IR em proles de ratas CN (PCN) e proles de ratas com inflamações orais (PPA, PDP e P-LEP). 45

LISTA DE ABREVIATURAS

Akt /PKB: Proteína quinase B

ANOVA: Análise de Variância é um procedimento utilizado para comparar três ou mais tratamentos.

AP-1: Proteína ativadora-1

BMP-2: osterix e proteínas morfogenética óssea-2

BPN: Baixo peso ao nascimento

CN: controle

coreceptor cluster de diferenciação 14 (CD14)

DM: Diabetes Mellitus

DM1: Diabetes Mellitus tipo 1

DM2: Diabetes Mellitus tipo 2

DP: Doença periodontal

DPs: Doenças periodontais

DPs: Doenças periodontais

DTT: ditionitrosol

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA: ensaio de imunoabsorção enzimática

EPM: Erro padrão da média

FN- 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 19

IKK γ : Quinase do inibidor kappa B γ

GLUT4: transportador de Glicose tipo 4

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

IL-1 β : interleucina 1 Beta

IL-6: interleucina 6

IRS's: substratos do receptor de insulina

JNK: c-Jun N-terminal quinase

LBP: proteína ligante de LPS

LDL: lipoproteína de baixa densidade

LEP: Lesão endo-periodontal verdadeira

LEPs: Lesões endo-periodontais verdadeiras
LPS: lipopolissacarídeo bacteriano
MG: músculo gastrocnêmio
NF- κ B: Fator nuclear kappa B
OCN: Osteocalcina
PA: Periodontite apical
PAs: Periodontites apicais
PCN: Proles de ratas controle
PDP: Proles de ratas com doença periodontal
PKB: proteína quinase B
P-LEP: Proles de ratas com lesão endo-periodontal verdadeira
pp185: Substrato do receptor de insulina (IRS-1/IRS-2)
PPA: Proles de ratas com periodontite apical
RANKL: ligante do receptor ativador do fator nuclear-kappa B
RI: resistência à insulina
RUNX2: fator de transcrição relacionado com Runt 2
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
SI: Sinal insulínico
SOCS1: Supressor da sinalização de citocinas 1
SOCS3: Supressores da sinalização de citocinas 3
TAB: tecido Adiposo branco periepídidimo
TEMED: tetrametil etilenodiamina
TLR: Receptores do tipo toll
TLR4: Receptor do tipo toll 4
TNF- α : fator de necrose tumoral alfa
TRAP: fosfatase ácida resistente ao tartarato
Tris: hidroximetil aminometano
XIAP: Inibidor da apoptose ligado ao cromossomo X

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Formação e reabsorção óssea e doenças bucais (periodontite apical, doença periodontal e lesão endo-periodontal)	21
1.2 Inflamação, sinal insulínico e resistência insulínica.....	23
1.3 A relação entre: gravidez, doenças bucais, desenvolvimento fetal e doenças na idade adulta.....	27
2 OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo geral	31
2.2 Objetivos específicos	31
3 MATERIAL E MÉTODO	32
3.1 Animais.....	32
3.2 Análise histológica das regiões periapical e periodontal	35
3.2.1 Análise do infiltrado inflamatório.....	35
3.2.2 Análise Histométrica.....	35
3.3 Análise Imunoistoquímica.....	36
3.4 Coleta de sangue e tecidos	37
3.5 Determinação da glicemia e insulinemia de jejum.....	38
3.6 Avaliação da resistência insulínica.....	38
3.7 Avaliação das proteínas das vias insulínica e inflamatória.....	38
3.7.1 Preparação das amostras	38
3.7.2 “Western blotting”	39
4 RESULTADOS	41
4.1 Imagens representativas das análises histológica e imunoistoquímicas da região periodontal e periapical 79 dias após a indução das lesões maternas.....	41
4.2 avaliação da glicemia, insulinemia e índice de HOMA-IR	45

4.3 Avaliação da massa corpórea (g)	46
4.4 Ingestão alimentar	47
4.5 Avaliação das vias inflamatórias	48
4.6 Grau de fosforilação da pp185 em tirosina e em serina do IRS-1 no MG	49
5 DISCUSSÃO	50
6 RESUMO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS	58
7 CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS.....	60
.....	

1 INTRODUÇÃO

1.1 Formação e reabsorção óssea e doenças bucais (periodontite apical, doença periodontal e lesão endo-periodontal)

A Osteocalcina (OCN) é uma proteína relacionada com o processo de formação óssea. Secretada por osteoblastos maduros, esta proteína é essencial para diferenciação de osteoblastos e potencial marcador da formação óssea (BULLON *et al.*, 2007; PATTI *et al.*, 2013). A expressão de OCN ocorre sob o controle do fator de transcrição relacionado com Runt 2 (Runx2), que é o mais precoce e específico indicador de osteogênese (KIERSZENBAUM; TRES, 2012) induzindo também a expressão osteogênica de osterix e proteínas morfogenética óssea-2 (Bmp-2) (MARIA; WITT-ENDERBY, 2014; PARK *et al.* 2011). Além disso, essa proteína parece exercer efeitos regulatórios no metabolismo energético, agindo sobre os adipócitos, músculos, células β pancreáticas, e outros tecidos periféricos, aumentando a utilização da glicose, reduzindo a gordura visceral e diminuindo a quantidade de triglicerídeos (BARROS, 2011), o que compõe uma complexa rede de sinalização entre o osso e os órgãos associados com a regulação da homeostase energética, como o pâncreas e o tecido adiposo (DUCY, 2011).

Para a manutenção da qualidade óssea há necessidade de um equilíbrio entre formação e reabsorção óssea. No estudo deste processo há vários marcadores de reabsorção óssea, destacando uma das enzimas secretadas pelos osteoclastos que é a fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) refletindo o número de osteoclastos (BLUMSOHN; EASTELL, 1997; WHEATER *et al.*, 2013). Outro marcador de reabsorção é o ligante do receptor ativador do fator nuclear-kappa B (RANKL) da família do fator de necrose tumoral. RANKL é uma proteína transmembrânica expressa por osteoblastos, que se liga ao receptor ativador do fator nuclear-kB (RANK) presente na superfície de precursores de osteoclastos e de osteoclastos maduros (LACEY *et al.*, 1998; HSU *et al.*, 1999). Portanto, o processo de reabsorção óssea é desencadeado por mecanismos moleculares decorrentes das interações existentes entre essas proteínas em células precursoras de osteoclastos, que desencadeiam séries de cascatas de sinalizações intracelulares resultando na ativação de fator nuclear kappa B (NF-kB) (WADA *et al.*, 2006), um fator de transcrição

pleiotrópico que promove a expressão de vários genes responsáveis pela diferenciação de pré-osteoclastos em osteoclastos e, também, na ativação de osteoclastos maduros que, por sua vez, sintetizam vários mediadores, entre eles a TRAP (SOYSA; ALLES, 2009).

A Periodontite apical (PA) 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).

Já a etiologia da doença periodontal (DP) sugere que a infecção bacteriana seja a causa primária desta doença, decorrente da interação entre patógenos e hospedeiros (ÜSTÜN *et al.*, 2013). Os neutrófilos e os monócitos/macrófagos são células sanguíneas recrutadas para os locais de infecção, um processo mediado pela ligação a moléculas de adesão epitelial induzidas pelas citocinas TNF- α e IL-1. Quando estão no local da infecção, os neutrófilos e macrófagos reconhecem os patógenos por vários receptores e os fagocitam para destruição intracelular, como também secretam citocinas que participam tanto na eliminação de patógenos como na reparação de tecidos infectados (ABBAS, p. 42, 2009). Entre estas citocinas, destaca-se o TNF- α que pode ocasionar a ativação de osteoclastos, propiciando reabsorção óssea, bem como aumento de collagenase, favorecendo maior destruição das fibras do ligamento do periodonto, promovendo assim, uma destruição do osso e do tecido (IACOPINO, 1995; LALLA; LAMSTER; SCHMIDT, 1998; LALLA *et al.*, 2000).

A DP pode envolver a inflamação tanto dos tecidos de suporte (gingiva), quanto de sustentação (cimento, osso alveolar e ligamentos periodontais). Em adultos, o ambiente microbiano subgingival associado à cárie dentária contém principalmente bactérias anaeróbicas gram-negativas (por exemplo, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*). Sem tratamento, a DP pode levar à perda

progressiva do osso alveolar, resultando no afrouxamento e a subsequente perda de dentes. Os efeitos patogênicos da DP são causados pelos micro-organismos que aderem às superfícies do dente e pela resposta inflamatória agressiva gerada pelo organismo do hospedeiro contra esta infecção (SRINIVAS e PARRY, 2012; LASSERE *et al.*, 2018).

Diversos estudos demonstram haver relações estabelecidas entre a PA e a DP (MAZUR; MASSLER, 1964; CZARNECKI; SCHILDER, 1979; TORABINEJAD; KIGER, 1985; BERGENHOLTZ, LINDHE, 1978). A relação entre a polpa e o periodonto foi descoberta pela primeira vez por Simring e Goldberg em 1964 (SIMRING; GOLDBERG, 1964). Estes tecidos possuem uma inter-relação embrionária, anatômica e funcional. As células ectomesenquimais formam a papila e o folículo dentário, que são os precursores do periodonto e da polpa, respectivamente. Esse desenvolvimento embrionário gera conexões anatômicas permanentes entre estes tecidos (SUNITHA *et al.*, 2008).

As Lesões endo-periodontais (LEPs) são classificadas de acordo com sua patogênese: 1) quando se inicia através de um processo de expansão da destruição periodontal, chama-se de lesão periodontal primária com envolvimento endodôntico secundário; 2) quando se inicia a partir de uma lesão endodôntica, chamadas de lesão endodôntica primária com envolvimento periodontal secundário; 3) quando se desenvolve a partir de uma destruição periodontal combinada com uma lesão pulpar, promovendo a troca de produtos infecciosos de um tecido para o outro, que interferem diretamente no desenvolvimento destas patologias, chama-se lesão endo-periodontal (LEP) verdadeira ou combinada (GONÇALVES *et al.*, 2017; GAMBIN; LEAL, 2019).

Dentre as principais vias de comunicação entre a polpa e o periodonto, estão os túbulos dentinários, canais laterais, e o forame apical (SUNITHA *et al.*, 2008; GONÇALVES *et al.*, 2017). Os fatores etiológicos envolvidos na evolução das LEPs podem ser de uma natureza variada. No entanto, sabe-se que os agentes microbianos são a principal causa. A formação de placa bacteriana em superfícies radiculares após a doença periodontal, tem o potencial de induzir alterações patológicas na polpa através de canais laterais ou acessórios. Foi evidenciado que o efeito das lesões periodontais na polpa pode resultar em alterações atróficas e degenerativas, como a redução do número de células pulpares, mineralização distrófica, fibrose, formação de dentina reparadora, inflamação e reabsorção óssea. O processo inflamatório instalado

promove a formação de tecido granulomatoso no periodonto. Quando a doença periodontal se estende do sulco gengival em direção ao ápice, os produtos inflamatórios atacam os elementos do ligamento periodontal e o osso alveolar circundante (SUNITHA *et al.*, 2008).

Um estudo constatou que pacientes com periodontite moderada tinham um aumento acentuado na quantidade de fibras colágeno na polpa dentária, que pode ser devido a estímulos periodontais, pois as células do sistema imunológico liberam uma série de mediadores bioquímicos dentro do local do processo inflamatório, e desta forma, estimulam a proliferação de fibroblastos pulpares. Já em um processo de periodontite grave foi identificado a presença de uma extensa inflamação crônica dentro da polpa dental, demonstrando haver uma inter-relação bem estabelecida entre estas duas patologias (PA e DP) (CARAIVAN *et al.*, 2012).

Outros estudos evidenciaram quais os microorganismos envolvidos na etiologia da LEP (PEREIRA *et al.*, 2011; DIDILESCU *et al.*, 2012; TOKUNAGA *et al.*, 2013;). De acordo com Pereira *et al.*, (2011) pacientes diagnosticados com a doença, apresentam uma grande diversidade de bactérias anaeróbicas gram negativas como *Prevotella intermedia* em bolsas periodontais, e *Porphyromonas gingivalis* dentro dos canais radiculares. Além disso, observou-se entre a polpa e o periodonto uma colonização simultânea das bactérias *Tannerella forsythia* e *Porphyromonas endodontalis*.

1.2 Inflamação, sinal insulínico e resistência insulínica

No início do processo infeccioso, a contaminação ocorre 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), 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, eicosanoides e espécies reativas de oxigênio (KIM; SEARS, 2010).

O fator de transcrição 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 à 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).

Sabe-se que 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 de modo a evitar a hiperglicemia. A sobrecarga da função secretória das células beta do pâncreas induz a falência dessas células, ocasionando 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).

O efeito biológico da insulina é exercido por meio de sua ligação ao seu receptor específico, localizado na membrana plasmática. Este receptor 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. Já a subunidade β é uma proteína transmembrânica responsável pela transdução do SI (KAHN; WHITE, 1988). Além disso, após a ligação da insulina, esta subunidade adquire atividade quinase, tornando-se capaz de se autofosforilar e de fosforilar outros substratos em aminoácidos tirosina (KAHN, 1985; KAHN; WHITE, 1988). A ativação do receptor de insulina promove a fosforilação de vários substratos intracitoplasmáticos, como, por exemplo a pp185 (IRS-1 / IRS-2). Em 1991, um estudo realizou uma clonagem da pp185 e nomearam-na de substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) e, após três anos, observou-se que outra proteína também migrava na altura da banda da pp185, denominada IRS-2 (SUN *et al.*, 1991).

Evidências científicas demonstram que camundongos nocaute para IRS-1 apresentavam retardo no crescimento e RI, no entanto, 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 ocorre a fosforilação do IRS-1 e do IRS-2, são formados 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 Akt. Esta proteína possui três diferentes isoformas - Akt1, Akt2 e Akt3, que estão localizadas nos cromossomos 14q32, 19q13 e 1q44, respectivamente. Sua ativação ocorre por meio da fosforilação em treonina e serina (BELLACOSA *et al.*, 1998) e embora sejam codificadas por genes diferentes e em cromossomos distintos, possuem 80% de homologia em suas sequências e compartilham uma estrutura de domínio comum, o que contribui para a variabilidade de funções desempenhadas pela Akt (MEDHA, CHINMOY, 2021).

A Akt que medeia as ações da insulina participando ativamente de sua via de sinalização e que possui um papel de suma importância no processo de captação de glicose por meio da estimulação da translocação do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) (WHITEMAN *et al.*, 2002). Este transportador de glicose (GLUT4) é predominantemente expresso em adipócitos e células musculares cardíacas e esqueléticas e tem como função promover a captação de glicose insulino-mediada (MACHADO; SCHAAN; SERAPHIM, 2006; LEHNEN *et al.*, 2010).

Estudos apontam que citocinas pró inflamatórias como TNF- α podem comprometer o SI por diminuir a fosforilação do IRS-1 em resíduos de tirosina sendo este evento essencial para que o efeito biológico final esperado por essa via de sinalização seja alcançado (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). Tem sido estabelecido na literatura uma relação entre obesidade e inflamação crônica. Estudos tem demonstrado que o TNF- α foi superexpresso no tecido adiposo de camundongos obesos (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1993). Ademais, outros estudos demonstram que esta citocina também tem sua expressão aumentada nos tecidos

adiposo e muscular de humanos obesos e que sua administração exógena promove RI (KROGH-MADSEN *et al.*, 2006).

1.3 A relação entre: gravidez, doenças bucais, desenvolvimento fetal e doenças na idade adulta

Está bem estabelecido na literatura que a saúde materna está diretamente relacionada a alterações nas vias de desenvolvimento durante o crescimento pré-natal, levando a adaptações fetais que podem promover alterações no metabolismo pós-natal e contribuir para o desenvolvimento de doenças na vida adulta da prole. Este fenômeno denomina-se programação fetal (BARKER 1995; GODFREY *et al.*, 2001; FERNANDEZ *et al.*, 2020).

Durante a gestação, 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). Somado a isto, ocorre um aumento da susceptibilidade a doenças bucais como cárie dentária, gengivite e DP (KANDAN; MENAGA; KUMAR, 2011) fato que ocorre em decorrência de vários fatores, tais como mudanças na dieta, hiperacidez do meio bucal devido a vômitos, alterações hormonais, que associadas à desatenção na manutenção da higiene bucal favorecem a instalação destas patologias bucais (MELO *et al.*, 2007). Apesar destas implicações, 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 é considerado o período ideal e mais seguro para realização do tratamento odontológico (POLETTTO *et al.*, 2008; KANDAN; MENAGA; KUMAR, 2011). Ainda assim, observa-se um grande receio e despreparo que constituem um dos principais motivos que levam os cirurgiões-dentistas a se recusarem a prestar assistência odontológica às gestantes (MOIMAZ *et al.*, 2007; GARBIN *et al.*, 2011). Estudos evidenciam que a postergação do atendimento odontológico para o puerpério tardio pode ocasionar um dano maior, pois acaba aumentando o risco de desenvolvimento de doenças bucais (SEBASTIANI *et al.*, 2010).

Evidências científicas mostram 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). Ercan e colaboradores (2013) detectaram a presença de patógenos que fazem parte da patogenia da DP, como *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter rectus*, *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.

Outros estudos 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, verificou-se que a DP pode resultar na ativação de vias intracelulares capazes de afetar o curso e o desfecho da gravidez (STARZYŃSKA *et al.*, 2022). Adicionalmente, 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 (LANGLEY-EVANS; McMULLEN, 2010; CALKINS; DEVASKAR, 2011).

Sabe-se que 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 uma série de 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 dessas respostas adaptativas podem ser localizados em órgãos e tecidos específicos, que servirão para modificar a fisiologia e o metabolismo e, portanto, as funções dos tecidos.

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 ficou evidenciado que filhos de mulheres expostas à escassez alimentar durante o

início do período gestacional (ocasionada pela diminuição de oferta calórica) apresentaram maior incidência de obesidade aos dezenove anos. Adicionado a isto, 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 citado anteriormente, estudos têm demonstrado que a inflamação bucal materna, como a DP, também pode promover impactos negativos à saúde da prole (SHIRAKASHI *et al.*, 2013; MATTERA *et al.*, 2016). Entretanto, a literatura mostra-se escassa em relação a estudos que investigaram os efeitos da PA 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).

Recentemente, Tsosura *et al.*, (2019) demonstraram que a indução de PA materna em ratas promoveu em sua prole adulta: 1) RI; 2) comprometimento das etapas iniciais da sinalização insulínica; 3) aumenta as concentrações plasmáticas de insulina e TNF- α ; 4) aumenta o grau fosforilação de IKK α / β no MG e no TABp. (TSOSURA *et al.*, 2019). Outro estudo, evidenciou que a DP materna promove resistência insulínica, aumento nas concentrações plasmáticas de TNF- α , redução do conteúdo de GLUT4, do seu índice de translocação para membrana plasmática e sua expressão no músculo gastrocnêmio de sua prole adulta (MATTERA *et al.*, 2016). Ademais, a doença periodontal materna foi capaz de ativar vias inflamatórias na prole adulta, esta ativação foi comprovada pelo aumento da expressão de TNF- α , NF-

κ Bp65, NF- κ Bp50, ERK1/2 e IKK α/β (MATTERA *et al.*, 2019). Porém não houve nenhuma alteração na metilação de DNA do gene do GLUT4 e na expressão de JNK na prole adulta (MATTERA *et al.*, 2019).

Assim como a DP e a PA, o desenvolvimento e a patogênese da LEP também podem ser afetados por doenças sistêmicas, ou o contrário. A partir disto, um ensaio clínico foi realizado para verificar a interferência do Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) em pacientes com LEP, e evidenciaram que o DM2 contribui para um prognóstico ruim no tratamento de pacientes com LEP. Evidências sugerem que isto ocorre devido ao prejuízo causado pelo diabetes à circulação sanguínea e ao aumento da susceptibilidade a infecções. (DHOUM *et al.*, 2018).

Até o presente momento, não existe na literatura trabalhos que avaliaram o efeito da LEP 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 tecido muscular de ratos adultos, proles de ratas com LEP, pois alterações nas etapas da via de sinalização insulínica podem ocasionar RI, uma das principais características do DM2. Nossa hipótese é de que a presença conjunta da PA e DP na mãe possa promover maiores alterações sistêmicas e locais nas proles do que essas duas doenças bucais avaliadas separadamente. Ademais, conforme mencionado anteriormente, sabe-se que a ativação de vias inflamatórias pode contribuir com o desenvolvimento da RI, tornando de suma importância investigar se LEP materna promove resultados adversos ao nascimento e aumenta a atividade das proteínas inflamatórias no músculo esquelético de sua prole adulta. Os resultados desse estudo poderão contribuir para um melhor entendimento de como inflamações bucais maternas podem causar desordens sistêmicas, prejudicando a saúde geral da prole.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Primeiramente, avaliar a reabsorção óssea alveolar em ratas mães com LEP e, em seguida, verificar os efeitos da LEP materna em ratas sobre sensibilidade à insulina, expressão de TNF- α , vias insulínica e inflamatórias na sua prole adulta.

2.2 Objetivos específicos

Verificar em ratas mães com LEP:

- Marcadores ósseos como a fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) e Osteocalcina (OCN) no local das lesões maternas.

Verificar em ratos adultos, proles de ratas com LEP:

- Glicemia e insulinemia de jejum;
- Sensibilidade à insulina (HOMA-IR);
- Grau de fosforilação em tirosina da pp185 (IRS-1 / IRS-2), após estímulo insulínico, no músculo gastrocnêmio (MG);
- Grau de fosforilação em serina do IRS-1, após estímulo insulínico, no MG;
- Grau de fosforilação de JNK no MG;
- Grau de fosforilação de IKK α / β no MG;
- Conteúdo total de TNF- α em MG.

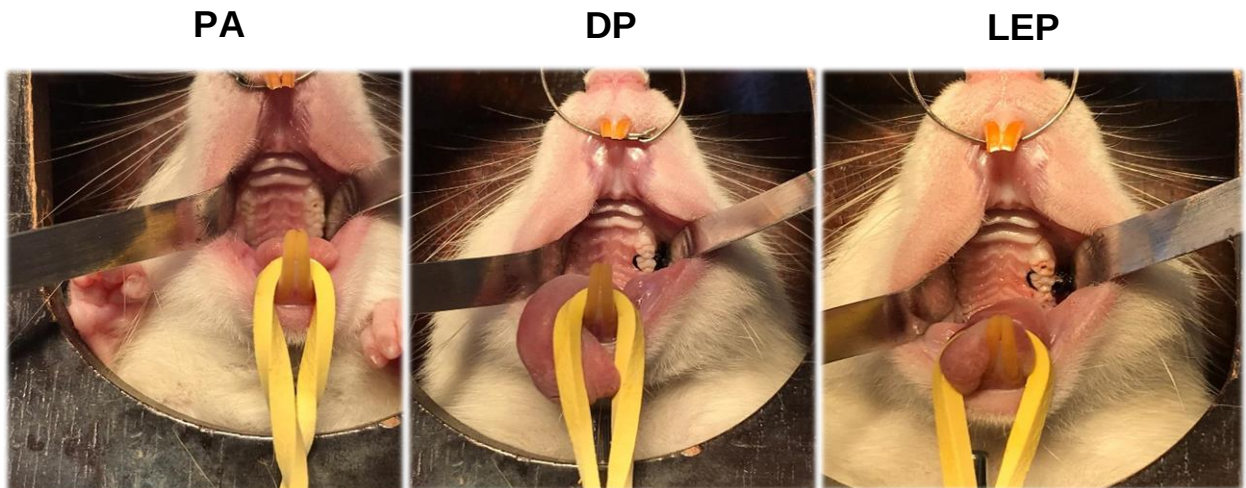
3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Animais

No presente estudo foram utilizados 28 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 quatro grupos ($n = 7$): 1) ratas controle (grupo CN); 2) ratas com PA induzida no primeiro molar superior direito (grupo PA); 3) ratas com DP induzida no segundo molar superior direito (grupo DP); 4) ratas com DP induzida no segundo molar superior direito, e PA induzida no primeiro molar superior direito (grupo LEP).

As PAs 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. 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 PAs. Ademais, a DP foi induzida por meio de ligadura com fio de seda estéril 4-0 (Seda-Silk, Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brasil) ao redor dos segundos molares superiores direitos.

Figura 1 - Indução da PA, DP e LEP. As PAs foram induzidas em ratas com o auxílio de uma broca (LN Long Neck, Dentisply Maillefer, Ballaigues- Suíça), em baixa rotação. As DPs foram induzidas com e fio de seda estéril 4-0 (Seda-Silk, Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brasil).



Fonte: do autor

Após 30 dias de exposição pulpar e da colocação da ligadura, as ratas de todos os grupos foram colocadas para acasalamento com ratos saudáveis. A confirmação da copulação foi realizada pela colpocitologia, observando a presença de espermatozoides no esfregaço vaginal.

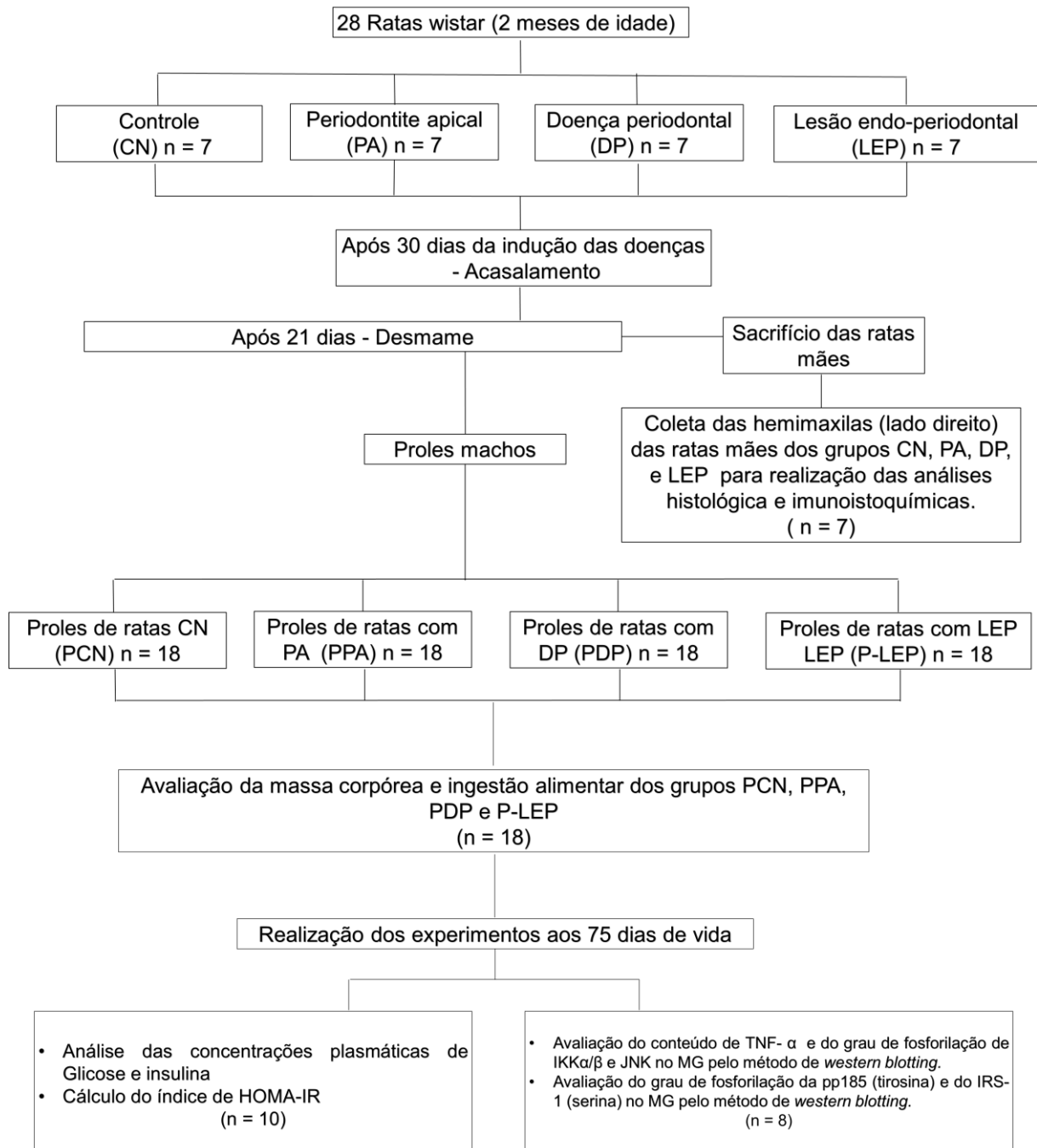
As ratas prenhas foram separadas em caixas individuais e após o nascimento, a ninhada foi distribuída em quatro grupos: 1) proles de ratas controle (PCN); 2) proles de ratas com PA (PPA); 3) proles de ratas com DP (PDP) e 4) proles de ratas com LEP (P-LEP). O número de filhotes foi ajustado para 6 por 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 de todas as ratas completarem 75 dias de idade, os experimentos foram realizados.

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



Fonte: do autor

3.2 Análise histológica das regiões periapical e periodontal

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 hemi-maxilas direitas foram retiradas e colocadas em cassetes histológicos de 34 plásticos devidamente identificados. Em seguida, foram imediatamente embebidas em formaldeído 4%, deixadas nesta solução por 24 horas e depois lavadas em água corrente por 12 horas. Após a fixação, foram desmineralizadas em solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 10% por aproximadamente 3 meses. Posteriormente, as peças foram lavadas em água corrente por 24 horas, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina.

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

3.2.1 Análise do infiltrado inflamatório

A intensidade do infiltrado inflamatório foi determinada da seguinte forma: ausente (0 a poucas células inflamatórias: ESCORE 1), leve (<25 células inflamatórias ESCORE 2), moderado (25-125 células inflamatórias: ESCORE 3) ou Intenso (>125 células inflamatórias: ESCORE 4).

3.2.2 Análise Histométrica

Para as análises histométricas foram utilizadas as mesmas imagens da análise histológica do infiltrado inflamatório. Para as PAs a área de perda óssea alveolar foi medida em cinco cortes seriados da região da furca considerando a área entre a crista óssea e a superfície do cimento. Já para as DPs a análise histométrica foi calculada a perda do osso alveolar (POA) e a perda de inserção epitelial (PIE) na face distal do segundo molar. Utilizou-se um sistema de análise de imagem (Axiovision 4.8.2; Carl Zeiss MicroImaging GmbH, 07740 Jena, Alemanha). Essas

áreas foram medidas três vezes em dias diferentes pelo mesmo examinador cego para reduzir as variações em nossas datas.

3.3 Análise Imunoistoquímica

As Hemimaxilas maternas (do lado direito) foram removidas e fixadas em Formalina tamponada 10% por 72 horas, lavadas em água corrente por 12 horas e colocadas em uma solução de ácido dietilaminotetracético (EDTA) tamponado 10% (Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA) até que estarem descalcificadas sendo incluídas em parafina. Foram obtidos cortes longitudinais contendo 5 µm de espessura, estendidas em lâminas silanizadas (StarFrost® Polycat Knittel). Sete cortes foram realizados na região de furca para as análises imunoistoquímica. Para a análise imunoistoquímica os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol (100° - 100° - 100° - 90° - 70° GL). A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão citrato (Spring Bioscience, Pleasanton, CA, EUA), em câmara pressurizada (Decloaking chamber®, Biocare Medical, Concord, CA, EUA) a 95°C, por 20 minutos. No final de cada etapa da reação imunoistoquímica, as lâminas histológicas foram lavadas em PBS 0,1 M, pH 7,4. Posteriormente, as lâminas foram imersas em 3% de peróxido de hidrogênio por 1 hora e 1% de soro albumina 13 bovino por 12 horas para bloqueio da peroxidase endógena e bloqueio dos sítios inespecíficos, respectivamente. As lâminas contendo amostras de cada grupo experimental foram divididas em dois lotes, e cada lote foi incubado com um dos seguintes anticorpos primários: anti-OCN do rato gerado em cabra (SC-18319, Santa Cruz Biotechnology®) e anti-TRAP do rato gerado em cabra (SC-30833, Santa Cruz Biotechnology®). Os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado por 2 horas e subsequentemente tratados com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte - HRP por 1 hora (Universal Dako Labeled HRP StreptavidinBiotin Kit®, Dako Laboratories, CA, EUA). A revelação foi realizada utilizando como cromógeno o 3,3'-tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit®, Dako Laboratories, CA, EUA). A contracoloração foi realizada com Hematoxilina de Harris, e em seguida a desidratação em etanol, diafanização em xilol e, recobrimento com meio de montagem (Permount, Fisher Scientific, San Diego, CA, USA) e lamínulas de vidro. Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização do anticorpo primário. A análise

imunoistoquímica foi realizada por um histologista certificado e cego aos tratamentos realizados (EE). Para a DP, a região de interesse foi o centro da área de furca e o limite coronário desta área será a crista óssea alveolar. Já para a PA, a região de interesse foi o periápice dentário. Realizou-se uma análise semi-quantitativa utilizando-se de umas secções histológicas de cada animal, no aumento original de 200x. Ao padrão de imunomarcção foi atribuído um escore. O critério adotado para o estabelecimento dos escores foi baseado e modificados daqueles estabelecidos por Faria et al. (2008), onde: ESCORE 0 = ausência de imunomarcção; ESCORE 1 = baixo padrão de imunomarcção; ESCORE 2 = moderado padrão de imunomarcção; ESCORE 3 = alto padrão de imunomarcção. Ademais, realizou-se uma análise quantitativa, na qual foi feita a contagem de células OCN e TRAP-positivas por milímetro no perímetro da lesão.

3.4 Coleta de sangue e tecidos

Os ratos proles controle (PCN), proles PA (PPA), proles DP (PDP) e proles LEP (P-LEP) foram submetidos a jejum de 14 horas antes dos procedimentos experimentais. Estes animais foram anestesiados com tiopental sódico (Thiopentax® - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, Brasil, 3%, 5mg/ 100g p.c., i.p.) 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. Sob anestesia, foi coletado sangue pela veia cava inferior. As amostras de sangue foram transferidas para tubos de plástico heparinizados e mantidas a 4°C até a centrifugação a 800g (4°C, 15 minutos). O plasma obtido foi armazenado a -80°C até o dia da quantificação das concentrações plasmáticas de glicose e insulina (n=10).

Outro grupo de ratos PCN, PPA, PDP e P-LEP (n = 8 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), 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. Salientamos que para

avaliar o grau de fosforilação de IKK α / β , JNK e conteúdo total de TNF- α no MG 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.

3.5 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.

3.6 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: $\text{HOMA - IR} = \text{glicemia de jejum (mmol/L)} \times \text{insulinemia de jejum } (\mu\text{UI/mL}) / 22,5$ (BONORA et al., 2000).

3.7 Avaliação das proteínas das vias insulínica e inflamatória

3.7.1 Preparação das amostras

Imediatamente após a extração, o tecido muscular foi homogeneizado 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 consiste 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. Será 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 os anticorpos anti JNK, anti p-JNK, anti IKK- α/β , anti p-IKK- α/β , anti-TNF- α 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).

3.6 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. As análises histológicas e imunoistoquímicas foram feitas por meio do teste *t* de student e pelo teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney. O programa estatístico utilizado foi o Graph Pad Prism Versão 7.0. O nível de significância adotado foi de 5% (alfa=5%).

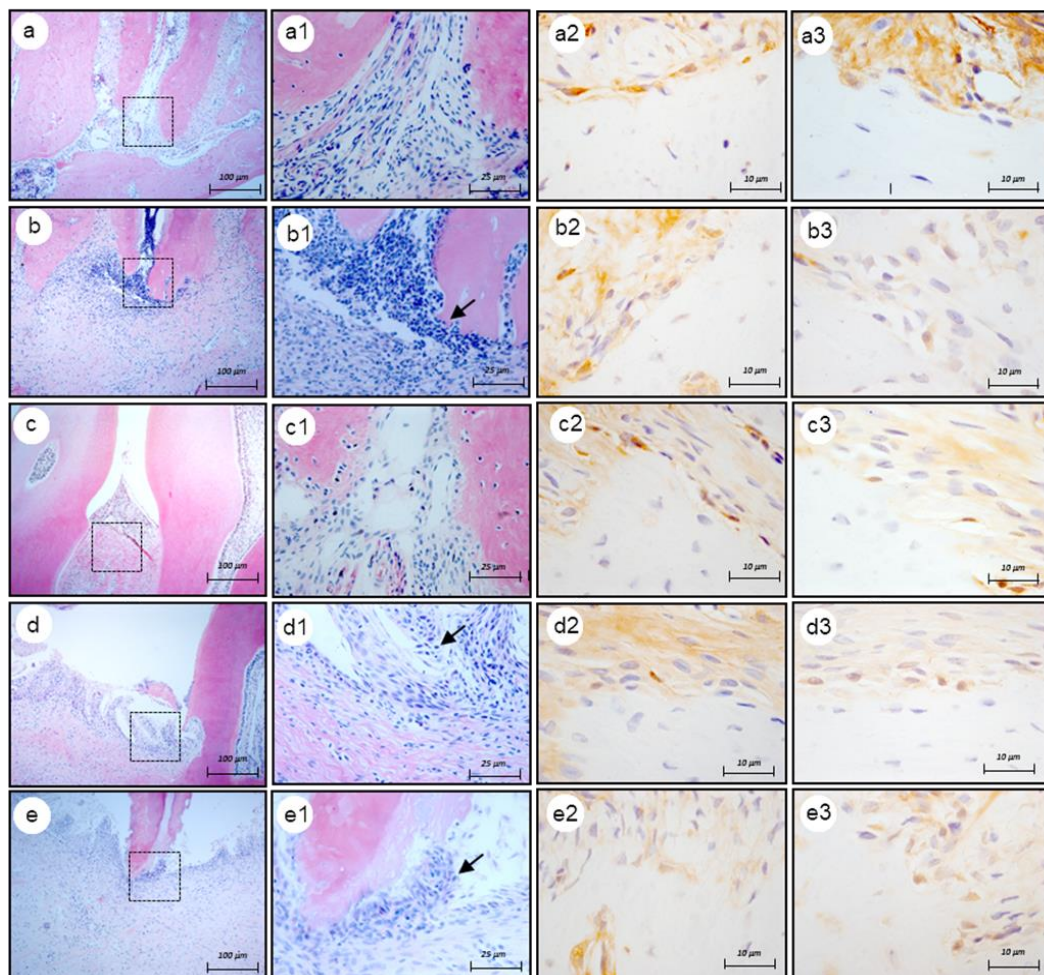
4 RESULTADOS

4.1 Imagens representativas das análises histológica e imunoistoquímicas da região periodontal e periapical 79 dias após a indução das lesões maternas.

As imagens representativas das análises histológicas mostram os ápices dentários e os tecidos periodontais do grupo CN (a, a1, c, c1) com características compatíveis com a normalidade. No grupo PA (b, b1) observou-se infiltrado de células inflamatórias na área ao redor do ápice e reabsorção dentária. O grupo DP apresenta grave comprometimento da integridade e estrutura do epitélio juncional e sulcular, além de moderado infiltrado de células inflamatórias nos tecidos periodontais. Por fim, o grupo LEP (e, e1) demonstra intenso infiltrado de células inflamatórias ao redor do ápice, além de extensa área de reabsorção óssea alveolar. Estes achados comprovam que a indução destas inflamações orais (PA, DP e LEP) foi efetiva e que os processos inflamatórios foram devidamente instalados.

As imagens representativas de imunoistoquímica mostram a expressão in situ de OCN e TRAP em ratas mães com PA (OCN - c2; TRAP - c3) DP (OCN – d2; TRAP – d3) e LEP (OCN – e2; TRAP – e3). A técnica imunoistoquímica empregada para a detecção de OCN e TRAP mostrou alta especificidade na detecção de tais proteínas, a qual foi comprovada pela ausência total de marcação no controle negativo da reação. As células imunorreativas apresentaram uma coloração marrom escura confinada exclusivamente ao citoplasma, no caso de TRAP, e confinada ao citoplasma e em menor escala à matriz extracelular, no caso de OCN.

Figura 3 - Imagens representativas das análises histológica e imunoistoquímicas das regiões periodontal e periapical 79 dias após a indução das lesões maternas. A coloração H.E (Hematoxilina-eosina) nos grupos controle–CN, com periodontite apical-PA e com doença periodontal-DP (a, a1; c, c1) mostra as regiões periapical e periodontal livres de infiltrado inflamatório (ampliação de 100x e 400x, respectivamente); setas indicam infiltrado de células inflamatórias. O grupo PA denota infiltrado inflamatório intenso ao redor do ápice (b, b1) e o grupo DP apresenta infiltrado inflamatório moderado no tecido gengival (d, d1). Ambos os grupos denotando ruptura do ligamento periodontal e área de reabsorção óssea (ampliação de 100x e 400x). O grupo LEP (e, e1) demonstrou intenso infiltrado inflamatório, além de extensa área de reabsorção óssea alveolar (aumento de 100x e 400x). (a2–e3). Imagens de imunoistoquímica dos grupos PA controle, PA, DP controle, DP e LEP. Expressão in situ de OCN e TRAP em ratas mães dos grupos (a2, a3) PA controle; (b2, b3) grupo PA; (c2, c3) Grupo DP controle; (d2, d3) grupo DP e (e2, e3) grupo LEP, respectivamente.



Fonte: do autor

4.1.1 Análise histológica e imunoistoquímicas da Periodontite Apical (PA), Doença Periodontal (DP) e Lesão endo-periodontal verdadeira (LEP)

As tabelas a seguir mostram as análises histológicas e imunoistoquímicas do local das lesões maternas. A análise do infiltrado inflamatório demonstrou que não houve diferença neste parâmetro entre os grupos de ratas mães com PA e LEP (Tabela 1). Entretanto, o grupo LEP apresentou aumento neste parâmetro quando comparado ao grupo de ratas mães com DP (Tabela 2). A análise histométrica mostrou maiores áreas de reabsorção óssea no grupo LEP em comparação ao grupo de ratas com PA (Tabela 1) e DP (Tabela 2). De acordo com as análises imunoistoquímicas, não houve diferença estatística nos padrões de imunomarcacão de OCN entre os grupos LEP e DP (Tabela 2). Entretanto, o grupo LEP apresentou aumento neste parâmetro quando comparado ao grupo de ratas com PA (Tabela 1). Ademais, houve maior imunomarcacão para TRAP no grupo LEP em comparação aos grupos PA (Tabela 1) e DP (Tabela 2).

Tabela 1 – Análises histológica e imunoistoquímicas da PA e LEP. Os escores observados para histologia em cada grupo experimental são expressos na forma de medianas e intervalos interquartis (II). A tabela também apresenta o número de células OCN e TRAP-positivas por milímetro no perímetro da lesão. Para os valores histométricos da reabsorção, os dados são expressos em forma de média e desvio padrão.

Critérios histológicos	Grupos experimentais			Análises estatísticas
	CN	PA	LEP	
Infiltrado inflamatório (mediana (IR))	1 (1-1)	3 (2-4)	4 (3-4)	Teste Mann-Whitney <i>U</i> P = .083
Imunomarcacão (média ± DSP)				Teste <i>t</i> student
OCN	25.34 ± 1.01	9.11 ± 2.09	11.31 ± 1.91*	P = .045
TRAP	5.99 ± 0.86	18.12 ± 2.12	31.74 ± 2.96*	P < .001
Análise histométrica (média ± DSP)	12.06 ± 8.18	82.07 ± 12.61	172.36 ± 66.61*	Teste <i>t</i> student P = .002

CN, controle; PA, periodontite apical; LEP, lesão endo-perio; OCN, osteocalcina; TRAP, fosfatase ácida resistente ao tartarato. * p < 0,05 LEP comparado ao grupo PA.

Tabela 2 Análises histológica e imunoistoquímicas da DP e LEP. Os escores observados para histologia em cada grupo experimental são expressos na forma de medianas e intervalos interquartis (II). A tabela também apresenta o número de células OCN e TRAP-positivas por milímetro no perímetro da lesão. Para os valores histométricos os dados são expressos em forma de média e desvio padrão.

Critérios histológicos	Grupos experimentais			Análises estatísticas
	CN	DP	LEP	
Infiltrado inflamatório (mediana (IR))	1 (1-1)	3 (2-4)	4 (3-4)*	Mann-Whitney U test P = .028
Imunomarcacão (média ± DSP)				Student t test
OCN	25.34 ± 1.01	11.12 ± 1.78	11.31 ± 1.91	P = .833
TRAP	5.99 ± 0.86	19.28 ± 3,12	31.75 ± 2.96*	P < .001
Análise histométrica (média ± DSP)	4.28 ± 9.7	13.58 ± 15.5	172.36 ± 66.61*	Student t test P < .001

CN, controle; DP, doença periodontal; LEP, lesão endo-perio; OCN, osteocalcina; TRAP, fosfatase ácida resistente ao tartarato. * p <0,05 LEP comparado ao grupo DP.

4.2 avaliação da glicemia, insulinemia e índice de HOMA-IR

Não houve diferença estatisticamente significativa na glicemia de jejum entre os grupos avaliados. No entanto, houve aumento nas concentrações plasmáticas de insulina e no índice de HOMA-IR nos grupos PPA, PDP e P-LEP em comparação ao grupo PCN. Além disso, o grupo P-LEP apresentou aumento significativo na insulinemia e no índice de HOMA-IR em comparação aos grupos PPA e PDP; entretanto, não foram observadas diferenças estatísticas nestes parâmetros entre os grupos os dois últimos grupos (Tabela 3).

Tabela 3 - Glicemia, insulinemia e índice HOMA-IR em proles de ratas CN (PCN) e proles de ratas com inflamações orais (PPA, PDP e P-LEP).

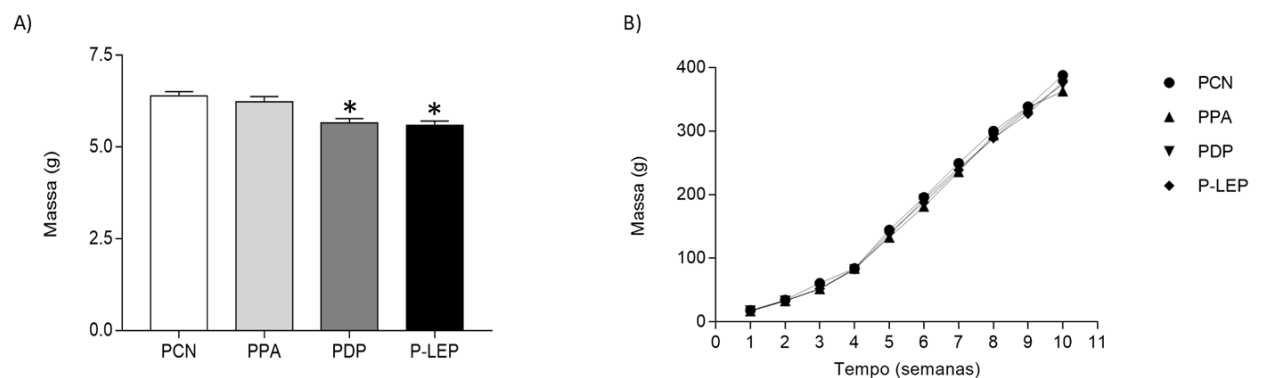
Parâmetros	PCN	PPA	PDP	P-LEP
Glicemia (mmol/L)	9,369 ± 0,27	9,569 ± 0,24	9,424 ± 0,39	9,655 ± 0,30
Insulinemia (μIU/mL)	8,519 ± 0,68	14,63 ± 1,38 *	14,91 ± 1,50 *	26,41 ± 1,40 #
HOMA-IR	3,114 ± 0,23	6,231 ± 0,61 *	6,222 ± 0,65 *	13,49 ± 1,40 #

Os valores são apresentados como média ± erro padrão (n = 10 por grupo). * p < 0,05 PPA e PDP comparados aos grupos PCN e P-LEP. # p < 0,05 P-LEP comparado aos grupos PCN, PPA e PDP.

4.3 Avaliação da massa corpórea (g)

Os resultados da massa corpórea dos grupos proles de ratas controle (PCN), proles de ratas com periodontite apical (PPA), proles de ratas com doença periodontal (PDP) e proles de ratas com lesão endo-periodontal verdadeira (P-LEP) foram avaliados semanalmente, desde o nascimento até 75 dias de idade. Os grupos PDP e P-LEP apresentaram baixo peso ao nascimento em relação aos grupos PCN e PPA. Entretanto, não houve diferença estatística nesse parâmetro entre os grupos PCN e PPA (Figura 4A). Adicionalmente, não houve diferença estatística na massa corpórea entre os grupos até os 75 dias (Figura 4B).

Figura 4 – A) Massa corpórea ao nascimento dos grupos proles de ratas controle (PCN), proles de ratas com periodontite apical (PPA), proles de ratas com doença periodontal (PDP) e proles de ratas com lesão endo-periodontal verdadeira (P-LEP). B) Massa corpórea dos grupos PCN, PPA, PDP e P-LEP, avaliada semanalmente durante 75 dias. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, n = 18. * p < 0,05 PDP e P-LEP quando comparados aos grupos PCN e PPA.

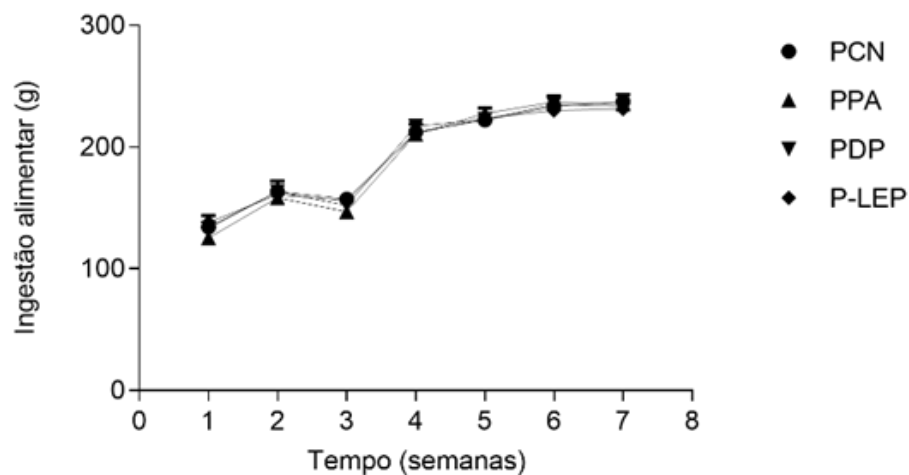


Fonte: do autor

4.4 Ingestão alimentar

A Figura 5 mostra a ingestão alimentar dos grupos PCN, PPA, PDP e P-LEP avaliada a partir do desmame até o final do experimento. Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa neste parâmetro a partir da primeira semana nos grupos PDP e P-LEP e durante os 75 dias de vida nos grupos PPA e PCN.

Figura 5 – Ingestão alimentar (média) dos grupos proles de ratas controle (PCN), proles de ratas com periodontite apical (PPA), proles de ratas com doença periodontal (PDP) e proles de ratas com lesão endo-periodontal verdadeira (P-LEP) avaliada a partir do desmame

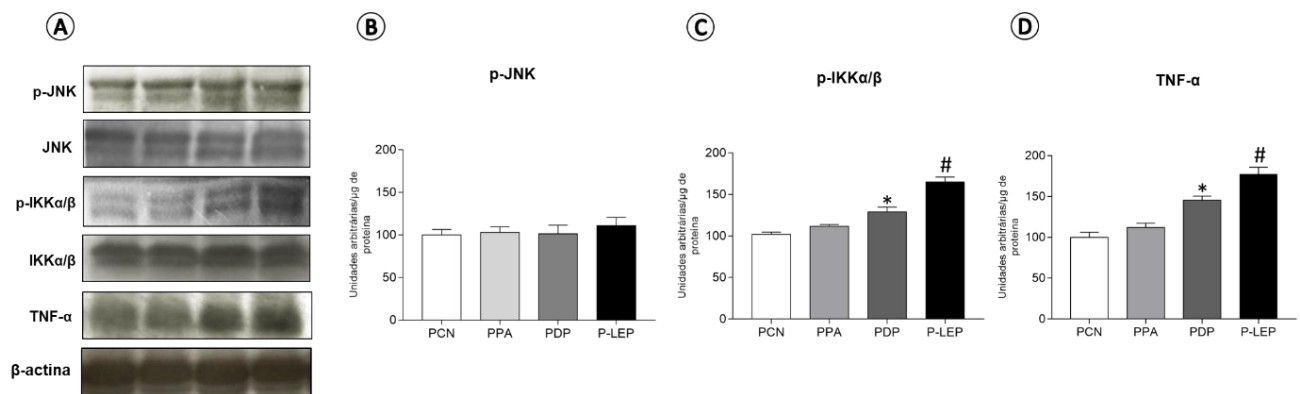


Fonte: do autor

4.5 Avaliação das vias inflamatórias

A Figura 6A mostra autorradiografias típicas referente ao conteúdo de TNF- α e grau de fosforilação de JNK e IKK α/β em tecido muscular dos grupos PCN, PPA, PDP e P-LEP. As Figuras 6B, C e D mostram os resultados, expressos em unidades arbitrárias por μg de proteína amostrada. O conteúdo de TNF- α (Figura 6A e D) e o grau de fosforilação de IKK α/β (Figura 6A e C) no MG foram significativamente maiores nos grupos PDP e P-LEP em comparação aos grupos PCN e PPA. Em relação a estes dois últimos grupos não houve diferença significativa entre eles nesta avaliação. Ademais, não foram observadas diferenças no grau de fosforilação da JNK entre os grupos no MG (Figura 6A e B).

Figura 6 – Avaliação do conteúdo de TNF- α e grau de fosforilação de JNK e IKK α/β no músculo gastrocnêmio de ratos adultos, proles de ratas controle (PCN), proles de ratas com periodontite apical (PPA), proles de ratas com doença periodontal (PDP) e proles de ratas com lesão endo-periodontal verdadeira (P-LEP). (A) Autorradiografias típicas: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 μg). Utilizou-se como controle: JNK, IKK α/β e β -actina (B, C, D). O conteúdo de TNF- α e grau de fosforilação de JNK e IKK α/β (expresso em unidades arbitrárias) são apresentados como a média $\pm$ EPM, $n = 8$. * $p < 0,05$ PDP em comparação aos grupos PCN, PPA e P-LEP; # $p < 0,05$ P-LEP em comparação aos grupos PCN, PPA e PDP.

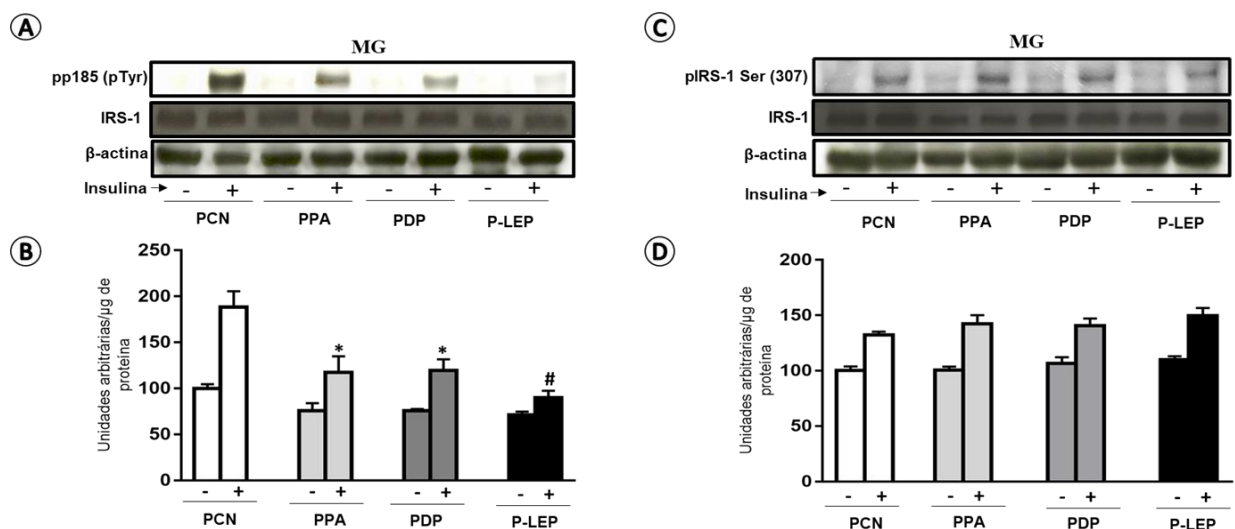


Fonte: do autor

4.6 Grau de fosforilação da pp185 em tirosina e em serina do IRS-1 no MG

Após estímulo insulínico, houve uma redução significativa no grau de fosforilação da pp185 em tirosina nos grupos PPA, PDP e P-LEP quando comparados ao grupo PCN (Figura 7B). Adicionalmente, verificou-se redução neste parâmetro no grupo P-LEP quando comparado a todos os outros grupos. Entretanto, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos PPA e PDP (Figura 7D). Adicionado a isto, não houve diferença significativa no grau de fosforilação em serina do IRS-1 entre os grupos avaliados.

Figura 7 – Avaliação do grau de fosforilação da pp185 em tirosina (pTyr) e serina (Ser), antes (-) e após (+) estímulo insulínico, no músculo gastrocnêmio (B e D) de proles de ratas controle (PCN), proles de ratas com PA (PPA), proles de ratas com DP (PDP), e proles de ratas com LEP (P-LEP). Em A e C, autorradiografias típicas: quantidades iguais de proteína foram analisadas (185 µg). β -actina foi usada como controle. Em B e D, os valores do grau de fosforilação em tirosina da pp185 e em serina do IRS-1 (expressos em unidades arbitrárias) são apresentados como média $\pm$ erro padrão, n = 8 animais por grupo. * p < 0,05 PPA e PDP em comparação com os grupos PCN e P-LEP. # p < 0,05 P-LEP em comparação com os grupos PCN, PPA e PDP.



Fonte: do autor

5 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo nas mães demonstraram que: 1) houve maior padrão de imunomarcção para OCN no grupo com LEP quando comparado ao grupo com PA; 2) não foram encontradas diferenças estatísticas neste parâmetro entre os grupos de ratas mães com LEP e DP; 3) verificou-se maior imunomarcção para TRAP no grupo LEP em comparação aos grupos PA e DP. Ademais, as análises realizadas nas proles mostraram que: 1) apenas a DP e LEP materna estão associadas ao BPN; 2) inflamações orais maternas (PA, DP e LEP) promovem aumento da insulinemia, RI e prejudicam o SI; 3) aumento no conteúdo de TNF- α e no grau de fosforilação de IKK α/β no MG somente nos grupos PDP e P-LEP. Além disso, proles de ratas com LEP apresentaram alterações mais acentuadas (RI, SI e ativação de vias inflamatórias) quando comparada à prole de ratas com PA ou DP.

A remodelação óssea é um processo complexo realizado por meio de atividades coordenadas entre osteoblastos e osteoclastos. A interação entre estas células garantem um equilíbrio adequado entre ganho e perda óssea (LEMAIRE *et al.*, 2004). Sabe-se que este fenômeno é conhecido como o acoplamento, sendo mantido em longo prazo por meio de um sistema de controle que inclui hormônios, fatores físicos e fatores humorais locais. Em condições inflamatórias, o equilíbrio entre a reabsorção e a formação se altera, resultando em perda óssea líquida (XIAO *et al.*, 2016). Estudos tem demonstrado que a DP não apenas estimula a osteoclastogênese, mas também interfere no desacoplamento da formação e reabsorção óssea, sendo este, um mecanismo patológico desencadeado pela reação imuno-inflamatória que resultando em perda óssea (GRAVES *et al.*, 2011). No presente estudo, na comparação entre as mães com ou sem inflamações orais observamos que: houve aumento na imunomarcção de OCN no grupo LEP em comparação ao grupo PA. Entretanto, não houve diferença neste parâmetro entre os grupos com LEP e DP. O aumento deste marcador de atividade osteoblástica (OCN) no grupo LEP em relação ao grupo PA a princípio é paradoxal, mas podemos sugerir que a exacerbação do processo inflamatório vista em LEP pode ter induzido um aumento da formação óssea para tentar compensar a extensa reabsorção resultante desta doença inflamatória.

Tanto as lesões de origem endodôntica quanto as doenças periodontais envolvem uma resposta do hospedeiro a bactérias e, conseqüentemente, a formação

de lesões osteolíticas (GRAVES *et al.*, 2011). As imagens histológicas e imunoistoquímicas (Figura 3) demonstraram que as induções das doenças inflamatórias foram efetivas e conforme esperado a LEP apresentou maiores áreas de reabsorção óssea e maior imunomarcacão para TRAP em comparação com a PA (Tabela 1) e a DP (Tabela 2). Existem modelos de indução de doença periodontal nos quais, além da realização da ligadura, realiza-se a inoculação de *Porphyromonas gingivalis*. Um estudo demonstrou que este modelo de indução com inoculação bacteriana também é efetivo, contudo, produz menor perda óssea se comparado ao modelo no qual se insere apenas a ligadura (MEULMAN *et al.*, 2011). Já está bem estabelecido na literatura que na DP há aumento de mediadores inflamatórios, como o TNF- α (COLOMBO *et al.*, 2012; PÉREZ *et al.*, 2011; KARA *et al.*, 2013), que acentua o processo inflamatório causando danos nos tecidos do periodonto. Ainda, destacam-se outros estudos que observaram em animais com DP uma reabsorção óssea alveolar acentuada em relação ao CN (ARABACI *et al.*, 2015; COLOMBO *et al.*, 2012; MATTERA *et al.*, 2016; RICOLDI *et al.*, 2017). Ademais, diferentes modelos experimentais de doenças orais inflamatórias tem apontado que citocinas como o TNF- α causam osteoclastogênese. Mucci *et al.*, (2012) verificaram em um estudo *in vitro*, utilizando modelo químico da doença de Gaucher, que a infusão de TNF α promoveu osteoclastogênese. Outros estudos demonstram ainda, que os níveis de IL-6 (Interleucina 6) estão relacionados com uma maior reabsorção óssea junto aos tecidos periapicais frente a infecções (AZUMA *et al.*, 2014) e que, na sua ausência, outras citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 e o TNF- α também podem induzir a reabsorção óssea nos tecidos periapicais (AZUMA *et al.*, 2014; DELGADO *et al.*, 2011). De acordo com esses dados, podemos inferir que a LEP apresentou maior padrão de imunomarcacão para TRAP em comparação aos grupos PA e DP, devido exacerbação da inflamação causada pela presença destes dois processos inflamatórios concomitantes (PA e DP).

Como descrito anteriormente, observou-se que a DP e a LEP materna promoveram BPN de sua prole (Figura 4). Estes resultados estão de acordo com estudos que evidenciaram que DP materna promove BPN (GUIMARÃES *et al.* 2012; MANNEM & CHAVA, 2011; MATTERA *et al.* 2016; MATTERA, *et al.* 2019). Estudos epidemiológicos relatam uma relação entre BPN e alta predisposição à hipertensão arterial, dislipidemia e diabetes na idade adulta. Esta relação pode ser explicada pelo

mecanismo conhecido como programação fetal no qual estímulos ambientais no útero afetam o crescimento fetal e a saúde não só durante a gestação, mas também durante a vida adulta (BARKER, 1995).

Diversos estudos demonstram que o microbioma placentário se assemelha e está mais relacionado com o microbioma oral (AAGAARD *et al.*, 2014; PRINCE *et al.*, 2014). Durante a infecção periodontal, os títulos bacterianos orais aumentam excessivamente, acompanhados de inflamação gengival e sangramento. Estas condições aumentam a bacteremia e a possibilidade de transmissão hematogênica (FARDINI *et al.*, 2010). De acordo com Aizawa *et al.*, 2018, o mecanismo direto responsável por desfechos gestacionais adversos relacionados a periodontite é a translocação de patógenos ou componentes de patógenos periodontais por meio da circulação sistêmica até a unidade feto-placentária. Outro mecanismo observado é a produção local ou disseminação sistêmica de mediadores inflamatórios que atingem a unidade feto-placentária, gerando uma série de alterações prejudiciais ao ambiente fetal (AIZAWA *et al.*, 2018).

Segundo Southerland *et al.*, 2005, a infecção por *Campylobacter rectus* (uma bactéria presente na periodontite) em ratos induz uma redução no tamanho do labirinto placentário. E modificações na estrutura do labirinto placentário podem promover um suprimento insuficiente para o feto e, conseqüentemente, um crescimento prejudicado e BPN (MADIANOS *et al.*, 2013). Como observado acima, os grupos PDP e P-LEP apresentaram BPN, no entanto, a partir da primeira semana de vida, não houve diferença significativa no peso corpóreo. Este resultado está de acordo com o fenômeno conhecido como “catch-up grown”. Este fenômeno sugere que crianças submetidas a um período transiente de inibição de crescimento, desenvolvem um mecanismo de aceleração do mesmo, atingindo peso e/ou altura semelhante ao de crianças com peso e altura normais ao nascer (BOERSMA & WIT, 1997). Além disso, o “catch-up grown” em humanos, tem sido associado ao aumento da suscetibilidade à obesidade e diabetes tipo 2 (CAMERON *et al.* 2002; JIMENEZ-CHILLARON *et al.* 2006). Por fim, foi evidenciado que infecções subcutâneas localizadas por *Porphyromonas gingivalis* (um patógeno periodontal) em hamsters podem reduzir o peso fetal em até 25% (COLLINS *et al.*, 1994).

Evidências científicas demonstram que patógenos periodontais como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Campylobacter rectus* também

estão presentes na patogenia da LEP (DIDILESCU *et al.*, 2012; PEERAN *et al.*, 2013). Os achados citados acima sobre a relação destas bactérias com desfechos gestacionais adversos podem justificar porque a LEP verdadeira materna também foi capaz de promover BPN na sua prole. Podemos inferir que os mecanismos responsáveis por estas alterações podem ser os mesmos que estão sendo estudados no caso da DP materna.

Estudos têm demonstrado que a PA materna está associada a complicações gestacionais como pré-eclâmpsia (KHALIGHINEJAD *et al.*, 2017), parto pré-termo e BPN (LEAL *et al.*, 2015; HARJUNMA *et al.*, 2015). Entretanto, no presente estudo não foi verificada diferença na massa corpórea ao nascimento no grupo PPA (Figura 4A). Estes dados estão de acordo com o estudo de Tsosura *et al.*, 2019, no qual também não foi verificado diferença estatística na massa corpórea ao nascimento em proles de ratas com PA.

A avaliação da ativação de vias inflamatórias demonstrou que houve um aumento do conteúdo total de TNF- α (Figura 6D) no tecido muscular esquelético dos grupos PDP e P-LEP verdadeira em relação aos grupos PCN e PPA, complementando os estudos de Mattera *et al.* (2016 e 2019). Entretanto, não houve diferença neste parâmetro entre os grupos PCN e PPA. Estes resultados estão de acordo com os dados de Tsosura *et al.* (2021) que demonstraram que o grupo PPA não apresentou aumento da expressão desta citocina no músculo esquelético em relação ao grupo PCN.

Ao avaliarmos o grau de fosforilação da proteína IKK α/β , os grupos P-LEP e PDP apresentaram aumento do grau de fosforilação da proteína IKK α/β em relação aos grupos PCN e PPA. Ademais, o grupo P-LEP apresentou aumento significativo no grau de fosforilação da proteína IKK α/β em comparação aos demais grupos (PCN, PPA e PDP). No entanto, não houve diferença no grau de fosforilação da proteína JNK entre os grupos (Figura 6A). O TNF- α é uma citocina capaz de ativar vias intracelulares da JNK, ERK1/2 e do I κ B kinase β /fator nuclear κ B (IKK β /NF- κ B) (PLOMGAARD *et al.*, 2005; SHOELSON; LEE; GOLDFINE, 2006; PABON *et al.*, 2019). No músculo esquelético, a ativação do IKK β aumenta a atividade de NF- κ B e este gene, por sua vez, é capaz de inibir a expressão de GLUT4 (RAYCHAUDHURI *et al.*, 2008). O NF- κ B pode ser ativado por vias como: a via não-canônica e a via canônica. A via alternativa ou não-canônica é ativada por meio da fosforilação da quinase NIK (NF-

κBinding kinase), que promove a ativação do complexo IKK e a translocação dos dímeros do NF-κB para o núcleo (SRIVASTAVA; RAMANA, 2009). Esta via é ativada por um grupo mais restrito de citocinas. Na via clássica ou canônica, a ligação do ligante específico ao receptor promove a ativação do complexo quinase IκB (IKK), que contém a ação das subunidades catalíticas quinases (IKKα e IKKβ) e a subunidade reguladora (NEMO/IKKγ) que conduz à fosforilação de IκB. Esta fosforilação promove o desligamento desta molécula e NF-κB, promovendo a degradação do IκB e a translocação dos dímeros do NF-κB (p50 e p65) para o núcleo, ocasionando o aumento da transcrição de citocinas inflamatórias (SRIVASTAVA; RAMANA, 2009). Proteínas como IKK e JNK inibem a ação da insulina por meio da fosforilação em serina do IRS1 (SCHENK *et al.*, 2008).

O NF-κB também tem um papel importante bloqueando a apoptose por meio da sua regulação positiva de moléculas anti-apoptóticas, incluindo XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein), cFLIP (FLICE-like inhibitory protein) e outras (SCHWABE; BRENNER, 2006). Como mencionado anteriormente, não houve diferença no grau de fosforilação de JNK entre os grupos avaliados no MG. Diversos estudos demonstram que o IKK modula negativamente a atividade de JNK. Estudos tem demonstrado que isso ocorre por meio da indução de genes alvo de NF-κB que codificam proteínas, como o inibidor 56 da apoptose ligado ao cromossomo X (XIAP), que interfere com a ativação da JNK mediada pelo TNF-α. Esses achados demonstram que as vias de sinalização NF-κB e JNK estão funcionalmente interconectadas (TANG *et al.*, 2001; SCHWABE, BRENNER, 2006) e estes dados podem explicar 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.

Recentemente, vários estudos destacaram o papel fundamental da via IKK/NF-κB na indução e manutenção do estado de inflamação subjacente às doenças metabólicas (ARKAN *et al.*, 2005; BISHWOKARMA *et al.*, 2019). A sinalização IKK-NF-κB tem sido descrita como um potencial mecanismo que pode modular respostas inflamatórias e contribuir para o desenvolvimento de RI (RICARDO *et al.*, 2021).

Sabe-se que a presença constante de citocinas inflamatórias como o TNF-α induzem uma inflamação crônica de baixo grau que interfere na transdução do SI (MANCUSI *et al.*, 2020). 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). Diversos estudos têm demonstrado potenciais mecanismos que podem explicar os efeitos prejudiciais do TNF- α sobre a sinalização insulínica: 1) supressão da atividade do receptor de insulina-tirosina quinase; 2) diminuição da fosforilação do IRS-1 em tirosina (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1994; PERALDI; XU; SPIEGELMAN, 1997); 3) redução da fosforilação da Akt em serina/treonina; 5) prejuízo na translocação de GLUT4 para a membrana plasmática (NIETOVAZQUEZ *et al.*, 2007). Adicionado a isto, sabe-se que proteínas como IKK e JNK podem inibir a ação da insulina por meio da fosforilação em serina do IRS-1 (SCHENK *et al.*, 2008; HAYDEN; GHOSH, 2014; SHOELSON; LEE; GOLDFINE, 2006).

Neste estudo, os grupos PPA, PDP e P-LEP 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 grupo P-LEP apresentou aumento significativo na insulinemia de jejum e nos valores do índice de HOMA-IR quando comparado a todos os demais grupos. No entanto, não houve diferença na glicemia de jejum entre todos os grupos avaliados (Tabela 3). Estes resultados estão de acordo com a teoria “fetal salvage”, a qual está relacionada ao BPN e sugere que o feto desnutrido desenvolve resistência à insulina periférica, por meio de uma redistribuição de nutrientes, tais como a glicose, a favor de órgãos essenciais, como o cérebro, levando a redução permanente da função ou do número de transportador de glicose do músculo esquelético (HOFMAN *et al.*, 1997; CIANFARANI; GERMANI; BRANCA, 1999). Podemos inferir que este seja um dos mecanismos responsáveis pelo aumento da insulinemia e do índice de HOMA-IR nos grupos PDP e P-LEP. Sabe-se que em consequência da diminuição da sensibilidade periférica à insulina há um estímulo nas células β para produzir quantidades maiores de insulina para atingir a glicemia normal, e se isso persistir por muito tempo pode levar a eventual esgotamento de células β (HOFMAN *et al.*, 1997; CIANFARANI; GERMANI; BRANCA, 1999). A normoglicemia observada nos grupos PPA, PDP e P-LEP pode ser resultante do aumento compensatório na secreção de insulina pelas células beta, o que pode manter este parâmetro dentro da normalidade. Outro mecanismo que pode ser responsável por esse aumento da RI pode ser decorrente do aumento da ativação da via do IKK/NF-

kB com consequente incremento na expressão de TNF- α . Vários estudos demonstraram uma relação positiva entre ativação da via IKK/NF-kB, TNF- α e resistência à insulina (SHOELSON; LEE; GOLDFINE, 2006; YE, 2009).

Estudos realizados anteriormente por Shirakashi *et al.* (2013) e Mattera *et al.* (2016) relatam dados semelhantes, em que ratos adultos, proles de ratas com DP apresentaram RI. Outro estudo realizado por Tsosura *et al.* (2019) demonstrou que proles de ratas com PA apresentaram parâmetros bioquímicos semelhantes, e consequentemente, RI na vida adulta. Evidências científicas mostram que a RI de forma contínua 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 resistência à insulina também desempenha um papel fundamental na patogênese e progressão de danos a órgãos-alvo induzidos por hipertensão, como hipertrofia ventricular esquerda, aterosclerose e doença renal crônica. Juntas, essas anormalidades contribuem significativamente para o aumento do risco de desenvolver diabetes tipo 2 (MANCUSI *et al.*, 2020).

A avaliação da etapa inicial da sinalização insulínica no MG, demonstrou que houve uma redução no grau de fosforilação em tirosina da pp185 (após estímulo insulínico) nos grupos PPA, PDP e P-LEP quando comparados ao grupo PCN. Ademais, o grupo P-LEP apresentou redução significativa neste parâmetro em comparação a todos os demais grupos (PCN, PPA e PDP). Entretanto, não houve diferença significativa no grau de fosforilação em serina do IRS-1 (após estímulo insulínico) entre os grupos avaliados. Shirakashi *et al.* (2013) e Mattera *et al.*, (2016) realizaram um estudo semelhante em modelo experimental de DP materna e verificou-se que proles adultas destas ratas tiveram redução no grau de fosforilação em tirosina da pp185 (após estímulo insulínico) no MG e TABp. Outro estudo, desta vez realizado em modelo experimental de PA materna, demonstrou que a proles adultas destas ratas tiveram redução no grau de fosforilação em tirosina da pp185 (após estímulo insulínico) no MG e TABp. No entanto, não foi verificada diferença significativa no grau de fosforilação em serina do IRS-1 no MG (TSOSURA *et al.*, 2019). Estes dados corroboram os resultados do presente estudo e reforçam a associação entre inflamações orais maternas e prejuízos a sinalização insulínica na vida adulta da prole. Tem sido estabelecido na literatura uma associação entre aumento de citocinas

inflamatórias e o desenvolvimento de RI (BLASCO-BAQUE *et al.*, 2017; HUANG *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2020). Essa diminuição do sinal insulínico pode ser decorrente do aumento da ativação da via IKK/NF- κ B e expressão de TNF- α devido ao processo inflamatório como descrito acima.

Conforme citado anteriormente, não houve diferença significativa no grau de fosforilação em serina do IRS-1 (após estímulo insulínico) entre os grupos avaliados, demonstrando que a diminuição no SI observada nos grupos PPA, PDP e P-LEP no MG não está relacionada com este parâmetro. 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). Nossos achados estão de acordo com estudos que evidenciaram que proles adultas de ratas com PA ou DP apresentaram redução no grau de fosforilação em tirosina da pp185 e nenhuma alteração no grau de fosforilação em serina do IRS-1 no MG (TSOSURA *et al.*, 2019; SHIRAKASHI *et al.*, 2013).

Os mecanismos pelos quais a associação da PA e DP (LEP) podem causar alterações sistêmicas na prole ainda não foram completamente elucidados. Entretanto, com base em nossos achados, é possível afirmar que a ativação de vias inflamatórias e aumento da expressão de TNF- α no tecido muscular possam estar envolvidos na RI em ratos adultos, proles de ratas com LEP verdadeira. Ademais, os resultados do presente estudo reforçam que a associação entre inflamações orais maternas (PA e DP) promove alterações sistêmicas mais pronunciadas na idade adulta de suas proles.

6 RESUMO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS

A associação entre a PA e a DP (LEP) em ratas promoveu:

- Aumento da imunomarcacão para TRAP no local das lesões maternas em comparacão a ratas com PA ou DP.

Ademais, a LEP materna promoveu em sua prole:

- Baixo peso ao nascimento;
- Inalteracão na massa corpórea e ingestão alimentar ao longo dos 75 dias de vida.
- Aumento nas concentrações plasmáticas de insulina;
- Nenhuma alteracão na glicemia de jejum;
- Diminuiçãõ da sensibilidade à insulina;
- Aumento no grau de fosforilaçãõ de IKK α / β no MG;
- Nenhuma alteracão no grau de fosforilaçãõ de JNK no MG;
- Diminuiçãõ no grau de fosforilaçãõ em tirosina da pp185 (após estímulo insulínico) no MG;
- Nenhuma alteracão no grau de fosforilaçãõ em serina do IRS-1 (após estímulo insulínico) no MG.

7 CONCLUSÃO

Os dados das análises realizadas nas mães demonstram que a associação da PA e DP pode promover uma reabsorção mais acentuada em relação às doenças estudadas separadamente. Avaliando-se a prole, foi constatado que apenas a DP e LEP materna promoveram BPN. Adicionalmente, a presença conjunta da PA e DP (LEP) na mãe promove alterações mais exacerbadas na idade adulta de suas proles, como maior grau de ativação de vias inflamatórias, RI e diminuição da sinalização insulínica em relação aos resultados obtidos das proles de mães com PA ou DP. Estes dados demonstram que manter uma saúde bucal materna adequada é essencial para prevenir doenças e garantir uma boa saúde geral da prole.

REFERÊNCIAS

- A. C. DIDILESCU, A.C.; RUSU, D.; ANGHEL A.; NICA, L.; ILIESCU, A.; GREABU, M.; BANCESCU, G.; STRATUL, S.I. Investigation of six selected bacterial species in endo-periodontal lesions. **Internacional endodontic jornal**. v. 45 n. 3 p. 282-293 mar 2012.
- Aagaard K.; Ma, J.; Antony K.M.; Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. **Sci Transl Med** 2014; 6: 237ra65.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. Imunologia celular e molecular. 6. ed Rio de Janeiro, **Elsevier**, 2009.
- 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.
- AIZAWA, S.K.; HAYAKAWA, S. Periodontal diseases and adverse pregnancy outcomes. **J. Obstet. Gynaecol. Res**, 2018.
- ARABACI, T.; et al. Therapeutic Effects of Melatonin on Alveolar Bone Resorption After Experimental Periodontitis in Rats: A Biochemical and Immunohistochemical Study. **Journal of periodontology**, v. 86, p. 874-881, 2015.
- ARAKI, E. et al. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. **Nature**, v. 372, n. 6502, p. 186-190, 1994.
- ARKAN, M.C. et al. IKK- β links inflammation to obesity-induced insulin resistance. **Nature Medicine**, v. 11, p. 191–198, 2005.
- 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.
- AZUMA, M.M.; et al. The role of IL-6 on apical periodontitis: a systematic review. **International endodontic jornal**, v. 47, p. 615-621, 2014.
- BARKER, D. J. Fetal origins of coronary heart disease. **BMJ**, v. 311, n. 6998, p. 171-174, 1995.
- BARROS, J.M. O osso como órgão endócrino. **Porto**, Maio, 2011.
- 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.

BERGENHOLTZ, G.; LINDHE, J. Effect of experimentally induced marginal periodontitis and periodontal scaling on the dental pulp. **J. Clin. Periodontol.** v.5, n.1, p. 59-73. Feb. 1978.

BING, C. Is interleukin-1 β a culprit in macrophage-adipocyte crosstalk in obesity?. **Adipocyte**, v. 4, n. 2, p. 149-152, 2015.

BISHWOKARMA, B. 2019. IKK/NF- κ B-regulated Inflammatory Pathway in Human Adipocytes: Implication in Subsequent Contribution to Insulin Resistance and Atherosclerosis. **Master's thesis**. Harvard Extension School.

BLASCO-BAQUE, V.; GARIDOU, L.; POMIÉ, C.; ET, AL. Periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis* drives periodontal microbiota dysbiosis and insulin resistance via an impaired adaptive immune response. **Gut**, v. 66, p. 872-885, 2017.

BLUMSOHN, A.; EASTELL, R. The performance and utility of biochemical markers of bone turnover: do we know enough to use them in clinical practice? **Am Clin Biochem.** v. 34, p. 449-459, 1997.

BOERSMA, B.; WIT, J.M. Catch-up Growth. **Endocrine Reviews**, v. 18, p. 646–661, 1997.

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.

BULLON, P.; CHANDLER, L.; SEGURA EGEA, J. J.; PEREZ CANO, R.; MARTINEZ SAHUQUILLO, A. Osteocalcin in serum, saliva and gingival crevicular fluid: their relation with periodontal treatment outcome in postmenopausal women. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.** V.12 p.193-7, 2007.

CALKINS, K.; DEVASKAR, S. U. Fetal Origins of Adult Disease. **Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care**, v. 41, n. 6, p.158-176, 2011.

CAMERON, N.; DEMERATH, E.W. Critical periods in human growth and their relationship to diseases of aging. **Am. J. Hum. Biol.**, v. 119, p. 159-184, 2002.

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.

CARAIVAN O, MANOELA H, CORLAN P, FRONIE A, BUNGET A, MOGOANTAS L. Microscopic aspects of pulpal changes in patients with chronic marginal periodontitis. **Rom J Morphol Embryol** v.53 p.725-729. 2012.

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

COLLINS, J. G. et al. Effects of a *Porphyromonas gingivalis* infection on inflammatory mediator response and pregnancy outcome in hamsters. **Infect. Immun.**, v. 62, n. 10, p. 4356-4361, Oct. 1994.

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

CZARNEKI, R. T.; SCHILDER, H. A histological evaluation of the human pulp in teeth with varying degrees of periodontal disease. **Journal of endodontics**, v. 5, n. 8, p.242-253, 1979.

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.

DELGADO, Ronan Jacques Rezende. Envolvimento de sinais coestimulatórios na periodontite apical crônica em humanos. 2011. Tese (Doutorado em Endodontia) - Faculdade de Odontologia de Bauru, **University of São Paulo, Bauru**, 2011. doi:10.11606/T.25.2011.tde-14122011-092305. Acesso em: 2022-03-06.

DHOUM S, LASLAMI K, ROUGGANI F, OUZZANI A.E., JABRI M. Endo-Perio Lesion and Uncontrolled Diabetes. **Case Rep Dent**. v.7 p. 478. 2018.

DIDILESCU, A.C. et al. Investigation of six selected bacterial species in endo-periodontal lesions. **International Endodontic Journal**, 45, 282–293, 2012.

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.

DUCY, P. The role of osteocalcin in the endocrine cross-talk between bone remodelling and energy metabolism. **Diabetologia**. v.54, p. 54:1291-1297, 2011.

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.

FARDINI et al., Transmission of Diverse Oral Bacteria to Murine Placenta: Evidence for the Oral Microbiome as a Potential Source of Intrauterine Infection. **Journal of reproductive immunology**, v. 104-105, p. 12-19, 2014

FERNANDEZ, J.M.; OCHOA, J.J.; FRIAS, M.L. CASTRO, J.D. Impact of Early Nutrition, Physical Activity and Sleep on the Fetal Programming of Disease in the Pregnancy: A Narrative Review. **Nutrients** 2020; 12:3900.

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

GAMBIN, D.J.; LEAL, O.L. Diagnóstico e prognóstico de lesões endo-periodontais: uma revisão de literatura. **Braz J Periodontol** . v. 29 n. 1. 2019.

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.

GODFREY, K.M.; BARKER, D.J. Fetal programming and adult health. **Public Health Nutr** 2001; 4:611-624

GONÇALVES, M.C.; MALIZIA, C.; ROCHA, L.E.M.D. Lesões endodôntico-periodontais: do diagnóstico ao tratamento. **Braz J Periodontol**. v. 27 n. 1 2017.

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

GRAVES, D.T.; OATES, T.; GUSTAVO, P. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions, **Journal of Oral Microbiology**, v.3, 2011.]

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

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 - an obesity-induced insulin resistance. **Science**, v. 271, n. 5249, p. 665-658, 1996.

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

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

HSU, H. *et al.* Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc. Natl. Acad. Science*, v. 96, p.3540-3545, 1999.

HUANG, X.; YANG, Z. Resistin's, obesity and insulin resistance: the continuing disconnect between rodents and humans. **J Endocrinol Invest.**, v. 39, p. 607–615, 2016.

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

ISRAËL, A. The IKK complex, a central regulator of NF- κ B activation. *Cold. Spring Harb. Perspect. Biol.*, v. 2, p. 000158, 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.

JIMENEZ-CHILLARON, J.C. *et al.* Reductions in caloric intake and early postnatal growth prevent glucose intolerance and obesity associated with low birthweight. **Diabetologia**, v. 49, p. 1974–1984, 2006.

JUGE-AUBRY, C. E. *et al.* Regulatory effects of interleukin (IL)-1, interferon- β , 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.; WHITE, M. F. The insulin receptor and the molecular mechanism of insulin action. **J. Clin. Invest.**, v. 82, n. 4, p. 1151-1156, 1988.

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.

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.

KARA, A. *et al.*, Immune modulatory and antioxidant effects of melatonin in experimental periodontitis in rats. **Journal of periodontology**, v. 55, p. 21-26, 2013.

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.

KIERSZENBAUM, A.L.; TRES, L.L. *Histologia e Biologia Celular – Uma Introdução à Patologia*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier Inc. cap. 4, p. 140, 2012.

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

KOHN, A. D.; TAKEUCHI, F.; ROTH, R. A. Akt, a pleckstrin homology domain containing kinase, is activated primarily by phosphorylation. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 21920-6, 1996.

KROGH-MADSEN, R.; PLOMGAARD, P.; MOLLER, K.; MITTENDORFER, B.; PEDERSEN, B.K.; Influence of tn α and il-6 infusions on insulin sensitivity and expression of IL-18 in humans. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 291, p. 108–114, 2006.

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

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.

LACEY, D. L. *et al.* Osteoprotegerin Ligand Is a Cytokine that Regulates Osteoclast Differentiation and Activation. **Cell.**, v. 93, p. 165-176, 1998.

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-1 β induces insulin resistance in murine and human adipocytes. **Diabetologia**, v. 49, n. 9, p. 2162-2173, 2006.

LALLA, E. *et al.* Blockade of RAGE suppresses periodontitis-associated bone loss in diabetic mice. **J. Clin. Invest.**, v. 105, n. 8, p. 1117-1124, Apr. 2000.

LALLA, E.; LAMSTER, I. B.; SCHMIDT, A. M. Enhanced interaction of advanced glycation end products with their cellular receptor RAGE: implications for the

pathogenesis of accelerated periodontal disease in diabetes. *Ann. Periodontol.*, v. 3, n. 1, p. 13-19, Jul. 1998.

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.

LASSERRE, J.F.; BRECX, M.C.; TOMA, S. Oral Microbes, Biofilms and Their Role in Periodontal and Peri-Implant Diseases. *Materials (Basel)*. v. 22,p.1802, 2018.

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.

LEMAIRE, V.; TOBIN, F.L.; GRELLER, C.R.C.L.J.S; Modeling the interactions between osteoblast and osteoclast activities in bone remodeling, *Journal of Theoretical Biology*, v. 229, p. 293-309, 2004.

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.; SCHAAAN, 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.

MADIANOS, P.N.; BOBETSIS, Y.A.; OFFENBACHER, S. Adverse pregnancy outcomes (APOs) and periodontal disease: pathogenic mechanisms *Journal of Periodontology*, v. 40, p. 170-180, 2013.

MANCUSI, C.; IZZO, R.; GIOIA, G.D. Insulin Resistance the Hinge Between Hypertension and Type 2 Diabetes. *High Blood Pressure & Cardiovascular Prevention*, v. 27, p. 515–526, 2020.

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

MARIA, S.; WITT-ENDERBY, P. A. Melatonin effects on bone: potential use for the prevention and treatment for osteopenia, osteoporosis, and periodontal disease and for use in bone-grafting procedures. *J. Pineal Res.*, v. 56, p. 115-125, 2014.

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. *Prime Reports*, v. 6, p. 13, 2014.

MARVIN, S.B.A.; MAURICE, G.B.A.; The Pulpal Pocket Approach: Retrograde Periodontitis. *Journal of periodontology*, v 35, p. 22-48, 1964.

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.

MATTERA, M.S.L.C. et al. Effect of maternal periodontitis on GLUT4 and inflammatory pathway in adult offspring. *Journal of periodontology*, v. 90, p. 884-893, 2019.

MAZUR, B.; MASSLER, M. Influence of periodontal disease of the dental pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.*, v.17, p.592-603, 1964

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.

MEULMAN, T. et al. Impact of Porphyromonas gingivalis inoculation on ligature-induced alveolar bone loss. A pilot study in rats. *J Periodont Res.*, v. 46, p 629–636, 2011.

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.

MUCCI, J. M.; SCIAN, R.; FRANCESCO, P. N. et al. Induction of osteoclastogenesis in an in vitro model of Gaucher disease is mediated by T cells via TNF- α . **Gene**, v. 509, p.51–59, 2012.

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

NIETO-VAZQUEZ, I. *et al.* Insulin resistance associated to obesity: the link TNF-alpha, *Archives of Physiology and Biochemistry*, v. 3, p. 183-194, 2007.

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.

PABON, N.A.; ZHANG, L.A.C.; SCHIPPER, C.J.C.; LEE, R.E.C. A network-centric approach to drugging TNF-induced NF- κ B signaling. **Nature Communications**, volume 10, n. 860, 2019.

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.

PATTI, A.; GENNARI, L.; MERLOTTI, D.; DOTTA, F.; NUTI, R. Endocrine Actions of Osteocalcin. **International Journal of Endocrinology**, v. 2013, p.1-11, 2013.

PEERAN, S.W.; ABDALLA, T.K.A.; MUGRABI, M.H. Endo-Perio Lesions. **International journal of scientific**, v.2, 2013.

PEREIRA C.V, STIPP R.N, FONSECA D.C, PEREIRA L.J, HÖFLING J.F. Detection and clonal analysis of anaerobic bacteria associated to endodontic-periodontal lesions. **J Periodontol.**, v.82 n.12 p.1767-75. 2011.

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.

PÉREZ, H. et al. Prevalence of periodontal disease and associated risk factors. **Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río**, v. 15, n. 2, p. 53-64, jul. 2011.

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.

POLETO, V. C. et al. Atendimento odontológico em gestantes: uma revisão da literatura. **Stomatos.**, v. 14, n. 26, p. 4-75, 2008.

PRINCE *et al.*, The microbiome, parturition, and timing of birth: more questions than answers. **Journal of reproductive immunology**, v.104-105, p. 12-19, 2014

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

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.

RAYCHAUDHURI, N.S. et al. **J. Biol. Chem.**, v. 283, p.13611-13626, 2008.

RICARDO, J.; ANTONIA, R.S.; HAGAN, A.S. Expanding the View of IKK: New Substrates and New Biology. **Trends Cell Biol**, v.31, p.166-178, 2021.

RICOLDI, M.S.T. et al. Effects of the probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* on the non-surgical treatment of periodontitis. A histomorphometric, microtomographic and immunohistochemical study in rats. **PLoS ONE**, v. 12, 2017.

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.

SCHENK, S.; & SABERI, M.; OLEFSKY, J.M. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, p. 2992-3002, 2008.

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.

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.

SHARMA, M., DEY, C.S. AKT ISOFORMS-AS160-GLUT4: The defining axis of insulin resistance. **Rev Endocr Metab Disord.**, v. 22, p. 973–986, 2021.

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.

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

SIMRING, M.; GOLDBERG, M. The Pulpal Pocket Approach: Retrograde Periodontitis. **The journal of periodontology**, v. 35, p. 22-48, 1964.

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.

SOUTHERLAND, J. H.; TAYLOR, G. W.; OFFENBACHER, S. Diabetes and periodontal infection: making the connection. **Clinical Diabetes**, v. 23, n. 9, p. 171-177, 2005.

SOYSA, N. S.; ALLES, N. NF kappa beta functions in osteoclast. **Biochem Biophys Rev Commun.**, V.378, p. 378:1-5, 2009.

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.

SRINIVAS, S. K.; PARRY, S. Periodontal disease and pregnancy outcomes: time to move on? **J. Womens Health**, v. 21, n. 2, p. 121-125, Feb. 2012.

SRIVASTAVA, S.K.; RAMANA, K.V.; Focus on molecules: nuclear factor-kappaB. **Experimental eye research**, v. 88, p. 2-3, 2009.

STARZYŃSKA, A.; WYCHOWAŃSKI, P.; NOWAK, M.; SOBOCKI, B.K; JERECZEK-FOSSA, B.A.; SŁUPECKA-ZIEMILSKA, M. Association between Maternal Periodontitis and Development of Systematic Diseases in Offspring. *International Journal of Molecular. Sciences*, 2022;

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.

SUNITHA R, EMMADI P, NAMASIVAYAM A, THYEGARAJAN R, RAJARAMAN V. The periodontal-endodontic continuum: a review. *J Conserv Dent.*, v. 11 n.2 p. 54-62. 2008.

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.

TOKUNAGA, C.; CROZETA, B.M.; BONATO, M.S.; COELHO, B.S.; FILHO, F.B.; TOMAZINHO, F.S.F. Microbiological aspects of endoperiodontal lesion. *RBSO.*, v. 10 n.2 2013.

TORABINEJAD M., KIGER R.D. A histologic evaluation of dental pulp tissue of a patient with periodontal disease. *Oral Med Oral Pathol.*, v.59, n.2, p.198-200.Feb. 1985.

Tsosura, T. V.S. et al. Maternal apical periodontitis is associated with insulin resistance in adult offspring. *International Endodontic Journal*, v. 52, n. 7, p. 1040-1050, 2019.

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.

ÜSTÜN, K.; SEZER, U.; KISACIK, B. *et al.* Periodontal Disease in Patients with Psoriatic Arthritis. *Inflammation*, v. 36, p. 665–669, 2013.

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.

WADA, T.; NAKASHIMA, T.; HIROSHI, N.; PENNINGER, J. M. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med.*, V. 12, n. 1, p. 17- 25, 2006.

WAJANT, H.; SCHEURICH, P. TNFR1-induced activation of the classical NF- κ B 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.

WHEATER et al. The clinical utility of bone marker measurements in osteoporosis. *Journal of Translational Medicine*. v. 11, n. 201, p 1-14, 2013.

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.

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.

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.

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

XIAO, W.A.; LI, S.; PACIOS, S.D.; WANG Y.C.; GRAVES, D.T. Bone Remodeling Under Pathological Conditions. **Tooth Movement**, v. 18, p. 17-27, 2016.

Ye, J. Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance. **Int J Obes.**, v. 33, p. 54–66, 2009.

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

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

ZHANG, J. et al. S6K directly phosphorylates IRS-1 on Ser-270 to promote insulin resistance in response to TNF-(α) 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 tecido muscular esquelético de ratos adultos, proles de ratas com lesão endo-periodontal verdadeira**", Processo FOA nº 00460-2020, sob responsabilidade de Dóris Hissako Matsushita apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 02 de Outubro de 2020.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 02 de Outubro de 2022.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 02 de Novembro de 2022.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Evaluation of insulin and inflammatory pathways in skeletal muscle tissue of adult rats, offspring of rats with true endodontic-periodontal lesions**", Protocol FOA nº 00460-2020, under the supervision of Dóris Hissako Matsushita presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on October 02, 2020.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: October 02, 2022.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: November 02, 2022.

Prof. Associado Guilherme de Paula Nogueira
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

ANEXO B

**Comprovante de envio para publicação em periódico qualis capes
b1 ou superior (CBII)**

Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

Submitted to

Journal of Periodontology

Manuscript ID

JOP-22-0139

Title

Effect of maternal true combined endodontic-periodontal lesion on insulin and inflammatory pathway in adult offspring

Authors

Belardi, Bianca Elvira
Mattera, Maria Sara de Lima Coutinho
Tsosura, Thaís Verônica Saori
Santos, Rodrigo
Cantiga da Silva, Cristiane
Tavares A Cintra, Luciano
Yamamoto Chiba, Fernando
Teschi Bravo, Lara
Ramos Carvalho, Nubia
Carnevali, Ana Carolina
Akira Fujji de Oliveira, Renan
Ervolino, Edison
Matsushita, Doris

Date Submitted

01-Mar-2022