

**THAÍS VERÔNICA SAORI TSOSURA**

**AVALIAÇÃO DA ETAPA FINAL DO SINAL INSULÍNICO, VIA  
INFLAMATÓRIA, ESTRESSE OXIDATIVO, MECANISMO  
EPIGENÉTICO POR METILAÇÃO DO DNA E EXPRESSÃO  
DE GLUT4 NO MÚSCULO GASTROCNÊMIO DE RATOS  
ADULTOS, PROLES DE RATAS COM PERIODONTITE  
APICAL**

**THAÍS VERÔNICA SAORI TSOSURA**

**AVALIAÇÃO DA ETAPA FINAL DO SINAL INSULÍNICO, VIA  
INFLAMATÓRIA, ESTRESSE OXIDATIVO, MECANISMO  
EPIGENÉTICO POR METILAÇÃO DO DNA E EXPRESSÃO  
DE GLUT4 NO MÚSCULO GASTROCNÊMIO DE RATOS  
ADULTOS, PROLES DE RATAS COM PERIODONTITE  
APICAL**

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

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Titular Doris Hissako Matsushita

**Araçatuba  
2023**

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

T882a Tsosura Thais Veronica Saori.  
Avaliação da etapa final do sinal insulínico, via inflamatória, estresse oxidativo, mecanismo epigenético por metilação do DNA e expressão de GLUT4 no músculo gastrocnêmio de ratos adultos, proles de ratas com periodontite apical / Thais Veronica Saori Tsosura. – Araçatuba, 2023  
97 f. : il. ; tab.

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

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

CDD 612

## DADOS CURRICULARES

**Nascimento:** 13.09.1993, Campinas – SP

**Filiação:** Rubens Tadao Tsosura

Cacilda Sayuri Ando Tsosura

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

**2017/2019:** Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

**2019/2023:** Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

## DEDICATÓRIA

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

## AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

Ao **Prof. Scott A. Summers** e **Prof. William L. Holland** pela oportunidade de realizar período de Doutorado Sanduíche em seus laboratórios no *Eccles Institute of Human Genetics, University of Utah*, Estados Unidos. Estendo meus agradecimentos à pós-doutoranda **Ran Hee Choi** pela paciência, ensinamento e amizade.

Ao **Prof. Luciano Tavares Angelo Cintra**, por ter sido tão solícito em todos os momentos. Obrigada por todas as suas contribuições valiosas para a realização deste estudo.

À coordenadora e à vice-coordenadora do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba / UNESP, **Prof.<sup>a</sup> Sandra Helena Penha de Oliveira** e **Prof.<sup>a</sup> Doris Hissako Matsushita**.

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

Aos professores membros da banca do Exame Geral de Qualificação, **Prof. Edilson Ervolino**, **Prof.<sup>a</sup> Flávia Lombardi Lopes** e **Prof.<sup>a</sup> Sandra Helena Penha de Oliveira**, pelos pertinentes apontamentos que engrandeceram este estudo.

Aos membros titulares e suplentes da Banca Examinadora de defesa da Tese, **Prof.<sup>a</sup> Flavia Lombardi Lopes**, **Prof. Guilherme de Paula Nogueira**, **Prof. Luiz Carlos Carvalho Navegantes**, **Prof. Luciano Tavares Angelo Cintra**, **Prof.<sup>a</sup> Maria Aparecida Visconti**, **Prof. Paulo Tambasco de Oliveira** e **Prof.<sup>a</sup> Simone Regina Potje**, que prontamente aceitaram o convite.

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

Aos amigos do laboratório de Endocrinologia, mestrandos, doutorandos e pós-doutorandos: **Ana Carla Thalez Ywabuchi Nobumoto**, **Bianca Elvira Belardi**, **Lara Teschi Bravo**, **Nubia Ramos Carvalho**, **Maria Sara de Lima Coutinho** e **Rodrigo Martins dos Santos**; e às alunas de iniciação científica: **Gabriele Fernandes Baliero**, **Giovanna Mendes Gomes da Silva**, **Heloisa Macedo Sampaio** e **Nicolle**

**Carvalho Barbosa**, pelo apoio e pela convivência agradável, pelos momentos compartilhados de estresse e também de alegria e descontração, durante o desenvolvimento, em equipe, de todos os projetos do laboratório. Muito obrigada a todos! Vocês são incríveis!! Foi uma verdadeira honra fazer parte dessa equipe.

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 **Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA)** pela oportunidade da realização e conclusão da minha iniciação científica, mestrado e doutorado.

Ao diretor e vice-diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA/UNESP), **Prof. Glauco Issamu Miyahara e Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem**.

Aos **funcionários** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA/UNESP) pelos serviços prestados.

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

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão da bolsa de estudo e apoio financeiro (Processo nº: 2019/04182-2), que foram imprescindíveis para a execução do projeto de doutorado que resultou na publicação dos resultados em dois artigos científicos em periódicos internacionais de alto fator de impacto. Ademais, agradeço à FAPESP pela concessão da **Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior** (BEPE – Doutorado. Processo nº: 2020/10619-1), que me permitiu a conclusão do Doutorado Sanduíche no *Eccles Institute of Human Genetics, University of Utah*, Estados Unidos, que proporcionou engrandecimento profissional e pessoal.

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

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

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

A todos, muito obrigada!

# EPÍGRAFE

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

*Robert Collier*

**TSOSURA, T. V. S. AVALIAÇÃO DA ETAPA FINAL DO SINAL INSULÍNICO, VIA INFLAMATÓRIA, ESTRESSE OXIDATIVO, MECANISMO EPIGENÉTICO POR METILAÇÃO DO DNA E EXPRESSÃO DE GLUT4 NO MÚSCULO GASTROCNÊMIO DE RATOS ADULTOS, PROLES DE RATAS COM PERIODONTITE APICAL.** 2023. 97 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

## **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. A metilação do DNA é um dos mecanismos epigenéticos envolvida nesta programação e regula a expressão gênica. Estudos anteriores verificaram que a periodontite apical (AP) materna em ratas promove em sua prole adulta: resistência insulínica (RI), alteração na etapa inicial do sinal insulínico (SI) no músculo gastrocnêmio (MG) e aumento na concentração plasmática de fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). O TNF- $\alpha$  pode ativar o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) que diminui a expressão gênica do transportador de glicose GLUT4. Nesse contexto, mais estudos são necessários para investigar se as alterações no SI observadas em ratos adultos, proles de ratas com AP também estão presentes na continuidade da cascata insulínica. Ademais, sabendo-se que o estresse oxidativo tem sido implicado como fator contribuinte tanto para o início quanto para a progressão do diabetes, torna-se fundamental verificar o grau de estresse oxidativo tecidual nesta prole adulta. Em vista disso, os objetivos deste estudo foram avaliar a RI, estresse oxidativo, etapa final do SI e via inflamatória no MG de ratos adultos, proles de ratas com AP. Para tanto, as 21 ratas Wistar (2 meses de idade) foram distribuídas em 3 grupos: 1) ratas controle; 2) ratas com 1 AP induzida em 1<sup>o</sup> molar superior direito; 3) ratas com 4 APs induzidas em 1<sup>os</sup> e 2<sup>os</sup> molares superiores e inferiores do lado direito. A AP foi induzida empregando-se broca em aço carbono dotada de esfera de 0,1 mm na extremidade. Após 30 dias da exposição pulpar, as ratas de todos os grupos foram colocadas para acasalamento. Quando os filhotes machos de todas as ratas completaram 75 dias de idade, foram realizadas as seguintes análises plasmáticas: 1) glicemia; 2) insulinemia; 3) RI. Ademais, foram realizados os seguintes experimentos no MG: 1) grau de fosforilação em serina/treonina da Akt, após o estímulo insulínico; 2)

conteúdo proteico de GLUT4; 3) grau de metilação do DNA na região promotora do gene do GLUT4; 4) expressão gênica do GLUT4 e TNF- $\alpha$ ; 5) conteúdo proteico de TNF- $\alpha$  e PGC-1 $\alpha$ ; 6) grau de fosforilação de NF-kB p50 e NF-kB p65; 7) estresse oxidativo (superóxido dismutase – SOD e espécies reativas ao tiobarbitúrico – TBARS). A análise estatística foi realizada pela análise de variância, seguida do teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5%. Os resultados mostraram que AP materna (tanto 1 foco de infecção como 4 focos de infecções) promoveu hiperinsulinemia, RI e diminuição na atividade antioxidante da SOD e na concentração de TBARS no MG de sua prole adulta. Entretanto, somente a AP materna em quatro dentes promoveu aumento na massa corpórea, na ingestão alimentar e no grau de fosforilação das subunidades p50 e p65 do NF-kB no MG de proles adultas. Ademais, houve diminuição no grau de fosforilação em serina e treonina da Akt (após estímulo insulínico) e na expressão gênica e conteúdo proteico de GLUT4 no MG em proles adultas de ratas com 4APs. A AP materna não promoveu alteração na glicemia de jejum, conteúdo de PGC-1 $\alpha$ , grau de metilação do DNA na região promotora do gene do GLUT4 e expressão gênica e conteúdo proteico de TNF- $\alpha$  no MG de proles adultas. Esses resultados revelam o impacto que a AP materna tem em longo prazo na predisposição às alterações metabólicas na fase adulta da prole. Isso reforça a importância que a manutenção da saúde bucal materna tem sobre a saúde geral da prole.

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

**TSOSURA, T. V. S. ASSESSMENT OF INSULIN SIGNALING AND INFLAMMATORY PATHWAYS IN SKELETAL MUSCLE AND ADIPOSE TISSUES OF ADULT RATS, OFFSPRING OF THE RATS WITH PERIAPICAL LESION. 2023.** 97 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

## **ABSTRACT**

Fetal programming suggests that adverse stimuli when applied during early fetal development may alter metabolism of offspring, increasing the risk of disease in adulthood. DNA methylation is one of the epigenetic mechanisms involved in this programming and regulates gene expression. Previous studies have shown that maternal apical periodontitis (AP) in rats promotes in their adult offspring: insulin resistance (IR), alteration in the initial steps of the insulin signaling (IS) in the gastrocnemius muscle (GM) and increase in plasma concentration of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). TNF- $\alpha$  can activate nuclear transcription factor kappa B (NF- $\kappa$ B) thus decreasing gene expression of the GLUT4 glucose transporter. In this context, more studies are needed to investigate whether changes in IS observed in adult rats, offspring of rats with AP are also present in the continuity of the insulin cascade. In addition, since oxidative stress has been implicated as a contributing factor for both the onset and progression of diabetes, it is essential to verify the degree of tissue oxidative stress in this adult offspring. Therefore, the aims of this study were to evaluate IR, oxidative stress, final steps of IS and inflammatory pathway in the GM of adult rats, offspring of rats with AP. For this purpose, 21 female Wistar rats (2 months of age) were distributed into three groups: 1) control rats (CN); 2) group with one AP induced in the upper right first molar (1AP); 3) group with four APs induced in the first and second upper and lower right molars (4AP). AP was induced using a surgical round bur measuring 0.1 mm in diameter. After 30 days of pulp exposure, female rats of all groups were placed for mating. Pregnant rats were separated into individual cages. When the male offspring of all rats reached 75 days of age, the following plasma analyzes were performed: 1) glycemia; 2) insulinemia; 3) IR. Furthermore, the following analyzes were performed in the GM: 1) Akt serine/threonine phosphorylation status, after insulin stimulation; 2) GLUT4 content; 3) degree of DNA methylation in the proximal promoter region of the GLUT4 gene; 4) GLUT4 and TNF-

$\alpha$  gene expression; 5) TNF- $\alpha$  and PGC-1 $\alpha$  content; 6) p50 and p65 subunits of NF- $\kappa$ B phosphorylation status; 7) oxidative stress (superoxide dismutase – SOD and thiobarbiturate reactive species – TBARS). Statistical analyzes were performed by analysis of variance, followed by the Tukey test. The level of significance adopted was 5%. Results showed that maternal AP (both 1 infection focus and 4 infection focus) promoted hyperinsulinemia, IR and decrease in SOD antioxidant activity and TBARS concentration in the GM of their adult offspring. However, only maternal AP in four teeth promoted an increase in body weight, food intake and p50 and p65 subunits of NF- $\kappa$ B phosphorylation status in the GM of adult offspring. Furthermore, there was a decrease in Akt serine and threonine phosphorylation status (after insulin stimulation) and in gene expression and protein content of GLUT4 in the GM in adult offspring of rats with 4APs. Maternal AP did not change fasting glycemia, PGC-1 $\alpha$  content, degree of DNA methylation in the proximal promoter region of GLUT4, gene expression and protein content of TNF- $\alpha$  in the GM of adult offspring. These results demonstrate that maternal AP is associated with IR and promotes important alterations in IS and inflammation pathways in adult offspring. This reinforces the importance of maternal oral health on the overall health of offspring.

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

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Indução da lesão periapical em rata com o auxílio de uma broca (LN Long Neck, Dentisply Maillefer, Ballaigues-Suíça), em baixa rotação. 34
- Figura 2** Esquema representativo da metodologia utilizada no presente trabalho. 37
- Figura 3** A-C: Representação histológica (coloração hematoxilina e eosina) da região periapical do grupo controle (CN), do grupo com 1 periodontite apical (AP1) e do grupo com 4 periodontites apicais (AP4). A imagem A representa o grupo CN. As regiões apical e periapical estão livres de infiltrado inflamatório. As imagens B e C representam os grupos de ratas com periodontites apicais. Observa-se a presença de infiltrado inflamatório em torno do ápice dentário (ampliação original x100). D-I: Radiografias periapicais das hemimaxilas e hemimandíbulas do lado direito de ratas dos grupos CN (D e G), AP1 (E e H) e AP4 (F e I). As pontas das setas indicam as áreas radiolúcidas, sugerindo as periodontites apicais. 46
- Figura 4** Massa corpórea semanal de ratos, proles de ratas controle (P-CN), proles de ratas com uma periodontite apical (P-AP1) e proles de ratas com quatro periodontites apicais (P-AP4), desde o nascimento até 75 dias de idade. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM de 45 animais por grupo. \* $p < 0,05$  P-CN vs. P-AP4; \*\* $p < 0,01$  P-CN vs. P-AP4; \*\*\* $p < 0,001$  P-CN vs. P-AP4;  $\delta p < 0,05$  P-AP1 vs. P-AP4; # $p < 0,01$  P-AP1 vs. P-AP4. 48
- Figura 5** Ingestão alimentar de ratos, proles de ratas controle (P-CN), proles de ratas com uma periodontite apical (P-AP1) e proles de ratas com quatro periodontites apicais (P-AP4), avaliada semanalmente desde o desmame (terceira semana) até o final do experimento. Os valores são 49

apresentados como média  $\pm$  EPM de 45 animais por grupo. \* $p < 0,05$  P-CN vs. P-AP4; \*\* $p < 0,01$  P-CN vs. P-AP4; \*\*\* $p < 0,001$  P-CN vs. P-AP4;  $\delta p < 0,05$  P-AP1 vs. P-AP4;  $\& p < 0,001$  P-AP1 vs. P-AP4

**Figura 6**

Avaliação do grau de fosforilação em serina (Ser<sup>473</sup>) e treonina (Thr<sup>308</sup>) da Akt, antes (-) e após (+) o estímulo insulínico, no músculo gastrocnêmio de proles de ratas controle (P-CN), proles de ratas com uma periodontite apical (P-AP1) e proles de ratas com quatro periodontites apicais (P-AP4). Em A, autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS PAGE (185  $\mu$ g).  $\beta$ -actina foi utilizada como controle. Em B e C, os valores do grau de fosforilação em (Ser<sup>473</sup>) e treonina (Thr<sup>308</sup>) da Akt, respectivamente (expressos em unidades arbitrárias) são apresentados como média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. \* $p < 0,05$  P-AP4 (-) vs. P-AP4 (+); \*\* $p < 0,01$  P-AP1 (-) vs. P-AP1 (+) e P-AP4 (-) vs. P-AP4 (+); \*\*\* $p < 0,001$  P-CN (-) vs. P-CN(+), P-AP1 (-) vs. P-AP1 (+); # $p < 0,01$  P-CN (+) vs. P-AP4 (+);  $\& p < 0,05$  P-CN (+) vs. P-AP4 (+)

50

**Figura 7**

Avaliação do conteúdo do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) no músculo gastrocnêmio de proles de ratas controle (P-CN), proles de ratas com uma periodontite apical (P-AP1) e proles de ratas com quatro periodontites apicais (P-AP4). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. \*  $p < 0,05$  P-CN vs. P-AP4

52

**Figura 8**

Avaliação da metilação do DNA na região promotora do gene *Slc2a4* no músculo gastrocnêmio de proles de ratas controle (P-CN), proles de ratas com uma periodontite apical (P-AP1) e proles de ratas com quatro periodontites apicais (P-AP4). Foram utilizados dois locais de restrição de enzimas sensíveis à metilação (HhaI e HpaII) e uma

52

enzima dependente de metilação (McrBC), (A, B e C) três regiões separadas dentro do promotor proximal, denominado prom 1, prom 2 e prom 3, do gene *Slc2a4* foram analisados. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM de 4 animais por grupo.

**Figura 9** Avaliação da expressão gênica do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) no músculo gastrocnêmio de proles de ratas controle (P-CN), proles de ratas com uma periodontite apical (P-AP1) e proles de ratas com quatro periodontites apicais (P-AP4). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM de 4 animais por grupo. \*  $p < 0,05$  P-CN vs. P-AP4 53

**Figura 10** Avaliação do conteúdo de fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) no músculo gastrocnêmio de proles de ratas controle (P-CN), proles de ratas com uma periodontite apical (P-AP1) e proles de ratas com quatro periodontites apicais (P-AP4). Em A, autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185  $\mu$ g).  $\beta$ -actina foi utilizada como controle. Em B, o valor do conteúdo de TNF- $\alpha$ , expressos em unidades arbitrárias, é apresentado como média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. 54

**Figura 11** Avaliação do grau de fosforilação de NF- $\kappa$ B p50 e NF- $\kappa$ B p65 no gastrocnêmio de proles de ratas controle (P-CN), proles de ratas com uma periodontite apical (P-AP1) e proles de ratas com quatro periodontites apicais (P-AP4). Em A, autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185  $\mu$ g). Os conteúdos de NF- $\kappa$ B p50 e NF- $\kappa$ B p65 foram utilizados como controle. Em B e C, os valores do grau de fosforilação de NF- $\kappa$ B p50 e NF- $\kappa$ B p65, respectivamente (expressos em unidades arbitrárias) são apresentados como média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. \*  $p < 0,05$  P-CN vs. P-AP4 54

**Figura 12** Avaliação do conteúdo de PGC-1 $\alpha$  no gastrocnêmio de

proles de ratas controle (P-CN), proles de ratas com uma periodontite apical (P-AP1) e proles de ratas com quatro periodontites apicais (P-AP4). Em A, autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 µg). β-actina foi utilizada como controle. Em B, os valores do conteúdo de PGC-1α (expressos em unidades arbitrárias) são apresentados como média ± EPM de 6 animais por grupo. 55

**Figura 13** Avaliação da atividade da superóxido dismutase – SOD (A) e concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS (B), normalizados pela proteína total no músculo gastrocnêmio de proles de ratas controle (P-CN), proles de ratas com uma periodontite apical (P-AP1) e proles de ratas com quatro periodontites apicais (P-AP4). Os valores são apresentados como a média ± EPM (n = 10 animais por grupo). # p<0,05 P-CN vs. P-AP1 e P-AP4; \*\* p<0,01 P-CN vs. P-AP1 e P-AP4; \*\*\* p<0,001 P-CN vs. P-AP1 56

## LISTA DE TABELA

|                 |   |    |
|-----------------|---|----|
| <b>Tabela 1</b> | Sequência de primers usados para qAMP de Slc2a4 e posição dos amplicons em referência ao códon de início.   | 41 |
| <b>Tabela 2</b> | Glicemia (mmol/L), insulinemia ( $\mu$ UI/mL) e Modelo de Avaliação da Homeostase da Resistência à Insulina (HOMA-IR) dos grupos proles de ratas controle (P-CN), proles de ratas com uma periodontite apical (P-AP1) e proles de ratas com quatro periodontites apicais (P-AP4). | 49 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

µm: Micrómetro

AgRP: Neurônio peptídeo relacionado ao gene agouti

Akt /PKB: Proteína quinase B

AP: Periodontite apical

AP-1: Proteína ativadora-1

BPN: Baixo peso ao nascimento

CAT: Catalase

CD14: Cluster de diferenciação 14

CN: Ratas do grupo controle

DM2: Diabetes mellitus 2

DP: Doença periodontal

DTT: Ditioneitol

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA: Ensaio de imun absorção enzimática

EPM: Erro padrão da média

ERO: Espécies reativas de oxigênio

GLUT4: Transportador de glicose tipo 4

GPx: Glutathione peroxidase

GR: Glutathione reductase

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

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrogênio

IFN-γ: Interferon-γ

IκB: Proteína inibitória kappa B

IKK: Quinase do inibidor kappa B

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

IKKα: Quinase do inibidor kappa B α

IKKβ: Quinase do inibidor kappa B β

IKKγ: Quinase do inibidor kappa B γ

IL-1β: Interleucina 1β

IL-4: Interleucina-4

IL-6: Interleucina 6

IRS-1: Substrato-1 do receptor de insulina

IRS-2: Substrato-2 do receptor de insulina

IRβ: Subunidade β do receptor de insulina

JNK: c-Jun N-terminal quinase

kDa: Kilodalton

LBP: Proteína ligante de LPS

LPS: Lipopolissacarídeos

MAPKs: Proteínas quinases ativadas por mitógenos

MD2: Proteína de diferenciação mielóide 2

MG: Músculo gastrocnêmio

mM: Milimolar

mmol: Milimol

mV: Milivolt

Na: Sódio

NaCl: Cloreto de sódio

NaF: Fluoreto de sódio

NF-kB: Fator nuclear kappa B

ng: Nanograma

O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Ânion superóxido

•OH: Radical hidroxila

p110: Subunidade catalítica da PI3K

p85: Subunidade regulatória da PI3K

PC-1: Glicoproteína-1 de membrana plasmática celular

P-CN: Proles de ratas controle

P-AP1: Proles de ratas com 1 periodontite apical

P-AP4: Proles de ratas com 4 periodontites apicais

pg: Picograma

PGC-1α: Receptor γ coativador-1α de receptor ativado por proliferadores de peroxissoma

PI3K: Fosfatidilinositol-3-quinase

POMC: Neurônio pró-opiomelanocortina

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

PTP1B: Proteína tirosina fosfatase 1 B

RI: Resistência insulínica

RPM: Rotações por minuto

S6K1: Proteína ribossômica S6 quinase beta-1

SB: Solução basal

SDS: Dodecil sulfato de sódio

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

Ser: Serina

SH2: Domínios com homologia a Src 2

SI: Sinal insulínico

SOCS1: Supressor da sinalização de citocinas 1

SOCS3: Supressores da sinalização de citocinas 3

SOD: Superóxido dismutase

TEMED : Tetrametil etilenodiamina

TLR: Receptores do tipo toll

TLR4: Receptore do tipo toll 4

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa

TRIS: Tris(hidroximetil)aminometano

Tyr: Tirosina

UI: Unidades Internacionais

V: Volt

XIAP: Inibidor da apoptose ligado ao cromossomo X

Ym1: Proteína 3 quitinase-3-like

$\mu$ g: Micrograma

$\mu$ UI: Microunidades internacionais

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO  | 25 |
| 2 OBJETIVOS   | 32 |
| 2.1 Objetivo geral  | 32 |
| 2.2 Objetivos específicos   | 32 |
| 3 MATERIAL E MÉTODO   | 33 |
| 3.1 Animais   | 33 |
| 3.2 Análises radiográfica e histológica da região periapical das ratas mães   | 35 |
| 3.3 Coleta de sangue e tecidos  | 35 |
| 3.4 Determinação da glicemia e insulinemia de jejum   | 37 |
| 3.5 Avaliação da resistência insulínica   | 37 |
| 3.6 Avaliação das proteínas das vias insulínica e inflamatória  | 38 |
| 3.7 Quantificação do conteúdo de proteína GLUT4   | 40 |
| 3.8 Avaliação da metilação do DNA do GLUT4  | 40 |
| 3.9 Análise da expressão gênica de GLUT4 e TNF- $\alpha$ por meio da técnica de PCR em tempo real                   | 42 |
| 3.10 Análise do grau de estresse oxidativo (SOD e TBARS)  | 44 |
| 3.11 Análise estatística  | 45 |
| 4 RESULTADOS  | 45 |
| 4.1 Análises histológica e radiográfica da região periapical das ratas mães   | 45 |
| 4.2 Massa corpórea  | 47 |
| 4.3 Ingestão alimentar  | 48 |
| 4.4 Glicemia, insulinemia e HOMA-IR   | 49 |
| 4.5 Avaliação do grau de fosforilação em serina (Ser <sup>473</sup> ) e treonina (Thr <sup>308</sup> ) da Akt no MG | 49 |
| 4.6 Avaliação do conteúdo de GLUT4  | 51 |
| 4.7 Avaliação do grau de metilação do DNA na região promotora do gene do GLUT4                                      | 52 |
| 4.8 Avaliação da expressão gênica de GLUT4 e TNF- $\alpha$ no MG  | 53 |
| 4.9 Avaliação do conteúdo de TNF- $\alpha$ no MG  | 53 |
| 4.10 Grau de fosforilação de NF-kB p50 e NF-kB p65  | 54 |
| 4.11 Conteúdo de PGC-1 $\alpha$   | 55 |

|   |    |
|---|----|
| 4.12 Grau de estresse oxidativo (SOD e TBARS) no MG | 56 |
| 5 DISCUSSÃO   | 56 |
| 6 RESUMO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS                  | 63 |
| 7 CONCLUSÃO   | 64 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS                          | 65 |
| ANEXOS  | 75 |

## 1 INTRODUÇÃO

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

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

A saúde bucal durante o período gestacional tem íntima relação com a saúde geral da gestante e pode influenciar no bem-estar do bebê (GARBIN *et al.*, 2011). Nesse aspecto, diversos estudos têm evidenciado a associação entre DP materna e resultados gestacionais adversos, tais como baixo peso ao nascimento (MATTERA *et al.*, 2016), parto pré-termo e restrição do crescimento intrauterino (SIQUEIRA *et al.*, 2007; VIDHALE; PURI; BHONGADE, 2020). Contudo, a literatura mostra-se escassa em relação a estudos que investigaram os efeitos da periodontite apical (AP) materna sobre a saúde da prole.

## Processo inflamatório

A AP 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; RICHERT *et al.*, 2022). Contudo, a cárie dentária compreende o principal meio pelo qual os microrganismos adentram o canal pulpar (STASHENKO *et al.*, 1994).

No estudo caso-controle de Khalighinejad *et al.* (2017) foi relatado que pelo menos 1 dente com AP foi observado em 27 mães que tiveram pré-eclâmpsia (total de 50 mães no grupo experimental) e em 16 mães do grupo controle (total de 50 mães no grupo controle). Os autores concluíram que a AP materna pode ser um forte preditor independente da pré-eclâmpsia. Ademais, no estudo de Leal *et al.* (2015) foi verificado que puérperas com AP crônica apresentaram maiores chances de terem bebês com baixo peso ao nascimento quando comparadas às puérperas sem a lesão endodôntica.

Na AP, ocorre inicialmente uma contaminação predominantemente por microrganismos aeróbios facultativos e, posteriormente, devido às alterações no ambiente pulpar, tais como comprometimento do suprimento sanguíneo, baixa tensão de oxigênio e disponibilidade de nutrientes, prevalece os microrganismos anaeróbios gram-negativos (SUNDQVIST, 1992; BARTHEL *et al.*, 1997; LUCISANO *et al.*, 2014). A parede celular dos microrganismos gram-negativos possui endotoxina denominada lipopolissacarídeo (LPS) (PALSSON-MCDERMOTT; O'NEILL, 2004; LU *et al.*, 2008), que pode ser reconhecida por receptores do tipo *toll* (TLR), especialmente o receptor do tipo *toll* 4 (TLR4) presente 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 fator nuclear kappa

B (NF- $\kappa$ B) e proteína ativadora-1 (AP-1), e indução da expressão de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, eicosanóides e espécies reativas de oxigênio (KIM; SEARS, 2010).

O NF- $\kappa$ B é uma família de fatores de transcrição, incluindo p105/p50 (NF- $\kappa$ B1), p100/p52 (NF- $\kappa$ B2), p65 (RelA), RelB e c-Rel, que se associam entre si para formar complexos homo e heterodiméricos e modular a transcrição de genes envolvidos em processos inflamatórios e imunológicos (NAPETSCHNIG; WU, 2013). Uma variedade de ligantes imunologicamente relevantes e seus receptores podem ativar a via do NF- $\kappa$ B. Estes incluem o receptor de fator de necrose tumoral (TNF), TLR, receptor de interleucina-1 (IL-1) e famílias de receptores de antígeno (HAYDEN; GHOSH, 2014). No estado latente, NF- $\kappa$ B encontra-se inativo no citoplasma, associado à proteína inibitória kappa B (I $\kappa$ B) (NAPETSCHNIG; WU, 2013). A ativação da via do NF- $\kappa$ B é iniciada por estímulos extracelulares, que são reconhecidos por receptores e transmitidos para a célula, onde as proteínas ancoradoras iniciam uma cascata de sinalização que resultam na ativação da quinase do inibidor kappa B (IKK) (NAPETSCHNIG; WU, 2013). O IKK é composto por duas subunidades catalíticas IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ , além do modulador essencial NF- $\kappa$ B (NEMO) ou IKK $\gamma$  (LI *et al.*, 2002). O IKK ativado fosforila o I $\kappa$ B em serina, levando à adição de ubiquitina pela ação da ubiquitina ligase e degradação pelo proteossoma (FRANCO, 2010). Assim, o complexo NF- $\kappa$ B / I $\kappa$ B é desfeito, permitindo a translocação do NF- $\kappa$ B para o núcleo com subsequente ligação em elementos de resposta específicos do DNA para regular inúmeros genes (GUPTA *et al.*, 2005), dentre eles, genes que modulam processos pró-inflamatórios, tais como fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucinas (IL)-6 e IL-1 $\beta$  (CHEN *et al.*, 2015).

Além de ativar a via IKK $\alpha$ / $\beta$  / NF- $\kappa$ B, os TLRs e as citocinas pró-inflamatórias (como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) são capazes de ativar a via da c-Jun amino-terminal quinase (JNK) (SHOELSON *et al.*, 2006). O grupo de serina/treonina quinases denominado JNK (JNK1, 2 e 3) pertence ao membro das proteínas da família das quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), responsáveis pela regulação de diversas funções celulares. A JNK ativada induz a expressão de genes pró-inflamatórios pelo acionamento do fator de transcrição AP-1 (CHEN *et al.*, 2015).

Sabe-se que citocinas pró-inflamatórias podem prejudicar a transdução do sinal insulínico (SI) e contribuir com o desenvolvimento da resistência insulínica (RI) (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1996; JAGER *et al.*, 2007; 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  $\beta$  do pâncreas secretam mais insulina a fim de evitar a hiperglicemia. A sobrecarga da função secretória destas células induz a sua falência, ocasionando a diminuição da secreção de insulina. Este processo está relacionado com o desenvolvimento do diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), o qual é resultado da combinação desses dois fatores: RI e prejuízo das células  $\beta$  em secretar insulina (PETERSEN, SHULMAN, 2002; KAHN; HULL; UTZCHNEIDER., 2006).

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

A ativação do receptor de insulina leva à fosforilação de vários substratos intracitoplasmáticos, como por exemplo, a fosforilação em tirosina da pp185 (IRS-1 / IRS-2). Entretanto, conforme mencionado anteriormente, as citocinas pró-inflamatórias podem prejudicar a transdução do SI. Sabe-se que o TNF- $\alpha$  pode diminuir a fosforilação em tirosina do substrato 1 do receptor insulínico (IRS-1) (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1996). Ademais, o TNF- $\alpha$  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).

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

A Akt se apresenta sob três isoformas (Akt1, 2 e 3), as quais são semelhantes em estrutura, porém distintas na função (YU; LITTLEWOOD;

BENNETT, 2015). Todas as isoformas são ativadas pela fosforilação em serina e treonina (KOHN *et al.* 1996; BELLACOSA *et al.* 1998). Todas as isoformas são ativadas pela fosforilação em serina pelo complexo 2 da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTORC2) (SARBASSOV *et al.*, 2005) e em treonina pela proteína quinase dependente de fosfoinosítideo-1 (PDK-1) (ALESSI *et al.*, 1997), conferindo atividade máxima à Akt. A Akt apresenta papel fundamental no processo de captação de glicose por meio da estimulação da translocação das vesículas de transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) do citoplasma para a membrana plasmática (WHITEMAN *et al.*, 2002). O comprometimento da translocação de GLUT4 estimulada por insulina reduz a captação de glicose e RI periférica em DM2 (WU *et al.*, 2016).

O GLUT4 é um importante transportador de glicose expresso em adipócitos e células musculares esqueléticas e cardíacas (WU *et al.*, 2016). A expressão de GLUT4 é regulada por uma variedade de estímulos. Sabe-se que o coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PGC-1 $\alpha$ ), um membro da família de coativadores de transcrição envolvido na regulação do metabolismo energético da célula (LIANG; WARD, 2006), promove aumento na expressão gênica de GLUT4 e captação de glicose em células musculares, destacando a importância do PGC-1 $\alpha$  na regulação da expressão de GLUT4 (MICHAEL *et al.*, 2001). Por outro lado, Furuya *et al.* (2013) forneceram as primeiras evidências de que o NF-kB pode se ligar ao promotor do gene *Slc2a4* (codificador da proteína GLUT4) e inibir a sua transcrição, demonstrando a existência da ligação entre inflamação e desordem metabólica como a RI.

### **Estresse Oxidativo**

Além da inflamação, o estresse oxidativo tem sido implicado como fator contribuinte tanto para o início quanto para a progressão do diabetes (MARITIM *et al.*, 2003; RAINS; JAIN, 2011). Entre as consequências de um ambiente oxidativo, destacam-se o desenvolvimento de RI, disfunção das células beta pancreática e intolerância à glicose (RAINS; JAIN, 2011). As espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas a partir da molécula de oxigênio como resultado do metabolismo celular normal e podem ser divididas em dois grupos: radicais livres e não radicais. Radicais livres são moléculas reativas contendo um ou mais elétrons não pareados. Quando 2 radicais livres compartilham seus elétrons desemparelhados, formas não

radicais são criadas. As três principais EROs são o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o radical hidroxila ( $\bullet OH$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). O radical hidroxila é o mais reativo das EROs e pode danificar macromoléculas, como proteínas, lipídios, carboidratos e DNA (BIRDEN *et al.*, 2012; NITA; GRZYBOWSKI, 2016). Além disso, este radical livre é responsável por iniciar a peroxidação lipídica (BIRDEN *et al.*, 2012). O peróxido de hidrogênio, radical superóxido, glutatona oxidada, malondialdeído, isoprostanos, carbonilas e nitrotirosina são considerados biomarcadores de oxidação (BIRDEN *et al.*, 2012).

Em condições fisiológicas, há um equilíbrio entre a geração e depuração de EROs, já que as células eucarióticas possuem mecanismos de defesa antioxidante (NITA; GRZYBOWSKI, 2016), os quais incluem moléculas enzimáticas (superóxido dismutase – SOD, catalase – CAT, glutatona peroxidase – GPx e glutatona redutase – GR) e não enzimáticas (glutatona e vitaminas A, C e E) (MARITIM; SANDERS; WATKINS, 2003; VALKO *et al.*, 2007). Contudo, quando há um desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e a capacidade das células de neutralizá-las pela defesa antioxidante, ocorre o estresse oxidativo (PERSSON *et al.*, 2014). As EROs podem ativar vias celulares sensíveis ao estresse, tais como JNK, p38 MAPK, IKK e quinases reguladas por sinal extracelular 1/2 (ERK 1/2) que podem interferir negativamente nas vias de sinalização celular (BLOCH-DAMTI; BASHAN, 2005). Diante desse contexto, tornou-se fundamental analisar o grau de estresse oxidativo tecidual (músculo gastrocnêmio) de ratos adultos, proles de ratas com AP, a fim de verificar a existência de uma relação entre este parâmetro e a RI.

### **Metilação do DNA e programação fetal**

Estudos anteriores do nosso laboratório demonstraram que a AP materna em ratas promove RI em sua prole adulta, mesmo que estes animais não tenham sido expostos diretamente a um processo inflamatório (TSOSURA *et al.*, 2019). Tais achados evidenciam que estímulos maternos adversos podem induzir alterações no desenvolvimento da prole, aumentando o risco de doenças na sua vida adulta (LANGREY-EVANS; McMULLEN, 2010; CALKINS; DEVASKAR, 2011). Este fenômeno denomina-se programação fetal (BARKER, 1995). Estudos sugerem que os mecanismos epigenéticos desempenham papel fundamental nas respostas adaptativas aos fatores nutricionais e ambientais durante a vida fetal e neonatal

(GICQUEL; EL-OSTA; BOUC, 2008). A epigenética refere-se a padrões estáveis (JAENISCH; BIRD, 2003) e hereditários de expressão gênica, independentes de alterações na sequência de DNA (EGGER *et al.*, 2004; BAYLIN, 2005). A metilação do DNA é um dos mecanismos epigenéticos que desempenha papel importante na regulação da expressão gênica (LIM; MAHER, 2010) e consiste na adição de um grupo metil (CH<sub>3</sub>) à base da citosina que geralmente precede uma base guanina (dinucleotídeo CpG) (HE *et al.*, 2018) pela ação de uma família de enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs) (BAYLIN, 2005; HE *et al.*, 2018). Os dinucleotídeos CpG aparecem esparsos pelos genomas eucariotos ou agrupados em regiões definidas como ilhas CpG. A maioria dos dinucleotídeos CpG esparsos está metilada, ao contrário das ilhas CpG que tendem a ser hipometiladas. Essas ilhas são frequentes em regiões promotoras de certos genes (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Em linhas gerais, a existência do grupo metil impede a interação dos fatores de transcrição e/ou do complexo de iniciação da polimerase ao promotor do gene, resultando no silenciamento gênico (LIM; MAHER, 2010).

Liu *et al.* (2013) verificaram que prole de ratas hipernutridas durante o período de amamentação (em decorrência da diminuição proposital do número filhotes por rata mãe) apresentaram aumento na massa corpórea e nas concentrações séricas de insulina, glicose e leptina na vida adulta. Além disso, esta hipernutrição resultou na hipermetilação do dinucleotídeo 5'-CpG-3' na região proximal do promotor de gene do GLUT4, que correlacionou com diminuição na expressão de RNAm de GLUT4 no músculo esquelético na prole adulta. Os autores deste estudo sugeriram que a modificação epigenética dos principais genes envolvidos na via de sinalização insulínica no músculo esquelético poderia resultar no desenvolvimento de RI em proles adultas.

Nossos estudos anteriores mostraram que a AP materna em um único dente ou em 4 dentes promove importantes alterações metabólicas em sua prole adulta, tais como RI, aumento na concentração plasmática de TNF- $\alpha$  e prejuízo na transdução da etapa inicial do SI no músculo gastrocnêmio (MG), incluindo a diminuição no grau de fosforilação em tirosina da pp185. No entanto, apenas AP materna em 4 dentes ocasiona aumento no grau de fosforilação de IKK $\alpha/\beta$  no MG nesta prole. Interessantemente, não houve alteração, tanto no grau de fosforilação em serina do IRS-1 (via inibitória do SI), quanto no grau de fosforilação de JNK no MG entre os grupos (TSOSURA *et al.*, 2019). Com intuito de compreender melhor os

mecanismos envolvidos na RI em ratos adultos, proles de ratas com AP, verificamos no trabalho a seguir se as alterações observadas no SI também estão presentes na continuidade da cascata insulínica (etapa final do SI) no MG desta prole adulta. Em decorrência disso, investigamos os componentes da via inflamatória (TNF- $\alpha$  e NF- $\kappa$ B), conteúdo de PGC-1 $\alpha$ , estresse oxidativo e alteração na metilação do DNA do GLUT4 no MG.

Dados epidemiológicos indicam aumento na prevalência de AP em adultos (JAKOVLJEVIC *et al.*, 2021). Salientamos que no presente projeto foram utilizados grupos de animais com um (exposição pulpar do 1<sup>o</sup> molar superior) e quatro focos de AP (1<sup>os</sup> e 2<sup>os</sup> molares superiores e inferiores do lado direito). Isto possibilitou um modelo de estudo similar ao observado na população, permitindo a obtenção de dados mais representativos, pois estudos epidemiológicos demonstram que a população brasileira apresentou uma média de 2,7 APs presentes por indivíduo (MAROTTA *et al.*, 2012), denotando ser comum a presença de mais de um foco de infecção em um mesmo paciente.

## **2 OBJETIVO GERAL**

Avaliar os efeitos da AP materna em ratas sobre a resistência à insulina, etapa final do sinal insulínico, metilação do DNA da região promotora proximal do gene do GLUT4, via inflamatória e estresse oxidativo no MG de sua prole adulta. Ademais, verificar se o aumento no número de foco de infecção endodôntica materna ocasiona piora nesses parâmetros na prole adulta.

### **2.1 Objetivos específicos**

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

- glicemia e insulinemia de jejum;
- resistência à insulina (HOMA-IR);
- grau de fosforilação em serina (Ser<sup>473</sup>) e treonina (Thr<sup>308</sup>) de Akt no músculo gastrocnêmio (MG);
- conteúdo de GLUT4 no MG;

- grau de metilação do DNA da região promotora proximal do gene do GLUT4 no MG;
- expressão gênica de GLUT4 e TNF- $\alpha$  no MG;
- grau de fosforilação de NF-kB p50 (Ser<sup>337</sup>) e p65 (Ser<sup>276</sup>) no MG;
- conteúdo de TNF- $\alpha$  e PGC-1 $\alpha$  no MG;
- grau de estresse oxidativo (SOD e TBARS) no MG.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho está de acordo com os Princípios Éticos em Uso de Animais e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/UNESP (PROCESSO CEUA Nº 00383-2019).

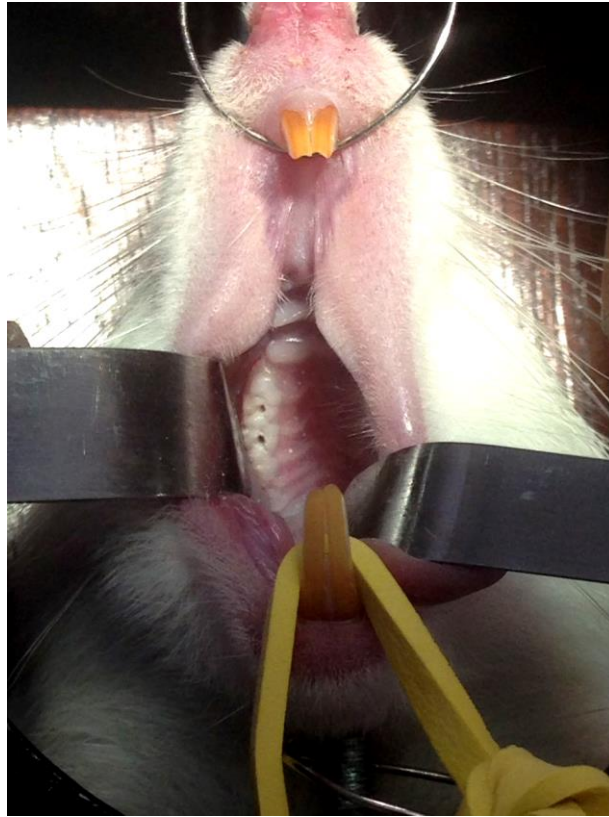
#### 3.1 Animais

No presente estudo foram utilizados 21 ratas (2 meses de idade com 200g) e 9 ratos Wistar (3 meses de idade com 350g), mantidos em ambiente sob condições padronizadas de temperatura ( $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), ciclo claro/escuro (12/12 horas diárias, com período claro iniciado às 7:00 horas), umidade ( $55 \pm 10\%$ ), temperatura de  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Todos os animais foram 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 3 grupos (n=7/grupo): a) ratas controle (CN); b) ratas com AP induzida em primeiro molar superior direito (apenas uma lesão) (AP1); c) ratas com AP induzida em primeiros e 2 molares superiores e inferiores do lado direito (total de quatro lesões) (AP4).

As APs 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 (Figura 1).

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



Fonte: do autor

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

As ratas prenhes foram separadas em caixas individuais e após o nascimento, a ninhada foi distribuída em três grupos: a) proles de ratas controle (P-CN); b) proles de ratas com apenas uma AP (P-AP1); c) proles de ratas com quatro APs (P-AP4). O número de filhotes foi ajustado para 8 por mãe lactante, a fim de evitar o efeito do tamanho da ninhada. Quando a ninhada não apresentava 8 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 P-CN, P-AP1 e P-AP4 completaram 75 dias de idade, iniciaram-se os experimentos.

### **3.2 Análises radiográfica e histológica da região periapical das ratas mães**

Após o desmame, aproximadamente 75 dias após a indução da AP, as ratas mães de todos os grupos foram eutanasiadas por dose excessiva de anestésico. As hemimaxilas e hemimandíbulas direitas foram retiradas e embebidas em formaldeído 4% por 24h. Para obtenção das imagens radiográficas foi utilizado o aparelho de raios-X GE-100 (General Electric, Milwaukee, EUA), operando com 70 kvp, 10 mA e tempo de exposição de 0,10s. A imagem digital foi obtida diretamente com placa óptica digital (Digora, Soredex, Orion Corporation, Helsinki, Finland). As leituras das placas ópticas foram realizadas em equipamentos de laser scanner sensibilizados, e as imagens foram analisadas usando um software (Windows Digora 1.51, Soredex, Orion Corporation, Helsinki, Finland). As análises radiográficas foram realizadas para detectar áreas radiolúcidas na região periapical nos grupos AP1 e AP4, indicando formação de AP. Após a análise radiográfica, as peças foram lavadas em água corrente por 12h. 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 24h, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. As peças foram cortadas com cortes semi-seriados, com 4 µm de espessura dos aspectos mesial-distal de todos os primeiros molares superiores do lado direito, realizados em micrômetro (RM2155, Leica Microsystems, BD, Wetzlar, Alemanha). Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina e estudos morfológicos foram realizados na área periapical.

### **3.3 Coleta de sangue e tecidos**

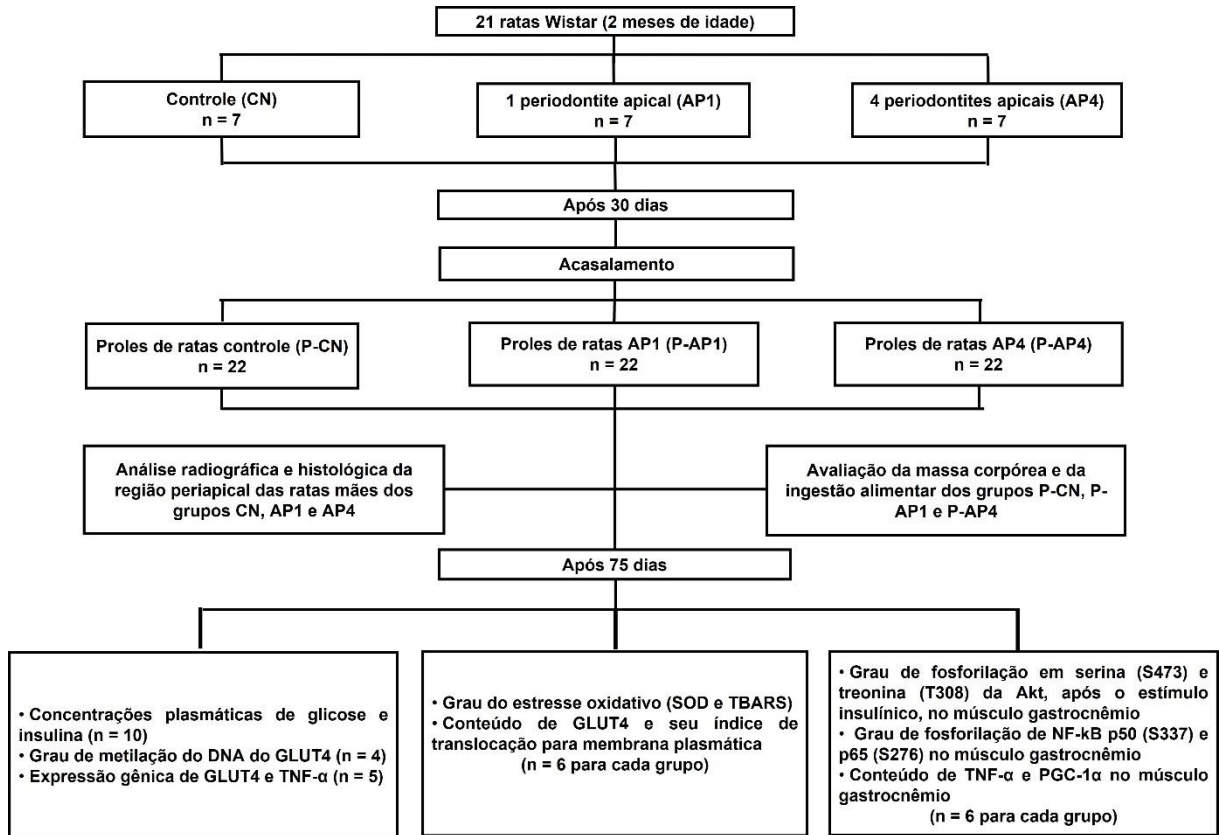
Os ratos P-CN, P-AP1 e P-AP4 foram submetidos a jejum de 12 horas antes dos procedimentos experimentais. Estes animais foram anestesiados com tiopental sódico (Thiopentax, Cristália, Itapira, SP, Brasil; 3%, 5mg/100g peso

corpóreo, via intraperitoneal) e os experimentos foram realizados 10-15 minutos após a anestesia.

Um grupo de ratos P-CN, P-AP1 e P-AP4 (n=10) foi submetido à laparotomia mediana para a coleta de sangue (4 mL) pela veia cava inferior. As amostras de sangue foram transferidas para tubos de plástico heparinizados (BV Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, EUA) e centrifugadas a 3.000G por 15 min a 4°C. Os plasmas obtidos foram aliquoteados e armazenados a -80°C até o dia da quantificação das concentrações plasmáticas de glicose e insulina. Ademais, destes mesmos animais foi coletado o MG para avaliar o grau de metilação do DNA do GLUT4 (n=4) e a expressão gênica de GLUT4 e TNF- $\alpha$  (n=5). Em outro grupo de ratos P-CN, P-AP1 e P-AP4 (n=10) foi coletado o MG para avaliação do grau de estresse oxidativo (SOD e TBARS) e conteúdo de GLUT4. Após este procedimento, os animais foram eutanasiados por dose excessiva do anestésico tiopental sódico (Thiopentax, Cristália, Itapira, SP, Brasil; 3%, 5mg/100g peso corpóreo, via intraperitoneal).

Em outro grupo de ratos P-CN, P-AP1 e P-AP4 (n=6) foi utilizado para analisar as proteínas envolvidas nas vias insulínica e inflamatória pelos métodos de *Western blotting* e *Immuno blotting*. Para tanto, os animais previamente anestesiados foram submetidos à laparotomia mediana, com retirada de amostras de MG antes e após 90s da administração intravenosa pela veia porta de 1,5 UI de insulina regular (Humulin, Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, EUA), seguindo protocolo de acordo com Saad *et al.* (1993) para avaliar o grau de fosforilação em serina (Ser<sup>473</sup>) e treonina (Thr<sup>308</sup>) da Akt, após a estimulação insulínica, nestes tecidos. Salienta-se que para avaliar o grau de fosforilação de NF-kB p50 (Ser<sup>337</sup>) e p65 (Ser<sup>276</sup>), conteúdo de TNF- $\alpha$  e PGC-1 $\alpha$  no MG foram utilizados amostras de tecidos sem o 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). Os experimentos foram realizados de acordo com o fluxograma representado na figura 2.

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



Fonte: do autor

### 3.4 Determinação da glicemia e insulinemia de jejum

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

### 3.5 Avaliação da resistência insulínica

Foi avaliada pelo índice HOMA-IR (Modelo de Avaliação da Homeostase - Resistência à Insulina), calculado a partir da fórmula, como segue:  $HOMA - IR = \text{glicemia de jejum (mmol/L)} \times \text{insulinemia de jejum } (\mu\text{UI/mL}) / 22,5$  (BONORA *et al.*, 2000).

### 3.6 Avaliação das proteínas das vias insulínica e inflamatória

- **Preparação das amostras:** imediatamente após a extração do MG foram homogeneizados em Polytron (24.000 RPM durante 10s) 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 min. Decorrido o tempo, foram transferidos para gelo e então centrifugados (4°C, 16.000G, 40 min). 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%).

- **“Western blotting”**

**“SDS-PAGE” - (“Sodium Dodecil Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis”):** a primeira etapa do *Western blotting* consistiu na submissão das amostras a uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida. Por meio deste método foi possível separar proteínas de acordo com seu peso molecular, sem que as unidades proteicas sejam perdidas, permitindo estudos posteriores nessas frações proteicas. Foi utilizado o método desenvolvido por Laemmli (1970) e modificado por Garfin (1990), o qual envolve um sistema descontínuo de dois géis contíguos, mas diferentes: o gel de “stacking” (3,39% T, 2,7% C - acrilamida 3,3%; bisacrilamida 0,09%; Tris 25 mM, pH 8,9; EDTA 2,0 mM; SDS 0,1%; TEMED 0.111%; Persulfato de amônio 0,27%) e o gel de resolução (6,16% T, 2,7% C - acrilamida 6%; bisacrilamida 0,16%; Tris 388 mM, pH=6,7; EDTA 2,1 mM; SDS 0,1%; TEMED 0.115%; Persulfato de amônio 0,17%; glicerol 10%). Na montagem, o gel de resolução ficou sob o gel de “stacking”, com orientação vertical, num sistema de câmaras que manteve as porções superiores e inferiores do gel em contato com um tampão de corrida (Tris 50 mM; glicina 375 mM; SDS 0,1%; EDTA 1,8 mM). No gel de “stacking” foram aplicadas as amostras solubilizadas em tampão de Laemmli. Imediatamente antes da aplicação, as amostras foram fervidas por 4 min. A eletroforese foi realizada em equipamento para minigel da Bio Rad (Mini-Protean, Bio Rad Laboratories, Richmond, CA), e foi começado com a corrida no gel de “stacking” sob voltagem constante em 30 mV até que ocorreu o empacotamento da amostra, o que pôde ser observado na transição dos géis. Posteriormente foi

aplicada voltagem constante de 100 V para a corrida no gel de resolução, durante 2h. Juntamente com as amostras, sempre foi colocado um padrão de proteínas de conhecidos pesos moleculares (marcadores).

- **“Electrophoretic transfer”**: Após a separação das frações proteicas no gel de poliacrilamida, foi feita a transferência eletroforética dessas frações para uma membrana de nitrocelulose Hybond-C Super (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England). A transferência foi realizada sob voltagem constante de 100 V, durante 2h, a 4°C, utilizando-se o tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, SDS 0,02%).
- **“Immunoblotting”**: Após a transferência eletroforética, foi iniciado o processo de imunodeteção de proteínas específicas (KRUGER; HAMMOND, 1988). A membrana de nitrocelulose foi primeiramente incubada na presença de solução bloqueadora (solução basal - SB - NaCl 150 mM; Tris 10 mM; "Tween" 20 0,02%; pH 7,2 - acrescida de 5% de leite desnatado - 0% de gordura) durante 2 horas à temperatura ambiente, e então lavada com solução basal por três sessões de 10 min. Em seguida, a membrana foi incubada em solução (SB + 3% de leite desnatado) contendo o anticorpos antifosfo-Akt (Ser<sup>473</sup>), antifosfo-Akt (Thr<sup>308</sup>), antifosfo-NF-kB p50 (Ser<sup>337</sup>), antifosfo-NF-kB p65 (Ser<sup>276</sup>), anti-TNF- $\alpha$ , anti-PGC-1 $\alpha$  e anti- $\beta$ -actina, todas da marca Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, EUA, por 4h em temperatura ambiente. Posteriormente foram realizadas três lavagens com solução basal e a membrana foi incubada durante 1h com segundo anticorpo contendo peroxidase de “horseradish” (“kit” de quimioluminescência, ECL – Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England). Novamente, foram realizadas 3 lavagens da membrana de nitrocelulose com solução basal, com duração de 10 min cada lavagem. Adicionou 1 mL de cada solução de detecção 1 e 2 (do kit de ECL) e foi incubada por 1 min. 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 min 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).

### 3.7 Quantificação do conteúdo de proteína GLUT4

As amostras do tecido MG foram homogeneizadas em tampão de sacarose de pH 7,4 (10 mmol/L de Tris-HCl, 1 mmol/L de EDTA e 250 mmol/L de sacarose). Quantidades iguais de proteína foram aplicadas num gel de SDS a 10%. Os “blots” foram quantificados por densitometria (ImageQuant TL, Amersham Biosciences UK Limited).

### 3.8 Avaliação da metilação do DNA do GLUT4

- **Restriction Digestion and Real-Time PCR (qAMP):** a partir dessa análise foi possível realizar uma avaliação quantitativa do estado de metilação dos sítios CpG de forma rápida e econômica, sem a necessidade de da modificação do DNA por bissulfito de sódio (OAKES *et al.*, 2009). Em resumo, são utilizadas enzimas de restrição sensíveis à metilação (MSREs) e uma endonuclease de restrição dependente da metilação (MDRE), essas enzimas identificam sítios de restrição na sequência de DNA de interesse e os primers são concebidos para flanquear esses sítios de restrição. O conjunto de “templates” de PCR criado para cada amostra de DNA é composto por tubos separados de DNA de igual concentração que foram digeridos com uma única enzima de restrição. Os grupos de digestão dos sítios são compostos por enzimas de restrição e são divididos em três categorias: 1) grupo *Sham* - uma digestão simulada sem enzima; 2) o grupo de digestão MSRE - o DNA é clivado se o sítio de restrição não estiver metilado; e 3) o grupo de digestão MDRE - o DNA é clivado apenas se metilado. Amplificação por PCR em tempo real de cada modelo é executado, produzindo valores de limiar de ciclo (Ct) que são utilizados para calcular a percentagem de metilação do DNA em determinado local de restrição (OAKES *et al.*, 2009). Ao gerar dados em um único dia, a metodologia de qAMP é substancialmente mais rápida e mais econômica do que a modificação do DNA por bissulfito de sódio, embora sejam avaliados menos dinucleotídeos CpG (OAKES *et al.*, 2009). A estratégia simplificada de desenho de primer e o aumento da estabilidade da matriz são vantagens adicionais. Em geral, o qAMP é um método rápido, alternativo à modificação do DNA por bissulfito de sódio para efeitos de rastreio dos níveis específicos de região e de metilação do DNA. Resultados obtidos a partir de qAMP demonstraram ser comparáveis com aqueles determinados utilizando modificação do DNA por bissulfito de sódio (OAKES *et al.*, 2009).

- **Desenho do oligos iniciadores (primers):** a sequência do gene de interesse foi localizada no banco de dados genome.ucsc.edu, utilizando o genoma da espécie. Os sítios de restrição das enzimas sensíveis à metilação (Hhal, HpaII) e uma dependente de metilação (McrBC) foram localizados na região promotora proximal do gene. Com os sítios de restrição das enzimas identificados no DNA de interesse, os iniciadores foram concebidos para flanquear estes locais de restrição. O software utilizado para desenhar os primers foi o Primer3 (v. 0.4.0).

**Tabela 1 – Sequência de primers usados para qAMP de *Slc2a4* e posição dos amplicons em referência ao códon de início.**

| Nome do oligo | Forward 5'-3'        | Reverse 5'-3'        | Posição         |
|---------------|----------------------|----------------------|-----------------|
| Prom 1        | GGCACTAGAAGCCTTGCACT | CACAGTCTACTGGCCCATCC | -897 a<br>-1141 |
| Prom 2        | CCCTTTAAGGCTCCATCTCC | GAAACAATGCCCCGAAGTAA | -653 a<br>-743  |
| Prom 3        | CTTCAGCTCTCCGCATCTTT | TGAACCAGATTCCCCAATTC | +23 a -227      |

- **Extração do DNA e PCR template preparation:** a extração do DNA genômico no MG foi realizada utilizando coluna de sílica e métodos disponibilizados pelo DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha). Para isolar o gDNA do tecido muscular foi utilizado 25 mg, conforme as instruções do fabricante. O gDNA isolado foi quantificado pela densidade óptica de absorbância a 260 nm no espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, EUA). Para melhores resultados utilizou-se 0,5-1,0 µg de DNA por reação de digestão. Por conseguinte, para um conjunto de cinco modelos, foram necessários 2,5-5,0 µg de DNA.

Etapas: Aumentou-se o volume da amostra de DNA para 250 µL, adicionando-se água. Este foi o volume final necessário para um conjunto de cinco modelos; foram utilizados 40 µL desta amostra de DNA por reação de digestão. Homogeneizou-se o DNA passando repetidamente a amostra por meio de uma agulha de calibre 27g 1/2 presa a uma seringa de 1 mL. Isto reduziu o tamanho médio do fragmento de DNA para ~ 4-5 kb. Distribuiu-se 40 µL de amostra de DNA para cinco amostras individuais em tubos de 1,5 mL. Digeriu-se os “templates” individuais com a enzima apropriada durante ~4h num volume total de 50 µL. Usou-se 25 unidades de cada enzima, NotI, HpaII, HhaI e McrBC, para digerir os diferentes “templates” as condições sugeridas pelos fabricantes. Para McrBC, usou-

se o dobro da concentração recomendada de GTP. O “template” *Sham* foi incubado na presença de tampão de reação 1x (tampão NEB 2). Todas as reações foram realizadas na presença de BSA 1x.

- **PCR quantitativo e análise de dados:** preparou-se uma mistura principal para o número desejado de reações (o procedimento descrito aqui foi otimizado para o uso do QuantiNova SYBR Green PCR Kit). O volume total para cada reação de PCR foi de 20  $\mu$ L; cada reação tinha 10  $\mu$ L de 2x SYBR Green PCR Master Mix, 1,0  $\mu$ L cada um dos primers forward e reverse, 0,1  $\mu$ L QN ROX Reference Dye, 5,9  $\mu$ L de água e 2  $\mu$ L de DNA (adicionado separadamente). Usando o conjunto de “templates” criado transferiu-se 17,5  $\mu$ L da mistura principal para cada poço e adicionou-se 2,5  $\mu$ L do “template” apropriado para reação com volume final de 20  $\mu$ L. Realizou-se a seguinte reação de amplificação no aparelho Stratagene Mx3005P: a) início da ativação da PCR: 95°C durante 1 min; b) desnaturação: 95°C por 5s; recozimento/extensão 60°C por 10s. Número de ciclos: 40. SYBR Green é utilizado para monitorizar a formação da amplificação de PCR. A amplificação não específica é monitorada por uma análise da curva de fusão realizada após o estágio de amplificação. A metilação foi mostrada como uma porcentagem de DNA digerido sobre não digerido, com base na mudança de Ct obtida para cada par de primers.

### **3.9 Análise da expressão gênica de GLUT4 e TNF- $\alpha$ por meio da técnica de PCR em tempo real**

- **Extração e quantificação do RNA total e transcrição reversa:** A extração de RNA total no MG foi realizada por meio da adição do reagente Trizol LS (Invitrogen, USA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Para isso, após remoção do tecido, estas amostras permaneceram armazenadas a -80°C até o início dos experimentos. No momento do experimento, nestas amostras foram adicionados 1000  $\mu$ L do reagente Trizol LS (Invitrogen) e homogeneizou-se e, posteriormente, foram adicionados 200  $\mu$ L de clorofórmio (Merck, Germany) em cada amostra. Os tubos foram vigorosamente agitados por 30s, e logo após, mantidos em repouso à temperatura ambiente, por 5 min. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 4°C e 13.000G por 15 min. Novos tubos foram nomeados de acordo com as amostras, e ao fim da centrifugação coletou-se cerca de 300  $\mu$ L da fase aquosa e colocou-se no novo tubo. Em seguida, adicionou-se

nestes novos tubos 500  $\mu$ L de álcool isopropílico (Merck), agitou-se novamente e armazenou-se à  $-20^{\circ}\text{C}$ . No dia seguinte, descongelou-se estas amostras e centrifugou-se a  $4^{\circ}\text{C}$  e 13.000G por 15 min, depois retirou-se o álcool isopropílico, acrescentou-se então 500  $\mu$ L de etanol 75% (Merck), agitou-se e centrifugou-se a  $4^{\circ}\text{C}$  e 10.000G por 10 min. Em seguida, desprezou-se o sobrenadante e colocou-se os tubos com a borda virada para baixo em uma superfície coberta com papel absorvente, quando os tubos estiveram secos desvirou-se e acrescentou-se 20  $\mu$ L de água DEPC para ressuspender o pellet. Por fim as amostras foram armazenadas à  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior quantificação. A concentração de RNA total nas amostras foi determinada por leitura em espectrofotômetro aplicando-se 1  $\mu$ L de cada amostra num dispositivo Nanodrop® (ThermoScientific, Wilmington, EUA). Foram consideradas as leituras nos comprimentos de onda de 280 e 260nm. A concentração das amostras foi fornecida pelo equipamento em  $\text{ng}/\mu\text{L}$ . A transcrição reversa das amostras de RNA em cDNA foi realizada por meio do kit comercial (SuperScript® II First-Strand Synthesis Super Mix for qRT-PCR, Invitrogen) e oligodT como iniciador, seguindo as instruções do fabricante. A quantidade de RNA total de partida foi definida com base no volume máximo de amostra recomendado pelo fabricante (12  $\mu$ L) multiplicado pela concentração da amostra que obtiver menor rendimento.

- **PCR quantitativo:** A expressão quantitativa do RNAm para os diferentes alvos foi realizada por meio de reações de PCR em tempo real, utilizando-se o sistema Taqman® (AppliedBiosystems, Life Technologies, EUA) em um aparelho Step One™ Real-Time PCR System (AppliedBiosystems, Life Technologies, United Kingdom). Para esta reação foram utilizadas sondas inventoriadas marcadas com fluoróforo FAM disponibilizados pela mesma empresa: GLUT4 (*Slc2a4* (GLUT4) - Rn01752377\_m1) e TNF- $\alpha$  (Rn01525859\_g1). Paralelamente, também foi realizada a amplificação do gene constitutivo com sonda inventoriada, marcada com o fluoróforo VIC disponibilizada pela mesma empresa:  $\beta$ -actina (Actb-Rn00667869\_m1). Alíquotas de 0,5  $\mu$ L do DNA complementar sintetizado a partir do RNAm foram utilizadas juntamente com reagentes Taqman® Gene Expression Mastermix (AppliedBiosystems, Life Technologies, EUA), e as sondas inventoriadas como determinado pelo fabricante, num volume final de reação de 10  $\mu$ L. A reação de amplificação compreendeu de 2 min a  $50^{\circ}\text{C}$ , 10 min a  $95^{\circ}\text{C}$ , e quarenta ciclo de 15s a  $95^{\circ}\text{C}$  a 1 min e  $60^{\circ}\text{C}$ , conforme recomendado pela empresa. Os resultados

foram analisados com base no valor de Ct (ciclethreshold – ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclo a partir do qual a amplificação atinge um dado limiar que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. As médias dos valores de Ct de medidas em duplicatas foram utilizadas para calcular a expressão do gene alvo, com normalização em relação ao controle interno ( $\beta$ -actina), e então comparadas com um controle alvo interno de uma amostra do grupo de células não estimuladas obtendo-se assim o cálculo do aumento da expressão, utilizando a fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Uma amostra negativa (água), também foi submetida à reação.

### 3.10 Análise do grau de estresse oxidativo (SOD e TBARS)

- **Preparo dos homogenatos:** o MG foi homogeneizado manualmente com pistilo de porcelana por cerca de 3 min em solução salina/tampão fosfato (pH 7,2), sempre mantidos no gelo. Após este processo, os homogenatos foram centrifugados a 10.000G, durante 15 min, a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para a mensuração da atividade da enzima antioxidante SOD. Para a determinação da concentração tecidual de TBARS, os homogenatos foram centrifugados a 5.000G, durante 5 min, a temperatura ambiente. As proteínas no MG foram quantificadas pelo método de *Lowry*.
- **Determinação da concentração tecidual de SOD:** o ensaio foi realizado de acordo com Dieterich *et al.* (2007). Nas alíquotas do homogenato foi adicionado 1mL de tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,8) contendo 1mM de DTPA (ácido dietilenotriaminopentacético) e a reação foi iniciada com a adição de pirogalol (0,2 mM). A leitura foi realizada durante 3 min à 37°C no espectrofotômetro a 420 nm. A determinação da atividade da enzima dada em U.mg proteína, foi determinada a partir da capacidade da SOD em inibir a autoxidação do pirogalol, onde 1U = 50% de inibição da autoxidação do pirogalol.
- **Determinação da concentração tecidual de TBARS:** em 125  $\mu$ L de homogenato tecidual foram adicionados 375  $\mu$ L de ácido tricloroacético 10%, para promover a precipitação das proteínas. Após 5s de agitação no vórtex, os tubos permaneceram em banho de gelo por 30 min e foram centrifugados a 3.000 RPM, por 10 min, sob temperatura inferior à 10 °C. Em tubos de vidro, foram colocados 250  $\mu$ L de sobrenadante e 250  $\mu$ L de ácido tiobarbitúrico 0,67% (Sigma, St. Louis,

MO, USA), de acordo com Neves *et al.* (1997). A solução foi agitada no vórtex por 5s e, a seguir, aquecida em banho-maria a 100°C por 15 min. Após resfriamento em banho de gelo, acrescentou-se 750 µL de álcool n-butílico em cada tubo, promovendo a extração do produto corado (MDA+TBA) da solução aquosa. Após agitação (por 40s) no vórtex e centrifugação a 2.000 RPM, por 5 min, o sobrenadante corado foi colocado em cubetas para a leitura em espectrofotômetro a 535nm (BUEGE; AUST, 1978).

### **3.11 Análise estatística**

Os dados foram analisados utilizando-se técnicas de estatística descritiva e os resultados, expressos por meio da média aritmética  $\pm$  erro padrão da média (EPM), foram apresentados sob a forma de tabela e gráficos.

A normalidade dos dados foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey para múltiplas comparações. As análises foram realizadas utilizando o programa estatístico Graph Pad Prism Versão 7.0, adotando-se o nível de significância de 5%.

O tamanho da amostra foi calculado com base em dados obtidos a partir de um estudo piloto. O estudo foi composto por 3 grupos e considerando a diferença mínima a ser detectada, estimativa do desvio padrão, nível de significância de 5% e um poder estatístico do teste de 80%, o tamanho amostral mínimo determinado foi de 9 animais por grupo para análise da resistência insulínica e estresse oxidativo; 6 animais por grupo para análise das vias insulínica e inflamatória; 5 animais por grupo para avaliação da expressão gênica TNF- $\alpha$  e GLUT4; e 4 animais por grupo para análise do grau de metilação de GLUT4.

## **4 RESULTADOS**

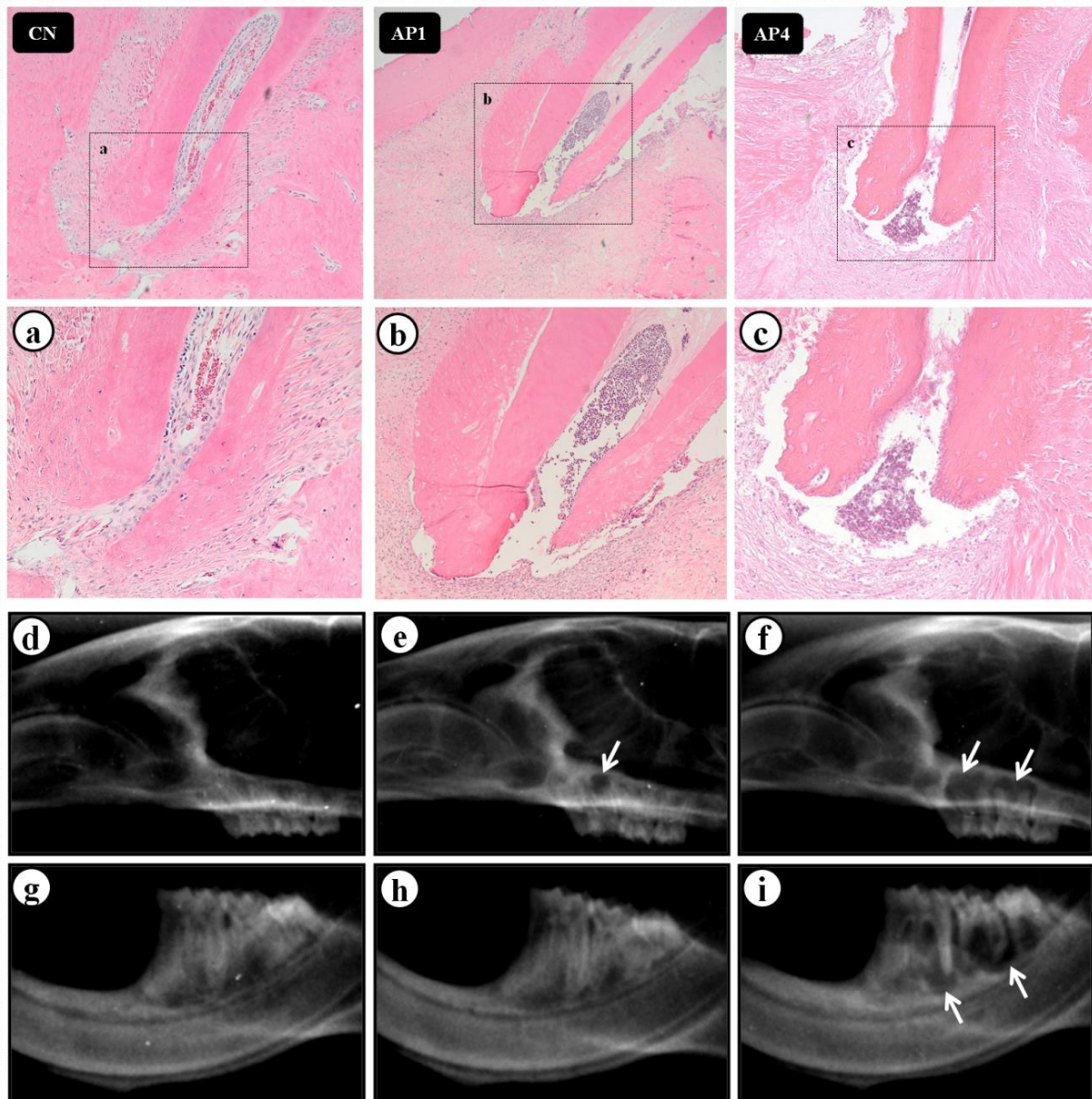
### **4.1 Análises histológica e radiográfica da região periapical das ratas mães**

No grupo CN, o ligamento periodontal, o canal radicular e o forame apical (Figura 3A) apresentaram características compatíveis com aspecto normal. As

imagens radiográficas (Figuras 3D e 3G) mostraram ausência de áreas radiolúcidas ao redor do ápice dentário.

Em ambos os grupos de ratas com AP (grupos AP1 e AP4), as polpas dentárias apresentaram necrose e as APs foram estabelecidas. As infiltrações de células inflamatórias na área ao redor do ápice dentário podem ser observadas nos grupos AP1 e AP4 (Figuras 3B e 3C). Com relação às imagens radiográficas, foram observadas áreas radiolúcidas na região periapical nos primeiros molares maxilares no grupo AP1 (Figuras 3E e 3H) e nos primeiros e segundos molares maxilares e mandibulares no grupo AP4 (Figuras 3F e 3I).

**Figura 3. A-C: Representação histológica (coloração hematoxilina e eosina) da região periapical do grupo controle (CN), do grupo com 1 periodontite apical (AP1) e do grupo com 4 periodontites apicais (AP4). A imagem A representa o grupo CN. As regiões apical e periapical estão livres de infiltrado inflamatório. As imagens B e C representam os grupos de ratas com periodontites apicais. Observa-se a presença de infiltrado inflamatório em torno do ápice dentário (ampliação original x100). D-I: Radiografias periapicais das hemimaxilas e hemimandíbulas do lado direito de ratas dos grupos CN (D e G), AP1 (E e H) e AP4 (F e I). As pontas das setas indicam as áreas radiolúcidas, sugerindo as periodontites apicais.**

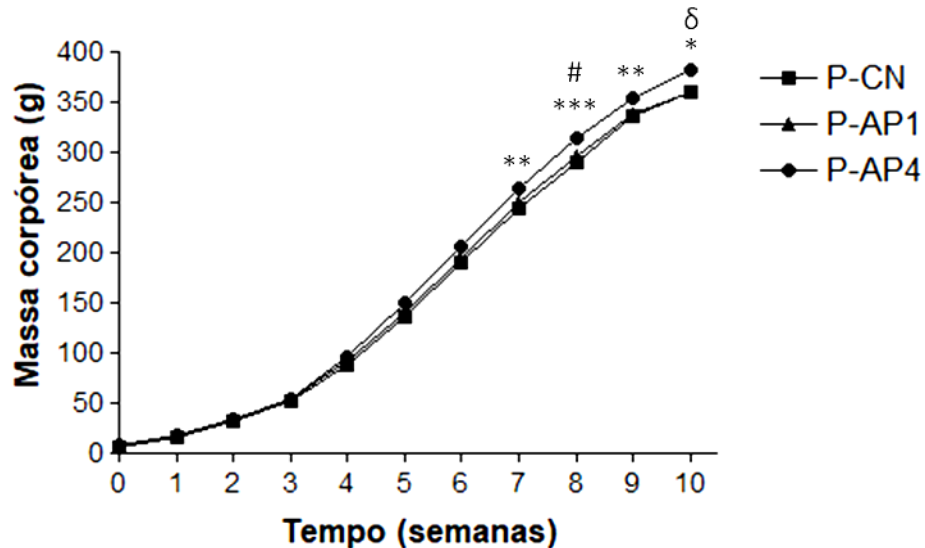


Fonte: do autor

## 4.2 Massa corpórea

A massa corpórea dos grupos proles de ratas controle (P-CN), proles de ratas com uma periodontite apical (P-AP1) e proles de ratas com quatro periodontites apicais (P-AP4) foram avaliadas semanalmente, desde o nascimento até 75 dias de idade. Não houve diferença na massa corpórea, ao nascimento, entre os grupos. Entretanto, o grupo P-AP4 apresentou aumento na massa corpórea, a partir da 7<sup>a</sup> até a 10<sup>a</sup> semana, comparado ao grupo P-CN, e na 8<sup>a</sup> e 10<sup>a</sup> semana, com relação ao grupo P-AP1. Por outro lado, não houve diferença estatística entre os grupos P-CN e P-AP1 nesse mesmo período (Figura 4).

Figura 4 – Massa corpórea semanal de ratos, proles de ratas controle (P-CN), proles de ratas com uma periodontite apical (P-AP1) e proles de ratas com quatro periodontites apicais (P-AP4), desde o nascimento até 75 dias de idade. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM de 45 animais por grupo. \* $p < 0,05$  P-CN vs. P-AP4; \*\* $p < 0,01$  P-CN vs. P-AP4; \*\*\* $p < 0,001$  P-CN vs. P-AP4;  $\delta p < 0,05$  P-AP1 vs. P-AP4; # $p < 0,01$  P-AP1 vs. P-AP4

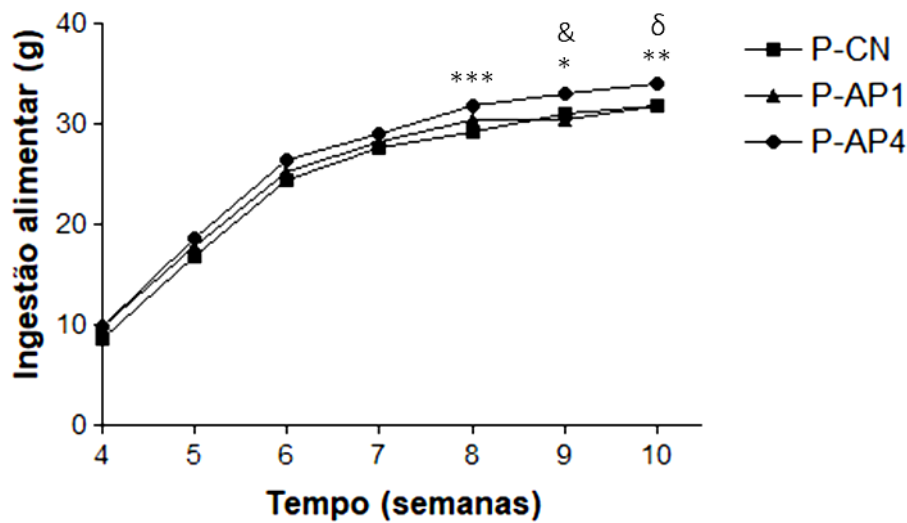


Fonte: do autor

### 4.3 Ingestão alimentar

A figura 5 mostra a ingestão alimentar dos grupos proles de ratas controle (P-CN), proles de ratas com uma periodontite apical (P-AP1) e proles de ratas com quatro periodontites apicais (P-AP4), avaliada semanalmente, a partir do desmame até o final do experimento. Não houve diferença estatística neste parâmetro entre os grupos P-CN e P-AP1. No entanto, o grupo P-AP4 apresentou maior consumo alimentar na 8ª, 9ª e 10ª semana em relação ao grupo P-CN, e na 9ª e 10ª semana comparado ao grupo P-AP1.

Figura 5 – Ingestão alimentar de ratos, proles de ratas controle (P-CN), proles de ratas com uma periodontite apical (P-AP1) e proles de ratas com quatro periodontites apicais (P-AP4), avaliada semanalmente desde o desmame (terceira semana) até o final do experimento. Os valores são apresentados como média  $\pm$  EPM de 45 animais por grupo. \* $p < 0,05$  P-CN vs. P-AP4; \*\* $p < 0,01$  P-CN vs. P-AP4; \*\*\* $p < 0,001$  P-CN vs. P-AP4;  $\delta p < 0,05$  P-AP1 vs. P-AP4;  $\& p < 0,001$  P-AP1 vs. P-AP4



Fonte: do autor

#### 4.4 Glicemia, insulinemia e HOMA-IR

Não houve diferença na glicemia de jejum entre os grupos. Entretanto, houve aumento tanto na insulinemia de jejum como no valor de HOMA-IR nos grupos P-AP1 e P-AP4 em relação ao grupo P-CN. Comparando-se os grupos P-AP1 e P-AP4, observou-se aumento nestes dois parâmetros no grupo P-AP4 em relação ao grupo P-AP1.

**Tabela 2 – Glicemia (mmol/L), insulinemia ( $\mu$ UI/mL) e Modelo de Avaliação da Homeostase da Resistência à Insulina (HOMA-IR) dos grupos proles de ratas controle (P-CN), proles de ratas com uma periodontite apical (P-AP1) e proles de ratas com quatro periodontites apicais (P-AP4).**

| Parâmetros                 | P-CN             | P-AP1              | P-AP4                     |
|----------------------------|------------------|--------------------|---------------------------|
| Glicemia (mmol/L)          | 10,29 $\pm$ 0,34 | 10,23 $\pm$ 0,40   | 10,34 $\pm$ 0,37          |
| Insulinemia ( $\mu$ UI/mL) | 44,15 $\pm$ 2,41 | 87,35 $\pm$ 5,52 * | 128,40 $\pm$ 18,02 ***; # |
| HOMA-IR                    | 20,74 $\pm$ 2,06 | 40,98 $\pm$ 3,93 * | 60,50 $\pm$ 8,15 ***; #   |

Valores expressos como média  $\pm$  EPM de 10 animais por grupo. \* $p < 0,05$  P-AP1 vs. P-CN; \*\*\* $p < 0,001$  P-AP4 vs. P-CN; # $p < 0,05$  P-AP4 vs. P-AP1

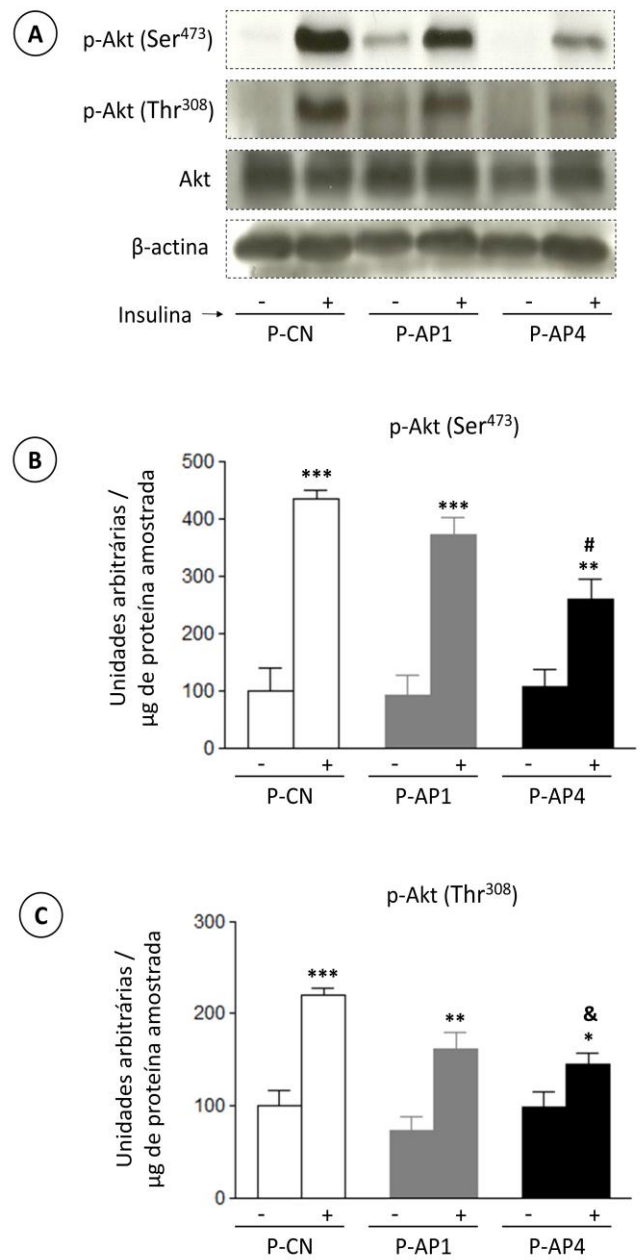
#### 4.5 Avaliação do grau de fosforilação em serina (Ser<sup>473</sup>) e treonina (Thr<sup>308</sup>) da Akt no MG

Na análise intragrupos, observou-se aumento no grau de fosforilação em serina e treonina da Akt, após o estímulo insulínico, com relação ao estado basal em todos os grupos.

Na análise intergrupos, após estímulo insulínico, o grau de fosforilação em serina e treonina da Akt foi reduzido no grupo P-AP4 em relação ao grupo PCN

(Figuras 6B e 6C). Entretanto, não houve diferença neste parâmetro tanto entre os grupos P-CN e P-AP1 como entre os grupos P-AP1 e P-AP4.

**Figura 6 – Avaliação do grau de fosforilação em serina (Ser<sup>473</sup>) e treonina (Thr<sup>308</sup>) da Akt, antes (-) e após (+) o estímulo insulínico, no músculo gastrocnêmio de proles de ratas controle (P-CN), proles de ratas com uma periodontite apical (P-AP1) e proles de ratas com quatro periodontites apicais (P-AP4). Em A, autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS PAGE (185 µg). β-actina foi utilizada como controle. Em B e C, os valores do grau de fosforilação em (Ser<sup>473</sup>) e treonina (Thr<sup>308</sup>) da Akt, respectivamente (expressos em unidades arbitrárias) são apresentados como média ± EPM de 6 animais por grupo. \*p<0,05 P-AP4 (-) vs. P-AP4 (+); \*\* p<0,01 P-AP1 (-) vs. P-AP1 (+) e P-AP4 (-) vs. P-AP4 (+); \*\*\*p<0,001 P-CN (-) vs. P-CN(+) e P-AP1 (-) vs. P-AP1 (+); #p<0,01 P-CN (+) vs. P-AP4 (+); &p<0,05 P-CN (+) vs. P-AP4 (+)**

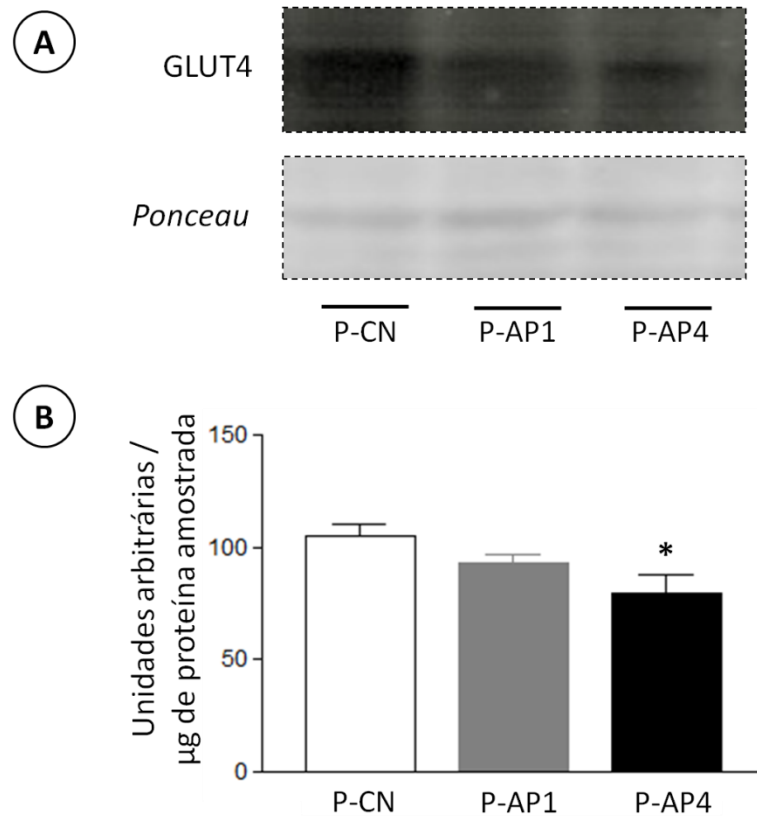


Fonte: do autor

#### 4.6 Avaliação do conteúdo de GLUT4

Houve diminuição na quantidade de proteína GLUT4 no grupo P-AP4 em comparação ao grupo P-CN. Entretanto não houve diferença estatística neste parâmetro tanto entre os grupos P-CN e P-AP1 como entre os grupos P-AP1 e P-AP4 (Figura 7).

**Figura 7 – Avaliação do conteúdo do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) no músculo gastrocnêmio de proles de ratas controle (P-CN), proles de ratas com uma periodontite apical (P-AP1) e proles de ratas com quatro periodontites apicais (P-AP4). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. \*  $p < 0,05$  P-AP4 vs. P-CN**

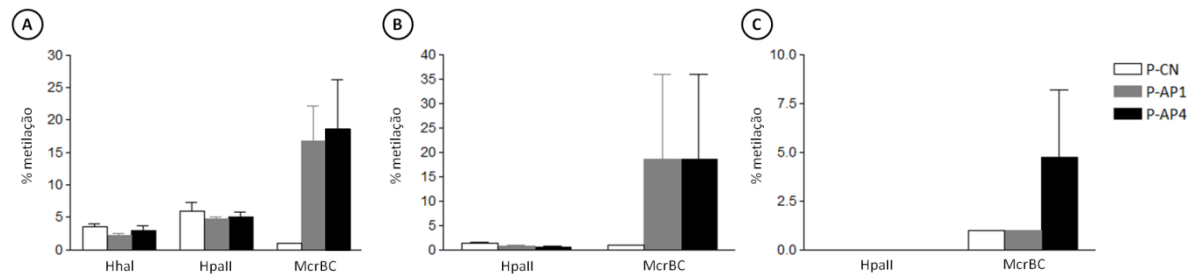


Fonte: do autor

#### 4.7 Avaliação do grau de metilação do DNA na região promotora do gene do GLUT4

Não houve diferença no grau de metilação do DNA na região analisada, localizada no promotor proximal do gene do GLUT4 entre os grupos no tecido analisado (Figura 8).

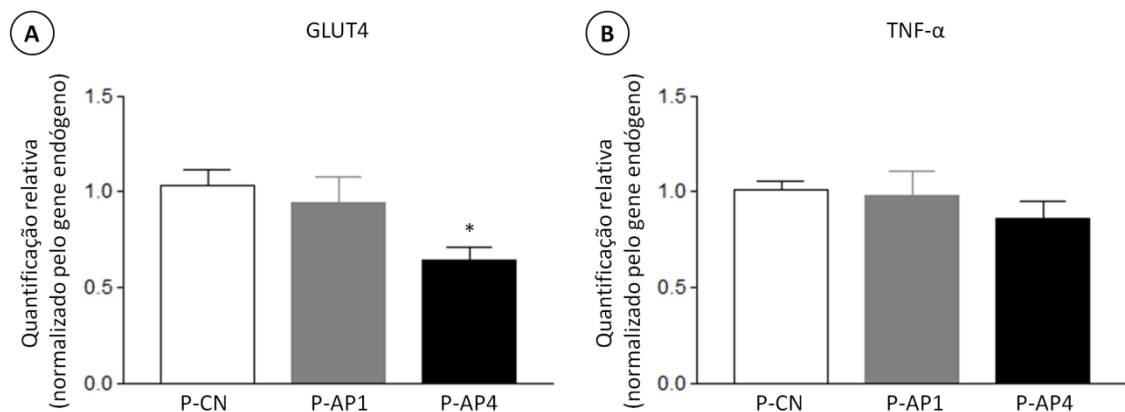
**Figura 8 – Avaliação da metilação do DNA na região promotora do gene *Slc2a4* no músculo gastrocnêmio de proles de ratas controle (P-CN), proles de ratas com uma periodontite apical (P-AP1) e proles de ratas com quatro periodontites apicais (P-AP4). Foram utilizados dois locais de restrição de enzimas sensíveis à metilação (HhaI e HpaII) e uma enzima dependente de metilação (McrBC), (A, B e C) três regiões separadas dentro do promotor proximal, denominado prom 1, prom 2 e prom 3, do gene *Slc2a4* foram analisados. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM de 4 animais por grupo.**



#### 4.8 Avaliação da expressão gênica de GLUT4 e TNF- $\alpha$ no MG

Houve diminuição na expressão gênica de GLUT4 no grupo P-AP4 comparado ao grupo P-CN. Entretanto não houve diferença estatística neste parâmetro tanto entre os grupos P-CN e P-AP1 como entre os grupos P-AP1 e P-AP4 (Figura 9A). Ademais, não houve diferença na expressão gênica de TNF- $\alpha$  entre os grupos (Figura 9B).

**Figura 9 – Avaliação da expressão gênica do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) no músculo gastrocnêmio de proles de ratas controle (P-CN), proles de ratas com uma periodontite apical (P-AP1) e proles de ratas com quatro periodontites apicais (P-AP4). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM de 5 animais por grupo. \*  $p < 0,05$  P-AP4 vs. P-CN**

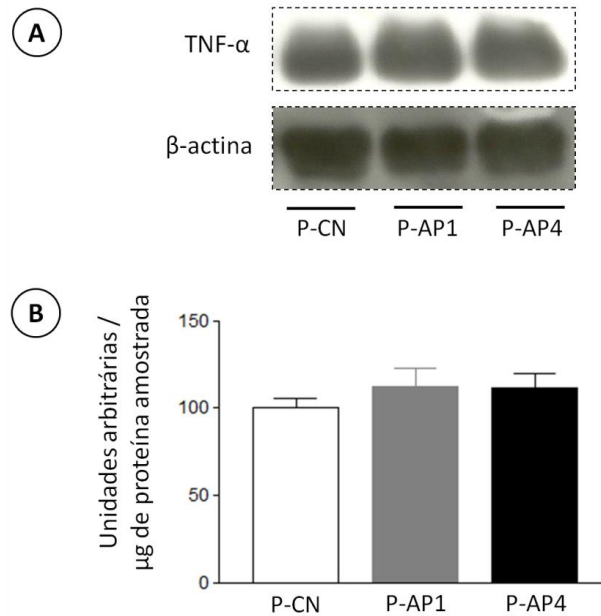


Fonte: do autor

#### 4.9 Avaliação do conteúdo de TNF- $\alpha$ no MG

Não houve diferença no conteúdo proteico de TNF- $\alpha$  entre os grupos no tecido analisado (Figura 10).

**Figura 10 – Avaliação do conteúdo de fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) no músculo gastrocnêmio de proles de ratas controle (P-CN), proles de ratas com uma periodontite apical (P-AP1) e proles de ratas com quatro periodontites apicais (P-AP4). Em A, autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185  $\mu$ g).  $\beta$ -actina foi utilizada como controle. Em B, o valor do conteúdo de TNF- $\alpha$ , expressos em unidades arbitrárias, é apresentado como média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo.**

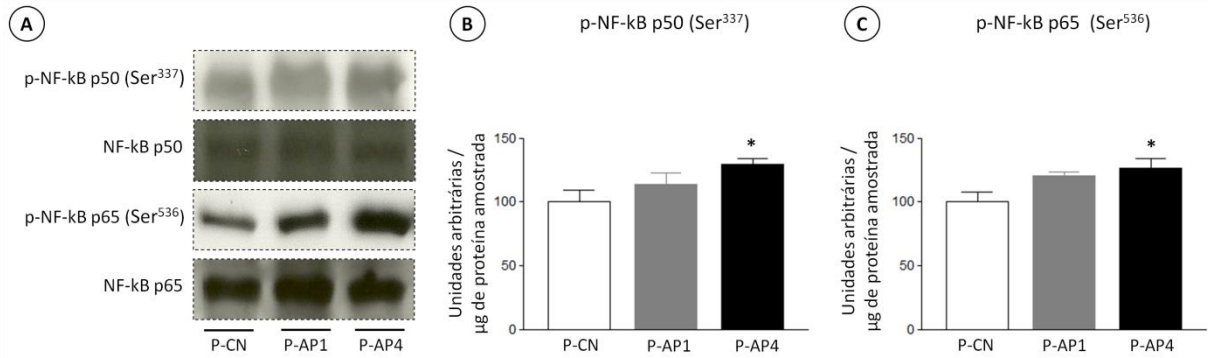


Fonte: do autor

#### 4.10 Grau de fosforilação de NF-kB p50 e NF-kB p65

Houve aumento no grau de fosforilação de NF-kB p50 e NF-kB p65 no MG no grupo P-AP4 em comparação com o grupo P-CN. Entretanto, não houve diferença nesses parâmetros entre os grupos P-CN e P-AP1, e entre os grupos P-AP1 e P-AP4 (Figuras 11B e 11C).

**Figura 11 – Avaliação do grau de fosforilação de NF-kB p50 e NF-kB p65 no gastrocnêmio de proles de ratas controle (P-CN), proles de ratas com uma periodontite apical (P-AP1) e proles de ratas com quatro periodontites apicais (P-AP4). Em A, autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185  $\mu$ g). Os conteúdos de NF-kB p50 e NF-kB p65 foram utilizados como controle. Em B e C, os valores do grau de fosforilação de NF-kB p50 e NF-kB p65, respectivamente (expressos em unidades arbitrárias) são apresentados como média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. \*  $p < 0,05$  P-AP4 vs. P-CN**

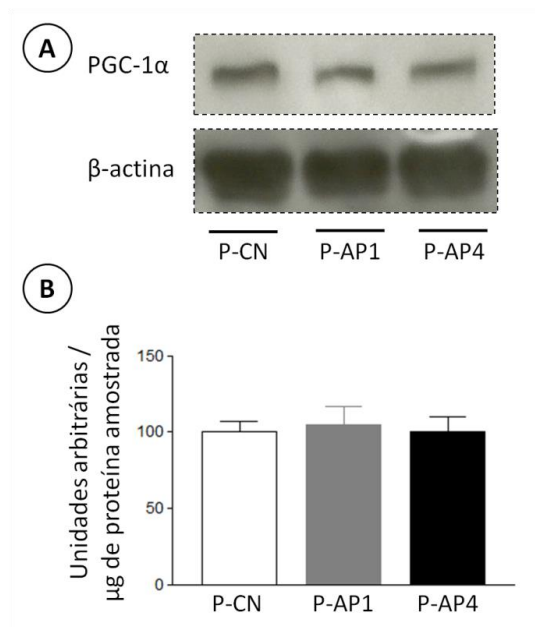


Fonte: do autor

#### 4.11 Conteúdo de PGC-1 $\alpha$

Não houve diferença estatística no conteúdo de PGC-1 $\alpha$  no MG entre os grupos (Figura 12B).

**Figura 12 – Avaliação do conteúdo de PGC-1 $\alpha$  no gastrocnêmio de proles de ratas controle (P-CN), proles de ratas com uma periodontite apical (P-AP1) e proles de ratas com quatro periodontites apicais (P-AP4). Em A, autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 µg).  $\beta$ -actina foi utilizada como controle. Em B, os valores do conteúdo de PGC-1 $\alpha$  (expressos em unidades arbitrárias) são apresentados como média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo.**

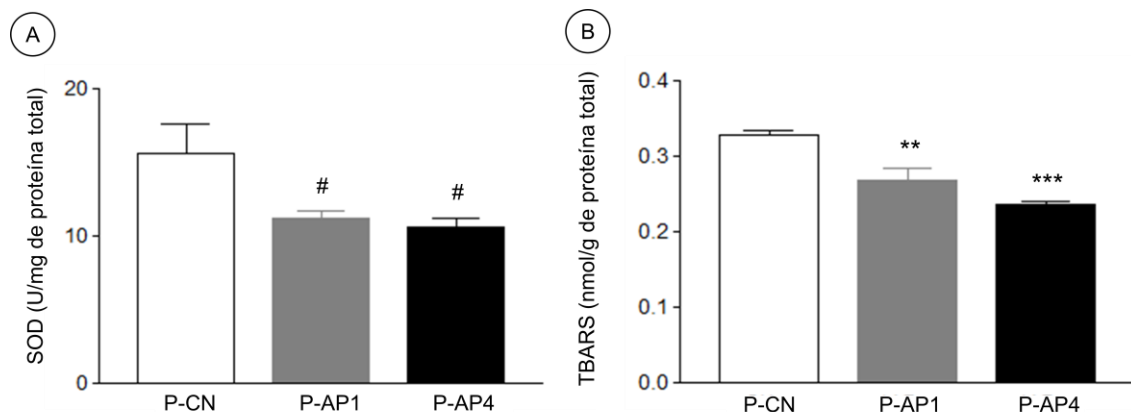


Fonte: do autor

#### 4.12 Grau de estresse oxidativo (SOD e TBARS) no MG

Houve diminuição na atividade de SOD nos grupos P-AP1 e P-AP4 em comparação com o grupo P-CN. No entanto, não houve diferença neste parâmetro entre os grupos P-AP1 e P-AP4 (Figura 13A). Ademais, houve diminuição na concentração de TBARS nos grupos P-AP1 e P-AP4 em comparação com o grupo P-CN. Entretanto, não houve diferença neste parâmetro entre os grupos de proles de ratas com AP (Figura 13B).

**Figura 13 – Avaliação da atividade da superóxido dismutase – SOD (A) e concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS (B), normalizados pela proteína total no músculo gastrocnêmio de proles de ratas controle (P-CN), proles de ratas com uma periodontite apical (P-AP1) e proles de ratas com quatro periodontites apicais (P-AP4). Os valores são apresentados como a média  $\pm$  EPM (n = 10 animais por grupo). #  $p < 0,05$  P-CN vs. P-AP1 e P-AP4; \*\*  $p < 0,01$  P-CN vs. P-AP1 e P-AP4; \*\*\*  $p < 0,001$  P-AP1 vs. P-CN**



Fonte: do autor

## 5 DISCUSSÃO

No presente estudo, mostramos que a inflamação oral materna, tal como a AP, está associada às alterações na saúde sistêmica da prole adulta. A AP materna (tanto 1 foco de infecção como 4 focos de infecções) promoveu hiperinsulinemia, RI e diminuição na atividade antioxidante da SOD e na concentração de TBARS no MG de sua prole adulta. Ademais, em relação à insulinemia e RI houve incremento nestes parâmetros na prole adulta em decorrência do aumento do número de foco de infecção endodôntica materna. Os resultados mostraram que somente a AP materna em quatro dentes promoveu

aumento na massa corpórea, na ingestão alimentar e no grau de fosforilação das subunidades p50 e p65 do NF- $\kappa$ B no MG de proles adultos. Ademais, houve diminuição no grau de fosforilação em serina e treonina da Akt (após estímulo insulínico) e na expressão gênica e no conteúdo proteico de GLUT4 no MG em proles adultos de ratas com 4APs. Entretanto, em relação aos grupos P-CN e P-AP1 não houve diferença nestes últimos parâmetros. A AP materna não promoveu alteração na glicemia de jejum, conteúdo de PGC-1 $\alpha$ , grau de metilação do DNA na região promotora do gene do GLUT4 e expressão gênica e conteúdo proteico de TNF- $\alpha$  no MG de proles adultos.

As imagens histológica e radiográfica das regiões periapicais das ratas mães comprovaram a instalação das APs, as quais foram induzidas por meio da abertura coronária com auxílio de uma broca cirúrgica e subsequente exposição da polpa dentária à cavidade oral. Stashenko *et al.* (1994) revelaram que as lesões expandem-se rapidamente nos primeiros 7 a 20 dias após a exposição pulpar (fase aguda) e desacelera a partir deste período (fase crônica). No presente estudo, após 75 dias de exposição pulpar foi observada a presença de necrose da polpa dentária e infiltração de células inflamatórias na área ao redor do ápice dentário (Figuras 3B e 2C) em ambos os grupos de ratas mães com AP (AP1 e AP4). Ademais, as imagens radiográficas mostraram extensas áreas radiolúcidas na região periapical dos primeiros molares maxilares no grupo AP1 (Figuras 3E e 3H) e dos primeiros e segundos molares maxilares e mandibulares no grupo AP4 (Figuras 3F e 3I). Estes achados estão de acordo com os estudos de Teixeira *et al.* (2011) e Botelho *et al.* (2023), os quais também confirmaram que apenas a abertura coronal e o contato da polpa com a cavidade oral eram suficientes para induzir a AP.

Evidências científicas relataram que a AP materna está associada às complicações gestacionais adversas, tais como pré-eclâmpsia (KHALIGHINEJAD *et al.*, 2017) e nascimento de bebês prematuros com baixo peso (LEAL *et al.*, 2015; HARJUNMA *et al.*, 2015). Entretanto, no presente estudo não foi verificada diferença na massa corpórea ao nascimento entre os grupos (Figura 3).

Ao analisarmos semanalmente a evolução da massa corporal, o grupo P-AP1 não demonstrou diferença estatística neste parâmetro, desde o nascimento até o final do experimento, quando comparado ao grupo P-CN (Figura 4). Entretanto, o grupo P-AP4 apresentou aumento na massa corpórea, a partir da 7<sup>a</sup> até a 10<sup>a</sup> semana, comparado ao grupo P-CN, e na 8<sup>a</sup> e 10<sup>a</sup> semana, com relação ao grupo P-

AP1 (Figura 4). Sugere-se que o aumento na ingestão alimentar verificado no grupo P-AP4 (Figura 5) pode ter contribuído para o aumento da massa corpórea neste grupo de animais.

Com relação aos parâmetros metabólicos, os resultados mostraram que os grupos P-AP1 e P-AP4 apresentaram aumento na insulinemia de jejum e nos valores do índice de HOMA-IR, indicando RI nestes grupos de animais em relação ao grupo P-CN. Ademais, o número de focos de infecção endodôntica materna promoveu uma piora nestes parâmetros avaliados, ou seja, o grupo P-AP4 apresentou maior RI e insulinemia de jejum em relação ao grupo P-AP1. Por outro lado, não houve diferença na glicemia de jejum entre todos os grupos avaliados (Tabela 1), que pode ser resultante do aumento compensatório na secreção de insulina pelas células  $\beta$  do pâncreas para manter a normoglicemia nos grupos P-AP1 e P-AP4. Resultados similares foram observados nos estudos de Shirakashi *et al.* (2013), Mattera *et al.* (2016) e Mattera *et al.* (2019), os quais relataram que ratos adultos, proles de ratas com DP (outra inflamação oral) apresentaram RI. Sabe-se que a contínua RI pode provocar esgotamento das células  $\beta$  pancreática, ocasionando uma grande diminuição na secreção de insulina, promovendo hiperglicemia e desenvolvimento de DM2 (KUMAR *et al.*, 2013).

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

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

No ARC, há duas populações neuronais funcionalmente antagônicas: 1) neurônios que expressam neuropeptídeos orexígenos (neuropeptídeo Y – NPY e

peptídeo relacionado ao gene agouti – AgRP); 2) neurônios que expressam neuropeptídeos anorexígenos (proopiomelanocortina – POMC e transcrito regulado pela cocaína e anfetamina – CART) (YU; KIM, 2012). A ligação da insulina ao seu receptor em neurônios do ARC estimula a via IRS/PI3K/Akt. A fosforilação da Akt promove inativação do fator de transcrição Forkhead box O1 (FoxO1), levando à diminuição na expressão de AgRP e aumento na expressão de POMC, resultando em ação anorexígena (KHANH *et al.*, 2014). Esse mecanismo molecular mostra o papel importante da insulina no controle central do apetite. Diante deste contexto, é possível sugerir que a RI e hiperinsulinemia observadas no grupo P-AP4 possam estar associadas à maior ingestão alimentar nestes animais.

Diante da situação de RI, estudos demonstram que há diminuição da atividade de Akt. Como descrito anteriormente, a Akt desempenha um papel fundamental no processo de captação de glicose mediada pelo estímulo insulínico, promovendo a translocação das vesículas de GLUT4 do citoplasma para a membrana plasmática (WHITEMAN *et al.*, 2002). Nossos resultados revelaram que houve uma diminuição no grau de fosforilação da serina e treonina da Akt, após estímulo insulínico, somente no grupo P-AP4 em comparação ao grupo P-CN (Figura 6). Estes resultados estão de acordo com estudo conduzidos com outras condições adversas maternas, nos quais verificaram que a dieta com baixo teor de proteína (XING *et al.*, 2019) ou doença periodontal (MATTERA *et al.*, 2016) promoveram diminuição no grau de fosforilação de Akt em serina no músculo esquelético de sua prole adulta com RI.

Sabendo-se que Akt é uma importante proteína envolvida na translocação de GLUT4, esta proteína também constituiu alvo de nosso estudo. O músculo esquelético constitui principal tecido de captação de glicose mediada pela insulina no estado pós-prandial (DeFRONZO, 2003). Nossos resultados mostraram que houve diminuição tanto na expressão gênica como no conteúdo proteico de GLUT4 em músculo esquelético somente no grupo P-AP4 em comparação com o grupo P-CN (Figuras 7 e 9). Estudos mostram que a transdução prejudicada do SI está associada à diminuição de GLUT4 (XU, SONG, ZHANG 2015). Portanto, com base nos resultados obtidos no presente estudo, podemos sugerir que a alteração na expressão proteica de GLUT4 está associada à RI em ratos adultos, proles de ratas com 4AP.

Observamos anteriormente um aumento na concentração plasmática de

TNF- $\alpha$  nos grupos P-AP1 e P-AP4 em comparação com o grupo P-CN (Tsosura *et al.*, 2019). No entanto, no presente estudo não houve diferença, tanto na expressão gênica como no conteúdo proteico de TNF- $\alpha$  no MG entre os grupos (Figuras 9 e 10). Isso sugere que proles de ratas com AP mostra apenas uma alteração plasmática na concentração desta citocina inflamatória, promovendo a RI.

A sensibilidade prejudicada à insulina no músculo esquelético é um dos fatores que contribuem para a disfunção metabólica e isso foi observado em proles expostos a um ambiente intrauterino adverso (LAKER *et al.* 2013). Evidências científicas apoiam um papel para a regulação epigenética alterada no feto em resposta à mudanças no ambiente intrauterino (LAKER *et al.* 2013). A metilação do DNA é um dos mecanismos epigenéticos mais conhecidos e associados ao silenciamento gênico (LIM, MAHER 2010; HE *et al.* 2018). Foi relatado que ratos adultos, proles de ratas submetidas à exposição oral ao di(2-etilhexil ftalato) apresentam RI associada ao aumento da metilação e diminuição da expressão gênica de GLUT4 no músculo esquelético (RAJESH, BALASUBRAMANIAN 2014). Além disso, no estudo de Liu *et al.* (2013) foi verificado que a supernutrição durante o período de amamentação promove hipermetilação de dinucleotídeos CpG específicos na região promotora proximal do gene GLUT4, no qual foi correlacionada à redução da expressão de mRNA de GLUT4 no músculo esquelético de proles adultos. Ademais, Liu *et al.* (2013) sugeriram que a modificação epigenética dos principais genes envolvidos na sinalização da insulina no músculo esquelético pode resultar no desenvolvimento de RI em proles na vida adulta. Portanto, foi hipotetizado que a RI em ratos adultos, prole de ratas com AP é mediada em parte pela metilação alterada do DNA do GLUT4. No entanto, nosso estudo não encontrou nenhuma alteração na metilação do DNA nas regiões promotoras estudadas de *Slc2a4* no MG (Figura 8). Diante deste resultado, sugere-se a análise em outras do promotor para verificar se há associação entre metilação do DNA e diminuição na expressão gênica de GLUT4. Esse achado está de acordo com o estudo de Mattera *et al.* (2019) no qual relatou que a DP materna promove RI na prole adulta, independente de alteração na metilação do DNA na região promotora proximal do *Slc2a4* no músculo esquelético. Além disso, outros estudos também não encontraram associação entre RI e mudanças na metilação do DNA na prole adulta (RAYCHAUDHURI *et al.* 2008; ZENG *et al.* 2013; DUAN *et al.* 2016).

Conforme mencionado anteriormente, nossos resultados revelaram que houve diminuição na expressão do gene GLUT4 no MG do grupo P-AP4 em relação ao grupo P-CN, independentemente das alterações na metilação do DNA, sugerindo que outros mecanismos moleculares estão envolvidos nesta alteração na expressão gênica e proteica de GLUT4. Furuya *et al.* (2013) mostraram que as subunidades p50 e p65 do NF- $\kappa$ B podem se ligar ao promotor do gene *Slc2a4* e inibir a sua transcrição, demonstrando que este fator de transcrição inflamatório tem um efeito repressor direto sobre o gene *Slc2a4*, fornecendo uma importante ligação entre RI e inflamação. O NF- $\kappa$ B é um regulador mestre da inflamação, sendo necessário para a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$  (CHEN *et al.* 2015). Nesse contexto, há estudos demonstrando que a obesidade promove ativação de vias pró-inflamatórias nas células-alvo da insulina, levando a RI (SCHENK *et al.* 2008). No entanto, a sensibilidade sistêmica à insulina é aumentada pela inativação de NF- $\kappa$ B por meio da deleção do gene p65 no fígado de camundongos alimentados com uma dieta rica em gordura (KE *et al.* 2015). Nossos resultados revelaram que houve aumento no grau de fosforilação das subunidades p50 e p65 do NF- $\kappa$ B no grupo P-AP4 em comparação ao grupo P-CN (Figura 11). Sugere-se que a diminuição na expressão do gene GLUT4 observada no grupo P-AP4 está associada a um aumento na atividade do NF- $\kappa$ B no MG. Nossos achados estão de acordo com o estudo de Guo *et al.* (2016), no qual mostrou que proles adultos submetidos à exposição pré-natal a lipopolissacarídeo apresentam aumento no grau de fosforilação de NF- $\kappa$ B p65 no tecido renal.

Os resultados referentes às análises de ativação de Akt, expressão de GLUT4 e ativação de NF- $\kappa$ B demonstraram houve alterações somente no grupo P-AP4 em relação ao grupo controle, demonstrando que a AP materna com 4 lesões promove maiores adversidades em relação a uma lesão.

Estudos mostraram que PGC-1 $\alpha$  desempenha um papel no metabolismo da glicose (MICHAEL *et al.* 2001; WU *et al.* 2016). Em um estudo *in vitro*, PGC-1 $\alpha$  aumentou a expressão de GLUT4, em grande parte pela ligação e coativação do fator de transcrição seletivo de músculo MEF2C (MICHAEL *et al.* 2001). Em conjunto, as evidências apresentadas suportam um papel para PGC-1 $\alpha$  na prevenção de RI e diabetes *mellitus* tipo 2 (WU *et al.* 2016). Portanto, para esclarecer os mecanismos envolvidos na RI em proles de ratas com AP, foi analisado o conteúdo de PGC-1 $\alpha$  no MG. Os resultados não mostraram alteração

neste parâmetro entre os grupos (Figura 12). Isso sugere que, no presente estudo, o PGC-1 $\alpha$  não foi associado a alterações na expressão do gene GLUT4 no MG de proles de ratas com AP.

O estresse oxidativo tem sido reconhecido como um mecanismo chave da RI (HURRLE; HSU, 2017). Estudos têm demonstrado que a exposição dos miócitos ao estresse oxidativo de baixo grau induz o comprometimento da sinalização da insulina (DOKKEN *et al.*, 2008) e reduz o transporte de glicose estimulado pela insulina (DOKKEN *et al.*, 2008; MADDUX *et al.*, 2001).

Sabe-se que o excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs) pode causar danos às macromoléculas celulares (NITA, 2016). Salienta-se que as EROs desempenham um papel importante na sinalização insulínica em condições fisiológicas, possivelmente devido a uma diminuição na atividade da proteína tirosina fosfatase mediada por EROs. Assim, o grau de geração de EROs determina aumento ou supressão de sinal insulínico, ou seja, embora as EROs produzidas por estímulos fisiológicos possam ser benéficas, a geração de EROs em excesso está associada à RI (LOH *et al.*, 2009).

A peroxidação lipídica é um produto da oxidação considerado um biomarcador do estresse oxidativo que pode estar associado à RI (ZEB; ULLAH, 2016). No estudo de Padmavathi *et al.* (2011) foi relatado que a restrição materna a micronutrientes promove RI e aumenta a peroxidação lipídica no fígado de proles adultos. Além disso, Al-amin *et al.* (2016) observaram aumento na peroxidação lipídica no tecido cerebral de proles expostos ao lipopolissacarídeo durante o período pré-natal em comparação ao controle.

Nossos resultados mostraram que houve diminuição significativa na concentração de TBARS no MG nos grupos P-AP1 e P-AP4 em comparação com o grupo P-CN (Figura 13). Este resultado parece paradoxal, pois seria esperado um aumento desse marcador de dano lipídico. Essa redução pode ser explicada pela grande utilização da SOD, que é um antioxidante, comprovado pelos nossos resultados nos quais observou-se a redução da SOD nos grupos P-AP1 e P-AP4.

A redução da SOD pode ser um indicativo que a reserva endógena foi consumida amplamente, uma vez este antioxidante enzimático constitui um componente do sistema de defesa de primeira linha contra EROs (IGHODARO; AKINLOYE, 2018). Podemos inferir que o AP modula o sistema de defesa antioxidante no MG de sua prole adulta, atenuando a peroxidação lipídica nesse

tecido. Isso reflete parte de uma resposta adaptativa da prole ao estímulo do processo inflamatório oral crônico materno, no qual o organismo atua diminuindo o dano tecidual oxidativo na fase pós-natal. Nossos resultados estão de acordo com o estudo de Al-Amin *et al.* (2016), no qual os autores verificaram uma redução na atividade da SOD no tecido cerebral de proles expostos ao lipopolissacarídeo durante o período pré-natal em comparação com o controle. Além disso, em um estudo de Ouardi *et al.* (28), uma diminuição na atividade da SOD no tecido cerebral foi observada em proles expostos ao malation (pesticida organofosforado) durante os períodos de gestação e lactação.

## 6 RESUMO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS

A AP materna (tanto em um único dente ou em quatro dentes) promoveu em sua prole adulta:

- aumento nas concentrações plasmáticas de insulina;
- resistência insulínica;
- nenhuma alteração na glicemia de jejum;
- diminuição na atividade antioxidante da SOD no MG;
- diminuição na concentração de TBARS no MG;
- nenhuma alteração no conteúdo de PGC-1 $\alpha$  no MG;
- nenhuma alteração no grau de metilação do DNA na região promotora proximal do gene do GLUT4 no MG;
- nenhuma alteração na expressão gênica e conteúdo proteico de TNF- $\alpha$  no MG.

Ademais, em relação à insulinemia, RI, atividade antioxidante da SOD e concentração tecidual de TBARS, tivemos incremento nestas alterações na prole adulta em decorrência do aumento do número de foco de infecção endodôntica materna. No entanto, apenas AP materna em quatro dentes ocasionou em sua prole adulta:

- aumento na massa corpórea e ingestão alimentar;
- aumento no grau de fosforilação das subunidades p50 e p65 do NF- $\kappa$ B no MG;
- diminuição no grau de fosforilação em serina e treonina da Akt (após estímulo insulínico);
- diminuição na expressão gênica e no conteúdo proteico de GLUT4 no MG.

## 7 CONCLUSÃO

A inflamação oral materna, tal como a AP, está relacionada às alterações sistêmicas na prole adulta, incluindo RI, aumento no estresse oxidativo, prejuízo na transdução da etapa final do sinal insulínico e ativação da via inflamatória relacionada à atenuação do sinal insulínico. Algumas alterações, tais como a insulinemia e RI, foram mais pronunciadas quando houve aumento no número de focos de infecção endodôntica materna. Ademais, os resultados referentes às análises de ativação de Akt, expressão de GLUT4 e ativação de NF- $\kappa$ B demonstraram que houve alterações somente no grupo P-AP4 em relação ao grupo controle, concluindo que a AP materna com 4 lesões promove maiores adversidades em relação a uma lesão.

Esses resultados revelam o impacto que a AP materna tem em longo prazo na predisposição as alterações metabólicas na fase adulta da prole. Isso reforça a importância que a manutenção da saúde bucal materna tem sobre a saúde geral da prole.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-AMIN, M. M. *et al.* Prenatal maternal lipopolysaccharide administration leads to age- and region-specific oxidative stress in the early developmental stage in offspring. **Neuroscience**, v. 318, p. 84-93, 2016.

ALESSI, D. R. *et al.* Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. **Curr Biol.**, v. 7, n. 4, p. 261-269, 1997.

BARKER, D. J. Fetal origins of coronary heart disease. **BMJ**, v. 311, n. 6998, p. 171-174, 1995.

BARTHEL, C. R. *et al.* TNF-alpha release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated Escherichia coli LPS. **Int. Endod. J.**, v. 30, n. 3, p. 155-9, 1997.

BAYLIN SB. DNA methylation and gene silencing in cancer. **Nat Clin Pract Oncol.**, v. 2, Suppl 1, S4-11, 2005.

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.

BERTOLINI BOTELHO, M. C. *et al.* Early life stress exacerbates bone resorption and inhibits anxiety-like behaviour induced by apical periodontitis in rats. **Int Endod J.**, v. 56, n. 2, p. 203-212, 2023.

BIRBEN, E. *et al.* Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organ J.**, v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012.

BLOCH-DAMTI, A.; BASHAN, N. Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. **Antioxid Redox Signal.**, v. 7, n. 11-12, p. 1553-1567, 2005.

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.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Meth. Enzymol.**, v. 52, p. 302-9, 1978.

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

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

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

DE FRONZO, R. A.; TRIPATHY, D. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. **Diabetes Care**, Suppl 2:S157-163, 2003.

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.

DIETERICH, S. *et al.* Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart. Increased expression of catalase in the end-stage failing heart. **Circulation**, v. 101, p. 33-39, 2000.

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

DOKKEN, B. B. *et al.* Oxidative stress-induced insulin resistance in rat skeletal muscle: role of glycogen synthase kinase-3. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 294, n. 3, E615-21, 2008.

EGGER, G. *et al.* Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature**, v. 429, 2004.

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

FURUYA, D. T. *et al.* Identification of nuclear factor- $\kappa$ B sites in the Slc2a4 gene promoter. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 370, n. 1-2, p. 97-95, 2013.

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.

GICQUEL, C.; EL-OSTA, A.; BOUC, Y. L. Epigenetic regulation and fetal programming. **Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 22, n. 1, p. 1-16, 2008.

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

GUO, W. *et al.* Post-Natal Inhibition of NF- $\kappa$ B Activation Prevents Renal Damage Caused by Prenatal LPS Exposure. **PLoS One**, v. 11, n. 4, e0153434, 2016.

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

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.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Regulation of NF- $\kappa$ B by TNF family cytokines. **Semin Immunol.**, v. 26, n. 3, p. 253-266, 2014.

HE, Z. *et al.* Role of genetic and environmental factors in DNA methylation of lipid metabolism. **Genes Dis.**, v. 5, n. 1, p. 9-15, 2017.

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- $\alpha$ - and obesity-induced insulin resistance. **Science**, v. 271, n. 5249, p. 665-658, 1996.

HURRLE, S.; HSU, W. H. The etiology of oxidative stress in insulin resistance. **Biomed J.**, v. 40, n. 5, p. 257-262, 2017.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria J Med.**, v. 54, Issue 4, p. 87-293, 2018.

JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nature genetics**, v. 33, Suppl 245-254, 2003.

JAGER, J. *et al.* Interleukin-1beta-induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. **Endocrinology**, v. 148, n. 1, p. 241-251, 2007.

JAKOVLJEVIC, A. *et al.* Prevalence of apical periodontitis and conventional nonsurgical root canal treatment in general adult population: an updated systematic review and meta-analysis of cross-sectional studies published between 2012 and 2020. **J Endod.**, v. 46, n. 10, p. 1371-1386.e8, 2020.

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.

KE, B. *et al.* Inactivation of NF- $\kappa$ B p65 (RelA) in Liver Improves Insulin Sensitivity and Inhibits cAMP/PKA Pathway. **Diabetes**, n. 64, n. 10, p. 3355-3362, 2015.

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

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

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

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.

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

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

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

LAKER, R. C. *et al.* Epigenetic origins of metabolic disease: The impact of the maternal condition to the offspring epigenome and later health consequences. **Food Sci. Hum. Wellness.**, v. 2, Issue 1, p. 1-11, 2013.

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

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

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

LIANG, H.; WARD, W. F. PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. **Adv Physiol Educ.**, v. 30, n. 4, p. 145-151, 2006.

LIM, D. H. K.; MAHER, E. R. DNA methylation: a form of epigenetic control of gene expression. **Obstet. Gynecol.**, v. 12, p. 37-42, 2010.

LIU, H. W. *et al.* Developmental programming in skeletal muscle in response to overnourishment in the immediate postnatal life in rats. **J. Nutr. Biochem.**, v. 24, n. 11, p. 1859-1869, 2013.

LOH, K. *et al.* Reactive oxygen species enhance insulin sensitivity. **Cell Metab.**, v. 10, n. 4, p. 260-272, 2009.

LOWRY, O. H. *et al.* 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.

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.

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

MARITIM, A. C.; SANDERS, R. A.; WATKINS, J. B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. **J Biochem Molecular Toxicology**, v. 17, n. 1, 2003.

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.

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. **J Periodontol.**, v. 90, n. 8, p. 884-893, 2019.

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.

MICHAEL, L. F. *et al.* Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 98, n. 7, p. 3820-3825, 2001.

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

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

NEVES, J. *et al.* Reduced and oxidized glutathione of the placenta in pregnancy complicated by pre-eclampsia. **Acta Med Port.**, v. 10, n. 5, p. 357-60, 1997.

NITA, M.; GRZYBOWSKI, A. The role of the reactive oxygen species and oxidative stress in the pathomechanism of the age-related ocular diseases and other pathologies of the anterior and posterior eye segments in adults. **Oxid Med Cell Longev.**, p. 3164734, 2016.

OAKES, C. C. *et al.* Restriction digestion and real-time PCR (qAMP). **Methods Mol Biol**, v. 507, p. 271-80, 2009.

OLIVEIRA, N. F. P. *et al.* Metilação de DNA e Câncer. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 56, n. 4, p. 493-499, 2010.

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

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

PERSSON, T.; POPESCU, B. O.; CEDAZO-MINGUEZ, A. Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail?. **Oxid Med Cell Longev.**, p. 427318, 2014.

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.

RAINS, J. L.; JAIN, S. K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. **Free Radic Biol Med.**, v. 50, n. 5, p. 567-575, 2011.

RAJESH P, BALASUBRAMANIAN K. Phthalate exposure in utero causes epigenetic changes and impairs insulin signalling. **J Endocrinol.**, v. 223, n. 1, p. 47-66, 2014.

RAYCHAUDHURI, N. *et al.* Histone code modifications repress glucose transporter 4 expression in the intrauterine growth-restricted offspring. **J Biol Chem.**, v. 283, n. 20, p. 13611-13626, 2008.

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.

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.

SARBASSOV, D. D. *et al.* Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. **Science**, v. 307, n. 5712, p. 1098-1101, 2005.

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. **J Clin Invest.**, v. 118, n. 9, p. 2992-3002, 2008.

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.

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.

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. A critical analysis of research methods and experimental models to study the root canal microbiome. **Int. Endod. J.**, v. 55, Suppl 1, p. 46-71, 2022.

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.

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

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

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.

TEIXEIRA, R. C. *et al.* Radiological and histopathological evaluation of experimentally-induced periapical lesion in rats. **J Appl Oral Sci**, v.19, p. 500-504, 2011.

TSOSURA, T. V. S. *et al.* Maternal apical periodontitis is associated with insulin resistance in adult offspring. **Int Endod J.**, v. 52, n. 7, p. 1040-1050, 2019.

VALKO, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 39, p. 44-48, 2007.

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.

VIDHALE, P. *et al.* A relationship between maternal periodontal disease and preterm low birth weight: A cross-sectional study. **Clin. Epidemiology Glob. Health.**, v. 8, issue 8, p. 1152-4, 2020.

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.

WU, H. *et al.* PGC-1 $\alpha$ , glucose metabolism and type 2 diabetes mellitus. **J Endocrinol.**, v. 229, n. 3, R99-R115, 2016.

XING, Y. *et al.* Reduction of the PI3K/Akt related signaling activities in skeletal muscle tissues involves insulin resistance in intrauterine growth restriction rats with catch-up growth. **PLoS One**, v. 14, n. 5, e0216665, 2019.

XU, P. *et al.* Impaired translocation of glut4 results in insulin resistance of atrophic soleus muscle. **Biomed Res. Int.**, p. 1-11, 2015.

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.

ZEB, A.; ULLAH, F. A Simple Spectrophotometric Method for the Determination of Thiobarbituric Acid Reactive Substances in Fried Fast Foods. **J Anal Methods Chem.**, 9412767, 2016.

**ANEXO A**

**Parecer de Aprovação da Comissão de Ética na  
Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia do  
*Campus* de Araçatuba (FOA/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 da etapa final do sinal insulínico, via inflamatória, estresse oxidativo, mecanismo epigenético por metilação do DNA e expressão de GLUT4 no músculo gastrocnêmico de ratos adultos, proles de ratas com periodontite apical**", Processo FOA nº 00383-2019, sob responsabilidade de Dóris Hissako Sumida apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 27 de Agosto de 2019.

**VALIDADE DESTE CERTIFICADO:** 27 de Agosto de 2022.

**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 27 de Setembro de 2022.

### CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Assessment of the final steps of insulin signaling, inflammatory pathway, oxidative stress, epigenetic mechanism by DNA methylation and GLUT4 expression in the gastrocnemius muscle of adult rats, offspring of rats with apical periodontitis**", Protocol FOA nº 00383-2019, under the supervision of Dóris Hissako Sumida presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on August 27, 2019.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** August 27, 2022.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** September 27, 2022.

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

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

**ANEXO B-1**

**Artigo publicado na revista *Journal of Endodontics***

## BASIC RESEARCH – BIOLOGY

# Maternal Apical Periodontitis Increases Insulin Resistance and Modulates the Antioxidant Defense System in the Gastrocnemius Muscle of Adult Offspring

Thais Verônica Saori Tsosura, MSc,<sup>\*,†</sup>  
 Rodrigo Martins dos Santos, MSc,<sup>\*,†</sup>  
 Antonio Fernandes Chaves Neto,  
 PhD,<sup>\*,†</sup> Fernando Yamamoto  
 Chiba, PhD,<sup>‡</sup>  
 Ana Carolina Nascimento Carnevali,<sup>\*</sup>  
 Maria Sara de Lima Coutinho Mattered,  
 PhD,<sup>\*</sup> Bianca Elvira Belardi,<sup>\*,†</sup>  
 Luciano Tavares Ângelo Cintra, PhD,<sup>‡</sup>  
 Nathália Evelyn da Silva Machado,  
 MSc,<sup>‡</sup> and Doris Hissako Matsushita,  
 PhD<sup>†</sup>

## ABSTRACT

**Introduction:** Maternal apical periodontitis (AP) is associated with insulin resistance (IR) in adult offspring. Oxidative stress has been linked to IR. This study investigated insulin sensitivity (IS) and oxidative stress in the gastrocnemius muscle (GM) of adult offspring of rats with AP. **Methods:** Fifteen female Wistar rats were distributed into a control group, a group with 1 tooth with AP, and a group with 4 teeth with AP. Thirty days after AP induction, female rats were mated with healthy male rats. When male offspring reached 75 days of age, glycemia, insulinemia, and IS were determined. In the GM, the oxidative damage products (thiobarbituric acid reactive substances and carbonyl protein) and activities of enzymatic (superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase) and nonenzymatic (glutathione and total antioxidant capacity) antioxidants were quantified. Analysis of variance was performed followed by the Tukey post hoc test ( $P < .05$ ). **Results:** Maternal AP was associated with decreased IS and changes in antioxidant activities (reduced superoxide dismutase and increased catalase, glutathione peroxidase, and glutathione) and decreased thiobarbituric acid reactive substance concentration in the GM of their adult offspring. However, maternal AP does not appear to affect glycemia, carbonyl protein concentration, and the nonenzymatic total antioxidant capacity in the GM of this offspring. **Conclusions:** Maternal AP modulates the antioxidant defense system in the GM of their adult offspring, attenuating lipid peroxidation in this tissue. This reflects part of an adaptive response of the offspring to the stimulation of the maternal chronic oral inflammatory process in which the organism acts by decreasing oxidative tissue damage in the postnatal stage. The present study improves knowledge about the impact of maternal oral inflammation on healthy offspring. (*J Endod* 2021; ■:1–6.)

## KEY WORDS

Apical periodontitis; fetal development; insulin resistance; oxidative stress

Reactive oxygen species (ROS) are produced from molecular oxygen as a result of normal cellular metabolism. Low levels of ROS are important for cell proliferation, host defense, signal transduction, and gene expression<sup>1</sup>. However, when there is an imbalance between ROS generation and the ability of cells to neutralize them by the antioxidant defense system, it results in oxidative stress<sup>1,2</sup>.

Oxidative stress has been recognized as a key mechanism of insulin resistance (IR)<sup>3</sup>. Studies have shown that the exposure of myocytes to low-grade oxidative stress induces the impairment of insulin signaling<sup>4</sup> and reduces insulin-stimulated glucose transport<sup>4,5</sup>. On the other hand, the administration of antioxidants in animal models of diabetes demonstrates an improvement in insulin sensitivity (IS)<sup>6</sup>.

Tsosura et al<sup>7</sup> showed that adult rats, originally the offspring of rats with apical periodontitis (AP), exhibit IR, impaired insulin signaling, and activation of the inflammatory pathway in the gastrocnemius

## SIGNIFICANCE

The present results suggest that maternal oral inflammation can promote systemic disorders in their adult offspring, resulting in insulin resistance and changes in the antioxidant defense system in the skeletal muscle, which has a key role in glucose homeostasis.

From the \*Department of Basic Sciences, †Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas (PPGMCF)/Sociedade Brasileira de Fisiologia (SBFis), and ‡Department of Preventive and Restorative Dentistry, São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araçatuba, Brazil

Address requests for reprints to Dr Thais Verônica Saori Tsosura, São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, R. José Bonifácio, 1193, 16015-050 Araçatuba, SP, Brazil.  
 E-mail address: [thais\\_tsosura@hotmail.com](mailto:thais_tsosura@hotmail.com)  
 0099-2399/\$ - see front matter

Copyright © 2021 American Association of Endodontists.  
<https://doi.org/10.1016/j.joen.2021.04.003>

muscle (GM). However, more studies are necessary to understand the mechanisms involved in this IR. To this end, we determined the glycemia, insulinemia, and IS as well as the oxidative damage products and activities of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in the GM of adult offspring of rats with AP in a single tooth or 4 teeth.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

The institutional ethics committee [Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) 2019-00383] approved the experimental protocol. The entire study was conducted according to the guidelines. Albino Wistar rats were kept in a room under standardized conditions of temperature ( $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), a 12-hour light/dark cycle (lights on at 07:00), and relative humidity ( $55\% \pm 10\%$ ). Food (Presence, Paulínia, São Paulo, Brazil) and water were available *ad libitum*.

### Experimental Design

Two-month-old female Wistar rats were distributed into 3 groups of 5 animals each: the control group (CN), the group with 1 tooth with AP (1AP), and the group with 4 teeth with AP (4AP). AP was induced in the 1AP and 4AP groups according to the previous study<sup>7</sup>. Thirty days later, female rats from all groups were mated with healthy male rats. On the day of delivery, the litter size was adjusted to ensure equal access to nutrients for all puppies. After weaning, only male pups were kept for further analysis.

Male pups were distributed into 3 groups of 10 animals each: offspring of CN rats (CN-o), offspring of 1AP rats (1AP-o), and offspring of 4AP rats (4AP-o). All experiments were performed once the offspring reached 75 days of age.

The animals were fasted for 12 hours before experimentation and anesthetized with sodium thiopental (50 mg/kg intraperitoneally; Thiopentax, Cristália, Itapira, Brazil). A median laparotomy was performed in 10 animals from each group, and blood samples were taken via inferior vena cava punctures and centrifuged to obtain plasma for the quantification of glucose and insulin. In addition, the GMs were immediately removed, weighed, frozen in liquid nitrogen, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for further analysis of oxidative stress. After this, the animals were euthanized by sodium thiopental overdose.

### Glycemia, Insulinemia, and Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance

Glycemia was measured using the glucose oxidase method (Enzymatic Glucose;

ANALISA Diagnóstica, Belo Horizonte, Brazil). Insulinemia was quantified by enzyme-linked immunosorbent assay using a specific commercial kit (Sensitive Rat Insulin; Millipore, St Charles, MO). IS was evaluated by homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR), which was calculated according to the following formula:  $\text{HOMA-IR} = \text{fasting glycemia (mmol/L)} \times \text{fasting insulinemia } (\mu\text{U/mL})/22.5^9$ .

### Analysis of Oxidative Damage Products and the Antioxidant Defense System in GM Preparation of Homogenates

The tissues were homogenized in 50 mmol/L potassium phosphate buffer (pH = 7.4, 0.2% Triton X-100 and 2 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride) for the analysis of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx) activities; total antioxidant capacity (TAC); total protein; concentrations of carbonyl protein (CP); and thiobarbituric acid reactive substances (TBARSs). For the analysis of glutathione (GSH) activity, the tissues were homogenized in a solution containing 5% trichloroacetic acid and 2 mmol/L EDTA. The homogenates were centrifuged at 10,000 rpm for 10 minutes at  $4^{\circ}\text{C}$ , and the supernatant was collected, aliquoted, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for further analysis. The total protein in samples was determined by the Lowry method<sup>9</sup>.

### Oxidative Damage Products

Lipid peroxidation was evaluated by measuring TBARSs<sup>10</sup>. Briefly, 0.1 mL supernatant was vortex mixed with 0.5 mL TBARS reagent (0.67% thiobarbituric acid, 15% trichloroacetic acid, and 0.25 mol/L hydrochloric acid) and incubated in a water bath at  $100^{\circ}\text{C}$  for 1 hour. The absorbance was measured against a reference blank at a wavelength of 532 nm.

CP was quantified using the simplified alkaline method<sup>11</sup>. Briefly, 10  $\mu\text{L}$  supernatant was added to 50 mmol/L potassium phosphate buffer and 10 mmol/L 2,4-dinitrophenylhydrazine in 0.5 mol/L phosphoric acid in a 96-well plate and incubated at room temperature for 10 minutes. Then, 6 mol/L sodium hydroxide was added. Absorbance was read at 450 nm after 10 minutes of incubation.

### Enzymatic Antioxidant

SOD activity was determined according to pyrogallol autoxidation<sup>12</sup>. The reaction was composed of buffer (pH = 8.2, 50 mmol/L TRIS-HCl and 1 mmol/L diethylenetriaminepentaacetic), CAT, and

pyrogallol added to the supernatant in a crystal cuvette. Absorbance was determined at 420 nm.

To quantify CAT activity, 10  $\mu\text{L}$  supernatant was mixed with 50 mmol/L potassium phosphate buffer and 30% hydrogen peroxide solution in a crystal cuvette. Absorbance was determined at  $240 \text{ nm}^{13}$ .

GPx activity was measured using 50  $\mu\text{L}$  supernatant in 143 mmol/L sodium phosphate buffer (pH = 7.5, 1 mmol/L EDTA), 10 mmol/L dihydronicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, 0.4 mmol/L sodium azide, 0.1 U/mL glutathione reductase, 1 mmol/L GSH, and 10 mmol/L tert-butyl hydroperoxide. Absorbance was determined at 340 nm.

### Nonenzymatic Antioxidant

To assess GSH activity, supernatants were added to a solution containing 100 mmol/L potassium phosphate buffer (pH = 7.4, 2 mmol/L EDTA), 2 mmol/L dihydronicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, 1.2 mmol/L 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid), and 20 mmol/L glutathione reductase. Absorbance was determined at  $412 \text{ nm}^{14}$ .

TAC was determined by the ferric-reducing antioxidant potential (FRAP) assay<sup>15</sup>. Briefly, FRAP reagent (0.3 mol/L sodium acetate buffer [pH = 3.6], 10 mmol/L 2,4,6-tripyridyl-s-triazine, and 20 mmol/L  $\text{FeCl}_3$ ) and deionized water were added to the samples. The reaction was incubated in a dark environment at  $37^{\circ}\text{C}$  for 30 minutes. Absorbance was determined at 593 nm.

### Statistical Analyses

Normality of the data set was verified for all analyses. Analysis of variance was performed followed by the Tukey post hoc test. *P* values  $< .05$  were considered statistically significant. Data were expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean, and data analysis was performed with the Graph Pad Prism, version 7.0, statistical program (GraphPad Software Inc, San Diego, CA).

## RESULTS

### Glycemia, Insulinemia, and HOMA-IR Index

There was no difference in fasting glycemia among the groups. However, there was a significant increase in fasting insulinemia and HOMA-IR values in the 1AP-o ( $P < .05$ ) and 4AP-o ( $P < .001$ ) groups compared with the CN-o group. Furthermore, there was a significant difference ( $P < .05$ ) in these parameters between the 1AP-o and 4AP-o groups (Table 1).

## ARTICLE IN PRESS

**TABLE 1** - Glycemia, Insulinemia, and the Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance (HOMA-IR) Index

| Parameters            | CN-o         | 1AP-o         | 4AP-o                         |
|-----------------------|--------------|---------------|-------------------------------|
| Glycemia (mmol/L)     | 10.29 ± 0.34 | 10.23 ± 0.40  | 10.34 ± 0.37                  |
| Insulinemia (μU/L/mL) | 44.15 ± 2.41 | 87.35 ± 5.52* | 128.40 ± 18.02 <sup>1,‡</sup> |
| HOMA-IR               | 20.74 ± 2.06 | 40.98 ± 3.93* | 60.50 ± 8.15 <sup>1,‡</sup>   |

1AP-o, 1 apical periodontitis offspring; 4AP-o, 4 apical periodontitis offspring; CN-o, control group offspring. Values are presented as the mean ± standard error of the mean (n = 10 animals per group).

\*P < .05 CN-o versus 1AP-o.

<sup>1</sup>P < .05 1AP-o versus 4AP-o.

<sup>‡</sup>P < .001 CN-o versus 4AP-o.

### Oxidative Damage Products in GM

There was a significant decrease in the TBARS concentration in the GM in the 1AP-o ( $P < .01$ ) and 4AP-o ( $P < .001$ ) groups compared with the CN-o group (Fig. 1A). However, there was no difference in this parameter between the groups of offspring of rats with AP. Regarding CP concentration, there was no difference among the groups (Fig. 1B).

### Enzymatic Antioxidant Defense in GM

There was a decrease ( $P < .05$ ) in SOD activity in the GM in the 1AP-o and 4AP-o groups compared with the CN-o group. However, there was no difference in this parameter between the 1AP-o and 4AP-o groups (Fig. 2A).

Regarding CAT activity, there was a significant increase ( $P < .001$ ) of this antioxidant enzyme in the GM in the 1AP-o group compared with the CN-o group. There was no difference in this parameter between the CN-o and 4AP-o groups or between the 1AP-o and 4AP-o groups (Fig. 2B). In addition, there was an increase in GPx activity ( $P < .05$ ) in the tissue analyzed in the 1AP-o and 4AP-o groups in relation to the CN-o group. However, there was no difference in this parameter between the 1AP-o and 4AP-o groups (Fig. 2C).

### Nonenzymatic Antioxidant Defense in GM

There was an increase in GSH activity ( $P < .01$ ) in the 1AP-o and 4AP-o groups compared with the CN-o group. However, there was no difference in this parameter between the 1AP-o and 4AP-o groups (Fig. 3A). Regarding TAC, there was no difference among the groups (Fig. 3B).

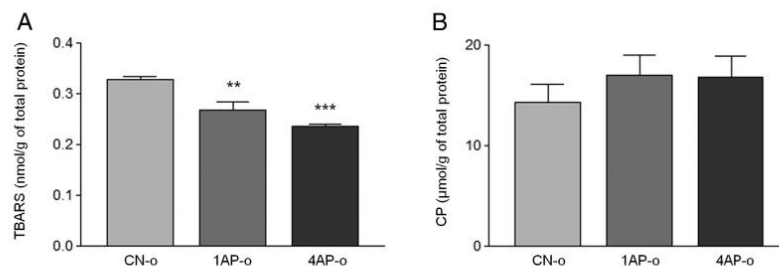
### DISCUSSION

The present study revealed that maternal AP is associated with decreased IS and changes in antioxidant activities (reduced SOD and increased CAT, GPx, and GSH) and reduced TBARS concentration in the GM of their adult offspring. However, maternal AP does not appear to affect glycemia, CP concentration, or TAC in the GM of these offspring.

Adverse stimuli during early fetal development can result in physiological and metabolic changes in offspring, thereby increasing the risk of diseases in adulthood<sup>16</sup>. IR is characterized by the attenuated response of tissues to the action of insulin (ie, the decrease in IS)<sup>8,17</sup>. In the present study, there was an increase in fasting insulinemia and the HOMA-IR index in the 1AP-o and 4AP-o groups compared

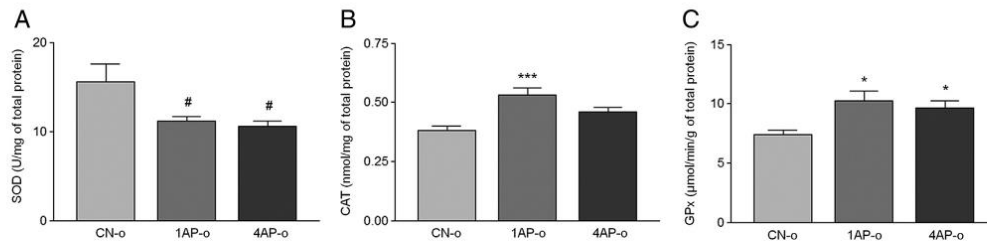
with the CN-o group, indicating decreased IS in the offspring of rats with AP. However, there was no difference in fasting glycemia among the groups, which may be the result of a compensatory increase in insulin secretion by pancreatic beta cells to maintain normoglycemia in the 1AP-o and 4AP-o groups. Similar results were found in studies that showed a reduction in IS in adult offspring of rats with periodontal disease<sup>18-20</sup>. Thus, we can suggest that maternal oral inflammation may program the development of IR in their offspring that manifests in adulthood.

It is known that excess ROS can cause damage to cellular macromolecules<sup>1</sup>. It should be noted that ROS plays an important role in normal IS, possibly due to a ROS-mediated decrease in protein tyrosine phosphatase activity. However, the degree of ROS generation determines an increase or suppression of IS (ie, although ROS produced by physiological stimuli can be beneficial, the sustained ROS generation is associated with IR)<sup>21</sup>. Lipid peroxidation and protein carbonylation are oxidation products considered biomarkers of oxidative stress that may be associated with IR<sup>22,23</sup>. Padmavathi et al<sup>24</sup> found that maternal micronutrient restriction promotes IR and increases lipid peroxidation in the liver of adult offspring. In addition, Al-Amin et al<sup>25</sup> observed an increase in lipid peroxidation in the brain tissue of offspring exposed to lipopolysaccharide during the prenatal period compared with the control. Interestingly, our results revealed that there was a significant decrease in TBARS concentration in the GM in the 1AP-o and 4AP-o groups compared with the CN-o group. However, there was no difference in the CP concentration in GM among the groups. In order to investigate the mechanisms involved in the attenuation of TBARSs in the GM of offspring of rats with AP,



**FIGURE 1** – The assessment of oxidative damage products, including (A) TBARS and (B) CP, normalized by total protein in the GM of the CN-o, 1AP-o, and 4AP-o groups. Values are presented as the mean ± standard error of the mean (n = 10 animals per group). \*\*P < .01 CN-o versus 1AP-o. \*\*\*P < .001 CN-o vs 4AP-o.

## ARTICLE IN PRESS



**FIGURE 2** – The assessment of enzymatic antioxidants activities, including (A) SOD, (B) CAT, and (C) GPx, normalized by total protein in the GM of the CN-o, 1AP-o, and 4AP-o groups. Values are presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean ( $n = 10$  animals per group). # $P < .05$  CN-o versus 1AP-o and 4AP-o. \* $P < .05$  CN-o versus 1AP-o and 4AP-o. \*\* $P < .01$  CN-o versus 1AP-o and 4AP-o. \*\*\* $P < .001$  CN-o versus 1AP-o.

the enzymatic and nonenzymatic antioxidant defense systems of these animals were determined.

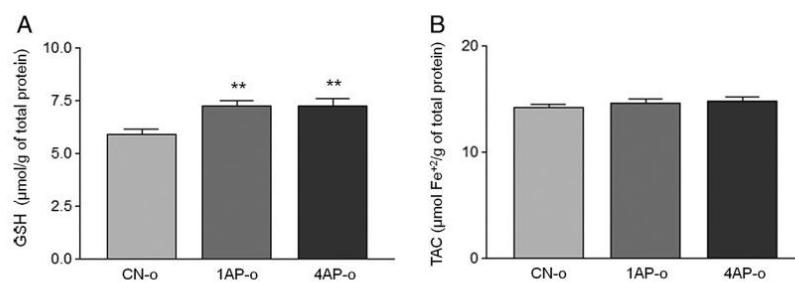
Aerobic organisms have integrated antioxidant systems, which include enzymatic and nonenzymatic antioxidants that are usually effective in blocking the harmful effects of ROS<sup>25</sup>. Our results showed a decrease in SOD activity in the GM of adult offspring of rats with AP compared with the CN-o group. However, there was an increase in CAT activity in the 1AP-o group as well as in GPx activity in the 1AP-o and 4AP-o groups compared with the CN-o group in this tissue. The decrease in SOD activity may be an indication that the endogenous reserves of this enzyme antioxidant have been depleted because it is a component of the first-line defense system against ROS<sup>26</sup>. On the other hand, an increase in CAT and GPx activities is favorable because these antioxidants neutralize ROS, thereby preventing oxidative damage in skeletal muscle. Taken together, we can suggest that the increase in CAT and GPx activities led to a

decrease in TBARS concentration in the GM of offspring of rats with AP. Our results are in accordance with studies that showed a reduction in SOD activity and an increase in CAT<sup>25</sup> and GPx<sup>27</sup> activities in the brain tissue of offspring exposed to lipopolysaccharide during the prenatal period compared with the control. Furthermore, in a study by Ouardi et al<sup>28</sup>, a decrease in SOD activity in brain tissue was observed in offspring exposed to malathion (organophosphate pesticide) during the gestation and lactation periods.

This study also analyzed the activities of nonenzymatic antioxidants. GSH is highly abundant in all cell compartments and is the major soluble antioxidant<sup>2</sup>. The activity of GPx depends on the presence of GSH as a hydrogen donor<sup>29</sup>. The GSH/GPx system plays an important role in eliminating ROS<sup>30</sup>. Rook et al<sup>31</sup> observed an increase in the concentration of GSH in the first days after birth in premature infants who received amino acid. TAC was evaluated by the FRAP assay that quantifies scavenging antioxidants (second-line

antioxidant defense system), including uric acid, ascorbic acid, bilirubin, and  $\alpha$ -tocopherol<sup>32</sup>. In our study, we provided evidence that there was no difference in the TAC in GM among the groups. These results suggest that maternal AP does not affect the concentrations of these nonenzymatic antioxidants, possibly because there was a predominant action of enzymatic antioxidants (SOD, CAT, and GPx) because these are the first-line antioxidant defense system that acts to suppress or prevent the formation of free radicals or reactive species in cells<sup>26</sup>. However, there was an increase in GSH activity in this tissue in the 1AP-o and 4AP-o groups compared with the CN-o group. It is suggested that the increase in GSH activity has also contributed to attenuating the TBARS concentration in the muscle tissue of the offspring of rats with AP.

In summary, we can conclude that maternal AP decreases IS and modulates the antioxidant defense system in the GM of their adult offspring, attenuating lipid peroxidation in this tissue. This reflects part of an adaptive



**FIGURE 3** – The evaluation of the (A) GSH activity and (B) TAC normalized by the total protein in the GM of the CN-o, 1AP-o, and 4AP-o groups. Values are presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean ( $n = 10$  animals per group). \* $P < .05$  CN-o versus 4AP-o.

## ARTICLE IN PRESS

response of the offspring to the stimulation of the maternal chronic oral inflammatory process in which the organism acts by decreasing oxidative tissue damage in the postnatal stage. The present study overall improves the knowledge surrounding the impact of maternal oral inflammations on the

health of offspring. We emphasize that the IR persisted even with the decrease in the TBARS concentration in the GM of offspring of rats with AP; thus, it is possible that other mechanisms, such as inflammatory cytokines, contribute to the maintenance of IR in these animals.

**ACKNOWLEDGMENTS**

Supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP) [grant #2019/04182-2; #2020/08706-3].

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

**REFERENCES**

1. Nita M, Grzybowski A. The role of the reactive oxygen species and oxidative stress in the pathomechanism of the age-related ocular diseases and other pathologies of the anterior and posterior eye segments in adults. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016: 3164734.
2. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, et al. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J* 2012;5:9–19.
3. Hurrle S, Hsu WH. The etiology of oxidative stress in insulin resistance. *Biomed J* 2017;40:257–62.
4. Dokken BB, Saengsritsuwan V, Kim JS, et al. Oxidative stress-induced insulin resistance in rat skeletal muscle: role of glycogen synthase kinase-3. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;294:E615–21.
5. Maddux BA, See W, Lawrence JC Jr, et al. Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of alpha-lipoic acid. *Diabetes* 2001;50:404–10.
6. Bloch-Damti A, Bashan N. Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:1553–67.
7. Tsosura TV, Chiba FY, Mattera MS, et al. Maternal apical periodontitis is associated with insulin resistance in adult offspring. *Int Endod J* 2019;52:1040–50.
8. Bonora E, Targher G, Alberiche M, et al. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. *Diabetes Care* 2000;23:57–63.
9. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–75.
10. Niehaus WG Jr, Samuelsson B. Formation of malonaldehyde from phospholipid arachidonate during microsomal lipid peroxidation. *Eur J Biochem* 1968;6:126–30.
11. Mesquita CS, Oliveira R, Bento F, et al. Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Anal Biochem* 2014;458:69–71.
12. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 1974;47:469–74.
13. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121–6.
14. Tipple TE, Rogers LK. Methods for the determination of plasma or tissue glutathione levels. *Methods Mol Biol* 2012;889:315–24.
15. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996;239:70–6.
16. Hocher B. More than genes: the advanced fetal programming hypothesis. *J Reprod Immunol* 2014;104-105:8–11.
17. Wilcox G. Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev* 2005;26:19–39.
18. Shirakashi DJ, Leal RP, Colombo NH, et al. Maternal periodontal disease in rats decreases insulin sensitivity and insulin signaling in adult offspring. *J Periodontol* 2013;84:407–14.
19. Mattera MS, Chiba FY, Mota MS, et al. Maternal periodontitis decreases plasma membrane GLUT4 content in skeletal muscle of adult offspring. *Life Sci* 2016;148:194–200.
20. Mattera MS, Chiba FY, Lopes FL, et al. Effect of maternal periodontitis on GLUT4 and inflammatory pathway in adult offspring. *J Periodontol* 2019;90:884–93.

## ARTICLE IN PRESS

21. Loh K, Deng H, Fukushima A, et al. Reactive oxygen species enhance insulin sensitivity. *Cell Metab* 2009;10:260–72.
22. Zeb A, Ullah F. A Simple spectrophotometric method for the determination of thiobarbituric acid reactive substances in fried fast foods. *J Anal Methods Chem* 2016;2016. 9412767.
23. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2003;329:23–38.
24. Padmavathi U, Rao KR, Raghunath M. Impact of maternal chromium restriction on glucose tolerance, plasma insulin and oxidative stress in WNIN rat offspring. *J Mol Endocrinol* 2011;47:261–71.
25. Al-Amin MM, Alam T, Hasan SM, et al. Prenatal maternal lipopolysaccharide administration leads to age- and region-specific oxidative stress in the early developmental stage in offspring. *Neuroscience* 2016;318:84–93.
26. Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J Med* 2018;54:287–93.
27. Zhu Y, Carvey PM, Ling Z. Altered glutathione homeostasis in animals prenatally exposed to lipopolysaccharide. *Neurochem Int* 2007;50:671–80.
28. Ouardi FZ, Anarhou H, Malqui H, et al. Gestational and lactational exposure to malathion affects antioxidant status and neurobehavior in mice pups and offspring. *J Mol Neurosci* 2019;69:17–27.
29. Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2011;25:287–99.
30. Panday S, Talreja R, Kavdia M. The role of glutathione and glutathione peroxidase in regulating cellular level of reactive oxygen and nitrogen species. *Microvasc Res* 2020;131. 104010.
31. Rook D, Te Braake FW, Schierbeek H, et al. Glutathione synthesis rates in early postnatal life. *Pediatr Res* 2010;67:407–11.
32. Young IS. Measurement of total antioxidant capacity. *J Clin Pathol* 2001;54:339.

**ANEXO B-2**

**Artigo publicado na revista *International Endodontic Journal***

## Effect of maternal apical periodontitis on the final step of insulin signalling and inflammatory pathway in the adult male offspring of rats

Thaís Verônica Saori Tsosura<sup>1,2</sup> | Maria Sara de Lima Coutinho Mattera<sup>1</sup> |  
 Fernando Yamamoto Chiba<sup>3</sup> | Ana Carolina Nascimento Carnevali<sup>1</sup> |  
 Bianca Elvira Belardi<sup>1,2</sup> | Rodrigo Martins dos Santos<sup>1,2</sup> | Luciano Tavares  
 Angelo Cintra<sup>3</sup> | Flávia Lombardi Lopes<sup>4</sup> | Natália Francisco Scaramelle<sup>4</sup> |  
 Doris Hissako Matsushita<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Basic Sciences, School of Dentistry, São Paulo State University (UNESP), Araçatuba, Brazil

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas (PPGMCF)/Sociedade Brasileira de Fisiologia (SBFis), School of Dentistry, São Paulo State University (UNESP), Araçatuba, Brazil

<sup>3</sup>Department of Preventive and Restorative Dental, School of Dentistry, São Paulo State University (UNESP), Araçatuba, Brazil

<sup>4</sup>Department of Production and Animal Health, School of Veterinary Medicine, São Paulo State University (UNESP), Araçatuba, Brazil

### Correspondence

Thaís Verônica Saori Tsosura, Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas (PPGMCF)/Sociedade Brasileira de Fisiologia (SBFis), School of Dentistry, São Paulo State University (UNESP), R. José Bonifácio, 1193, 16015-050 Araçatuba, SP, Brazil.  
 Email: thaís\_tsosura@hotmail.com

### Funding information

São Paulo Research Foundation (FAPESP), Grant/Award Number: 2019/04182-2 and 2020/08706-3; National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Grant/Award Number: 155540/2020-3

### Abstract

**Aim:** To evaluate the final step of insulin signalling, inflammatory pathway (related to the inhibition of insulin signalling), peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) protein content and DNA methylation in the *Slc2a4* gene promoter region in the skeletal muscle of adult male offspring of rats with apical periodontitis (AP) in a single tooth or in four teeth.

**Methodology:** Female Wistar rats were distributed into three groups: a control group, a group with one tooth with AP and a group with four teeth with AP. Thirty days after induction of AP, female rats from all groups were mated with healthy male rats. When male offspring reached 75 days of age, the following analyses were performed in the gastrocnemius muscle (GM): insulin-stimulated Akt serine and threonine phosphorylation status; NF- $\kappa$ B p50 and p65 subunits phosphorylation status; GLUT4, TNF- $\alpha$  and PGC-1 $\alpha$  protein content by Western blotting; GLUT4 and TNF- $\alpha$  gene expression by real-time polymerase chain reaction (PCR); and DNA methylation in the *Slc2a4* gene promoter region by restriction digestion and real-time PCR. Analysis of variance was performed, followed by Tukey's post hoc test. *p* values <.05 were considered to be statistically significant.

**Results:** Maternal AP in four teeth decreased insulin-stimulated Akt serine and threonine phosphorylation status, reduced GLUT4 gene expression and its protein content, and increased NF- $\kappa$ B p50 and p65 subunits phosphorylation status in the GM of adult offspring. There were no alterations in the parameters analysed in the GM of adult offspring of rats with AP in a single tooth. In addition, maternal AP did not affect TNF- $\alpha$  gene expression and its protein content, PGC-1 $\alpha$  protein content and DNA methylation in the *Slc2a4* gene promoter region in the GM of adult offspring.

**Conclusions:** Maternal AP in four teeth was associated with impairment in the final step of insulin signalling in the GM of adult male offspring in rats. An increase

in NF- $\kappa$ B activity may be involved in this decrease in insulin signalling. This study demonstrates the impact of maternal AP on the health of offspring, demonstrating the importance of maintaining adequate maternal oral health to prevent diseases in adult offspring in rats.

#### KEYWORDS

apical periodontitis, foetal development, glucose transporter type 4, inflammation

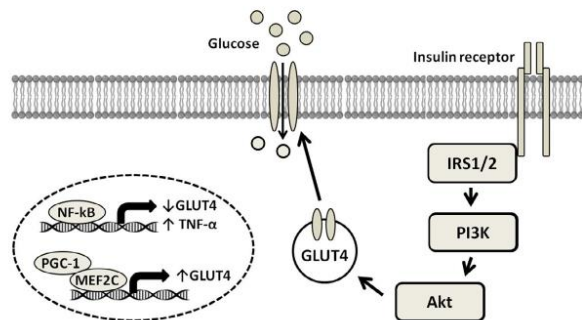
## INTRODUCTION

Foetal programming proposes that adverse insults during intrauterine life can induce changes in the metabolism of offspring, leading to an increased risk of disease in adulthood (Chen & Zhang, 2011). Epigenetic modifications are associated with this programming (Chen & Zhang, 2011; Zhu et al., 2019). DNA methylation is an epigenetic mechanism involved in the regulation of gene expression (Zhu et al., 2019). Modifications in DNA methylation patterns in skeletal muscles have been linked to insulin resistance (IR) (Zhou et al., 2018).

IR is a reduced biological response of target tissues to insulin stimulation, impairing glucose disposal (Czech, 2017). Under normal conditions, the action of insulin is initiated by binding to its receptor, activation of the receptor's intrinsic tyrosine kinase protein and phosphorylation of intracellular substrates, including IRS1 and IRS2. Tyrosine-phosphorylated IRS1/2 stimulates phosphatidylinositol-3-kinase, which in turn activates protein kinase B (PKB/Akt) (Fröjdö et al., 2009). Akt stimulates glucose transporter type 4 (GLUT4), which plays a key role in cellular glucose uptake processes (Whiteman et al., 2002). Thus, impairment of insulin-stimulated

GLUT4 leads to peripheral IR in patients with type 2 diabetes mellitus (Wu et al., 2016) (Figure 1).

GLUT4 is an insulin-regulated glucose transporter expressed in adipocytes and skeletal and cardiac muscle cells (Wu et al., 2016). GLUT4 gene expression is regulated by various stimuli (Im et al., 2007). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) increases GLUT4 gene expression (Michael et al., 2001). PGC-1 $\alpha$  is a member of a family of transcription coactivators associated with the regulation of cellular energy metabolism (Liang & Ward, 2006). In contrast, nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) can bind to the promoter of the *Slc2a4* gene, which encodes the GLUT4 protein and inhibits its transcription, providing an important link between IR and inflammation (Furuya et al., 2013). NF- $\kappa$ B represents a family of structurally related transcription factors, including RelA (p65), RelB, c-Rel, p105/p50 (NF- $\kappa$ B1) and p100/52 (NF- $\kappa$ B2), which combine to form complexes homo and heterodimeric. The heterodimeric p50/p65 form is the most common (Oeckinghaus & Ghosh, 2009). NF- $\kappa$ B mediates the transcription of genes involved in inflammatory processes, such as tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Chen et al., 2015).



**FIGURE 1** Molecular mechanism of insulin signalling pathway regulation. Activated insulin receptor phosphorylates insulin receptor substrates 1 and 2 (IRS1/2), which stimulates phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K). Phosphorylated protein kinase B (PKB/AKT) promotes glucose transporter type 4 (GLUT4) translocation to the plasma membrane, which leads to cellular glucose uptake. Nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) inhibits the transcription of the GLUT4 gene and stimulates the transcription of the tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) gene. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 (PGC-1) mediates the increase in GLUT4 gene expression by binding to and coactivating the myocyte enhancer factor 2C (MEF2C).

Tsosura et al. (2019) reported that maternal apical periodontitis (AP) was associated with IR, increased TNF- $\alpha$  plasma concentration, impairment in the initial step of insulin signalling and activation of the inflammatory pathway (IKK $\alpha/\beta$ ) in the gastrocnemius muscle (GM) of adult offspring of rats. However, the mechanisms involved in this IR are not fully understood. Therefore, this study aimed to verify whether maternal AP impairs the continuity of the insulin signalling cascade in the GM. For that, the final step of insulin signalling, inflammatory pathway (related to the inhibition of insulin signalling), PGC-1 $\alpha$  protein content and DNA methylation in the *Slc2a4* gene promoter region in the GM of adult offspring of rats with AP in a single tooth or in four teeth was analysed.

## MATERIALS AND METHODS

The manuscript of this animal study has been written according to the Preferred Reporting Items for Animal studies in Endodontology (PRIASE) 2021 guidelines (Nagendrababu et al., 2021) describes the main stages of the study (Figure 2).

### Animals

The experimental protocol was approved by the Institutional Ethics Committee (protocol number: 2019-00383) of the São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araçatuba, Brazil, and was conducted in accordance with relevant guidelines. Albino Wistar rats were kept in a room under standardized conditions: temperature ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ), 12-h light/dark cycle (lights on at 07:00) and relative humidity ( $55 \pm 10\%$ ). Food (Presence, Paulínia, São Paulo, SP, Brazil) and water were available *ad libitum*.

### Experimental design

Two-month-old female Wistar rats were distributed into three groups of five animals each: the control group (CN), the group with one tooth with AP (1AP) and the group with four teeth with AP (4AP). Animals in the 1AP and 4AP groups were anaesthetized with an intramuscular injection of ketamine (80 mg/kg; Dopalen; Sespo Ind e Com Ltda) and xylazine (10 mg/kg; Anasedan; Sespo Ind e Com Ltda). To induce AP, the pulps of the first right maxillary molar (1AP), the first and second right maxillary, and the mandibular molars (4AP) were exposed to the oral environment through the occlusal surface using a surgical round bur measuring 0.1 mm in diameter (Broca LN Long Neck; Dentsply Ind e Com Ltda). The pulp tissue

was exposed to the oral cavity for 30 days, and then, the female rats from all groups were mated with healthy male rats. After confirming pregnancy, female rats were housed individually. On the day of delivery, the litter size was reduced to eight pups to ensure equal nutrient access for all offspring. After weaning, only male pups were used for further analysis.

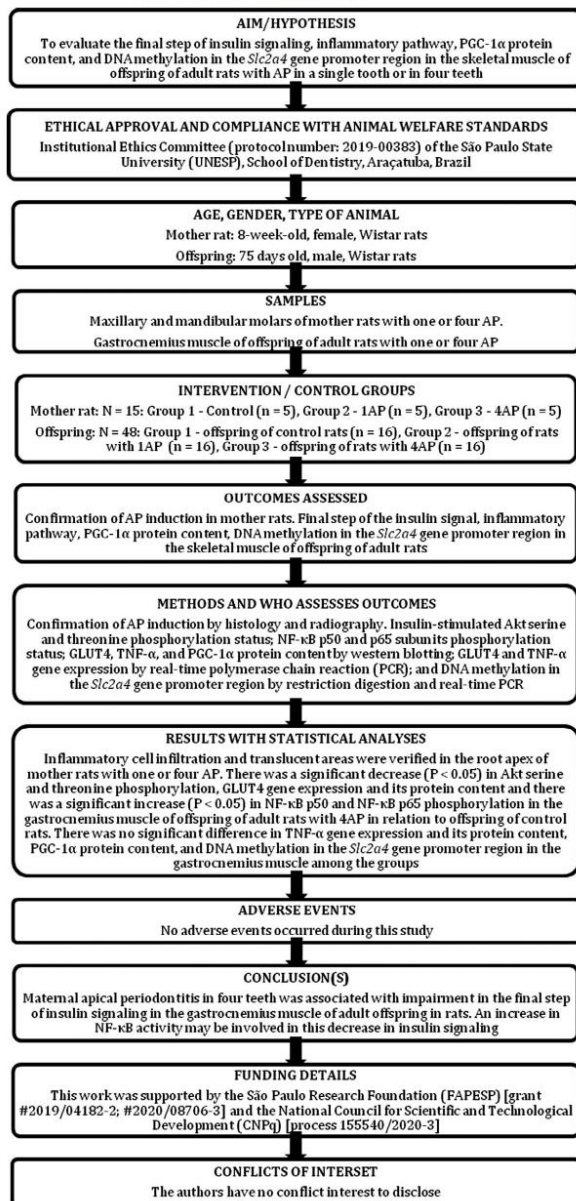
Male pups were distributed into three groups of 16 animals each: offspring of CN rats (CN-o), offspring of 1AP rats (1AP-o) and offspring of 4AP rats (4AP-o). All experiments were performed once the offspring reached 75 days of age. Animals were fasted for 12 h prior to experimentation and anaesthetized with sodium thiopental (50 mg/kg, intraperitoneal; Thiopentax; Cristália). The GM was collected from four animals in each group to assess DNA methylation in the *Slc2a4* gene promoter region and GLUT4 and TNF- $\alpha$  gene expression. To evaluate the GLUT4 protein content in the GM by western blotting, six animals from each group were used. The remaining animals (six animals in each group) were used to evaluate the final step of insulin signalling and inflammatory pathway in the GM by Western blotting. Subsequently, the animals were euthanized by sodium thiopental overdose.

### Radiographic and histological analysis of the periapical region in mother rats

After weaning, the mother rats were euthanized by sodium thiopental overdose, and the maxillary and mandibular molars of the rats were immediately dissected and post-fixed in neutral-buffered formalin for 24 h. The pieces were radiographed at 70 kVp, 10 mA and 0.10 s exposure. The source-to-film distance was always set at 40 cm. The digital images were obtained directly using an optical digital plate (Digora, Soredex; Orion Corporation), and the optical plates were read using a sensitized laser scanner (Windows Digora 1.51, Soredex; Orion Corporation). After radiographic analysis, the pieces were washed in water for 12 h and decalcified in 10% buffered ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Sigma-Aldrich) and histologically processed, and the first molar was sectioned semiserially (thickness: 4  $\mu\text{m}$ ) along its longitudinal axis. The slices were stained with haematoxylin and eosin.

### Western blot analysis in offspring

Six animals from each group were anaesthetized before median laparotomy to remove the GM before and 90 s after intravenous (portal vein) administration of 1.5 U regular insulin (Humulin; Eli Lilly and Company). Tissue



**FIGURE 2** PRIASE 2021 flowchart illustrating the steps involved in conducting the present study.

samples were prepared according to methods described by Carvalho et al. (1996) and were subjected to Western blotting for the quantification of the following: (a) Akt serine and threonine phosphorylation status and their protein content using anti-phosphoserine Akt Ser<sup>473</sup>, anti-phosphothreonine Akt Thr<sup>308</sup> and anti-Akt antibodies

respectively (Santa Cruz Biotechnology); (b) NF- $\kappa$ B p50 and NF- $\kappa$ B p65 phosphorylation status and their protein content using anti-phosphoserine NF- $\kappa$ B p50 Ser<sup>337</sup> and NF- $\kappa$ B p65 Ser<sup>536</sup> and anti-NF- $\kappa$ B p50 and NF- $\kappa$ B p65 antibodies respectively (Santa Cruz Biotechnology); (c) TNF- $\alpha$  content using anti-TNF- $\alpha$  antibody (Santa Cruz

**TABLE 1** Sequence of primers used for qAMP of *Slc2a4* in offspring and position of amplicons I in reference to the start codon

| Oligo name | Forward 5'–3'        | Reverse 5'–3'        | Position      |
|------------|----------------------|----------------------|---------------|
| Prom 1     | GGCACTAGAAGCCTTGCACT | CACAGTCTACTGGCCCATCC | –897 to –1141 |
| Prom 2     | CCCTTTAAGGCTCCATCTCC | GAAACAATGCCCGAAGTAA  | –653 to –743  |
| Prom 3     | CTTCAGCTCTCCGATCTTT  | TGAACCAGATCCCAATTC   | +23 to –227   |

Biotechnology); (d) PGC-1 $\alpha$  content using anti-PGC-1 $\alpha$  antibody (Thermo Fisher Scientific).  $\beta$ -Actin served as the loading control.

Immunoreactive bands were detected by autoradiography using an enhanced chemiluminescence detection system (ECL Kit, Amersham; GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions. Quantitative analysis of the blots was performed using Scion Image software (Scion Image – Release Beta 3b; National Institutes of Health, Frederick, MD, USA).

#### GLUT4 protein content analysis in offspring

Muscles were homogenized in cell lysis buffer (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM beta-glycerophosphate and 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1  $\mu$ g/ml leupeptin [Cell Signaling, Danvers]). The protein extracts were resolved on a sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis and electrotransferred onto a nitrocellulose membrane (GE Healthcare). The membranes were probed with the primary anti-GLUT4 antibody (NG1869806; Millipore), which was diluted 1:1000 in 1X PBS-T with 5% bovine serum albumin (Fisher Bioreagents). Immunoreactive bands were detected by autoradiography using a chemiluminescent substrate system (GE Healthcare), according to the manufacturer's instructions. The blots were analysed quantitatively using Scion Image-Release Beta 3b (National Institutes of Health). For GLUT4 protein analysis, the Ponceau-stained membrane was used as a loading control.

#### GLUT4 and TNF- $\alpha$ gene expression in offspring by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction

Total RNA was extracted from muscle tissue using TRIzol LS (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Samples were treated with an endonuclease (DNase I; Sigma-Aldrich), and total RNA was quantified by spectrophotometry. Total RNA from each sample was reverse transcribed to complementary

DNA using a reverse transcriptase (SuperScript™ II Reverse Transcriptase; Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

Gene expression analysis of *Slc2a4* (GLUT4) and TNF- $\alpha$  was performed by real-time reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR) using a real-time PCR instrument (StepOne-Plus™ Real-Time PCR Systems; Applied Biosystems) and a kit (*Slc2a4*: Rn01752377\_m1 and TNF- $\alpha$ : Rn01525859\_g1, FAM fluorophore reporter/non-fluorescent quencher MGB; TaqMan™ Gene Expression Assay; Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). The relative amount of transcripts was determined using the 2<sup>-( $\Delta\Delta$ Ct)</sup> method, with target expression normalized to Actb (Rn00667869\_m1; Applied Biosystems), and the control group used as the calibrator.

#### DNA methylation in the *Slc2a4* gene promoter region in offspring by restriction digestion and real-time PCR (qAMP)

Genomic DNA (gDNA) extraction from the GM was performed using silica columns and reagents provided in the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen). A total of 25 mg of the GM was used to isolate gDNA, according to the manufacturer's instructions. Isolated gDNA was quantified by measuring the optical density at 260 nm using a spectrophotometer (NanoDrop Spectrophotometer; Thermo Fisher Scientific). Quantitative analysis of DNA methylation using qAMP involves the use of methylation-sensitive restriction enzymes and a methylation-dependent restriction endonuclease, which identify restriction sites in a DNA sequence of interest, and PCR primers designed to flank these restriction sites (Oakes et al., 2009). The sequence of the *Slc2a4* gene was present in the genomic database (Genome Browser database of the University of California, Santa Cruz, CA, USA), and restriction sites for methylation-sensitive enzymes HhaI (New England Biolabs) and HpaII (Carlsbad, California, USA) and a methylation-dependent enzyme McrBC (New England Biolabs) were located in the gene. After the restriction sites of the enzymes were identified in the DNA of interest, primers were designed to flank these sites (Table 1) using Primer3 (v. 0.4.0), avoiding repeat regions and regions similar to other non-specific genomic regions.

Gene-specific regions containing the recognition sites for all three enzymes were chosen. Digested and undigested DNA were used for real-time PCR reactions using the QuantiNova SYBR Green PCR Kit (Qiagen), following the manufacturer's recommendations. Methylation is shown as the percentage of digested over undigested DNA, based on the shift in the Ct obtained for each enzyme and each primer pair.

### Statistical analyses

Normality of the data set was verified for all analyses. Analysis of variance was performed, followed by Tukey's post hoc test.  $p$  values  $< .05$  were considered to be statistically significant. Data were expressed as the mean  $\pm$  standard error of mean, and data analysis was performed using GraphPad Prism (version 3.0; GraphPad Software Inc.).

## RESULTS

### Confirmation of AP induction in mother rats

In the CN group, the periodontal ligament, root canal and apical foramen (Figure 3a) revealed characteristics consistent with a normal architecture. In addition, radiographic images (Figure 3d,g) revealed the absence of radiolucent areas around the root apex.

In AP1 and AP4 groups, dental pulps had necrosis, and AP was established. Inflammatory cell infiltration in the area around the root apex was observed in these groups (Figure 3b,c). On radiographic images, radiolucent areas were observed in the periapical region of the first maxillary molars in the AP1 group (Figure 3e) and in the maxillary and mandibular first and second molars in the AP4 group (Figure 3f,i).

### Akt serine and threonine phosphorylation status in the GM of offspring

After insulin stimulation, there was a significant increase ( $p < .05$ ) in Akt serine and threonine phosphorylation in all groups.

There was a significant decrease ( $p < .05$ ) in Akt serine and threonine phosphorylation after insulin stimulation in the 4AP-o group compared with that in the CN-o group. However, no differences in Akt serine and threonine phosphorylation were observed between the CN-o and 1AP-o groups and between the 1AP-o and 4AP-o groups (Figure 4b,c).

### GLUT4, TNF- $\alpha$ and PGC-1 $\alpha$ protein content, GLUT4 and TNF- $\alpha$ gene expression and NF- $\kappa$ B p50 and NF- $\kappa$ B p65 phosphorylation status in the GM of offspring

There was a significant decrease ( $p < .05$ ) in GLUT4 protein content and its gene expression in the 4AP-o group compared with that in the CN-o group. However, no differences in GLUT4 protein content and its gene expression were verified between the CN-o and 1AP-o groups and between the 1AP-o and 4AP-o groups (Figure 5b,c).

There was no significant difference in TNF- $\alpha$  protein content and its gene expression amongst the groups (Figure 5e,f). Furthermore, there was no significant difference in PGC-1 $\alpha$  protein content amongst the groups (Figure 5g).

Significantly greater ( $p < .05$ ) NF- $\kappa$ B p50 and NF- $\kappa$ B p65 phosphorylation was observed in the 4AP-o group than in the CN-o group. However, no significant differences in NF- $\kappa$ B p50 and NF- $\kappa$ B p65 phosphorylation were verified between the CN-o and 1AP-o groups and between the 1AP-o and 4AP-o groups (Figure 5h,i).

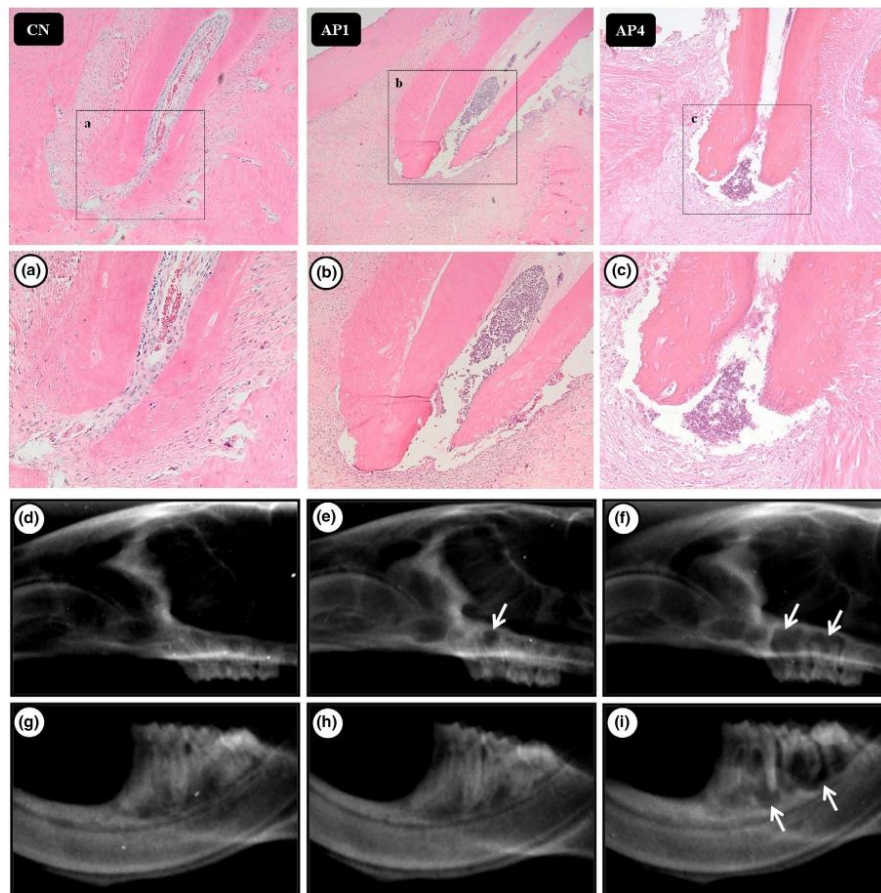
### DNA methylation in the *Slc2a4* gene promoter region in the GM of offspring

There was no significant difference in DNA methylation in the *Slc2a4* gene promoter region amongst the groups (Figure 6a-c).

## DISCUSSION

The present study revealed that maternal AP in four teeth decreased the insulin-stimulated Akt serine and threonine phosphorylation status, reduced GLUT4 gene expression and its protein content, and increased NF- $\kappa$ B p50 and p65 subunits phosphorylation status in the GM of adult male offspring in rats. There were no changes in the parameters analysed in the GM of adult offspring of rats with AP in a single tooth compared with those analysed in the GM of adult offspring of control rats and rats with AP in four teeth. In addition, maternal AP did not alter TNF- $\alpha$  gene expression, TNF- $\alpha$  and PGC-1 $\alpha$  protein content, and DNA methylation in the *Slc2a4* gene promoter region in the GM of adult offspring.

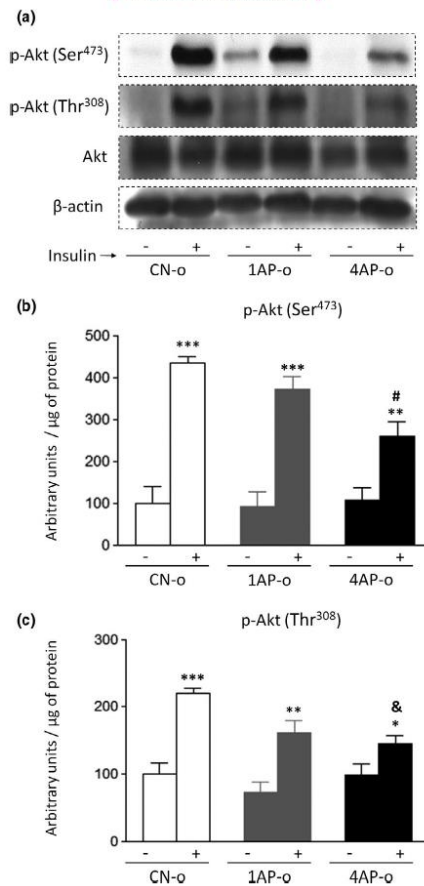
The skeletal muscle is the predominant site of insulin-mediated glucose uptake in the postprandial state. The majority (approximately 80%–85%) of glucose uptake by peripheral tissues occurs in this tissue (DeFronzo, 2004). GLUT4 is the main isoform of the glucose transport protein family that mediates glucose removal from the



**FIGURE 3** (a–c): Histological images of the periapical region of the control (CN) group, group with apical periodontitis in one tooth (AP1) and group with apical periodontitis in four teeth (AP4) stained with haematoxylin and eosin (original magnification: 100 $\times$ ). Image a represents the CN group. The apical and periapical regions are free of inflammatory infiltrate. Images b and c represent AP1 and AP4 groups. An inflammatory infiltrate is observed around the dental apex (original magnification: 400 $\times$ ). (d–i): Radiographic images of the maxilla and mandibles on the right side of the CN (D and G), AP1 (e and h) and AP4 (f and i) groups. The arrowheads indicate the radiolucent areas, suggesting apical periodontitis.

circulation and is a key regulator of whole-body glucose homeostasis (Huang and Czech 2007). In this study, there was a decrease in GLUT4 protein content in the skeletal muscle in the 4AP-o group compared with that in the CN-o group. This result is in agreement with the studies by Thamotharan et al. (2005) and Xing et al. (2019), which revealed a decrease in GLUT4 protein content in the muscle tissue of rats with intrauterine growth restriction caused by maternal caloric restriction. Additionally, GLUT4 protein content was reduced in male mice exposed to a low-selenium diet during early development (Hofstee et al., 2020).

Akt is involved in the process of insulin-mediated glucose uptake by transporting GLUT4 to the plasma membrane (Whiteman et al., 2002). The results of the present study revealed that there was a decrease in insulin-stimulated Akt serine and threonine phosphorylation status in the 4AP-o group compared with the CN-o group. This may be the reason for the decrease in GLUT4 protein content in the 4AP-o group. In other studies, adverse maternal conditions, such as a low protein diet (Xing et al., 2019) or periodontal disease (Mattera et al., 2016), have been reported to promote a decrease in the Akt phosphorylation status in the skeletal muscle of adult offspring

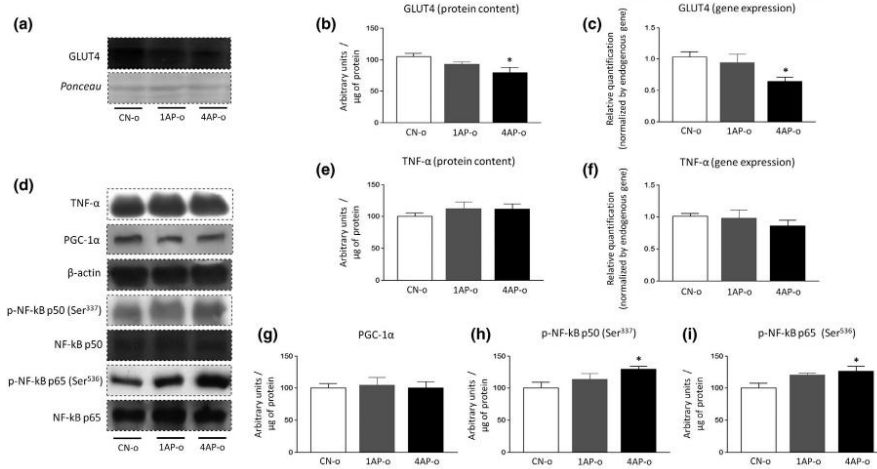


**FIGURE 4** Evaluation of protein kinase B (Akt) serine (Ser<sup>473</sup>) and threonine (Thr<sup>308</sup>) phosphorylation status before (-) and after (+) insulin stimulation in the gastrocnemius muscle of offspring of rats from the control (CN-o) group, group with apical periodontitis in one tooth (1AP-o) and group with apical periodontitis in four teeth (4AP-o). (a) Typical autoradiography: equal amounts of protein (185 μg) were subjected to sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis. β-Actin was used as the control. (b and c) Values of Akt serine (Ser<sup>473</sup>) and threonine (Thr<sup>308</sup>) phosphorylation (expressed in arbitrary units) are presented as mean ± standard error of mean, n = 6 animals per group. \*\*\*p < .001 insulin (-) vs. insulin (+); \*\*p < .01 insulin (-) vs. insulin (+); #p < .05 CN-o (+) vs. 4AP-o (+); &p < .05 CN-o (+) vs. 4AP-o (+).

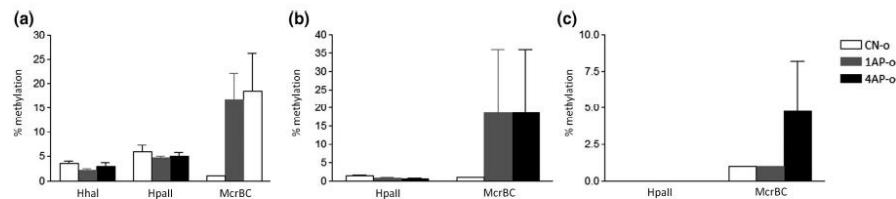
with IR. Taken together, it can be suggested that changes in the final step of insulin signalling in the GM are associated with IR in adult rats, offspring of rats with AP in four teeth.

Impaired insulin sensitivity in the skeletal muscle is one of the factors that contribute to whole-body metabolic dysfunction, and this has been observed in offspring exposed to an abnormal intrauterine environment (Laker et al., 2013). Scientific evidence supports a role for altered epigenetic regulation in the foetus in response to changes in the intrauterine environment (Laker et al., 2013). DNA methylation is one of the most well-known epigenetic mechanisms associated with gene silencing (He et al., 2017; Lim & Maher, 2010). It has been reported that adult offspring of rats subjected to oral di-(2-ethylhexyl) phthalate exposure showed IR associated with increased methylation and decreased GLUT4 gene expression at the MYOD-binding site in the skeletal muscle (Rajesh & Balasubramanian, 2014). In addition, in the study by Liu et al. (2013), overnourishment during the suckling period resulted in hypermethylation of specific CpG dinucleotides in the proximal promoter region of the *GLUT4* gene, which correlated with the reduction in GLUT4 mRNA levels in the skeletal muscle of adult offspring. Further, Liu et al. (2013) have suggested that epigenetic modification of the main genes involved in insulin signalling in the skeletal muscle can result in the development of IR in adulthood. Therefore, it can be hypothesized that IR in adult rats, offspring of rats with AP is mediated in part by altered DNA methylation. However, the present study did not find any changes in DNA methylation in the *Slc2a4* promoter region in the GM. This finding is in agreement with that reported by Mattera et al. (2019) revealing that maternal periodontal disease promotes IR in adult offspring, independent of changes in DNA methylation in the *Slc2a4* promoter region in the skeletal muscle. In addition, other studies have reported no association between IR and changes in DNA methylation in adult offspring (Duan et al., 2016; Raychaudhuri et al., 2008; Zeng et al., 2013).

The results of the present study revealed that there was a decrease in GLUT4 gene expression in the GM of 4AP-o group compared with the CN-o group, regardless of changes in DNA methylation, suggesting that other molecular mechanisms are involved in this genetic alteration. Furuya et al. (2013) reported that the p50 and p65 subunits of NF-κB can bind to the *Slc2a4* promoter gene and inhibit its transcription, demonstrating that this inflammatory transcription factor has a direct repressor effect on the *Slc2a4* gene, providing an important link between IR and inflammation. NF-κB is a master regulator of inflammation. It is required for the expression of pro-inflammatory cytokines, such as TNF-α (Chen et al., 2015). Consistent with this, studies have reported that chronic activation of pro-inflammatory pathways in insulin target cells can lead to obesity-related IR (Schenk et al., 2008). However, systemic insulin sensitivity is increased



**FIGURE 5** (a, b, d, e and g–i) Evaluation of glucose transporter type 4 (GLUT4), tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) protein content and nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) p50 (Ser<sup>337</sup>) and NF- $\kappa$ B p65 (Ser<sup>536</sup>) phosphorylation status in the gastrocnemius muscle of offspring of control rats (CN-o), group with apical periodontitis in one tooth (1AP-o) and group with apical periodontitis in four teeth (4AP-o). (a and d) Typical autoradiography: equal amounts of protein (185  $\mu$ g) were subjected to sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. The *Ponceau*-stained membrane, NF- $\kappa$ B p50 and NF- $\kappa$ B p65 total content and  $\beta$ -Actin were used as loading controls. (b, e and g–i) The values of GLUT4, TNF- $\alpha$  and PGC-1 $\alpha$  protein content and NF- $\kappa$ B p50 (Ser<sup>337</sup>) and NF- $\kappa$ B p65 (Ser<sup>536</sup>) phosphorylation status were expressed in arbitrary units ( $n = 6$  animals per group). (c and f) Assessment of GLUT4 and TNF- $\alpha$  gene expression in the gastrocnemius muscle of CN-o, 1AP-o and 4AP-o groups ( $n = 4$  per group). Results are presented as mean  $\pm$  standard error of mean. \* $p < .05$  CN-o vs. 4AP-o.



**FIGURE 6** Evaluation of DNA methylation in the *Slc2a4* gene promoter region in the gastrocnemius muscle of offspring of rats from the control (CN-o) group, group with apical periodontitis in one tooth (1AP-o) and group with apical periodontitis in four teeth (4AP-o). Employing two restriction sites of methylation-sensitive enzymes (HhaI and HpaII) and one methylation-dependent (McrBC) enzyme, (a, b, and c) three separate regions within the proximal promoter, termed prom 1, prom 2 and prom 3, of the *Slc2a4* gene, were analysed. Results are presented as mean  $\pm$  standard error of mean,  $n = 4$  per group.

by inactivation of NF- $\kappa$ B through deletion of the *p65* gene in the liver of mice fed a high-fat diet (Ke et al., 2015). The results of the present study revealed that there was an increase in the NF- $\kappa$ B p50 and p65 subunits phosphorylation status in the GM of 4AP-o group compared with the CN-o group. It can be suggested that the decrease in GLUT4 gene expression observed in the 4AP-o group is associated with an increase in NF- $\kappa$ B activity in the GM. These findings are in agreement with the study by Guo et al. (2016), who reported that offspring subjected to prenatal lipopolysaccharide exposure showed an increase in

NF- $\kappa$ B p65 phosphorylation status in the renal tissue in adulthood.

In a previous study, there was an increase in the TNF- $\alpha$  plasma concentration in the 1AP-o and 4AP-o groups compared with the CN-o group (Tsosura et al., 2019). However, in the present study, there was no difference in TNF- $\alpha$  gene expression and its protein content in the GM amongst the groups, indicating that the GM is not a source of this inflammatory cytokine, and other tissues, such as the adipose tissue, may contribute to the increase in the TNF- $\alpha$  plasma concentration.

Studies have reported that PGC-1 $\alpha$  plays a role in glucose metabolism (Michael et al., 2001; Wu et al., 2016). In a laboratory study, PGC-1 $\alpha$  increased GLUT4 expression, in large part, by binding to and coactivating the muscle-selective transcription factor MEF2C (Michael et al., 2001). Taken together, the evidence presented supports a role for PGC-1 $\alpha$  in preventing IR and type 2 diabetes mellitus (Wu et al., 2016). Therefore, to clarify the mechanisms involved in IR in offspring of rats with AP, the PGC-1 $\alpha$  content in the GM was analysed; the results showed no change in this parameter in the GM amongst the groups. This suggests that in the present study, PGC-1 $\alpha$  was not associated with changes in GLUT4 gene expression in the GM of offspring of rats with 4AP.

It has been reported that maternal periodontal disease or obesity promotes IR, impairs insulin signalling (Fante et al., 2016; Mattera et al., 2016; Shirakashi et al., 2013) and the activation of inflammatory pathways (Fante et al., 2016; Mattera et al., 2019) in adult offspring, suggesting that maternal inflammatory processes are associated with systemic metabolic changes in offspring.

In the present study, no alteration was observed in the final step of insulin signalling in the GM of offspring of rats with 1AP, suggesting that the maternal endodontic lesion in a single tooth was not sufficient to promote a significant change in this parameter. However, the increase in the number of teeth with AP was associated with a decrease in the insulin signal (statistical power of the Akt serine and threonine phosphorylation status in the 4AP-o group was greater than 0.8 compared with the CN-o group), reinforcing the findings of a previous study that demonstrated that systemic changes in adult offspring, including hyperinsulinaemia and IR, were more pronounced when the mother rats had a greater number of teeth with AP (Tsosura et al., 2019).

In summary, maternal AP in four teeth promoted changes in the final step of insulin signalling in the GM of adult offspring. Furthermore, these changes were partly mediated through the activation of the inflammatory pathway in the muscle tissue. In the present study, there was no change in DNA methylation in the *Slc2a4* gene promoter region in the skeletal muscle of adult offspring of rats with AP; therefore, the role of other epigenetic mechanisms, including histone modifications and non-coding RNAs, cannot be excluded.

## CONCLUSION

Maternal apical periodontitis in four teeth was associated with changes in the final step of insulin signalling in the GM of adult male offspring in a rat experimental model. An increase in NF- $\kappa$ B activity may be involved in this decrease

in insulin signal and GLUT4 gene expression. This study revealed that metabolic alterations, including a decrease in serine and threonine Akt phosphorylation status, reduction in GLUT4 gene and protein expression, and an increase in NF- $\kappa$ B p50 and p65 phosphorylation in the skeletal muscle of this offspring, can play an important role in the development of IR, which is a characteristic associated with type 2 diabetes mellitus (Taylor, 2012), dyslipidaemia and cardiovascular diseases (Ormazabal et al., 2018). Therefore, it is important to maintain adequate maternal oral health to avoid these comorbidities in offspring during adulthood.

## ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP) [grant #2019/04182-2; #2020/08706-3] and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) [process 155540/2020-3].

## CONFLICT OF INTEREST

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

## ETHICS STATEMENT AND AUTHOR CONTRIBUTION

The authors confirm contribution to the paper as follows: study conception and design (Tsosura, T.V.S. and Matsushita, D.H.), data collection (Tsosura, T.V.S., Mattera, M.S.L.C., Chiba, F.Y., Carnevali, A.C.N., Belardi, B.E., dos Santos, R.M., Cintra, L.T.A., Lopes, F.L., Scaramele, N.F., Matsushita, D.H.), analysis and interpretation of results (Tsosura, T.V.S., Mattera, M.S.L.C., Chiba, F.Y., Carnevali, A.C.N., Belardi, B.E., dos Santos, R.M., Cintra, L.T.A., Lopes, F.L., Scaramele, N.F., Matsushita, D.H.), draft manuscript preparation (Tsosura, T.V.S., Mattera, M.S.L.C., Chiba, F.Y., Belardi, B.E., dos Santos, R.M., Cintra, L.T.A., Lopes, F.L., Matsushita, D.H.). All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.


## ORCID

Thais Verônica Saori Tsosura  <https://orcid.org/0000-0003-1708-4071>

org/0000-0003-1708-4071

Maria Sara de Lima Coutinho Mattera  <https://orcid.org/0000-0003-2288-708X>

org/0000-0003-2288-708X

Fernando Yamamoto Chiba  <https://orcid.org/0000-0003-4406-405X>

org/0000-0003-4406-405X

Ana Carolina Nascimento Carnevali  <https://orcid.org/0000-0003-0874-2714>

org/0000-0003-0874-2714

Bianca Elvira Belardi  <https://orcid.org/0000-0002-5564-8256>

org/0000-0002-5564-8256

Rodrigo Martins dos Santos  <https://orcid.org/0000-0002-5122-275X>

org/0000-0002-5122-275X

Luciano Tavares Angelo Cintra  <https://orcid.org/0000-0003-2348-7846>

Flávia Lombardi Lopes  <https://orcid.org/0000-0002-3173-3712>

Natália Francisco Scaramelle  <https://orcid.org/0000-0003-4071-5935>

Doris Hissako Matsushita  <https://orcid.org/0000-0003-3753-229X>

## REFERENCES

- Carvalho, C.R., Brenelli, S.L., Silva, A.C., Nunes, A.L., Velloso, L.A. & Saad, M.J. (1996) Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. *Endocrinology*, 137, 151–159.
- Chen, L., Chen, R., Wang, H. & Liang, F. (2015) Mechanisms linking inflammation to insulin resistance. *International Journal of Endocrinology*, 2015, 508409.
- Chen, M. & Zhang, L. (2011) Epigenetic mechanisms in developmental programming of adult disease. *Drug Discovery Today*, 16, 1007–1018.
- Czech, M.P. (2017) Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature Medicine*, 23, 804–814.
- DeFronzo, R.A. (2004) Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Medical Clinics of North America*, 88, 787–835.
- Duan, C., Liu, M., Xu, H., Tang, W., Liu, J., Hou, L. et al. (2016) Decreased expression of GLUT4 in male CG-IUGR rats may play a vital role in their increased susceptibility to diabetes mellitus in adulthood. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 48, 872–882.
- Fante, T., Simino, L.A., Reginato, A., Payolla, T.B., Vitorélli, D.C.G., de Souza, M. et al. (2016) Diet-induced maternal obesity alters insulin signalling in male mice offspring rechallenge with a high-fat diet in adulthood. *PLoS One*, 11, e0160184.
- Fröjdö, S., Vidal, H. & Pirola, L. (2009) Alterations of insulin signalling in type 2 diabetes: a review of the current evidence from humans. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1792, 83–92.
- Furuya, D.T., Neri, E.A., Poletto, A.C., Anhô, G.F., Freitas, H.S., Campello, R.S. et al. (2013) Identification of nuclear factor- $\kappa$ B sites in the Slc2a4 gene promoter. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 370, 87–95.
- Guo, W., Guan, X., Pan, X., Sun, X., Wang, F., Ji, Y. et al. (2016) Postnatal inhibition of NF- $\kappa$ B activation prevents renal damage caused by prenatal LPS exposure. *PLoS One*, 11, e0153434.
- He, Z., Zhang, R., Jiang, F., Hou, W. & Hu, C. (2017) Role of genetic and environmental factors in DNA methylation of lipid metabolism. *Genes and Diseases*, 5, 9–15.
- Hofstee, P., McKeating, D.R., Bartho, L.A., Anderson, S.T., Perkins, A.V. & Cuffe, J.S.M. (2020) Maternal selenium deficiency in mice alters offspring glucose metabolism and thyroid status in a sexually dimorphic manner. *Nutrients*, 12, 267.
- Huang, S. & Czech, M.P. (2007) The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metabolism*, 5, 237–252.
- Im, S.S., Kwon, S.K., Kim, T.H., Kim, H.I. & Ahn, Y.H. (2007) Regulation of glucose transporter type 4 isoform gene expression in muscle and adipocytes. *IUBMB Life*, 59, 134–145.
- Ke, B., Zhao, Z., Ye, X., Gao, Z., Manganiello, V., Wu, B. et al. (2015) Inactivation of NF- $\kappa$ B p65 (RelA) in liver improves insulin sensitivity and inhibits cAMP/PKA pathway. *Diabetes*, 64, 3355–3362.
- Laker, R.C., Wlodek, M.E., Connelly, J.J. & Yan, Z. (2013) Epigenetic origins of metabolic disease: the impact of the maternal condition to the offspring epigenome and later health consequences. *Food Science and Human Wellness*, 2, 1–11.
- Liang, H. & Ward, W.F. (2006) PGC-1 $\alpha$ : a key regulator of energy metabolism. *Advances in Physiology Education*, 30, 145–151.
- Lim, D.H.K. & Maher, E.R. (2010) DNA methylation: a form of epigenetic control of gene expression. *The Obstetrician & Gynaecologist*, 12, 37–42.
- Liu, H.W., Mahmood, S., Srinivasan, M., Smiraglia, D.J. & Patel, M.S. (2013) Developmental programming in skeletal muscle in response to overnourishment in the immediate postnatal life in rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24, 1859–1869.
- Mattera, M.S.d.L.C., Chiba, F.Y., Mota, M.S.d.O.d., Pereira, R.F., Ervolino, E., Chaves Neto, A.H. et al. (2016) Maternal periodontitis decreases plasma membrane GLUT4 content in skeletal muscle of adult offspring. *Life Sciences*, 148, 194–200.
- Mattera, M.S.L.C., Chiba, F.Y., Lopes, F.L., Tsosura, T.V.S., Peres, M.A., Brito, V.G.B. et al. (2019) Effect of maternal periodontitis on GLUT4 and inflammatory pathway in adult offspring. *Journal of Periodontology*, 90, 884–893.
- Michael, L.F., Wu, Z., Cheatham, R.B., Puigserver, P., Adelmant, G., Lehman, J.J. et al. (2001) Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(7), 3820–3825.
- Nagendrababu, V., Kishen, A., Murray, P.E., Nekoofar, M.H., Figueiredo, J.A.P., Priya, E. et al. (2021) PRIASE 2021 guidelines for reporting animal studies in Endodontology: a consensus-based development. *International Endodontic Journal*, 54, 848–857.
- Oakes, C.C., La Salle, S., Trasler, J.M. & Robaire, B. (2009) Restriction digestion and real-time PCR (qAMP). *Methods in Molecular Biology*, 507, 271–280.
- Oeckinghaus, A. & Ghosh, S. (2009) The NF- $\kappa$ B family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4, a000034.
- Ormazabal, V., Nair, S., Elfeky, O., Aguayo, C., Salomon, C. & Zuñiga, F.A. (2018) Association between insulin resistance and the development of cardiovascular disease. *Cardiovascular Diabetology*, 17, 122.
- Rajesh, P. & Balasubramanian, K. (2014) Phthalate exposure in utero causes epigenetic changes and impairs insulin signalling. *Journal of Endocrinology*, 223, 47–66.
- Raychaudhuri, N., Raychaudhuri, S., Thamotharan, M. & Devaskar, S.U. (2008) Histone code modifications repress glucose transporter 4 expression in the intrauterine growth-restricted offspring. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 13611–13626.
- Schenk, S., Saberi, M. & Olefsky, J.M. (2008) Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, 118, 2992–3002.
- Shirakashi, D.J., Leal, R.P., Colombo, N.H., Chiba, F.Y., Garbin, C.A.S., Jardim, E.G. Jr et al. (2013) Maternal periodontal disease in rats decreases insulin sensitivity and insulin signaling in adult offspring. *Journal of Periodontology*, 84, 407–414.
- Taylor, R. (2012) Insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetes*, 61, 778–779.

- Thamotharan, M., Shin, B.C., Suddiricku, D.T., Thamotharan, S., Garg, M. & Devaskar, S.U. (2005) GLUT4 expression and subcellular localization in the intrauterine growth-restricted adult rat female offspring. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 288, E935–E947.
- Tsosura, T.V.S., Chiba, F.Y., Mattera, M.S.L.C., Pereira, R.F, Cintra, L.T.A, Conti, L.C. et al. (2019) Maternal apical periodontitis is associated with insulin resistance in adult offspring. *International Endodontic Journal*, 52, 1040–1050.
- Whiteman, E.L., Cho, H. & Birnbaum, M.J. (2002) Role of Akt/protein kinase B in metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 13, 444–451.
- Wu, H., Deng, X., Shi, Y., Su, Y., Wei, J. & Duan, H. (2016) PGC-1 $\alpha$ , glucose metabolism and type 2 diabetes mellitus. *The Journal of Endocrinology*, 229, R99–R115.
- Xing, Y., Zhang, J., Wei, H., Zhang, H., Guan, Y., Wang, X. et al. (2019) Reduction of the PI3K/Akt related signaling activities in skeletal muscle tissues involves insulin resistance in intrauterine growth restriction rats with catch-up growth. *PLoS One*, 14, e0216665.
- Zeng, Y., Gu, P., Liu, K. & Huang, P. (2013) Maternal protein restriction in rats leads to reduced PGC-1 $\alpha$  expression via altered DNA methylation in skeletal muscle. *Molecular Medicine Reports*, 7, 306–312.
- Zhou, Z., Sun, B., Li, X. & Zhu, C. (2018) DNA methylation landscapes in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Nutrition & Metabolism*, 15, 47.
- Zhu, Z., Cao, F. & Li, X. (2019) Epigenetic programming and fetal metabolic programming. *Frontiers in Endocrinology*, 10, 764.

**How to cite this article:** Tsosura, T.V.S., Mattera, M.S.D.L.C., Chiba, F.Y., Carnevali, A.C.N., Belardi, B.E., dos Santos, R.M., et al. (2021) Effect of maternal apical periodontitis on the final step of insulin signalling and inflammatory pathway in the adult male offspring of rats. *International Endodontic Journal*, 00, 1–12. <https://doi.org/10.1111/iej.13610>