



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

Campus de Araçatuba
Departamento de Ciências Básicas

Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

DAISY JAQUELINE SHIRAKASHI

**AVALIAÇÃO DA VIA INIBITÓRIA DO SINAL
INSULÍNICO EM RATOS ADULTOS, PROLES DE
RATAS COM DOENÇA PERIODONTAL**

Araçatuba-SP

2012



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

Campus de Araçatuba
Departamento de Ciências Básicas

Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

DAISY JAQUELINE SHIRAKASHI

AVALIAÇÃO DA VIA INIBITÓRIA DO SINAL INSULÍNICO EM RATOS ADULTOS, PROLES DE RATAS COM DOENÇA PERIODONTAL

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

Orientadora: Prof. Adj. Doris Hissako Sumida

Co-orientador: Prof. Ass. Carla Roberta de Oliveira Carvalho

Araçatuba-SP

2012

Catálogo na Publicação (CIP)
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S558a Shirakashi, Daisy Jaqueline.
Avaliação da via inibitória do sinal insulínico em ratos adultos, proles de ratas com doença periodontal / Daisy Jaqueline Shirakashi. - Araçatuba : [s.n.], 2012
107 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

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

1. Doenças periodontais 2. Citocinas 3. Diabetes mellitus 4. Resistência à insulina 5. Inflamação

CDD 612

Dados Curriculares

Nascimento: 26.01.1983, São Paulo - SP.

Filiação: Edison Masanobu Shirakashi
Lourdes Mieko Shirakashi

2004/2009: Curso de Graduação em Odontologia Faculdade de Odontologia do *Campus* de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

2010/2012: Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia do *Campus* de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

Dedicatória

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Edison e Lourdes pelo amor, incentivo, apoio, aprendizado de vida e esforço realizado para a minha educação, exemplos de garra, humildade, honestidade e perseverança, ensinando-me a lutar pelos meus objetivos.

Ao meu irmão Rodrigo, minha cunhada Elaine e a minha sobrinha querida Dhafine, pelo companheirismo, incentivo, sinceridade e carinho.

Ao meu namorado Adriano, pela sua paciência, carinho e compreensão, apoiando-me e sendo meu ombro amigo nos momentos difíceis.

Aos meus grandes e verdadeiros amigos pela enorme demonstração de amizade, durante os momentos mais difíceis na realização deste estudo.

Agradecimentos Especiais

A Deus, a cada novo dia e por fazer-me a cada dia mais forte.

À minha orientadora Doris Hissako Sumida, a grande responsável pela trajetória acadêmica que tenho seguido, pela sua orientação, ensinamentos transmitidos, grande incentivo e confiança em mim depositada.

À minha amiga Natalia Helena Colombo, pela amizade, incentivo, imenso apoio e colaboração constantes durante todas as fases deste projeto.

Aos meus amigos Fernando Yamamoto Chiba, Maria Sara de Lima Coutinho, Alana Carvalho de Oliveira, Patrícia Juvêncio Dias que participaram na realização deste trabalho, e a todos os amigos que me apoiaram fazendo parte dessa minha caminhada.

Agradecimentos

À UNESP – Universidade Estadual Paulista, pela oportunidade de realizar este curso.

À Diretora da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Prof. Adj. Ana Maria Pires Soubhia e ao Vice-Diretor Prof. Titular Wilson Roberto Poi, pelo apoio.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pela concessão da bolsa de estudos; à FUNDUNESP (Fundação para Desenvolvimento da UNESP) e a Pró-Reitoria de pesquisa da UNESP (PROPe-UNESP) que proporcionaram os recursos necessários para a realização das pesquisas em nosso laboratório.

Aos professores do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, por todos os ensinamentos ministrados, empréstimos de laboratório e equipamentos, e pela ótima convivência.

A Prof. Ass. Carla Roberta de Oliveira Carvalho pela co-orientação e ensinamentos transmitidos.

Aos professores Edilson Ervolino, Sandra Helena Penha de Oliveira, Leda Maria Pescinini Salzedas e Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune, pela colaboração com esta pesquisa.

Aos amigos e colegas do curso de pós-graduação pelo agradável convívio. Um agradecimento especial à Vilma Cleme Coli pela ajuda com os ensaios lipídicos.

Aos alunos de iniciação científica, Amanda de Almeida Oliveira, Lara Vieira Pacanaro, Mariane Machado Curbete, Marjorie de Oliveira Gallinari, Viviane Clície da Silva, Wendrew Douglas de Souza Gomes e aos alunos de pós-graduação Aline

Yamamoto Silva e Rafael Dias Astolph, pela amizade e pela colaboração com este trabalho.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Katsuko Aparecida Anze Inoue (Cidinha) e Arnaldo César dos Santos, pela imensa disposição em ajudar.

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

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, Valéria Queiroz Marcondes Zagatto, Cristiane Regina Lui Mattos, Diogo Reatto, Lilian Sayuri Mada e Marina Midori Sakamoto Hawagoe, pelo excelente trabalho, atenção dispensada, grande disposição em atender e ótimo relacionamento.

Às funcionárias da Diretoria Técnica Administrativa, Isabel Cristina Lui Poi e Célia Cristina Antonello Cunha, pela atenção dispensada.

Aos funcionários do Setor de Biotério, Alan Roge Senerine Carvalho, Camilo Roberto Venancio, João Batista Alves Correa, pela atenção e presteza no atendimento.

A todos os meus familiares e amigos, pelo apoio e incentivo constantes.

A todos os demais professores e funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, pela ajuda e atenção que me dispensaram desde a graduação.

Epígrafe

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

(Madre Teresa de Calcutá)

SHIRAKASHI, D.J. **Avaliação da via inibitória do sinal insulínico em ratos adultos, proles de ratas com doença periodontal.** 2012. 107 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2012.

RESUMO

O ambiente fetal tem sido apontado como possível fator causal de diabetes mellitus, pois há um fenômeno conhecido como “programming”, sugerindo que um estímulo ou agressão durante um período crítico da vida intra-uterina resulta em alterações na fisiologia e no metabolismo, na vida adulta. Estudos demonstraram que tanto a doença periodontal (DP) como o aumento do tecido adiposo elevam o nível de citocinas plasmáticas. Ademais, citocinas, como por exemplo, o $\text{TNF-}\alpha$, podem ocasionar alteração no sinal insulínico. Estudos anteriores do nosso laboratório demonstraram que proles de ratas com doença periodontal apresentaram resistência à insulina e diminuição no grau de fosforilação em tirosina no tecido adiposo branco periepididimal e muscular esquelético gastrocnêmio. Para averiguar quais mecanismos estão envolvidos nestas alterações, o objetivo do presente estudo foi avaliar: 1) o grau de fosforilação em serina do IRS-1, após o estímulo insulínico, em músculo esquelético gastrocnêmio (MG), tecido adiposo branco periepididimal (TAB) e fígado (F); 2) quantificação dos conteúdos de $\text{IR}\beta$ e de IRS-1 em MG, TAB e F; 3) colesterolemia e triacilgliceridemia; 4) concentração plasmática de $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, resistina e adiponectina; 5) frutossaminemia, 6) amilasemia e lipasemia. Para tanto, foram utilizados ratos e ratas Wistar (2 meses de idade). As ratas foram divididas em dois grupos: 1) grupo com doença periodontal (DP) induzida por meio da ligadura com fio de seda ao redor do 1º molar inferior; 2) grupo-controle (CN). Após 7 dias da colocação da ligadura, as ratas de ambos os grupos foram colocadas para acasalamento, verificando-se diariamente, por esfregaço vaginal, o dia da copulação. As ratas prenhas foram separadas em caixas individuais e, após o nascimento, os filhotes foram pareados (número de filhotes) e divididos em proles de ratas com doença periodontal (PDP) e proles de ratas-controle (PCN). Quando os filhotes machos destas ratas completaram 75 dias, os experimentos foram

realizados. A DP materna promoveu na vida adulta de sua prole: a) aumento no grau de fosforilação em serina do IRS-1 no tecido adiposo, porém não no tecido muscular e hepático, após o estímulo insulínico; b) aumento nas concentrações de citocinas plasmáticas (TNF- α , IL-6 e resistina), mas não de adiponectina; c) aumento nas concentrações plasmáticas de colesterol total, colesterol LDL, colesterol VLDL e triglicérides, porém as concentrações de colesterol HDL não apresentaram diferença; d) aumento nas concentrações plasmáticas de amilase, lipase e frutossamina. Com base nesses resultados, podemos inferir que a diminuição no grau de fosforilação em tirosina e a resistência à insulina encontrada no grupo PDP, em estudos anteriores, podem ter sido decorrentes de aumento: 1) no grau de fosforilação em serina no tecido adiposo; 2) da concentração de citocinas plasmáticas; 3) de dislipidemia; 4) da glicemia (demonstrada pelos valores da frutossamina); 5) das enzimas pancreáticas (lipase e amilase). Estes resultados podem reforçar a importância de se prevenir a doença periodontal com o intuito de se evitar a resistência insulínica e suas complicações em geração subsequente.

Palavras-chave: Doenças periodontais. Citocinas. Diabetes mellitus. Resistência à insulina. Inflamação.

SHIRAKASHI, D.J. **Evaluation of the inhibitory pathway of the insulin signal in the adulthood of offspring of female rats with periodontal disease.** 2012. 107 f. Dissertation (Master's) – School of Dentistry, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2012.

ABSTRACT

Fetal environment has been pointed out as being a possible causal factor of diabetes mellitus, because there is a phenomenon known as programming, which suggests that any stimulation or aggression during a critical period of intrauterine life results in physiological and metabolic alterations in adulthood. Studies have reported that both periodontal disease (PD) and increase in adipose tissue raise the cytokine plasma level. Cytokines such as TNF- α can cause alteration in insulin signaling. Previous studies from the authors' laboratory have demonstrated that offspring of rats with periodontal disease showed insulin resistance and decrease in tyrosine phosphorylation status in periepididymal white adipose tissue and gastrocnemius skeletal muscle. To investigate which mechanisms are involved in these alterations, the aim of present study was to evaluate: 1) IRS-1 serine phosphorylation status after insulin stimulation in gastrocnemius skeletal muscle (GM), periepididymal white adipose tissue (WAT) and liver (L); 2) quantification of IR β and IRS-1 content in GM, WAT and L; 3) cholesterolemia and triacylglyceridemia; 4) TNF- α , IL-6, resistin and adiponectin plasma concentrations; 5) fructosaminemia; 6) amylasaemia and lipasaemia. Male and female rats (2-month-old) were used. Female rats were divided into two groups: 1) periodontal disease group (PD) – with periodontitis induced by silk thread placed in cervical region of mandibular first molars; 2) control group (CN). Seven days after ligature placement, animals from both groups mated and daily vaginal smears were taken to verify the presence of sperm. Pregnant rats were kept in individual cages. After birth, the numbers of offspring from CN and PD mothers were paired and they were divided into: control offspring (CNO) and periodontal disease offspring (PDO). When the male offspring of these rats completed 75 days of life, the experiments were performed. In adulthood of their offspring, maternal periodontal disease promoted : a) increase in IRS-1 serine phosphorylation status in

adipose tissue but not in muscle tissue and liver after insulin stimulation; b) increased cytokine plasma concentrations (TNF- α , IL-6 and resistin), but not in adiponectin; c) increased plasma concentrations of total cholesterol, LDL cholesterol, VLDL cholesterol and triglycerides, but not in HDL cholesterol; d) increased amylase, lipase and fructosamine plasma concentrations. Based on these results, it could be inferred that the decrease in IRSs tyrosine phosphorylation status and insulin resistance found in the PDP group in a previous study may be due to the increase in: 1) IRS-1 serine phosphorylation status in the adipose tissue; 2) cytokines plasma concentrations; 3) dyslipidemia; 4) glycemia (shown by the fructosamine values), 5) pancreatic enzymes (amylase and lipase). These results place even greater emphasis on the importance of preventing periodontal disease in order to prevent insulin resistance and its complications in the subsequent generation.

Keywords: Periodontal diseases. Cytokines. Diabetes mellitus. Insulin resistance. Inflammation.

Lista de Figuras

- Figura 1** As vias de sinalização insulínica. O receptor de insulina é uma tirosina quinase que se autofosforila e catalisa a fosforilação de proteínas intracelulares como as proteínas IRS, Shc e Cbl. Após a fosforilação essas proteínas se ligam a outras moléculas de sinalização através de seus domínios SH2, resultando na ativação de vias de sinalização intracelular como a via da PI3K, a cascata da MAPK e a ativação do TC10 via CAP/Cbl. Essas vias regulam o transporte de glicose, a síntese de glicogênio, lipídeos e proteínas, coordenando e integrando o metabolismo intermediário (figura extraída e adaptada de Carvalheira et al. 2002). 25
- Figura 2** Peso corpóreo semanal de ratos, proles de ratas-controle (PCN) e proles de ratas com doença periodontal (PDP) desde o nascimento até 75 dias de idade. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, n = 20. 35
- Figura 3** Avaliação do grau de fosforilação em serina do IRS-1(Ser307) antes (-) e após (+) o estímulo insulínico no músculo gastrocnêmio (A, B), tecido adiposo branco periepídídimo (C, D) e fígado (E, F) de proles de ratas-controle (PCN) e proles de ratas com doença periodontal (PDP). Em **A**, **C** e **E** autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 μ g). β -actina foi utilizada como controle. Em **B**, **D** e **F**, valores do grau de fosforilação em serina do IRS-1, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média $\pm$ EPM, n=10, *p<0,05 PDP (+) vs PCN (+). 36
- Figura 4** Avaliação do conteúdo da subunidade β do receptor de insulina (IR β) em tecido muscular gastrocnêmio (A, B), adiposo branco periepídídimo (C, D) e hepático (E, F) de proles de ratas-controle (PCN) e de proles de ratas com doença periodontal (PDP). Em **A**, **C** e **E** autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 μ g). Em **B**, **D** e **F**, valores do conteúdo do IR β , expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média $\pm$ EPM, n=8. 38
- Figura 5** Avaliação do conteúdo do IRS-1 em tecido muscular gastrocnêmio (A, B), adiposo branco periepídídimo (C, D) e hepático (E, F) de proles de ratas-controle (PCN) e proles de ratas com doença periodontal (PDP). Em **A**, **C** e **E** autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 μ g). Em **B**, **D** e **F**, valores do conteúdo do IRS-1, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média $\pm$ EPM, n=8. 39

Lista de Tabelas

Tabela 1	Ingestão alimentar total (média) de ratos, proles de ratas-controle (PCN) e proles de ratas com doença periodontal (PDP) do desmame até o final do experimento.	35
Tabela 2	Concentrações plasmáticas (mg/dL) de lipídeos de ratos, proles de ratas-controle (PCN) e proles de ratas com doença periodontal (PDP).	40
Tabela 3	Concentrações plasmáticas de citocinas de ratos, proles de ratas-controle (PCN) e proles de ratas com doença periodontal (PDP).	40
Tabela 4	Peso absoluto (g) e relativo (por 100g de peso corpóreo) do tecido adiposo branco periepídimal (TAB) e músculo gastrocnêmio (GM).	41
Tabela 5	Concentrações plasmáticas de amilase, lipase e frutamina dos ratos PCN e PDP.	41

Lista de Abreviaturas

- AGL: Ácidos graxos livres
- AMPK: Proteína quinase AMP ativada
- AS160: Substrato da AKT de 160 kDa
- Akt /PKB: Proteína quinase B
- Akt 1: Proteína quinase B 1
- Akt 2: Proteína quinase B 2
- Akt 3: Proteína quinase B 3
- CAP: Proteínas associadas à Cbl
- Cbl: Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene
- CN: Grupo-controle
- CT: Colesterol Total
- DM: Diabetes Mellitus
- DM1: Diabetes Mellitus tipo 1
- DM2: Diabetes Mellitus tipo 2
- DNA: Ácido desoxirribonucléico
- DP: Doença periodontal
- DTT: Ditioneítrito
- EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EPM: Erro padrão da média
- F: Fígado
- FOXO1A: Forkhead box O1
- GLUT4: Proteína transportadora de glicose GLUT4
- Grb10: Proteína 10 ligada a receptor de fator de crescimento
- Grb14: Proteína 14 ligada a receptor de fator de crescimento
- GSK-3 : Glicogênio sintase *quinase* 3
- HDL: Lipoproteína de alta densidade
- IL-1 β : Interleucina -1 β
- IL-6: Interleucina-6
- IL-10: Interleucina-10

- IL-1 α : Interleucina-1 α
- IL-8: Interleucina-8
- IR: Receptor de insulina
- IRS: Substrato do receptor de insulina
- IRS-1: Substrato 1 do receptor de insulina
- IRS-2: Substrato 2 do receptor de insulina
- IRS-3: Substrato 3 do receptor de insulina
- IRS-4: Substrato 4 do receptor de insulina
- IR β : Subunidade β do receptor de insulina
- JNK: c-Jun N-terminal quinase
- JNK 1: c-Jun N-terminal quinase 1
- kDa: kilodalton
- I κ B (IKK β): Quinase inibidora do fator nuclear K β
- LDL: Lipoproteínas de baixa densidade
- LPS: Lipopolissacarídeos
- MAPK: Proteína quinase ativada por Ras-mitógeno
- MCP-1: Proteína quimiotática de monócitos-1
- MG: músculo esquelético gastrocnêmio
- PAMPs: Padrões moleculares associados à patógenos
- PBPN: Nascimento prematuro de bebês com baixo peso
- PCN: Proles de ratas-controle
- PC1: Glicoproteína-1 de membrana plasmática celular
- PDP: Proles de ratas com doença periodontal
- PDK1: Proteína quinase- 1 dependente de fosfoinositideo
- PGE: Prostaglandina E
- PGE 2: Prostaglandina E2
- PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinase
- PKC: Proteína quinase C
- PKC- θ : Proteína quinase C theta
- pp185: Substrato do receptor de insulina (IRS-1/IRS-2)
- PPAR γ : Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama

- PRRs: Receptores de reconhecimento de padrões
- PTP1B: Proteína tirosina fosfatase 1B
- P38 MAPK: P38 proteína quinase ativada por mitógeno
- Ratos TG: Ratos transgênicos com excesso crônico de hormônio de crescimento
- RNA: Ácido ribonucleico
- ROS: Espécies reativas de oxigênio
- SDS: Dodecil sulfato de sódio
- SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida em dodecil sulfato de sódio
- SH2: Domínios com homologia a Src 2
- Shc: Substrato do receptor de insulina, possuidora do domínio SH2, cuja estrutura lembra àquela do colágeno (*Src homology collagen*)
- Src: Família de proteína tirosina quinase originalmente identificada por homologia com a proteína oncogênica PP60 (v-Src) do vírus do sarcoma de *rous*.
- SK6 (p70S6k): Proteína serina/treonina quinase
- SOCS1: Supressor de sinalização de citocinas-1
- SOCS3: Supressor de sinalização de citocinas-3
- TAB: Tecido adiposo branco periepididimal
- TEMED: Tetrametil etilenodiamina
- TC10: Small guanosine 5'-triphosphate (GTP) binding protein
- TG: Triglicérides
- TLRs: Receptores Toll-like
- TLR-2: Receptor Toll-like 2
- TLR-4: Receptor Toll-like 4
- TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa
- Tris: Tris(hidroximetil)aminometano
- VLDL: Lipoproteínas de muito baixa densidade

Sumário

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVO	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1	Animais	28
3.2	Avaliação do sinal insulínico	29
3.2.1	Preparação das amostras	29
3.2.2	“Western blotting”	29
3.3	Determinação da concentração plasmática de colesterol total	31
3.4	Determinação da concentração plasmática do colesterol HDL	32
3.5	Determinação da concentração plasmática dos triglicérides	32
3.6	Determinação da concentração plasmática do LDL e VLDL	33
3.7	Concentrações plasmáticas de citocinas	33
3.8	Lipase	33
3.9	Amilase	33
3.10	Frutosamina	34
3.11	Análise estatística	34
4	RESULTADOS	35
4.1	Avaliação do peso corporal (g)	35
4.2	Ingestão alimentar	35
4.3	Avaliação do grau de fosforilação em serina do substrato do receptor de insulina IRS-1 no músculo esquelético gastrocnêmio, tecido adiposo branco periepídimal e fígado	36
4.4	Avaliação do conteúdo da subunidade β do receptor de insulina (IR β) no músculo esquelético gastrocnêmio, tecido adiposo branco periepídimal e fígado	38
4.5	Avaliação do conteúdo do substrato do receptor de insulina IRS-1 no músculo esquelético gastrocnêmio, tecido adiposo branco periepídimal e fígado	39
4.6	Concentrações plasmáticas de lipídios	40
4.7	Concentrações plasmáticas de citocinas e adipocinas	40
4.8	Peso dos tecidos	41
4.9	Concentrações plasmáticas de amilase, lipase e frutosamina	41
5	DISCUSSÃO	42
6	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS	56
	ANEXOS	75

1 Introdução

Na área odontológica, há certo consenso no que diz respeito ao fato de que infecções crônicas nos dentes e em seus periodontos, mesmo que não tragam qualquer desconforto ao paciente, têm grande potencial de progredir para lesões insidiosas, eventualmente fatais. Diversas evidências permitem considerar as condições bucais não mais de maneira isolada, mas em suas relações com todo o corpo humano.¹⁻³ Este posicionamento também é válido para as periodontopatias, que têm sido apontadas por diversos estudos como fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, acidentes cérebro-vasculares, pneumonias e diabetes mellitus.¹⁻⁴

Doença periodontal (DP) é um nome genérico que engloba uma série de alterações patológicas que ocorrem no periodonto e, embora existam inúmeras classificações, elas podem ser organizadas em dois grandes grupos: gengivite e periodontite. Na gengivite, apenas o tecido gengival está alterado. Na periodontite, além dos tecidos moles, os tecidos duros (ossos, ligamento e cemento) estão alterados,⁵ resultando na perda de inserção dental e aumento de profundidade da bolsa periodontal, podendo levar à mobilidade e perda dos dentes.⁶ A DP representa ainda hoje um dos maiores problemas em odontologia, sendo a segunda patologia bucal mais prevalente no mundo.^{7, 8}

A doença periodontal também tem sido indicada como um dos fatores responsáveis pelo nascimento prematuro de bebês com baixo peso (PBPN).^{1, 2, 5, 9-13}

Esta alteração é considerada o maior problema perinatal em muitos países, contribuindo substancialmente com a mortalidade infantil e com o desenvolvimento de uma infância repleta de problemas.² Em contrapartida, alguns estudos não demonstram essa mesma correlação, ou seja, entre PBPN,¹⁴ restrição do crescimento fetal e doença periodontal materna.¹⁵

Há indícios de que a periodontite, durante a gravidez, pode aumentar as bactérias ou mediadores inflamatórios que penetram na corrente circulatória e que podem causar uma ruptura prematura da membrana e nascimento pré-termo e, como consequência, baixo peso do recém-nascido.¹⁶ Sabe-se que bactérias periodontopatogênicas produzem muitos fatores de virulência, tais como, os

lipopolissacarídeos (LPS) e os peptidoglicanos, fatores bacterianos que induzem uma resposta do hospedeiro, incluindo a produção de citocinas pro-inflamatórias.¹⁷

O reconhecimento de patógenos é um elemento essencial para o início da resposta imune inata tais como inflamação e é mediada por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que reconhecem estruturas moleculares, amplamente compartilhadas por patógenos, conhecidas como padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs). No processo de reconhecimento dos PAMPs pelos PRRs, estes receptores iniciam uma série de programas de sinalização que executam a primeira linha da resposta defensiva necessária para eliminar microorganismos infecciosos.¹⁸

Os receptores Toll-like (TLRs) foram os primeiros PRRs a serem identificados. Eles são também os mais bem caracterizados e reconhecem uma vasta gama de PAMPs.¹⁸ Os TLRs são amplamente expressos em células do sistema imune inato (macrófagos, células epiteliais, endoteliais, e células do parênquima de órgãos) e em células do sistema imune adaptativo (células B, mastócitos, células T, e células dendríticas).¹⁹ Uma família de 10 TLRs funcionais humanos pode reconhecer os ligantes que não existem no hospedeiro e iniciar as cascatas inflamatórias. Isto provoca a produção de citocinas inflamatórias, quimiocinas, e interferons.¹⁹

Os receptores Toll-like 1-9 são expressos por células do tecido gengival normal e a expressão desses receptores apresenta-se aumentada nas células do tecido gengival inflamado.²⁰ Cada TLR detecta PAMPs distintos derivados de vírus, bactérias, fungos ou parasitas. Como exemplos de PAMPs bacterianos pode-se citar lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteínas, flagelina, DNA e RNA.¹⁸ Sabe-se que o LPS estimula o RNAm para TLR-2 e TLR-4²¹ e causa regulação transcricional de uma ampla gama de genes pró-inflamatórios incluindo TNF- α , IL-1, IL-8 e IL-6.²² Portanto a estimulação dos TLRs provoca uma resposta defensiva imediata, incluindo a produção de uma matriz de peptídeos antimicrobianos e citocinas.²³

Os LPS são os principais componentes das membranas mais externas das bactérias gram-negativas e considerados fatores importantes na patogênese da doença periodontal; são encontrados adsorvidos às superfícies dentárias radiculares e aos tecidos gengivais de pacientes com doença periodontal.²⁴ Como visto acima, os LPS podem induzir a produção de várias citocinas em macrófagos, tais como

TNF- α , IL-1 β , IL-6 que desempenham papel importante na maturação de células progenitoras dos osteoclastos²⁵ e ocasionam a ativação de osteoclastos, favorecendo a reabsorção óssea e o aumento de collagenase que propicia maior destruição das fibras do ligamento periodontal, promovendo assim, uma destruição do osso e do tecido conjuntivo.²⁶⁻²⁸

Estudos experimentais em ratos demonstram que a periodontite induzida por ligadura promove aumento de TNF- α plasmático.^{29, 30} Sert et al.,³¹ também evidenciaram aumento nos níveis de TNF- α e IL-6 em mães com periodontite. Em adição, Lin et al.³² também observaram que o aumento de TNF- α e a redução de IL-10 no soro materno estão relacionados diretamente com a restrição do crescimento fetal.

Comparando as citocinas do fluido amniótico de mulheres que tiveram parto prematuro com as que tiveram parto a termo, observou-se aumento dos níveis de IL-6, TNF- α ,^{33, 34} IL-1 α , IL-1 β e PGE2 no fluido amniótico das mulheres que tiveram parto pré-termo.³³ Dörtbudak et al.³⁵ também observaram aumento de PGE2, IL-6 e IL-8 no fluido amniótico de gestantes com periodontite entre a 15ª e a 20ª semana de gravidez e estas apresentaram um risco aumentado para o parto prematuro.

Na literatura, há ainda diversos relatos da associação de baixo peso ao nascimento e posterior desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) na vida adulta desta prole.³⁶⁻³⁸

O diabetes mellitus (DM) é considerado um problema de saúde pública prevalente, em ascendência, oneroso do ponto de vista social e econômico e com potencial reconhecido para prevenção.³⁹ É uma doença crônica causada por uma deficiência do pâncreas na produção de insulina, ou por incapacidade da insulina exercer adequadamente suas funções.⁴⁰ Com a progressão da doença, o indivíduo desenvolve complicações sistêmicas como: alteração no metabolismo de proteínas, baixos níveis de colesterol HDL, altos níveis de triglicérides, microangiopatia, neuropatia, nefropatia, doenças macrovasculares, aumento do tempo de cicatrização de feridas e risco de infecção.⁴¹⁻⁴⁸

Existem dois tipos principais de diabetes, que são o diabetes tipo 1 (DM1) e o diabetes tipo 2 (DM2). O DM1 é quando o pâncreas não produz a insulina essencial à sobrevivência. Esse tipo de diabetes ocorre mais frequentemente nas crianças e

nos adolescentes, mas também pode ocorrer em pessoas com mais idade.⁴⁰ O DM1, segundo a Organização Mundial da Saúde, é uma das mais importantes doenças crônicas da infância.⁴⁹ Nos Estados Unidos da América, dos 651 mil casos novos diagnosticados a cada ano, 11 mil são em crianças e adolescentes.⁵⁰ Os pais dessas crianças enfrentam vários tipos de problemas, sendo que os mais frequentes estão relacionados à administração de insulina, dieta, dinâmica familiar e testes de glicose no sangue e na urina.⁵¹

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) resulta da incapacidade do corpo em responder adequadamente à ação da insulina produzida pelo pâncreas, ocorrendo com maior frequência nos adultos, mas está sendo observado cada vez mais em crianças e adolescentes. A maioria dos diabéticos apresenta o diabetes tipo 2.⁴⁰ A resistência à insulina e os níveis elevados de insulina plasmática em jejum são alterações bastantes frequentes em indivíduos obesos e parecem ser os primeiros sinais para o desenvolvimento do DM2. Este tipo de diabetes tem contribuído com mais de 30% dos novos casos de diabetes, demonstrando possível relação do aumento da prevalência de obesidade infantil com o desenvolvimento desta doença.⁵² Além disso, o DM2 pode ocasionar morbidade e mortalidade precoce.⁵³

O ambiente fetal tem sido apontado como possível fator causal de DM2, pois há um fenômeno conhecido como “programming”, sugerindo que estímulos ou agressões durante um período crítico da vida intrauterina resulta em alterações na fisiologia e metabolismo na vida adulta.⁵⁴

O estudo de Bobetsis et al.⁵⁵ fornece o primeiro relatório de que a infecção pode levar à modificação epigenética de um gene impresso. Não está completamente elucidado se a hipermetilação ocorre devido à direta interação bacteriana com o tecido ou como consequência de uma resposta inflamatória do hospedeiro. O estudo avaliou alterações nos padrões de metilação do DNA em tecidos da placenta, mostrando que a infecção medeia a hipermetilação do promotor placentário IGF2. Porém, essas alterações nos padrões de metilação do DNA podem ocorrer em outros tecidos ou órgãos fetais, levantando a possibilidade de que modificações epigenéticas somáticas podem ocorrer em útero como consequência de infecção e também fornece uma ligação potencial para explorar a metilação do

DNA na prole em resposta à infecção, uma vez que modifica o desenvolvimento e potencialmente medeia a deficiência em longo prazo em vários sistemas de órgãos.

Estudos em humanos e em animais mostram que a associação entre o ambiente intrauterino adverso com o retardo ou elevado crescimento fetal está relacionada com prejuízo na função e desenvolvimento das células β . Isto, por sua vez, leva ao desenvolvimento de diabetes tipo 2 na vida adulta. Modelos animais demonstram que os mecanismos celulares e moleculares ligados ao desenvolvimento alterado de células β estão relacionados com a função mitocondrial anormal e alterações epigenéticas dos principais genes chaves das células β .⁵⁶

A epigenética, termo que significa no “topo de genes”, descreve como o ambiente interage com o genoma para produzir mudanças hereditárias, resultando em variação fenotípica sem alterar o DNA do genoma. Processos epigenéticos incluem metilação e desmetilação do DNA e processos pós-translacionais, como fosforilação, acetilação e metilação de histonas nucleares, que resultam em código de histonas alterado.⁵⁷

Boney et al.⁵⁸ constataram que crianças nascidas com sobrepeso e que foram expostas a um ambiente intrauterino de gestantes com diabetes ou obesidade apresentavam risco aumentado à síndrome metabólica durante a infância. Atualmente relata-se aumento na incidência da obesidade entre crianças e adultos. Estes resultados têm implicações por perpetuar o ciclo da obesidade, da resistência insulínica e das suas consequências (Diabetes Mellitus Gestacional, Diabetes Mellitus II, Síndrome Metabólica, e doença cardiovascular) nas gerações subsequentes.

Estudo realizado por Dahlgren et al.⁵⁹ demonstrou que a injeção em ratas mães de IL-6 ou de TNF- α por via intraperitoneal nos dias 8, 10 e 12 de gestação induziu obesidade em ambos os grupos na idade adulta das proles; o grupo no qual injetou-se IL-6 apresentou resistência à insulina e o grupo submetido à injeção de TNF- α teve valores elevados de insulina basal. Estes autores sugerem que citocinas podem ser uma peça no enigma multivariável da programação neonatal e no risco de desenvolver doenças na idade adulta.

O tecido adiposo é um órgão dinâmico que secreta vários fatores denominados adipocinas. Estas adipocinas, em sua grande maioria, estão

relacionadas, direta ou indiretamente, a processos que contribuem na aterosclerose, hipertensão arterial, resistência insulínica, DM2 e dislipidemias.⁶⁰ Dentre elas, destacam-se o TNF- α , a interleucina-6 (IL-6), a resistina e a adiponectina. A adiponectina, ao contrário das demais adipocinas, age como fator protetor para doenças cardiovasculares e aumenta a sensibilidade à insulina.⁶¹ Duncan et al.⁶² e Snijder et al.⁶³ demonstraram que baixos níveis na circulação de adiponectinas são associados com alto risco futuro de DM2.

Hivert et al.⁶⁴ verificaram em estudo com 2356 pessoas que a prevalência de resistência à insulina reduziu com o aumento do nível de adiponectina plasmática em indivíduos com e sem síndrome metabólica. Também foi observado que a prevalência desta resistência aumentou com o incremento dos níveis de outras adipocinas (TNF- α e resistina), em pessoas com e sem síndrome metabólica.

Demonstrou-se também que a neutralização dos efeitos do TNF- α em ratos obesos provocou aumento da sensibilidade insulínica.^{65, 66} É relatado que camundongos deficientes em TNF- α permaneceram sensíveis à insulina quando colocados em dieta rica em gordura.⁶⁷ Morino et al.⁶⁸ demonstraram que camundongos transgênicos com mutação de IRS-serina em alanina estão protegidos da resistência à insulina induzida por dieta rica em gordura.

O TNF- α exerce efeitos metabólicos que contribuem para a patogênese da resistência à insulina, diabetes mellitus tipo 2 e dislipidemia. Vários mecanismos potenciais podem explicar os efeitos aparentemente deletérios do TNF- α sobre o metabolismo: 1) inibição da expressão de genes-chave nas células adiposas (como proteína transportadora de glicose GLUT4); 2) efeito antagônico sobre a síntese e / ou ação da PPAR γ ; (3) ativação da lipólise que aumenta os níveis de ácidos graxos livres (AGL); (4) fosforilação em serina de IRS-1, que ocasiona a diminuição do sinal insulínico por diminuir a fosforilação em tirosina deste substrato do receptor de insulina.⁶⁹

Ainda não está claro se a associação entre o crescimento fetal é mediada por alterações na sensibilidade à insulina, defeitos na secreção deste hormônio ou uma associação dos dois fatores.⁷⁰

Em mamíferos, a insulina é o principal hormônio no controle da glicemia, com ações que: estimulam a utilização de glicose nos tecidos muscular, adiposo e no

tecido hepático; inibem a gliconeogênese e a glicogenólise e estimulam a síntese de glicogênio. Este hormônio também modifica a expressão ou atividade de diversas enzimas e sistemas de transporte. Além disso, como a insulina é um hormônio anabólico, estimula a síntese de triacilglicerol e proteínas, assim como a captação de lipídeos circulantes e aminoácidos, promovendo assim o armazenamento de substratos e o crescimento celular.⁷¹

A insulina exerce seu efeito através de sua ligação a um receptor específico na membrana plasmática (Figura 1). O receptor de insulina é uma glicoproteína heterotetramérica constituído por duas subunidades alfa e duas subunidades beta, ligadas por pontes de dissulfeto.⁷² A subunidade alfa é inteiramente extracelular, com peso molecular de 135 kDa e contém o sítio de ligação da insulina. A subunidade beta é uma proteína transmembrânica (95 kDa) responsável pela transdução do sinal insulínico.^{72, 73}

Kasuga et al.^{73, 74} descreveram que a subunidade beta do receptor de insulina é uma proteína quinase, estimulada pela insulina, sendo capaz de autofosforilar-se e de fosforilar outros substratos em aminoácidos tirosina. Essa atividade do receptor de insulina é importante para a ação insulínica.⁷⁵ O receptor, uma vez fosforilado em decorrência de sua ativação por insulina, passa a fosforilar substratos intracitoplasmáticos, como por exemplo a pp185 (IRS-1/IRS-2). Este foi o primeiro substrato do receptor de insulina estudado, com peso molecular de aproximadamente 185 kDa.⁷⁶ Sun et al.⁷⁷ observaram que, em células transfectadas com o receptor de insulina humano, há um expressivo aumento da fosforilação da pp185, coincidindo com aumento da ação insulínica.

Em 1991, Sun et al.⁷⁷ clonaram a pp185 e denominaram-na substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) e, após três anos, demonstrou-se que outra proteína também migrava na altura da banda desta proteína, intitulada IRS-2.⁷⁸⁻⁸⁰ Quando o IRS-1 e o IRS-2 estão fosforilados, podem interagir com proteínas contendo a porção SH2 e ativá-las. Entre essas proteínas está uma enzima, a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K). Alessi et al.⁸¹ demonstraram que esta proteína ativada pode induzir a ativação de outras proteínas como a proteína quinase-1 dependente de fosfoinositideo (PDK1) e esta pode fosforilar e ativar a Akt (ou proteína quinase B – PKB). Esta proteína tem três diferentes isoformas - Akt1, Akt2 e Akt3 - e todas são

ativadas pela fosforilação em treonina e serina.^{82, 83} A ativação desta proteína é essencial para síntese de glicogênio,⁸⁴ ação antiapoptótica,⁸⁵ regulação da síntese lipídica,⁸⁶ síntese de proteínas,⁸⁷ regulação da expressão gênica⁸⁸ e transporte de glicose estimulado pela insulina.⁸⁹ A PDK-1, além de fosforilar a Akt, demonstrou capacidade de, em resposta à insulina, fosforilar isoformas atípicas da PKC (ζ e λ) envolvidas na translocação de GLUT4 para a membrana plasmática e, assim, promover a captação de glicose em tecido adiposo e muscular.⁹⁰ Diminuição da ativação das isoformas atípicas da PKC (aPKC) tem sido reportada em músculos de roedores e humanos com DM2.⁹¹

Outras proteínas da mesma família do IRS-1, como o IRS-3 e IRS-4, também podem estimular o transporte de glicose.⁹²

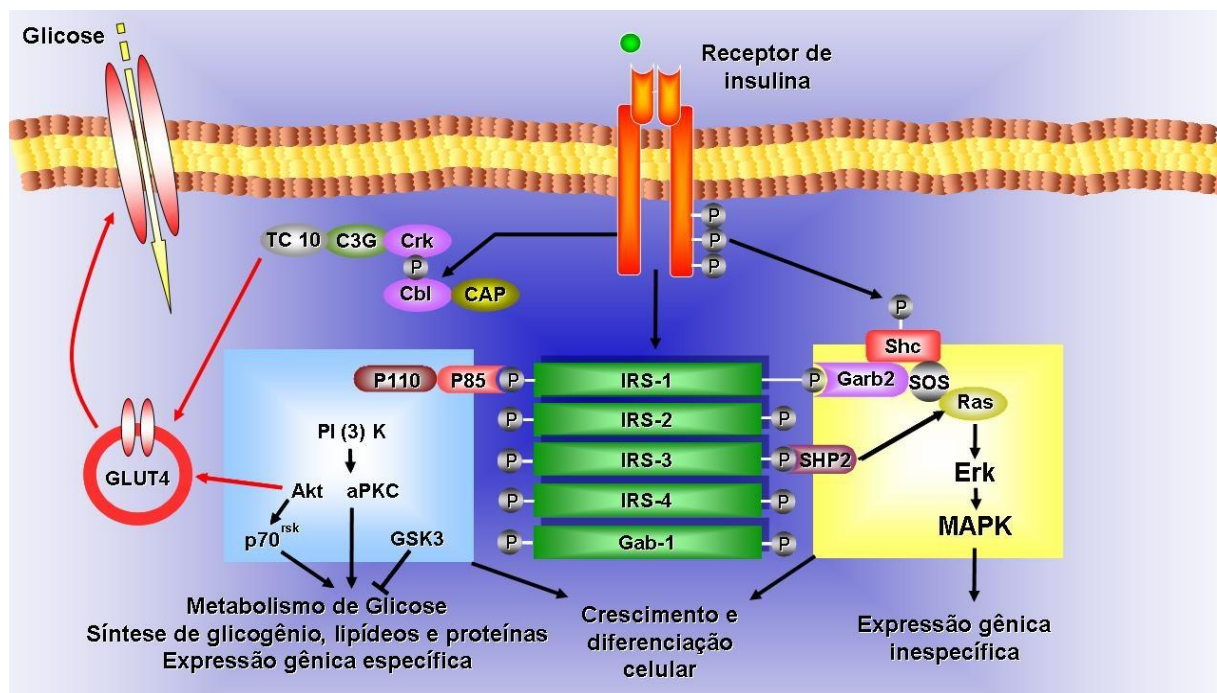


Figura 1 - As vias de sinalização insulínica. O receptor de insulina é uma tirosina quinase que se autofosforila e catalisa a fosforilação de proteínas intracelulares como as proteínas IRS, Shc e Cbl. Após a fosforilação essas proteínas se ligam a outras moléculas de sinalização através de seus domínios SH2, resultando na ativação de vias de sinalização intracelular como a via da PI3K, a cascata da MAPK e a ativação do TC10 via CAP/Cbl. Essas vias regulam o transporte de glicose, a síntese de glicogênio, lipídeos e proteínas, coordenando e integrando o metabolismo intermediário (figura extraída e adaptada de Carvalheira et al.⁹³).

Em suma, a ação insulínica envolve uma sequência de interações covalentes e não covalentes centralizadas, em primeiro nível, nos IRSs. A ligação da insulina ao seu receptor, na superfície celular, determina a fosforilação destes substratos. Estes servem, então, como proteínas ancoradoras para várias enzimas intracelulares e adaptadores moleculares. Tais ligações determinam múltiplos sinais na cascata da ação insulínica, que contribuirão para determinar a multiplicidade dos efeitos biológicos finais. Portanto, os estudos que investigam alterações do mecanismo de ação de insulina presentes na resistência à insulina representam um passo importante na busca de mecanismos preventivos e ou curativo para o diabetes mellitus.

Renström et al.⁹⁴ mostraram que o longo tempo de exposição a um ambiente de altos níveis de glicose e insulina leva ao prejuízo na capacidade de captação de glicose e a redução do conteúdo de IRS-1 e IRS-2 em adipócitos primários de ratos. A depleção de IRS-2 pode ser explicada pela supressão da expressão gênica e, a do IRS-1, parece ser causada por mecanismos pós-transducionais, como por exemplo, alterações na via de degradação de proteína.

Burén et al.⁹⁵ demonstraram que altos níveis de insulina e glicose em longo prazo, particularmente em combinação, podem produzir, dentro de 24 h em cultura de células adiposas de ratos, intensas alterações na capacidade de captação de glicose, no conteúdo de IRS-1/2 e de GLUT4 e na fosforilação da proteína kinase B (PKB) induzida pela insulina.

Em nossos estudos anteriores, observamos uma relação entre doença periodontal materna e alterações no sinal insulínico na prole em sua vida adulta, no qual demonstramos que ratos adultos, proles das ratas com doença periodontal apresentaram redução tanto na sensibilidade à insulina, como no grau de fosforilação em tirosina da pp185 (IRS1-IRS2) após o estímulo insulínico em tecido adiposo branco periepididimal (TAB) e muscular esquelético gastrocnêmio (MG). No intuito de averiguar quais mecanismos estão envolvidos nestes resultados, tornou-se primordial caracterizar os mecanismos pelos quais esta prole apresenta diminuição da resposta tecidual à insulina.

2 Objetivo

Avaliar em ratos adultos, proles de ratas com doença periodontal: 1) grau de fosforilação em serina do IRS-1 em músculo esquelético gastrocnêmio (MG), tecido adiposo branco periepididimal (TAB) e fígado (F); 2) conteúdos de $IR\beta$ e de IRS-1 em MG, TAB e F; 3) colesterolemia e triacilgliceridemia; 4) concentração plasmática de $TNF-\alpha$, IL-6, resistina e adiponectina; 5) frutossaminemia; 6) amilasemia e lipasemia.

3 Materiais e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizadas 8 ratas (2 meses de idade com 220g) e 4 ratos Wistar (3 meses de idade com 350g), mantidos em ambiente de 12/12 horas de claro e escuro (período claro iniciado às 7:00 horas) e temperatura de $23 \pm 2^\circ \text{C}$. As ratas foram divididas, aleatoriamente, em dois grupos: 1) com doença periodontal (DP) induzida por meio de ligadura com fio de seda ao redor do 1º molar inferior (esta doença foi comprovada por análise radiográfica); 2) ratas-controle (CN). Após 7 dias da colocação da ligadura, as ratas de ambos os grupos foram colocadas para acasalamento, verificando-se diariamente, por esfregaço vaginal, o dia da copulação. As ratas prenhas foram separadas em caixas individuais e, após o nascimento, a ninhada foi dividida em proles de ratas com doença periodontal (PDP) e proles de ratas-controle (PCN), e o número de filhotes foi pareado (para as mães ficarem com a mesma quantidade de filhotes). Desde o dia do nascimento até o final do experimento foi avaliado o peso corporal (uma vez por semana) dos filhotes machos de ambos os grupos. A ingestão alimentar destes grupos foi aferida a partir do desmame (três vezes por semana) até a realização dos experimentos. Quando estes filhotes machos PDP (n=20) e PCN (n=20) completaram 75 dias, realizou-se a anestesia com tiopental sódico (Thiopentax® - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, Brasil, 3%, 5mg/ 100g p.c., i.p.).

Em um grupo destes animais (n=10), sob anestesia, realizou-se laparotomia mediana e coleta de sangue pela veia cava inferior, e as amostras de sangue foram transferidas para tubos heparinizados e centrifugadas (4000 rpm, 4°C , 15 minutos). O plasma obtido foi aliquotado e armazenado a -70°C até o dia da avaliação das concentrações plasmáticas de colesterol total (CT), colesterol HDL (HDL), triglicérides (TG), TNF- α , IL-6, resistina, adiponectina, frutossamina, amilase e lipase. Destes animais, coletaram-se também o músculo esquelético gastrocnêmio e o tecido adiposo branco periepídídimo para análise do peso tecidual. Em seguida os animais foram eutanasiados por dose anestésica excessiva.

Outro grupo de animais (n=10) foi utilizado para quantificar, em tecidos responsivos à insulina, o grau de fosforilação em serina do substrato do receptor de

insulina IRS-1, após estímulo insulínico. Nestes experimentos, os animais foram anestesiados conforme descrito acima, realizando-se em seguida: laparotomia mediana, com retirada de amostras dos tecidos antes e após a injeção de 1,5 U de insulina regular (i.v. veia porta) em tempos variáveis (30s para o fígado, 90s para o músculo esquelético gastrocnêmio e 120s para o tecido adiposo branco periepididimal). Em seguida os animais foram eutanasiados por dose anestésica excessiva. Destas mesmas amostras foram avaliados os conteúdos de IR β e de IRS-1.

3.2 Avaliação do sinal insulínico

3.2.1 Preparação das amostras

Imediatamente após a extração, os tecidos foram homogeneizados em Polytron (24000 rpm durante 10 s) em 2 mL de tampão de extração (Tris 100 mM pH 7,5; EDTA 10 mM; SDS 1%; NaF 100 mM; Pirofosfato de Na 10 mM; Ortovanadato de Na 10 mM; 0,1mg/mL Aprotinina) e mantidos em banho-maria (100 °C) durante 10 min, transferidos para gelo e, então, centrifugados a 16000g durante 40 min (4°C). Do sobrenadante foram retiradas alíquotas para determinação da concentração protéica pelo método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay - Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA), e para estoque em tampão de Laemmli (azul de bromofenol 0,1%; SDS 10 %; fosfato de sódio 1M pH 7,0; glicerol 50%; DTT15%).

3.2.2 “Western blotting”

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

A primeira etapa do Western blotting consistiu na submissão das amostras a uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida. Através deste método, foi possível separar proteínas de acordo com seu peso molecular, sem que as unidades protéicas fossem perdidas, permitindo estudos posteriores nessas frações protéicas. Utilizou-se o método desenvolvido por Laemmli e modificado por Garfin⁹⁶ 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 iniciada com a corrida no gel de “stacking” sob voltagem constante em 30 mV até que ocorresse o empacotamento da amostra, que pode ser observado na transição dos géis. Posteriormente, aplicou-se 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 protéicas no gel de poliacrilamida, foi feita a transferência eletroforética dessas frações para uma membrana de nitrocelulose Hybond-C Super (GE Healthcare Buckinghamshire, Germany).

A transferência foi realizada sob voltagem constante de 100 V, durante 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, iniciou-se o processo de imunodeteção de proteínas específicas⁹⁷. 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 2h à temperatura ambiente e, então, lavada com solução basal por três sessões de 10 min. Em seguida, a membrana foi incubada em solução (SB + 3% de leite desnatado) contendo os anticorpos antifososerina-IRS-1(Ser307) (UPSTATE, New York, EUA) ou anti-IRS-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, USA) ou anti-IRβ (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, USA) por 4h em temperatura ambiente. Posteriormente foram realizadas três lavagens com solução

basal e as membranas foram incubadas durante 1h com segundo anticorpo contendo peroxidase de “horseradish” (“kit” de quimioluminescência -ECL- GE Healthcare Buckinghamshire, Germany). Novamente, realizaram-se 3 lavagens das membranas de nitrocelulose com solução basal, com duração de 10 min cada lavagem. Após estes procedimentos, as membranas foram levadas até uma câmara escura, onde foi adicionado 1 ml de cada solução de detecção 1 e 2 (do kit de ECL), e incubou-se por 1 minuto. Finalmente, drenou-se o excesso de reagente e a membrana de nitrocelulose foi exposta ao filme de RX (Hyperfilm ECL– GE Healthcare Buckinghamshire, Germany) durante 10 min à temperatura ambiente. O filme foi processado com solução reveladora e reforçadora GBX (KODAK BRASILEIRA, São Paulo, BR) e solução fixadora e reforçadora GBX (KODAK BRASILEIRA, São Paulo, BR).

A intensidade dos “blots” foi avaliada por densitometria óptica, utilizando-se o programa Scion Image (Scion Image-Release Beta 3b, NIH, Frederick, MD, USA).

3.3 Determinação da concentração plasmática de colesterol total

A concentração plasmática de colesterol total (CT) foi determinada pelo método de colesterol oxidase, que consiste em método enzimático específico desta análise (Katal Biotecnológica Ind. Com. Ltda., Belo Horizonte, Brasil).

Neste método, os ésteres de colesterol da amostra são hidrolisados pelo colesterol esterase, produzindo colesterol livre. Este, em presença do colesterol oxidase e do oxigênio, produz peróxido de hidrogênio que pela ação da peroxidase em presença de fenol e 4-aminoantipirina produz um composto róseo-avermelhado (quinonimina) com máximo de absorção em 500 nm.

Para a dosagem de colesterol total foram utilizados 10µL da amostra ou de padrão e 1,0 mL de reagente enzimático. Essa solução foi homogeneizada e colocada em banho-maria a 37°C durante 10 minutos. As absorbâncias do teste e do padrão são determinadas em 500 nm acertando o zero com o branco.

Cálculos

$\text{Colesterol (mg/dL)} = (\text{Absorbância do Teste} \div \text{Absorbância do Padrão}) \times 200$

$\text{Colesterol (mmol/L)} = \text{mg/dL} \times 0,0259$

3.4 Determinação da concentração plasmática do colesterol HDL

A determinação da concentração plasmática do colesterol HDL (HDL) foi realizada por um método enzimático de precipitação, específico para esta análise (Katal Biotecnológica Ind. Com. Ltda., Belo Horizonte, Brasil).

O conjunto colesterol HDL é um sistema que se destina à separação do colesterol ligado à fração HDL no plasma sanguíneo. A mistura ácido fosfotúngstico/cloreto de magnésio precipita os quilomicrons, as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e muito baixa densidade (VLDL) sem alterar a solubilidade das lipoproteínas de alta densidade (HDL). Após centrifugação, recolhe-se o líquido sobrenadante que contém a fração HDL cujo conteúdo em colesterol (colesterol HDL) é determinado enzimaticamente.

Para a dosagem de HDL foram utilizados 100µL da amostra ou de padrão e 1,0 mL de reagente de cor. Essa solução foi homogeneizada e colocada em banho-maria a 37°C durante 10 minutos. As absorbâncias do teste e do padrão são determinadas em 500 nm acertando o zero com o branco.

Cálculos

Colesterol HDL (mg/dL) = (Absorbância do Teste ÷ Absorbância do Padrão) x 40*

*OBS: O valor 40 leva em conta a diluição do soro na etapa de precipitação.

3.5 Determinação da concentração plasmática dos triglicérides

A concentração plasmática dos triglicérides foi determinada pelo método enzimático da glicerol-P-oxidase, específico para quantificação de triglicérides (Katal Biotecnológica Ind. Com. Ltda., Belo Horizonte, Brasil).

No presente método, os triglicérides do plasma são hidrolisados pela lipase lipoproteica produzindo glicerol livre. Este é fosforilado pela glicerol quinase, cujo produto sofre a ação da glicerol-P-oxidase, a qual, em presença de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio. Este, sob a ação da peroxidase e em presença de um reagente fenólico (p-clorofenol) e 4-aminoantipirina, produz um composto róseo-avermelhado (quinonimina), com máximo de absorção em 500 nm.

Para a dosagem dos triglicérides, foram utilizados 10µL da amostra ou de padrão e 1,0 mL de reagente de cor. Essa solução foi homogeneizada e colocada

em banho-maria a 37°C durante 10 minutos. As absorbâncias do teste e do padrão são determinadas em 500 nm acertando o zero com o branco.

Cálculos

Triglicérides (mg/dl) = (Absorbância do Teste ÷ Absorbância do Padrão) x200

Triglicérides (mmol/L) = mg/dL x 0,0113

3.6 Determinação da concentração plasmática do LDL e VLDL

Os valores do colesterol VLDL e colesterol LDL foram obtidos pela equação de Friedewald⁹⁸:

VLDL (mg/dl) = (Triglicérides (mg/dl)/ 5)

LDL (mg/dl) = Colesterol total – (Colesterol HDL + Colesterol VLDL)

3.7 Concentrações plasmáticas de citocinas

As concentrações plasmáticas de TNF- α , IL-6, resistina e adiponectina foram determinadas pelo método de ELISA com a utilização de kits de acordo com as instruções dos fabricantes. Os kits comerciais utilizados foram Invitrogen Corporation, Camarillo, USA; BD Biosciences, San Diego, USA; Biovendor, Heidelberg, Germany; RayBio, Norcross, USA, respectivamente.

3.8 Lipase

A atividade da lipase (U/L) foi estimada através de método enzimático colorimétrico (kit comercial - Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Brasil, ref. 107), segundo recomendações do fabricante. Nas determinações foi utilizado como substrato 1-2-o-dilaúril-rac-glicero-3-ácido glutárico (6- metilresorufina)-éster, e a absorbância do produto de reação (metilresorufurina) nos tempos 90 e 180 segundos foi obtida utilizando-se espectrofotômetro (comprimento de onda de 570 nm) da marca Hitach (Hitachi, Ltd. Tokyo, Japan).

3.9 Amilase

A atividade de amilase (U/dL) foi determinada através de método de “caraway” modificado utilizando-se kit comercial (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Brasil, ref. 11), segundo recomendações do fabricante. A absorbância foi

estimada em 660 nm em espectrofotômetro da marca Hitachi (Hitachi, Ltd. Tokyo, Japan).

3.10 Frutosamina

A frutosamina ($\mu\text{mol/L}$) foi estimada por método cinético de tempo fixo (kit comercial - Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Brasil, ref. 97), utilizando-se como substrato azul de nitrotetrazólio. As absorbâncias nos tempos de reação 10 e 15 minutos foram estimadas em espectrofotômetro da marca Hitachi (Hitachi, Ltd. Tokyo, Japan), em comprimento de onda de 530nm. Para realização das dosagens foram seguidas as recomendações do fabricante.

3.11 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o programa estatístico BioEstat 5.0 (BioEstat 5.0, Pará, Brasil). Duas análises foram realizadas.

1) Para o sinal insulínico

A normalidade do conjunto de dados analisados foi verificada. As análises estatísticas foram realizadas por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, quando a análise de variância sugeriu uma diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

2) Para a análise das concentrações plasmáticas de citocinas, ensaios lipídicos, amilase, lipase, frutosamina, ingestão alimentar, peso corpóreo e tecidual (músculo gastrocnêmio e adiposo branco periepididimal).

As análises estatísticas foram analisadas pelo teste t de Student. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Todos os valores foram apresentados como média $\pm$ EPM.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação do peso corporal (g)

Os resultados do peso corporal dos grupos PDP e PCN foram avaliados semanalmente, desde o nascimento até 75 dias de idade. Não houve diferença estatística entre os dois grupos desde o início até o final do experimento (Figura 2).

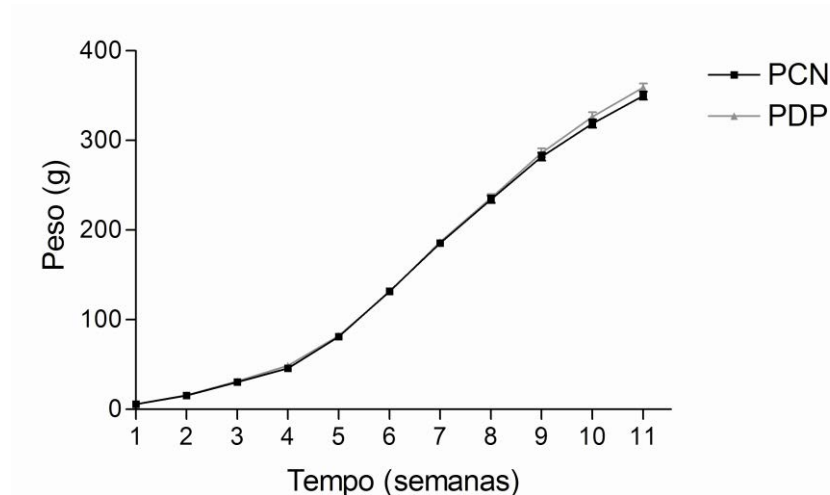


Figura 2 - Peso corpóreo semanal de ratos, proles de ratas-controle (PCN) e proles de ratas com doença periodontal (PDP) desde o nascimento até 75 dias de idade. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM, $n = 20$.

4.2 Ingestão alimentar

A Tabela 1 mostra a ingestão alimentar total de PCN e PDP do desmame até o final do experimento. Observa-se que o grupo PDP apresentou maior ($p < 0,05$) ingestão alimentar total (do desmame até o final do experimento) em comparação com PCN.

Tabela 1 - Ingestão alimentar total (média) de ratos, proles de ratas-controle (PCN) e proles de ratas com doença periodontal (PDP) do desmame até o final do experimento

	PCN	PDP
Ingestão alimentar (g)	1126 $\pm$ 13,33	1175 $\pm$ 10,82*

Valores expressos como média $\pm$ EPM, $n=20$. * $p < 0,05$ comparado ao controle

4.3 Avaliação do grau de fosforilação em serina do substrato do receptor de insulina IRS-1 no músculo esquelético gastrocnêmio, tecido adiposo branco periepídídimal e fígado

A figura 3 (em A, C e E) mostra autorradiografias típicas referentes ao: 1) grau de fosforilação em serina do IRS-1, antes e após o estímulo insulínico, no tecido muscular esquelético (gastrocnêmio), adiposo e hepático; 2) conteúdo de β -actina, destes mesmos tecidos, que foi utilizada como controle. A figura 3 (em B, D e F) mostra os resultados, expressos em unidades arbitrárias por μ g de proteína amostrada. Em ambos os grupos, verificou-se que após o estímulo insulínico não houve alteração no grau de fosforilação em serina de IRS-1 com relação ao estado basal, ou seja, sem a estimulação insulínica imposta em todos os tecidos estudados. Comparando-se os dois grupos (PCN e PDP) observou-se que, no estado basal, não houve diferenças significativas na fosforilação em serina de IRS-1. Entretanto, após estímulo insulínico, constatou-se aumento significativo ($p < 0,05$) no grau de fosforilação em serina de IRS-1 apenas em tecido adiposo do grupo PDP em relação ao grupo-controle. Esta alteração não foi encontrada nos tecidos muscular e hepático.

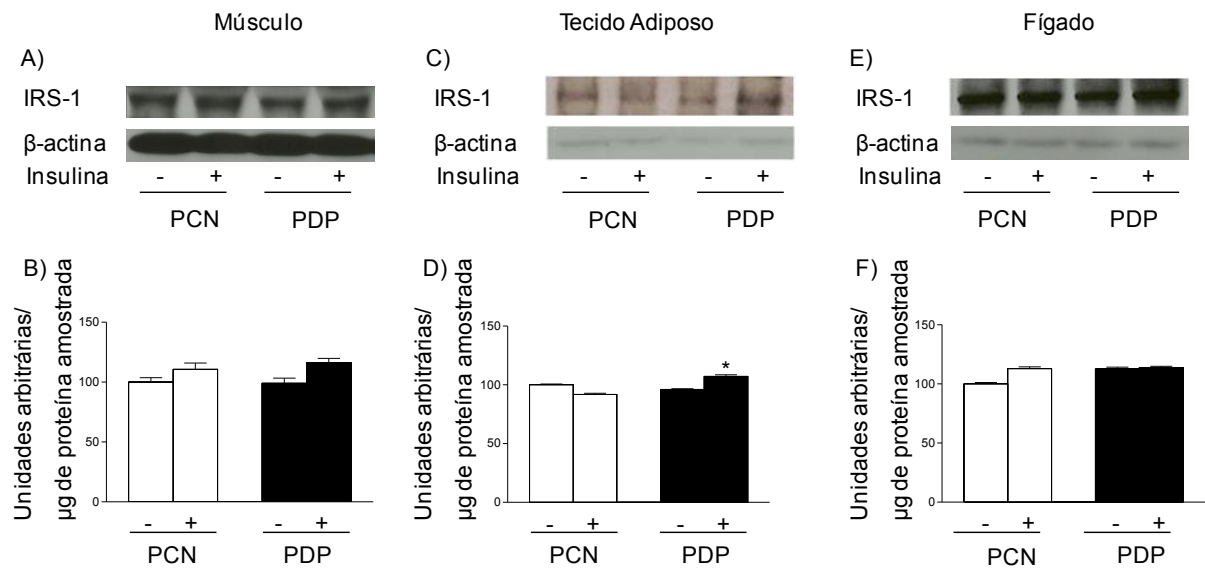


Figura 3 - Avaliação do grau de fosforilação em serina do IRS-1 (Ser307) antes (-) e após (+) o estímulo insulínico no músculo gastrocnêmio (A, B), tecido adiposo branco periepídimal (C, D) e fígado (E, F) de proles de ratas-controle (PCN) e proles de ratas com doença periodontal (PDP). Em **A, C e E** autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 μg). β-actina foi utilizada como controle. Em **B, D e F**, valores do grau de fosforilação em serina do IRS-1, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média ± EPM, n=10, *p<0,05 PDP (+) vs PCN (+).

4.4 Avaliação do conteúdo da subunidade β do receptor de insulina (IR β) no músculo esquelético gastrocnêmio, tecido adiposo branco periepididimal e fígado

Na figura 4, observa-se que não houve diferença no conteúdo de IR β entre os dois grupos em todos os tecidos estudados.

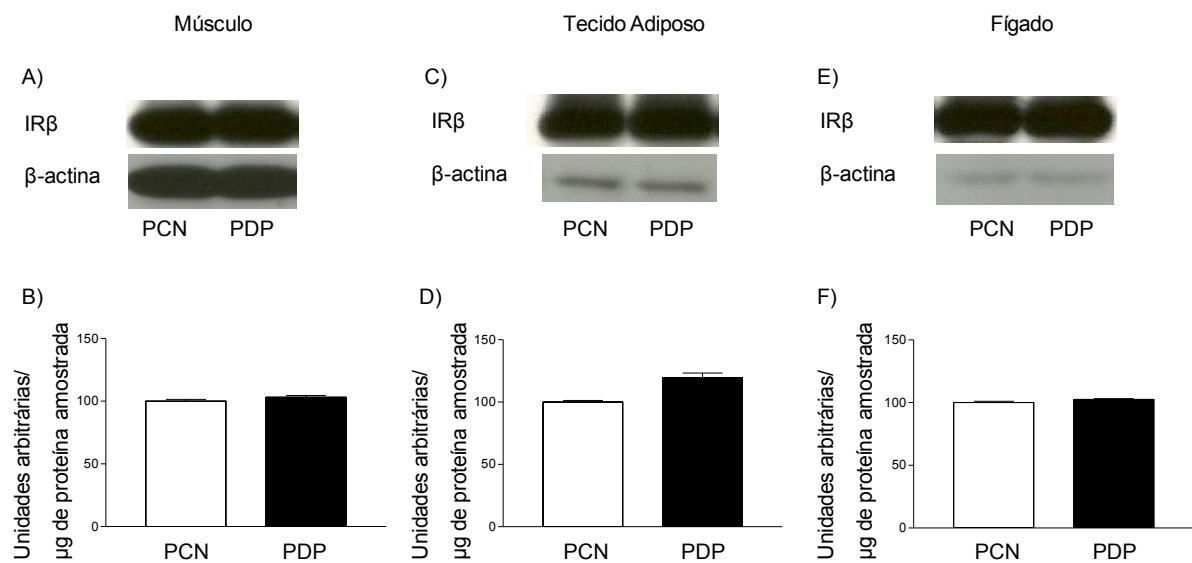


Figura 4 - Avaliação do conteúdo da subunidade β do receptor de insulina (IR β) em tecido muscular gastrocnêmio (A, B), adiposo branco periepididimal (C, D) e hepático (E, F) de proles de ratas-controle (PCN) e de proles de ratas com doença periodontal (PDP). Em **A**, **C** e **E** autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 μ g). Em **B**, **D** e **F**, valores do conteúdo do IR β , expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média $\pm$ EPM, n=8.

4.5 Avaliação do conteúdo do substrato do receptor de insulina IRS-1 no músculo esquelético gastrocnêmio, tecido adiposo branco periepididimal e fígado

A figura 5 mostra o conteúdo do IRS-1 em tecido muscular gastrocnêmio, adiposo branco e hepático dos grupos PCN e PDP. Observa-se que não houve diferença no conteúdo celular de IRS-1 entre estes grupos nestes tecidos estudados.

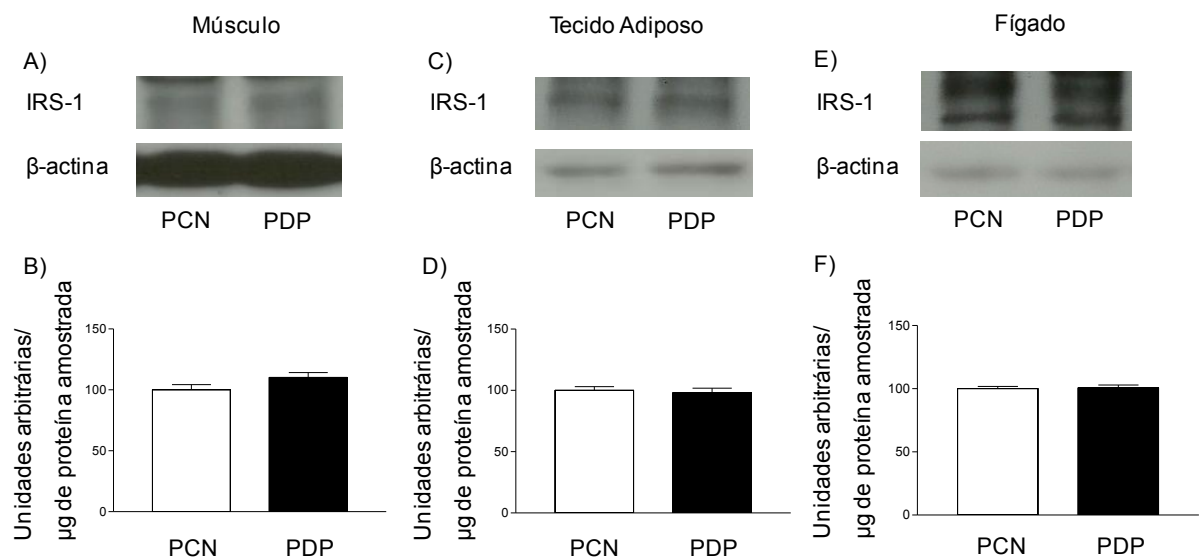


Figura 5 - Avaliação do conteúdo do IRS-1 em tecido muscular gastrocnêmio (A, B), adiposo branco periepididimal (C, D) e hepático (E, F) de proles de ratas-controle (PCN) e proles de ratas com doença periodontal (PDP). Em **A**, **C** e **E** autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 µg). Em **B**, **D** e **F**, valores do conteúdo do IRS-1, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média $\pm$ EPM, n=8.

4.6 Concentrações plasmáticas de lipídios

A Tabela 2 ilustra as concentrações plasmáticas de lipídios de proles de ratas-controle (PCN) e proles de ratas com doença periodontal (PDP). Observou-se aumento significativo ($p < 0,05$) nas concentrações plasmáticas de colesterol Total, colesterol LDL, colesterol VLDL e triglicérides nos ratos PDP em relação aos ratos-controle. Porém, em relação ao colesterol HDL não houve diferença entre os dois grupos.

Tabela 2 - Concentrações plasmáticas (mg/dL) de lipídeos de ratos, proles de ratas-controle (PCN) e proles de ratas com doença periodontal (PDP)

	PCN	PDP
Colesterol Total	46,45 $\pm$ 3,22	56,34 $\pm$ 1,92*
Triglicérides	44,15 $\pm$ 5,14	62,52 $\pm$ 5,54*
Colesterol HDL	13,40 $\pm$ 0,54	14,20 $\pm$ 0,29
Colesterol LDL	24,01 $\pm$ 2,39	29,94 $\pm$ 1,19*
Colesterol VLDL	8,83 $\pm$ 1,03	12,51 $\pm$ 1,04*

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

4.7 Concentrações plasmáticas de citocinas e adipocinas

Ao analisarmos as concentrações plasmáticas de TNF- α , IL-6 e resistina, observou-se aumento destas no grupo PDP em relação ao PCN, porém nenhuma diferença foi encontrada na concentração de adiponectina entre estes grupos (Tabela 3).

Tabela 3 - Concentrações plasmáticas de citocinas de ratos, proles de ratas-controle (PCN) e proles de ratas com doença periodontal (PDP)

	PCN	PDP
TNF- α (pg/mL)	8,66 $\pm$ 0,39	10,67 $\pm$ 0,38*
IL-6 (pg/mL)	13,29 $\pm$ 0,17	13,82 $\pm$ 0,14*
Resistina (ng/mL)	1,56 $\pm$ 0,09	2,77 $\pm$ 0,48*
Adiponectina (mg/ml)	1,67 $\pm$ 0,42	1,62 $\pm$ 0,41

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

4.8 Peso dos tecidos

Na Tabela 4, observa-se um aumento tanto no peso absoluto (g) como no peso relativo (por 100 g de peso corporal) de tecido adiposo branco periepididimal (TAB) no grupo PDP em relação ao grupo PCN. Por outro lado, no tecido muscular (G) houve uma diminuição tanto no peso absoluto (g) como no peso relativo (por 100 g de peso corporal) deste tecido no grupo PDP quando comparado com o grupo-controle.

Tabela 4 - Peso absoluto (g) e relativo (por 100g de peso corpóreo) do tecido adiposo branco periepididimal (TAB) e músculo gastrocnêmio (MG)

	PCN	PDP
TAB g	4,89 ± 0,23	5,94 ± 0,27*
TAB g/100g p.c	1,37 ± 0,05	1,57 ± 0,06*
MG g	2,24 ± 0,04	2,05 ± 0,05*
MG g/100g p.c	0,61 ± 0,02	0,56 ± 0,01*

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

4.9 Concentrações plasmáticas de amilase, lipase e frutossamina

A Tabela 5 mostra as concentrações plasmáticas de amilase, lipase e frutossamina dos grupos PCN e PDP. O grupo proles de ratas com DP apresentou valores mais elevados em todos estes parâmetros em relação ao grupo-controle.

Tabela 5 - Concentrações plasmáticas de amilase, lipase e frutossamina dos ratos PCN e PDP

	PCN	PDP
Lipase (U/L)	6,22 ± 0,61	30,86 ± 1,99*
Amilase (U/dL)	697,3 ± 2,24	721,5 ± 2,75*
Frutossamina (µmol/L)	109,4 ± 10,34	204,4 ± 28,34 *

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

5 Discussão

O diabetes mellitus, no século XXI, é considerado um dos mais importantes problemas de saúde pública em muitos países, principalmente naqueles em desenvolvimento e/ou industrializados. Esse fato tem merecido uma atenção especial da comunidade médica, dos profissionais de saúde, dos governos, da indústria farmacêutica e dos portadores de diabetes.⁹⁹

Whiting et al.,¹⁰⁰ em seu estudo sobre prevalência do diabetes mellitus em adultos (20-79 anos), mostra que, em 2030, o número de pessoas diabéticas deverá alcançar aproximadamente 552 milhões no mundo e, particularmente no Brasil, esse número alcançará 19.605 milhões. Estimativas globais de prevalência do diabetes mostram que esta patologia continua a ser um crescente problema de saúde internacional. O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é uma doença metabólica complexa e a sua patogênese envolve anormalidades na ação periférica da insulina e secreção de insulina pelas células β pancreáticas.¹⁰¹

Diferentes estados metabólicos alterados, tais como elevação persistente de glicose circulante, insulina, ácidos graxos e citocinas, podem levar à resistência à insulina periférica,¹⁰² considerada a característica fisiopatológica mais importante em muitos estados pré-diabéticos.¹⁰¹

Sob uma perspectiva molecular, a resistência insulínica pode ocorrer em vários níveis: 1) pré-receptor: fenômeno raro nos dias atuais, mas que antigamente era exemplificado por pacientes com altos níveis de anticorpos circulantes contra insulina que bloqueavam a ligação do ligante ao seu receptor; 2) receptor: pode ser resultante de alterações genéticas na expressão do receptor ou em sua estrutura, como alterações na atividade do receptor devido à fosforilação em serina; 3) pós-receptor: pode ocorrer em quase todos os locais, em uma das vias comuns ou ramificadas da sinalização insulínica.⁷¹

Nos estados mais comuns de resistência à insulina, parece haver defeitos em vários níveis. No diabetes tipo 2 por exemplo, há uma redução na concentração do receptor, na atividade quinase do receptor, na concentração e fosforilação de IRS-1 e IRS-2, na atividade da PI3-quinase (PI3K) e na translocação do transportador de

glicose, bem como defeitos na atividade das enzimas intracelulares.^{71, 103, 104} Normalmente, em modelos de resistência à insulina, o sinal insulínico está alterado.^{103, 105, 106}

A programação do desenvolvimento fetal (“programming”) é considerada um importante fator de risco para o desenvolvimento de várias doenças na vida adulta, incluindo doenças coronárias e outros distúrbios relacionados com a resistência à insulina.¹⁰⁷ O “programming” refere-se ao fato de que estímulos, aplicados durante o início do desenvolvimento fetal, geram mudanças permanentes que persistem ao longo da vida. Ademais, o “programming” não se limita apenas ao meio ambiente intrauterino, mas estende-se até a infância, em que diferentes órgãos e sistemas continuam adaptando-se a estímulos diversos.⁵⁷ Perturbações que ocorrem com a mulher durante a gestação, tais como alterações na nutrição, nas concentrações de citocinas, de cortisol e redução do fluxo sanguíneo uteroplacentário, programam o feto para desenvolver doenças na vida adulta.¹⁰⁸

Sabe-se que crianças que apresentam desenvolvimento inferior ao esperado para a idade gestacional têm o número e a função de células pancreáticas reduzidos, resultando em diminuição da produção de insulina e, conseqüentemente, em alta relação glicose/insulina. Isto leva à sinalização insulínica anormal em músculo esquelético, fígado e adipócitos e produção anormal de glicose, resultando em resistência à insulina.⁵⁷

Conforme comentado anteriormente, a doença periodontal tem sido indicada como um dos fatores responsáveis pelo nascimento prematuro de bebês com baixo peso (PBP).^{1, 2, 5, 9-13} Por outro lado, Davenport et al.¹⁵ e Ryu et al.¹⁰⁹ não observaram diferenças no peso ao nascimento em proles de mães com DP. Estes resultados corroboram os achados do presente estudo (Figura 2) no qual também não se observou baixo peso ao nascimento nas proles das ratas com doença periodontal.

Na literatura, há diversos relatos da associação entre baixo peso ao nascer e posterior desenvolvimento de DM2 na vida adulta.³⁶⁻³⁸ No início da elaboração do presente projeto a hipótese era que a DP materna iria promover baixo peso ao nascimento (BPN) e este BPN, posteriormente, ocasionaria diabetes na vida adulta das proles de ratas com DP. Entretanto, esta associação não pôde ser averiguada

neste estudo, pois conforme descrito acima observou-se que ratos, proles de ratas com DP não apresentaram baixo peso ao nascimento. Apesar disso, os ratos, proles de mães com DP apresentaram resistência à insulina e diminuição do grau de fosforilação em tirosina da pp185 (IRS-1/IRS-2) em tecido adiposo e muscular.¹¹⁰

No intuito de averiguar que mecanismos promoveram a diminuição da fosforilação em tirosina da pp185 nesses tecidos, a análise de fosforilação em serina de IRS-1 foi realizada, pois conforme descrito na introdução, o aumento na fosforilação em serina de IRS-1 pode ser uma das causas da diminuição da fosforilação em tirosina de IRSs. A partir da análise dos resultados deste estudo, constatamos que as proles de ratas com doença periodontal apresentaram aumento no grau de fosforilação em serina no tecido adiposo branco, porém não foram encontradas diferenças significativas nesta avaliação em tecido muscular e fígado (figura 3). Esse aumento de fosforilação em serina no tecido adiposo branco não foi decorrente de alterações nos conteúdos de IR β e IRS-1 (figuras 4 e 5). Também não foram evidenciadas alterações nestes conteúdos em tecido muscular e hepático. A partir destes resultados, pode-se inferir que, em tecido adiposo branco periepididimal, a diminuição da fosforilação em tirosina da pp185 pode ser decorrente de maior fosforilação em serina de IRS-1.

Como descrito anteriormente, a ação insulínica inicia-se a partir da ligação do hormônio ao seu receptor específico que se autofosforila e fosforila em tirosina substratos citoplasmáticos, tais como IRS-1 e IRS-2. Estes substratos fosforilados em tirosina podem se associar à PI3K, ativando-a. Esta ativação é essencial para o transporte de glicose em tecidos sensíveis à insulina.¹¹¹ O estudo de Sano et al.¹¹² indica que o AS160 (substrato da Akt de 160 kDa) é um componente chave que liga a via da sinalização da insulina da PI3K à maquinaria de tráfico vesicular na translocação do GLUT4.

O receptor de insulina, além de ser fosforilado em tirosina, também pode ser fosforilado em serina, o que atenua a transmissão do sinal através da diminuição da capacidade do receptor em se fosforilar em tirosina, após estímulo com insulina.¹¹³ Essas fosforilações inibitórias causam *feedback* negativo na sinalização insulínica e podem provocar resistência à insulina.⁹³ Estudos recentes indicam que a resistência à insulina induzida pela obesidade pode ser decorrente da ativação sequencial da

proteína quinase C (PKC) e da quinase inibidora do fator nuclear $\kappa\beta$ (IKK β).^{114, 115} Zhang et al.¹¹⁶ demonstraram que o TNF- α ativa a SK6 (p70S6k- uma serina quinase), através do IKK β , e que SK6 fosforila diretamente o IRS-1 em múltiplos resíduos de serina para, então, inibir a sinalização insulínica.

Além do TNF- α , outras citocinas como IL-6 e IL-1 β exercem efeitos parácrinos para ativar as vias inflamatórias no interior das células-alvo à insulina. Isto leva à ativação de Jun N-terminal quinase (JNK), inibidor da quinase $\kappa\beta$ (IKK) β , e outras serinas quinases. Estas serinas quinases também podem fosforilar em serina proteínas do substrato receptor de insulina (IRS), receptores de insulina e, possivelmente, outras moléculas da sinalização insulínica. Estes eventos de fosforilação em serina interferem com a ação normal da insulina, criando um estado celular de resistência à insulina.¹¹⁷ A partir dos dados citados, pode-se inferir que a alteração no sinal insulínico em tecido adiposo dos ratos PDP (Figura 3) pode ser devido ao aumento das concentrações plasmáticas de citocinas, como o TNF- α e IL-6, observado nestes animais (tabela 3).

Para corroborar esta hipótese, há um estudo realizado por Alvaro et al.¹¹⁸ no qual demonstrou que o tratamento crônico com TNF- α em músculo esquelético, resultou em translocação prejudicada do GLUT4 para a membrana plasmática e, consequente captação deficiente de glicose. E estes autores concluíram que o TNF- α , por ativar a P38 MAPK, produziu fosforilação do IRS-1 em resíduos de serina, prejudicando a fosforilação em tirosina do IRS-1 deste substrato, associada à atividade da PI3K e Akt.

Adicionalmente, Nieto-Vazquez et al.¹¹⁹ estudaram o impacto do tratamento com IL-6 na sinalização insulínica em músculo esquelético, encontrando um duplo efeito. A curto prazo, IL-6 ativa AMPK sem afetar a fosforilação de Akt pela insulina. Separadamente, IL-6 e insulina ativam a fosforilação de AS160 e, juntos, possuem um efeito aditivo, ou seja, aumentam a captação de glicose e a sensibilidade sistêmica à insulina. A fosforilação de AS160 é estimulada pela insulina e é necessária para regular a translocação do GLUT4.¹¹² A exposição crônica ao IL-6 acarreta em deficiência da translocação de GLUT-4 para a membrana plasmática e defeitos na sinalização do substrato receptor de insulina. Portanto, o tratamento crônico com essa citocina prejudica completamente a fosforilação em tirosina de

IRS-1 e IRS-2 e a fosforilação em serina do Akt, sem alterar a quantidade total desta proteína. Além disso, IL-6 produz fosforilação do IRS-1 em resíduos Ser307 de uma maneira JNK dependente. No músculo de camundongos tratados com IL-6, encontrou-se um alto teor proteína tirosina fosfatase 1B (PTB1B).¹¹⁹

Outro fator importante que pode regular negativamente o sinal insulínico é a PTP1B¹⁰¹ relacionada à desfosforilação da tirosina.¹¹⁹ Estudos conduzidos em ratos demonstraram que a atividade elevada da PTP1B pode induzir desfosforilação em tirosina do IR e IRS-1, resultando em defeitos na transdução do sinal insulínico e, assim, ocasionando resistência à insulina.¹²⁰ Embora no presente estudo não tenhamos encontrado alteração no grau de fosforilação em serina no músculo, estudos anteriores do nosso laboratório demonstraram diminuição no grau de fosforilação em tirosina neste tecido em ratos adultos, proles de ratas com DP, quando comparados com grupo-controle.¹¹⁰ Portanto, pode-se aventar que a diminuição da fosforilação em tirosina da pp185 em músculo gastrocnêmio no grupo PDP possa ser decorrente de um aumento da atividade de PTP1B neste tecido, ou também pela atuação de outras proteínas que podem diminuir a função do receptor de insulina, bloqueando sua interação com proteínas IRS ou modificando sua atividade quinase, tais como glicoproteína-1 de membrana plasmática celular (PC1),¹²¹ proteína ligada a receptor de fator de crescimento 10 (Grb10) e 14 (Grb14),^{122, 123} supressores da sinalização de citocinas (SOCS1 e SOCS3).¹²⁴

Frittitta et al.¹²⁵ observaram que em fibroblastos o PC-1 liga-se ao IR tanto *in vivo* como *in vitro*, e subsequentemente, a função do receptor é inibida. Por conseguinte, é possível que o PC-1 interaja com o IR e altere a sua capacidade de ativar a subunidade β . Além disso, é possível que a fosforilação da proteína medie a interação da PC-1 com o IR. A PC-1 tem sido relatada como sendo uma treonina quinase,^{126, 127} e a função tirosina quinase do IR é anulada pela fosforilação em serina/treonina.¹²⁸

Smith et al.¹²⁹ demonstraram que camundongos deficientes para Grb10 exibem aumento na fosforilação em tirosina de IRS-1 induzida por insulina no tecido adiposo branco e muscular. Camundongos deficientes para Grb14 exibem aumento no sinal insulínico por meio da via IRS-1 e Akt no fígado e músculo esquelético.¹²³ Além disso, foi demonstrado na literatura que ambos os modelos de camundongos

knockout para Grb10 e Grb14 apresentam melhora na homeostase da glicose corpórea.^{123, 129}

As proteínas SOCS têm sido encontradas em maior atividade em situações de resistência insulínica, como na obesidade, podendo participar da fisiopatologia do diabetes mellitus tipo 2.¹³⁰ Ademais, sabe-se que a SOCS estão envolvidas na cascata da inflamação. Citocinas pro-inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β induzem expressão de SOCS-3.¹³¹ Emanuelli et al.¹³⁰ demonstraram que a SOCS-3 em fibroblastos diminui a fosforilação em tirosina do IRS-1 induzida por insulina e a sua associação com p85, uma subunidade reguladora de PI3-k. Este mecanismo aponta para uma função da SOCS-3 na resistência à insulina. Esses autores demonstraram ainda que o TNF- α induziu aumento na expressão de SOCS-3, no fígado, músculo e tecido adiposo. A inflamação aumenta a expressão hepática de SOCS, especialmente SOCS-1 e SOCS-3, e estas proteínas podem antagonizar sinalização do IR no fígado, podendo haver prejuízo na fosforilação em tirosina de IRS.¹³²

Ao analisarmos o peso do músculo esquelético gastrocnêmio e do tecido adiposo branco periepídídimo no grupo PDP constatamos aumento tanto no peso absoluto ($\uparrow 20\%$) como no peso relativo ($\uparrow 15\%$) de tecido adiposo e diminuição tanto no peso absoluto ($\downarrow 8\%$) como no peso relativo ($\downarrow 8\%$) do músculo em relação ao grupo PCN (tabela 4). Apesar das alterações no peso destes tecidos, o peso corpóreo dos animais não foi alterado, pois o aumento no peso do tecido adiposo pode ter sido compensado pela diminuição do peso do tecido muscular. Observou-se, pela análise do peso relativo dos tecidos, em termos percentuais, que o aumento do tecido adiposo foi quase o dobro em relação ao valor percentual da diminuição do peso muscular, porém, não se observou diferença no peso corpóreo final. Esta resposta pode ser devido ao fato de que o tecido muscular corresponde a uma porção considerável do peso corporal (p.c.), ou seja, cerca de 40% do p.c., enquanto o tecido adiposo corresponde em torno de 20% do p.c. em indivíduos não obesos.

O prejuízo no crescimento muscular é relevante no contexto de um risco tardio para a resistência à insulina, uma vez que o músculo esquelético é um dos principais determinantes da sensibilidade à insulina, responsável por 90% da captação de glicose estimulada por este hormônio.¹³³

A Figura 3 também não mostra alteração na fosforilação em serina do IRS-1 no tecido hepático. Em estudos anteriores, neste mesmo tecido, não encontramos alteração na fosforilação em tirosina da pp185 (IRS-1/IRS-2). Esta resposta está de acordo com modelos de resistência à insulina, como os ratos transgênicos (TG) com excesso crônico de hormônio de crescimento, nos quais,¹³⁴ após estímulo insulínico, observaram em fígado de ratos TG: a) redução na fosforilação de IRS-1; b) aumento significativo na fosforilação de IRS-2. A inexistência de alteração do grau de fosforilação da pp185 pode ser decorrente do equilíbrio proveniente entre o aumento e a diminuição da fosforilação em tirosina de IRS-2 e de IRS-1, respectivamente. Cho et al.¹³⁴ sugerem que esses resultados encontrados no tecido hepático de ratos TG podem compensar a resistência à insulina encontrada em tecido adiposo e muscular para prevenir a hiperglicemia. Recentemente, o tecido hepático tem mostrado ser peça importante na manutenção da homeostase lipídica e glicídica em ratos *knockout* para GLUT4 músculo-específicos.¹³⁵ Estes achados sugerem que o prejuízo na regulação glicídica dependente da insulina, provocado pelo excesso crônico de hormônio de crescimento nos tecidos adiposo e muscular, é compensado pela regulação da glicose no fígado e que a sinalização da insulina através da IRS-2 no tecido hepático, em condições de excesso de hormônio de crescimento, promove aumento na síntese de lipídio e glicogênio, resultando no acúmulo dos mesmos no fígado.

A Tabela 1 mostra que o grupo PDP apresentou uma maior ingestão alimentar em relação ao grupo-controle. Isto pode ter propiciado aumento no acúmulo de tecido adiposo periepididimal em PDP, conforme foi escrito anteriormente. Esse aumento do tecido adiposo poderia explicar as concentrações plasmáticas aumentadas de citocinas encontradas nesses animais, já que Hotamisligil et al.^{65, 136} demonstraram que o aumento de tecido adiposo tanto em roedores como em humanos obesos induz nos adipócitos um aumento na produção de citocinas como TNF- α .

Vários autores demonstraram que o TNF- α é um forte candidato a induzir resistência insulínica na obesidade.^{65, 113, 137, 138} Conforme descrito acima, o tratamento com TNF- α leva à redução da autofosforilação do receptor da insulina estimulada pela própria insulina e inibição subsequente da fosforilação em tirosina

de IRS-1.^{113, 139-141} Ademais, o TNF- α induz modificação do IRS-1 por fosforilação em serina, o que torna essa molécula inibitória para a capacidade sinalizadora do receptor de insulina.^{113, 139}

Vaag et al.³⁸ propuseram que depósitos de gordura metabolicamente ativos, incluindo liberação imediata de ácidos graxos livres e adipocinas na circulação portal, têm sido propostos como potenciais mediadores da resistência à insulina.

Alguns fatores derivados do tecido adiposo branco contribuem para a ativação e infiltração de macrófagos em depósitos de gordura. Estes macrófagos, quando ativados, secretam citocinas que aumentam a infiltração celular e o processo inflamatório. Durante este processo, o tecido adiposo branco transforma-se em um órgão inflamado que libera grandes quantidades de ácidos graxos livres, contribuindo para o acúmulo de lipídios no fígado e músculo esquelético. O armazenamento inadequado de lipídios nesses tecidos é fortemente associado com resistência à insulina.⁶⁰

O aumento da concentração intracelular de metabólitos lipídicos ou o aumento de AGL plasmáticos ativa as vias de transdução de sinal, que irá induzir inflamação e prejudicar a sinalização da insulina.¹⁴² AGL são armazenados como triglicérides nos adipócitos e servem como fonte de energia essencial durante as condições de jejum.¹⁴³

Alguns estudos¹⁴⁴⁻¹⁴⁷ propuseram que a elevação de AGL plasmáticos resultaria em ativação da proteína quinase C- θ (PKC- θ), uma serina-quinase, levando a fosforilação em serina do IRS-1, o que reduz a capacidade do IRS-1 de se ligar e ativar a PI3K, resultando em translocação prejudicada de GLUT4 para membrana celular. Dessa forma, os ácidos graxos livres podem reduzir a captação de glicose celular interferindo diretamente na cascata de proteínas envolvidas na transmissão do sinal de insulina, e não através da inibição da atividade da hexoquinase.¹⁴⁸

Os mecanismos pelos quais AGL causam resistência à insulina no fígado e no músculo esquelético apresentam certas semelhanças e consistem na ativação de várias serina/treonina quinases que, presumivelmente, diminuem a fosforilação em tirosina de IRS-1/2 e interrompem a sinalização da insulina.¹⁴⁹ Na obesidade, a capacidade de miócitos e hepatócitos de metabolizar totalmente os ácidos graxos é

geralmente insuficiente para corresponder à absorção excessiva de ácidos graxos pelas células. Isto pode levar à acumulação celular de intermediários dos ácidos graxos (por exemplo, diacilglicerol, ceramida, acilcarnitinas), o que finalmente resulta em ativação de um número de serina quinases, incluindo JNK1 IKK β , e PKC- θ .^{147, 150}

Um estudo realizado por Ruddock et al.¹⁵¹ demonstrou que o palmitato, um representante abundante dos ácidos graxos saturado, induz a resistência à insulina ao nível de sinalização da insulina e da expressão do gene do receptor de insulina em duas linhagens de células de hepatócitos cultivadas. Esses autores também verificaram que o palmitato inibe a fosforilação em tirosina do IR e dos IRS-1/2 e ativação de PI3K e Akt. Estes efeitos do palmitato se estendem a inibição da fosforilação da p70 S6 quinase, GSK-3 e FOXO1A, provavelmente contribuindo para reduzir mudanças transcricionais mediadas pela insulina e produzir hiperglicemia.

Há fortes evidências de que o tecido adiposo não só libera ácidos graxos livres que contribuem para a resistência à insulina no fígado e músculo, mas também produz uma ampla gama de moléculas inflamatórias, incluindo TNF- α e IL-6, que podem ter tanto efeitos locais sobre a fisiologia do tecido adiposo, como efeitos sistêmicos em outros tecidos. Alguns fatores como a leptina, TNF- α , IL-6 e resistina são mais produzidos durante a obesidade e, inversamente, os níveis plasmáticos de adiponectina estão reduzidos durante a obesidade.¹⁵²

A adiponectina reduz a resistência à insulina através da redução do conteúdo intracelular de triglicérides no músculo e fígado de camundongos obesos. Esse efeito é resultado do aumento da expressão de moléculas envolvidas tanto na metabolização de ácidos graxos quanto na dissipação de energia do músculo. Além disso, a resistência à insulina em camundongos lipoatróficos foi completamente revertida com a combinação de doses fisiológicas de adiponectina e leptina, mas apenas parcialmente pela adiponectina ou leptina isoladas.¹⁵³ Esses dados indicam um possível papel terapêutico da reposição de adiponectina na resistência à insulina e diabetes tipo 2. Entretanto, no presente estudo (Tabela 3) não foi encontrada diferença na adiponectinemia entre os grupos PCN e PDP. Por outro lado, ao avaliarmos as concentrações plasmáticas de resistina, constatamos que esta citocina estava aumentada no grupo PDP comparado ao PCN (tabela 3).

TNF- α , adiponectina, leptina, MCP-1, resistina e várias outras adipocinas são associados à regulação do metabolismo da glicose e sensibilidade à insulina. Em um estudo com linhagem de células humanas do fígado (HepG2), Luo et al.¹⁵⁴ sugerem que a resistina induz resistência à insulina nas células, pelo menos em parte, através da indução da expressão de SOCS-3 e redução da fosforilação do Akt por meio de um mecanismo independente de AMPK. Em contraste, Heilbronn et al.¹⁵⁵ não observaram relação entre as concentrações séricas de resistina e sensibilidade à insulina, concluindo que a resistina não atua como um importante mediador na sensibilidade à insulina em humanos.

Estudos iniciais sugeriram que a resistina poderia causar resistência à insulina, uma vez que seus níveis estavam aumentados em camundongos obesos e eram reduzidos por drogas antidiabéticas da classe das tiazolidinedionas. Além disso, a administração de anticorpo antirresistina parecia melhorar a glicemia e a ação insulínica em camundongos com obesidade induzida por dieta;¹⁵⁶ também a captação de glicose estimulada por insulina pelos adipócitos foi aumentada pela neutralização da resistina e reduzida pelo tratamento com resistina. Entretanto, estudos subsequentes não confirmaram esses achados iniciais, concluindo-se que a expressão da resistina está significativamente reduzida em diferentes modelos de obesidade.¹⁵⁷

A análise da literatura permite concluir que os indivíduos diabéticos apresentam alterações nas concentrações séricas de colesterol e triglicérides. A partir desta consideração, realizamos análises sorológicas da colesterolemia e triacilgliceridemia. Nossos resultados mostraram aumento nos níveis de colesterol total, VLDL, LDL e triglicérides no grupo PDP em relação ao grupo PCN. Porém não observamos alteração nos níveis de colesterol HDL (tabela 2).

Essas alterações nos níveis de colesterol encontrados nas proles PDP podem ter relação com a resistência à insulina nelas encontrada.¹¹⁰ Pillajamki et al.¹⁵⁸ associaram a resistência à insulina com o aumento da síntese de colesterol e diminuição da absorção de colesterol.

Em pacientes com dislipidemia diabética, a resistência à insulina parece contribuir direta ou indiretamente com a tríade de anormalidades lipídicas plasmáticas, ou seja, hipertrigliceridemia, baixos níveis de colesterol HDL e altos

níveis de colesterol LDL.¹⁵⁹ A hiperinsulinemia está associada a baixos níveis de colesterol HDL. O aumento do número de partículas de colesterol VLDL e de triglicérides plasmático leva à diminuição do nível de HDL e aumento da concentração de colesterol LDL de baixa densidade.¹⁵⁹

A dislipidemia metabólica é a complicação mais comum na resistência à insulina e no DM2 e acredita-se ser exacerbada pela obesidade, bem como por numerosos fatores ambientais prejudiciais, tais como uma dieta rica em gordura e estilo de vida sedentário. A dislipidemia acompanhada de resistência à insulina é caracterizada por alterações que incluem diminuições nos níveis plasmáticos de HDL com elevação plasmática de AGL e triglicerídeos.¹⁶⁰

Porém, na obesidade, baixos níveis de colesterol HDL podem ocorrer independentemente de níveis séricos de triglicérides elevados. Em alguns indivíduos obesos, o baixo nível de HDL pode ser secundário à elevação dos níveis séricos de citocinas inflamatórias, como o TNF- α e IL-6.¹⁶¹ Essas dislipidemias encontradas no grupo PDP podem ser devido à resistência à insulina e ao aumento do tecido adiposo, que pode ter acarretado em aumento plasmático das adipocinas TNF- α , IL-6 e resistina nesses animais.

Kumar et al.,¹⁶² demonstraram que o nível de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6) foi maior em pessoas diabéticas do que em não-diabéticas, sendo que o nível delas foi maior no tecido adiposo visceral que secreta estas citocinas, as quais possuem papel crucial na inflamação, resistência à insulina e doenças cardiovasculares. Também demonstraram anormalidades do perfil lipídico nos indivíduos diabéticos, como por exemplo, diminuição do nível de HDL e aumento dos níveis de colesterol total (CT), triglicérides (TG), LDL e VLDL com alta resistência à insulina. Semelhantemente, nosso estudo demonstrou aumento de TNF- α , IL-6, CT, TG, LDL e VLDL em ratos PDP. Acredita-se que a resistência à insulina, um estado de diminuição da resposta à mesma, é a chave patológica primária que leva à disfunção das células β do pâncreas e contribui para a progressão de DM2. Este defeito é acompanhado por aumento compensatório na secreção de insulina pelas células β pancreáticas para manter a euglicemia. A contínua resistência à insulina provoca esgotamento das células β pancreáticas diminuindo a secreção de insulina, resultando em hiperglicemia e desenvolvimento de diabetes.¹⁶² Lu et al.¹⁶³

demonstraram que a elevação intracelular de colesterol induz apoptose de células β pancreáticas através da geração intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ativação da p38 MAPK.

Na Tabela 5 observamos que o grupo PDP apresentou elevação na concentração de frutossamina plasmática em comparação com o grupo-controle. Esta dosagem é utilizada para medir os níveis de proteína glicada, refletindo o controle glicêmico durante um período de 2-3 semanas.¹⁶⁴ Este aumento da glicemia plasmática no Grupo PDP pode ser devido às alterações nas células β pancreáticas. Remacle et al.¹⁶⁵ sugerem que a má nutrição fetal pode levar a defeitos definitivos na população de células β , e alteração em tecidos sensíveis à insulina.

Para se averiguar a existência de alterações pancreáticas nos animais do grupo PDP, avaliamos as concentrações plasmáticas de amilase e lipase, que se apresentaram aumentadas no grupo PDP em relação ao grupo-controle (tabela 5); sabe-se que essas enzimas encontram-se aumentadas em casos de disfunções pancreáticas como, por exemplo, em casos de pancreatite aguda.¹⁶⁶ Esses dados sugerem que o pâncreas desses animais apresenta algum tipo de alteração.

Estudo realizado por Nilsson et al.¹⁶⁷ teve como objetivo verificar se o desafio imunológico materno, realizado através de injeções intraperitoneais de endotoxina bacteriana (LPS), seria seguido por anormalidades metabólicas e endócrinas na idade adulta da prole, demonstrando que esses animais apresentam aumento no peso corporal, alargamento do tecido adiposo intra-abdominal e redução no efeito da insulina sobre a captação de glicose. Estas observações permitem sugerir que o período pré-natal pode ser importante para o desenvolvimento de obesidade e resistência insulínica em adultos.

Outros fatores também podem gerar a programação fetal, como por exemplo, um estudo realizado por Vidonho et al.,¹⁶⁸ que demonstraram que a restrição de sal (dieta hipossódica) perinatal acarretou em baixo peso ao nascer, resistência à insulina e aumento plasmático de colesterol e triglicérides na vida adulta dessa prole. A maior parte desses resultados é semelhante aos nossos dados encontrados em proles de ratas com doença periodontal. Estes achados sugerem que alterações que ocorrem com a mãe durante o período fetal, podem ocasionar resistência à insulina e dislipidemias na vida adulta da prole.

Conforme descrito anteriormente, a associação entre o ambiente intrauterino adverso com o retardo ou elevado crescimento fetal está relacionada com prejuízo na função e desenvolvimento das células β , levando ao desenvolvimento de diabetes tipo 2 na vida adulta. E os mecanismos ligados ao desenvolvimento alterado de células β estão relacionados com função mitocondrial anormal e alterações epigenéticas dos principais genes chaves das células β .⁵⁶ A programação mitocondrial pode levar a danos oxidativos de macromoléculas como o DNA e podem ocorrer mudanças epigenéticas como a metilação do DNA que altera permanentemente a expressão do gene.¹⁶⁵

Qualquer condição abaixo do ideal durante o período perinatal pode resultar em efeitos permanentes possíveis de continuarem ao longo de gerações. O “programming” envolve várias mudanças estruturais nos órgãos. Existem diversos mecanismos que podem explicar essas mudanças: alteração na expressão do gene, proliferação celular deficiente secundária à deficiência de nutrientes, morte celular por apoptose causada pelo estresse oxidativo e mudanças nos receptores de superfície. Cada mecanismo envolvido na programação fetal-neonatal interage com o outro, sendo um gatilho para uma cascata inteira de outros mecanismos.¹⁶⁹

Com base nesses resultados, podemos inferir que a diminuição no grau de fosforilação em tirosina e a resistência à insulina encontrada no grupo PDP, em estudos anteriores, pode ter sido decorrente de aumento: 1) no grau de fosforilação em serina no tecido adiposo; 2) da concentração de citocinas plasmáticas; 3) de dislipidemia; 4) da glicemia (demonstrada pelos valores da frutossamina); 5) das enzimas pancreáticas (lipase e amilase). Estes resultados podem reforçar a importância de se prevenir a doença periodontal com o objetivo de se evitar a resistência à insulina e suas complicações em geração subsequente.

6 Conclusão

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que a doença periodontal materna promoveu em sua prole adulta:

- nenhuma alteração no peso corpóreo ao nascimento até 75 dias de idade;
- maior ingestão alimentar;
- aumento no grau de fosforilação em serina do IRS-1 no tecido adiposo, porém não no tecido muscular e hepático, após o estímulo insulínico, e sem alteração nos conteúdos de IR β e IRS-1 nestes tecidos;
- aumento nas concentrações plasmáticas de TNF- α , IL-6 e resistina, contudo não houve diferença na concentração de adiponectina;
- aumento nas concentrações plasmáticas de colesterol total, colesterol LDL, colesterol VLDL e triglicérides, porém a concentração de colesterol HDL não apresentou diferença;
- aumento nas concentrações plasmáticas de amilase, lipase e frutossamina.

Referências

1. Collins JG, Windley HW, Arnold RR, Offenbacher S. Effects of a *Porphyromonas gingivalis* infection on inflammatory mediator response and pregnancy outcome in hamsters. *Infect Immun*. 1994;62(10):4356-61.
2. Qureshi A, Ijaz S, Syed A, Khan AA. Periodontal infection: a potential risk factor for pre-term delivery of low birth weight (PLBW) babies. *J Pak Med Assoc*. 2005;55(10):448-52.
3. Lunardelli AN, Peres MA. Is there an association between periodontal disease, prematurity and low birth weight? A population-based study. *J Clin Periodontol*. 2005;32(9):938-46.
4. Iacopino AM, Cutler CW. Pathophysiological relationships between periodontitis and systemic disease: recent concepts involving serum lipids. *J Periodontol*. 2000;71(8):1375-84.
5. Louro PM, Fiori HH, Filho PL, Steibel J, Fiori RM. Periodontal disease in pregnancy and low birth weight. *J Pediatr (Rio J)*. 2001;77(1):23-8. Português.
6. Lazenby MG, Crook MA. The innate immune system and diabetes mellitus: the relevance of periodontitis? A hypothesis. *Clin Sci (Lond)*. 2010;119(10):423-9.
7. Petersen PE. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century--the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2003;31 (Suppl 1):3-23.
8. Cruz SS, Costa MaC, Gomes Filho IS, Vianna MI, Santos CT. [Maternal periodontal disease as a factor associated with low birth weight]. *Rev Saude Publica*. 2005;39(5):782-7. Português.
9. Offenbacher S, Katz V, Fertik G, Collins J, Boyd D, Maynor G, et al. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. *J Periodontol*. 1996;67(10 Suppl):1103-13.

10. Vettore MV, Sheiham A, Peres MA. Low birth weight and periodontal diseases association. *Rev Saude Publica*. 2006;40(1):184-5.
11. Alves RT, Ribeiro RA. Relationship between maternal periodontal disease and birth of preterm low weight babies. *Braz Oral Res*. 2006;20(4):318-23.
12. Marakoglu I, Gursoy UK, Marakoglu K, Cakmak H, Ataoglu T. Periodontitis as a risk factor for preterm low birth weight. *Yonsei Med J*. 2008;49(2):200-3.
13. Khader Y, Al-shishani L, Obeidat B, Khassawneh M, Burgan S, Amarin ZO, et al. Maternal periodontal status and preterm low birth weight delivery: a case-control study. *Arch Gynecol Obstet*. 2009;279(2):165-9.
14. Vettore MV, Leal M, Leão AT, da Silva AM, Lamarca GA, Sheiham A. The relationship between periodontitis and preterm low birthweight. *J Dent Res*. 2008;87(1):73-8.
15. Davenport ES, Williams CE, Sterne JA, Murad S, Sivapathasundram V, Curtis MA. Maternal periodontal disease and preterm low birthweight: case-control study. *J Dent Res*. 2002;81(5):313-8.
16. Galvão MP, Rösing CK, Ferreira MB. Effects of ligature-induced periodontitis in pregnant Wistar rats. *Pesqui Odontol Bras*. 2003;17(1):51-5.
17. Ara T, Kurata K, Hirai K, Uchihashi T, Uematsu T, Imamura Y, et al. Human gingival fibroblasts are critical in sustaining inflammation in periodontal disease. *J Periodontal Res*. 2009;44(1):21-7.
18. Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*. 2011;34(5):637-50.
19. Tilich M, Arora RR. Modulation of toll-like receptors by insulin. *Am J Ther*. 2011;18(5):e130-7.

20. Beklen A, Hukkanen M, Richardson R, Konttinen YT. Immunohistochemical localization of Toll-like receptors 1-10 in periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 2008;23(5):425-31.
21. Kocgozlu L, Elkaim R, Tenenbaum H, Werner S. Variable cell responses to *P. gingivalis* lipopolysaccharide. *J Dent Res.* 2009;88(8):741-5.
22. Wright SD. Toll, a new piece in the puzzle of innate immunity. *J Exp Med.* 1999;189(4):605-9.
23. Akira S. Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem.* 2003;278(40):38105-8.
24. Mayrand D, Holt SC. Biology of asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species. *Microbiol Rev.* 1988;52(1):134-52.
25. Xing Q, de Vos P, Faas MM, Ye Q, Ren Y. LPS promotes pre-osteoclast activity by up-regulating CXCR4 via TLR-4. *J Dent Res.* 2011;90(2):157-62.
26. Iacopino AM. Diabetic periodontitis: possible lipid-induced defect in tissue repair through alteration of macrophage phenotype and function. *Oral Dis.* 1995;1(4):214-29.
27. Lalla E, Lamster IB, Schmidt AM. Enhanced interaction of advanced glycation end products with their cellular receptor RAGE: implications for the pathogenesis of accelerated periodontal disease in diabetes. *Ann Periodontol.* 1998;3(1):13-9.
28. Lalla E, Lamster IB, Feit M, Huang L, Spessot A, Qu W, et al. Blockade of RAGE suppresses periodontitis-associated bone loss in diabetic mice. *J Clin Invest.* 2000;105(8):1117-24.
29. Colombo NH, Shirakashi DJ, Chiba FY, Sara de Lima Coutinho M, Ervolino E, Saliba Garbin CA, et al. Periodontal disease decreases insulin sensitivity and insulin signaling. *J Periodontol.* In press 2011.

30. Endo Y, Tomofuji T, Ekuni D, Irie K, Azuma T, Tamaki N, et al. Experimental periodontitis induces gene expression of proinflammatory cytokines in liver and white adipose tissues in obesity. *J Periodontol.* 2010;81(4):520-6.
31. Sert T, Kirzioğlu FY, Fentoğlu O, Aylak F, Mungan T. Serum placental growth factor, vascular endothelial growth factor, soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 and -2 levels in periodontal disease, and adverse pregnancy outcomes. *J Periodontol.* 2011;82(12):1735-48.
32. Lin D, Smith MA, Champagne C, Elter J, Beck J, Offenbacher S. Porphyromonas gingivalis infection during pregnancy increases maternal tumor necrosis factor alpha, suppresses maternal interleukin-10, and enhances fetal growth restriction and resorption in mice. *Infect Immun.* 2003;71(9):5156-62.
33. Hillier SL, Witkin SS, Krohn MA, Watts DH, Kiviat NB, Eschenbach DA. The relationship of amniotic fluid cytokines and preterm delivery, amniotic fluid infection, histologic chorioamnionitis, and chorioamnion infection. *Obstet Gynecol.* 1993;81(6):941-8.
34. Hitti J, Tarczy-Hornoch P, Murphy J, Hillier SL, Aura J, Eschenbach DA. Amniotic fluid infection, cytokines, and adverse outcome among infants at 34 weeks' gestation or less. *Obstet Gynecol.* 2001;98(6):1080-8.
35. Dörtbudak O, Eberhardt R, Ulm M, Persson GR. Periodontitis, a marker of risk in pregnancy for preterm birth. *J Clin Periodontol.* 2005;32(1):45-52.
36. Horáková D, Janoutová G, Janout V. Insulin resistance and birth weight. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2005;149(1):173-6.
37. Kim CS, Park JS, Park J, Nam JS, Kang ES, Ahn CW, et al. The relation between birth weight and insulin resistance in Korean adolescents. *Yonsei Med J.* 2006;47(1):85-92.

38. Vaag A, Jensen CB, Poulsen P, Brøns C, Pilgaard K, Grunnet L, et al. Metabolic aspects of insulin resistance in individuals born small for gestational age. *Horm Res.* 2006;65 (Suppl 3):137-43.
39. Georg AE, Duncan BB, Toscano CM, Schmidt MI, Mengue S, Duarte C, et al. Economic analysis of a screening program for diabetes mellitus in Brazil. *Rev Saude Publica.* 2005;39(3):452-60.
40. Organização Pan-ameriacana da Saúde. Doenças crônico-degenerativas e obesidade: estratégia mundial sobre alimentação saudável, atividade física e saúde. Brasília; Organização Pan-Americana da Saúde. 2003.
41. Taylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M, Knowler WC, et al. Non-insulin dependent diabetes mellitus and alveolar bone loss progression over 2 years. *J Periodontol.* 1998;69(1):76-83.
42. Jensen T, Deckert T. Diabetic retinopathy, nephropathy and neuropathy. Generalized vascular damage in insulin-dependent diabetic patients. *Horm Metab Res Suppl.* 1992;26:68-70.
43. Libman IM, Laporte RE, Tull ES, Matsushima M. Insulin dependent diabetes mellitus in the 21st century and beyond a model disease for global health? (A review). *Diabete Metab.* 1993;19(1 Pt 2):74-9.
44. Løe H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 1993;16(1):329-34.
45. Elner SG, Elner VM, Jaffe GJ, Stuart A, Kunkel SL, Strieter RM. Cytokines in proliferative diabetic retinopathy and proliferative vitreoretinopathy. *Curr Eye Res.* 1995;14(11):1045-53.
46. Patterson JE, Andriole VT. Bacterial urinary tract infections in diabetes. *Infect Dis Clin North Am.* 1997;11(3):735-50.

47. Vlassara H, Palace MR. Diabetes and advanced glycation endproducts. *J Intern Med.* 2002;251(2):87-101.
48. Borggreve SE, De Vries R, Dullaart RP. Alterations in high-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus: role of lipolytic enzymes, lecithin:cholesterol acyltransferase and lipid transfer proteins. *Eur J Clin Invest.* 2003;33(12):1051-69.
49. Zanetti ML, Mendes IA. [Analysis of difficulties related with the daily activities of adolescents and children with type-1 diabetes mellitus: mothers' accounts]. *Rev Lat Am Enfermagem.* 2001;9(6):25-30.
50. Pond JS, Peters ML, Pannell DL, Rogers CS. Psychosocial challenges for children with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Educ.* 1995;21(4):297-9.
51. Warzak WJ, Majors CT, Ayllon T, Milan MA, Delcher HK. Parental versus professional perceptions of obstacles to pediatric diabetes care. *Diabetes Educ.* 1993;19(2):121-4.
52. Oliveira CL, Mello MT, Cintra IP, Fisberg M. Obesidade e síndrome metabólica na infância e adolescência. *Rev Nutr.* 2004;17(2):237-45.
53. Ferreira SR, Almeida B, Siqueira AF, Khawali C. [Interventions on the prevention of type 2 diabetes mellitus: is it feasible a population-based program in our country?]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2005;49(4):479-83. Português.
54. Reynolds RM, Phillips DI. Long-term consequences of intrauterine growth retardation. *Horm Res.* 1998;49 Suppl 2:28-31.
55. Bobetsis YA, Barros SP, Lin DM, Weidman JR, Dolinoy DC, Jirtle RL, et al. Bacterial infection promotes DNA hypermethylation. *J Dent Res.* 2007;86(2):169-74.
56. Simmons RA. Role of metabolic programming in the pathogenesis of beta-cell failure in postnatal life. *Rev Endocr Metab Disord.* 2007;8(2):95-104.

57. Calkins K, Devaskar SU. Fetal origins of adult disease. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2011;41(6):158-76.
58. Boney CM, Verma A, Tucker R, Vohr BR. Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. *Pediatrics*. 2005;115(3):e290-6.
59. Dahlgren J, Nilsson C, Jennische E, Ho HP, Eriksson E, Niklasson A, et al. Prenatal cytokine exposure results in obesity and gender-specific programming. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001;281(2):e326-34.
60. Torres-Leal FL, Fonseca-Alaniz MH, Rogero MM, Tirapegui J. The role of inflamed adipose tissue in the insulin resistance. *Cell Biochem Funct*. 2010;28(8):623-31.
61. Hermsdorff HH, Monteiro JB. Visceral, subcutaneous or intramuscular fat: where is the problem?. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2004;48(6):803-11. Português.
62. Duncan BB, Schmidt MI, Pankow JS, Bang H, Couper D, Ballantyne CM, et al. Adiponectin and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes*. 2004;53(9):2473-8.
63. Snijder MB, Heine RJ, Seidell JC, Bouter LM, Stehouwer CD, Nijpels G, et al. Associations of adiponectin levels with incident impaired glucose metabolism and type 2 diabetes in older men and women: the hoorn study. *Diabetes Care*. 2006;29(11):2498-503.
64. Hivert MF, Sullivan LM, Fox CS, Nathan DM, D'Agostino RB, Wilson PW, et al. Associations of adiponectin, resistin, and tumor necrosis factor-alpha with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(8):3165-72.
65. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993;259(5091):87-91.

66. Cheung AT, Ree D, Kolls JK, Fuselier J, Coy DH, Bryer-Ash M. An in vivo model for elucidation of the mechanism of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-induced insulin resistance: evidence for differential regulation of insulin signaling by TNF-alpha. *Endocrinology*. 1998;139(12):4928-35.
67. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature*. 1997;389(6651):610-4.
68. Morino K, Neschen S, Bilz S, Sono S, Tsigotis D, Reznick RM, et al. Muscle-specific IRS-1 Ser->Ala transgenic mice are protected from fat-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Diabetes*. 2008;57(10):2644-51.
69. Moller DE. Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab*. 2000;11(6):212-7.
70. Pescador MVB, Streher AAF, da Silva JMF, Valente GCC, Nakagiri M, Boguszewski MCS. Aspectos Endocrinológicos das Crianças e Adultos Nascidos Pequenos para a Idade Gestacional. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2001;45(1):15-23.
71. Kahn CR, Weir GC, King GL, Jacobson AM, Moses AC, Smith R. Joslin: diabetes mellito. São Paulo, artmed, 2009.
72. Kasuga M, Hedo JA, Yamada KM, Kahn CR. The structure of insulin receptor and its subunits. Evidence for multiple nonreduced forms and a 210,000 possible proreceptor. *J Biol Chem*. 1982;257(17):10392-9.
73. Kasuga M, Karlsson FA, Kahn CR. Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. *Science*. 1982;215(4529):185-7.
74. Kasuga M, Zick Y, Blithe DL, Crettaz M, Kahn CR. Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin receptor in a cell-free system. *Nature*. 1982;298(5875):667-9.

75. Ebina Y, Araki E, Taira M, Shimada F, Mori M, Craik CS, et al. Replacement of lysine residue 1030 in the putative ATP-binding region of the insulin receptor abolishes insulin- and antibody-stimulated glucose uptake and receptor kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(3):704-8.
76. White MF, Takayama S, Kahn CR. Differences in the sites of phosphorylation of the insulin receptor in vivo and in vitro. *J Biol Chem*. 1985;260(16):9470-8.
77. Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, et al. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature*. 1991;352(6330):73-7.
78. Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hayakawa T, et al. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature*. 1994;372(6502):182-6.
79. Araki E, Lipes MA, Patti ME, Brüning JC, Haag B, Johnson RS, et al. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature*. 1994;372(6502):186-90.
80. Sun XJ, Wang LM, Zhang Y, Yenush L, Myers MG, Glasheen E, et al. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature*. 1995;377(6545):173-7.
81. Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balph. *Curr Biol*. 1997;7(4):261-9.
82. Bellacosa A, Chan TO, Ahmed NN, Datta K, Malstrom S, Stokoe D, et al. Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene*. 1998;17(3):313-25.
83. Kohn AD, Takeuchi F, Roth RA. Akt, a pleckstrin homology domain containing kinase, is activated primarily by phosphorylation. *J Biol Chem*. 1996;271(36):21920-6.

84. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 1995;378(6559):785-9.
85. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell*. 1997;88(4):435-7.
86. Kitamura T, Kitamura Y, Kuroda S, Hino Y, Ando M, Kotani K, et al. Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt. *Mol Cell Biol*. 1999;19(9):6286-96.
87. Hajduch E, Alessi DR, Hemmings BA, Hundal HS. Constitutive activation of protein kinase B alpha by membrane targeting promotes glucose and system A amino acid transport, protein synthesis, and inactivation of glycogen synthase kinase 3 in L6 muscle cells. *Diabetes*. 1998;47(7):1006-13.
88. Vanhaesebroeck B, Alessi DR. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J*. 2000;346 Pt 3:561-76.
89. Wang Q, Somwar R, Bilan PJ, Liu Z, Jin J, Woodgett JR, et al. Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myoblasts. *Mol Cell Biol*. 1999;19(6):4008-18.
90. Farese RV. Function and dysfunction of aPKC isoforms for glucose transport in insulin-sensitive and insulin-resistant states. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002;283(1):E1-11.
91. Farese RV, Sajan MP, Standaert ML. Atypical protein kinase C in insulin action and insulin resistance. *Biochem Soc Trans*. 2005;33(Pt 2):350-3.
92. Zhou L, Chen H, Xu P, Cong LN, Sciacchitano S, Li Y, et al. Action of insulin receptor substrate-3 (IRS-3) and IRS-4 to stimulate translocation of GLUT4 in rat adipose cells. *Mol Endocrinol*. 1999;13(3):505-14.

93. Carvalheira JB, Ribeiro EB, Guimarães RB, Telles MM, Velloso LA, Gontijo JA. Characterization of selective insulin resistance to insulin signaling in the hypothalamus of obese Zucker rats'. *Diabetes*. 2002;51:A41.
94. Renström F, Burén J, Eriksson JW. Insulin receptor substrates-1 and -2 are both depleted but via different mechanisms after down-regulation of glucose transport in rat adipocytes. *Endocrinology*. 2005;146(7):3044-51.
95. Burén J, Liu HX, Lauritz J, Eriksson JW. High glucose and insulin in combination cause insulin receptor substrate-1 and -2 depletion and protein kinase B desensitisation in primary cultured rat adipocytes: possible implications for insulin resistance in type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol*. 2003;148(1):157-67.
96. Garfin DE. One-dimensional gel electrophoresis. *Methods Enzymol*. 1990;182:425-41.
97. Kruger NJ, Hammond JB. Molecular comparison of pyrophosphate- and ATP-dependent fructose 6-Phosphate 1-Phosphotransferases from potato tuber. *Plant Physiol*. 1988;86(3):645-8.
98. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972;18(6):499-502.
99. Costa AA, Almeida Neto JS. Manual de diabetes: educação, alimentação, medicamentos, atividades físicas. Sth ed. São Paulo: Savier; 2009.
100. Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011;94(3):311-21.
101. Benito M. Tissue-specificity of insulin action and resistance. *Arch Physiol Biochem*. 2011;117(3):96-104.

102. Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest.* 2000;106(2):165-9.
103. Cusi K, Maezono K, Osman A, Pendergrass M, Patti ME, Pratipanawatr T, et al. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest.* 2000;105(3):311-20.
104. Caro JF, Dohm LG, Pories WJ, Sinha MK. Cellular alterations in liver, skeletal muscle, and adipose tissue responsible for insulin resistance in obesity and type II diabetes. *Diabetes Metab Rev.* 1989;5(8):665-89.
105. Chiba FY, Colombo NH, Shirakashi DJ, Gomes WDS, Moimaz SAS, Garbin CAS, et al. Insulin signal decrease in muscle but not in the liver of castrated male rats from chronic exposure to fluoride. *Fluoride.* 2010;43(1):25-30.
106. Kerouz NJ, Hörsch D, Pons S, Kahn CR. Differential regulation of insulin receptor substrates-1 and -2 (IRS-1 and IRS-2) and phosphatidylinositol 3-kinase isoforms in liver and muscle of the obese diabetic (ob/ob) mouse. *J Clin Invest.* 1997;100(12):3164-72.
107. Langley-Evans SC. Nutritional programming of disease: unravelling the mechanism. *J Anat.* 2009;215(1):36-51.
108. Jansson T, Powell TL. Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. *Clin Sci (Lond).* 2007;113(1):1-13.
109. Ryu JI, Oh K, Yang H, Choi BK, Ha JE, Jin BH, et al. Health behaviors, periodontal conditions, and periodontal pathogens in spontaneous preterm birth: a case-control study in Korea. *J Periodontol.* 2010;81(6):855-63.
110. Shirakashi DJ, Colombo NH, Chiba FY, Moimaz SAS, Sumida DH. Evaluation of insulin sensitivity and insulin signal transduction in adult offspring of female rats with periodontal disease. *J Am Diabetes Assoc.* 2010;59(70):A380-1.

111. Clarke JF, Young PW, Yonezawa K, Kasuga M, Holman GD. Inhibition of the translocation of GLUT1 and GLUT4 in 3T3-L1 cells by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, wortmannin. *Biochem J.* 1994;300 (Pt 3):631-5.
112. Sano H, Kane S, Sano E, Mîinea CP, Asara JM, Lane WS, et al. Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *J Biol Chem.* 2003;278(17):14599-602.
113. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science.* 1996;271(5249):665-8.
114. Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, et al. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikk β . *Science.* 2001;293(5535):1673-7.
115. Kim JK, Kim YJ, Fillmore JJ, Chen Y, Moore I, Lee J, et al. Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J Clin Invest.* 2001;108(3):437-46.
116. Zhang J, Gao Z, Yin J, Quon MJ, Ye J. S6K directly phosphorylates IRS-1 on Ser-270 to promote insulin resistance in response to TNF-(α) signaling through IKK2. *J Biol Chem.* 2008;283(51):35375-82.
117. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol.* 2010;72:219-46.
118. de Alvaro C, Teruel T, Hernandez R, Lorenzo M. Tumor necrosis factor α produces insulin resistance in skeletal muscle by activation of inhibitor κ B kinase in a p38 MAPK-dependent manner. *J Biol Chem.* 2004;279(17):17070-8.
119. Nieto-Vazquez I, Fernández-Veledo S, de Alvaro C, Lorenzo M. Dual role of interleukin-6 in regulating insulin sensitivity in murine skeletal muscle. *Diabetes.* 2008;57(12):3211-21.

120. Dadke SS, Li HC, Kusari AB, Begum N, Kusari J. Elevated expression and activity of protein-tyrosine phosphatase 1B in skeletal muscle of insulin-resistant type II diabetic Goto-Kakizaki rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;274(3):583-9.
121. Maddux BA, Goldfine ID. Membrane glycoprotein PC-1 inhibition of insulin receptor function occurs via direct interaction with the receptor alpha-subunit. *Diabetes*. 2000;49(1):13-9.
122. Morrione A. Grb10 proteins in insulin-like growth factor and insulin receptor signaling (review). *Int J Mol Med*. 2000;5(2):151-4.
123. Cooney GJ, Lyons RJ, Crew AJ, Jensen TE, Molero JC, Mitchell CJ, et al. Improved glucose homeostasis and enhanced insulin signalling in Grb14-deficient mice. *EMBO J*. 2004;23(3):582-93.
124. Ueki K, Kondo T, Kahn CR. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. *Mol Cell Biol*. 2004;24(12):5434-46.
125. Frittitta L, Spampinato D, Solini A, Nosadini R, Goldfine ID, Vigneri R, et al. Elevated PC-1 content in cultured skin fibroblasts correlates with decreased in vivo and in vitro insulin action in nondiabetic subjects: evidence that PC-1 may be an intrinsic factor in impaired insulin receptor signaling. *Diabetes*. 1998;47(7):1095-100.
126. Oda Y, Kuo MD, Huang SS, Huang JS. The plasma cell membrane glycoprotein, PC-1, is a threonine-specific protein kinase stimulated by acidic fibroblast growth factor. *J Biol Chem*. 1991;266(25):16791-5.
127. Stefan C, Stalmans W, Bollen M. Threonine autophosphorylation and nucleotidylation of the hepatic membrane protein PC-1. *Eur J Biochem*. 1996;241(2):338-42.
128. Goldfine ID. The insulin receptor: molecular biology and transmembrane signaling. *Endocr Rev*. 1987;8:235-55.

129. Smith FM, Holt LJ, Garfield AS, Charalambous M, Koumanov F, Perry M, et al. Mice with a disruption of the imprinted Grb10 gene exhibit altered body composition, glucose homeostasis, and insulin signaling during postnatal life. *Mol Cell Biol.* 2007;27(16):5871-86.
130. Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Chavey C, Freidinger K, Hilton DJ, et al. SOCS-3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to tumor necrosis factor-alpha in the adipose tissue of obese mice. *J Biol Chem.* 2001;276(51):47944-9.
131. Fukushima A, Kajiya H, Izumi T, Shigeyama C, Okabe K, Anan H. Pro-inflammatory cytokines induce suppressor of cytokine signaling-3 in human periodontal ligament cells. *J Endod.* 2010;36(6):1004-8.
132. Farrell GC. Signalling links in the liver: knitting SOCS with fat and inflammation. *J Hepatol.* 2005;43(1):193-6.
133. Hales CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull.* 2001;60:5-20.
134. Cho Y, Ariga M, Uchijima Y, Kimura K, Rho JY, Furuhashi Y, et al. The novel roles of liver for compensation of insulin resistance in human growth hormone transgenic rats. *Endocrinology.* 2006;147(11):5374-84.
135. Kotani K, Peroni OD, Minokoshi Y, Boss O, Kahn BB. GLUT4 glucose transporter deficiency increases hepatic lipid production and peripheral lipid utilization. *J Clin Invest.* 2004;114(11):1666-75.
136. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 1995;95(5):2409-15.
137. Fernández-Real JM, Broch M, Ricart W, Casamitjana R, Gutierrez C, Vendrell J, et al. Plasma levels of the soluble fraction of tumor necrosis factor receptor 2 and insulin resistance. *Diabetes.* 1998;47(11):1757-62.

138. Montani JP, Antic V, Yang Z, Dulloo A. Pathways from obesity to hypertension: from the perspective of a vicious triangle. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002;26 Suppl 2:S28-38.
139. Kanety H, Feinstein R, Papa MZ, Hemi R, Karasik A. Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). Possible mechanism for suppression of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1. *J Biol Chem.* 1995;270(40):23780-4.
140. Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(11):4854-8.
141. Kroder G, Bossenmaier B, Kellerer M, Capp E, Stoyanov B, Mühlhöfer A, et al. Tumor necrosis factor-alpha- and hyperglycemia-induced insulin resistance. Evidence for different mechanisms and different effects on insulin signaling. *J Clin Invest.* 1996;97(6):1471-7.
142. Krebs M, Roden M. Molecular mechanisms of lipid-induced insulin resistance in muscle, liver and vasculature. *Diabetes Obes Metab.* 2005;7(6):621-32.
143. DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am.* 2004;88(4):787-835.
144. Shulman GI, Rothman DL, Jue T, Stein P, DeFronzo RA, Shulman RG. Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin-dependent diabetes by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *N Engl J Med.* 1990;322(4):223-8.
145. Boden G, Chen X, Ruiz J, White JV, Rossetti L. Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *J Clin Invest.* 1994;93(6):2438-46.
146. Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, et al. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes.* 1999;48(6):1270-4.

147. Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, et al. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem*. 2002;277(52):50230-6.
148. Carvalheira JBC, Zecchin HG, Saad MJA. Bases moleculares e fisiológicas da resistência à insulina. *Hipertensão*. 2002;5(1):33-8.
149. Boden G. Fatty acid-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle and liver. *Curr Diab Rep*. 2006;6(3):177-81.
150. Schenk S, Saberi M, Olefsky JM. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest*. 2008;118(9):2992-3002.
151. Ruddock MW, Stein A, Landaker E, Park J, Cooksey RC, McClain D, et al. Saturated fatty acids inhibit hepatic insulin action by modulating insulin receptor expression and post-receptor signalling. *J Biochem*. 2008;144(5):599-607.
152. Meshkani R, Adeli K. Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Clin Biochem*. 2009;42(13-14):1331-46.
153. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med*. 2001;7(8):941-6.
154. Luo Z, Zhang Y, Li F, He J, Ding H, Yan L, et al. Resistin induces insulin resistance by both AMPK-dependent and AMPK-independent mechanisms in HepG2 cells. *Endocrine*. 2009;36(1):60-9.
155. Heilbronn LK, Rood J, Janderova L, Albu JB, Kelley DE, Ravussin E, et al. Relationship between serum resistin concentrations and insulin resistance in nonobese, obese, and obese diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(4):1844-8.

156. McTernan PG, McTernan CL, Chetty R, Jenner K, Fisher FM, Lauer MN, et al. Increased resistin gene and protein expression in human abdominal adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(5):2407.
157. Nagaev I, Smith U. Insulin resistance and type 2 diabetes are not related to resistin expression in human fat cells or skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;285(2):561-4.
158. Pihlajamäki J, Gylling H, Miettinen TA, Laakso M. Insulin resistance is associated with increased cholesterol synthesis and decreased cholesterol absorption in normoglycemic men. *J Lipid Res.* 2004;45(3):507-12.
159. Mooradian AD. Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2009;5(3):150-9.
160. Avramoglu RK, Basciano H, Adeli K. Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistant states. *Clin Chim Acta.* 2006;368(1-2):1-19.
161. Mooradian AD, Albert SG, Haas MJ. Low serum high-density lipoprotein cholesterol in obese subjects with normal serum triglycerides: the role of insulin resistance and inflammatory cytokines. *Diabetes Obes Metab.* 2007;9(3):441-3.
162. Kumar H, Mishra M, Bajpai S, Pokhria D, Arya AK, Singh RK, 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.* In press 2011.
163. Lu X, Liu J, Hou F, Liu Z, Cao X, Seo H, et al. Cholesterol induces pancreatic β cell apoptosis through oxidative stress pathway. *Cell Stress Chaperones.* 2011;16(5):539-48.
164. Post EM, Moore JD, Ihrke J, Aisenberg J. Fructosamine levels demonstrate improved glycemic control for some children attending a diabetes summer camp. *Pediatr Diabetes.* 2000;1(4):204-8.

165. Remacle C, Dumortier O, Bol V, Goosse K, Romanus P, Theys N, et al. Intrauterine programming of the endocrine pancreas. *Diabetes Obes Metab*. 2007;9 Suppl 2:196-209.
166. Frank B, Gottlieb K. Amylase normal, lipase elevated: is it pancreatitis? A case series and review of the literature. *Am J Gastroenterol*. 1999;94(2):463-9.
167. Nilsson C, Larsson BM, Jennische E, Eriksson E, Björntorp P, York DA, et al. Maternal endotoxemia results in obesity and insulin resistance in adult male offspring. *Endocrinology*. 2001;142(6):2622-30.
168. Vidonho AF, da Silva AA, Catanozi S, Rocha JC, Beutel A, Carillo BA, et al. Perinatal salt restriction: a new pathway to programming insulin resistance and dyslipidemia in adult wistar rats. *Pediatr Res*. 2004;56(6):842-8.
169. Nesterenko TH, Aly H. Fetal and neonatal programming: evidence and clinical implications. *Am J Perinatol*. 2009;26(3):191-8.

ANEXO A - Parecer de Aprovação da Comissão de Ética na
Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia do
Campus de Araçatuba - UNESP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Marília



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEa)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "AVALIAÇÃO DA VIA INIBITÓRIA DO SINAL INSULÍNICO EM RATOS ADULTOS PROLES DE RATAS COM DOENÇA PERIODONTAL" sob responsabilidade Profa. Dra. Dóris Hissako Sumida está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em 10/09/2009 de acordo com o protocolo 2009-005671.

Aragatuba, 10 de Setembro de 2009

Tringa Cristata. Beldoro. Elva

Prof.^a Dra. Tereza Cristina Cardoso da Silva
Presidente da CEEA- FQA/UNESP

ANEXO B - Artigo submetido à Revista Journal of Periodontology

Maternal periodontal disease in rats decreases insulin sensitivity and insulin signaling in adult offspring

Maternal periodontal disease in rats decreases insulin sensitivity and insulin signaling in adult offspring

Daisy J. Shirakashi*, D.D.S.,
 Rosana P. Leal†, M.Sc.,
 Natalia H. Colombo*, D.D.S.,
 Fernando Y. Chiba†, M.Sc.,
 Cléa A. S. Garbin†, Ph.D.,
 Elerson G. Jardim Jr ‡, Ph.D.,
 Cristina Antoniali*, Ph.D.,
 Doris H. Sumida*, Ph.D.

*Department of Basic Sciences, Dental School of Araçatuba, São Paulo State University -UNESP, Brazil

†Department of Child and Social Dentistry, Dental School of Araçatuba, São Paulo State University -UNESP, Brazil

‡Department of Pathology and Propedeutics, Dental School of Araçatuba, São Paulo State University -UNESP, Brazil

Corresponding Author:

Doris Hissako Sumida

E-mail: dorishs@foa.unesp.br

Dental School of Araçatuba, UNESP - São Paulo State University

R. José Bonifácio, 1193, CEP: 16015-050, Araçatuba-SP, Brazil

TEL: (+55) 18 3636 2819 FAX: (+55) 18 3636 3233

The fax number and e-mail can be published.

Grants from the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP), São Paulo, SP, Brazil

3250 words, four figures and three tables

Running title: Insulin resistance in offspring of rats with periodontitis.

The present study showed that maternal periodontal disease in rats decreases insulin sensitivity and insulin signaling in adult offspring.

Maternal Periodontal Disease In Rats Decreases Insulin Sensitivity And Insulin Signaling In Adult Offspring

Background: Periodontal disease during pregnancy has been recognized as one of the causes of preterm and low birth weight (PLBW) babies. Several studies have demonstrated that PLBW babies are prone to developing insulin resistance as adults. Although there is controversy over the association between periodontal disease and PLBW, the phenomenon known as programming can translate any stimulus or aggression experienced during intrauterine growth into physiological and metabolic alterations in adulthood. The purpose of the present study was to investigate whether the offspring of rats with periodontal disease develop insulin resistance in adulthood.

Methods: Ten female Wistar rats were divided into periodontal disease (PED) and control (CN) groups. Rats from both groups were mated at 7 days after induction of periodontal disease. Male offspring were divided into two groups: 1) periodontal disease offspring (PEDO, n=24), and 2) control offspring (CNO, n=24). Offspring body weight was measured from birth until 75 days-old. When the offspring reached 75 days-old, the following parameters were measured: 1) plasma concentrations of glucose, insulin, fructosamine, lipase, amylase and TNF- α ; 2) insulin sensitivity (IS); and 3) insulin signal transduction (IST) in insulin-sensitive tissues.

Results: Low birth weight was not detected in the PEDO group. However, plasma concentrations of glucose, insulin, fructosamine, lipase, amylase and TNF- α were increased, and IS and IST were reduced ($P < 0.05$) in the PEDO group compared with the control group.

Conclusions: Maternal periodontal disease may induce insulin resistance and reduce IST in adult offspring, but such alterations are not due to low birth weight.

KEYWORDS

Periodontal Diseases; Cytokines; Diabetes Mellitus; Insulin Resistance; Inflammation.

INTRODUCTION

Periodontal disease has been identified as one of the causes of preterm and low birth weight (PLBW) babies.¹⁻⁶ Periodontal disease is also considered a major perinatal problem in many countries, contributing significantly to childhood mortality and morbidity.⁴ However, some studies have shown no correlation between PLBW and maternal periodontal disease.^{7, 8} Published reports show that periodontitis during pregnancy increases bacteria and inflammatory mediators, which can enter the bloodstream and cause preterm membrane rupture and birth, increasing the potential for low birth weight.⁹ Experimental studies in rats show that ligature-induced periodontitis promotes an increase in plasma levels of TNF- α .^{10, 11} Sert et al.¹² also reported increased levels of TNF- α and IL-6 in human mothers with periodontitis.

It has also been reported that low birth weight may be related to the development of type 2 diabetes mellitus associated with insulin resistance in adulthood.^{13, 14} This hormonal resistance is the main metabolic defect resulting from an adverse intrauterine environment, inducing low birth weight and increased risk of type 2 diabetes later in life.¹⁵ Previous studies showed that disorders occurring during pregnancy, such as changes in nutrition, concentrations of cytokines and cortisol, and reduction in uteroplacental blood flow can program the fetus to develop diseases in adulthood.¹⁶

Indeed, programming during fetal development is considered an important risk factor for the development of various diseases in adulthood, including coronary heart diseases and other disorders related to insulin resistance.¹⁷ After injecting pregnant rats with bacterial endotoxin (LPS), Nilsson et al.¹⁸ observed that the offspring exhibited an increase in body weight, increase in intra-abdominal adipose tissue, and reduction in the insulin effect on glucose uptake, suggesting that the prenatal period is important for determining the risk of developing insulin resistance and obesity in adult offspring.

Since controversy remains about the relationship between periodontal disease during pregnancy and PLBW, this study evaluated the birth weight of offspring of female rats with periodontal disease. In addition, this study examined the potential correlation between maternal periodontal disease, low birth weight, and the development of insulin resistance and alterations in IST in adult offspring. It is believed that maternal periodontitis can promote PLBW, and this low birth weight, in turn, may cause insulin resistance and impair insulin signal transduction in the offspring adulthood.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Wistar rats were housed with a 12 hour light/dark cycle (lights on at 07:00), a temperature of $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, and food and water available *ad libitum*. This study followed the Ethical Principles and Guidelines for Animal Experimentation and was approved by the local ethics committee, according to protocol number 43/06.

Experimental Design

Ten female rats, weighing approximately 200 g each, were randomly divided into two groups: 1) periodontal disease group (PED), and 2) control group (CN). In the PED group, periodontal disease was induced by ligating 4-0 silk thread on the cervical region of the lower first molars, bilaterally, as described by Rodini et al,¹⁹. Radiographic Evaluation of Alveolar Bone Loss and Periodontal Bone Support of mother rats mandibles was done to show that the induction of periodontal disease was effective. Seven days after ligature placement, animals from both groups were mated, and daily vaginal smears were taken to verify the presence of sperm. Pregnant rats were kept in individual cages.

After birth, the numbers of offspring from CN and PED mothers were matched so that each mother had the same number of offspring. After weaning, only male offspring were studied to avoid any effect from hormonal oscillation that occurs during the estrous cycle of adult female rats. Male offspring were divided into two groups: 1) control offspring (CNO, n=24), and 2) periodontal disease offspring (PEDO, n=24). The body weight of the offspring was evaluated once a week, from birth until 75 days-old, and experiments were carried out when the offspring were 75 days-old.

Animals were fasted for 14 hours prior to experiments, and anesthetized using sodium thiopental[§] (3%, 50 mg/kg body weight, i.p.). Experiments were carried out 10–15 min later. Median laparotomy was performed in rats from CNO (n=10) and PEDO (n=10) groups, and blood samples (4 mL) were taken via inferior vena cava puncture. The blood samples were then distributed into tubes containing heparin.^{||} Plasma was prepared by centrifuging the blood at $3000 \times g$ for 15 min at 4°C , and plasma was then stored in aliquots at -70°C until used for glucose, insulin, fructosamine, lipase, amylase and TNF- α quantification. Other animals from the CNO (n=6) and PEDO (n=6) groups were subjected to intravenous insulin tolerance tests ($0.75 \text{ U insulin}^{\text{¶}}$ /kg body weight). The periepididymal white adipose tissue and left gastrocnemius muscle were removed from all animals used to obtain blood samples or

subjected to the intravenous insulin tolerance test in order to assess absolute weight (g) and relative weight (per 100 g of body weight) of these tissues. After this procedure, animals were euthanized. Finally, animals from CNO (n=8) and PEDO (n=8) groups were used to quantify the status of tyrosine phosphorylation of the insulin receptor substrate (pp185, IRS-1/IRS-2) in insulin-sensitive tissues such as the gastrocnemius skeletal muscle and periepididymal white adipose tissue following insulin stimulus (1.5 U, i.v.).

Determination of Glucose, Insulin, Fructosamine, Lipase, Amylase and TNF- α Levels

Using 10 plasma samples from each group (CNO and PEDO), glucose concentrations were measured by the glucose oxidase method[#] and insulinemia was measured by radioimmunoassay.^{**} Insulin resistance was evaluated by the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR),²⁰ calculated from the formula: $\text{HOMA-IR} = [\text{fasting glycemia (mmol/L)} \times \text{fasting insulinemia (}\mu\text{UI/mL)}] / 22.5$. Fructosamine, lipase and amylase plasma concentrations (n=10) were determined with commercial kits, based on nitroblue tetrazolium reduction (NBT), colorimetric assay, and modified Caraway, respectively.^{††} Plasma concentrations of TNF- α (n=10) were quantified using an enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA) kit.^{‡‡} The minimum limit of detection for TNF- α was <4 pg/mL.

Short Intravenous Insulin Tolerance Test (ITT)

The ITTs were carried out in six animals from each group (CNO and PEDO) following the protocol described by Chehoud et al.²¹ Insulin[¶] (0.75 U/kg body weight) was administered through the penile vein. Blood samples (about 50 μL) were collected from nicked tails at 0 (before hormone administration), 4, 8, 12 and 16 min after insulin administration, and glucose was measured using a glycemia monitor.^{§§} The results were analyzed by comparison of the constant rate for glucose disappearance (Kitt value) from 0 to 16 min of the test. The Kitt value was calculated using the formula $0.693/t_{1/2}$. The glucose $t_{1/2}$ was calculated from the slope of the least-square analysis of the plasma glucose concentrations during the linear decay phase.²²

Evaluation of the Tyrosine Phosphorylation Status of the Insulin Receptor Substrate

Eight animals from each group (CNO and PEDO) were anesthetized before median laparotomy was performed to remove tissue samples before and after administration of 1.5 U regular insulin[¶] (i.v. portal vein) at variable times (90 s for the gastrocnemius muscle, 120 s for the periepididymal white adipose tissue). Tissue samples were prepared according to the

method described by Carvalho et al.²³ Samples were subjected to western blot analysis for quantification of the tyrosine phosphorylation status of pp185 following insulin stimulus, using an anti-phosphotyrosine antibody^{||}. β -actin^{||} served as the loading control. IRS-1 and IRS-2 of pp185 appear as a single band with a molecular weight between 165 and 185 kDa in western blot assays. Immunoreactive bands were detected by autoradiography using a chemiluminescent substrate system,^{¶¶} according to the manufacturer's instructions. Quantitative analyses of the blots were carried out using software.^{##}

Radiographic Evaluation of Alveolar Bone Loss and Periodontal Bone Support of mother rats mandibles

After weaning, mother rats were euthanized. The right and left hemi-mandibles were dissected and fixed for 24 hours in 4% formaldehyde. Radiographic images were acquired using 70 kvp, 10 mA, and 0.10 s exposure. The source-to-film distance was always set at 40 cm. The digital image was obtained directly with the optical digital plate.^{***} The readings of optical plates were performed in sensitized laser scanner equipment, and the images were analyzed by software.^{†††} Radiographic analyses were performed to detect alveolar bone loss as described by Holzhausen et al.²⁴ The distance between the cement-enamel junction (CEJ) and the height of alveolar bone was determined for mesial root surfaces of left and right mandible first molars with the aid of the software.^{†††} Periodontal bone support was analyzed as described by Andersen et al.²⁵ Measurements were performed electronically on the mesial part of right and left mandible first molars. A line was drawn connecting the cusps (C) of the first molar to the apex (A) of the corresponding root. A second line was drawn from the apex (A) to the level of bone corresponding to the deepest interproximal bone defect (B). The distances were measured in millimeters, and periodontal bone support was calculated according to the formula: Periodontal bone support = $(AB/AC) \times 100\%$.

Statistical Analysis

For body weight, IST and glycemia values from ITT tests, statistical analyses were performed by analysis of variance, followed by Tukey post hoc test when the analysis of variance suggested a significant difference among groups ($P < 0.05$). Data analysis was performed with a statistical program.^{†††} Alveolar bone loss and periodontal bone support, periepididymal white adipose tissue and gastrocnemius muscle weights, Kitt values, and plasma levels of glucose, insulin, lipase, amylase, fructosamine, and TNF- α were analyzed by Student t test. A P value < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Alveolar Bone Radiographic Analysis of Mother Rats

Alveolar bone analysis revealed that mother rats with periodontal disease had more bone loss and less bone support ($P < 0.0001$) than mother rats in the control group (Table 1, Fig. 1), showing that the induction of periodontal disease was effective.

Evaluation of Body Weight and Tissue Weight

There was no difference in the average body weight, evaluated weekly from birth to 75 days-old, between CNO and PEDO groups (Fig. 2). The absolute and relative weights of periepididymal white adipose tissue were higher in the PEDO group compared to the CNO group ($P < 0.05$). However, the absolute and relative weights of the gastrocnemius muscle were reduced ($P < 0.05$) in the PEDO group compared to the CNO group (Table 2).

Glycemia, Insulinemia and HOMA-IR Index

Fasting glycemia and in insulinemia values were increased in the PEDO group compared to the CNO group. In addition, the HOMA-IR index calculated from these parameters was higher ($P < 0.05$) in the PEDO group compared to the CNO group (Table 3).

Lipase, Amylase, Fructosamine and TNF- α Levels

Lipase, amylase, fructosamine and TNF- α levels were higher ($P < 0.05$) in the PEDO group than in the CNO group (Table 3).

ITT

Glucose levels were higher in the PEDO group than in the CNO group at 12 and 16 min after insulin infusion (Fig. 3). Kitt values from the ITTs, performed in the first 16 min following hormone infusion, are presented in Table 3. The Kitt value was lower in the PEDO group compared with the CNO group ($P < 0.05$), demonstrating decreased insulin sensitivity in PEDO rats compared to CNO rats. A smaller Kitt value indicates greater insulin resistance, because the cell sensitivity to insulin is impaired. As a consequence, the glucose disappearance rate after insulin injection is low.²²

Insulin Signal Transduction

An increase in the pp185 tyrosine phosphorylation status in relation to baseline was observed after insulin stimulus in both groups and tissues. However, the increase in pp185 phosphorylation levels observed after insulin stimulation in the muscle and white adipose tissues was lower in PEDO group compared to CNO group ($P < 0.05$). There was no

difference in the pp185 phosphorylation status at baseline across these groups in either tissue (Fig. 4).

DISCUSSION

Our initial aim was to establish whether maternal periodontal disease causes low birth weight in offspring, and whether low birth weight could be related to the development of insulin resistance and alterations in IST later in life. While low birth weight was not found in offspring from the periodontal disease group, decreased insulin sensitivity and insulin signaling were observed in adulthood.

In our experimental model, no weight differences between groups (CNO and PEDO) were found from birth to 75 days-old. This result is in agreement with previous studies, which also found no correlation between maternal periodontal disease and low birth weight.^{7, 8} However, the insulin resistance observed in the adult offspring from the periodontal disease group in the present study could result from the programming effect, by which stimulation or aggression during intrauterine growth results in physiological and metabolic alterations in adulthood.²⁶

Poor fetal nutrition caused by poor maternal nutrition or placental changes can cause changes in the development of fetal organs, prioritizing proper development of the more important organs like the brain and resulting in changes in the development of other tissues such as muscle, kidney and pancreas.²⁷ Although the PEDO group did not exhibit changes in birth weight, weight of the gastrocnemius muscle in these animals was reduced compared to controls rats at the time of euthanasia (75 days-old). This change in gastrocnemius skeletal muscle weight did not alter the animals' body weight, probably due to the increase in adipose tissue, which may have offset the decrease in muscle tissue weight. The impairment in muscle growth is relevant in the context of later risk for insulin resistance, given that skeletal muscle is a major determinant of insulin sensitivity, accounting for 90% of insulin-stimulated glucose uptake.²⁷

Impaired physiological uterine conditions may alter adipose tissue development and impact the long-term function and health of the offspring.²⁸ A study performed by Ravelli et al.²⁹ analyzed the obesity rates in young men after intrauterine and early infancy exposure to famine. These researchers found that poor nutrition in the first half of pregnancy resulted in higher obesity rates in the subjects of the study. Characteristics of metabolically active

visceral fat depots, including ready release of free fatty acids and adipokines into the portal circulation, have been proposed as potential mediators of body insulin resistance.¹⁵

In the present study, there was an increase in fasting glycemia in the PEDO group. Fructosamine concentrations, which can be used to measure levels of glycated proteins that reflect the glycemic control over a period of 2-3 weeks,³⁰ were also increased in the PEDO group. These observations may indicate that glucose levels were increased in the last weeks. The increase in blood glucose may be due to changes in β -cells. Remacle et al.³¹ suggest that fetal malnutrition may lead to definitive defects in the β -cell population and alterations in insulin-sensitive tissue in malnourished offspring. The molecular mechanisms responsible for the intrauterine programming of β -cells have not been fully elucidated yet, although mitochondrial programming and epigenetic modulation are likely to be involved. There is little doubt that metabolic alterations in the intrauterine environment impair pancreatic growth, especially of β -cells, leading to diabetes in adulthood.³¹

We also observed an increase in fasting insulinemia in the PEDO group. To evaluate the existence of pancreatic disease in these animals, plasma concentrations of amylase and lipase were analyzed. These enzymes are increased in cases of acute pancreatitis,³² and several authors observed a decrease in insulinemia in cases of this acute disease, as well.³³⁻³⁶ Dlugosz et al.³⁷ evaluated the insulin response to oral glucose load in non-obese (NOBAP) and obese (OAP) patients with acute pancreatitis (AP). The results of this research showed that secretion of insulin after oral glucose was significantly impaired and delayed in NOBAP patients, while a hyperinsulinemic response was evident in OAP patients. In both groups of patients with AP, the coefficient of glucose utilization was diminished. Likewise, our results revealed an increase in adipose tissue and insulinemia in the PEDO group.

The increase in insulin may be due to insulin resistance. This hormonal resistance is a genetic or acquired condition, in which physiological concentrations of insulin cause a subnormal response in cellular glucose uptake, especially in the muscular and adipose tissues. Due to the reduced glucose uptake, higher insulin production is needed from the pancreas in order to maintain normal glycemic concentration, increasing the circulating concentration of insulin.³⁸

Similarly, in the present study, both insulin resistance (demonstrated by the increased HOMA-IR index and by the decreased Kitt values during the insulin tolerance test) and hyperinsulinemia were observed in offspring from rats with periodontitis. However, the

tendency to develop diabetes mellitus in these animals is associated with insulin resistance, not with the decrease of insulin secretion. Insulin resistance can also be related to decreased IST.

In this study, analysis of the initial phases of insulin action in periepididymal white adipose tissue and gastrocnemius muscle demonstrated that the increase in pp185 tyrosine phosphorylation status observed after insulin stimulation is diminished in the adult offspring of mothers with periodontal disease. The reduction of the phosphorylation status and the decrease in insulin sensitivity might be related to the action of inflammatory mediators such as TNF- α , which was found to be upregulated in the PEDO group.

These findings reinforce studies showing that TNF- α alters insulin signaling by reducing tyrosine phosphorylation of the insulin receptor and its substrates.³⁹⁻⁴² Moreover, TNF- α induces serine phosphorylation of IRS-1, which makes IRS-1 inhibitory to the signaling capacity of the insulin receptor.^{39, 43}

The increase in TNF- α plasma concentration in the PEDO group may be related to the increased adipose tissue observed in this group. Hotamisligil et al.^{44, 45} demonstrated that, in rodents and obese humans, an increase in adipose tissue induces an increase in the production of cytokines, including TNF- α .

Another study performed by Dahlgren et al.⁴⁶ demonstrated that i.p. injection of IL-6 or TNF- α in pregnant rats induced an increase in body weight and retroperitoneal adipose tissue weight in adult offspring. The offspring of rats injected with IL-6 had insulin resistance, and the offspring of rats injected with TNF- α showed elevated basal levels of insulin. These authors suggest that cytokines can be important factors in mediating the effects of neonatal programming and determining the risk of disease development in adulthood.

Based on these results, the present study suggests a connection between maternal periodontal disease and the development of insulin resistance in adult offspring. This result reinforces the importance of preventing periodontal disease, considered a local disease, with the aim of avoiding insulin resistance and subsequent complications.

CONCLUSIONS

Offspring of rats with periodontal disease showed insulin resistance and impaired insulin signal in the adulthood. These metabolic alterations observed in later life can be attributed to the effect "programming", and reinforce the importance of preventing maternal periodontal disease, aiming to prevent insulin resistance in the adulthood of offspring.

§ Thiopentax®, Cristália, Itapira, Brazil.

^l Lique mine, Hoffmann-La Roche, Basle, Switzerland.

[¶] Novolin ®, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca.

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

** Coat-A-Count, DPC Diagnostics Products, Los Angeles, CA, USA.

^{††} Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brazil.

^{‡‡} Invitrogen Corporation, Camarillo, CA, USA.

§§ Accu-Chek Advantage, Roche Diagnostic, Indianapolis, IN, USA.

^{||} Santa Cruz Biotechnology. Inc, Santa Cruz, CA, USA.

^{¶¶} GE Healthcare, Buckinghamshire, UK.

^{##} Scion Image-Release Beta 3b, NIH, Frederick, MD, USA.

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

^{†††} Windows Digora 1.51, Soredex, Orion Corporation, Helsinki, Finland.

^{‡‡‡} SAS System, v. 9.2. SAS Institute Inc, Cary, NC, USA.

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

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants (2009/01412-5, 06/56237-5, 06/56238, 06/56238-1) from the São Paulo Research Foundation (FAPESP), São Paulo, SP, Brazil, Pro-Rectorate of Research of UNESP (PROPe-UNESP) and Foundation for the Development of UNESP (FUNDUNESP). We would like to thank Associate Professor Dr. Guilherme de Paula Nogueira^{§§§} and laboratory technician, Mrs. Devani Mariano Pinheiro,^{§§§} for help in the insulinemia evaluation.

REFERENCES

1. Alves RT, Ribeiro RA. Relationship between maternal periodontal disease and birth of preterm low weight babies. *Braz Oral Res* 2006;20:318-323.
2. Collins JG, Windley HW, Arnold RR, Offenbacher S. Effects of a *Porphyromonas gingivalis* infection on inflammatory mediator response and pregnancy outcome in hamsters. *Infect Immun* 1994;62:4356-4361.
3. Guimarães AN, Silva-Mato A, Miranda Cota LO, Siqueira FM, Costa FO. Maternal periodontal disease and preterm or extreme preterm birth: an ordinal logistic regression analysis. *J Periodontol* 2010;81:350-358.
4. Offenbacher S, Katz V, Fertik G, et al. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. *J Periodontol* 1996;67:1103-1113.
5. Khader YS, Ta'ani Q. Periodontal diseases and the risk of preterm birth and low birth weight: a meta-analysis. *J Periodontol* 2005;76:161-165.
6. Siqueira FM, Cota LO, Costa JE, Haddad JP, Lana AM, Costa FO. Intrauterine growth restriction, low birth weight, and preterm birth: adverse pregnancy outcomes and their association with maternal periodontitis. *J Periodontol* 2007;78:2266-2276.
7. Davenport ES, Williams CE, Sterne JA, Murad S, Sivapathasundram V, Curtis MA. Maternal periodontal disease and preterm low birthweight: case-control study. *J Dent Res* 2002;81:313-318.
8. Ryu JI, Oh K, Yang H, et al. Health behaviors, periodontal conditions, and periodontal pathogens in spontaneous preterm birth: a case-control study in Korea. *J Periodontol* 2010;81:855-863.
9. Galvão MP, Rösing CK, Ferreira MB. Effects of ligature-induced periodontitis in pregnant Wistar rats. *Pesqui Odontol Bras* 2003;17:51-55.
10. Colombo NH, Shirakashi DJ, Chiba FY, et al. Periodontal Disease Decreases Insulin Sensitivity and Insulin Signaling. *J Periodontol* 2011.
11. Endo Y, Tomofuji T, Ekuni D, et al. Experimental periodontitis induces gene expression of proinflammatory cytokines in liver and white adipose tissues in obesity. *J Periodontol* 2010;81:520-526.
12. Sert T, Kırzioğlu FY, Fentoğlu O, Aylak F, Mungan T. Serum placental growth factor, vascular endothelial growth factor, soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 and -2 levels in periodontal disease, and adverse pregnancy outcomes. *J Periodontol* 2011;82:1735-1748.
13. Horáková D, Janoutová G, Janout V. Insulin resistance and birth weight. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2005;149:173-176.
14. Kim CS, Park JS, Park J, et al. The relation between birth weight and insulin resistance in Korean adolescents. *Yonsei Med J* 2006;47:85-92.
15. Vaag A, Jensen CB, Poulsen P, et al. Metabolic aspects of insulin resistance in individuals born small for gestational age. *Horm Res* 2006;65 Suppl 3:137-143.
16. Jansson T, Powell TL. Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. *Clin Sci (Lond)* 2007;113:1-13.
17. Langley-Evans SC. Nutritional programming of disease: unravelling the mechanism. *J Anat* 2009;215:36-51.
18. Nilsson C, Larsson BM, Jennische E, et al. Maternal endotoxemia results in obesity and insulin resistance in adult male offspring. *Endocrinology* 2001;142:2622-2630.

19. Rodini CO, Batista AC, Dionísio TJ, Santos CF, Cunha FQ, Lara VS. Morphologic evaluation and expression of matrix metalloproteinases-2 and 9 and nitric oxide during experimental periodontal disease in rat. *J Mol Histol* 2008;39:275-282.
20. 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.
21. Chehoud KA, Chiba FY, Sasaki KT, Garbin CAS, Sumida DH. Effects of fluoride intake on insulin sensitivity and insulin signal transduction. *Fluoride* 2008;41:270-275.
22. Bonora E, Moghetti P, Zancanaro C, et al. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;68:374-378.
23. Carvalho CR, Brenelli SL, Silva AC, Nunes AL, Velloso LA, Saad MJ. Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. *Endocrinology* 1996;137:151-159.
24. Holzhausen M, Rossa Júnior C, Marcantonio Júnior E, Nassar PO, Spolidório DM, Spolidório LC. Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol* 2002;73:1030-1036.
25. Andersen CCP, Buschard K, Flyvbjerg A, Stoltze K, Holmstrup P. Periodontitis Deteriorates Metabolic Control in Type 2 Diabetic Goto-Kakizaki Rats. 2006;77:350-356.
26. Reynolds RM, Phillips DI. Long-term consequences of intrauterine growth retardation. *Horm Res* 1998;49 Suppl 2:28-31.
27. Hales CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull* 2001;60:5-20.
28. Mostyn A, Symonds ME. Early programming of adipose tissue function: a large-animal perspective. *Proc Nutr Soc* 2009;68:393-400.
29. Ravelli GP, Stein ZA, Susser MW. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med* 1976;295:349-353.
30. Post EM, Moore JD, Ihrke J, Aisenberg J. Fructosamine levels demonstrate improved glycemic control for some children attending a diabetes summer camp. *Pediatr Diabetes* 2000;1:204-208.
31. Remacle C, Dumortier O, Bol V, et al. Intrauterine programming of the endocrine pancreas. *Diabetes Obes Metab* 2007;9 Suppl 2:196-209.
32. Frank B, Gottlieb K. Amylase normal, lipase elevated: is it pancreatitis? A case series and review of the literature. *Am J Gastroenterol* 1999;94:463-469.
33. Johansen K, Ornsholt J. Frequency of diabetes after acute pancreatitis. *Metabolism* 1972;21:291-296.
34. Solomon SS, Duckworth WC, Jallepalli P, Bobal MA, Iyer R. The glucose intolerance of acute pancreatitis: hormonal response to arginine. *Diabetes* 1980;29:22-26.
35. Duckworth WC, Solomon SS, Jallepalli P, Iyer R, Bobal MA. Hormonal responses to intravenous glucose and arginine in patients with pancreatitis. *Horm Res* 1983;17:65-73.
36. Malecka-Panas E, Gasiorowska A, Kropiwnicka A, Zlobinska A, Drzewoski J. Endocrine pancreatic function in patients after acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 2002;49:1707-1712.

37. Dlugosz J, Olszewski S, Kinalska I, Gabryelewicz A. The insulin response and glucose tolerance in acute pancreatitis with reference to patients body weight. *Dtsch Z Verdau Stoffwechselkr* 1982;42:295-299.
38. Cesaretti ML, Kohlmann Junior O. [Experimental models of insulin resistance and obesity: lessons learned]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2006;50:190-197.
39. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996;271:665-668.
40. Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor α inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:4854-4858.
41. Kroder G, Bossenmaier B, Kellerer M, et al. Tumor necrosis factor- α - and hyperglycemia-induced insulin resistance. Evidence for different mechanisms and different effects on insulin signaling. *J Clin Invest* 1996;97:1471-1477.
42. Feinstein R, Kanety H, Papa MZ, Lunenfeld B, Karasik A. Tumor necrosis factor- α suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. *J Biol Chem* 1993;268:26055-26058.
43. Kanety H, Feinstein R, Papa MZ, Hemi R, Karasik A. Tumor necrosis factor α -induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). Possible mechanism for suppression of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1. *J Biol Chem* 1995;270:23780-23784.
44. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993;259:87-91.
45. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 1995;95:2409-2415.
46. Dahlgren J, Nilsson C, Jennische E, et al. Prenatal cytokine exposure results in obesity and gender-specific programming. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;281:E326-334.

Table 1. Alveolar bone destruction in mother rats.

	CN	PED
Bone loss (mm)	0.88 $\pm$ 0.09	1.65 $\pm$ 0.2*
Bone support (%)	54.06 $\pm$ 2.93	37.30 $\pm$ 4.43*

CN, control rats; PED, rats with periodontal disease. *P < 0.05 for CN vs. PED animals. Values are presented as means $\pm$ SD.

Table 2. Absolute and relative weights of periepididymal white adipose tissue and gastrocnemius muscle.

Tissue	CNO	PEDO
WAT g	4.89 ± 0.91	5.94 ± 1.06*
WAT g/100g of body weight	1.37 ± 0.21	1.57 ± 0.24*
GM g	2.24 ± 0.17	2.05 ± 0.20*
GM g/100g of body weight	0.61 ± 0.07	0.56 ± 0.04*

WAT, white adipose tissue; GM, gastrocnemius muscle. *P <0.05 compared with control. Values are presented as means ± SD.

Table 3. Offspring parameters.

Parameters	CNO	PEDO
Glycemia (mmol/L)	5.34 ± 0.14	5.74 ± 0.41*
Insulinemia (μU/mL)	8.06 ± 3.04	12.97 ± 3.08*
HOMA-IR	1.92 ± 0.75	3.31 ± 0.83*
Fructosamine (μmol/L)	109.4 ± 32.7	204.4 ± 89.62*
Kitt	4.34 ± 0.98	3.23 ± 0.41*
Lipase (U/L)	6.22 ± 1.5	30.86 ± 6.3*
Amylase (U/dL)	697.3 ± 7.07	721.5 ± 8.7*
TNF-α (pg/mL)	8.66 ± 1.23	10.67 ± 1.2*

CNO, offspring from control mothers; PEDO, offspring from mothers with periodontal disease. *P <0.05 compared with control. Values are presented as means ± SD.

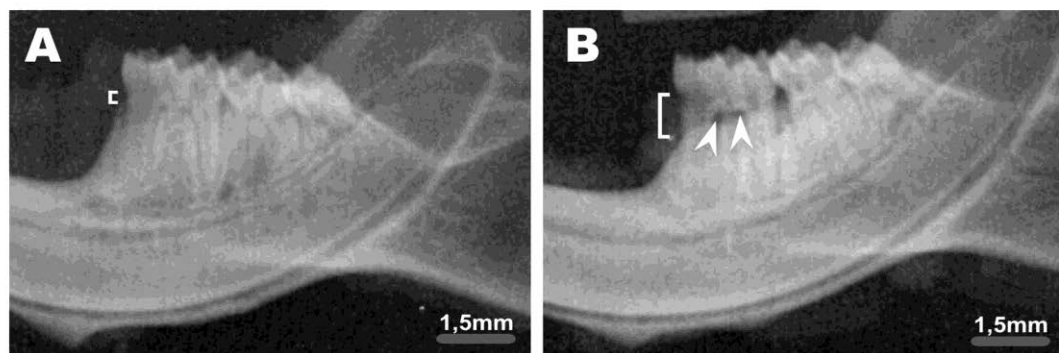


Figure 1. Mandible images obtained from experimental animals. Radiographic images showing (A) normal alveolar bone, and (B) loss of bone in the interproximal and interradiolar regions (white arrowhead) around 50 days after ligature-induced periodontitis. Loss of bone was measured by the CEJ to alveolar bone crest distance (white line).

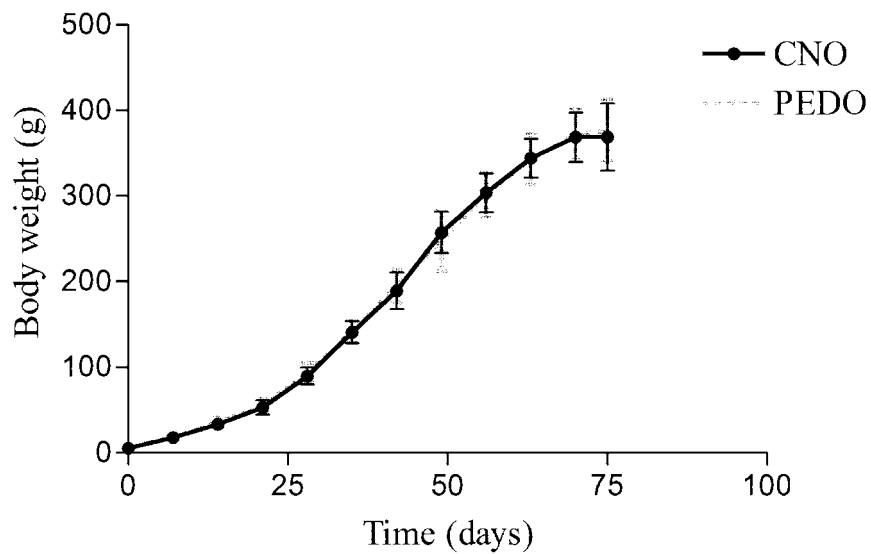


Figure 2. Offspring body weight. Quantitative comparison of the body weight of offspring from control (CNO) and periodontal disease (PEDO) groups, measured weekly from birth to 75 days-old. Values are presented as means $\pm$ SD, $n=24$ (per group).

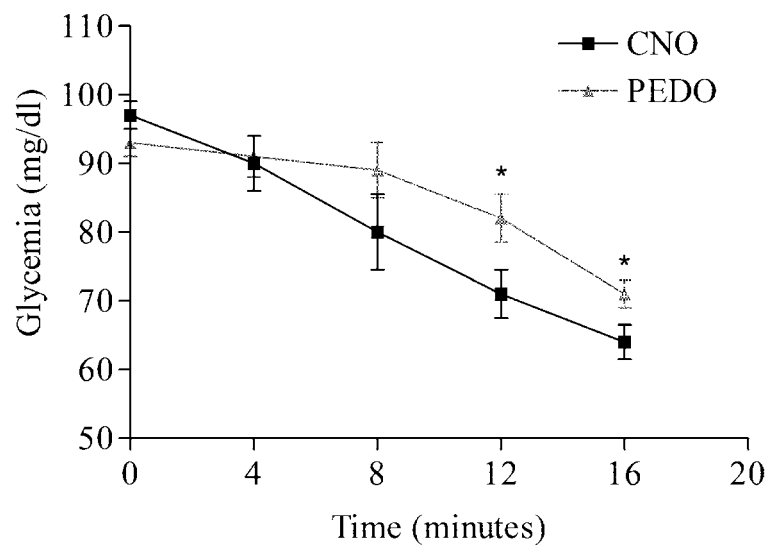


Figure 3. Intravenous ITT. Blood samples were collected from control (CNO) and periodontal disease (PEDO) offspring at 0 (basal), 4, 8, 12, and 16 minutes after insulin injection. Glycemia values are presented as means $\pm$ SD, $n = 6$ (per group). * $P < 0.05$ CNO vs. PEDO.

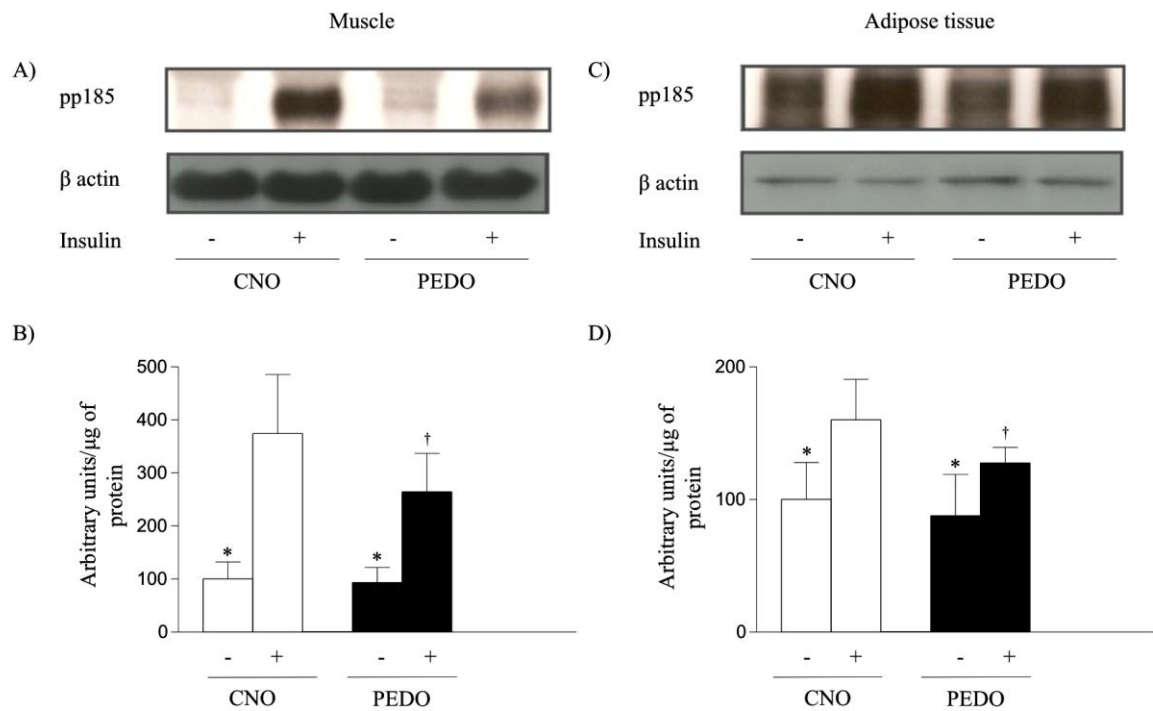


Figure 4. Evaluation of pp185 tyrosine phosphorylation status. The levels of pp185 (IRS-1/IRS-2) tyrosine phosphorylation were analyzed before (-) and after (+) insulin stimulus in gastrocnemius muscle and periepididymal white adipose tissue (WAT) in animals from control (CNO) and periodontal disease (PEDO) groups. **(A and C)** Typical autoradiographs of muscle and WAT are presented, respectively. β -actin was used as a loading control. **(B and D)** Quantitative analysis of pp185 tyrosine phosphorylation status in muscle and WAT, expressed in arbitrary units per μ g of protein (means $\pm$ SD, $n = 8$). * $P < 0.05$ Insulin (-) vs. Insulin (+); † $P < 0.02$ CNO/Insulin (+) vs. PEDO/Insulin (+).

ANEXO C - Artigo a ser submetido à Revista Journal of Periodontology

Maternal periodontal disease in rats decreases insulin signaling, induces dyslipidemia and increases IL-6 and resistin levels in the adulthood of offspring

Maternal periodontal disease in rats decreases insulin signaling, induces dyslipidemia and increases IL-6 and resistin levels in the adulthood of offspring

Daisy J. Shirakashi * - Post graduate student

Natalia H. Colombo * - Post graduate student

Fernando Y. Chiba [†] - Post graduate student

Maria Sara L. Coutinho * - Undergraduate student

Ana Cláudia M. S. Nakamune * - Assistant Professor

Sandra Helena P. Oliveira* - Associate Professor

Carla R. O. Carvalho [‡] - Associate Professor

Cléa A. S. Garbin [†] - Associate Professor

Doris H. Sumida * - Associate Professor

* Department of Basic Sciences, Dental School of Araçatuba, São Paulo State University -UNESP, Brazil

[†] Department of Child and Social Dentistry, Dental School of Araçatuba, São Paulo State University - UNESP, Brazil

[‡] Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Brazil

Corresponding Author:

Doris Hissako Sumida

E-mail: dorishs@foa.unesp.br

Dental School of Araçatuba, UNESP- Univ Estadual Paulista

Address: R. José Bonifácio, 1193, CEP: 16015-050, Araçatuba-SP, Brazil

TEL: (+55) 18 3636 2819 FAX: (+55) 18 3636 3233

Fax number and e-mail can be published.

Grants from the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP), São Paulo, SP, Brazil.

2862 words, one figure and two tables

MATERNAL PERIODONTAL DISEASE IN RATS DECREASES INSULIN SIGNALING, INDUCES DYSLIPIDEMIA AND INCREASES IL-6 AND RESISTIN LEVELS IN THE ADULTHOOD OF OFFSPRING

Background: Maternal periodontal disease in adult rats is associated with the development of insulin resistance (IR) and alterations in insulin signal (IS) in adulthood of offspring. The aim of this study is to verify whether these alterations in the adulthood of offspring are due to variation in the inhibitory pathway of insulin signal transduction and in lipids and cytokines plasmatic concentrations.

Methods: Eight female Wistar rats were divided into two groups: periodontal disease and control groups. Rats from both groups mated at seven days after induction of periodontal disease. Male offspring were divided into two groups: 1) periodontal disease offspring (PEDO, n=20); 2) control offspring (CNO, n=20). The body weight of the offspring was followed up from birth until 75 days old. After this period, the following evaluations were performed: 1) plasma concentrations of lipids, IL-6, resistin and adiponectin; 2) IRS-1 serine phosphorylation status (IRS-1-SerP) in insulin-sensitive tissues.

Results: The PEDO group showed, after insulin stimulus, an increased ($p<0.05$) IRS-1-SerP in the white adipose tissue compared to the CNO group. The plasmatic concentrations of total cholesterol (C), LDL-C, VLDL-C, triglycerides, IL-6 and resistin were higher in PEDO group compared to CNO group. However, no difference in plasmatic concentrations of adiponectin and HDL-C was observed.

Conclusions: The decrease in IS and IR found in the PEDO group may be due to the increase in: a) IRS-1-SerP in the adipose tissue, 2) IL-6 and resistin plasmatic concentrations, 3) dyslipidemia, 4) glycemia (shown from values of fructosamine), 5) pancreatic enzymes (lipase and amylase). These results further strengthen the importance of preventing periodontal disease in order to prevent insulin resistance and its complications in the subsequent generation.

KEY WORDS

Periodontal Diseases, Cytokines, Diabetes Mellitus, Insulin Resistance, Inflammation, Fetal Development.

INTRODUCTION

The programming of fetal development ("programming") is considered an important risk factor for the development of various diseases in adulthood, including coronary heart diseases and other disorders related to insulin resistance.¹ Studies showed that disorders that occur with the woman during pregnancy, as changes in nutrition, concentrations of cytokines and cortisol, and reduction in uteroplacental blood flow can program the fetus to develop diseases in adulthood.²

Nilsson et al.³ injected bacterial endotoxin (LPS) in mother rats and observed that the offspring of these animals exhibited an increase in body weight, increase in intra-abdominal adipose tissue, and reduction in the insulin effect on glucose uptake, suggesting that the prenatal period can be important for the development of insulin resistance and obesity in adulthood of offspring.

Periodontal disease has been associated as one cause for preterm and low birth weight (PLBW), and some studies showed that the low birth weight is related to the development of insulin resistance in adolescents and adult. It is known that periodontopathogenic bacteria produce many virulence factors such as lipopolysaccharide (LPS) and peptidoglycan and these factors induce a host response, including production of proinflammatory cytokines.⁴⁻⁷

Studies have demonstrated that different metabolic states altered such as persistent elevation of circulating glucose, insulin, cytokines and fatty acids can lead to peripheral insulin resistance.⁸

The literature shows that people with diabetes exhibit changes in cholesterol and triglycerides serum levels. In patients with diabetic dyslipidemia, insulin resistance seems to contribute directly or indirectly with the plasma lipid abnormalities, such as hypertriglyceridemia, low HDL-cholesterol and high LDL cholesterol levels.⁹

The increase in pro-inflammatory cytokines such as TNF- α ,¹⁰⁻¹³ IL-6¹⁴ and resistin can promote impairment in the insulin signal, through of decrease in tyrosine phosphorylation status of insulin receptor substrate (IRS-1). Moreover, TNF- α and IL-6 can induce serine phosphorylation of IRS-1, which makes this molecule inhibitory for the signaling capacity of the insulin receptor.^{10, 14, 15}

A recent study performed in our laboratory showed no association between maternal periodontitis and low birth weight in offspring. However, a relationship between maternal periodontal disease and changes in insulin signal in the adulthood of offspring was observed.

We demonstrated that the offspring of rats with periodontal disease had a decrease in insulin sensitivity and reduction in the pp185 (IRS1-IRS2) tyrosine phosphorylation status, after insulin stimulation, in periepididymal white adipose tissue (WAT) and skeletal muscle gastrocnemius (GM).

The aim of this study is to verify whether a decrease in insulin sensitivity and in the pp185 (IRS1-IRS2) tyrosine phosphorylation status shown in the adult offspring of rats with periodontal disease is due to changes in the inhibitory pathway of insulin signal transduction and in lipids and adipokines plasmatic concentrations.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Wistar rats were kept under a 12/12 h light/dark cycle (lights on at 07:00), at a temperature of $23 \pm 2^\circ\text{C}$ with food and water available *ad libitum*. This study followed the Ethical Principles and Guidelines for Animal Experimentation and was approved by the local ethics committee, according to protocol number 2009-005671.

Experimental design

Eight female rats weighing approximately 200g were randomly divided into two groups: 1) periodontal disease group (PED), in which the disease was induced by ligating 4-0 silk thread on cervical region of the lower first molars, bilaterally, as described by Rodini et al.¹⁶; and 2) control group (CN), without periodontal disease. Seven days after ligature placement, animals from both groups mated and daily vaginal smears were taken to verify the presence of sperm. Pregnant rats were kept in individual cages.

After birth, the numbers of offspring from CN and PED mothers were paired so that each mother had the same amount of puppies; after weaning, only male offspring were used and divided into two groups: A) control offspring (CNO, n=20) and B) periodontal disease offspring (PEDO, n=20). The body weight of the offspring was evaluated once a week, from birth until 75 days old, and experiments were carried out from this age.

Animals were fasted 14 h prior to experiments and anesthetized using sodium thiopental[§] (3%, 50 mg/kg body weight, i.p.). Experiments were carried out 10-15 min later. Median laparotomy was performed in rats from CNO (n=10) and PEDO (n=10) groups and blood samples (4mL) were taken via inferior vena cava puncture. The samples were then distributed into tubes containing heparin.^l Plasma was prepared by centrifugation of blood at 3000g for 15 minutes at 4°C and then stored in aliquots at -70°C until analysis of total

cholesterol (TC), triglycerides (TG), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), IL-6, resistin and adiponectin plasmatic concentrations. Other animals from the CNO (n=10) and PEDO (n=10) groups were used to quantify the IRS-1 serine phosphorylation status in insulin-sensitive tissues such as the liver (L), gastrocnemius skeletal muscle (GM) and periepididymal white adipose tissue (WAT) after insulin stimulus (1.5 U, i.v.).

Lipid assays

TC and TG were determined by an enzymatic method using a kit.[¶] HDL-C was determined by a direct method using the enzymes cholesterol oxidase and esterase with a kit.[¶] Very low density lipoprotein cholesterol (VLDL-C) values were calculated by the TG/5 formula. Low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) values were calculated by the Friedewald equation.¹⁷

Cytokine and adipokines plasmatic concentrations measurement

Plasmatic concentrations of IL-6[#], resistin^{**} and adiponectin^{††} were quantified using an enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA) kit.

Assessment of the insulin receptor substrate (IRS-1) serine phosphorylation status

Samples from the liver (L), gastrocnemius skeletal muscle (GM) and periepididymal white adipose tissue (WAT) were collected from ten animals of each group (CNO and PEDO) prior to and after administration of 1.5 U regular insulin^{‡‡} (i.v. portal vein) at variable times (30 s for L, 90 s for GM, 120 s for WAT). Tissue samples were prepared according to the method described by Carvalho et al.¹⁸ and submitted to the western blotting method for quantification of the IRS-1 serine phosphorylation status using anti-phospho-IRS-1 (ser 307) antibody.^{§§} β -actin antibody^{§§} were used as controls. Immunoreactive bands were detected by autoradiography using a chemiluminescent substrate system^{||} according to the manufacturer's instructions. Quantitative analysis of the blots was carried out using a software.^{¶¶}

Statistical Analysis

Two analyses were performed:

1) For insulin signal:

The normality of data set analyzed was verified. The statistical analysis was performed by analysis of variance, followed by Tukey post hoc test when the analysis of variance suggested a significant difference among groups ($p < 0.05$). Data analysis was performed with a statistical program.^{##}

2) For analysis of lipids, IL-6, resistin and adiponectin plasmatic concentrations:

The statistical analyses were analyzed by Student t test. p value of <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Insulin signal

After insulin stimulus, the IRS-1 serine phosphorylation status was increased ($p<0.05$) in the white adipose tissue in the PEDO group compared to the CNO group. However, this alteration in insulin signaling was not observed in the muscle and in liver between groups. No alteration in IRS-1 serine phosphorylation status was observed at baseline and, after insulin stimulus, in relation to baseline in all groups and tissues (Fig. 1).

Lipids plasmatic concentrations

As seen in the table 1, plasmatic concentrations of total cholesterol, LDL-cholesterol, VLDL-cholesterol and triglycerides were higher in PEDO group compared to PCN group. However, PEDO rats showed no alteration in plasmatic concentration of HDL-cholesterol when compared to CNO rats.

Cytokine and adipokines plasmatic concentrations

The values of IL-6 and resistin plasmatic concentrations were higher in PEDO group compared to CNO group. However, no alteration in adiponectin plasmatic concentration was observed in PEDO rats compared to CNO rats (Table2).

DISCUSSION

The present study showed that maternal periodontal disease promoted an increase in the serine phosphorylation status in white adipose tissue, but no significant differences were found in this evaluation in muscle tissue and liver (Figure 1). The insulin action starts from the binding of the hormone to a specific receptor which autophosphorylates and phosphorylates in tyrosine the cytoplasmatic substrates such as IRS-1 and IRS-2. These substrates phosphorylated in tyrosine can be associated with PI 3-kinase, activating it. This activation is essential for the transport of glucose in insulin-sensitive tissues.¹⁹

The insulin receptor, besides being phosphorylated in tyrosine, can also be phosphorylated in serine, which attenuates the signal transmission by reducing the ability of the receptor to phosphorylate in tyrosine after insulin stimulation.¹⁰ These inhibitory phosphorylations cause negative feedback in insulin signaling and can cause insulin resistance.¹⁰

Recent studies indicate that insulin resistance induced by obesity can be due to sequential activation of protein kinase C (PKC) and kinase inhibitor of nuclear factor κ B (IKK β).^{5, 20} Zhang et al.²¹ demonstrated that TNF- α activates the SK6 (p70S6K-serine kinase) through IKK β , and that SK6 directly phosphorylates IRS-1 in multiple serine residues to inhibit insulin signaling.

Besides the TNF- α , other cytokines such as IL-6 and IL-1 β perform paracrine effects to activate inflammatory pathways in insulin-target cells. This leads to the activation of Jun N-terminal kinase (JNK), inhibitor κ B kinase (IKK) β , and other serine kinases. These serine kinases can also phosphorylate proteins of insulin receptor substrate (IRS), insulin receptors, and possibly other molecules in the insulin signaling in serine. These phosphorylations in serine interfere with the normal action of insulin, creating a cellular condition of insulin resistance.²²

From the above data, it can be inferred that the alteration in insulin signal in adipose tissue of PEDO rats (Figure 1) can be due to increased plasmatic concentrations of cytokines such as IL-6 and resistin observed in these animals (Table 3).

Nieto-Vazquez et al.,²³ verified the impact of treatment with IL-6 in insulin signaling in skeletal muscle and found a twofold effect. In short term, IL-6 associated with insulin increase glucose uptake and systemic insulin sensitivity. Chronic exposure to IL-6 leads to deficiency in the translocation of GLUT4 to the plasmatic membrane and defects in the signaling of the insulin receptor substrate. Chronic treatment with this cytokine, therefore, impairs completely the IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation and AKT serine phosphorylation, without changing the amount of total AKT protein. Furthermore, IL-6 produces phosphorylation of IRS-1 in Ser307 residues in a JNK dependent manner.²³

The offspring of rats with periodontal disease showed an increase in weight of adipose tissue (data not shown), and this increase in adipose tissue could explain the increased plasmatic concentrations of cytokines found in these animals.

Characteristics of the metabolically active visceral fat depot, including ready release of free fatty acids and adipokines into the portal circulation, have been proposed as potential mediators of body insulin resistance.²⁴ Increased intracellular concentrations of lipid metabolites and/or increased plasma FFA will, in turn, activate signal transduction pathways, which will induce inflammation and impair insulin signaling.²⁵

There is strong evidence that adipose tissue not only releases FFA that contributes to insulin resistance in liver and muscle, but also produces a wide range of inflammatory molecules including TNF- α and IL-6 which may have local effects on adipose physiology and also systemic effects on other tissues. Some factors such as leptin, TNF- α , IL-6 and resistin are overproduced during obesity, and conversely the plasma levels of adiponectin are reduced during this pathology.²⁶

However, despite the present study having found an increase in IL-6 and resistin (as shown above), plasma levels of adiponectin did not differ between PCN and PDP groups.

TNF α , leptin, adiponectin, MCP-1, resistin, and several other adipokines are involved in the regulation of glucose metabolism and insulin sensitivity. In a study with human liver cell line (HepG2), Luo et al.²⁷ suggest that resistin induces insulin resistance in cells, at least in part, through the induction of expression of SOCS-3 and reducing phosphorylation of Akt by a mechanism independent of AMPK.²⁷ In contrast, Heilbronn et al.²⁸ found no relationship between serum resistin and insulin sensitivity, concluding that resistin does not act as an important mediator on insulin sensitivity in humans.

The literature shows that subjects with diabetes show changes in serum cholesterol and triglycerides.^{9, 29} Due to this fact, we performed analyses of serum cholesterol and triglycerides. The results of the experiments showed increased levels of total cholesterol, VLDL, LDL and triglycerides in the PDP groups in relationship to NCP. However, no changes were observed in HDL-cholesterol levels (Table 2).

These variations in cholesterol levels found in the PEDO offspring may be related to insulin resistance found in these animals in previous studies.³⁰ Pihlajamäki et al.³¹ associated the insulin resistance with increased synthesis and decreased absorption of cholesterol.

The increase in the number of particles of VLDL-cholesterol and plasmatic triglycerides leads to decreased levels of HDL and increase in the plasmatic concentration of LDL-cholesterol.⁹

The metabolic dyslipidemia is the most common complication in insulin resistance and in type 2 diabetes, and it is believed to be exacerbated by obesity, as well as by numerous environmental factors, such as a high-fat diet and sedentary lifestyle. Dyslipidemia accompanied by insulin resistance is characterized by abnormalities that include the decrease of plasmatic levels of HDL-cholesterol with plasmatic elevation in FFA and triglycerides.³²

However, in obesity low levels of HDL-cholesterol can occur independently of increased serum triglyceride levels. In some obese individuals, the low level of HDL may be secondary to increased serum levels of inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-6.³³ These dyslipidemia seen in the PEDO group may be due to insulin resistance and increased adipose tissue found previously (data not shown), which may have caused an increase in plasmatic concentrations of adipokines, such as IL-6 and resistin in these animals.

Kumar et al.³⁴ demonstrated that the level of proinflammatory cytokines (TNF- α and IL-6) was higher in diabetic patients than in non-diabetic ones, and that was increased in visceral adipose tissue that secretes these cytokines, which have shown to play crucial role in inflammation, insulin resistance and cardiovascular diseases. These authors also demonstrate abnormalities in lipid profile of diabetics such as decreased level of HDL-C and increased levels of the TC, TG, LDL-C and VLDL-C with high insulin resistance. It is believed that insulin resistance, a state of diminished response to insulin, is primary key pathological feature which leads to pancreatic beta cell dysfunction and contributes to the progression of T2DM. This defect is accompanied by compensatory increase in pancreatic β -cell insulin secretion for the maintenance of euglycemia.

Any condition less than ideal during the perinatal period can result in permanent effects which may last for generations. The programming involves several structural changes in organs. There are several mechanisms that can explain these changes: alteration in genic expression, deficient cell proliferation secondary to poor nutrient deficiency, apoptotic cell death caused by oxidative stress and changes in surface receptors. Each mechanism involved in fetal-neonatal programming interacts with the other, being a trigger for a whole cascade of other mechanisms.³⁵

Based on these results, we can conclude that the decrease of IRSs tyrosine phosphorylation status and insulin sensitivity found in PDP group in previous study can be due to increase in: IRS-1 serine phosphorylation status in adipose tissue, plasmatic concentrations of IL-6, resistin and lipids.

CONCLUSIONS

The maternal periodontal disease promotes a lot of alterations in the adulthood of their offspring, such as decrease in insulin signaling and increase in IL-6, resistin and lipids plasmatic levels. These results reinforce the importance of preventing the periodontal disease in order to prevent insulin resistance and its complications in the subsequent generation.

§ Thiopentax®, Cristália, Itapira, Brazil.

|| Liqemine, Hoffmann-La Roche, Basle, Switzerland.

¶ Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Brazil.

BD Biosciences, San Diego, USA.

** Biovedor, Heidelberg, Germany.

†† RayBiotech, Norcross, USA.

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

§§ Santa Cruz Biotechnology. Inc, Santa Cruz, USA.

||| GE Healthcare, Buckinghamshire, UK.

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

BioEstat 5.0, Pará, Brasil

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants (2009/01412-5, 2009/13106-6) from the São Paulo Research Foundation (FAPESP), São Paulo, SP, Brazil, Pro-Rectorate of Research of UNESP (PROPE-UNESP) and Foundation for the Development of UNESP (FUNDUNESP).

REFERENCES

1. Langley-Evans SC. Nutritional programming of disease: unravelling the mechanism. *J Anat* 2009;215:36-51.
2. Jansson T, Powell TL. Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. *Clin Sci (Lond)* 2007;113:1-13.
3. Nilsson C, Larsson BM, Jennische E, et al. Maternal endotoxemia results in obesity and insulin resistance in adult male offspring. *Endocrinology* 2001;142:2622-2630.
4. Alves RT, Ribeiro RA. Relationship between maternal periodontal disease and birth of preterm low weight babies. *Braz Oral Res* 2006;20:318-323.
5. Kim CS, Park JS, Park J, et al. The relation between birth weight and insulin resistance in Korean adolescents. *Yonsei Med J* 2006;47:85-92.
6. Newsome CA, Shiell AW, Fall CH, Phillips DI, Shier R, Law CM. Is birth weight related to later glucose and insulin metabolism?--A systematic review. *Diabet Med* 2003;20:339-348.
7. Ara T, Kurata K, Hirai K, et al. Human gingival fibroblasts are critical in sustaining inflammation in periodontal disease. *J Periodontal Res* 2009;44:21-27.
8. Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000;106:165-169.
9. Mooradian AD. Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2009;5:150-159.

10. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996;271:665-668.
11. Feinstein R, Kanety H, Papa MZ, Lunenfeld B, Karasik A. Tumor necrosis factor- α suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. *J Biol Chem* 1993;268:26055-26058.
12. Hotamisligil GS, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor α : a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* 1994;43:1271-1278.
13. Kroder G, Bossenmaier B, Kellerer M, et al. Tumor necrosis factor- α - and hyperglycemia-induced insulin resistance. Evidence for different mechanisms and different effects on insulin signaling. *J Clin Invest* 1996;97:1471-1477.
14. Holzhausen M, Rossa Júnior C, Marcantonio Júnior E, Nassar PO, Spolidório DM, Spolidório LC. Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol* 2002;73:1030-1036.
15. Kanety H, Feinstein R, Papa MZ, Hemi R, Karasik A. Tumor necrosis factor α -induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). Possible mechanism for suppression of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1. *J Biol Chem* 1995;270:23780-23784.
16. Rodini CO, Batista AC, Dionísio TJ, Santos CF, Cunha FQ, Lara VS. Morphologic evaluation and expression of matrix metalloproteinases-2 and 9 and nitric oxide during experimental periodontal disease in rat. *J Mol Histol* 2008;39:275-282.
17. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
18. Carvalho C, Brenelli S, Silva A, Nunes A, Velloso L, Saad M. Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. *Endocrinology* 1996;137:151-159.
19. Clarke JF, Young PW, Yonezawa K, Kasuga M, Holman GD. Inhibition of the translocation of GLUT1 and GLUT4 in 3T3-L1 cells by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, wortmannin. *Biochem J* 1994;300 (Pt 3):631-635.
20. Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, et al. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikk β . *Science* 2001;293:1673-1677.
21. Zhang J, Gao Z, Yin J, Quon MJ, Ye J. S6K directly phosphorylates IRS-1 on Ser-270 to promote insulin resistance in response to TNF-(α) signaling through IKK2. *J Biol Chem* 2008;283:35375-35382.
22. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol* 2010;72:219-246.
23. Nieto-Vazquez I, Fernández-Veledo S, de Alvaro C, Lorenzo M. Dual role of interleukin-6 in regulating insulin sensitivity in murine skeletal muscle. *Diabetes* 2008;57:3211-3221.
24. Vaag A, Jensen CB, Poulsen P, et al. Metabolic aspects of insulin resistance in individuals born small for gestational age. *Horm Res* 2006;65 Suppl 3:137-143.
25. Krebs M, Roden M. Molecular mechanisms of lipid-induced insulin resistance in muscle, liver and vasculature. *Diabetes Obes Metab* 2005;7:621-632.
26. Meshkani R, Adeli K. Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Clin Biochem* 2009;42:1331-1346.

27. Luo Z, Zhang Y, Li F, et al. Resistin induces insulin resistance by both AMPK-dependent and AMPK-independent mechanisms in HepG2 cells. *Endocrine* 2009;36:60-69.
28. Heilbronn LK, Rood J, Janderova L, et al. Relationship between serum resistin concentrations and insulin resistance in nonobese, obese, and obese diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:1844-1848.
29. Borggreve SE, De Vries R, Dullaart RP. Alterations in high-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus: role of lipolytic enzymes, lecithin:cholesterol acyltransferase and lipid transfer proteins. *Eur J Clin Invest* 2003;33:1051-1069.
30. Shirakashi DJ, Colombo NH, Chiba FY, Moimaz SAS, Sumida DH. Evaluation of insulin sensitivity and insulin signal transduction in adult offspring of female rats with periodontal disease. *American Diabetes Association's* 2010;59:A380-A381.
31. Pihlajamäki J, Gylling H, Miettinen TA, Laakso M. Insulin resistance is associated with increased cholesterol synthesis and decreased cholesterol absorption in normoglycemic men. *J Lipid Res* 2004;45:507-512.
32. Avramoglu RK, Basciano H, Adeli K. Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistant states. *Clin Chim Acta* 2006;368:1-19.
33. Mooradian AD, Albert SG, Haas MJ. Low serum high-density lipoprotein cholesterol in obese subjects with normal serum triglycerides: the role of insulin resistance and inflammatory cytokines. *Diabetes Obes Metab* 2007;9:441-443.
34. Kumar H, Mishra M, Bajpai S, 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* 2011.
35. Nesterenko TH, Aly H. Fetal and neonatal programming: evidence and clinical implications. *Am J Perinatol* 2009;26:191-198.

Table 1. Lipids plasmatic concentrations (mg/dl) in offspring of control rats (CNO) and offspring of rats with periodontal disease (PDP)

Lipids	CNO (mean $\pm$ SEM)	PEDO (mean $\pm$ SEM)
Total cholesterol	46.45 $\pm$ 3.224	56.34 $\pm$ 1.915*
Triglycerides	44.15 $\pm$ 5.141	62.52 $\pm$ 5.544*
HDL-cholesterol	13.40 $\pm$ 0.5416	14.20 $\pm$ 0.2906
LDL-cholesterol	24.01 $\pm$ 2.388	29.94 $\pm$ 1.192*
VLDL-cholesterol	8.829 $\pm$ 1.028	12.51 $\pm$ 1.041*

*p < 0.05 for CNO versus PEDO animals (n=10)

Table 2. Cytokines and adipokines plasmatic concentrations in offspring of control rats (CNO) and offspring of rats with periodontal disease (PEDO)

Parameters	CNO (mean $\pm$ SEM)	PEDO (mean $\pm$ SEM)
IL-6 (pg/ml)	13.29 $\pm$ 0.17	13.82 $\pm$ 0.14*
Resistin (ng/ml)	1.56 $\pm$ 0.09	2.77 $\pm$ 0.48*
Adiponectin (mg/ml)	1.67 $\pm$ 0.42	1.62 $\pm$ 0.41

*p < 0.05 for CNO versus PEDO animals (n=10)

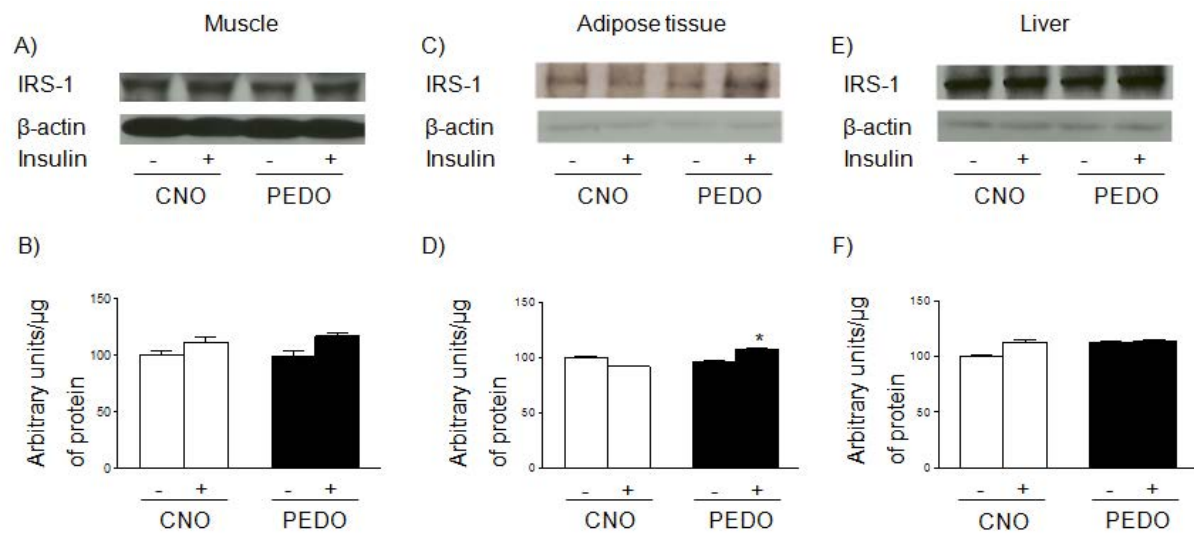


Figure 1 – Evaluation of IRS-1 serine phosphorylation status before (-) and after (+) insulin stimulus in gastrocnemius muscle (A,B), in periepididymal white adipose tissue (C,D) and in liver (E,F) of control (CNO) and periodontal disease (PEDO) rats. A, C and E show typical autoradiography, where similar quantities of protein (185 μg) were submitted to SDS-PAGE. β-actin was used as control. B, D and F show serine phosphorylation status values (expressed in arbitrary units) which are presented as means $\pm$ SEM, n=10. *p<0.05 for CNO (+) versus PEDO (+).