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

HELOISA MACEDO SAMPAIO

Avaliação da etapa inicial do sinal insulínico e do grau de fosforilação do NF-κB p50 em tecido adiposo de ratos adultos, proles de ratas com doença periodontal

Araçatuba – SP
2024

HELOISA MACEDO SAMPAIO

AVALIAÇÃO DA ETAPA INICIAL DO SINAL INSULÍNICO E DO GRAU DE FOSFORILAÇÃO DO NF-κB P50 EM TECIDO ADIPOSO DE RATOS ADULTOS, PROLES DE RATAS COM DOENÇA PERIODONTAL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia de Araçatuba, para obtenção do título de Cirurgiã-Dentista.

Orientadora: Prof. Dr. Dóris Hissako Matsushita

Araçatuba - SP
2024

Dedico este trabalho à Deus, em primeiro lugar, que até aqui me sustentou e abençoou minha trajetória.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de começar agradecendo a Deus por me capacitar, instruir e colocar pessoas incríveis em meu caminho durante a graduação. Agradeço aos meus pais, que são minha base sólida e sempre estiveram ao meu lado, apoiando e incentivando-me. Todo o meu esforço é dedicado a eles. À minha irmã, por me ajudar a lembrar da minha essência. À minha avó, por ser uma fonte inesgotável de amor e acolhimento. A todos os meus familiares, pois minha família é meu bem mais precioso.

Um agradecimento especial aos meus amigos Verô, Esté, Nay e Marcos, que se tornaram minha família em Araçatuba durante os sete anos de graduação e estiveram ao meu lado nos momentos mais importantes.

Sou extremamente grata à professora Dóris por me acolher e me dar a oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa. Seus ensinamentos científicos, profissionais e de vida foram essenciais para minha formação.

Agradeço aos colegas do laboratório de fisiologia — Sarinha, Bia e Carlão — com quem aprendi e me diverti muito. Um agradecimento especial à Sarinha por sua ajuda em todas as etapas da iniciação científica. Muito obrigada mesmo!

Aos colegas e dentistas que tive a honra de conhecer e acompanhar — Dr. Dan, Dra. Lara, Dra. Juliana, Letícia, Dra. Amanda, Giovana, Bia e Clarissa — meu sincero agradecimento.

Agradeço também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de pesquisa (proposta 2537) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido por meio do Processo nº 2022/08872-6.

"A persistência é o caminho do êxito."

Charles Chaplin

RESUMO

SAMPAIO, H. M. **Avaliação da etapa inicial do sinal insulínico e do grau de fosforilação do NF-κB p50 em tecido adiposo de ratos adultos, proles de ratas com doença periodontal**. 2024. Trabalho de Conclusão de Curso- Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2024.

A hipótese da programação fetal sugere que estímulos ou agressões durante a vida intrauterina podem resultar em alterações permanentes na fisiologia e metabolismo da descendência, aumentando o risco de doenças na vida adulta. Estudos demonstraram que a doença periodontal (DP) materna promove em sua prole: resistência insulínica, aumento da concentração plasmática de citocinas e alteração da via inflamatória no tecido muscular esquelético. Entretanto, avaliações dessas alterações em tecido adiposo branco (TAB) são escassas. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar em TAB de ratos, proles de ratas com doença periodontal: a) fosforilação da proteína NF-κB p50 e seu conteúdo total; b) o grau de fosforilação em tirosina da pp185 (IRS-1/IRS-2). As ratas foram distribuídas em dois grupos: a) com doença periodontal (DP), no qual esta doença foi induzida por meio de ligadura com fio de seda ao redor do 1º molar inferior de ambos os lados; b) ratas controle (CN). Após 7 dias da colocação da ligadura, as ratas de ambos os grupos foram colocadas para acasalamento, verificou-se diariamente, por esfregaço vaginal, o dia da copulação. As ratas prenhas foram separadas em caixas individuais. A massa corpórea da prole foi avaliada ao nascimento e durante os 75 dias de idade. Quando os filhotes machos destas ratas completaram 75 dias, avaliou-se em TAB periepididimal pela técnica WB: a) fosforilação da proteína NF-κB p50 e seu conteúdo total; b) o grau de fosforilação em tirosina da pp185 (IRS-1/IRS-2), antes e após o estímulo insulínico. Os resultados demonstraram que a doença periodontal materna promove em sua prole ao nascimento baixo peso e na vida adulta: 1) diminuição no grau de fosforilação em tirosina da pp185 em TAB; 2) não foi observado diferenças no grau de fosforilação da NF-κB p50 no TAB. Em decorrência destes resultados, podemos concluir que a DP materna promove alterações na fase inicial da sinalização da insulina no tecido adiposo branco de sua prole adulta. Estes resultados demonstram o impacto que a doença periodontal materna pode promover, em curto prazo, sobre a vida intrauterina da prole, levando a mesma a

predisposição a certas alterações na fase adulta. Isso reforça a importância da manutenção da saúde bucal materna sobre a saúde geral da prole na vida adulta.

Palavras-chave: doença periodontal; programação fetal; resistência insulínica; inflamação.

ABSTRACT

SAMPAIO, H. M. **Evaluation of the initial stage of the insulin signal and the degree of phosphorylation of NF-κB p50 in adipose tissue of adult rats, offspring of rats with periodontal disease.** 2024. Trabalho de Conclusão de Curso- Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2024.

The fetal programming hypothesis suggests that stimuli or insults during intrauterine life can result in permanent alterations in the physiology and metabolism of offspring, increasing the risk of diseases in adulthood. Studies have shown that maternal periodontal disease (PD) promotes in its offspring: insulin resistance, increased plasma cytokine concentrations, and alterations in the inflammatory pathway in skeletal muscle tissue. However, evaluations of these changes in white adipose tissue (WAT) are scarce. Therefore, the objective of the present study was to assess in WAT of rats, offspring of rats with periodontal disease: a) phosphorylation of NF-κB p50 protein and its total content; b) the degree of tyrosine phosphorylation of pp185 (IRS-1/IRS-2). The rats were divided into two groups: a) with periodontal disease (PD), in which the disease was induced by ligature with silk thread around the 1st lower molar on both sides; b) control rats (CN). After 7 days of ligature placement, the rats from both groups were placed for mating, and the day of copulation was verified daily by vaginal smear. The pregnant rats were separated into individual cages. The body mass of the offspring was evaluated at birth and during the 75 days of age. When the male offspring of these rats reached 75 days, WAT periepididymal was assessed by WB technique: a) phosphorylation of NF-κB p50 protein and its total content; b) the degree of tyrosine phosphorylation of pp185 (IRS-1/IRS-2), before and after insulin stimulation. The results showed that maternal periodontal disease promotes low birth weight in its offspring and, in adulthood: 1) decreased tyrosine phosphorylation of pp185 in WAT; 2) no differences were observed in the phosphorylation level of NF-κB p50 in WAT. Consequently, we can conclude that maternal PD induces changes in the early phase of insulin signaling in the white adipose tissue of its adult offspring. These results demonstrate the impact that maternal periodontal disease can have in the short term on the intrauterine life of the offspring, leading to predisposition to certain alterations in adulthood. This reinforces

the importance of maintaining maternal oral health for the overall health of the offspring in adulthood.

Keywords: periodontal disease; fetal programming; insulin resistance; inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Massa corpórea ao nascimento de ratos, proles de ratas controle (PCN) e proles de ratas com doença periodontal (PDP). 20

Figura 2- Ingestão alimentar (média) de ratos, proles de ratas controle (PCN) e proles de ratas com doença periodontal (PDP) do desmame até o final do experimento. 20

Figura 3- Avaliação do grau de fosforilação em tirosina da pp185 antes (-) e após (+) o estímulo insulínico em tecido adiposo periepididimal de ratos adultos proles de ratas controle (PCN) e de ratas com doença periodontal (PDP). 21

Figura 4- Avaliação do grau de fosforilação de NF-κB p50 no tecido adiposo periepididimal de ratos adultos, proles de ratas controle (PCN) e de ratas com doença periodontal (PDP). 22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	Proteína quinase B
BPN	Baixo peso ao nascimento
DM	Diabetes mellitus
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DP	Doença periodontal
GLUT4	Transportador de glicose tipo 4
IL-1β	Interleucina-1 beta
IL6	Interleucina- 6
IRS-1	Substrato do receptor de insulina 1
IRS-2	Substrato do receptor de insulina 2
JNK	Quinase c-Jun N-terminal
NF-κB	Fator nuclear kappa B
PDK	Proteína quinase- 1 dependente de fosfoinositídeo
PCN	Proles controle
PDP	Proles com doença periodontal
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PKB	Proteína quinase b
PTB	Parto prematuro
RAGE	Receptor do produto final de glicação avançada
SH2	Domínios com homologia a src 2
TAB	Tecido adiposo branco
TLR	Receptor toll-like
TNFA	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1. **INTRODUÇÃO** 13
2. **OBJETIVOS** 16
3. **MATERIAIS E MÉTODOS** 17
   3.1 **Animais** 17
   3.2 "**Western-blotting"** 17
   3.3 **Análise Estatística** 19
4. **RESULTADOS** 20
   4.1 **Avaliação da massa corpórea (g) e ingestão alimentar (g)** 20
   4.2 **Avaliação da fosforilação em tirosina da pp185 (IRS1/IRS2) em tecido adiposo** 21
   4.3 **Avaliação das vias inflamatórias** 21
5. **DISCUSSÃO** 23
6. **CONCLUSÃO** 26
   REFERÊNCIAS 27

1 INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica causada por uma deficiência do pâncreas na produção de insulina ou por incapacidade da insulina exercer adequadamente suas funções (OPAS 2003). No diabetes mellitus tipo 2 (DM2), o pâncreas é capaz de produzir insulina, porém o corpo é incapaz de responder adequadamente aos seus efeitos, provocando um acúmulo de glicose no sangue (hiperglicemia) e com a progressão da doença pode ocorrer diminuição na secreção de insulina. Ocorre com maior frequência nos adultos e idosos, mas, recentemente, tem sido observado um aumento da doença em crianças e adolescentes.

O ambiente fetal tem sido apontado como possível fator causal de DM2, uma vez que há um fenômeno conhecido como "*programming",* que sugere que um estímulo ou agressão durante um período crítico da vida intrauterina resulta em alterações na fisiologia e metabolismo também durante a vida adulta (LUO et al. 2010). Estudos realizados em animais evidenciaram que complicações intrauterinas podem danificar o funcionamento das células β (GREEN et al. 2010), levando ao desenvolvimento de diabetes tipo 2 na vida adulta.

Nas últimas décadas, tem sido verificado que processos inflamatórios e patógenos bucais, principalmente os provenientes de doenças periodontais, influenciam no início e/ou progressão de várias etapas de doenças sistêmicas (LUNARDELLI et al. 2005). A doença periodontal (DP) é uma infecção crônica que acomete os tecidos de suporte (gengiva) e sustentação (cemento, ligamento e osso) dos dentes. Embora existam inúmeras classificações, a DP pode ser classificada em dois grandes grupos: gengivite e periodontite. Na gengivite, apenas o tecido de suporte está alterado. Na periodontite, além dos tecidos de suporte, os tecidos de sustentação são alterados (LOURO et al. 2001). A etiologia da periodontite sugere que a infecção bacteriana seja a causa primária da doença (FLEMMING, 1999), enquanto que sua patologia é o resultado da interação entre patógenos e hospedeiros (ÜSTÜN et al. 2013). Esta interação promove a ativação dos monócitos pelos linfócitos T que iniciam a produção de grandes quantidades de mediadores inflamatórios, tais como TNF-α e IL-1β (HERNANDEZ et al. 2011). E citocinas, como por exemplo, o TNF-a, têm sido relacionadas com a redução da expressão de GLUT4 e resistência à insulina. O transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) é um dos

14 membros da família de GLUTs. Cada um destes transportadores apresenta uma afinidade distinta e especificidade para hexoses particulares, assim como a distribuição do tecido original, localização subcelular e função fisiológica (LETO e SALTIEL, 2012).

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

Ademais, foi demonstrado que a região promotora do gene Slc2a4 (que codifica o transportador de glicose GLUT4) apresenta sequências às quais tanto a subunidade p50 como a p65 do NF-kB são capazes de se ligarem e agirem como repressor direto da atividade transcricional do Slc2a4, ocasionando a diminuição da expressão de GLUT4. (FURUYA et al., 2013; SILVA, 2013).

Além disso, estudos anteriores demonstraram que a atividade do receptor de insulina interfere na homeostase glicídica. O receptor, uma vez fosforilado em decorrência de sua ativação por insulina, passa a fosforilar substratos citoplasmáticos, como, por exemplo, a pp185. Este foi o primeiro substrato do receptor de insulina estudado, com peso molecular de aproximadamente 185 kDa (WHITE et al., 1985). Sun et al.(1991) observaram que em células transfectadas com o receptor de insulina humano há um expressivo aumento da fosforilação da pp185, coincidindo com aumento da ação insulínica.

Em 1991, Sun et al. clonaram a pp185 e denominaram-na de substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) e, após três anos, demonstrou-se que outra proteína também migrava na altura da banda desta proteína, que foi denominada de substrato 2 do receptor de insulina (IRS-2)(ARAKI et al., 1994; TAMEMOTO et al., 1994; SUNet al., 1995). 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 (PI3-k). Alessi et al.(1997) demonstraram que esta proteína ativada pode induzir a ativação de outras proteínas

como a proteína quinase- 1 dependente de fosfoinositídeo (PDK1) e esta pode fosforilar e ativar a Akt (ou proteína quinase B – PKB).

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

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

Tais achados evidenciaram a necessidade de realizar mais estudos para verificar se, no tecido adiposo, há alterações no grau de fosforilação em tirosina da pp185 (IRS-1/IRS-2) e do NF-κB p50, em tecido adiposo branco periepididimal (TAB) na prole adulta de ratas com DP.

2 OBJETIVOS

Avaliar em TAB de ratos adultos, proles de ratas com doença periodontal:

1) o grau de fosforilação em tirosina da pp185 (IRS-1/IRS-2);

2) grau de fosforilação do NF-κB p50.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizadas 4 ratas (2 meses de idade com 200g) e 2 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 + 2º C. Dividimos as ratas em dois grupos: 1) com doença periodontal (DP), no qual esta doença foi induzida por meio de ligadura com fio de seda ao redor do 1º molar inferior; 2) ratas controle (CN). Após a colocação da ligadura avaliou-se, três vezes por semana, a ingestão de ração e o peso corporal das ratas de ambos os grupos. Após 7 dias da colocação da ligadura, as ratas de ambos os grupos foram colocadas para acasalamento, verificou-se diariamente, por esfregaço vaginal, o dia da copulação. As ratas prenhas foram separadas em caixas individuais. Quando os filhotes (n=6) machos DP e CN destas ratas completarem 75 dias, realizou-se os experimentos. Os ratos proles controle (PCN) e proles DP (PDP) foram submetidos a jejum de 14 horas antes dos procedimentos experimentais. A anestesia dos animais foi feita com tiopental sódico (Thiopentax® - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, Brasil, 3%, 5mg/ 100g p.c., i.p.), e, sob anestesia, coletou-se as amostras de tecido adiposo periepididimal.

3.2 “Western blotting”:

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

A primeira etapa do Western blotting foi a submissão das amostras à corrida eletroforética em gel de poliacrilamida. Através deste método, é possível separar proteínas de acordo com seu peso molecular, sem que as unidades protéicas sejam perdidas, permitindo estudos posteriores nessas frações protéicas. Utilizou-se o método desenvolvido por Laemmli e modificado por GARFIN (1990), o qual envolve um sistema descontínuo de dois géis contíguos, mas diferentes: o gel de “stacking” (3,39% T, 2,7% C – acrilamida 3,3%; bisacrilamida 0,09%; Tris 25mM, pH 8,9; EDTA 2,0mM; 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 388mM, pH=6,7; EDTA 2,1mM; SDS 0,1%; TEMED 0.115%; persulfato de amônio 0,17%; glicerol 10%). Na montagem, o gel de resolução fica sob o gel de “stacking”, com

orientação vertical, num sistema de câmaras que mantém as porções superiores e inferiores do gel em contato com um tampão de corrida (Tris 50mM; glicina 375mM; SDS 0,1%; EDTA 1,8mM).

[No gel de “stacking” foram aplicadas as amostras solubilizadas em tampão de Laemmli. Imediatamente antes da aplicação, as amostras são fervidas por 4 min. A eletroforese realizou-se em equipamento para mini gel da BioRad (Mini-Protean, BioRadLaboratories, Richmond, CA), e iniciou com a corrida no gel de “stacking” sob voltagem constante em 30 V até que acontecesse o empacotamento da amostra, o que pode ser observado na transição dos géis. Posteriormente aplicou-se voltagem constante de 100 V para a corrida no gel de resolução, durante 2 horas.

Juntamente com as amostras, colocou-se um padrão de proteínas de conhecidos pesos moleculares (marcadores).

- **Tranferência eletroforética**

Após a separação das frações protéicas no gel de poliacrilamida, realizou-se a transferência eletroforética dessas frações para uma membrana de nitrocelulose Hybond-C Super (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England).

A transferência ocorreu sob voltagem constante de 100 V, durante 2h, a 4ºC, utilizando-se o tampão de transferência (Tris 25mM, glicina 192mM, metanol 20%, SDS 0,02%).

- “**Immunoblotting”:**

Após a transferência eletroforética, iniciou-se o processo de imunodetecção de proteínas específicas (KRUGER & HAMMOND, 1988). As membranas de nitrocelulose foram, primeiramente, incubadas 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, lavadas com solução basal por três sessões de 10 min. Em seguida, as membranas foram incubadas em solução (SB + 3% de leite desnatado) contendo o anticorpos: tirosina da pp185 (IRS-1/IRS-2) e anti p-NF-κB p50 e anti NF-κB p50 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, USA). Posteriomente, realizou-se três lavagens com solução basal, e a membrana foi incubada durante 1h com segundo anticorpo contendo peroxidase de “horseradish” (“kit’ de

quimioluminescência -ECL- AmershamPharmacia Biotech, Buckinghamshire, England). Novamente, realizou-se 3 lavagens da membrana de nitrocelulose com solução basal, com duração de 10 min cada lavagem. Adicionou-se 1 ml de cada solução de detecção 1 e 2 (do kit de ECL), e foi incubado por 1 minuto. Por fim, drenou-se o excesso de reagente e as membranas de nitrocelulose foram expostas a filme de RX (Hyperfilm ECL– AmershamBiosciences, Buckinghamshire, England), 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 um programa da Media Cybernetics – GEL-PRO ANALYSER - Hartland, USA.

3.3 Análise Estatística

Todos os valores foram apresentados como média ± EPM. A análise estatística foi a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, e as diferenças entre os grupos são consideradas significantes quando $p<0,05$.

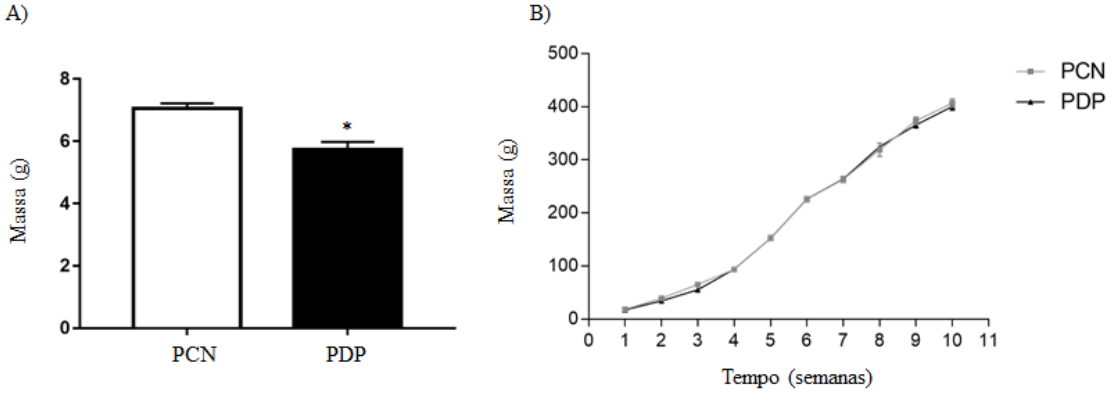
4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da massa corpórea (g) e ingestão alimentar (g)

Os resultados da massa corpórea dos grupos proles de ratas controle (PCN) e proles de ratas com doença periodontal (PDP) foram avaliados semanalmente, desde o nascimento (Figura 1A) e do desmame até o final do experimento (Figura 1B). Houve diferença estatística na massa corpórea ao nascimento (Figura 1A), porém não houve diferença nestes parâmetros entre os grupos até os 75 dias (Figura 1B).

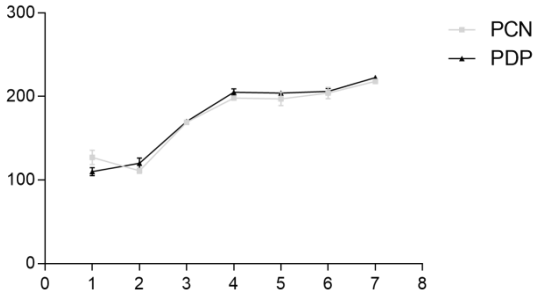
A Figura 2 mostra a ingestão alimentar de PCN e PDP do desmame até o final do experimento. Não houve diferença significativa entre os grupos na ingestão alimentar durante este período.

Figura 1 – Massa corpórea ao nascimento de ratos, proles de ratas controle (PCN) e proles de ratas com doença periodontal (PDP). Os valores são expressos como média ± EPM, n = 6. * p<0,05 PDP vs. PCN



Elaborado pelo autor, 2024.

Figura 2 - Ingestão alimentar (média) de ratos, proles de ratas controle (PCN) e proles de ratas com doença periodontal (PDP) do desmame até o final do experimento. Valores expressos como média ± EPM, n=6.



Elaborado pelo autor, 2024.

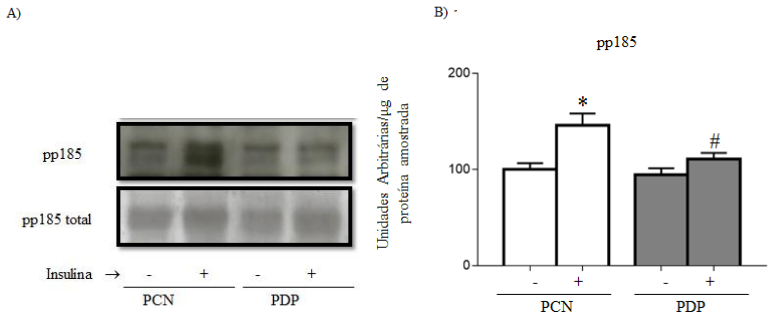
4.2 Avaliação da fosforilação em tirosina da pp185 (IRS1/ IRS2) em tecido adiposo

A Figura 3A mostra autorradiografia típica referente ao grau de fosforilação em tirosina da pp185 (IRS1/ IRS2), antes (“-”, estado basal) e após o estímulo insulínico (“+”, estado estimulado), em tecido adiposo de ratos adultos, proles de ratas com doença periodontal. A Figura 3B mostra os resultados, expressos em unidades arbitrárias por µg de proteína amostrada.

Na avaliação intragrupos, observou-se um aumento no grau de fosforilação em tirosina no estado estimulado “+” em relação ao resultado basal “-” no grupo PCN. Entretanto, no grupo PDP, não se verificou diferença entre estado estimulado “+” e estado basal “-”.

Comparando-se os dois grupos, observou-se uma diminuição significativa ($p<0,05$) no grau de fosforilação em tirosina da pp185 (IRS1/IRS2) no grupo PDP em relação ao grupo PCN, após estímulo insulínico, em tecido adiposo.

Figura 3 - Avaliação do grau de fosforilação em tirosina da pp185 antes (-) e após (+) o estímulo insulínico em tecido adiposo periepididimal de ratos adultos proles de ratas controle (PCN) e de ratas com doença periodontal (PDP). Em **A** autorradiografia típica: quantidades iguais de proteína foram submetidas a SDS-PAGE (185 µg). βactina foi utilizada como controle. Em **B**, valores do grau de fosforilação em tirosina da pp185, expressos em unidades arbitrárias, são apresentados como média ± EPM, n=6. * $p <0.05$ insulina (-) vs. insulina (+); # $p <0.05$ PCN (+) vs. PDP (+).



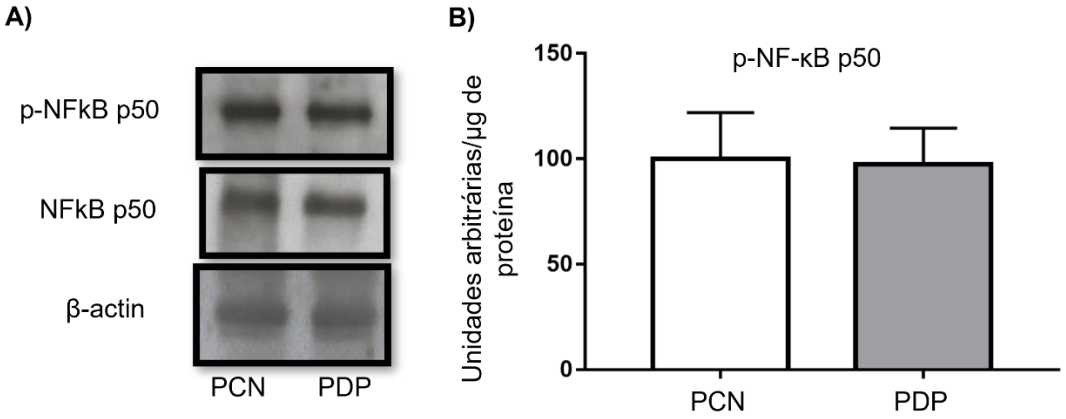
Elaborado pelo autor, 2024.

4.3 Avaliação das vias inflamatórias

As Figuras 4A mostram autorradiografias típicas referente ao conteúdo e/ou ao grau de fosforilação de NF-κB p50, em tecido adiposo dos grupos PCN e PDP. A Figura 4B mostra os resultados, expressos em unidades arbitrárias por µg de proteína amostrada. Não foi observado diferenças no grau de fosforilação da NF-κB p50 entre os grupos em TAB (Figura 4A e B).

Figura 4 - Avaliação do grau de fosforilação de NF-κB p50 no tecido adiposo periepididimal de ratos adultos, proles de ratas controle (PCN) e de ratas com

doença periodontal (PDP). (A) Autorradiografias típicas: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185 µg). Grau de fosforilação de NF-κB p50 (expresso em unidades arbitrárias) são apresentadas como a média ± EPM, n = 6. * p<0,05 PDP vs. PCN



Elaborado pelo autor, 2024.

5 DISCUSSÃO

A DP materna promoveu em sua prole baixo peso ao nascimento e na sua vida adulta, em TAB: a) diminuição no grau de fosforilação em tirosina da pp185 (IRS1/IRS2); b) inalteração no grau de fosforilação de NF-κB p50 em relação ao grupo PCN.

A DP é ocasionada por bactérias gram-negativas que agem na circulação sanguínea levando à produção de PGE2 e TNF-α que podem representar uma ameaça potencial à unidade fetal-placentária (OFFENBACHER et al., 1996) e podem promover parto prematuro (PTB) e BPN (GANDHIMADHI; MYTHILI, 2010).

No presente estudo, observou-se que DP materna promoveu BPN (Figura 1A). Estes resultados estão de acordo com estudos que evidenciaram que DP maternal promove BPN (MANNEM; CHAVA, 2011; GUIMARÃES et al. 2012; MATTERA et al. 2016; MATTERA et al. 2019).

Segundo Offenbacher et al. (2005), a infecção por *Campylobacterrectus* (uma bactéria presente na periodontite) em ratos induz uma redução no tamanho do labirinto placentário. E modificações na estrutura do labirinto placentário podem promover um suprimento insuficiente para o feto e, portanto, um crescimento prejudicado e BPN (MADIANOS et al., 2013). Ademais, infecções subcutâneas localizadas por *Porphyromonasgingivalis* (um patógeno periodontal) em hamsters podem reduzir o peso fetal em até 25% (COLLINS et al., 1994).

Estudos epidemiológicos relatam uma relação entre BPN e alta predisposição à hipertensão arterial, dislipidemia e diabetes na idade adulta. Esta relação pode ser explicada pelo mecanismo conhecido como programação fetal pela qual estímulos ambientais no útero que afetam o crescimento fetal e a saúde, não só durante a gestação, mas também durante a vida adulta (BARKER, 1995). Esta programação fetal, induzida pela DP materna foi comprovada pelos estudos de Shirakashi et al. (2013), Mattera et al. (2016) e Mattera et al. (2019).

Como observado acima, o grupo PDP apresentou BPN, no entanto, a partir da primeira semana de vida, os grupos não apresentaram diferença significativa no peso corpóreo (Figura 1B). A hipótese conhecida como *catch-up grown* sugere que crianças submetidas a um período transiente de inibição de crescimento acelera o

mesmo, atingindo peso e/ou altura semelhante ao de crianças com peso e altura normais ao nascer (BOERSMA; WIT, 1997). Além disso, a *catch-up grown* está associada ao aumento da suscetibilidade à obesidade e DM2 (ONG et al., 2004; JIMENEZ-CHILLARON et al., 2006).

A capacidade de manter níveis normais de glicose no sangue envolve uma interação complexa entre a secreção de insulina pelas células β do pâncreas e capacidade de resposta à insulina metabólica no músculo esquelético, fígado e tecido adiposo (WEI *et al.*, 2008).

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

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

Em suma, podemos afirmar que alterações na etapa final da sinalização insulínica encontrada no grupo PDP, em estudos anteriores, podem ter sido decorrentes do aumento do TNF-α plasmático (Mattera et al 2016), uma vez que esta citocina inibe a ação da insulina. Entretanto, no tecido adiposo, não foi encontrado diferenças na expressão de NF-κB p50 entre os grupos (Figura 4).

Os resultados demonstram o impacto que a doença periodontal materna pode promover, em curto prazo, sobre a vida intrauterina da prole, levando a mesma a predisposição a certas alterações na fase adulta. Isso reforça a importância da manutenção da saúde bucal materna sobre a saúde geral da prole na vida adulta.

6 CONCLUSÃO

Este estudo demonstra que a DP materna está associada a BPN e redução no grau de fosforilação em tirosina da pp185 (IRS1/IRS2) na vida adulta. Esses resultados ressaltam a importância da saúde bucal materna, evidenciando que a manutenção adequada da saúde periodontal durante a gestação é crucial para prevenir complicações no desenvolvimento fetal e na saúde geral dessa prole.

REFERÊNCIAS

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

2. ARAKI, E. et al. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. Nature, v. 372, n. 6502, p. 186-90, Nov 1994. ISSN 0028-0836.

3. BARKER DJP. Fetal origins ofcoronary heart disease. British Medical Journal (BMJ), Vol. 311, 1995.

4. BOERSMA, B.; WIT, J. M. Catch-up growth. Endocr. Ver., v. 18, n. 5, p. 646-61, Oct. 1997.

5. CARVALHO, E; KOTANI, K; PERONI, OD; KAHN, BB. Adipose-specific overexpression of GLUT4 reverses insulin resistance and diabetes in mice lacking GLUT4 selectively in muscle. Am J PhysiolEndocrinolMetab, Vol. 289, p. E551–E561, 2005.

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

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

8. FLEMMING TF. Periodontitis. Ann Periodontol, Vol.4, No. 1, 1999.

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

10. GREEN, AS; ROZANCE, PJ; LIMESAND, SW. Consequences of a compromised intrauterine environment on islet function. J. Endocrinol, Vol. 206, No. 3, p. 335, 2010.

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

12. HERNANDEZ, MN. DUTZAN, J. GARCIA-SESNICH, L. ABUSLEME, A. DEZEREGA, N. SILVA, FE GONZALEZ, R. VERNAL, T. SORSA, J. GAMONAL. Host-pathogen interactions in progressive chronic periodontitis. Journal of Dental Research,Vol. 90, p. 1164–70, 2011

13. 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.,Vol.95, p. 2409 – 2415, 1995.

14. HOTAMISLIGIL, GS; SHARGILL, NS; SPIEGELMAN, BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. Science, Vol. 259, p. 87– 91,1993.

15. JIMENEZ-CHILLARON, J. C. et al. Reductions in caloric intake and early postnatal growth prevent glucose intolerance and obesity associated with low birthweight. Diabetologia, v. 49, n. 8, p. 1974-84, Aug. 2006.

16. KATZ, E. B. et al. The metabolic consequences of altered glucose transporter expression in transgenic mice. J Mol Med (Berl), v. 74, n. 11, p. 639-52, Nov 1996. ISSN 0946-2716.

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

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

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

20. LEHNEN, AM; LEGUISAMO, NM; PINTO, GH; MARKOSKI, MM; ANGELIS, K; MACHADO, UF; SCHAAN, B. The beneficial effects of exercise in rodents are preserved after detraining: a phenomenon unrelated to GLUT4 expression.CardiovascDiabetol, Vol 9 , No. 1 , 2010.

21. LEGUISAMO, NM; LEHNEN, AM; MACHADO, UF; OKAMOTO, MM; MARKOSKI, MM; PINTO, GH; SCHAAN, BD. GLUT4 content decreases along with insulin resistance and high levels of inflammatory markers in rats with metabolic syndrome. CardiovascDiabetol, Vol. 11, No. 100, 2012.

22. LETO, D.; SALTIEL, A. R. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. Nat Rev Mol Cell Biol, v. 13, n. 6, p. 383-96, Jun 2012. ISSN 1471-0080.

23. LOURO, PM; FIORI, HH; LOURO, FILHO, P; STEIBEL, J; FIORI, RM. Doença periodontal na gravidez e baixo peso ao nascer. J. Pediatr. (Rio J), Vol. 77, No. 1, p. 23-8, 2001.

24. LUNARDELLI, AN; PERES, MA. Is there association between periodontal disease, prematurity and low birth weight? A population-based study. J. Clin. Periodontol.,Vol. 32, p. 938-946, 2005.

25. LUO, ZC; XIAO, L; NUYT, AM. Mechanisms of developmental programming of the metabolic syndrome and related disorders. World J Diabetes,Vol.1, No. 3, p. 89-98, 2010.

26. MADIANOS P.N.; BOBETSIS Y.A.; OFFENBACHER S. Adverse pregnancy outcomes (APOs) and periodontal disease: pathogenic mechanisms. J. Clin. Periodontol.,v. 40, p. S170-80, Apr. 2013.

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

28. MATTERA M.S.L.C. et al. Effect of maternal periodontitis on GLUT4 and inflammatory pathway in adult offspring. J Periodontol. 2019 Feb 6.

29. MATTERA M. S. et al. Maternal periodontitis decreases plasma membrane GLUT4 content in skeletal muscle of adult offspring. Life Sci. 2016 Mar 1;148:194-200.

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

31. ONG, K. K. et al. Insulin sensitivity and secretion in normal children related to size at birth, postnatal growth, and plasma insulin-like growth factor-I levels. Diabetologia, v. 47, n. 6, p. 1064-70, Jun. 2004.

32. Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde: Doenças crônico-degenerativas e obesidade: estratégia mundial sobre alimentação saudável, atividade física e saúde: Brasília, 2003.

33. SHIRAKASHI DJ. Avaliação da via inibitória do sinal insulínico em ratos adultos, proles de ratas com doença periodontal. Araçatuba: Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista; 2012.

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

35. SILVA JL, GIANNOCCO G, FURUYA DT, et al. NF-kappaB, MEF2A, MEF2D and HIF1-a involvement on insulin- and contraction-induced regulation of GLUT4 gene expression in soleus muscle. Mol Cell Endocrinol 2005;240:82-93.

36. SUN, X. J. et al. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. Nature, v. 377, n. 6545, p. 173-7, Sep 1995. ISSN 0028-0836.

37. TAMEMOTO, H. et al. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. Nature, v. 372, n. 6502, p. 182-6, Nov 1994. ISSN 0028-0836.

38. TORRES-LEAL, F. L. et al. The role of inflamed adipose tissue in the insulin resistance. Cell Biochem. Funct., v. 28, n. 8, p. 623-631, Dec. 2010.

39. ÜSTÜN, K; SEZER, U; KISACIK, B; ŞENYURT, SZ; ÖZDEMIR, EÇ; KIMYON, G; PEHLIVAN, Y; ERCIYAS, K; ONAT, AM. Periodontal Disease in Patients with Psoriatic Arthritis. Inflammation, 2013.

40. WEI, Y. et al. Skeletal muscle insulin resistance: role of inflammatory cytokines and reactive oxygen species. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., v. 294, n. 3, p. R673-R680, Mar. 2008.

41. WHITE, M. F.; TAKAYAMA, S.; KAHN, C. R. Differences in the sites of phosphorylation of the insulin receptor in vivo and in vitro. J Biol Chem, v. 260, n. 16, p. 9470-8, Aug 1985. ISSN 0021-9258.