

**MARIA SARA DE LIMA COUTINHO MATTERA**

**AVALIAÇÃO DO MECANISMO EPIGENÉTICO POR  
METILAÇÃO DO DNA E DA EXPRESSÃO DE GLUT4 EM  
TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO DE RATOS ADULTOS,  
PROLES DE RATAS COM DOENÇA PERIODONTAL**

**MARIA SARA DE LIMA COUTINHO MATTERA**

**AVALIAÇÃO DO MECANISMO EPIGENÉTICO POR  
METILAÇÃO DO DNA E DA EXPRESSÃO DE GLUT4 EM  
TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO DE RATOS ADULTOS,  
PROLES DE RATAS COM DOENÇA PERIODONTAL**

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

Orientadora: Profa. Titular Doris Hissako  
Matsushita.

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

M435a      Mattera, Maria Sara de Lima Coutinho.  
Avaliação do mecanismo epigenético por metilação do DNA e da expressão de GLUT4 em tecido muscular esquelético de ratos adultos, proles de ratas com doença periodontal / Maria Sara de Lima Coutinho Mattera. – Araçatuba, 2019  
84 f. : il. ; tab.

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

1. Doenças periodontais 2. Resistência à insulina 3. Transportador de glucose tipo 4 4. Inflamação 5. Diabetes mellitus tipo 2 6. Epigenômica I. T.

CDD 612

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

## **DADOS CURRICULARES**

**Nascimento:** 08.04.1991, Bilac-SP.

**Filiação:** Maria Alice de Lima Coutinho  
Luiz Carlos Coutinho

**2009/2013:** Curso de Graduação em Farmácia e Bioquímica pela Universidade Paulista – UNIP.

**2013/2015:** 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.

**2018:** Doutorado Sanduíche no Exterior no Departamento de Genética Humana na Universidade de Utah – EUA.

**2015/2019:** Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Fisiológicas, nível de Doutorado, pela Faculdade de Odontologia do *Campus* de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

## **Dedico este trabalho**

Ao meu marido, amor, amigo e companheiro de todas as horas, Rafael Wilian Mattera, que sempre me incentivou e me apoiou incondicionalmente.

Aos meus pais Maria Alice e Luiz Carlos pelo carinho, paciência, amor e por serem a minha fortaleza, pois devo a eles minha formação pessoal e profissional. Sou eternamente grata aos senhores.

A toda minha família, aos grandes amigos e à Maru, que sempre estiveram presentes em toda a jornada.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar presente em toda a minha vida e nunca me desamparar.

À minha orientadora, Doris Hissako Matsushita, pela confiança em mim depositada e pelos ensinamentos transmitidos ao longo destes quatro anos de doutorado, dois anos de mestrado e mais três anos de iniciação científica. Anos que foram primordiais para meu crescimento não só científico como pessoal. Minha gratidão e admiração a esta amiga e mãe científica será eterna.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” e ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, pela oportunidade de realizar o Curso de Mestrado em Ciências Fisiológicas.

Ao Prof. Titular Renato Herman Sundfeld que possibilitou a realização da minha iniciação científica com a Profa. Doris.

À coordenadora do Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Profa. Adj. Cristina Antoniali da Silva.

À diretora e ao vice-diretor da Faculdade de Odontologia do *Campus* de Araçatuba – UNESP, Prof. Titular Wilson Roberto Poi e Prof. Titular João Eduardo Gomes Filho.

A todos os amigos e colegas de laboratório, em especial ao Fernando Yamamoto Chiba, Renato Felipe Pereira, Thaís Verônica Saori Tsosura, Fernando Marani, Rodrigo Martins dos Santos, Bruna Soares Tavares, Bianca Elvira Belardi, Renan Akira, Andressa Caroline Hernandes Magalhães, Ângelo César Fernandes Jacomossi, Juliano Jefferson da Silva e Bruno Simão Bernadi. Estendo também estes agradecimentos aos colegas que um dia participaram deste grupo de pesquisa: Natália Francisco Scaramele, Jhenifer Haiane, Mariana Caioá, Beatriz Costa, Max Sander de Oliveira da Mota, Daisy Jaqueline Shirakashi, Natália Helena Colombo, Patrícia Juvêncio Dias, Alana Carvalho, Rafael Dias Astolphi, Aline Pedro de Melo Yamamoto, Jéssica Cristiane Bonilha, Rita de Cássia Alves Nunes, Mariana Lopes Benites, Nayara Rodrigues Alves, Natália Vieira Magalhães, Kelly Cristina dos Santos, Amanda Gomes, Amanda Oliveira, Lara Mariano Pinheiro, Leonardo Raniel Figueiredo e Mariane Dias Curbete, pelo companheirismo.

A todos os professores e alunos do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas pelo agradável e pacífico convívio ao longo deste tempo.

Ao Prof. Edilson Ervolino e à Profa. Leda Maria Pescinini Salzedas, pelo apoio e pelos ensinamentos.

À Profa. Flavia Lombardi Lopes, ao Prof. Joel Claudio Heimann, à Dra. Maria Angelica Peres e à Profa. Sandra Helena Penha de Oliveira por permitirem o acesso aos seus laboratórios, pelo auxílio de alguns experimentos e pelos ensinamentos.

À Profa. Lila Oyama pela disponibilidade de nos emprestar alguns anticorpos necessários para publicação do artigo.

Agradecimento especial a equipe do laboratório da Dra. Sihem Boudina, Dra. Karla Pires, Prof. John David Symons e Dr. Scott Summers, pelos ensinamentos durante o meu estágio de doutorado na Universidade de Utah.

Aos amigos que obtive durante o meu estágio de doutorado na Universidade de Utah, Aaron Wallace, Amber Carr Wallace, Carmen Wallace, Carolina Ferreira Santos, Maroua Ferhat Haroun, Rafael Belo Durtschi, Alicia Youlton, Hiroaki Eshima, Jaemin Cho, Seul-Ki e muitos outros pela boa convivência durante o meu estágio de doutorado na Universidade de Utah.

Aos funcionários da Biblioteca, Claudio Hideo Matsumoto, Ana Claudia Martins Grieger Manzatti, 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 Técnica de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão (STAEPE), Samuel Aparecido Patim, Maurício Hiromi Tutumi, Patrick Santos Nogueira da Silva e Reinaldo Inácio Mendes.

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

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

Às funcionárias Eliseide Maria Ferreira Silva Navega e Meire Cristiane Gonçalves Dornellas, pela imprescindível ajuda.

Ao meu irmão Levi Danilo Coutinho e a minha cunhada Jéssica Castilho, por estarem presentes nas minhas conquistas.

Aos meus avós José Arlindo de Lima, Alice de Lima, Lauresto Coutinho (*in memoriam*) e Maria Coutinho (*in memoriam*) pelos conselhos que só a experiência pode dar.

Ao meu amigo Matusalém Filho e sua família pelo apoio, conselhos e amizade durante toda a minha vida.

A família Mattera, Rosameire Mattera, José Carlos Mattera e Rodrigo Mattera, Alécio Mattera e Luzia Mattera que me acolheram de uma forma especial.

A todos, que me ajudaram direta ou indiretamente para conclusão do doutorado, meu muito obrigada pela indispensável ajuda na execução de cada uma das etapas deste trabalho e por amenizarem a aspereza do caminho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro (Bolsa BEPE – Processo 2017/13817-6; Bolsa Doutorado – Processo 2015/12018-7).

Não deixará vacilar o teu pé: aquele que te guarda não tosquenejará.

Salmos 121:3

MATTERA, M.S.L.C. **AVALIAÇÃO DO MECANISMO EPIGENÉTICO POR METILAÇÃO DO DNA E DA EXPRESSÃO DE GLUT4 EM TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO DE RATOS ADULTOS, PROLES DE RATAS COM DOENÇA PERIODONTAL.** 2019. 84f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

## RESUMO

Atualmente, está bem estabelecido que o ambiente fetal está ligado à saúde materna, e estímulos ou agressões anormais durante a vida intra-uterina podem resultar em mudanças na fisiologia e metabolismo da prole, aumentando o risco de doenças na vida adulta. Tal fenômeno é conhecido como programação fetal. Alterações na metilação do DNA e expressão gênica são consideradas mecanismos moleculares responsáveis por esta programação. Estudos anteriores demonstraram que a doença periodontal (DP) materna promove resistência insulínica, aumento nas concentrações plasmáticas de citocinas, redução do conteúdo de GLUT4 e do seu índice de translocação para membrana plasmática em sua prole adulta. E citocinas, como por exemplo, o TNF- $\alpha$ , têm sido relacionadas com a redução da expressão de GLUT4 por meio da ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B). Além disso, esta citocina pode estimular algumas serinas quinases, incluindo I $\kappa$ B quinase (IKK), c-Jun amino-terminal kinase (JNK) e quinases reguladas por sinais extracelulares (ERKs) que estão envolvidas na resistência insulínica. Tais achados evidenciam a necessidade de realizar mais estudos para verificar os mecanismos envolvidos nestas alterações. Portanto, os objetivos do presente estudo foram avaliar em ratos adultos, proles de ratas com DP: 1) massa corpórea ao longo de 75 dias de idade; 2) glicemia e insulinemia; 3) expressão do RNAm da proteína transportadora de glicose GLUT4 e do IRS1 em muscular esquelético gastrocnêmio (MG); 4) o grau de metilação do DNA na região promotora do gene do GLUT4 em MG; 5) fosforilação das proteínas JNK, IKK $\alpha/\beta$ , ERK 1/2, NF- $\kappa$ Bp65 e NF- $\kappa$ Bp50 e seus conteúdos totais em MG; 6) conteúdo total de TNF- $\alpha$  em MG. As ratas foram divididas 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 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 machos destas ratas completaram 75 dias, realizaram-se os experimentos: 1) glicemia e insulinemia; 2) expressão do RNAm do GLUT4 e do *IRS1* em MG; 3) o grau de metilação do DNA na região promotora do gene do GLUT4 em MG; 4)

fosforilação das proteínas JNK, IKK $\alpha/\beta$ , ERK 1/2, NF- $\kappa$ Bp65 e NF- $\kappa$ Bp50 e seus conteúdos totais em MG; 5) conteúdo total de TNF- $\alpha$  em MG. Os resultados demonstraram que a doença periodontal materna promove na sua prole adulta baixo peso ao nascimento (BPN), resistência insulínica, aumento do conteúdo total de TNF- $\alpha$  em MG, aumento do grau de fosforilação de IKK $\alpha/\beta$ , ERK 1/2, NF- $\kappa$ Bp65 (grau de fosforilação e conteúdo) e NF- $\kappa$ Bp50 em MG, diminuição na expressão gênica da proteína transportadora de glicose GLUT4 e aumento na expressão gênica do *IRS1*; porém não promove nessa prole alteração no grau de metilação do DNA na região promotora do gene do GLUT4, e no grau de fosforilação da proteína JNK em MG. Portanto, este estudo é de fundamental importância para o entendimento de alguns dos mecanismos envolvidos na relação entre a doença periodontal materna e resistência à insulina na prole adulta. Além disso, mostra que a saúde bucal materna ideal pode ajudar a prevenir doenças futuras na prole adulta.

**Palavras-chave:** Doenças Periodontais. Resistência à insulina. Transportador de glicose tipo 4. Diabetes mellitus tipo 2. Inflamação. Epigenômica.

MATTERA, M.S.LC. **Evaluation of the epigenetic mechanism by DNA methylation and GLUT4 expression in skeletal muscle tissue of adult rats, prole of rats with periodontal disease.** 2015. 84f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

## ABSTRACT

It is well established that the fetal environment is linked to maternal health, and abnormal stimuli or aggressions during intrauterine life can result in changes in the physiology and metabolism of offspring, increasing the risk of disease in adult life, this phenomenon is known as fetal programming. Changes in DNA methylation and gene expression are considered molecular mechanisms responsible for this programming. Previous studies have demonstrated that maternal periodontal disease (PD) promotes insulin resistance, increased plasma concentrations of cytokines, reduced GLUT4 content and its plasma membrane translocation index in its adult offspring. And cytokines, such as TNF- $\alpha$ , have been linked to reduced GLUT4 expression through the activation of nuclear transcription factor kappa B (NF- $\kappa$ B). In addition, this cytokine can stimulate some serine kinases including I $\kappa$ B kinase (IKK), c-Jun amino-terminal kinase (JNK) and extracellular signal-regulated kinases (ERKs) that are involved in insulin resistance. These findings evidenced the need for further studies to verify the mechanisms involved in these changes. Therefore, the objectives of the present study were to evaluate in adult rats, offspring of rats with PD: 1) birth weight and during the 75 days of age; 2) glycemia and insulinemia; 3) GLUT4 and *IRS1* mRNA expression in skeletal muscle gastrocnemius (MG); 4) the degree of DNA methylation in the promoter region of the GLUT4 gene in MG; 5) phosphorylation of JNK, IKK $\alpha/\beta$ , ERK 1/2, NF- $\kappa$ Bp65 and NF- $\kappa$ Bp50 proteins and their total contents in MG; 6) TNF- $\alpha$  content in MG. Female Wistar rats were distributed into a control group and an experimental periodontal disease group, in which the disease is induced by ligation with silk thread around the 1st molar. 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. The body weights of the offspring were measured once weekly from birth until 75 days of age. When male offspring of these rats completed 75 days, the experiments were performed: 1) glycemia and insulinemia; 2) GLUT4 and *IRS1* mRNA expression in skeletal muscle gastrocnemius (MG); 3) the degree of DNA methylation in the promoter region of the GLUT4 gene in MG; 4) phosphorylation of JNK, IKK $\alpha/\beta$ , ERK 1/2, NF- $\kappa$ Bp65 and NF- $\kappa$ Bp50 proteins and their

total contents in MG; 5) TNF- $\alpha$  content in MG. The results demonstrated that maternal periodontal disease promotes in its adult offspring low birth weight (LBW), insulin resistance, increased TNF- $\alpha$  content in MG, increased IKK $\alpha/\beta$ , ERK 1/2, NF- $\kappa$ Bp65 (phosphorylation status and content) and NF- $\kappa$ Bp50 phosphorylation status in the MG, decrease in gene expression of GLUT4 and increase in *IRS1* gene expression; but does not promote in this progeny change in the degree of DNA methylation in the promoter region of the GLUT4 gene, and JNK phosphorylation status in MG. Therefore, this study is of fundamental importance for the understanding of some of the mechanisms involved in the relationship between maternal periodontal disease and insulin resistance in adult offspring. In addition, it shows that ideal maternal oral health can help prevent future illnesses in adult offspring.

**Keywords:** Periodontal diseases. Insulin resistance. Glucose transporter type 4. Type 2 diabetes mellitus. Inflammation. Epigenetic.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Gráfico (Figura 1A) mostra que a média das medidas (distância entre a crista óssea alveolar e a junção cimento-esmalte nas faces mesial e distal; e distância da crista óssea alveolar do septo interradicular e o bulbo dental na região de furca) no grupo DP foi maior que no grupo CN, confirmando a perda óssea alveolar. A figura apresenta análises radiografias e histológicas dos primeiros molares inferiores no grupo controle (CN) (Figura 1B, 1D e 1E) e no grupo doença periodontal (DP) (Figura 1C, 1F e 1G). Observa-se que os aspectos radiográficos (1B) e histológicos (Figura 1D e 1E) são compatíveis com um padrão normal no grupo CN, e o que grupo DP apresenta perda óssea alveolar (Figura 1C e 1F) e uma grave resposta inflamatória local (Figura 1F e 1G). Abreviações e símbolos: oa, osso alveolar; tc, tecido conjuntivo; lp, ligamento periodontal. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM, n = 7. \* p<0,05 DP vs. CN 42
- Figura 2** A) Massa corpórea ao nascimento de ratos, proles de ratas controle (PCN) e proles de ratas com doença periodontal (PDP). B) Massa corpórea semanal de ratos, PCN e PDP, semanalmente, até 75 dias de idade. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM, n = 19. \* p<0,05 PDP vs. PCN 43
- Figura 3** A) Massa corpórea ao nascimento de ratos, proles de ratas controle (PCN) e proles de ratas com doença periodontal (PDP). B) Massa corpórea semanal de ratos, PCN e PDP semanalmente até 75 dias de idade. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM, n = 19. \* p<0,05 PDP vs. PCN 44
- Figura 4** Avaliação do conteúdo e/ou o grau de fosforilação TNF- $\alpha$ , IKK $\alpha/\beta$ , JNK, ERK 1/2, NF- $\kappa$ B p65 (conteúdo e grau de fosforilação) e NF- $\kappa$ B p50 no músculo gastrocnêmio de ratos adultos proles, de ratas controle (PCN) e de ratas com doença periodontal (PDP). (A e E) Autorradiografias típicas: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185  $\mu$ g). Utilizou-se como controle:  $\beta$ -actina, IKK $\alpha/\beta$ , JNK, ERK 1/2 e NF- $\kappa$ B p50. (B, C, D, F, G e H) Conteúdo e/ou ao grau de fosforilação TNF- $\alpha$  e IKK $\alpha/\beta$ , JNK, ERK 1/2, NF- $\kappa$ B p65 (conteúdo e grau de fosforilação) e NF- $\kappa$ B p50 (expresso em unidades arbitrárias) são apresentadas como a média  $\pm$  EPM, n = 7. \* p<0,05 PDP vs. PCN 46
- Figura 5** Avaliação da expressão gênica da proteína transportadora de glicose GLUT4 (*Slc2a4*) em tecido muscular esquelético gastrocnêmio de ratos adultos proles de ratas controle (PCN) e de ratas com doença periodontal (PDP).  $\beta$ -actina foi utilizada como gene endógeno. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  EPM, n=5. \* p<0,05 PDP vs. PCN 47
- Figura 6** Avaliação da expressão gênica do substrato 1 do receptor de insulina (*IRS1*) em tecido muscular esquelético gastrocnêmio de ratos adultos proles de ratas controle (PCN) e de ratas com doença periodontal (PDP).  $\beta$ -actina foi utilizada como gene endógeno. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  EPM, n=5. \* p<0,05 PDP vs. PCN 48
- Figura 7** Avaliação da metilação do DNA de GLUT4 (*Slc2a4*) em tecido muscular esquelético gastrocnêmio de ratos adultos, proles de ratas controle (PCN) e de ratas com doença periodontal (PDP). Empregando dois sítios de restrição de enzimas sensíveis à metilação (HhaI e HpaII) e uma enzima dependente de metilação (McrBC), (A, B e C) em três regiões separadas 49

dentro do promotor proximal, denominadas prom 1 (Fig. A), prom 2 (Fig. B) e prom 3 (Fig. C), do gene *Slc2a4*. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM, n=4.

## LISTA DE TABELAS

|                 |   |    |
|-----------------|---|----|
| <b>Tabela 1</b> | Sequências dos primers usados para análise quantitativa de metilação (qAMP) de GLUT4 ( <i>Slc2a4</i> ) na prole adulta. | 39 |
| <b>Tabela 2</b> | Glicemia (mmol/L), insulinemia ( $\mu$ UI/mL) e HOMA-IR.  | 45 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

- 4-AF: 4-aminofenazona
- Akt /PKB: Proteína quinase B
- Akt 1: Proteína quinase B 1
- Akt 2: Proteína quinase B 2
- Akt 3: Proteína quinase B 3
- AMPK: Proteína quinase AMP ativada
- AS160: Substrato da AKT de 160 kDa
- ATF-4: *Activating transcription factor-4*
- ATF-6: *Activating transcription factor-6*
- BPN: baixo peso ao nascimento
- CD14: Cluster de diferenciação 14
- c-FLIP: *FLICE-like inhibitory protein*
- CN: Grupo-controle
- CpG: Dinucleotídeo citosina guanina
- DGCR8: *DiGeorge syndrome critical region gene 8*
- DM: Diabetes Mellitus
- DM1: Diabetes Mellitus tipo 1
- DM2: Diabetes Mellitus tipo 2
- DNA: Ácido desoxirribonucléico
- DP: Doença periodontal
- DTT: Ditioneitol
- EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
- eIF2 $\alpha$ : *Eukaryotic translation initiation factor-2*
- EPM: Erro padrão da média
- ERE: Estresse do retículo endoplasmático
- ERK: Quinases reguladas por sinais extracelulares
- ERK1: Quinases reguladas por sinais extracelulares 1
- ERK2: Quinases reguladas por sinais extracelulares 2
- GADD45: *Growth Arrest and DNA-Damage Inducible 45*
- GLUT4: Proteína transportadora de glicose GLUT4
- GOD: Glicose oxidase
- HDAC-1: Histona desacetilase-1

HDL: Lipoproteína de alta densidade  
HOMA-IR: Modelo de Avaliação da Homeostase - Resistência à Insulina  
i.p.: Intraperitoneal  
IDF: *International Diabetes Federation*  
IGF-1: Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1  
IL-1: Interleucina -1  
IL-10: Interleucina-10  
IL-1ra: antagonista do receptor de IL-1  
IL-1 $\beta$ : Interleucina -1 $\beta$   
IL-6: Interleucina-6  
IPF-1: Fator promotor da insulina-1  
IRS: Substrato do receptor de insulina  
IRS1: Substrato 1 do receptor de insulina  
IRS2: Substrato 2 do receptor de insulina  
JNK 1: c-Jun N-terminal quinase 1  
JNK 2: c-Jun N-terminal quinase 1  
JNK 3: c-Jun N-terminal quinase 1  
JNK: c-Jun N-terminal quinase  
kDa: kilodalton  
k $\beta$  (IKK $\beta$ ): Quinase inibidora do fator nuclear K $\beta$   
LBP: Proteína ligante de LPS  
LPS: Lipopolissacarídeos  
MG: músculo esquelético gastrocnêmio  
miRNA primário: pri-miRNA  
miRNA: micro-RNA  
NF- $\kappa$ B: Fator de transcrição nuclear kappa B  
NF- $\kappa$ B1: p50  
NIK: *NF- $\kappa$ B-inducing kinase*  
OMS: Organização mundial da saúde  
p65: RelA  
PAMPs: Padrões moleculares associados à patógenos  
PCN: Proles de ratas-controle  
PCR: Proteína C-reativa  
PDP: Proles de ratas com doença periodontal

PERK: *PKR-like ER-regulated kinase*

PGE2: Prostaglandina E2

pp185: Substrato do receptor de insulina (IRS1/IRS2)

PPARs: Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma

PTB: Parto prematuro

RAGE: Receptor para produtos finais de glicação avançada

RCIU: Restrição de crescimento intrauterino

RelA: p65

RISC: *RNA Induced Silencing Complex*

RNAm: Ácido ribonucleico mensageiro

ROS: Espécies reativas de oxigênio

SB: Solução basal

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*)

SIN3A: Transcription regulator family member A

Slc2a4: membro 4 da família 2 de carreador de soluto

SOD2: *Superoxide Dismutase 2*

Src: Família de proteína tirosina quinase originalmente identificada por homologia com a proteína oncogênica PP60 (v-Src) do vírus do sarcoma de *rous*.

TEMED: Tetrametil etilenodiamina

TLR-4: Receptor Toll-like 4

TLRs: Receptores Toll-like

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

TPO: Trombopoetina

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano

USF-1: *Upstream stimulatory factor 1*

V: Volt

XIAP: *X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein*

$\mu$ L: Microlitro

$\mu$ m: Micrômetro

$\mu$ U: Microunidades

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO  | 20 |
| 2 OBJETIVOS   | 31 |
| 2.1 Objetivo Geral  | 31 |
| 2.2 Objetivos específicos   | 31 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS   | 32 |
| 3.1 Animais   | 32 |
| 3.2 Análise radiográfica do nível da perda óssea alveolar   | 33 |
| 3.3 Análise histológica da perda óssea alveolar   | 33 |
| 3.4 Determinação da glicemia (método de glicose-oxidase)  | 34 |
| 3.5 Determinação de insulinemia   | 34 |
| 3.6 Análise do HOMA-IR  | 34 |
| 3.7 Avaliação das vias inflamatórias em tecido muscular esquelético   | 34 |
| 3.7.1 Preparação das amostras   | 34 |
| 3.7.2 <i>Western blotting</i>   | 35 |
| 3.8 Metodologia de quantificação do GLUT4 e do IRS1 por meio da técnica de “PCR em tempo real”                  | 37 |
| 3.8.1 Extração e quantificação do RNA total e transcrição reversa   | 37 |
| 3.8.2 PCR quantitativo  | 38 |
| 3.9 Avaliação do grau de metilação de DNA na região promotora do gene de GLUT4 em músculo esquelético           | 38 |
| 3.9.1 Extração do DNA e Análise de Dados  | 38 |
| 3.9.2 Desenho do oligos iniciadores (primers)   | 39 |
| 3.9.3 Restriction Digestion and Real-Time PCR (qAMP)  | 39 |
| 3.10 Análise estatística  | 40 |
| 4 RESULTADOS  | 41 |
| 4.1 Análise radiográfica e histológica dos tecidos periodontais das mães  | 41 |
| 4.2 Avaliação da massa corpórea (g)   | 43 |
| 4.3 Ingestão alimentar  | 44 |
| 4.4 Glicemia, Insulinemia e HOMA-IR   | 45 |
| 4.5 Avaliação das vias inflamatórias  | 46 |
| 4.6 Avaliação da expressão gênica de <i>Slc2a4</i> e do <i>IRS1</i> em tecido muscular esquelético gastrocnêmio | 47 |

|  |    |
|--|----|
| 4.7 Avaliação da metilação do DNA de <i>Slc2a4</i> em tecido muscular esquelético gastrocnêmio | 49 |
| 5 DISCUSSÃO  | 50 |
| 6 RESUMOS DOS PRINCIPAIS RESULTADOS  | 56 |
| 7 CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS   | 57 |
| REFERÊNCIAS  | 58 |
| ANEXOS   | 71 |

# 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, os pesquisadores estão apenas começando a entender as complexas interações entre a herança genética e as influências ambientais sobre a expressão gênica e as maneiras pelas quais isso afeta o ser humano (LONGO, 2019). O fenômeno conhecido como *programming* ou programação fetal sugere que estímulos ou agressões durante a vida intrauterina podem resultar em alterações na fisiologia e metabolismo da descendência, aumentando o risco de doenças na vida adulta (BARKER, 1995), como por exemplo, diabetes *mellitus* (DM) (LANGLEY-EVANS; MCMULLEN, 2010).

O DM é considerado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pela Federação Internacional de Diabetes como uma epidemia global, atingindo 422 milhões de pessoas no mundo e no Brasil, alcançando 8,1% da população na faixa etária entre 20 e 79 anos, totalizando 11,6 milhões de pessoas. Adicionalmente, estima-se que em 2045 o número de pessoas com DM em todo o mundo será superior a 438 milhões (IDF, 2017). Há dois tipos principais de DM: tipo 1 (DM1) e tipo 2 (DM2).

No DM1 a produção de insulina do pâncreas é insuficiente, pois as células das ilhotas pancreáticas sofrem destruição autoimune. Seu início é muito súbito, e as pessoas acometidas por este tipo de diabetes precisam de insulina para sobreviver. No 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 DM pode levar a várias 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 (JENSEN; DECKERT, 1992; LIBMAN *et al.*, 1993; LÖE, 1993; ELNER *et al.*, 1995; PATTERSON; ANDRIOLE, 1997; TAYLOR *et al.*, 1998; VLASSARA; PALACE, 2002; BORGGREVE; DE VRIES; DULLAART, 2003).

Acredita-se que a resistência insulínica seja um evento desencadeante no desenvolvimento do DM2 por ser a primeira anormalidade detectável desta doença (GABBAY; CESARINI; DIB, 2003).

A insulina é um hormônio anabólico secretado pelas células  $\beta$  pancreáticas, tendo como papel principal a captação de glicose, atuando em diferentes tecidos, como muscular,

adiposo e também no fígado (CARVALHEIRA *et al.*, 2002). Este hormônio exerce seu efeito por meio de ligação a um receptor específico na membrana plasmática. O receptor de insulina é uma glicoproteína heterotetramérica constituído por duas subunidades alfa e duas subunidades beta, ligadas por pontes de dissulfeto (KASUGA *et al.*, 1982a). 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 (KASUGA *et al.*, 1982a, 1982b).

Kasuga *et al.* (1982b, 1982c) 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 (EBINA *et al.*, 1987). O receptor, uma vez fosforilado em decorrência de sua ativação por insulina, passa a fosforilar substratos intracitoplasmáticos, como por exemplo a pp185. Este foi o primeiro substrato do receptor de insulina estudado, com peso molecular de aproximadamente 185 kDa (WHITE; TAKAYAMA; KAHN, 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 (IRS1) 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 (IRS2) (ARAKI *et al.*, 1994; TAMEMOTO *et al.*, 1994; SUN *et al.*, 1995). Quando o IRS1 e o IRS2 estão fosforilados, podem interagir com proteínas contendo a porção SH2 e ativá-las. Entre essas proteínas está uma enzima, a fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-k). Alessi *et al.* (1997) demonstraram que esta proteína ativada pode induzir a ativação de outras proteínas como a proteína quinase-1 dependente de fosfoinosítido (PK1) 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 (KOHN; TAKEUCHI; ROTH, 1996; BELLACOSA *et al.*, 1998). A fosforilação da Akt auxilia na translocação da proteína transportadora de glicose (GLUT4) para membrana plasmática para facilitar a entrada da glicose em células musculares e adipócitos (WHITEMAN; CHO; BIRNBAUM, 2002).

O transportador de glicose insulino-sensível, 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; SALTIEL, 2012).

O GLUT4, também denominado transportador de glicose 4 ou membro 4 da família 2 de carreador de soluto, é uma proteína transportadora (codificada pelo gene *Slc2a4*) expressa predominantemente em células musculares e adipócitos e tem como função propiciar a captação de glicose insulino-mediada (LEHNEN *et al.*, 2010; MACHADO; SCHAAN; SERAPHIM, 2006). Ratos transgênicos que carecem ou superexpressam o GLUT4, respectivamente, diminuem ou aumentam a sensibilidade à insulina (KATZ *et al.*, 1996; CARVALHO *et al.*, 2005; BERGLUND *et al.*, 2012). Assim sendo, este transportador é de fundamental importância para a manutenção da homeostase da glicose (CARVALHO *et al.*, 2005; LEGUISAMO *et al.*, 2012).

Outra forma de ativar a translocação de GLUT4 é por meio do exercício físico via AMPK, sendo este, um mecanismo independente de insulina (HAYASHI *et al.*, 1998). A AMPK é uma proteína heterotrimérica formada por uma subunidade catalítica ( $\alpha$ ) e duas subunidades regulatórias ( $\beta$  e  $\gamma$ ) (HARDIE; CARLING, 1997; HARDIE *et al.*, 2003). A contração muscular promove a hidrólise de ATP necessário para produção de energia, resultando na diminuição de ATP e um aumento de AMP. Este aumento de AMP ativa a AMPK por promover a fosforilação da sua subunidade  $\alpha$  em resíduo de treonina 172 (HARDIE; CARLING, 1997). Esta fosforilação causa a ativação do substrato da PKB a AS-160, promovendo a translocação de GLUT4 para a membrana plasmática, o que possibilita o transporte de glicose para o músculo (MCGEE *et al.*, 2003).

A resistência insulínica pode estar presente em outra patologia como obesidade, uma vez que os adipócitos, além de promoverem o armazenamento de gordura, também secretam vários fatores denominados adipocinas. Estas adipocinas, em sua grande maioria, estão relacionadas, direta ou indiretamente, com o DM2 (TORRES-LEAL *et al.*, 2010). Dentre elas, destacam-se a adiponectina, o TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa), a IL-6 (interleucina-6) e a resistina. A adiponectina, ao contrário das demais adipocinas, age como fator protetor para doenças cardiovasculares e aumenta a sensibilidade à insulina (HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004). Por outro lado, o TNF- $\alpha$ , a IL-6 e a resistina, promovem resistência insulínica.

Shirakashi (2012) demonstrou que ratos adultos, proles de ratas com doença periodontal (DP) materna, apresentaram resistência insulínica, modificações no sinal insulínico e aumento das concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$ , IL-6 e resistina. A relação cíclica bidirecional entre DM e DP tem sido amplamente examinada. Ou seja, as

complicações sistêmicas do DM agravam a DP (ALMEIDA ABDO *et al.*, 2013; BORGNAKKE *et al.*, 2013), e DP, por sua vez, exacerba a hiperglicemia (TAYLOR; BORGNAKKE, 2008).

A DP refere-se aos processos inflamatórios que ocorrem nos tecidos ao redor dos dentes em resposta às acumulações bacterianas ou biofilme dentária. O biofilme, gengivite e periodontite estão inter-relacionados, pois o acúmulo supragengival de biofilme microbiano pode progredir a infecções subgengivais e DP. No pior dos casos, a DP pode envolver a inflamação tanto dos tecidos de suporte (gengiva), quanto de sustentação (cimento, osso alveolar e ligamentos periodontais). Em adultos, o ambiente microbiano subgengival associado à cárie dentária contém principalmente bactérias anaeróbicas gram-negativas (por exemplo, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*). Sem tratamento, a DP pode levar à perda progressiva do osso alveolar, resultando em mobilidade e a subsequente perda de dentes. Os efeitos patogênicos da DP são causados pelos micro-organismos que aderem às superfícies do dente e pela resposta inflamatória agressiva contra esses micro-organismos (SRINIVAS; PARRY, 2012).

A etiologia da periodontite sugere que a infecção bacteriana seja a causa primária desta doença e esta patologia é o resultado da interação entre patógenos e hospedeiros (ÜSTÜN *et al.*, 2013). Esta interação promove a ativação de monócitos pelos linfócitos T que iniciam a produção de grandes quantidades de mediadores inflamatórios, tais como IL-6 e TNF- $\alpha$  (HERNÁNDEZ *et al.*, 2011). Estas citocinas ocasionam a ativação de osteoclastos, propiciando reabsorção óssea, bem como aumento de colagenase, o que favorece maior destruição das fibras do ligamento do periodonto, promovendo assim, a destruição do osso e do tecido (IACOPINO, 1995; LALLA; LAMSTER; SCHMIDT, 1998; LALLA *et al.*, 2000).

Segundo Wang e Ohura (2002), amostras de soros de pacientes com periodontite são positivas para anticorpos contra vários componentes estruturais de *P. gingivalis*, como: proteína de membrana externa, cápsula, fímbrias, produtos bacterianos biologicamente ativos, lipopolissacarídeo (LPS) e hemaglutinina, sendo que, o LPS é absorvido nas superfícies das raízes e nos tecidos gengivais de pacientes com DP.

O LPS se liga primeiro à proteína ligante de LPS (LBP), solúvel no sangue ou líquido extracelular, e este complexo serve para facilitar a ligação de LPS a CD14, que existe como uma proteína plasmática solúvel e como uma proteína de membrana ligada a glicofosfatidilinositol na maioria das células, exceto no endotélio. Uma vez que o LPS se liga a CD14, LBP se dissocia, e o complexo LPS-CD14 se associa fisicamente o *toll-like receptor* 4 (TLR4) (ABBAS; LICHTAN; PILLAI, 2008).

O TLR4 é um receptor da superfície celular que gera respostas imunes inatas pela sua capacidade em detectar agentes patogênicos por meio de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que resulta na indução de cascatas de sinalização da ativação de fatores de transcrição e cinase. Estas cascatas de ativação podem conduzir à geração de fatores de transcrição (NF- $\kappa$ B e AP-1), citocinas pró-inflamatórias (como TNF- $\alpha$  e IL-6), quimiocinas, eicosanóides, e as espécies reativas de oxigênio (ROS), todos os efetores da imunidade inata. Notavelmente, o TLR4 é expresso em vários componentes celulares dos tecidos alvo da insulina, incluindo fígado, tecido adiposo, músculo esquelético, vasos, células  $\beta$  pancreáticas e cérebro (KIM; SEARS, 2010). Além disso, as vias de TLR4 ativadas inibem outras vias de sinalização, por exemplo, a sinalização insulínica, por promover a fosforilação em serina do IRS1 (KIM; SEARS, 2010). As sinalizações dos TLRs estão na base do desenvolvimento de inflamação crônica e resistência à insulina no músculo esquelético, demonstrando que patógenos podem promover alterações sistêmicas (KIM; SEARS, 2010).

O tratamento com TNF- $\alpha$  causa diminuição tanto na fosforilação em tirosina do receptor de insulina e no IRS1 *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 IRS1 pode ser devido a uma maior taxa de fosforilação em serina deste substrato. Sabe-se que esta fosforilação em serina do IRS1 diminui o sinal insulínico (KANETY *et al.*, 1995).

Citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$ , ativam vias intracelulares da cJun amino-terminal kinase (JNK), das quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK: ERK1 e ERK2) e do I $\kappa$ B kinase  $\beta$ /fator nuclear  $\kappa$ B (IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B) (WULLAERT *et al.*, 2006). A ativação da JNK promove a fosforilação do IRS1 em serina (SHOELSON; LEE; GOLDFINE, 2006) e prejudica a atividade da Akt, promovendo resistência insulínica (KANETO *et al.*, 2005).

O subgrupo JNK das proteínas quinases ativadas por mitógenos é codificada por três genes: JNK1, JNK2 e JNK3 (TUNCMAN *et al.*, 2006). Nos estados de resistência insulínica e obesidade, as atividades JNK e IKK $\beta$  estão aumentadas por ativarem fatores de transcrição pró-inflamatórios. Verificou-se que os ratos deficientes em JNK1, mas não em JNK2, têm adiposidade reduzida e melhoram a sensibilidade à insulina (TUNCMAN *et al.*, 2006).

De acordo com Plomgaard *et al.* (2005), a infusão de TNF- $\alpha$  em humanos aumenta a fosforilação de p70 S6 quinase (S6K), ERK1/2 e JNK, concomitante com a fosforilação em serina do IRS1. Estas ativações comprometem a captação de glicose, devido à

diminuição do AS160 (substrato da Akt de 160 kDa), responsável pela regulação da translocação de GLUT4.

A exposição crônica ao IL-6 acarreta deficiência da translocação de GLUT4 para a membrana plasmática e defeitos na sinalização do substrato receptor de insulina, demonstrando que o tratamento crônico com essa citocina prejudica completamente a fosforilação em tirosina de IRS1 e IRS2 e a fosforilação em serina do Akt, sem alterar a quantidade total desta última proteína. (NIETO-VAZQUEZ *et al.*, 2008). Além disso, IL-6 produz fosforilação do IRS1 em resíduos Ser307, de uma maneira JNK dependente. Convém salientar, que nem sempre a IL-6 possui efeitos pró-inflamatórios. Durante o exercício físico, a contração muscular promove a produção de IL-6 por fibras musculares, por meio de uma via independente de TNF- $\alpha$ , que estimula o aparecimento de citocinas anti-inflamatórias, tais como, IL-10 e IL-1ra (antagonista do receptor de IL-1), e inibe a produção de TNF- $\alpha$  (PETERSEN; PEDERSEN, 2005; PEDERSEN; FISCHER, 2007;). A duração do exercício é o fator mais importante que determina a amplitude da produção da IL-6 pelos músculos esqueléticos (PETERSEN; PEDERSEN, 2005).

Por meio da técnica de citometria de fluxo, Xie *et al.* (2010) avaliaram que concentrações significativas de citocinas inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, em células 3T3-L1 (pré-adipócitos) reduzem a expressão de GLUT4. Estas citocinas inflamatórias têm um papel importante na regulação do metabolismo da glicose. E a ativação excessiva das vias inflamatórias pode representar uma etapa fundamental no desenvolvimento da resistência à insulina (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005).

Conforme descrito anteriormente, um dos fatores que podem causar o DM2 é o ambiente fetal (REYNOLDS; PHILLIPS, 1998; LUO; XIAO; NUYT, 2010). A inflamação oral materna, particularmente a DP, tem sido associada a desfechos gestacionais adversos, incluindo parto prematuro (PTB), baixo peso ao nascer (BPN) e restrição de crescimento intrauterino (RCIU) e, posteriormente, diabetes na vida adulta (SIQUEIRA *et al.*, 2007; ERCAN *et al.*, 2013; IDE; PAPAPANOU, 2013; POZO *et al.* 2016). Ademais, o tratamento periodontal em grávidas reduziu a incidência de PTB (JEFFCOAT *et al.*, 2011).

Segundo Amarilyo *et al.* (2011) o sangue do cordão umbilical de crianças com RCIU apresenta elevadas concentrações de IL-6, TNF- $\alpha$ , proteína C-reativa (PCR) e trombopoietina (TPO).

Os mecanismos patogênicos que têm sido propostos como causa de PTB e BPN em consequência da infecção periodontal, são a translocação de bactérias ou produtos bacterianos (por exemplo, o LPS) para a unidade fetoplacental, desencadeando a liberação

local de mediadores bioquímicos ou citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e prostaglandina E2 (PGE2) (GANDHIMADHI; MYTHILI, 2010).

Outro mecanismo que tem sido proposto é que uma bactéria presente na periodontite (*Campylobacter rectus*) induz grandes alterações na estrutura da placenta, como a redução no tamanho do labirinto placentário (OFFENBACHER *et al.*, 2005). O labirinto é a região da placenta, onde há a troca de nutrientes e resíduos entre a mãe e o feto. Por isso, alterações em sua estrutura podem implicar a alimentação insuficiente do feto e, conseqüentemente, o crescimento prejudicado e BPN. Além disso, danos estruturais na placenta podem interromper o fluxo normal de sangue entre o feto e a mãe (MADIANOS *et al.*, 2013).

A nutrição prejudicada promove adaptações fetais, como a priorização do gasto de energia para os principais tecidos (cérebro e coração) e uma diminuição no desenvolvimento de tecidos menos críticos, por exemplo, no músculo esquelético (a hipótese do fenótipo econômico). Essas adaptações levam a conseqüências fisiológicas e metabólicas negativas na musculatura esquelética e, posteriormente, predispõem a prole a doenças metabólicas na idade adulta, como o DM (HORÁKOVÁ; JANOUTOVÁ; JANOUT, 2005).

Estudos realizados em animais evidenciaram que complicações intrauterinas podem danificar o funcionamento das células  $\beta$  (GREEN; ROZANCE; LIMESAND, 2010), levando ao desenvolvimento de DM2 na vida adulta por afetar a expressão de genes essenciais para o desenvolvimento do pâncreas que são susceptíveis a modificações epigenéticas (PINNEY; SIMMONS, 2010). O termo epigenética refere-se aos processos que modificam a atividade genética sem alterar a sequência de DNA e levam a modificações que podem ser transmitidas transgeracionalmente. Existem pelo menos dois mecanismos envolvidos na epigenética: modificações de histonas e metilação do DNA (PINNEY; SIMMONS, 2010). Estas modificações podem ocorrer durante a embriogênese ou na vida pós-natal precoce.

A metilação do DNA é caracterizada pela adição de um grupo metil (CH<sub>3</sub>) no carbono 5 da citosina em dinucleotídeos de citosina e guanina (CpG). Esta metilação ocorre por meio de DNA metiltransferases (DNMT) responsáveis por adicionar o grupo metil do S-adenosil metionina (SAM) para citosina. As DNMTs podem ser de três tipos: DNMT3A e DNMT3B, que são responsáveis por fazer novas metilações; enquanto a DNMT1 cuida da manutenção da metilação. Aproximadamente 70% dos dinucleotídeos CpGs do DNA humano é constitutivamente metilado, enquanto a maioria dos CpGs não metilados estão localizados em ilhas CpG (PINNEY; SIMMONS, 2010). As ilhas CpG são sequências ricas em CG

principalmente localizadas em regiões promotoras (PINNEY; SIMMONS, 2010). A metilação das ilhas CpG dentro das sequências promotoras evita a interação de fatores de transcrição, inibindo a expressão gênica (BAYLIN, 2005).

Já a desacetilação de histonas é marcada pela ação das histonas desacetilases (HDAC) que removem o grupo acetil das histonas promovendo a condensação da cromatina. Ambos os mecanismos impossibilitam que os fatores de transcrição se liguem à região promotora dos genes. Entretanto, as modificações de histonas são consideradas eventos mais dinâmicos, enquanto a metilação do DNA fornece uma forma mais estável de regulação gênica (BÄCKDAHL; BUSHELL; BECK, 2009).

Essas alterações epigenéticas podem ocorrer no fator duodenopancreático homeobox 1 (PDX1), também denominado fator promotor da insulina 1 (IPF-1), que é um fator de transcrição que regula o desenvolvimento do pâncreas e diferenciação de células  $\beta$  (VAXILLAIRE; FROGUEL, 2008; LING; GROOP, 2009). Mutações no gene deste fator podem causar uma forma de diabetes monogênica (VAXILLAIRE; FROGUEL, 2008; LING; GROOP, 2009). A RCIU, devido à insuficiência útero-placentária, foi associada com o silenciamento epigenético progressivo de PDX1 (PARK *et al.*, 2008). Na vida pós-natal precoce, antes do início da diabetes, o estado de RCIU induz desacetilação das histonas H3 e H4, o que é facilitada pelo recrutamento de histona-desacetilase 1 (HDAC1) e Sin3A para o promotor proximal de PDX1 (PARK *et al.*, 2008). A desacetilação destas histonas é acompanhada pela perda de ligação do fator de transcrição chave, como o *upstream stimulatory factor 1* (USF-1), ao gene da PDX1 (PARK *et al.*, 2008). Após o aparecimento da diabetes no indivíduo adulto que apresentou RCIU, foi observada a metilação da ilha de CpG no promotor proximal, o que resulta no silenciamento completo e permanente do locus PDX1 (PARK *et al.*, 2008).

Modificações epigenéticas podem também ocorrer na vida pós-natal precoce. Conforme descrito por Liu *et al.* (2013) ratos fêmeas hipernutridas (em decorrência da diminuição proposital do número filhotes) durante o período de amamentação, apresentaram ganho de peso, aumento dos níveis de insulina, glicose e leptina. Além disso, esta hipernutrição resultou na hipermetilação específica do dinucleotídeo CpG (dinucleotídeo 5'-CpG-3') na região proximal dos genes promotores do IRS1 e GLUT4 e, conseqüentemente, uma redução nos níveis de RNAm de GLUT4 e do IRS1 no tecido muscular esquelético na prole adulta.

Segundo Raychaudhuri *et al.* (2008) a RCIU, devido à restrição de nutrientes no período perinatal, diminui a expressão de RNAm de GLUT4 em tecido muscular esquelético

de ratos fêmeas. Esta diminuição foi em decorrência de alterações no gene promotor de GLUT4, pois nesse gene observou-se: 1) aumento da ligação de *myocyte enhancer factor 2D* MEF2D (inibidor); 2) declínio da ligação de *myocyte enhancer factor 2A* MEF2A (ativador) e MyoD (co-ativador). O MEF2A, MEF2D e o MyoD são fatores de transcrição. Além disso, a RCIU promoveu o recrutamento de enzimas DNA metiltransferase 3A (DNMT3A) e DNA metiltransferase 3B (DNMT3B), na idade adulta ao gene de GLUT4. A enzima DNMT3A pode interagir com outras proteínas repressoras suprimindo a transcrição do gene. Outro fator de transcrição que pode regular a expressão de GLUT4 é o NF- $\kappa$ B atuando na inibição do gene. Lembrando que o TNF- $\alpha$  ativa o NF- $\kappa$ B (RAYCHAUDHURI *et al.*, 2008).

A família NF- $\kappa$ B em células de mamíferos é um complexo homo ou heterodimérico formado pelas proteínas contendo o domínio semelhante a RelA (p65), RelB, NF- $\kappa$ B1 (p105/p50), NF- $\kappa$ B2 (p100/p52) e c-Rel. A forma heterodimérica p50/p65 é a mais comum (OECKINGHAUS *et al.*, 2009; FURUYA *et al.*, 2013). Ademais, foi demonstrado que a região promotora do gene *Slc2a4* (que codifica o transportador de glicose GLUT4) apresenta sequências (-134/-112 e -82/-60 no gene do camundongo) às quais tanto a subunidade p50 como a p65 do NF- $\kappa$ B são capazes de se ligar e agir como repressor direto da atividade transcricional do *Slc2a4*, ocasionando a diminuição da expressão de GLUT4 (FURUYA *et al.*, 2013; SILVA, 2013).

Outros fatores que regulam a expressão gênica são os microRNA (miRNAs) que constituem uma família de pequenos RNAs endógenos não-codificadores de proteínas. Estes miRNAs estão intimamente ligados com as modificações de histonas e metilação do DNA e, muitas vezes, agem conjuntamente como uma forma de regular os diferentes processos celulares (SAETROM *et al.*, 2007; VAISSIÈRE *et al.*, 2008). Enquanto a modificação de histonas e a metilação do DNA regulam a expressão a nível transcricional, os miRNAs agem principalmente em nível pós-transcricional (SAETROM *et al.*, 2007).

Os miRNAs são moléculas de RNA fita simples, de cerca de 22 nucleotídeos, não codificadores de proteínas, que agem como potentes reguladores pós-transcricionais da expressão gênica em plantas e animais, promovendo a degradação ou inibição da tradução de RNAs mensageiros alvo (RNAm) (KIM, 2005; DAVIS-DUSENBERY; HATA, 2010).

Utilizar miRNAs como biomarcadores é relativamente novo e foi proposto pela primeira vez para a detecção de várias formas de câncer, doenças autoimunes e sepse (GUAY; REGAZZI, 2013). Guay e Regazzi (2013) demonstraram que indivíduos diabéticos apresentavam alterações no perfil de miRNA. A melhor caracterização do papel dos miRNAs

nos mecanismos de secreção de insulina poderá levar à compreensão da fisiopatologia do diabetes, além de auxiliar no desenvolvimento de novos tratamentos.

Segundo Poy *et al.* (2004) o miR-375 é um regulador da secreção da insulina, uma vez que, o miR-375 regula a secreção da insulina em células  $\beta$  de pâncreas de camundongo, inibindo a expressão de miotrofina, uma proteína citoplasmática que induz a exocitose de grânulos de insulina.

Karolina e pesquisadores avaliaram os miRNAs presentes no sangue e exossomos de 265 pacientes com diferentes condições de saúde associados à síndrome metabólica. Eles detectaram uma regulação positiva de miR-27a, miR-150, miR-192, miR-320a e miR-375 em pacientes com DM2 e observaram uma forte correlação entre os níveis de jejum elevados de glicose e o aumento dos níveis de miR-27a e miR-320a. Estes estudos pioneiros demonstraram o potencial dos miRNAs como biomarcadores para DM2 (KAROLINA *et al.*, 2012).

Outros modelos de programação fetal como alterações nutricionais materna, podem levar à resistência insulínica na prole. Segundo Westermeier *et al.* (2014) a obesidade pré-gestacional materna está relacionada a um aumento no risco de obesidade, de resistência insulínica e à presença de marcadores precoces de doenças cardiovasculares na prole. Uma das explicações é que a obesidade materna, em consequência de efeitos estressores causados por excesso de nutrientes, leva ao estresse do retículo endoplasmático (ERE) em células endoteliais da veia umbilical humana, envolvendo ativação de proteínas de ERE, como a PERK e ATF6. A ATF6 é libertada a partir de membranas do retículo endoplasmático e, em seguida, processada no complexo de Golgi por clivagem proteolítica, promovendo a sua translocação nuclear. Por sua vez, a PERK autofosforilada é capaz de fosforilar eIF2 $\alpha$ , levando à translocação para o núcleo de ATF4. Além disso, eIF2 $\alpha$  também pode ser fosforilada pela PKR que também é uma proteína dependente do ERE. Estudos sugerem que as translocações nucleares de ATF6 e ATF4 podem ser capazes de alterar a sinalização da insulina e levar à resistência insulínica em células endoteliais da veia umbilical humana por meio de redução da fosforilação da Akt. Em paralelo, a ativação da PKR pode causar atenuação da sinalização insulínica pela fosforilação inibitória do IRS1 (WESTERMEIER *et al.*, 2014).

Outro estudo, que evidenciou a existência da programação fetal, demonstrou que a dieta materna (durante a prenhez) com baixo teor de sódio promove em sua prole (macho e fêmea) BPN (apenas na prole fêmea) e aumento da adiposidade na vida adulta (LOPES *et al.*, 2008). Ademais, o BPN em machos está, pelo menos em parte, relacionado com menores

concentrações séricas de IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1), menor expressão gênica e maior metilação do gene *Igf1* (SIQUEIRA, 2014). Estes resultados também reforçam a influência do ambiente intrauterino no desenvolvimento de distúrbios na prole.

Vários estudos sobre a programação fetal reforçam a relevância de se manter uma dieta materna adequada durante o período pré-gestacional e gestacional para a manutenção da saúde geral de sua prole na vida adulta (PARK *et al.*, 2008; LOPES *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2013; WESTERMEIER *et al.*, 2014; SIQUEIRA, 2014).

Nosso grupo mostrou previamente que não só a dieta, mas também uma doença bucal, como a DP materna, promove programação fetal em ratos. Esta programação resulta em: BPN, resistência à insulina, aumento dos níveis de TNF- $\alpha$ , alterações no grau de fosforilação da serina de Akt e alterações no índice de translocação e conteúdo GLUT4 do músculo gastrocnêmio (MG) na prole adulta (MATTERA *et al.*, 2016).

Como esse estudo demonstrou que a DP materna pode promover alterações no conteúdo proteico de GLUT4 no MG na sua prole adulta, como também aumento de TNF- $\alpha$  e resistência insulínica, investigamos os mecanismos que podem promover essas alterações, avaliando tanto as alterações epigenéticas e expressão gênica de GLUT4, como as vias inflamatórias.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Sabendo-se que a doença periodontal materna promove baixo peso ao nascimento, resistência à insulina, aumento dos níveis de TNF- $\alpha$ , alterações no grau de fosforilação da serina de Akt, alterações no índice de translocação e conteúdo GLUT4 do músculo gastrocnêmio na prole adulta, tornou-se fundamental identificar os mecanismos que podem promover tais alterações nessa prole, como: mudanças na metilação do DNA do GLUT4, na expressão gênica (GLUT4 e IRS1), no conteúdo total de TNF- $\alpha$  e nas vias inflamatórias, em tecido muscular esquelético gastrocnêmio (MG).

### 2.2 Objetivos específicos

O presente estudo objetivou avaliar em ratos adultos, proles de ratas com doença periodontal:

- peso ao nascimento e durante os 75 dias de idade;
- glicemia e insulinemia;
- fosforilação das proteínas JNK, IKK $\alpha/\beta$ , ERK 1/2, NF- $\kappa$ Bp65 e NF- $\kappa$ Bp50 e seus conteúdos totais em MG;
- conteúdo total de TNF- $\alpha$  em MG.
- expressão do RNAm da proteína transportadora de glicose GLUT4 (*Slc2a4*) e do *IRS1* em MG;
- grau de metilação do DNA na região promotora do gene de *Slc2a4* em MG.

## 3 MATERIAL E MÉTODO

### 3.1 Animais

O trabalho está de acordo com os Princípios Éticos em Uso de Animais e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Protocolo FOA-2015-00634).

Foram utilizadas 14 ratas (2 meses de idade com 200g) e 3 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  $23 \pm 2^\circ$  C. As ratas foram distribuídas em dois grupos: 1) com doença periodontal (DP) (n=7), nas quais esta doença foi induzida por meio de ligadura com fio de seda ao redor do 1º molar inferior; 2) ratas controle (CN) (n=7). Após a colocação da ligadura foram avaliados, 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 e, após o nascimento, a ninhada foi distribuída em proles de ratas com doença periodontal (PDP) (n=19) e proles de ratas-controle (PCN) (n=19), 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 (semanalmente) até a realização dos experimentos. Quando os filhotes machos DP e CN destas ratas completaram 75 dias, os experimentos foram realizados.

Os ratos proles controle (PCN) e proles DP (PDP) foram submetidos a jejum de 14 horas antes dos procedimentos experimentais. Estes animais foram anestesiados com tiopental sódico (Thiopentax® - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, Brasil, 3%, 5mg/ 100g p.c., i.p.), e, sob anestesia, foi realizada laparotomia mediana, coletou-se sangue pela veia cava inferior. As amostras de sangue foram transferidas para tubos de plástico heparinizados e mantidas a  $4^\circ\text{C}$  até a centrifugação a 800g ( $4^\circ\text{C}$ , 15 minutos). O plasma obtido foi armazenado a  $-70^\circ\text{C}$  até o dia da quantificação das concentrações plasmáticas de glicose e insulina (n=7).

Ademais, foi coletado o MG para avaliar: 1) o grau de metilação do DNA (n = 4) de *Slc2a4*; 2) expressão do mRNA de *Slc2a4* e do *IRS1* (n = 5) no MG. Por fim, os demais animais dos grupos PCN (n = 7) e PDP (n = 7) foram utilizados para avaliar: 1) fosforilação

das proteínas JNK, IKK $\alpha/\beta$ , ERK 1/2, NF- $\kappa$ Bp65 e NF- $\kappa$ Bp50 e seus conteúdos totais em MG; 2) conteúdo total de TNF- $\alpha$  em MG. Após os experimentos, todos os animais foram eutanasiados por dose excessiva de anestésico (Tiopentax® 3% - Cristália, Itapira/ SP – 150 mg/Kg p.c., i.p).

### **3.2 Análise radiográfica do nível da perda óssea alveolar**

Após o desmame, aproximadamente 57 dias após a instalação da ligadura, as ratas mães de ambos os grupos foram eutanasiadas por dose excessiva de anestésico (Tiopentax® 3% - Cristália, Itapira/ SP – 150 mg/Kg p.c., i.p). As hemi-mandíbulas direita e esquerda foram dissecadas e fixadas por 24 h em formaldeído a 4%. Para obtenção das imagens radiográficas foi utilizado o aparelho de raios-X GE-100 (General Electric, Milwaukee, EUA), operando com 70 kvp, 10 mA e tempo de exposição de 0,12 segundos. A imagem digital foi obtida diretamente com placa óptica digital (Digora, Soredex, Orion Corporation, Helsinki, Finland). O nível ósseo foi mensurado nas imagens radiográficas em quatro locais: face mesial, face distal e em dois pontos equidistantes na região de furca dos primeiros molares inferiores. Com o auxílio de software digital (Digora, Soredex, Orion Corporation, Helsinki, Finland), medidas lineares (em milímetros) foram realizadas paralelamente ao longo eixo do dente, considerando, nas faces mesial e distal, a distância entre a crista óssea alveolar e a junção cimento-esmalte e, por outro lado, a mensuração equidistante na região de furca levou em consideração a distância entre a crista óssea alveolar do septo interradicular e a superfície do bulbo dental. A média aritmética das quatro mensurações foi realizada para cada animal e, em seguida, os valores foram expressos em média para cada grupo experimental para que fosse possível quantificar o nível ósseo ao redor do elemento dental e, conseqüentemente, avaliar a perda óssea alveolar.

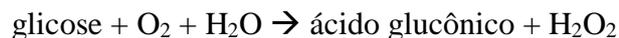
### **3.3 Análise histológica da perda óssea alveolar**

Após a radiografia, as hemi-mandíbulas foram submetidas à desmineralização em 10% de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) por 60 dias. Em seguida, as amostras foram processadas de maneira convencional seccionadas em micrótomo de parafina, coletadas sobre lâminas de vidro e coradas com hematoxilina e eosina (HE). Após esta etapa, foi realizada análise histológica do primeiro molar com doença periodontal induzida por ligadura, na qual foram considerados os seguintes parâmetros: presença de processo inflamatório,

extensão da inflamação nos tecidos periodontais, padrão de celularidade dos tecidos periodontais e padrão de estrutura da matriz extracelular do tecido periodontal.

### **3.4 Determinação da glicemia (método de glicose-oxidase)**

Esse é um método enzimático, específico para quantificação de glicose (Análise Diagnóstica, São Paulo, Brasil). No método de glicose-oxidase a glicose é oxidada enzimaticamente pela glicose oxidase (GOD) gerando ácido glucônico e água oxigenada. A  $H_2O_2$ , em presença de peroxidase (POD), produz a ligação oxidativa do fenol com a 4-amino fenazona (4-AF), dando origem a um cromógeno com máximo de absorção em 505nm de comprimento de onda. Devem ser consideradas as seguintes reações resumidas:



### **3.5 Determinação de insulinemia**

A insulinemia foi quantificada pelo método radioimunológico –RIE (Sensitive Rat Insulin, SRI-13K, Millipore, St Charles, MO, EUA). Em resumo, trata-se de uma reação de competição entre antígenos (insulina fria e insulina marcada) para ligação a um anticorpo específico. Essa reação obedece à lei da ação de massas. Portanto, quanto mais insulina fria estiver presente, mais será formado complexo insulina fria-anticorpo, acarretando queda na quantidade de complexo insulina marcada-anticorpo.

### **3.6 Análise do HOMA-IR**

A resistência à insulina foi avaliada por meio do índice HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment - Insulin Resistance / Modelo de Avaliação da Homeostase - Resistência à Insulina), calculado a partir da fórmula, como segue:  $HOMA - IR = \text{glicemia de jejum (mmol/L)} \times \text{insulinemia de jejum } (\mu\text{IU/ml}) / 22,5$  (BONORA *et al.*, 2000).

## **3.7 Avaliação das vias inflamatórias em tecido muscular esquelético**

### **3.7.1 Preparação das amostras**

Imediatamente após a extração, os tecidos foram homogeneizados em Polytron (24000 rpm durante 10 segundos) em 2 mL de tampão de extração (Tris 100 mM pH 7,5; EDTA 10 mM; SDS 1%; NaF 100 mM; Pirofosfato de Na 10 mM; Ortovanadato de Na 10 mM; 0,1mg/mL Aprotinina) e mantidos em banho-maria (100°C) durante 10 minutos,

transferidos para gelo e, então, centrifugados a 16000g durante 40 minutos (à 4°C). Do sobrenadante foram retiradas alíquotas para determinação da concentração protéica pelo método de Lowry *et al.*, (1951) modificado e para estoque em tampão desenvolvido por Laemmli (azul de bromofenol 0,1%; SDS 10 %; fosfato de sódio 1M pH 7,0; glicerol 50%; DTT 15%).

### 3.7.2 Western blotting

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

A primeira etapa do *Western blotting* consistiu na submissão das amostras (185 µg de proteína em cada poço) a uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Por meio deste método, foi possível separar proteínas de acordo com seu peso molecular, sem que as unidades proteicas fossem perdidas, permitindo estudos posteriores nessas frações proteicas. Foi utilizado o método desenvolvido por Laemmli e modificado por Garfin (1990), o qual envolve um sistema descontínuo de dois géis contínuos, mas diferentes em sua composição: 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 minutos. A eletroforese foi realizada em equipamento para minigel da Bio Rad (Mini- Protean, Bio Rad Laboratories, Richmond, CA. EUA), e começou com a corrida no gel de *stacking* sob voltagem constante em 30 mV até que ocorresse o empacotamento da amostra, o que pôde ser observado na transição dos géis. Posteriormente foi aplicada voltagem constante de 100 V para a corrida no gel de resolução, durante aproximadamente 2 horas. Juntamente com as amostras, sempre foi colocado um padrão de proteínas de conhecidos pesos moleculares (marcadores).

#### •Transferência eletroforética

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 2 horas, a 4°C, utilizando-se o tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, SDS 0,02%).

• ***Immunoblotting***

Após a transferência eletroforética, foi iniciado o processo de imunodeteção de proteínas específicas, desenvolvido por Kruger e Hammond (1988). A membrana de nitrocelulose foi, primeiramente, incubada na presença de solução bloqueadora (solução basal - SB - NaCl 150 mM; Tris 10 mM; Tween 20 0,02%; pH 7,2 - acrescida de 5% de leite desnatado em pó - 0% de gordura) durante 2 horas à temperatura ambiente, e então, lavada com solução basal por três sessões de 10 minutos cada. Em seguida, a membrana foi incubada em solução (SB + 3% de leite desnatado em pó - 0% de gordura) contendo os anticorpos p-IKK $\alpha$ / $\beta$ , p-JNK, p-ERK 1/2, p-NF- $\kappa$ B p65, p-NF- $\kappa$ B p50, TNF- $\alpha$  e p-NF- $\kappa$ B p65 e NF- $\kappa$ B p65 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, USA), na diluição de 1:1000, ou anticorpos  $\beta$ -actina, IKK $\alpha$ / $\beta$ , JNK, ERK 1/2 e NF- $\kappa$ B p50 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, USA), utilizados como controle endógeno, na diluição de 1:1000 por 4 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizadas três lavagens com solução basal, e as membranas foram incubadas em solução (SB + 1% de leite desnatado em pó - 0% de gordura) com segundo anticorpo contendo peroxidase de *horseradish* ("kit" de quimioluminescência - ECL - GE Healthcare Buckinghamshire, Alemanha), durante 1 hora em temperatura ambiente. Novamente, foram realizadas 3 lavagens das membranas de nitrocelulose com solução basal, com duração de 10 minutos 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 - GE Healthcare Buckinghamshire, Alemanha), e incubou-se por 1 minuto. Por fim, foi drenado o excesso de reagente e a membrana de nitrocelulose foi exposta a filme de RX (Hyperfilm ECL- GE Healthcare Buckinghamshire, Alemanha) dentro de um cassete para autorradiografia (GE Healthcare Buckinghamshire, Alemanha) à prova de luz, durante 10 minutos, em temperatura ambiente. O filme foi processado com solução reveladora e reforçadora GBX (Kodak Brasileira, São Paulo, Brasil) e solução fixadora e reforçadora GBX (Kodak Brasileira, São Paulo, Brasil). A intensidade dos *blots* foi avaliada por densitometria óptica, utilizando-se o programa Scion Image (Scion Image-Release Beta 3b, NIH, Frederick, MD, EUA).

## **3.8 Metodologia de quantificação do GLUT4 e do IRS1 por meio da técnica de “PCR em tempo real”**

### **3.8.1 Extração e quantificação do RNA total e transcrição reversa**

A extração de RNA total tecidual foi realizada por meio da adição do reagente Trizol LS (Invitrogen, USA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Para isso, após remoção do tecido, estas amostras permaneceram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o início dos experimentos. No momento do experimento, a essas amostras foram adicionados  $1000\ \mu\text{L}$  do reagente Trizol LS (Invitrogen) e, depois de homogeneizadas, foram adicionados  $200\ \mu\text{L}$  de clorofórmio (Merck, Germany) em cada amostra. Os tubos foram vigorosamente agitados por 30 segundos, e logo após, mantidos em repouso à temperatura ambiente, por 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a  $4^{\circ}\text{C}$  e  $13000\ \text{G}$ , por 15 minutos. Novos tubos foram nomeados de acordo com as amostras, e ao fim da centrifugação coletamos cerca de  $300\ \mu\text{L}$  da fase aquosa e colocamos no novo tubo. Em seguida, adicionamos nestes novos tubos  $500\ \mu\text{L}$  de álcool isopropílico (Merck), agitamos novamente e armazenamos à  $-20^{\circ}\text{C}$ . No dia seguinte, estas amostras descongeladas e centrifugadas a  $4^{\circ}\text{C}$  e  $13000\text{G}$  por 15 minutos, depois de retirado o álcool isopropílico, foram acrescentados  $500\ \mu\text{L}$  de etanol 75% (Merck). Após isso, as amostras foram agitadas e centrifugadas a  $4^{\circ}\text{C}$  e  $10000\ \text{G}$  por 10 minutos. Em seguida, desprezou-se o sobrenadante e os tubos foram colocados com a borda virada para baixo em uma superfície coberta com papel absorvente. Quando os tubos apresentaram-se secos, foram desvirados. Então foram acrescentados  $20\ \mu\text{L}$  de água DEPC para ressuspender o pellet. Por fim as amostras foram armazenadas à  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior quantificação.

A concentração de RNA total nas amostras foi determinada por leitura em espectrofotômetro aplicando-se  $1\ \mu\text{L}$  de cada amostra num dispositivo Nanodrop® (ThermoScientific, Wilmington, EUA). Foram consideradas as leituras nos comprimentos de onda de 280 e 260 nm. A concentração das amostras foi fornecida pelo equipamento em  $\text{ng}/\mu\text{L}$ .

A transcrição reversa das amostras de RNA em cDNA foi realizada por meio do kit comercial (SuperScript® II First-Strand Synthesis Super Mix for qRT-PCR, Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. A quantidade de RNA total de partida foi definida com base no volume máximo de amostra recomendado pelo fabricante ( $12\ \mu\text{L}$ ), multiplicado pela concentração da amostra que obteve menor rendimento.

### 3.8.2 PCR quantitativo

A expressão quantitativa do RNAm para os diferentes alvos foi realizada por meio de reações de PCR em tempo real, utilizando-se o sistema Taqman® (AppliedBiosystems, Life Technologies, EUA) em um aparelho Step One™ Real-Time PCR System (AppliedBiosystems, Life Technologies, United Kingdom). Para esta reação foram utilizadas sondas inventoriadas marcadas com fluoróforo FAM disponibilizados pela mesma empresa: *Slc2a4* (GLUT4 - Rn01752377\_m1) e *IRS1* (Rn02132493\_s1). Paralelamente, também foi realizada a amplificação do gene constitutivo com sonda inventoriada, marcada com o fluoróforo VIC, disponibilizada pela mesma empresa:  $\beta$ -actina (*Actb* -Rn00667869\_m1). Aliquotas de 0,5  $\mu$ L do DNA complementar sintetizado a partir do RNAm foram utilizadas juntamente com reagentes Taqman® Gene Expression Mastermix (AppliedBiosystems, Life Technologies, EUA), e as sondas inventoriadas, como determinado pelo fabricante, num volume final de reação de 10  $\mu$ L. A reação de amplificação compreendeu 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, e quarenta ciclos de 15 s a 95 °C e 1 min a 60 °C, conforme recomendado pela empresa. Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (ciclethreshold – ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclo a partir do qual a amplificação atinge um dado limiar que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. As médias dos valores de Ct de medidas em duplicatas foram utilizadas para calcular a expressão do gene alvo, com normalização em relação ao controle interno ( $\beta$ -actina), e então comparadas com um controle alvo interno de uma amostra do grupo de células não estimuladas obtendo-se assim o cálculo do aumento da expressão, utilizando a fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Uma amostra negativa (água), também foi submetida à reação.

## 3.9 Avaliação do grau de metilação do DNA na região promotora do gene do GLUT4 em músculo esquelético

### 3.9.1 Extração do DNA e Análise de Dados

A extração do DNA genômico do MG foi realizada utilizando-se coluna de sílica e métodos disponibilizados pelo DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha). Para isolar o gDNA do tecido muscular foram utilizados 25mg conforme as instruções do fabricante. O gDNA isolado foi quantificado pela densidade óptica de absorbância a 260nm no espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, EUA). A metilação foi mostrada como uma porcentagem de DNA digerido sobre não digerido, com base na mudança de Ct obtida para cada enzima e para cada par de primers.

### 3.9.2 Desenho do oligos iniciadores (primers)

O gene de interesse foi localizado no banco de dados genome.ucsc.edu. Com auxílio do genome.ucsc.edu os sítios de restrição das enzimas sensíveis à metilação (HhaI, HpaII) e uma dependente de metilação (McrBC) foram localizados no gene. Com os sítios de restrição das enzimas identificados no DNA de interesse, os iniciadores foram concebidos para flanquear estes locais de restrição. O software utilizado para desenhar os primers foi o Primer3 (v. 0.4.0) (Tabela 1), evitando regiões repetidas e semelhanças com outras regiões genômicas não específicas. As regiões específicas do gene foram escolhidas para conter os locais de reconhecimento de todas as três enzimas empregadas e acordo com os artigos Liu *et al.* (2013) e Raychaudhuri *et al.* (2014).

**Table 1 - Sequências dos primers usados para análise quantitativa de metilação (qAMP) de GLUT4 (*Slc2a4*) na prole adulta**

| Nome do Oligo | <i>Forward 5'-3'</i>     | <i>Reverse 5'-3'</i>     | Posição          |
|---------------|--------------------------|--------------------------|------------------|
| Prom 1        | GGCCTAGAAAGCCT<br>TGCACT | CACAGTCTACTGGCCCATCC     | -897 a -<br>1141 |
| Prom 2        | CCCTTTAAGGCTCC<br>ATCTCC | GAAACAATGCCCCGAAGTA<br>A | -653 a -<br>743  |
| Prom 3        | CTTCAGCTCTCCGC<br>ATCTTT | TGAACCAGATTCCCCAATTC     | +23 a -227       |

Fonte: do autor

### 3.9.3 Restriction Digestion and Real-Time PCR (qAMP)

A partir dessa análise foi possível realizar uma avaliação quantitativa do grau de metilação dos sítios CpG de forma rápida e econômica, sem a necessidade da modificação do DNA por bissulfato de sódio (OAKES *et al.*, 2009). Em resumo, foram utilizadas enzimas de restrição sensíveis à metilação (MSREs) e uma endonuclease de restrição dependente da metilação (MDRE). Essas enzimas identificam sítios de restrição na sequência de DNA de interesse e os primers foram concebidos para flanquear esses sítios de restrição. O conjunto de *templates* de PCR criado para cada amostra de DNA foi composto por tubos separados de DNA de igual concentração que foram digeridos com uma única enzima de restrição. Os grupos de digestão dos sítios foram compostos por enzimas de restrição e foram divididos em três categorias: 1) grupo Sham - uma digestão simulada sem enzima; 2) o grupo de digestão MSRE - o DNA é clivado, se o sítio de restrição não estiver metilado; e 3) o grupo de digestão, MDRE - o DNA é clivado apenas se metilado. Amplificação por PCR em tempo real de cada modelo foi executado, produzindo valores de limiar de ciclo (Ct) que foram

utilizados para calcular a percentagem de metilação do DNA em determinado local de restrição (OAKES *et al.*, 2009).

### 3.10 Análise estatística

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

1) Para análise da ingestão alimentar, da massa corpórea dos ratos (durante os 75 dias de vida) e do grau de metilação de DNA, foi verificada a normalidade do conjunto de dados analisados por meio do teste de *Shapiro-Wilk*. As análises estatísticas foram realizadas por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey. As diferenças entre os grupos foram consideradas significantes quando  $p < 0,05$ .

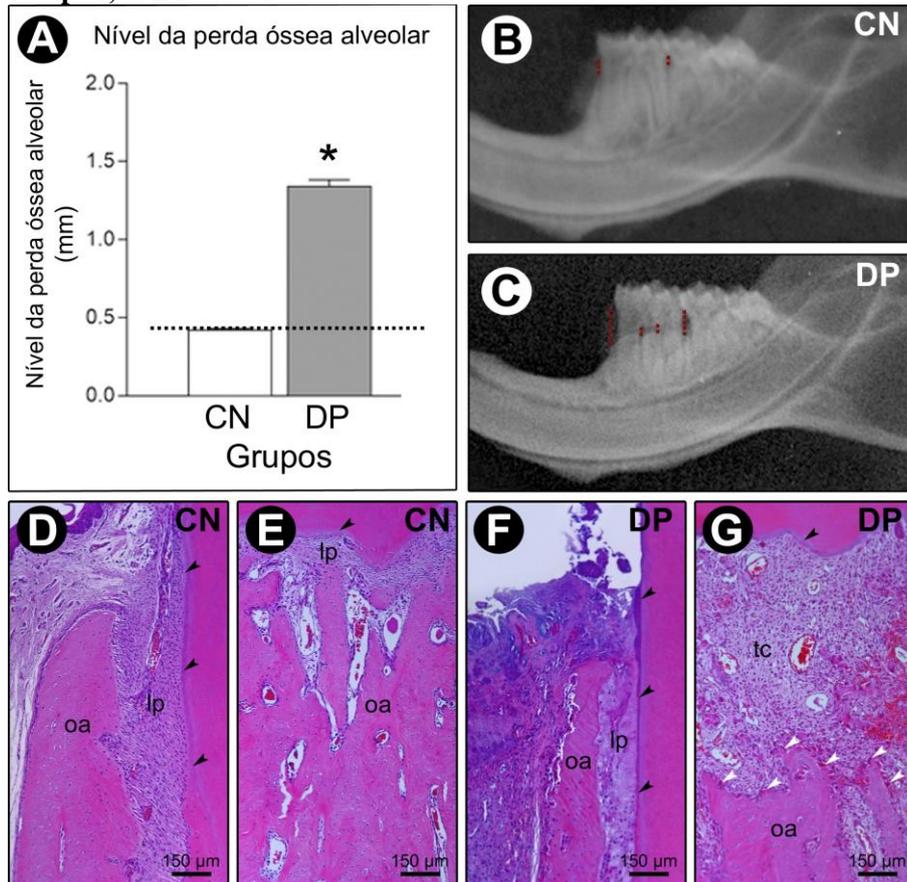
2) Para a análise das vias inflamatórias, massa corpórea ao nascimento, glicemia em jejum, insulinemia, HOMA-IR, expressão do RNAm (*Slc2a4* e *IRS1*), foi também verificada a normalidade do conjunto de dados analisados por meio do teste de *Shapiro-Wilk*. As análises estatísticas foram analisadas pelo teste *t* de *Student*. As análises estatísticas foram realizadas com o programa estatístico Graph Pad Prism (version 5.0). As diferenças entre os grupos foram consideradas significantes quando  $p < 0,05$ .

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Análise radiográfica e histológica dos tecidos periodontais das mães**

A análise das mensurações lineares (distância entre a crista óssea alveolar e a junção cimento-esmalte nas faces mesial e distal; e entre a crista óssea alveolar do septo interradicular e o bulbo dental) realizadas sobre as radiografias mostrou que a média das medidas (Figura 1A) no grupo DP foi maior que no grupo CN, confirmando a presença de perda óssea alveolar (Figura 1A, B e C). A análise histológica revelou um padrão de celularidade e estrutura dos tecidos periodontais compatíveis com a normalidade no grupo CN (Figura 1D e E). No grupo DP, a presença de infiltrado inflamatório foi observada na face mesial e distal e na região de furca do primeiro molar inferior (Figura 1F e G). Foram observadas destruição do ligamento periodontal e perda óssea alveolar associada a locais onde o processo inflamatório estava presente (Figura 1F). Uma alta quantidade de osteoclastos estavam presentes nesses locais (Figura 1G). A perda óssea alveolar demonstrada pela avaliação radiográfica associada à presença do processo infeccioso-inflamatório e a desintegração dos tecidos periodontais demonstrada pela avaliação histológica confirmaram a indução e manutenção da doença periodontal no grupo DP (Figura 1).

Figura 1 – Gráfico (Figura 1A) mostra que a média das medidas (distância entre a crista óssea alveolar e a junção cimento-esmalte nas faces mesial e distal; e distância da crista óssea alveolar do septo interradicular e o bulbo dental na região de furca) no grupo DP foi maior que no grupo CN, confirmando a perda óssea alveolar. A figura apresenta análises radiográficas e histológicas dos primeiros molares inferiores no grupo controle (CN) (Figura 1B, 1D e 1E) e no grupo doença periodontal (DP) (Figura 1C, 1F e 1G). Observa-se que os aspectos radiográficos (1B) e histológicos (Figura 1D e 1E) são compatíveis com um padrão normal no grupo CN, e o que grupo DP apresenta perda óssea alveolar (Figura 1C e 1F) e uma grave resposta inflamatória local (Figura 1F e 1G). Abreviações e símbolos: oa, osso alveolar; tc, tecido conjuntivo; lp, ligamento periodontal. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM, n = 7. \*  $p < 0,05$  DP vs. CN

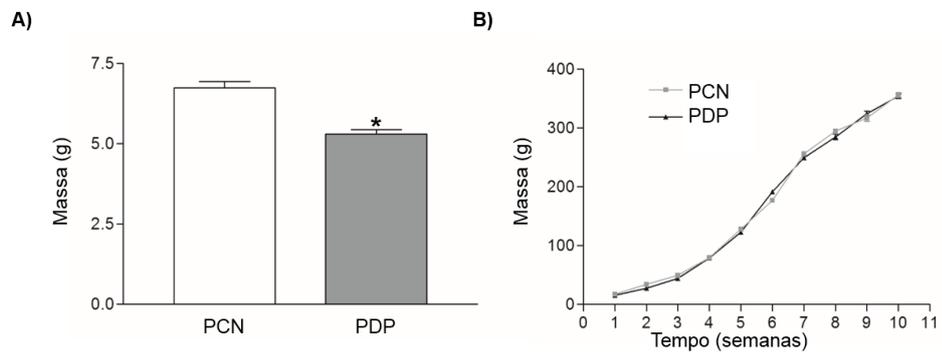


Fonte: do autor

## 4.2 Avaliação da massa corpórea (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 até 75 dias de idade. Houve diferença estatística na massa corpórea ao nascimento (Figura 2A), porém não houve diferença nestes parâmetros entre os grupos até os 75 dias (Figura 2B).

**Figura 2 – A) Massa corpórea ao nascimento de ratos, proles de ratas controle (PCN) e proles de ratas com doença periodontal (PDP). B) Massa corpórea semanal de ratos, PCN e PDP, semanalmente, até 75 dias de idade. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM, n = 19. \* p<0,05 PDP vs. PCN**

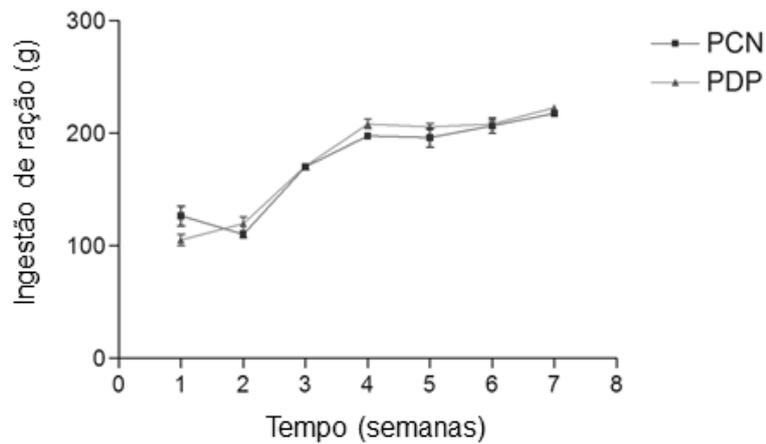


Fonte: do autor

### 4.3 Ingestão alimentar

A Figura 3 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 3 - 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  $\pm$  EPM, n=19.**



Fonte: do autor

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

A Tabela 2 mostra as glicemias, insulinemias e os valores de HOMA-IR dos grupos PCN e PDP. Não houve diferença significativa entre os grupos nas concentrações plasmáticas de glicose, porém houve entre as insulinemias e os valores de HOMA-IR.

**Tabela 2 – Glicemia (mmol/L), insulinemia ( $\mu$ UI/mL) e HOMA-IR**

| Parâmetros                 | PCN              | PDP               |
|----------------------------|------------------|-------------------|
| Glicemia (mmol/L)          | 5,16 $\pm$ 0,16  | 6,01 $\pm$ 0,55   |
| Insulinemia ( $\mu$ IU/mL) | 12,61 $\pm$ 2,35 | 27,87 $\pm$ 4,99* |
| HOMA-IR                    | 2,91 $\pm$ 0,58  | 7,98 $\pm$ 2,13*  |

Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM, n =7. \*p<0,05

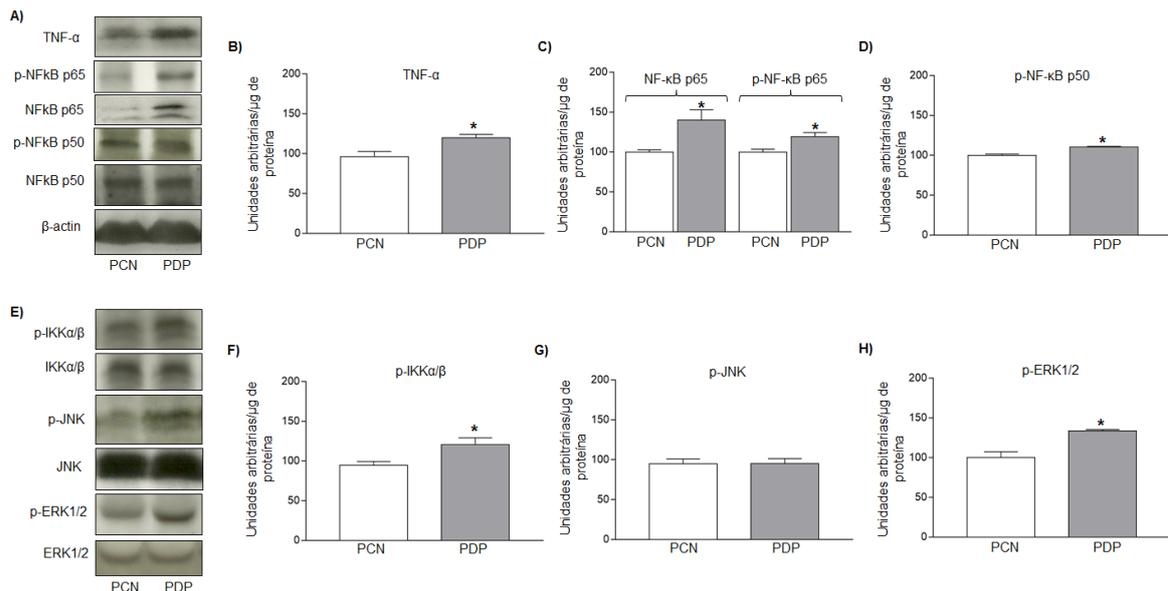
Fonte: do autor

## 4.5 Avaliação das vias inflamatórias

As Figuras 4A e E mostram autorradiografias típicas referente ao conteúdo e/ou ao grau de fosforilação de TNF- $\alpha$  e IKK $\alpha/\beta$ , JNK, ERK 1/2, NF- $\kappa$ B p65 e NF- $\kappa$ B p50, em tecido muscular dos grupos PCN e PDP. As Figuras 4B, C, D, F, G e H mostram os resultados, expressos em unidades arbitrárias por  $\mu$ g de proteína amostrada.

Os conteúdos de TNF- $\alpha$  e NF- $\kappa$ B p65 no MG foram significativamente maiores no grupo PDP em comparação ao grupo PCN (Figura 4A, B e C). Os graus de fosforilação de IKK $\alpha/\beta$ , ERK 1/2, NF- $\kappa$ B p65 e NF- $\kappa$ B p50 foram significativamente maiores no grupo PDP, enquanto não foram observadas diferenças no grau de fosforilação da JNK entre os grupos no MG (Figura 4C, D, E, F, G e H).

**Figura 4 – Avaliação do conteúdo e/ou o grau de fosforilação TNF- $\alpha$ , IKK $\alpha/\beta$ , JNK, ERK 1/2, NF- $\kappa$ B p65 (conteúdo e grau de fosforilação) e NF- $\kappa$ B p50 no músculo gastrocnêmio de ratos adultos, proles de ratas controle (PCN) e de ratas com doença periodontal (PDP). (A e E) Autorradiografias típicas: quantidades iguais de proteína foram submetidas à SDS-PAGE (185  $\mu$ g). Utilizou-se como controle:  $\beta$ -actina, IKK $\alpha/\beta$ , JNK, ERK 1/2 e NF- $\kappa$ B p50. (B, C, D, F, G e H) Conteúdo e/ou ao grau de fosforilação TNF- $\alpha$  e IKK $\alpha/\beta$ , JNK, ERK 1/2, NF- $\kappa$ B p65 (conteúdo e grau de fosforilação) e NF- $\kappa$ B p50 (expresso em unidades arbitrárias) são apresentadas como a média  $\pm$  EPM, n = 7. \* p<0,05 PDP vs. PCN**

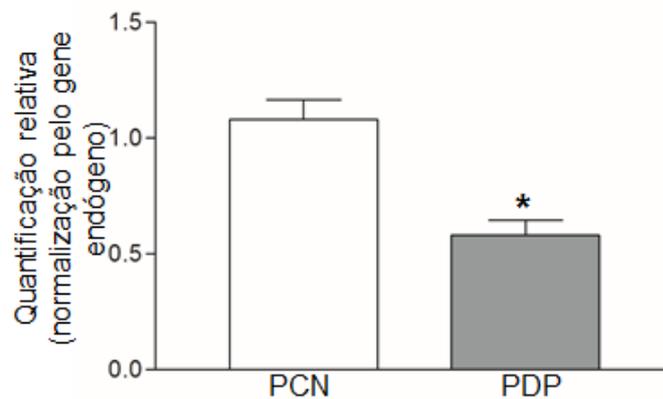


Fonte: do autor

#### 4.6 Avaliação da expressão gênica de *Slc2a4* e do *IRS1* em tecido muscular esquelético gastrocnêmio

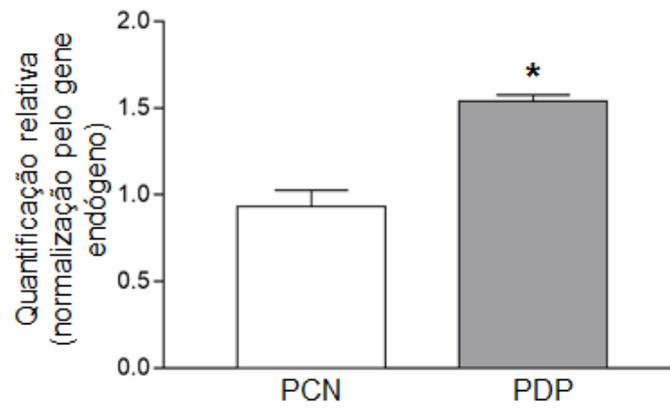
O grupo PDP apresentou uma diminuição ( $p < 0,05$ ) na expressão gênica da proteína transportadora de glicose (GLUT4) comparado ao grupo PCN (Figura 5). Entretanto, ao avaliarmos a expressão gênica do *IRS1* (Figura 6) foi observado um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no grupo PDP em relação ao grupo PCN.

**Figura 5 - Avaliação da expressão gênica da proteína transportadora de glicose GLUT4 (*Slc2a4*) em tecido muscular esquelético gastrocnêmio de ratos adultos, proles de ratas controle (PCN) e de ratas com doença periodontal (PDP).  $\beta$ -actina foi utilizada como gene endógeno. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  EPM,  $n=5$ . \*  $p < 0,05$  PDP vs. PCN**



Fonte: do autor

**Figura 6 - Avaliação da expressão gênica substrato 1 do receptor de insulina (*IRS1*) em tecido muscular esquelético gastrocnêmio de ratos adultos proles de ratas controle (PCN) e de ratas com doença periodontal (PDP).  $\beta$ -actina foi utilizada como gene endógeno. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  EPM, n=5. \*  $p < 0,05$  PDP vs. PCN**

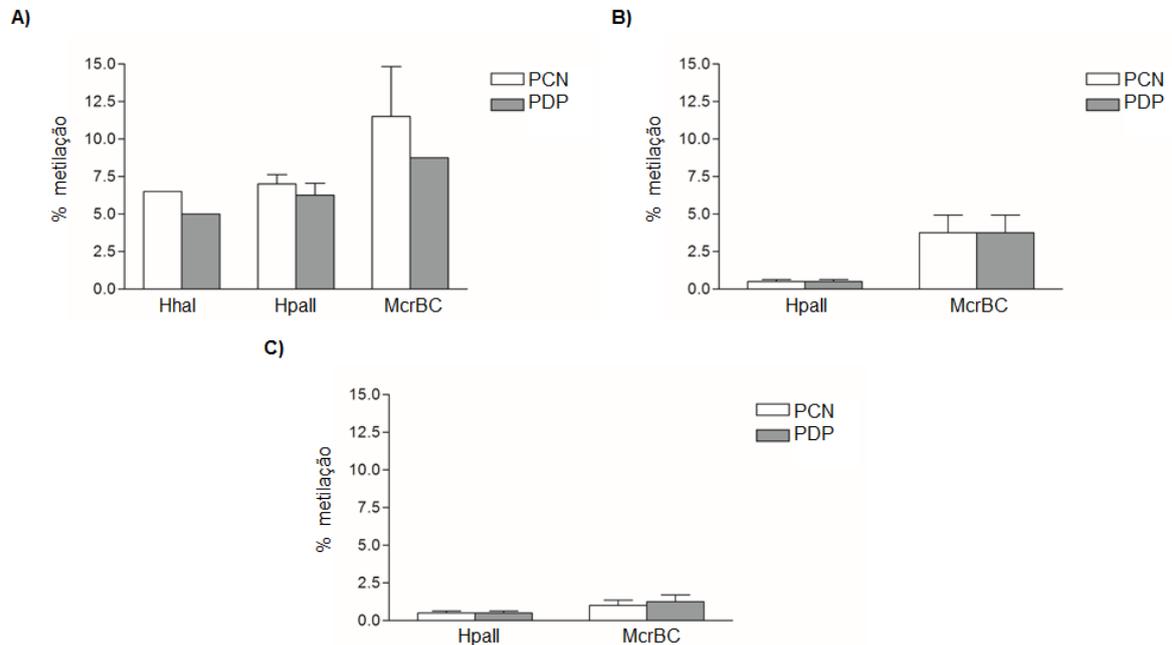


Fonte: do autor

## 4.7 Avaliação da metilação do DNA de *Slc2a4* em tecido muscular esquelético gastrocnêmio

A Figura 7 mostra os resultados para a metilação do DNA de GLUT4 (*Slc2a4*) em MG nos grupos PCN e PDP. Foram analisadas três regiões separadas dentro do promotor proximal, denominadas prom 1, prom 2 e prom 3, do gene *Slc2a4*. Não foram encontradas diferenças nos níveis de metilação entre os grupos.

**Figura 7 – Avaliação da metilação do DNA de GLUT4 (*Slc2a4*) em tecido muscular esquelético gastrocnêmio de ratos adultos proles de ratas controle (PCN) e de ratas com doença periodontal (PDP). Empregando dois sítios de restrição de enzimas sensíveis à metilação (HhaI e HpaII) e uma enzima dependente de metilação (McrBC), (A, B e C) em três regiões separadas dentro do promotor proximal, denominadas prom 1 (Figura 7A), prom 2 (Figura 7B) e prom 3 (Figura 7C), do gene *Slc2a4*. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM, n=4.**



Fonte: do autor

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que a doença periodontal (DP) materna promove na sua prole adulta BPN; resistência insulínica; aumento do grau de fosforilação das proteínas IKK $\alpha/\beta$ , ERK 1/2, NF- $\kappa$ Bp65 e NF- $\kappa$ Bp50 em tecido muscular gastrocnêmio (MG); incremento do conteúdo total do NF- $\kappa$ Bp65 e TNF- $\alpha$  em MG; diminuição na expressão gênica de *Slc2a4* e aumento na expressão gênica do *IRS1* em MG. Porém não promove nessa prole adulta alterações no grau de metilação do DNA, na região promotora do gene de *Slc2a4*, e no grau de fosforilação da proteína JNK em MG.

O presente estudo utilizou o modelo de DP induzida por ligadura em ratas. As imagens radiográficas e histológicas e o nível da perda óssea alveolar (Figura 1) demonstraram que a indução desta doença foi efetiva. Existem modelos de indução de doença periodontal nos quais, além da realização da ligadura, realiza-se a inoculação de *Porphyromonas gingivalis*. Um estudo demonstrou que este modelo de indução com inoculação bacteriana também é efetivo, contudo, produz menor perda óssea se comparado ao modelo no qual se insere apenas a ligadura (MEULMAN *et al.*, 2011). Ademais, a perda óssea, no modelo de DP induzida por ligadura, pode ser observada a partir do sétimo dia após a indução (RODINI, 2005).

Conforme descrito anteriormente, a DP é ocasionada por bactérias gram-negativas que agem na circulação sanguínea levando à produção de PGE2 e TNF- $\alpha$  que podem representar uma ameaça potencial à unidade fetal-placentária (OFFENBACHER *et al.*, 1996) e podem promover PTB e BPN (GANDHIMADHI; MYTHILI, 2010).

No presente estudo, observou-se que DP materna promoveu BPN (Figura 2A). 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).

Conforme comentado anteriormente, segundo Offenbacher *et al.* (2005), a infecção por *Campylobacter rectus* (uma bactéria presente na periodontite) em ratos induz uma redução no tamanho do labirinto placentário. E modificações na estrutura do labirinto placentário podem promover um suprimento insuficiente para o feto e, portanto, um crescimento prejudicado e BPN (MADIANOS *et al.*, 2013). Ademais, infecções subcutâneas localizadas por *Porphyromonas gingivalis* (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) e Mattera *et al.* (2016).

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 2B) e, após o desmame, também não apresentaram diferença na ingestão alimentar (Figura 3). 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).

No presente estudo observamos aumento de insulinemia, nenhuma alteração na glicemia e redução na sensibilidade insulínica, avaliada pelo índice de HOMA-IR, no grupo PDP em relação ao grupo PCN (Tabela 2). Estes resultados estão de acordo com a teoria *fetal salvage*, no qual o feto desnutrido desenvolve resistência à insulina periférica, por meio de uma redistribuição de nutrientes, tais como a glicose, a favor de órgãos essenciais, como o cérebro, levando à redução permanente da função ou do número de transportador de glicose do músculo esquelético. Em consequência desta diminuição da sensibilidade periférica à insulina há um estímulo nas células  $\beta$  para produzir quantidades maiores de insulina para atingir a glicemia normal. Se isso se mantiver durante um período prolongado pode ocorrer um esgotamento de células  $\beta$  (HOFMAN *et al.*, 1997; CIANFARANI; GERMANI; BRANCA, 1999). Ademais, resultados similares foram observados no estudo de Tsosura *et al.* (2019), os quais relataram que ratos adultos, proles de ratas com lesão periapical (outra inflamação oral) apresentaram aumento da insulinemia e resistência insulínica.

Mattera *et al.* (2016) demonstraram, em ratos, que a DP materna promoveu em sua prole adulta alterações na etapa inicial e final da sinalização insulínica e um aumento nas concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$ . No presente estudo observamos aumento da expressão do conteúdo total de TNF- $\alpha$  (Figura 4B) no tecido muscular de ratos adultos, proles de ratas com DP, complementando os estudos de Mattera *et al.* (2016).

O TNF- $\alpha$  é capaz de ativar vias intracelulares da JNK, ERK1/2 e do I $\kappa$ B kinase  $\beta$ /fator nuclear  $\kappa$ B (IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B) (PLOMGAARD *et al.*, 2005; SHOELSON; LEE;

GOLDFINE, 2006). No músculo esquelético, o aumento da ativação do IKK $\beta$  aumenta expressão de NF- $\kappa$ B e este gene pode inibir a expressão de GLUT4 (RAYCHAUDHURI *et al.*, 2008).

O NF- $\kappa$ B pode ser ativado por vias como: a via não-canônica e a via canônica. A via alternativa ou não-canônica é ativada por meio da fosforilação da quinase NIK (*NF- $\kappa$ B-inducing kinase*), que promove a ativação do complexo IKK e a translocação dos dímeros do NF- $\kappa$ B para o núcleo (SRIVASTAVA; RAMANA, 2009). Esta via é ativada por um grupo mais restrito de citocinas. Na via clássica ou canônica, a ligação do ligante específico ao receptor promove a ativação do complexo quinase I $\kappa$ B (IKK), que contém a ação das subunidades catalíticas quinases (IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ ) e a subunidade reguladora (NEMO/IKK $\gamma$ ) que conduz à fosforilação de I $\kappa$ B. Após a degradação do I $\kappa$ B, os dímeros do NF- $\kappa$ B (p50 e p65) são translocados para o núcleo promovendo a transcrição de citocinas inflamatórias (SRIVASTAVA; RAMANA, 2009). Proteínas como IKK e JNK inibem a ação da insulina por meio da fosforilação em serina do IRS1 (SCHENK *et al.*, 2008). O NF- $\kappa$ B também tem um papel importante bloqueando a apoptose por meio da sua regulação positiva de moléculas anti-apoptóticas, incluindo XIAP (*X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein*), c-FLIP (*FLICE-like inhibitory protein*) e outras (BONNARD *et al.*, 2000; AOKI *et al.*, 2002; SCHWABE; BRENNER, 2006).

Ao avaliarmos o grau de fosforilação da proteína IKK $\alpha/\beta$  e ERK1/2, o grupo PDP apresentou um aumento do grau de fosforilação da proteína IKK $\alpha/\beta$  e ERK1/2 em relação ao grupo PCN (Figura 4F e 4H). Porém, não houve diferença no grau de fosforilação da proteína JNK entre os grupos (Figura 4G).

Estudos demonstraram que a ativação da JNK promove apoptose celular (SCHWABE e BRENNER, 2006). E o NF- $\kappa$ B pode atenuar a ativação de JNK induzida por TNF- $\alpha$ , representando um mecanismo importante pelo qual NF- $\kappa$ B bloqueia a morte celular (DE SMAELE *et al.*, 2001; TANG *et al.*, 2001; SCHWABE; BRENNER 2006). NF- $\kappa$ B ativa vários fatores que foram implicados na repressão da atividade de JNK, como por exemplo, os fatores de transcrição XIAP e GADD45 (*Growth Arrest and DNA-Damage Inducible 45*), bem como a enzima antioxidante *Superoxide Dismutase 2* -SOD2 (SCHWABE e BRENNER, 2006). Deste modo, a ativação não contínua de JNK via TNF- $\alpha$  pode proporcionar uma diminuição da apoptose celular (NAKANO, 2004).

O TNF- $\alpha$  exerce as suas funções biológicas por meio de interações com dois receptores cognitivos da membrana, TNF-R1 e TNF-R2. Embora o TNF- $\alpha$  possa atuar como um potente ativador, tanto das vias pró-inflamatórias como das pró-apoptóticas, estas vias de

sinalização interagem numa rede complexa em vários níveis e a ativação de uma via depende frequentemente da inativação de outra via, sugerindo que as células são capazes de dirigir o sinal induzido por TNF- $\alpha$  em direção à resposta apropriada (SCHWABE; BRENNER, 2006).

Estudos com animais mostram que a supressão de JNK e IKK resulta em menor infiltração de macrófagos, menor secreção de adipocinas pró-inflamatórias, diminuição na fosforilação de IRS1 em resíduos de serina, assim aumentando a sensibilidade à insulina desses animais (ZANG *et al.*, 2018; JIANG *et al.*, 2018). Em decorrência disto, essas vias estão sendo os principais alvos de estudo no combate à obesidade e à resistência insulínica (ZANG *et al.*, 2018; JIANG *et al.*, 2018).

Uma proteína importante para sinalização insulínica é o GLUT4. Esta proteína é responsável pela captação de glicose mediada por insulina no tecido adiposo, músculo esquelético e coração (RÜEGG *et al.*, 2011). Após a estimulação da insulina, o GLUT4 transloca-se dos estoques intracelulares para a membrana plasmática e medeia a entrada de glicose na célula (KAHN, 1996). A atividade de GLUT4 é regulada tanto pela sua translocação para a membrana plasmática quanto pelo seu nível de expressão gênica (IM *et al.*, 2007). Estudos em ratos mostraram que a perda da expressão de GLUT4 leva à diminuição da sensibilidade à insulina, enquanto a superexpressão de GLUT4 em ratos resistentes à insulina restaura a sensibilidade à mesma (GRAHAM; KAHN, 2007).

Ao avaliarmos a expressão gênica de *Slc2a4* em tecido muscular esquelético, o grupo PDP apresentou diminuição da expressão deste gene em relação ao grupo PCN (Figura 5). Conforme mencionado anteriormente, no músculo esquelético, o aumento da ativação do IKK $\beta$  aumenta expressão de NF- $\kappa$ B e este gene pode inibir a expressão de GLUT4 (RAYCHAUDHURI *et al.*, 2008). Ademais, conforme descrito anteriormente, foi demonstrado que a região promotora do gene *Slc2a4* apresenta sequências (-134/-112 e -82/-60 no gene do camundongo) às quais tanto a subunidade p50 como a p65 do NF- $\kappa$ B são capazes de se ligar e agir como repressor direto da atividade transcricional do *Slc2a4*, ocasionando a diminuição da expressão de GLUT4 (FURUYA *et al.*, 2013; SILVA, 2013). No presente estudo, ambas as subunidades, tanto p50 como a p65 do NF- $\kappa$ B, tinham aumento no grau de fosforilação em tecido muscular (Figura 4C e 4D).

Entretanto, quando avaliamos a expressão de *IRS1* (Figura 6), observamos que o grupo PDP apresentou uma maior expressão de *IRS1* no tecido muscular. Este resultado pode ser devido a um mecanismo compensatório, ou seja, para equilibrar a resistência à insulina e diminuição da expressão gênica de GLUT4 encontrada no grupo PDP, o organismo tende a

contrabalançar essas mudanças com um aumento da expressão de *IRS1*, uma vez que este substrato é importante para a regulação do sinal insulínico e da ativação de GLUT4.

Conforme descrito anteriormente, outros mecanismos que podem modificar a expressão de genes são os mecanismos epigenéticos. Há pelo menos dois possíveis mecanismos envolvidos na epigenética: modificações de histonas e metilação do DNA. Estas alterações podem ocorrer durante a embriogênese ou início da vida pós-natal (BAYLIN, 2005; BÄCKDAHL *et al.*, 2009). A metilação do DNA pode impedir a interação de fatores de transcrição no promotor do gene, inibindo efetivamente a transcrição (BAYLIN, 2005; BÄCKDAHL *et al.*, 2009).

A expressão de GLUT4 está sob regulação epigenética, e estudos mostraram que a desmetilação do DNA pode desempenhar um papel na ativação da expressão de GLUT4 durante a adipogênese (RÜEGG *et al.*, 2011).

Ratos machos com RCIU e *catch-up grown* (RCIU-CG) apresentaram susceptibilidade aumentada ao DM e menor expressão (gênica e proteica) das moléculas (*IRS2*, *IRS1* e GLUT4) importantes para a via de sinalização insulínica (DUAN *et al.*, 2017). Para elucidar o mecanismo da regulação negativa desses genes, os autores examinaram os padrões de metilação nas regiões promotoras dos genes *IRS2*, *IRS1* e GLUT4 (DUAN *et al.*, 2017). Estas regiões mostraram diferentes padrões de metilação nas ilhas CpG. O perfil de metilação do gene *IRS2* apresentou hipermetilação relativamente moderada; o gene *IRS1* mostrou leve hipermetilação, enquanto não foram observadas diferenças no padrão de metilação no gene do GLUT4 em ratos machos RCIU-CG comparado ao grupo controle. Os perfis de metilação desses três genes não mostraram uma relação unânime com seus padrões de expressão, o que pode sugerir que eles têm uma regulação epigenética diferente (DUAN *et al.*, 2017). Ademais, ratos fêmeas (18 meses de idade) com RCIU mostraram intolerância à glicose e reduções significativas nas expressões de GLUT4 e no coativador-1 $\alpha$  do receptor ativado por proliferador de peroxissoma  $\gamma$  (PGC-1 $\alpha$ ) no tecido muscular esquelético, mas apenas o nível médio de metilação da ilha CpG do promotor PGC-1 $\alpha$  foi significativamente aumentado (ZENG *et al.*, 2013).

No presente estudo avaliamos o grau de metilação do DNA na região promotora do gene de GLUT4 e conforme apresentado na Figura 7 não houve diferença no grau de metilação do DNA. Com base nestes resultados, podemos inferir que a DP materna promove a diminuição da expressão gênica de GLUT4 por meio da ativação de vias inflamatórias e não por metilação do DNA nas regiões estudadas.

Em suma, podemos afirmar que alterações na etapa inicial e final da sinalização insulínica encontrada no grupo PDP, em estudos anteriores, podem ter sido decorrentes do aumento do conteúdo total de TNF- $\alpha$  e aumento do grau de fosforilação da proteínas IKK $\alpha/\beta$ , ERK 1/2, NF- $\kappa$ Bp65 (conteúdo total e grau de fosforilação) e NF- $\kappa$ Bp50 em MG no grupo PDP, uma vez que a ativação dessas proteínas inibe a ação da insulina.

Portanto, estes resultados demonstram o impacto que a DP tem em curto prazo sobre a vida intrauterina, e em longo prazo na predisposição a certas doenças na fase adulta da prole. Isso reforça a importância que a manutenção da saúde bucal materna tem sobre a saúde geral da prole.

## 6 RESUMO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS

A doença periodontal materna em sua prole:

- promoveu baixo peso ao nascimento;
- não alterou a massa corpórea do nascimento até 75 dias de idade;
- não alterou a ingestão alimentar;
- não alterou as concentrações plasmáticas de glicose;
- promoveu aumento das concentrações plasmáticas de insulina;
- ocasionou resistência insulínica;
- aumentou o grau de fosforilação do IKK $\alpha/\beta$ , ERK 1/2, NF- $\kappa$ B p65 (conteúdo total e grau de fosforilação) e NF- $\kappa$ B p50 em MG;
- não alterou o grau de fosforilação de JNK em MG;
- aumentou a expressão de mRNA do *IRS1* em MG;
- diminuiu a expressão de mRNA do *Slc2a4* (GLUT4) em MG;
- não promoveu diferenças nos níveis de metilação do *Slc2a4* em MG.

## 7 CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A DP materna em sua prole promoveu: baixo peso ao nascimento (BPN); resistência à insulina; ativação de vias inflamatórias; diminuição da expressão de *Slc2a4* (GLUT4); um aumento da expressão gênica do *IRS1*. Essas alterações foram independentes das mudanças na metilação do DNA do *Slc2a4* (nas regiões estudadas) ou do grau de fosforilação JNK no tecido muscular esquelético gastrocnêmio na prole adulta. Portanto, este estudo é de fundamental importância para o entendimento de alguns dos mecanismos envolvidos na relação entre DP materna e resistência à insulina na prole adulta. Além disso, mostra que a saúde bucal materna ideal pode ajudar a prevenir desfechos gestacionais adversos, como BPN, e doenças futuras na prole adulta.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- 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.
- ALMEIDA ABDO, J. et al. Influence of dyslipidemia and diabetes mellitus on chronic periodontal disease. **J. Periodontol.**, v. 84, n. 10, p. 1401-1408, Oct. 2013.
- AMARILYO, G. et al. Increased cord serum inflammatory markers in small-for-gestational-age neonates. **J. Perinatol.**, v. 31, n. 1, p. 30-32, Jan. 2011.
- ARAKI, E. et al. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS1 gene. **Nature**, v. 372, n. 6502, p. 186-190, Nov. 1994.
- AOKI, H. et al. Direct activation of mitochondrial apoptosis machinery by c-Jun N-terminal kinase in adult cardiac myocytes. **J Biol Chem**, v. 277, n. 12, p. 10244-50, Sep. 2002.
- BARKER, D. J. Fetal origins of coronary heart disease. **BMJ**, v. 311, n. 6998, p. 171-174, Jul. 1995.
- BÄCKDAHL, L.; BUSHELL, A.; BECK, S. Inflammatory signalling as mediator of epigenetic modulation in tissue-specific chronic inflammation. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 41, n. 1, p. 176-84, Jan. 2009.
- BAYLIN, S. B. DNA methylation and gene silencing in cancer. **Nat. Clin. Pract. Oncol.**, v. 2 Suppl 1, p. S4-11, Dec. 2005.
- BELLACOSA, A. et al. Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. **Oncogene**, v. 17, n. 3, p. 313-325, Jul. 1998.
- BERGLUND, E. D. et al. Regulation of endogenous glucose production in glucose transporter 4 over-expressing mice. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e52355, 2012.
- BOERSMA, B.; WIT, J. M. Catch-up growth. **Endocr. Ver.**, v. 18, n. 5, p. 646-61, Oct. 1997.

BONNARD, M. et al. Deficiency of T2K leads to apoptotic liver degeneration and impaired NF-kappaB-dependent gene transcription. **EMBO J.**, v. 19, n. 18, p. 4976-85, Sep. 2000.

BONORA, E. et al. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. **Diabetes Care**, v. 23, n. 1, p. 57-63, Jan. 2000.

BORGGREVE, S. E.; DE VRIES, R.; DULLAART, R. P. 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.**, v. 33, n. 12, p. 1051-1069, Dec. 2003.

BORGNAKKE, W. S. et al. Effect of periodontal disease on diabetes: systematic review of epidemiologic observational evidence. **J. Periodontol.**, v. 84, n. 4 Suppl, p. S135-S152, Apr. 2013.

CARVALHEIRA, J. B. et al. Characterization of selective insulin resistance to insulin signaling in the hypothalamus of obese Zucker rats'. **Diabetes**, v. 51, p. A41, 2002.

CARVALHO, E. et al. Adipose-specific overexpression of GLUT4 reverses insulin resistance and diabetes in mice lacking GLUT4 selectively in muscle. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 289, n. 4, p. E551-E561, Oct. 2005.

CIANFARANI, S.; GERMANI, D.; BRANCA, F. Low birthweight and adult insulin resistance: the "catch-up growth" hypothesis. **Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.**, v. 81, n. 1, p. F71-F73, Jul. 1999.

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

DAVIS-DUSENBERY, B. N.; HATA, A. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. **J. Biochem**, v. 148, n. 4, p. 381-92, 2010.

DENTINO, A. et al. Principles of periodontology. **Periodontol. 2000**, v. 61, n. 1, p. 16-53, Feb. 2013.

DE SMAELE, E. et al. Induction of gadd45beta by NF-kappaB downregulates pro-apoptotic JNK signalling. **Nature**, v. 414, n. 6861, p. 308-13, Nov. 2001.

DUAN, C. et al. Decreased expression of GLUT4 in male CG-IUGR rats may play a vital role in their increased susceptibility to diabetes mellitus in adulthood. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 48, n. 10, p. 872-882, Feb. 2017.

EBINA, Y. 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**, v. 84, n. 3, p. 704-708, Feb. 1987.

ELNER, S. G. et al. Cytokines in proliferative diabetic retinopathy and proliferative vitreoretinopathy. **Curr. Eye Res.**, v. 14, n. 11, p. 1045-1053, Nov. 1995.

ERCAN, E. et al. Evaluation of periodontal pathogens in amniotic fluid and the role of periodontal disease in pre-term birth and low birth weight. **Acta Odontol. Scand.**, v. 71, n. 3-4, p. 553-559, May/Jul. 2013.

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.

FURUYA D. T. et al. Identification of nuclear factor- $\kappa$ B sites in the Slc2a4 gene promoter. **Mol Cell Endocrinol**, v. 370, p. 87-95, 2013.

GABBAY, M.; CESARINI, P. R.; DIB, S. A. Diabetes melito do tipo 2 na infância e adolescência: revisão da literatura. **J. Pediatr.**, v. 79, n. 3, p. 201-208, May/Jun. 2003.

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.

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

GRAHAM, T. E.; KAHN, B. B. Tissue-specific alterations of glucose transport and molecular mechanisms of intertissue communication in obesity and type 2 diabetes. **Horm. Metab. Res.**, v. 39, n. 10, p. 717-21, Oct. 2007.

GREEN, A. S.; ROZANCE, P. J.; LIMESAND, S. W. Consequences of a compromised intrauterine environment on islet function. **J. Endocrinol.**, v. 205, n. 3, p. 211-224, Jun. 2010.

GUAY, C.; REGAZZI, R. Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 9, n. 9, p. 513, 2013.

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.

HAN, Y. W. et al. Periodontal disease, atherosclerosis, adverse pregnancy outcomes, and head-and-neck cancer. **Adv. Dent. Res.**, v. 26, n. 1, p. 47-55, May 2014.

HARDIE, D. G. et al. Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. **FEBS Lett.**, v. 546, n. 1, p. 113-120, Jul. 2003.

HARDIE, D. G.; CARLING, D. The AMP-activated protein kinase-fuel gauge of the mammalian cell ? **Eur. J. Biochem.**, v. 246, n. 2, p. 259-273, Jun. 1997.

HAYASHI, T. et al. Evidence for 5' AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport. **Diabetes**, v. 47, n. 8, p. 1369-1373, Aug. 1998.

HERMSDORFF, H. H.; MONTEIRO, J. B. Gordura visceral, subcutânea ou intramuscular: onde está o problema? **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 48, n. 6, p. 803-811, Dec. 2004.

HERNÁNDEZ, M. et al. Host-pathogen interactions in progressive chronic periodontitis. **J. Dent. Res.**, v. 90, n. 10, p. 1164-1170, Oct. 2011.

HOFMAN, P. L. et al. Insulin resistance in short children with intrauterine growth retardation. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 82, n. 2, p. 402-406, Feb. 1997.

HOTAMISLIGIL, G. S. et al. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, v. 95, n. 5, p. 2409-2415, May 1995.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, n. 5091, p. 87-91, Jan. 1993.

HOTAMISLIGIL, G. S. et al. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 11, p. 4854-4858, May. 1994.

HORÁKOVÁ, D.; JANOUTOVÁ, G.; JANOUT, V. Insulin resistance and birth weight. **Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.**, v. 149, n. 1, p. 173-176, Jun. 2005.

IACOPINO, A. M. Diabetic periodontitis: possible lipid-induced defect in tissue repair through alteration of macrophage phenotype and function. **Oral Dis**, v. 1, n. 4, p. 214-229, Dec. 1995.

IDE, M.; PAPAPANOU, P. N. Epidemiology of association between maternal periodontal disease and adverse pregnancy outcomes--systematic review. **J. Clin. Periodontol.**, v. 40 Suppl 14, p. S181-94, Apr. 2013.

IM, S. S. et al. Regulation of glucose transporter type 4 isoform gene expression in muscle and adipocytes. **IUBMB Life**, v. 59, n. 3, p. 134-45, Dec. 2007.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. Diabetes Atlas 2017.

JEFFCOAT, M. et al. Periodontal infection and preterm birth: successful periodontal therapy reduces the risk of preterm birth. **BJOG**, v. 118, n. 2, p. 250-256, Jan. 2011.

JENSEN, T.; DECKERT, T. Diabetic retinopathy, nephropathy and neuropathy. Generalized vascular damage in insulin-dependent diabetic patients. **Horm. Metab. Res. Suppl.**, v. 26, p. 68-70, 1992.

JIANG, N.; LI, Y.; SHU, T.; WANG, J. Cytokines and inflammation in adipogenesis: an updated review. **Front Med.**, Aug. 2018.

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.

KAHN, B. B. Glucose Transport: Pivotal Step in Insulin Action. 1996.

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.

KANETY, H. et al. Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS1). Possible mechanism for suppression of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS1. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 40, p. 23780-23784, Oct. 1995.

KAROLINA, D. S. et al. Circulating miRNA profiles in patients with metabolic syndrome. **J. Clin Endocrinol Metab.**, v. 97, n. 12, p. E2271-6, 2012.

KASUGA, M. et al. The structure of insulin receptor and its subunits. Evidence for multiple nonreduced forms and a 210,000 possible proreceptor. **J. Biol. Chem.**, v. 257, n. 17, p. 10392-10399, Sep. 1982a.

KASUGA, M.; KARLSSON, F. A.; KAHN, C. R. Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. **Science**, v. 215, n. 4529, p. 185-187, Jan. 1982b.

KASUGA, M. et al. Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin receptor in a cell-free system. **Nature**, v. 298, n. 5875, p. 667-669, Aug. 1982c.

KATZ, E. B. et al. The metabolic consequences of altered glucose transporter expression in transgenic mice. **J. Mol. Med.**, v. 74, n. 11, p. 639-652, Nov. 1996.

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

KIM, V. N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 6, n. 5, p. 376-85, 2005.

KOHN, A. D.; TAKEUCHI, F.; ROTH, R. A. Akt, a pleckstrin homology domain containing kinase, is activated primarily by phosphorylation. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 36, p. 21920-21926, Sep. 1996.

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.

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

LALLA, E.; LAMSTER, I. B.; SCHMIDT, A. M. Enhanced interaction of advanced glycation end products with their cellular receptor RAGE: implications for the pathogenesis of accelerated periodontal disease in diabetes. **Ann. Periodontol.**, v. 3, n. 1, p. 13-19, Jul. 1998.

LANGLEY-EVANS, S. C.; MCMULLEN, S. Developmental origins of adult disease. **Med. Princ. Pract.**, v. 19, n. 2, p. 87-98, 2010.

LEGUISAMO, N. M. et al. GLUT4 content decreases along with insulin resistance and high levels of inflammatory markers in rats with metabolic syndrome. **Cardiovasc. Diabetol.**, v. 11, p. 100, 2012.

LEHNEN, A. M. et al. The beneficial effects of exercise in rodents are preserved after detraining: a phenomenon unrelated to GLUT4 expression. **Cardiovasc. Diabetol.**, v. 9, p. 67, 2010.

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. 383-396, Jun. 2012.

LIBMAN, I. M. et al. Insulin dependent diabetes mellitus in the 21st century and beyond a model disease for global health? (A review). **Diabetes Metab.**, v. 19, n. 1, Pt 2, p. 74-79, 1993.

LING, C.; GROOP, L. Epigenetics: a molecular link between environmental factors and type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 58, n. 12, p. 2718-2725, Dec. 2009.

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

LÖE, H. Periodontal disease: the sixth complication of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 16, n. 1, p. 3293-34, Jan. 1993.

LONGO, L. D. Epigenetics and the Fetal Origins of Adult Health and Disease. **SpringerLink**. 2019.

LOPES, K. L. et al. Perinatal salt restriction: a new pathway to programming adiposity indices in adult female Wistar rats. **Life Sci.**, v. 82, n. 13-14, p. 728-732, Mar. 2008.

- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, n. 1, p. 265-275, Nov. 1951.
- LUNARDELLI, A. N.; PERES, M. A. Is there an association between periodontal disease, prematurity and low birth weight? A population-based study. **J. Clin. Periodontol.**, v. 32, n. 9, p. 938-946, Sep. 2005.
- LUO, Z. C.; XIAO, L.; NUYT, A. M. Mechanisms of developmental programming of the metabolic syndrome and related disorders. **World J. Diabetes**, v. 1, n. 3, p. 89-98, Jul. 2010.
- MACHADO, U. F.; SCHAAN, B. D.; SERAPHIM, P. M. Transportadores de glicose na síndrome metabólica. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 50, n. 2, p. 177-189, Apr. 2006.
- 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.
- 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.
- MATTERA, M. S. et al. Maternal periodontitis decreases plasma membrane GLUT4 content in skeletal muscle of adult offspring. **Life Sci**, v. 148, p. 194-200, Mar 2016.
- MCGEE, S. L. et al. Exercise increases nuclear AMPK alpha2 in human skeletal muscle. **Diabetes**, v. 52, n. 4, p. 926-928, Apr. 2003.
- MEULMAN T. et al. Impact of Porphyromonas gingivalis inoculation on ligature-induced alveolar bone loss. A pilot study in rats. **J. Periodontal Res.**, v. 46, p. 629-36, May 2011.
- NAKANO, H. Signaling crosstalk between NF-kappaB and JNK. **Trends Immunol.**, v. 25, n. 8, p. 402-5, Aug. 2004.
- NIETO-VAZQUEZ, I. et al. Dual role of interleukin-6 in regulating insulin sensitivity in murine skeletal muscle. **Diabetes**, v. 57, n. 12, p. 3211-3221, Dec. 2008.
- OAKES, C. C. et al. Restriction digestion and real-time PCR (qAMP). **Methods Mol. Biol.**, v. 507, p. 271-80, 2009.

OECKINGHAUS A, GHOSH S. The NF- $\kappa$ B Family of Transcription Factors and Its Regulation. **Cold Spring Harb Perspect Biol.**, v. 1, p. 1-14, 2009.

OFFENBACHER S. et al. Effects of maternal *Campylobacter rectus* infection on murine placenta, fetal and neonatal survival, and brain development. **J. Periodontol.**, v. 76, p. 2133-2143, 2005.

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.

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.

PARK, J. H. et al. Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1. **J. Clin. Invest.**, v. 118, n. 6, p. 2316-2324, Jun. 2008.

PATTERSON, J. E.; ANDRIOLE, V. T. Bacterial urinary tract infections in diabetes. **Infect. Dis. Clin. North. Am.**, v. 11, n. 3, p. 735-750, Sep. 1997.

PEDERSEN, B. K.; FISCHER, C. P. Physiological roles of muscle-derived interleukin-6 in response to exercise. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, v. 10, n. 3, p. 265-271, May 2007.

PETERSEN, A. M.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **J. Appl. Physiol.**, v. 98, n. 4, p. 1154-1162, Apr. 2005.

PINNEY, S. E.; SIMMONS, R. A. Epigenetic mechanisms in the development of type 2 diabetes. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 21, n. 4, p. 223-229, Apr. 2010.

PLOMGAARD, P. et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces skeletal muscle insulin resistance in healthy human subjects via inhibition of Akt substrate 160 phosphorylation. **Diabetes**, v. 54, n. 10, p. 2939-2945, Oct. 2005.

POY, M. N. et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. **Nature**, v. 432, n. 7014, p. 226, 2004.

POZO, E. et al. Preterm birth and/or low birth weight are associated with periodontal disease and the increased placental immunohistochemical expression of inflammatory markers. **Histol. Histopathol.**, v. 31, n. 2, p. 231-7, Feb. 2016.

QURESHI, A. et al. Periodontal infection: a potential risk factor for pre-term delivery of low birth weight (PLBW) babies. **J. Pak. Med. Assoc.**, v. 55, n. 10, p. 448-452, Oct. 2005.

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

REYNOLDS, R. M.; PHILLIPS, D. I. Long-term consequences of intrauterine growth retardation. **Horm. Res.**, v. 49, Suppl 2, p. 28-31, 1998.

RODINI, C.O. **Doença periodontal inflamatória induzida por ligadura: caracterização microscópica e estudo da presença de mastócitos e das enzimas óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e metaloproteinases -2 e -9.** 2005, 165 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Bucal) - Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, Bauru, 2005.

RÜEGG, J. et al. Epigenetic regulation of glucose transporter 4 by estrogen receptor  $\beta$ . **Mol. Endocrinol.**, v. 25, n. 12, p. 2017-28, Dec. 2011.

SAETROM, P.; SNØVE, O.; ROSSI, J. J. Epigenetics and microRNAs. **Pediatr. Res.**, v. 61, n. 5 Pt 2, p. 17R-23R, 2007.

SCHENK, S.; SABERI, M.; OLEFSKY, J. M. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. **J. Clin. Invest.**, v. 118, n. 9, p. 2992-3002, Sep 2008.

SCHWABE, R. F.; BRENNER, D. A. Mechanisms of Liver Injury. I. TNF-alpha-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. **Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.**, v. 290, n. 4, p. G583-9, Apr 2006.

SILVA J. L. 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.**, v. 240, p. 82-93, 2005.

SIQUEIRA, F. M. et al. Intrauterine growth restriction, low birth weight, and preterm birth: adverse pregnancy outcomes and their association with maternal periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 78, n. 12, p. 2266-76, Dec 2007.

SIQUEIRA, F. R. **Restrição no consumo de sódio durante a gestação é responsável pelo baixo peso ao nascimento e pela resistência à insulina da prole na idade adulta: estudo do mecanismo epigenético por metilação do DNA.** 2014, 101 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

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

SHIRAKASHI, D. J. et al. Maternal periodontal disease in rats decreases insulin sensitivity and insulin signaling in adult offspring. **J. Periodontol.**, v. 84, n. 3, p. 407-414, Mar. 2013.

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

SRIVASTAVA, S. K.; RAMANA, K. V. Focus on molecules: nuclear factor-kappaB. **Exp. Eye Res.**, v. 88, n. 1, p. 2-3, Jan 2009.

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

SUN, X. J. et al. Structure of the insulin receptor substrate IRS1 defines a unique signal transduction protein. **Nature**, v. 352, n. 6330, p. 73-77, Jul. 1991.

SUN, X. J. et al. Role of IRS2 in insulin and cytokine signalling. **Nature**, v. 377, n. 6545, p. 173-177, Sep. 1995.

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

TANG, G. et al. Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. **Nature**, v. 414, n. 6861, p. 313-7, Nov 2001.

TAYLOR, G. W.; BORGNACKE, W. S. Periodontal disease: associations with diabetes, glycemic control and complications. **Oral Dis.**, v. 14, n. 3, p. 191-203, Apr. 2008.

TAYLOR, G. W. et al. Non-insulin dependent diabetes mellitus and alveolar bone loss progression over 2 years. **J. Periodontol.**, v. 69, n. 1, p. 76-83, Jan. 1998.

THAMOTHARAN, M. et al. GLUT4 expression and subcellular localization in the intrauterine growth-restricted adult rat female offspring. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 288, n. 5, p. E935-E947, May 2005.

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.

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

TUNCMAN, G. et al. Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 103, n. 28, p. 10741-10746, Jul 2006.

ÜSTÜN, K. et al. Periodontal disease in patients with psoriatic arthritis. **Inflammation**, v. 36, n. 3, p. 665-669, Jun. 2013.

VAISSIÈRE, T.; SAWAN, C.; HERCEG, Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. **Mutat. Res.**, v. 659, n. 1-2, p. 40-8, 2008.

VAXILLAIRE, M.; FROGUEL, P. Monogenic diabetes in the young, pharmacogenetics and relevance to multifactorial forms of type 2 diabetes. **Endocr. Rev.**, v. 29, n. 3, p. 254-264, 2008.

VLASSARA, H.; PALACE, M. R. Diabetes and advanced glycation endproducts. **J. Intern. Med.**, v. 251, n. 2, p. 87-101, Feb. 2002.

WANG, P. L.; OHURA, K. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide signaling in gingival fibroblasts-CD14 and Toll-like receptors. **Crit. Rev. Oral. Biol. Med.**, v. 13, n. 2, p. 132-142, 2002.

WELLEN, K. E.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, stress, and diabetes. **J. Clin. Invest.**, v. 115, n. 5, p. 1111-1119, May 2005.

WESTERMEIER, F. et al. Programming of fetal insulin resistance in pregnancies with maternal obesity by ER stress and inflammation. **Biomed Res. Int.**, v. 2014, p. 917672, 2014.

WHITE, M. F.; TAKAYAMA, S.; KAHN, C. R. Differences in the sites of phosphorylation of the insulin receptor in vivo and in vitro. **J. Biol. Chem.**, v. 260, n. 16, p. 9470-9478, Aug. 1985.

WHITEMAN, E. L.; CHO, H.; BIRNBAUM, M. J. Role of Akt/protein kinase B in metabolism. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 13, n. 10, p. 444-451, Dec. 2002.

WULLAERT, A.; HEYNINCK, K.; BEYAERT, R. Mechanisms of crosstalk between TNF-induced NF-kappaB and JNK activation in hepatocytes. **Biochem Pharmacol.**, v. 72, n. 9, p. 1090-101, Oct. 2006.

XIE, L. et al. Interactive changes between macrophages and adipocytes. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 17, n. 4, p. 651-659, Apr. 2010.

ZHANG, C. et al. More than an Anti-diabetic Bariatric Surgery, Metabolic Surgery Alleviates Systemic and Local Inflammation in Obesity. **Obes Surg.**, v. 28, p. 3658-3668, Nov. 2018.

ZENG, Y. et al. Maternal protein restriction in rats leads to reduced PGC-1 $\alpha$  expression via altered DNA methylation in skeletal muscle. **Mol. Med. Rep.**, v. 7, n. 1, p. 306-12, Jan 2013.

**ANEXO A**

Parecer de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade  
de Odontologia do *Campus* de Araçatuba – UNESP



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**



CAMPUS ARAÇATUBA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

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

### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **“Avaliação do mecanismo epigenético por metilação do DNA e da expressão de GLUT4 e do IRS-1 em tecido muscular esquelético de ratos adultos, proles de ratas com doença periodontal”**, Processo FOA nº 2015-00634, sob responsabilidade de Dóris Hissako Sumida apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 05 de Agosto de 2015.

**VALIDADE DESTE CERTIFICADO:** 04 de Maio de 2018.

**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 04 de Junho de 2018.

### CERTIFICATE

We certify that the study entitled **“Evaluation epigenetic mechanism by DNA methylation and expression of GLUT4 and IRS-1 in skeletal muscle tissue of adult rats, offspring of rats with periodontal disease”**, Protocol FOA nº 2015-00634, under the supervision of Dóris Hissako Sumida presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on August 05, 2015.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** May 04, 2018.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** June 04, 2018.

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

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

**ANEXO B**

Artigo publicado no periódico Journal of Periodontology

## Effect of maternal periodontitis on GLUT4 and inflammatory pathway in adult offspring

Maria Sara de Lima Coutinho Mattered<sup>1</sup> | Fernando Yamamoto Chiba<sup>2</sup> | Flávia Lombardi Lopes<sup>3</sup> |  
 Thaís Verônica Saori Tsosura<sup>1</sup> | Maria Angelica Peres<sup>4</sup> | Victor Gustavo Balera Brito<sup>1</sup> |  
 Sandra Helena Penha de Oliveira<sup>1</sup> | Renato Felipe Pereira<sup>1</sup> | Fernando Marani<sup>1</sup> |  
 Rodrigo Martins dos Santos<sup>1</sup> | Bianca Elvira Belardi<sup>1</sup> | Gestter Willian Lattari Tessarin<sup>5,6</sup> |  
 Mariana Lopes Benites<sup>1</sup> | Edilson Ervolino<sup>5,6</sup> | Joel Claudio Heimann<sup>4</sup> | Doris Hissako Sumida<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Multicenter Post-Graduate Program in Physiological Sciences (SBFis), Department of Basic Sciences, School of Dentistry, São Paulo State University (UNESP), Araçatuba, Brazil

<sup>2</sup>Department of Child and Social Dentistry, School of Dentistry, São Paulo State University (UNESP), Araçatuba, Brazil

<sup>3</sup>School of Veterinary Medicine, São Paulo State University (UNESP), Araçatuba, Brazil

<sup>4</sup>Department of Internal Medicine, Laboratory of Experimental Hypertension, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>5</sup>Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil

<sup>6</sup>Department of Basic Sciences, Division of Histology, Dental School of Aracatuba, UNESP-Univ Estadual Paulista, Araçatuba, Brazil

### Correspondence

Maria Sara de Lima Coutinho Mattered, São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araçatuba, Brazil – R. José Bonifácio, 1193, 16015-050, Araçatuba-SP, Brazil. Email: mariasara\_1c@hotmail.com

### Funding information

This study was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP) [grants #2015/12018-7; #2017/12405-6] São Paulo, SP, Brazil.

### Abstract

**Background:** Maternal periodontal disease leads to low birth weight (LBW), insulin resistance (IR), increased TNF- $\alpha$  levels, and alterations in insulin signaling in adult offspring. TNF- $\alpha$  has been associated with the stimulation of IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B, resulting in the decreased expression of GLUT4. Another mechanism that may be involved in decreasing GLUT4 expression is DNA methylation. This study aimed to evaluate in the adult offspring of rats with periodontal disease: IR, inflammatory pathways, DNA methylation, and expression of GLUT4.

**Methods:** Female Wistar rats were distributed into control and experimental periodontal disease groups. Seven days after induction of periodontal disease, both groups were mated with healthy male rats. After weaning, male offspring were distributed into control offspring (CN-o) and periodontal disease offspring (PED-o) groups. Body weights were measured from 0–75 days of age. At day 75, the following were measured in the offspring: IR (HOMA-IR index); TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ Bp65 content in the gastrocnemius muscle (GM) by western blotting; IKK $\alpha$ / $\beta$ , JNK, ERK 1/2, NF- $\kappa$ Bp65, and NF- $\kappa$ Bp50 phosphorylation status in the GM by western blotting; DNA methylation by restriction digest and real-time PCR(qAMP); and expression of GLUT4 mRNA in the GM by real-time PCR.

**Results:** LBW, IR, increases in TNF- $\alpha$ , IKK $\alpha$ / $\beta$ , ERK 1/2, NF- $\kappa$ Bp65, and NF- $\kappa$ Bp50 decreased expression of GLUT4 mRNA were observed in the PED-o rats. No differences were identified in JNK phosphorylation status and DNA methylation in the evaluated regions of the GLUT4-encoding gene *Slc2a4*.

**Conclusion:** Maternal periodontal disease causes LBW, IR, activation of inflammatory pathways, and decreased GLUT4 expression in the GM of adult offspring.

### KEY WORDS

diabetes mellitus, DNA methylation, glucose transporter type 4, low birth weight, periodontal diseases, tumor necrosis factor-alpha



It is well established that the fetal environment is linked to maternal health, and abnormal stimuli or aggression during intrauterine life can result in permanent changes in the physiology and metabolism of the offspring, increasing the risk of disease in adulthood<sup>1-3</sup>; this mechanism is known as “fetal programming” or “fetal origin of adult disease.”

Maternal oral inflammation, particularly periodontal disease, has been associated with adverse gestational outcomes including preterm birth (PTB), low birth weight (LBW), and intrauterine growth restriction (IUGR).<sup>4-6</sup> It has been proposed that bacterium present in periodontitis may promote changes in the placental labyrinth, which is vital to maternal-fetal exchanges,<sup>7</sup> and impair fetal nutrition leading to LBW in mice.

Impaired nutrition promotes fetal adaptations, such as the prioritization of energy expenditure to main tissues (brain and heart), and a decrease in the development of less important tissues, for example, in skeletal muscle (the “thrifty phenotype” hypothesis).<sup>8,9</sup> These adaptations lead to negative physiologic and metabolic consequences in skeletal muscles, and subsequently, predispose the offspring to metabolic diseases in adulthood, such as type-2 diabetes (DM2).<sup>9</sup> Skeletal muscle insulin resistance is the primary abnormality in DM2.<sup>10</sup> Further, several studies have demonstrated an association between insulin resistance and inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ).<sup>11,12</sup>

Our studies have demonstrated that the adult offspring of rats with periodontal disease show an increase in plasma levels of TNF- $\alpha$ .<sup>13,14</sup> This cytokine can activate c-Jun N-terminal kinases (JNK), I $\kappa$ B kinase  $\beta$ /nuclear factor-kappa B (IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B) and extracellular signal-regulated protein (ERK: ERK1 and ERK2) intracellular pathways that are involved in insulin resistance.<sup>11,15,16</sup> The NF- $\kappa$ B family in mammalian cells is a homo- or heterodimeric complex formed by the Rel-like domain-containing proteins RelA (p65), RelB, NF- $\kappa$ B1/p105, NF- $\kappa$ B1/p50, c-Rel, NF- $\kappa$ B2/p52, and NF- $\kappa$ B2/p100. The heterodimeric p50/p65 form is the most common.<sup>17,18</sup> This transcription factor has been associated with the inhibition of *Slc2a4* gene expression, which encodes the glucose transporter type 4 (GLUT4), an essential protein for glucose entry into muscle tissue cells.<sup>19</sup>

Epigenetic mechanisms, such as DNA methylation, can also control gene expression. This particular epigenetic modification is associated with gene silencing.<sup>20,21</sup> In fact, permanent and progressive changes in gene expression, modulated by DNA methylation, can be found in offspring that show IUGR, and this may affect important metabolically active tissues.<sup>22</sup>

Our group has previously shown that maternal periodontal disease in rats results in LBW, insulin resistance, increased TNF- $\alpha$  levels, changes in Akt serine phosphorylation status, and changes in the translocation index and GLUT4 content of the gastrocnemius muscle (GM) in adult offspring.<sup>13</sup>

Therefore, this study aimed to evaluate the effects of maternal periodontal disease on birth weight, insulin resistance, gene expression, and DNA methylation of *Slc2a4*, and inflammatory pathways in adult offspring. The findings of this study can contribute to verify whether the alterations in GLUT4 protein levels observed in previous studies are because of epigenetic alterations or activation of inflammatory pathways and can improve our understanding of the mechanisms involved in this fetal programming.

## 1 | MATERIALS AND METHODS

### 1.1 | Animals

This study followed the Ethical Principles and Guidelines for Animal Experimentation and was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of the São Paulo State University (Unesp), Araçatuba (protocol number 2015-00634). Wistar rats were housed with a 12-hour light/dark cycle (lights on at 07:00) at an ambient temperature of 23  $\pm$  2°C, and with food and water available *ad libitum*.

### 1.2 | Experimental design

Fourteen Wistar female rats (approximately 200 g each) were randomly distributed into two groups: CN, control group ( $n = 7$ ); and PED, experimental periodontal disease group ( $n = 7$ ). In the PED group, periodontal disease was induced by installing a ligature with a 4-0 silk thread (Seda-Silk, Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brazil) onto the cervical region of the mandibular first molars bilaterally, as described by Rodini et al.<sup>23</sup> Seven days later, rats in both groups were mated with normal male rats. Vaginal smears were taken daily to verify the presence of sperm. After confirming pregnancy, females were housed individually. Ligatures were maintained throughout pregnancy until weaning of the offspring.

After birth, the number of pups in the CN and PED groups was matched so that each mother had equivalent numbers. After weaning, only the male pups were kept for further analysis to avoid any effects from the hormonal oscillations in the juvenile female rats. Males were then distributed into two groups: CN-o, offspring of the control rats ( $n = 19$ ); and PED-o, offspring of the rats with experimental periodontal disease ( $n = 19$ ). Body weights were measured once per week from birth until 75 days of age, and samples were collected once the offspring were 75 days old.

Animals were fasted for 14 hours before experiments and anesthetized (Thiopentax<sup>®</sup>, Cristália, Itapira, Brazil) (50 mg/kg, intraperitoneal). Experiments were performed 10–15 minutes later. Median laparotomies were performed in rats from the CN-o ( $n = 7$ ) and PED-o ( $n = 7$ ) groups, and blood samples (4 mL) were taken via inferior vena cava punctures



and distributed into tubes containing heparin. Plasma was prepared by centrifuging the blood at  $3000 \times g$  for 15 minutes at  $4^{\circ}\text{C}$  and stored in aliquots at  $-80^{\circ}\text{C}$  for glucose and insulin quantification.

Five animals from the CN-o and PED-o groups were used to evaluate DNA methylation ( $n = 4$ ) and expression of *Slc2a4* mRNA ( $n = 5$ ) in the GM. Finally, the remaining animals from the CN-o ( $n = 7$ ) and PED-o ( $n = 7$ ) groups were used to evaluate: 1) TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B p65 content in the GM; and 2) IKK $\alpha/\beta$  and JNK phosphorylation status in the GM.

### 1.3 | Radiographic and histologic analysis of maternal periodontal tissues

Periodontal health (CN group) or the effectiveness of periodontal disease induction (PED group) was confirmed using radiographic and histologic analysis of maternal jaws. Adult female rats were euthanized after the weaning of the offspring and the right and left hemi-mandibles were dissected and fixed for 24 hours in 4% formaldehyde. The hemi-mandibles were radiographed using a 70 kVp, 10 mA, and 0.12 seconds exposure. The source-to-film distance was always set at 40 cm. Digital images were obtained directly with an optical digital plate (Digora, Soredex, Orion Corporation, Helsinki, Finland), and the optical plates were read in a sensitized laser scanner (Windows Digora 1.51, Soredex, Helsinki, Finland). The bone level was measured in such radiographic images at four sites: mesial side, distal side and at two points equidistant in the furcation region of the first lower molars. With the aid of the software (Windows Digora 1.51, Soredex, Helsinki, Finland), linear measurements (in millimeters) were performed parallel to the long axis of the tooth and consisted of the medial side and the distal side at a distance between the alveolar bone crest and the cementum-enamel junction and in the furcation region at a distance of the alveolar bone crest and the external surface of the tooth. A mean of the four measurements was made so that it was possible to quantify the bone level around this tooth and consequently to evaluate the alveolar bone loss. After being x-rayed the hemimandibles were submitted to demineralization in 10% EDTA for 60 days. They were then conventionally processed and stained with hematoxylin and eosin (HE). A histologic analysis of the site with induced periodontal disease was carried out and the following parameters were evaluated: presence of inflammatory process, extent of inflammation in the periodontal tissues, pattern of cellularity of the periodontal tissues and pattern of structure of the extracellular matrix of the periodontal tissues.

### 1.4 | Measurement of glycemia, insulinemia, and the HOMA-IR index in offspring

Glucose concentrations were measured by the glucose oxidase method (Enzymatic glucose, ANALISA Diagnóstica, Belo Horizonte, MG, Brazil), and insulinemia was measured

by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) (Sensitive Rat Insulin, SRI-13K, Millipore, St. Charles, MO). Insulin resistance was evaluated by the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) index, which was calculated according to the following formula:  $\text{HOMA-IR} = \text{fasting glycemia (mmol/L)} \times \text{fasting insulinemia } (\mu\text{IU/mL})/22.5$ .<sup>24,25</sup>

### 1.5 | Western blotting analysis in offspring

The gastrocnemius muscle was collected from seven animals in each group (CN-o and PED-o). Tissue samples were prepared as described by Carvalho et al.<sup>26</sup> Phosphorylation status (IKK $\alpha/\beta$ , JNK, ERK 1/2, NF- $\kappa$ B p65 and NF- $\kappa$ B p50) and protein content (TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B p65) were quantified by Western blotting using p-IKK $\alpha/\beta$ , p-JNK, TNF- $\alpha$ , p-ERK 1/2, p-NF- $\kappa$ B p65 and p-NF- $\kappa$ B p50 antibodies (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA).

Total JNK, IKK $\alpha/\beta$ , p-ERK 1/2 and NF- $\kappa$ B p50 were quantified by western blotting using total JNK, IKK $\alpha/\beta$ , ERK 1/2 and NF- $\kappa$ B p50 antibodies (Santa Cruz Biotechnology Inc).  $\beta$ -actin (Santa Cruz Biotechnology Inc) served as the loading control. Immunoreactive bands were detected by autoradiography using a chemiluminescent substrate system (ECL Kit, Amersham, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), according to the manufacturer's instructions. Blots were quantitatively analyzed using the software (Scion Image-Release Beta 3b software, NIH, Frederick, MD).

### 1.6 | *Slc2a4* mRNA expression in offspring by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Total RNA was extracted from GM using reagent (Trizol LS, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific; Carlsbad, CA) according to manufacturer's instructions. Samples were treated with an endonuclease (DNAse I, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) and total RNA was quantified by spectrophotometry. The total RNA from each sample was reverse transcribed to complementary DNA using reverse transcriptase (SuperScript<sup>TM</sup> II Reverse Transcriptase, Invitrogen) according to manufacturer's instructions.

Gene expression analysis of *Slc2a4* (Glut4) was performed by qRT-PCR, using Real-Time PCR instrument (StepOne-Plus<sup>TM</sup> Real-Time PCR Systems, Applied Biosystems, Foster City) and kit (Rn01752377\_m1; FAM fluorophore reporter/non-fluorescent quencher MGB) (TaqMan<sup>TM</sup> Gene Expression Assay, Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA). The relative amount of transcripts was determined by the  $2^{-(\Delta\Delta\text{CT})}$  method, with target expression normalization with *Actb* (Rn00667869\_m1, Applied Biosystems), as housekeeping gene, and control group as the calibrator.

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

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

### 1.7 | DNA methylation of *Slc2a4* in offspring by restriction digestion and real-time PCR (qAMP)

Genomic DNA (gDNA) extraction from the GM was performed using silica columns and reagents provided by the kit (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen, Hilden, Germany). A total of 25 mg of GM was utilized to isolate gDNA, according to the manufacturer's instructions. Isolated gDNA was quantified by measuring the optical density at 260 nm in a spectrophotometer (NanoDrop spectrophotometer, Thermo Scientific, Wilmington). Quantitative analysis of DNA methylation using restriction digestion and real-time PCR (qAMP) involves the use of methylation-sensitive restriction enzymes (MSREs) and a methylation-dependent restriction endonuclease (MDRE), which identify restriction sites in a DNA sequence of interest, and PCR primers designed to flank these restriction sites.<sup>27</sup> The sequence of the *Slc2a4* gene (GLUT4) was present in the genomic database (Genome Browser database of the University of California, Santa Cruz (UCSC), California), and restriction sites for methylation-sensitive enzymes (HhaI (New England Biolabs, County Rd, Ipswich) and HpaII (Carlsbad, California)) and a methylation-dependent enzyme (McrBC (New England Biolabs)) were located in the gene. With the restriction sites of the enzymes identified in the DNA of interest, primers were designed to flank these sites (Table 1) using Primer3 (v. 0.4.0), avoiding repeat regions, and similarities to other non-specific genomic regions. Gene-specific regions were chosen to contain the recognition sites of all three enzymes employed. Digested and undigested DNA were used for real-time PCR reactions using the kit (QuantiNova SYBR Green PCR Kit, Qiagen, Mississauga, ON, Canada), following the manufacturer's recommendations. Methylation is shown as the percentage of digested over undigested DNA, based on the shift in the  $C_t$  obtained for each enzyme and each primer pair.

### 1.8 | Statistical analysis

Shapiro-Wilk test was used to determine the type of data distribution. Body weights at 75 days and DNA methylation of *Slc2a4* in the offspring were assessed by analyses of variance, followed by the Tukey test when the analysis of variance suggested a significant difference among the groups ( $p < 0.05$ ).

All other data analyses were performed using the Student's t-test. A p-value of  $< 0.05$  was considered statistically

significant. Data were expressed as the mean  $\pm$  standard error (SEM), and data analyses were performed using the statistical analysis program (GraphPad Prism 6.0 Software Inc., San Diego, CA).

## 2 | RESULTS

### 2.1 | Radiographic and histologic analysis of the periodontal tissues of the mother rats

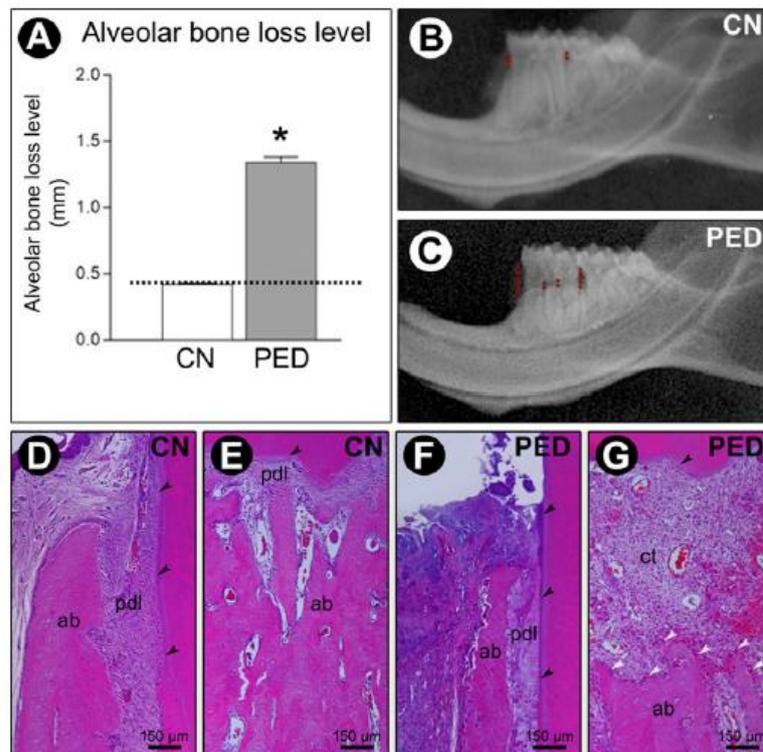
The radiographic analysis showed that the mean of measurements (distance between the alveolar bone crest and the cementum-enamel junction on the mesial side and on the distal side and distance of the alveolar bone crest and the external surface of the tooth in the furcation region) in the PED group was higher than in the CN group, confirming that there was alveolar bone loss at the site with induced periodontal disease (Fig. 1A, 1B, and 1C). Histologic analysis revealed a pattern of cellularity and structure of periodontal tissues consistent with a normality in the CN group (Fig. 1D and 1E). In the PED group, the presence of inflammatory infiltrate was observed on the mesial side, on the distal side and on the furcation region of the first lower molar. Severe disruption of the periodontal ligament and alveolar bone loss associated with sites where the inflammatory process was present was observed. A high amount of active osteoclasts was present at these sites (Fig. 1F and 1G). The alveolar bone loss demonstrated by the radiographic evaluation associated with the presence of the infectious-inflammatory process and the disintegration of the periodontal tissues demonstrated by the histologic evaluation confirmed the induction and maintenance of the periodontal disease in the PED group (Fig. 1).

### 2.2 | Assessment of body weights in offspring

There was a significantly lower birth weight (time 0) in the PED-o group compared to the CN-o group (Table 2). However, body weight did not differ at the weekly (time 1–10) weighing, carried out until 75 days of age, between the CN-o and PED-o groups (Table 2).

### 2.3 | Glycemia, insulinemia, and the HOMA-IR index of offspring

There was no statistical difference in fasting glycemia values between the groups. However, insulinemia values were



**FIGURE 1** Radiographic and histologic appearance of the mandibular first molar in the CN and PED groups. **A**) Graph showing that the mean of measurements (distance between the alveolar bone crest and the cementum-enamel junction on the mesial side and on the distal side and distance of the alveolar bone crest and the external surface of the tooth in the furcation region) in the PED group was higher than in the CN group, confirming that there was alveolar bone loss at the site with induced periodontal disease. Histologic alveolar bone level in the CN groups and in the PED group. **B** and **C**) Radiographic images evidencing alveolar bone loss in the PED group, measured via alveolar bone level. Values are presented the as mean  $\pm$  standard error. **D** and **E**) Photomicrographs showing the histologic aspect of the mesial region (**D**) and furcation region (**E**) of the mandibular first molar in the CN group, where a normal pattern of periodontal tissues can be observed. **F** and **G**) Photomicrographs showing the histologic aspect of the mesial region (**F**) and the furcation region (**G**) of the mandibular first molar with periodontal disease induced (PED group), where inflammatory infiltrate can be observed in the periodontal tissues, disruption of the ligament periodontal and foci of alveolar bone resorption, with presence of active osteoclasts (white arrows). Abbreviations and symbols: \* $P < 0.05$ ; ab, alveolar bone; pdl, periodontal ligament; ct, connective tissue; red dotted, alveolar bone level; black dotted, alveolar bone level in normal conditions; black arrows, cement; white arrows, osteoclasts. Staining (**D**–**G**): hematoxylin and eosin (HE). Original magnification (**D**–**G**): 100 $\times$ . Scale bars (**D**–**G**): 150  $\mu$ m

increased in the PED-o group compared to the CN-o group. Further, the HOMA-IR index, calculated from these parameters, was significantly higher ( $p < 0.05$ ) in the PED-o group than in the CN-o group (Table 3).

#### 2.4 | Assessment of inflammatory pathways in adult offspring

The content of TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B p65 in the GM was significantly higher in the PED-o group compared to the CN-o group (Fig. 2A, 2B and 2C). The IKK $\alpha/\beta$ , ERK 1/2, NF- $\kappa$ B p65, and NF- $\kappa$ B p50 phosphorylation status were significantly higher in the PED-o group, whereas no differences in JNK

phosphorylation status were seen between the groups in the GM (Fig. 2A through 2H).

#### 2.5 | Expression of *Slc2a4* mRNA and DNA methylation of *Slc2a4* in GM of offspring

Figure 3A depicts a reduction in *Slc2a4* (GLUT4) mRNA expression in the GM of PED-o animals when compared to that of CN-o animals. Figures 3B, 3C, and 3D shows the results of DNA methylation analysis of the *Slc2a4* gene in the GM of the CN-o and PED-o groups. Three separate regions within the proximal promoter, termed prom 1, prom 2, and prom 3 of the *Slc2a4* gene were analyzed. No differences in methylation levels were found among the groups.

**TABLE 2** Body weight (g) of offspring in the CN-o and PED-o groups at birth (time 0) and weekly (time 1–10) until 75 days of age

| Time (weeks) | Body weight (g) |               |
|--------------|-----------------|---------------|
|              | CN-o            | PED-o         |
| 0            | 6.74 ± 0.21     | 5.31 ± 0.13*  |
| 1            | 17.46 ± 0.33    | 15.44 ± 0.17  |
| 2            | 34.24 ± 0.48    | 27.72 ± 0.25  |
| 3            | 49.58 ± 0.56    | 44.47 ± 0.26  |
| 4            | 79.47 ± 2.59    | 79.16 ± 1.17  |
| 5            | 128.30 ± 1.48   | 123.00 ± 2.06 |
| 6            | 177.20 ± 1.73   | 191.50 ± 2.05 |
| 7            | 256.20 ± 2.26   | 249.60 ± 3.88 |
| 8            | 294.70 ± 3.87   | 285.00 ± 4.43 |
| 9            | 317.20 ± 5.78   | 324.6 ± 4.21  |
| 10           | 356.50 ± 3.94   | 354.40 ± 3.99 |

CN-o: control group; PED-o: periodontal disease group. Values are presented the as mean ± standard error ( $n = 19$  per group). \* $p < 0.05$

**TABLE 3** Glycemia, insulinemia and HOMA-IR Index in offspring of control rats and offspring of rats with experimental periodontal disease

| Parameters                 | CN-o         | PED-o         |
|----------------------------|--------------|---------------|
| Glycemia (mmol/L)          | 5.16 ± 0.16  | 6.01 ± 0.55   |
| Insulinemia ( $\mu$ IU/mL) | 12.61 ± 2.35 | 27.87 ± 4.99* |
| HOMA-IR                    | 2.91 ± 0.58  | 7.98 ± 2.13*  |

Values are presented as the mean ± standard error ( $n = 7$  per group). \* $P < 0.05$

### 3 | DISCUSSION

Our results demonstrate that maternal periodontal disease promotes LBW; insulin resistance; increased IKK $\alpha/\beta$ , ERK 1/2, NF- $\kappa$ B p65 and NF- $\kappa$ B p50 phosphorylation status; increased protein content of TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B p65; and decreased expression of *Slc2a4* mRNA (GLUT4). This reduced expression was unrelated to alterations in the three distinct promoter areas in the proximal promoter of *Slc2a4*, as well as the JNK phosphorylation status in the GM.

Epidemiologic studies report that there is a relationship between LBW and a high predisposition to hypertension, dyslipidemia, and diabetes in adulthood.<sup>1,28,29</sup> According to Barker,<sup>1</sup> environmental stimuli in the uterus can alter the health of the offspring, not only during pregnancy but through to adulthood.

The association demonstrated between maternal periodontal disease and LBW (Table 2) corroborates some previous studies showing that maternal periodontal disease promotes adverse pregnancy outcomes, such as LBW and premature birth.<sup>13,30–32</sup> Notwithstanding, other studies have failed to find effects of maternal periodontal disease on birth weights of offspring.<sup>14,33</sup> Ide and Papananou<sup>6</sup> considered this association modest but significant, because in each study there is a high degree of variability in the evaluation of the populations

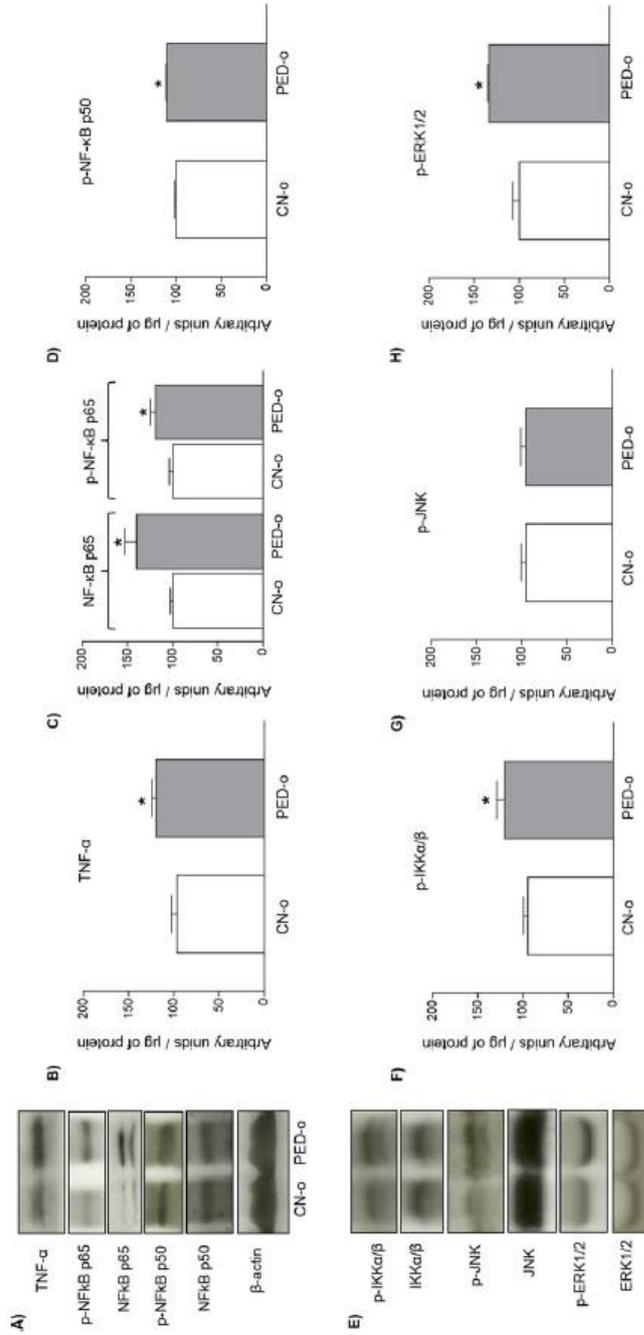
as well as differences in the way the data are recorded and treated.<sup>6,34</sup> In fact, we showed that the PED-o group showed a recovery in growth after the first week of life, as no differences in body weight were observed past this point in relation to the CN-o group (Table 2). This growth acceleration or “catch-up growth” occurs when there is a LBW, and the body manages to reach a similar weight and/or height to that of a normal individual<sup>35</sup>; albeit at a price, as catch-up growth in humans has been related to visceral obesity and insulin resistance.<sup>36</sup>

In fact, the PED-o group showed increased insulinemia, no difference in glycemia, and reduced insulin sensitivity, evaluated by the HOMA-IR index, when compared to the CN-o group (Table 3). These results are in agreement with the “fetal salvage” hypothesis. Children exposed to IUGR can develop a permanent reduction in the number or function of glucose transporters in skeletal muscles. This alteration is caused by a change in the distribution of nutrients, such as glucose, favoring essential organs and resulting in peripheral insulin resistance. As a consequence of this insulin resistance, pancreatic  $\beta$ -cells are stimulated to produce higher amounts of insulin to maintain normal glycemia, resulting in their eventual depletion.<sup>37,38</sup>

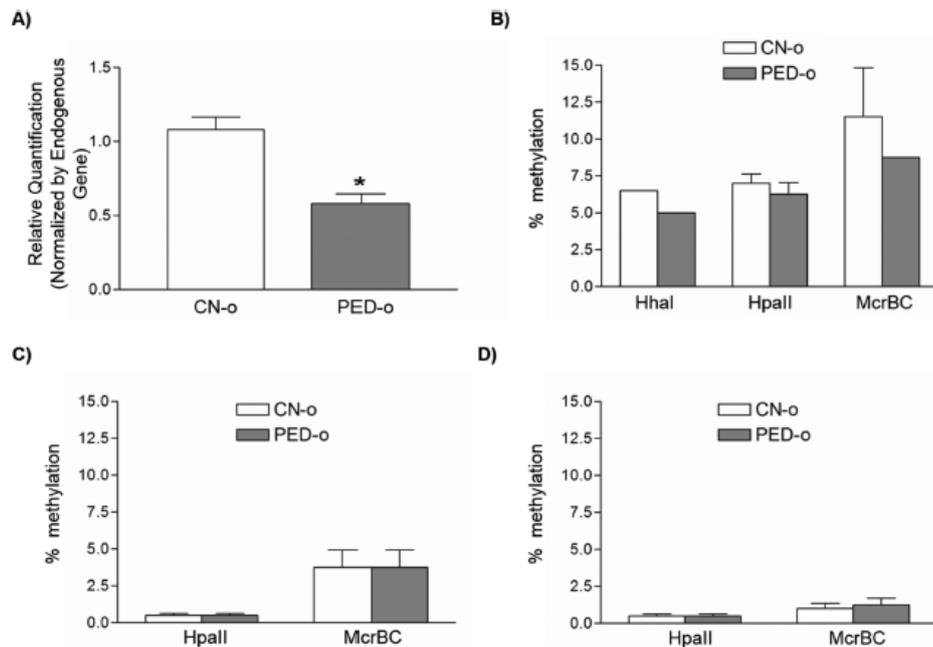
As previously mentioned, the mechanisms that have been proposed as causes of PTB and LBW as a consequence of periodontal infection are the translocation of oral bacteria or bacterial products (e.g. lipopolysaccharides [LPS]) to the fetoplacental unit.<sup>39</sup> These translocations of bacteria to the fetoplacental unit can lead to structural modifications in the fetus, leading to impaired fetal nutrition.<sup>5</sup>

In humans, adverse pregnancy outcomes (LBW and PTB) were associated with periodontitis and increased placental expression of interleukin (IL) -1 beta (IL-1 $\beta$ ), cyclooxygenase-2 (COX-2), vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR1), and 70-kilodalton heat shock proteins (HSP70).<sup>40</sup> Further, the presence of bacterial products in the fetoplacental unit can trigger the local release of biochemical mediators or pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, and prostaglandin E2 (PGE2).<sup>38</sup> We have previously observed that maternal periodontal disease promotes increased plasma concentrations of TNF- $\alpha$  in adult rats.<sup>13</sup> In this study, we observed an increase in TNF- $\alpha$  content in the GM of the PED-o group (Fig. 2B).

As previously mentioned, pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  activate the JNK, ERK 1/2 and IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B intracellular pathways.<sup>11,16</sup> Activation of TNF- $\alpha$ -induced IKK $\beta$  or ERK 1/2 increases serine phosphorylation of the insulin receptor and its substrate (IRS-1), impairing insulin signaling.<sup>16,41</sup> In the present study, the PED-o group showed an increase in IKK $\alpha/\beta$  and ERK 1/2 phosphorylation status when compared to the CN-o group (Fig. 2F and 2H). However, there was no difference in the JNK phosphorylation status among the groups (Fig. 2G).



**FIGURE 2** TNF- $\alpha$  content and IKK $\alpha/\beta$ , JNK, ERK 1/2, NF- $\kappa$ B p65 (content and phosphorylation status), and NF- $\kappa$ B p50 phosphorylation status in the gastrocnemius muscle of the offspring in the control (CN-o) and periodontal disease (PED-o) groups. A and E) Typical autoradiograph; equal amounts of protein were analyzed by SDS-PAGE (185  $\mu$ g),  $\beta$ -actin, IKK $\alpha/\beta$ , JNK, ERK 1/2, and NF- $\kappa$ B p50 were used to normalize for equal protein loading. (B-D and F-H) TNF- $\alpha$  content and IKK $\alpha/\beta$ , JNK, ERK 1/2, NF- $\kappa$ B p65 (content and phosphorylation status) and NF- $\kappa$ B p50 phosphorylation status (expressed in arbitrary units) are presented as the mean  $\pm$  standard error ( $n = 7$  per group). \*  $P < 0.05$



**FIGURE 3** A) Evaluation of gene expression of the glucose transporter 4 (GLUT4) ( $n = 5$  per group) and (B–D) DNA methylation of *Slc2a4* ( $n = 4$  per group) in gastrocnemius muscle in the offspring of the control (CN-o) and experimental periodontal disease (PED-o) groups. Employing two restriction sites of methylation-sensitive enzymes (HhaI and HpaII) and one methylation-dependent (McrBC) enzyme, (B, C and D) three separate regions within the proximal promoter, termed prom 1, prom 2, and prom 3, of the *Slc2a4* gene were analyzed. Results are presented as mean  $\pm$  standard error. \* $P < 0.05$

Studies have shown that activation of JNK promotes cellular apoptosis.<sup>42,43</sup> NF- $\kappa$ B can attenuate TNF- $\alpha$ -induced JNK activation, representing an important mechanism by which NF- $\kappa$ B blocks cell death.<sup>44</sup> In this manner, the noncontinuous activation of JNK via TNF- $\alpha$  may provide a decrease in cellular apoptosis.<sup>44</sup> Although TNF- $\alpha$  can act as a potent activator of both the pro-inflammatory and pro-apoptotic pathways, these signaling pathways interact at multiple levels, and the activation of one pathway often depends on the inactivation of the other, suggesting that cells are able to direct the signal induced by TNF- $\alpha$  towards the appropriate response.<sup>42</sup>

In this study, we observed an increase in NF- $\kappa$ B p65 (content and phosphorylation status) and NF- $\kappa$ B p50 phosphorylation status in the PED-o group in the GM (Fig. 2C and 2D). Recently, NF- $\kappa$ B was shown to act as a direct inhibitor of *Slc2a4* transcription.<sup>17</sup> Both the p50 and p65 subunits (members of the NF- $\kappa$ B family) can bind to sequences present in the *Slc2a4* gene (–134 to –113 bp and –83 to –62 bp in the mouse gene), leading to decreased GLUT4 expression.<sup>17</sup> In fact, expression of this gene in the GM was decreased in the PED-o group when compared with the CN-o group (Fig. 3A).

As mentioned previously, epigenetic mechanisms (e.g., DNA methylation) can modify gene expression. DNA

methylation is characterized by the addition of a methyl group to the fifth carbon of the pyrimidine ring of a cytosine preceding a guanine, or a CpG site. This addition is carried out by DNA methyltransferase (DNMT) enzymes. Three members of this family directly catalyze the addition of methyl groups onto DNA: Dnmt1, Dnmt3a, and Dnmt3b.<sup>45</sup> The existence of the methyl group serves to repress gene expression.<sup>20,21</sup>

Alterations to epigenetic profiles may occur because of undernutrition and overnutrition in critical periods, leading to changes in growth and metabolism in adult life. As described by Liu et al.,<sup>46</sup> overnourishment of female rats, because of a deliberate reduction in the number of pups during the breastfeeding period, resulted in weight gain and increased levels of insulin, glucose, and leptin. Overnutrition also resulted in the specific hypermethylation of CpG dinucleotides (5'-CpG-3' dinucleotide) in the proximal region of the *Irs1* and *Slc2a4* promoters, consequently leading to a reduction in *Slc2a4* and *Irs1* mRNA levels in the skeletal muscle of adult offspring.<sup>46</sup> However, female rats (18-month-old) with IUGR, because of a maternal protein-restricted diet during pregnancy, showed impaired glucose tolerance and significant reductions in GLUT4 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (Pgc-1 $\alpha$ ) expressions in



skeletal muscle, but only the mean CpG island methylation level of the *PGC-1 $\alpha$*  promoter was significantly increased.<sup>47</sup>

According to Raychaudhuri et al.,<sup>48</sup> IUGR caused by nutrient restriction during the prenatal period decreased *Slc2a4* mRNA expression in the skeletal muscle of female rats. This decrease was because of alterations in the promoter of the *Slc2a4* gene, because it was observed that there were: 1) increased binding of myocyte enhancer factor 2D (MEF2D), which inhibits expression; 2) histone modifications, another important epigenetic mechanism for regulating gene expression; and 3) decreased binding of myocyte enhancer factor 2A (MEF2A), which activates expression and MyoD, a transcriptional co-activator. MEF2A, MEF2D, and MyoD are all transcription factors. In addition, IUGR promoted the recruitment of DNA methyltransferase 3A (Dnmt3a) and DNA methyltransferase 3B (Dnmt3b) to the *Slc2a4* gene in adulthood, but there was no DNA methylation. Dnmt3a was found to interact with other repressor proteins and suppress transcription of the gene.<sup>48</sup> In the present study, we evaluated DNA methylation in the promoter region of *Slc2a4*, as shown in Fig. 3B–3D; however, the proximal promoter regions examined had very low levels of methylation (< 10%) in both groups. Based on the results of this study, we can infer that maternal periodontal disease promotes a decrease in the expression of GLUT4 in muscle tissue by way of activation of inflammatory pathways and not by affecting DNA methylation.

In summary, we observed that the changes in insulin signaling and decreased expression of *Slc2a4* mRNA in the PED-o group might be linked to an increase in IKK $\alpha/\beta$ , ERK 1/2, NF- $\kappa$ B p65 (content and phosphorylation status) and NF- $\kappa$ B p50 phosphorylation status in the GM, given that the activation of this TNF- $\alpha$ -induced pathway inhibits the action of insulin. This study confirms the influence of maternal oral health on adult offspring.

## 5 | CONCLUSION

Maternal periodontal disease causes LBW; insulin resistance; activation of inflammatory pathways; decreased GLUT4 expression, independently of changes in the DNA methylation of *Slc2a4*, and JNK phosphorylation status in the GM of adult offspring. Therefore, this study is of fundamental importance in the understanding of some of the mechanisms involved in the relationship between maternal periodontal disease and insulin resistance in the adult offspring. In addition, it shows that optimal maternal oral health can help prevent future diseases in the adult offspring.

## DECLARATION OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## REFERENCES

1. Barker D. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ*. 1995;311:171-174.
2. Godfrey KM, Barker DJ. Fetal programming and adult health. *Public Health Nutr*. 2001;4:611-624.
3. Calkins K, Devaskar SU. Fetal origins of adult disease. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2011;41:158-176.
4. Siqueira FM, Cota LO, Costa JE, et al. Intrauterine growth restriction, low birth weight, and preterm birth: adverse pregnancy outcomes and their association with maternal periodontitis. *J Periodontol*. 2007;78:2266-2276.
5. Madianos PN, Bobetsis YA, Offenbacher S. Adverse pregnancy outcomes (APOs) and periodontal disease: pathogenic mechanisms. *J Clin Periodontol*. 2013;40:S170-S180.
6. Ide M, Papapanou PN. Epidemiology of association between maternal periodontal disease and adverse pregnancy outcomes—systematic review. *J Clin Periodontol*. 2013;40:S181-S194.
7. Offenbacher S, Riché EL, Barros SP, et al. Effects of maternal *Campylobacter rectus* infection on murine placenta, fetal and neonatal survival, and brain development. *J Periodontol*. 2005;76:2133-2143.
8. Hales CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull*. 2001;60:5-20.
9. Vaag AA, Grunnet LG, Arora GP, et al. The thrifty phenotype hypothesis revisited. *Diabetologia*. 2012;55:2085-2088.
10. DeFronzo RA, Tripathy D. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2009;32:S157-S163.
11. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006;116:1793-1801.
12. Liu C, Feng X, Li Q, Wang Y, et al. Adiponectin, TNF- $\alpha$  and inflammatory cytokines and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Cytokine*. 2016;86:100-109.
13. Mattera MS, Chiba FY, Mota MS, et al. Maternal periodontitis decreases plasma membrane GLUT4 content in skeletal muscle of adult offspring. *Life Sci*. 2016;148:194-200.
14. Shirakashi DJ, Leal RP, Colombo NH, et al. Maternal periodontal disease in rats decreases insulin sensitivity and insulin signaling in adult offspring. *J Periodontol*. 2013;84:407-414.
15. Kaneto H, Matsuoka TA, Nakatani Y, et al. Oxidative stress, ER stress, and the JNK pathway in type 2 diabetes. *J Mol Med*. 2005;83:429-439.
16. Plomgaard P, Bouzakri K, Krogh-Madsen R, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces skeletal muscle insulin resistance in healthy human subjects via inhibition of Akt substrate 160 phosphorylation. *Diabetes*. 2005;54:2939-2945.
17. Furuya DT, Neri EA, Poletto AC, et al. Identification of nuclear factor- $\kappa$ B sites in the *Slc2a4* gene promoter. *Mol Cell Endocrinol*. 2013;370:87-95.
18. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF- $\kappa$ B family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009;1:1-14.
19. Silva JL, Giannocco G, Furuya DT, et al. NF- $\kappa$ B, MEF2A, MEF2D and HIF1- $\alpha$  involvement on insulin- and contraction-induced regulation of GLUT4 gene expression in soleus muscle. *Mol Cell Endocrinol*. 2005;240:82-93.



20. Baylin SB. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol.* 2005;2:S4-11.
21. Bäckdahl L, Bushell A, Beck S. Inflammatory signalling as mediator of epigenetic modulation in tissue-specific chronic inflammation. *In J Biochem Cell Biol.* 2009;41:176-184.
22. Thompson RF, Fazzari MJ, Niu H, et al. Experimental intrauterine growth restriction induces alterations in DNA methylation and gene expression in pancreatic islets of rats. *J Biol Chem.* 2010;285:15111-15118.
23. Rodini CO, Batista AC, Dionísio TJ, et al. 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.
24. 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.
25. Lasheen NN. Pancreatic functions in high salt fed female rats. *Physiol Rep.* 2015;3:1-13.
26. Carvalho CR, Brenelli SL, Silva AC, et al. 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.
27. Oakes CC, La Salle S, Trasler JM, et al. Restriction digestion and real-time PCR (qAMP). *Methods Mol Biol.* 2009;507:271-280.
28. Hales CN, Barker DJ, Clark PM, et al. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ.* 1991;303:1019-1022.
29. Barker DJ. The long-term outcome of retarded fetal growth. *Clin Obstet Gynecol.* 1997;40:853-863.
30. Guimarães AN, Silva-Mato A, Siqueira FM, et al. Very low and low birth weight associated with maternal periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2012;39:1024-1031.
31. Haerian-Ardakani A, Eslami Z, Rashidi-Meibodi F, et al. Relationship between maternal periodontal disease and low birth weight babies. *Iran J Reprod Med.* 2013;11:625-630.
32. Mannem S, Chava VK. The relationship between maternal periodontitis and preterm low birth weight: a case-control study. *Contemp Clin Dent.* 2011;2:88-93.
33. Davenport ES, Williams CE, Sterne JA, et al. Maternal periodontal disease and preterm low birthweight: case-control study. *J Dent Res.* 2002;81:313-318.
34. Bansal M, Khatri M, Kumar A, et al. Relationship between maternal periodontal status and preterm low birth weight. *Rev Obstet Gynecol.* 2013;6:135-140.
35. Boersma B, Wit JM. Catch-up growth. *Endocr Rev.* 1997;18:646-661.
36. Morrison JL, Duffield JA, Muhlhauser BS, et al. Fetal growth restriction, catch-up growth and the early origins of insulin resistance and visceral obesity. *Pediatr Nephrol.* 2010;25:669-677.
37. Hofman PL, Cutfield WS, Robinson EM, et al. Insulin resistance in short children with intrauterine growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:402-406.
38. Cianfarani S, Germani D, Branca F. Low birthweight and adult insulin resistance: the "catch-up growth" hypothesis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1999;81:F71-F73.
39. Gandhimadhi D, Mythili R. Periodontal infection as a risk factor for preterm low birth weight. *J Indian Soc Periodontol.* 2010;14:114-120.
40. Pozo E, Mesa F, Ikram MH, et al. Preterm birth and/or low birth weight are associated with periodontal disease and the increased placental immunohistochemical expression of inflammatory markers. *Histol Histopathol.* 2016;31:231-237.
41. de Alvaro C, Teruel T, Hernandez R, et al. Tumor necrosis factor alpha produces insulin resistance in skeletal muscle by activation of inhibitor kappaB kinase in a p38 MAPK-dependent manner. *J Biol Chem.* 2004;279:17070-17078.
42. Schwabe RF, Brenner DA. Mechanisms of Liver Injury. I. TNF-alpha-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006;290:G583-G589.
43. Dhanasekaran DN, Reddy EP. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene.* 2008;27:6245-6251.
44. Nakano H. Signaling crosstalk between NF-kappaB and JNK. *Trends Immunol.* 2004;25:402-405.
45. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology.* 2013;38:23-38. (Ed.).
46. Liu HW, Mahmood S, Srinivasan M, et al. Developmental programming in skeletal muscle in response to overnourishment in the immediate postnatal life in rats. *J Nur Biochem.* 2013;24:1859-1869.
47. Zeng Y, Gu P, Liu K, et al. Maternal protein restriction in rats leads to reduced PGC-1 $\alpha$  expression via altered DNA methylation in skeletal muscle. *Mol Med Rep.* 2013;7:306-312.
48. Raychaudhuri N, Raychaudhuri S, Thamocharan M, et al. Histone code modifications repress glucose transporter 4 expression in the intrauterine growth-restricted offspring. *J Biol Chem.* 2008;283:13611-13626.

**How to cite this article:** Mattera MSLC, Chiba FY, Lopes FL, et al. Effect of maternal periodontitis on GLUT4 and inflammatory pathway in adult offspring. *J Periodontol.* 2019;1-10. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0568>