



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CAMPUS DE SOBRAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

KARYSIA BEZERRA BRITO VERAS

**EFEITO DA DIABETES MELLITUS NA PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM
RATOS: PARTICIPAÇÃO DA VIA WNT/ β -CATENINA**

SOBRAL-CE

2018

KARYSIA BEZERRA BRITO VERAS

**EFEITO DA DIABETES MELLITUS NA PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM
RATOS: PARTICIPAÇÃO DA VIA WNT**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará – Campus Sobral, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Paula Goes Pinheiro Dutra.

SOBRAL-CE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

VERAS, KARYSIA BEZERRA BRITO VERAS
EFEITO DA DIABETES MELLITUS NA PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM RATOS:
PARTICIPAÇÃO DA VIA WNT/ β -CATENINA – 2018
70 f. : il. color

Dissertação (Mestrado) –Universidade Federal do Ceará, Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde, Mestrado em Ciências da Saúde, Sobral, 2018. Área de Concentração:
Ciências da Saúde.
Orientação: Profa. Dra. Paula Goes

1. Periodontite 2. Diabetes 3. Via de sinalização 4. Wnt. 5.Ratos.

CDD 610

KARYSIA BEZERRA BRITO VERAS

**EFEITO DA DIABETES MELLITUS NA PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM
RATOS: PARTICIPAÇÃO DA VIA WNT/ β -CATENINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção de Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Paula Goes Pinheiro Dutra

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Paula Goes (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Mirna Marques (Membro Interno)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Delane Viana Gondim (Membro Externo)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À Deus, por guiar meus caminhos. Aos meus pais Antônio Carlos e Elenice por sempre estarem ao meu lado. Aos meus irmãos por sempre me apoiarem. Ao Alfredo Coelho por todo amor e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, por não me deixar fraquejar nunca.

Aos meus pais e irmãos por sempre estarem ao meu lado me apoiando.

Ao meu noivo Alfredo por todo amor, apoio e dedicação para a concretização desse estudo.

À minha orientadora, Profa. Dra. Paula Goes, pela competência, paciência e pelos valiosos ensinamentos em meu processo de aprendizagem.

Às professoras Mirna Marques Bezerra e Hellíada Vasconcelos Chaves do Laboratório de Farmacologia de Sobral (LAFS) pelo apoio e contribuição na realização desse estudo.

À Nayara, técnica do laboratório de farmacologia de Sobral por todas as contribuições e ajuda durante esta caminhada.

À Doutoranda Jordânia Marques, por todo apoio e ajuda durante todo o estudo.

À Doutoranda Luzia Hermínia por todo apoio em diversas fases desse estudo.

À Veterinária Alana e ao Sr. Araújo pela dispensação, cuidado dos animais laboratoriais e contribuição para este estudo.

À Professora Dra. Flávia Furlaneto e a Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto pela colaboração fundamental na pesquisa desse trabalho.

Ao Laboratório de Farmacologia de Sobral (LASF) e todos os seus colaboradores por toda ajuda e incentivo durante estes dois anos de mestrado.

Ao Laboratório NEMPI (Núcleo de Estudos e Processamento de Imagens) em especial ao técnico de histologia Júnior, por todo apoio e por terem contribuído na conclusão deste estudo. Meu muito obrigada!

Aos professores participantes da banca examinadora Profa Dra. Mirna Marques Bezerra e Prof Dra. Delane Viana Gondim por aceitarem o convite e por prestigiarem este trabalho.

À Fundação Cearense de Apoio ao desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) por estes dois anos de apoio financeiro.

**“Entregue seu caminho ao senhor;
confia nele, e ele agirá”**
Salmo 37:5

RESUMO

A periodontite (PE) e o diabetes mellitus (DM) representam problemas de saúde pública mundial. Ambas as doenças, são de etiologia multifatorial e evidências indicam uma relação bidirecional. Tem sido destacado a participação da via WNT/ β -catenina nos processos de perda óssea, no entanto pouco se sabe sobre o papel dessa via quando da presença de uma doença de base instalada, como por exemplo o DM. Neste contexto, objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do DM na perda óssea inflamatória de ratos com ênfase na participação da via WNT/ β -catenina. Para tanto, foram utilizados 72 ratos Wistar machos (200-220 g) divididos em 4 grupos (n=6): Naïve (N), DM, PE e DM+PE. Inicialmente, os animais DM e DM+PE foram submetidos DM tipo 2 por meio da administração intraperitoneal de nicotinamida (230 mg/kg) seguida de estreptozotocina (60 mg/kg), em doses únicas, após 08 horas de jejum. Cinco dias depois da indução de DM, foi aferida a taxa glicêmica dos ratos. O grupo PE recebeu solução salina (1 ml/kg-i.p). Posteriormente, os grupos PE e DM+PE foram submetidos a indução de PE que consistiu na inserção de um fio de náilon 3.0, em torno do 2º molar superior esquerdo de animais sob anestesia. O grupo DM, sob anestesia, foram submetidos a manipulação oral, sem inserção da ligadura, enquanto que os animais do grupo Naive não receberam qualquer intervenção. Após 11 dias da indução da PE todos os animais foram eutanasiados. Previamente à eutanásia, sob anestesia, foi realizado coleta de sangue para realização de dosagens bioquímicas. Os parâmetros analisados foram: 1) análise macroscópica e microtomografia do osso; 2) análise do osso alveolar avaliando infiltrado inflamatório e contagem de osteoclastos e osteoblastos; 3) Análise do percentual de fibras colágenas do ligamento periodontal; 4) Dosagem dos níveis gengivais de IL-8 e IL-1 β ; 5) Quantificação do percentual de imunexpressão do agonista (WNT-10b) e antagonista (Dkk-1) da via WNT/ β -catenina; 6) Análise dos níveis séricos de glicose, Fosfatase Alcalina Óssea (FAO), cálcio e fósforo. Os achados deste estudo mostraram que DM+PE aumentou a perda óssea ($p < 0,05$) comparado aos demais grupos. Microscopicamente foi observado maior intensidade do infiltrado inflamatório no periodonto do DM+PE ($p < 0,05$) comparado aos demais grupos. O DM+PE apresentou aumento dos níveis gengivais de IL-8 ($p < 0,05$) comparado aos demais grupos do estudo. O DM+PE apresentou aumento dos níveis gengivais de IL-1 β ($p < 0,05$) comparado ao Naive e DM. Na histomorfometria houve aumento no número de osteoclastos e redução do número de osteoblastos no DM+PE ($p < 0,05$) comparado aos demais grupos. Foi possível observar aumento do percentual de imunomarcção para DKK-1 e redução do percentual de imunomarcção para Wnt10b no DM+PE ($p < 0,05$) comparado aos demais grupos. Os níveis séricos de cálcio e fósforo apresentaram aumento no DM+PE ($p < 0,05$), enquanto os níveis séricos de FAO, se mantiveram reduzidos neste grupo ($p < 0,05$) quando comparado aos demais grupos. Em suma, os achados desse estudo mostraram que o DM potencializou a perda óssea e inflamação no periodonto de animais com PE e a via WNT parece participar deste processo.

Palavras-chave: Periodontite. Diabetes. Via de sinalização Wnt. Ratos.

ABSTRACT

Periodontitis (PE) and diabetes mellitus (DM) represent global public health problems. Both diseases are of multifactorial etiology and evidence indicates a bidirectional relationship. The involvement of the WNT / β -catenin pathway in the bone loss processes has been highlighted, but little is known about the role of this pathway in the presence of an underlying disease, such as DM. In this context, the objective of this work was to evaluate the effect of DM on the inflammatory bone loss of rats with emphasis on the participation of the WNT / β -catenin pathway. For this purpose, 72 male Wistar rats (200-220 g) divided into 4 groups (n = 6) were used: Naïve (N), DM, PE and DM + PE. Initially, DM and DM + PE animals were submitted to type 2 DM by intraperitoneal administration of nicotinamide (230 mg / kg) followed by streptozotocin (60 mg / kg) in single doses after 08 hours of fasting. Five days after the induction of DM, the glycemic rate of the rats was measured. The PE group received saline solution (1 ml / kg-i.p). Subsequently, the PE and DM + PE groups were submitted to PE induction, which consisted of the insertion of a nylon 3.0 wire, around the upper left 2nd molar of animals under anesthesia. The DM group, under anesthesia, underwent oral manipulation without ligature insertion, whereas the animals of the Naive group received no intervention. After 11 days of PE induction all animals were euthanized. Prior to euthanasia, under blood anesthesia, blood collection was performed to perform biochemical measurements. The analyzed parameters were: 1) macroscopic analysis and micro-tomography of the bone; 2) analysis of alveolar bone evaluating inflammatory infiltrate and osteoclast and osteoblast counts; 3) Analysis of the percentage of collagen fibers of the periodontal ligament; 4) Dosing of the gingival levels of IL-8 and IL-1 β ; 5) Quantification of the percentage of immunoexpression of the agonist (WNT-10b) and antagonist (Dkk-1) of the WNT / β -catenin pathway; 6) Analysis of serum glucose levels, Bone Alkaline Phosphatase (BALP), calcium and phosphorus. The findings of this study showed that DM + PE increased bone loss (p <0.05) compared to the other groups. Microscopically, a greater intensity of the inflammatory infiltrate was observed in the periodontium of DM + PE (p <0.05) compared to the other groups. The DM + PE showed an increase in the gingival levels of IL-8 (p <0.05) compared to the other groups in the study. The DM + PE presented an increase of the gingival levels of IL-1 β (p <0.05) compared to Naive and DM. In histomorphometry there was an increase in the number of osteoclasts and a reduction in the number of osteoblasts in DM + PE (p <0.05) compared to the other groups. It was possible to observe an increase in the percentage of immunoblotting for DKK-1 and reduction of the percentage of immunoblotting for Wnt10b in DM + PE (p <0.05) compared to the other groups. Serum levels of calcium and phosphorus showed an increase in DM + PE (p <0.05), while serum levels of BALP remained lower in this group (p <0.05) when compared to the other groups. In summary, the findings of this study showed that DM enhanced bone loss and inflammation in the periodontium of animals with PE and the WNT pathway seems to participate in this process.

Keywords: Periodontitis. Diabetes. Wnt signaling pathway. Rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Via de sinalização Wnt/ β -catenina.	21
Figura 2 - Protocolo experimental do estudo.	30
Figura 4 - Análise histomorfométrica da hemimaxila de ratos submetidos à periodontite com diabetes induzido	37
Figura 4– Análise das medidas lineares (2D) por micro- ct em ratos submetidos à periodontite com diabetes induzi	39
Figura 5 - Análise das medidas volumétricas (3D) por micro- ct em ratos submetidos à periodontite com diabetes induzido.	41
Figura 6 - Análise histopatológica do periodonto de ratos submetidos a periodontite e diabetes induzido	43
Figura 7 - Contagem de osteoclastos e osteoblastos em ratos submetidos a periodontite e diabetes experimental.	44
Figura 8 – Fotomicrografia do ligamento periodontal de ratos submetidos a PE e DM experimental.	
Figura 9 - Percentual de colágeno total em ratos submetidos a periodontite e diabetes experimental.	45
Figura 10 - Análise imunohistoquímica para DKK-1 em ratos diabéticos submetidos a periodontite.	47
Figura 11 - Análise imunohistoquímica para WNT-10b em ratos diabéticos submetidos a periodontite.	48
Figura 12 - Níveis gengivais de IL-8 e IL-1 β em ratos submetidas a periodontite e diabetes experimental.	49
Figura 13 - Níveis séricos de Cálcio, Fósforo, Glicose e Fosfatase Alcalina Óssea de ratos submetidos a periodontite e diabetes induzido.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise histopatológica na intensidade de infiltrado inflamatório no tecido periodontal de ratos submetidos à periodontite e diabetes

43

LISTA DE SIGLAS

%	Porcentagem
µm	Micrômetro
AGES	Avançados Produtos de Glicação
ANOVA	Análise de Variância
DKK	<i>Dickkopf</i>
DM	Diabetes Mellitus
DP	Desvio Padrão
E.P.M	Erro Padrão da Média
ELISA	Enzyme Lynked Immuno Sorbent Assay
EO	Estresse Oxidativo
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAO	Fosfatase Alcalina Óssea
G	Gramas
GSK3	Glicogênio Sintase Quinase-3
HE	Hematoxilina-Eosina
i.p	Intraperitoneal
IL-1β	Interleucina 1
IL-8	Interleucina 8
Kg	Kilograma
LRP	Proteína Relacionada ao Receptor
Md	Mediana
Mg	Miligrama
mm ²	Milímetro quadrado
NAD	Nicotinamia-adenina-dinucleotídeo
OPG	Osteoprotegerina
PBS	Tampão Fosfato-Salino (phosphate buffered saline)
PE	Periodontite
PG	Prostaglandina
PMNs	Polimorfonucleares
POA	Perda Óssea Alveolar
RANK	Receptor Ativador do Fator Nuclear-κB
RANKL	Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear-κB
SOST	Esclerotina
WNT	Wigless

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Periodontite.....	14
1.2 Diabetes Mellitus	15
1.3 Relação Diabetes e Periodontite	17
1.4 A participação da via WNT/ β -catenina no tecido ósseo.....	19
2. JUSTIFICATIVA	23
3.OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo Geral.....	24
3.2 Objetivos Específicos.....	24
4. CAPÍTULO 1	25
4.1 ARTIGO 1: EFEITO DA DIABETES MELLITUS NA PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM RATOS: PARTICIPAÇÃO DA VIA WNT / β -CATENINA.	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
ANEXOS	70
ANEXO 1- DECLARAÇÃO DE ANUÊNCIA DO COMITÊ DE ÉTICA EM ANIMAIS (CEUA) UFC- CAMPUS SOBRAL	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 Periodontite

A periodontite é uma doença infecto-inflamatória dos tecidos de suporte do dente, sendo uma das principais causas de perda dentária (PETERSEN; OGAWA, 2005; BORRELL; PAPAPANOU, 2005). Esta apresenta etiologia multifatorial, sendo a resposta do hospedeiro, frente à infecção bacteriana, um importante fator iniciador e de progressão desta doença (PIHLSTROM et al., 2005; BASCONES-MARTÍNEZ et al., 2012). Porém apesar da resposta do hospedeiro ser essencialmente protetora, esta precisa estar modulada, pois tanto a hiporresponsividade, quanto a hiperrresponsividade pode resultar em destruição tecidual (REDLICH; SMOLEN, 2012).

A resposta inicial a infecção bacteriana é a reação inflamatória local, que ativa o sistema imune inato (GRAVES; COCHRAN, 2003; GARLET et al., 2006; COCHRAN, 2008). A amplificação desta resposta inicial local resulta na liberação de uma grande quantidade de citocinas, e outros mediadores, levando a propagação da inflamação e assim, promovendo o desenvolvimento de resposta humoral e mediada por células (GRAVES; COCHRAN, 2003; GARLET et al., 2006; COCHRAN, 2008). O processo inflamatório exacerbado provoca destruição do tecido conjuntivo e de osso alveolar (COCHRAN, 2008). O diagnóstico clínico desta doença é baseado na avaliação clínica e radiográfica (PIHLSTROM et al., 2005). Clinicamente a destruição tecidual pode ser avaliada por meio das medidas de: profundidade e sangramento à sondagem, mobilidade dentária, nível ósseo, supuração e recessões gengivais que confirmam a perda óssea (TATSUEI et al., 2017).

Vale ressaltar que a periodontite inflamatória é comum também no reino animal. A anatomia da junção dentogengival da região de molares dos ratos são semelhantes aquela descrita no homem, tornando o estudo experimental da doença periodontal inflamatória nesses animais uma ferramenta de estudo bastante válida (LISTGARTEN, 1986). A periodontite inflamatória experimental é realizada por meio da colocação de ligadura ao redor do primeiro ou segundo

molar superior que funciona como sítio de colonização bacteriana. A irritação mecânica local e a promoção da formação de placa bacteriana pela colocação da ligadura com fio de seda ao redor da região cervical do dente tem sido amplamente utilizada na indução da doença periodontal inflamatória experimental (GYORFI et al., 1994).

Nas duas últimas décadas têm surgido evidências que suportam o conceito de que as doenças periodontais (DP), tais como periodontite, pode ter efeitos adversos em diversos órgãos e tecidos do corpo. As DP tem sido estudadas como um importante fator de risco para doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, nascimento de bebês prematuros e/ou com baixo peso e do mau controle metabólico em pacientes com DM (ALVES et al., 2007).

A prevenção e tratamento da periodontite se baseia no controle dos fatores causais e de risco. Portanto os procedimentos de higiene oral associado a intervenção profissional com raspagem e alisamento radicular, tem sido considerado como o padrão ouro (VAN DYKE 2008; BEZERRA et al., 2000, 2002; DE LIMA et al., 2000; ALENCAR et al., 2002; LIMA et al., 2004; LEITÃO et al., 2004, 2005; MENEZES et al., 2005; GOES et al., 2010, 2012, 2014; DALCICO et al., 2013; GONÇALVES et al., 2014; LISBOA et al., 2015).

Assim, tendo em vista o proeminente papel da resposta do hospedeiro como importante fator etiológico da periodontite e sabendo que condições sistêmicas tais como DM podem afetar o curso desta doença, o estudo dos mecanismos e vias envolvidos na PE associado ao DM se sobressai como uma forma de compreender o papel da inflamação na reabsorção óssea quando associado as condições sistêmicas, e com isso sugerir novas abordagens terapêuticas.

1.2 Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus (DM) é um dos principais problemas de saúde pública mundial e vem se agravando rapidamente especialmente nas nações em desenvolvimento. Existem 2 tipos principais de diabetes, tipo 1 e tipo 2, sendo que aproximadamente 90% dos casos correspondem a pacientes tipo 2 (MEALEY,

2000; BASCONES-MARTINEZ et al., 2011). Esta doença acomete cerca de 285 milhões de pessoas no mundo, sendo que destas, 90% são portadoras de DM tipo 2 (FAZELI FARSANI et al., 2013). O sinal mais característico desta condição é o aumento dos níveis de glicose, resultando da produção reduzida de insulina, disfunção da insulina ou falta de responsividade do receptor de insulina em órgãos-alvo (BJELLAND et al., 2002).

No diabetes mellitus do tipo 1, verifica-se uma deficiência na produção de insulina decorrente da destruição autoimune das células β do pâncreas. Em geral, neste tipo da doença, os pacientes são jovens (antes dos 30 anos de idade) e não obesos quando os sintomas aparecem pela primeira vez e seu tratamento exige o uso de insulina. No diabetes mellitus tipo 2, ocorre resistência à ação da insulina. Neste caso a doença tem herança poligênica ainda não completamente definida. A patogênese do diabetes mellitus tipo 2 é complexa e envolve a interação entre a genética e fatores ambientais, entre esses especialmente a obesidade proveniente do sedentarismo e ingestão alimentar excessiva. Para o tratamento do DM são utilizados os agentes hipoglicemiantes orais e/ou insulina (DEFRONZO, 2004; MALANDRINO; SMITH, 2011).

Para a confirmação do DM, os sintomas de poliúria, polidipsia, polifagia e perda de peso devem estar associados à: glicemia causal > 200 mg/dl, glicemia de jejum > 126 mg/dl ou glicemia de duas horas pós-sobrecarga de 75 g de glicose > 200 mg/dl (DIRETRIZES SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017). Os principais sintomas são: polidipsia, polifagia e perda de peso, além de outros sinais e sintomas comumente encontrados, como alterações visuais, nefropatias, neuropatias e as manifestações orais (SOUSA et al., 2003; VARELLIS M. 2005).

Dentre as manifestações orais, mais comuns, em portadores de DM estão: cárie de rápida evolução, cálculo dental, aumento da parótida, periodontites, xerostomia, alteração do paladar e alterações na microbiota da cavidade oral (SOUSA et al., 2003).

Dentre as causas do desenvolvimento do diabetes tem-se incluído uma base inflamatória. Pois, foi detectado um aumento nos marcadores inflamatórios

em indivíduos aparentemente saudáveis e que posteriormente vieram a desenvolver o diabetes (VOZAROVA, et al., 2002), sugerindo que a inflamação ocorre previamente à instalação completa da doença, ou seja, na fase inicial em que a tolerância à glicose está reduzida. Além disso, a obesidade e a consequente ativação do tecido adiposo podem aumentar a liberação de fatores inflamatórios que acentuam a resistência à insulina (HOTAMISLIGIL, 2006; SHOELSON; LEE; GOLDFINE, 2006). Consequentemente, a liberação de mediadores inflamatórios e a ativação de diversas citocinas, resulta no recrutamento local de monócitos, que se diferenciam em macrófagos, os quais liberam mais fatores pró-inflamatórios e quimiocinas, não só localmente, bem como sistemicamente, propagando a resposta inflamatória a vários outros tecidos (SHOELSON; LEE; GOLDFINE, 2006). Assim, parece existir uma relação próxima entre periodontite, reabsorção óssea e diabetes, ao se considerar a inflamação crônica um denominador comum entre elas (GARCIA-HERNANDEZ et al., 2012).

Nesse contexto é interessante aprofundar os conhecimentos sobre os mecanismos e vias homeostáticas afetadas durante o agravamento do diabetes os quais predispõem o desenvolvimento de quadros infecciosos e inflamatórios nestes pacientes.

1.3 Relação do Diabetes e a Periodontite

A periodontite e o diabetes mellitus são doenças vem se agravando rapidamente especialmente nas nações em desenvolvimento (CHAPPLE; GENCO, 2013; AL-KHABBAZ; AL-SHAMMARI, 2011; ISLAM, 2011). Ambas apresentam alta prevalência na população, são de etiologia multifatorial, apresentam características crônicas e evidências indicam uma relação bidirecional entre elas (CHAPPLE; GENCO, 2013; AL-KHABBAZ; AL-SHAMMARI, 2011; ISLAM, 2011).

Em pacientes com doença periodontal ativa, ocorre liberação crônica e exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-8 e TNF- α (VAN DYKE; SERHAN, 2003) reduzindo a ação da insulina com consequente agravamento das alterações metabólicas (KOROMANTZOS et al., 2011). O risco

de infecções orais, em particular da periodontite, entre os pacientes com diabetes deve ser considerado. Vale ressaltar que a periodontite tem sido destacada como a 6ª principal complicação do diabetes (MANGAN et al., 2000).

Estudos mostram ainda que níveis mais elevados de citocinas foram encontrados no fluido crevicular gengival de diabéticos, quando comparados com os não-diabéticos, (GROSSI; GENCO, 1998; SALVI et al., 1998). O aumento na produção local de citocinas potencializam a resposta inflamatória, levando a danos no tecido conjuntivo, reabsorção óssea e atraso na reparação de feridas. Os pacientes com diabetes têm um aumento da atividade da collagenase no fluido crevicular gengival quando comparado a não-diabéticos (OLIVER; TERVONEN, 1994). Essa maior atividade da collagenase sugere um maior grau de destruição de colágeno nos tecidos de diabéticos (LACONO et al., 1985, COLLIN et al., 1998).

Em paciente diabético não compensado, a hiperglicemia resultante, promove alterações vasculares, fagocitose ineficaz pelos neutrófilos e macrófagos, além de lentificação da síntese de colágeno causando retardo na reparação tecidual (DESHPANDE et al., 2010). Os mediadores pró-inflamatórios são substâncias que estimulam a transformação do colágeno em compostos menos solúveis, mais resistentes à ação de enzimas e menos flexíveis, o que contribui também para a dificuldade de cicatrização encontrada em pacientes diabéticos (GRECHI et al., 2002). Estas substâncias também ativam osteoclastos e collagenases, conduzindo à destruição do osso e tecido conjuntivo, aumentando a progressão e agravamento da doença periodontal (RODRIGUES, 2001; ANTUNES, 2003).

A base bioquímica, por meio da qual o diabetes está associado à maior agravamento da doença periodontal, é decorrente do crescente acúmulo de produtos de glicação avançada (AGEs) no plasma e nos tecidos (NOVAES; MACEDO; ANDRADE, 2007). Essa condição leva a um aumento da ligação cruzada de colágeno e a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS), tais como radicais livres (GROSSI; GENCO, 1998). As fibras de colágeno modificada se acumulam nos tecidos, resultando em espessamento da membrana basal,

prejudicando a difusão de oxigênio, eliminação de resíduos, a migração de leucócitos e a difusão de fatores imunes podendo, assim, contribuir para a patogênese da periodontite (LALLA et al., 1998).

A sobrecarga de glicose pode ativar muitas vias metabólicas ou de sinalização que geram mais espécies reativas de oxigênio, levando ao estresse oxidativo e mais insuficiência das células β pancreáticas (WU; YAN, 2015). Acredita-se que os EROs desempenham um papel fundamental na patogênese das complicações diabéticas mais tardias, devido à sua capacidade para oxidar lipídios, proteínas e DNA. Além disso, os EROS podem alterar processos bioquímicos sensíveis ao estresse, podendo gerar alterações celulares que, em último caso, são igualmente responsáveis pelo aparecimento das complicações do diabetes, aumentando assim, a resistência à insulina e diminuição da sua secreção (HOUSTIS et al., 2006; LOPES et al., 2008).

Adicionalmente, no diabetes pobremente controlada ocorre anormalidades nas funções dos polimorfonucleares, tais como a adesão, quimiotaxia e a fagocitose prejudicadas, tornando o hospedeiro mais suscetível a infecções tais como a periodontite (BJELLAND et al., 2002).

Assim nesse contexto, sabendo que o diabetes tem sido considerado como um importante fator de risco para doenças periodontais, e a inflamação periodontal por sua vez, dificulta o controle do diabetes, é de interesse científico entendermos melhor quais mecanismos biológicos estão envolvidos no processo imunoinflamatório dessas duas doenças a fim de contribuir para os futuros estudos com abordagens preventivas e/ou terapêuticas.

1.4 A participação da via WNT/ β -catenina no tecido ósseo e no diabetes

A maior função do tecido ósseo é prover suporte estrutural para o corpo, proteção de órgãos internos e acomodação do sistema hematopoiético. O osso está em constante remodelação para que ocorra adaptação óssea ao crescimento ou devido à carga mecânica, e também para o reparo de danos. As principais células que participam da remodelação são os osteoblastos, que tem função de

formação óssea, e osteoclastos, que participam da reabsorção deste tecido (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003; REDLICH; SMOLEN, 2012).

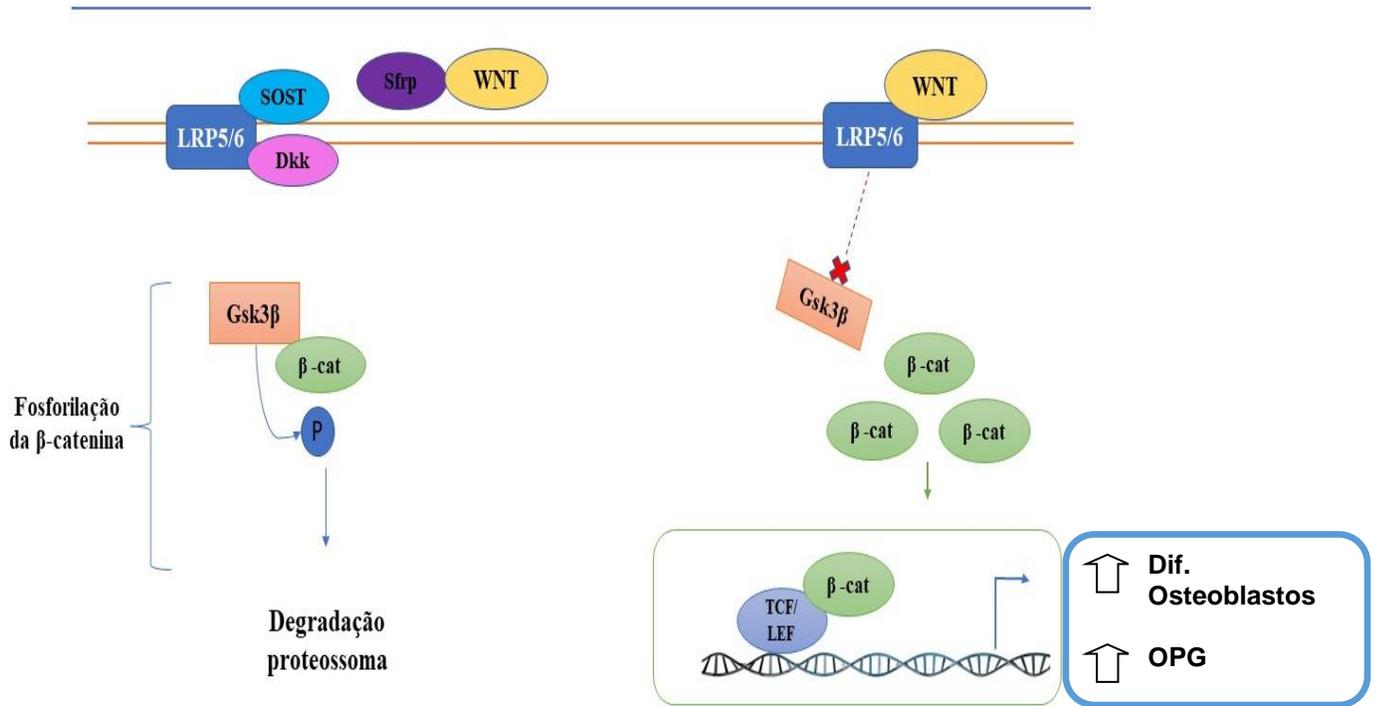
O ciclo de remodelação óssea é controlado por uma grande variedade de mecanismos imunológicos, promovendo o desenvolvimento de uma nova área de estudo conhecida como Osteoimunologia (OKAMOTO; TAKAYANAGI, 2011). A descoberta do eixo do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANK), seu ligante (RANKL) e osteoprotegerina (OPG) (RANK-RANKL-OPG) permitiu a melhor compreensão da homeostasia óssea e interrelação entre metabolismo ósseo e imunologia (HARDY; COOPER, 2009).

Em certas condições inflamatórias crônicas, tais como na periodontite, observa-se um desequilíbrio neste eixo RANK-RANKL-OPG, resultando em excessiva reabsorção óssea (YUAN et al., 2011). A superexpressão de mediadores pró-inflamatórios, tais como Interleucinas (IL) -1, -6, -8, -11 e -17, e o fator de necrose tumoral (TNF), dentre outros, estimulam osteoblastos periosteais, bem como de outros tipos celulares incluindo fibroblastos e linfócitos T e B, a aumentar a expressão de RANKL em sua superfície (ZUPAN; JERAS; MARC, 2013). Adicionalmente, estes mediadores também promovem redução da produção de OPG por osteoblastos e células estromais, favorecendo assim a osteoclastogênese, e conseqüente reabsorção óssea (NAKASHIMA et al., 2000).

Atualmente, além do eixo RANK-RANKL-OPG, a literatura tem mostrado que a via WNT/ β -catenina parece atuar na homeostasia óssea (RAUNER et al., 2013). As proteínas WNT, as quais são glicoproteínas secretadas ricas em cisteína, ativam pelo menos 3 sinalizações sendo a sinalização canônica a mais bem entendida até então. Nesta via, quando as WNTs se ligam ao seu receptor, o qual está associado a um receptor de lipoproteína de baixa-densidade relacionado a proteína -5, ou -6 (LRP-5/6), ocorre inibição da quinase glicogênio sintase 3 β (GSK3 β) favorecendo a estabilização da β -catenina (BARKER, 2008). A β -catenina estabilizada se acumula no núcleo e ativa diversos fatores de transcrição, tais como o fator de célula T/ fator estimulador de linfócito (TCF/LEF), que promovem diferenciação de osteoblastos e aumento da produção de OPG (KUBOTA et al., 2009). A regulação desta via é feita pela ação de Dickkopfs

(DKKs) e Esclerostina (SOST), que se ligam aos receptores LRP5/6, ou as proteínas secretadas relacionadas ao receptor de WNT (Sfrps) que se ligam as WNTs e agem impedindo a inibição da GSK3 β , favorecendo assim a fosforilação da β -catenina, a qual se liga à ubiquitina para então ser degradada via proteossoma (BARKER, 2008). (Figura 2).

Figura 1 - Via de sinalização Wnt/ β -catenina.



Fonte: KUBOTA et al., 2009 (Adaptado pela autora).

A deficiência de β -catenina inibe a osteoblastogênese e consequente produção de OPG, promovendo um desequilíbrio do eixo RANK-RANKL-OPG a favor de RANK. Os inibidores da via canônica (DKK e SOST) são induzidos por ação de mediadores inflamatórios e citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α (KUBOTA et al., 2009; RAUNER et al., 2013).

Tem sido relatado na literatura que proteínas WNT 7b e 10b atuam como reguladores endógenos da formação óssea, pois estão expressas em osteoblastos e sua expressão está elevada quando da diferenciação osteoblástica, além disso, estas proteínas promovem indução de fatores de transcrição osteoblastogênicos (HU et al., 2005; LI et al., 2005a, 2005b).

A inibição ou perda da β -catenina, em células do tecido ósseo, produz grave osteopenia com aumento de osteoclastos e redução da osteoblastogênese (ALBERS et al., 2013). Os osteoblastos produzidos na ausência de β -catenina exibem expressão elevada da RANKL e redução da produção de OPG (CORRADO et al., 2013), mostrando que a β -catenina em osteoblastos maduros regula produção e função dos osteoclastos (HOLMEN et al., 2005). Portanto a via canônica da sinalização WNT/ β -catenina parece estar ligada ao eixo RANK-RANKL-OPG na regulação da homeostasia óssea (SHIN et al., 2005).

Vale ressaltar que a via WNT/ β -catenina parece estar envolvida também na patogênese do DM. A via WNT está envolvida no metabolismo lipídico e na homeostase da glicose e mutações no receptor LRP5 podem levar ao desenvolvimento de diabetes e obesidade. A β -catenina/TCF também está envolvido na produção do hormônio incretina peptídeo 1 tipo glucagon nas células endócrinas intestinais. Mais recentemente, estudos de associação genômica identificaram o TCF7L2 como um gene de suscetibilidade ao diabetes, e indivíduos portadores de certos polimorfismos de nucleotídeo único TCF7L2 podem ser mais suscetíveis ao desenvolvimento de diabetes tipo 2 (JIN, 2008).

Neste contexto, entendendo que a resposta imunoinflamatória do hospedeiro tem papel importante na reabsorção óssea e nas condições sistêmicas como o diabetes, uma vez que a presença de inflamação sugere alterar vias de sinalização importantes para o metabolismo ósseo e metabólico, parece ser interessante aprofundar o conhecimento acerca do papel da via WNT/ β -catenina na reabsorção óssea inflamatória associada a condições sistêmicas como o DM.

2. JUSTIFICATIVA

Sabendo que a periodontite é um processo mediado por diversas vias e mecanismos, envolvendo a presença de bactérias e a resposta do sistema imune do hospedeiro, e que a diabetes parece contribuir para o agravamento da periodontite, especialmente por aumentar o status inflamatório e desregular diversas vias de sinalização, sendo esta via ainda pouco estudada na periodontite associada a condições sistêmicas, torna-se interessante investigar a participação da via Wnt/ β -catenina, em condições patológicas como no caso da periodontite associada ao diabetes.

3.OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar o efeito do diabetes mellitus na periodontite experimental em ratos: investigando a possível participação da via WNT/ β -catenina.

3.2 Objetivos Específicos

Em ratos diabéticos submetidos à periodontite:

- Avaliar a perda óssea alveolar através de análises macroscópicas, micro tomográfica (μ CT);
- Avaliar o processo inflamatório no tecido periodontal através de análise histopatológica;
- Quantificar osteoclastos e osteoblastos por meio de análise histomorfométrica;
- Analisar o percentual colágeno no ligamento periodontal;
- Quantificar a imunexpressão do agonista Wnt10b e do antagonista DKK-1, por imunohistoquímica, no tecido ósseo;
- Quantificar os níveis gengivais de IL-8 e IL-1 β , através de ELISA;
- Analisar os níveis séricos de Glicose, Fosfatase Alcalina Óssea (FAO), Cálcio (Ca) e Fósforo (P).

4. CAPÍTULO 1

Esta dissertação está baseada no artigo 45 Regimento Interno do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará – Campus Sobral que regulamenta o formato alternativo para dissertações de Mestrado e permite a inserção de artigos científicos de autoria ou co-autoria do candidato.

Por se tratar de pesquisa envolvendo animais, os protocolos utilizados neste trabalho foram submetidos à apreciação e foram devidamente aprovados pelo comitê de ética animal com protocolo 05/16. (Anexo I). Dessa forma, a presente dissertação é composta por 1 artigo científico.

4.1 ARTIGO 1: EFEITO DA DIABETES MELLITUS NA PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM RATOS: PARTICIPAÇÃO DA VIA WNT

Introdução

A periodontite é uma doença infecto-inflamatória dos tecidos de suporte do dente, sendo uma das principais causas de perda dentária (PETERSEN; OGAWA, 2005; BORRELL; PAPAPANOU, 2005). Esta apresenta etiologia multifatorial, sendo a susceptibilidade do hospedeiro, decorrente de uma infecção bacteriana, um importante fator iniciador e de progressão desta doença (PIHLSTROM et al., 2005; BASCONES-MARTÍNEZ et al., 2012). Porém apesar da resposta do hospedeiro ser essencialmente protetora, esta precisa estar modulada, pois tanto a hiporresponsividade, quanto a hiperrresponsividade pode resultar em destruição tecidual (REDLICH; SMOLEN, 2012).

Nas duas últimas décadas têm surgido evidências que suportam o conceito de que as doenças periodontais (DP), tais como periodontite, podem refletir na homeostasia de diversos órgãos e tecidos do corpo. As DP tem sido estudada como importantes fatores de risco para doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, nascimento de bebês prematuros e/ou com baixo peso e do mau controle metabólico em pacientes com Diabetes Mellitus (DM) (ALVES et al., 2007).

O DM representa um grave problema de saúde pública mundial e vem se agravando nas nações em desenvolvimento. Sendo 90% dos pacientes portadoras de DM tipo 2 (FAZELI FARSANI et al., 2013). Existem dois principais tipos da doença, sendo estas classificadas como DM tipo 1, onde ocorre a deficiência na produção de insulina decorrente da destruição autoimune das células β do pâncreas e DM tipo 2 que ocorre resistência à ação da insulina e a doença tem herança poligênica ainda não completamente definida. (DEFRONZO, 2004; MALANDRINO, SMITH, 2011).

Os principais sintomas do DM são: polidipsia, polifagia e perda de peso, além de outras complicações comumente encontrados nestes pacientes, como alterações visuais, nefropatias, neuropatias e as complicações orais (SOUSA et al., 2003; VARELLIS M. 2005). Dentre as manifestações orais, mais comuns, em portadores de DM estão: cárie de rápida evolução, cálculo dental, aumento da parótida, periodontites, xerostomia, alteração do paladar e alterações na

microbiota da cavidade oral (SOUSA et al., 2003). O diabetes altera a ação dos mecanismos imunológicos sistematicamente, assim os pacientes com DM têm os mecanismos de defesa prejudicados e são mais suscetíveis à infecção, e em geral, as infecções em diabéticos são mais graves quando comparados aos pacientes não diabéticos (MEALEY, 1999).

Assim, a relação entre DM e as doença periodontais, tais como periodontite, tem sido extensamente estudada. A partir das pesquisas epidemiológicas observou-se que o DM aumenta o risco e a gravidade das doenças periodontais (MEDEIRO et al., 2005), porém os mecanismos e vias envolvidos neste processo ainda não estão bem elucidados na literatura.

Estudos mostram que em pacientes com doenças periodontais, ocorre liberação crônica e exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-8 e TNF- α (VAN DYKE; SERHAN, 2003) podendo reduzir a ação da insulina com consequente agravamento das alterações metabólicas (KOROMANTZOS et al., 2011). Vale ressaltar que a periodontite tem sido destacada como a 6^a principal complicação do diabetes (MANGAN et al., 2000). Dentro desse contexto, parece existir uma relação próxima entre periodontite, reabsorção óssea e diabetes, ao se considerar a inflamação crônica um denominador comum entre elas (GARCIA-HERNANDEZ et al., 2012).

Considerando especificamente a perda óssea inflamatória, quando a periodontite está associada ao DM tem sido relatado alterações na homeostasia óssea e metabólica mediada pela desregulação de vias de sinalização neste cenário (PIHLSTROM et al., 2005; ALVES, 2007; BASCONES-MARTÍNEZ et al., 2012). Assim dentre as vias que parecem estar envolvidas neste processo destaca-se a via WNT/ β -catenina, tornando-se interessante investigar a participação da via WNT/ β -catenina, em condições patológicas como no caso da periodontite associada ao diabetes.

Materiais e Métodos

Tipo do Estudo e Aspectos éticos

Trata-se de um estudo pré-clínico prospectivo, randomizado, controlado e cego. Os protocolos experimentais foram executados seguindo as recomendações apresentadas no ARRIVE (Animal Research: Reporting In Vivo Experiments) guidelines para uso de animais experimentais (KILKENNY et al., 2010). Os experimentos foram iniciados logo após aprovação no Comitê de Ética Animal da UFC- *Campus* Sobral, sendo este aprovado sob o nº de protocolo 05/16 o qual é regido pela Declaração Universal de Direitos Animais (UNESCO – 27 de janeiro 1978) e pelos Guidelines Éticos Internacionais para Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (Conselho para Organizações Internacionais de Ciências Médicas –CIOMS) bem como o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Seleção de Animais, cálculo da Amostra e Randomização

Foram utilizados 72 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), com massa corpórea de aproximadamente 200-220 gramas. Esses animais foram procedentes do Biotério Central do Campus do Pici - UFC e transferidos para o Biotério da Faculdade de Medicina – Campus Sobral, onde foram mantidos em gaiolas apropriadas, em número de 6 animais em cada. Todos receberam ração comercial balanceada e água à vontade, e permaneceram nas mesmas condições ambientais de ciclos claro/escuro de 12 horas e temperatura ambiente de 22 °C durante todo o experimento. Os animais foram randomicamente divididos em 4 grupos experimentais. Para tanto foi utilizada a estratégia de randomização em bloco.

Desenho Experimental

Após 2 semanas de adaptação, os animais foram divididos em 4 grupos com 6 animais cada: Naïve (N), Diabetes Mellitus (DM); Periodontite Experimental

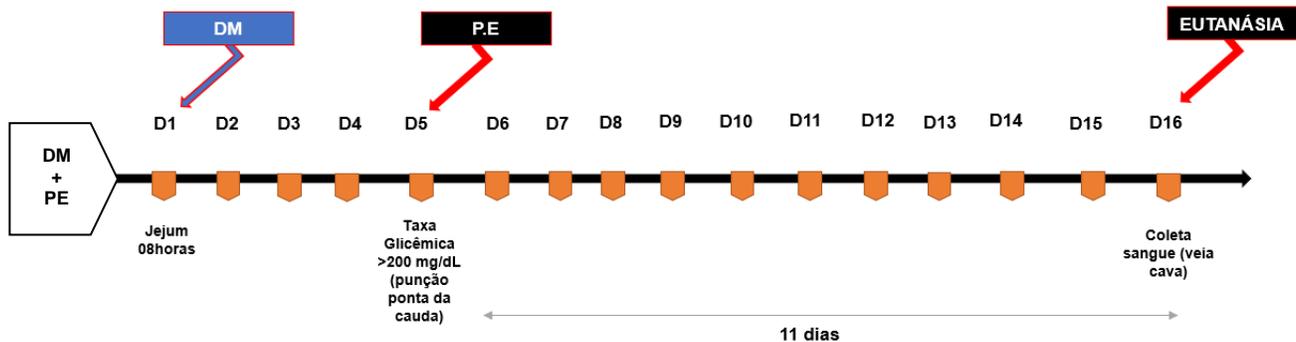
(PE) e Diabetes Mellitus + Periodontite (DM + PE). Os animais dos grupos DM e DM + PE foram submetidos a indução de DM tipo 2, 1º dia experimental, através da administração intraperitoneal (i.p) de nicotinamida na dose de 230 mg/kg, seguida por administração de estreptozotocina (Sigma® S-130) por via (i.p) na dose única de 60 mg/kg de peso corporal, diluído em tampão citrato (0,1M pH 4,5). Este modelo provoca diabetes por um longo período de tempo chegando até 40 semanas (MASIELLO et al. 1998). Os animais do grupo Naive não foram manipulados e os animais do grupo PE receberam 1ml/kg de solução salina por via (i.p).

Após 5 dias da indução de DM tipo 2, a taxa glicêmica foi aferida por obtenção de sangue da veia caudal e analisada com o glicosímetro Accu-Chek Active (Roche®). Os animais com níveis de glicose superiores a 200 mg/dL foram considerados diabéticos (MASIELLO et al. 1998).

Os animais dos grupos PE e DM + PE, após verificação da taxa glicêmica, foram submetidos a periodontite induzido por ligadura (5º dia experimental), que consiste na inserção de um fio de sutura de náilon 3.0, em torno do 2º molar superior esquerdo de um rato sob anestesia com Ketamina e Xilazina (75 mg/kg de Ketamina + 8 mg/kg de Xilazina por via intramuscular.). Logo em seguida, a passagem do fio, foi dado um nó cirúrgico voltado para a face vestibular (de LIMA et al., 2000).

Após onze dias a inserção do fio (PE e DM + PE), dia de pico da perda óssea intensa (de LIMA et al., 2000), todos os grupos do experimento foram eutanasiados (16 º dia experimental), por meio de overdose de barbitúrico Tiopental (100mg/kg) + Lidocaína (7 mg/kg) por via intraperitoneal. Foi realizada coleta de sangue a partir da veia cava inferior, no dia da eutanásia, para realização das dosagens séricas de fósforo, cálcio, glicose e Fosfatase Alcalina Óssea (FAO) (Fig. 2).

Figura 2 - Protocolo Experimental do Estudo.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2018). Legenda: no grupo Naive os animais não foram manipulados; o grupo DM no 1º dia foi submetido a indução DM tipo 2, no 5º dia foram anestesiados, mas não receberam ligadura; o grupo PE no 1º dia receberam salina 1ml/kg (i.p), no 5º dia foram submetidos a indução de PE por ligadura; o grupo DM+PE no 1º dia foram submetidos a indução de DM tipo 2, no 5º dia foram anestesiados e realizado a indução de PE por ligadura. Os animais foram acompanhados até a eutanásia (16º dia experimental).

Análise Macroscópica do Osso Alveolar

Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados e suas maxilas removidas e fixadas em formol a 10%, durante 24 horas. A seguir, as maxilas foram separadas em duas hemiarcadas, dissecadas e coradas com azul de metileno a 1%, a fim de discriminar tecido ósseo dos dentes (BEZERRA et al., 2000, 2002; de LIMA et al., 2000; LIMA et al., 2004; GOES et al., 2010; 2012, 2016). Para a quantificação da reabsorção óssea, as duas hemiarcadas foram acomodadas em massinha de modelar em lâminas para microscópio, e fotografadas em câmera digital (modelo D-40, Nikon, São Paulo - SP). Todas as imagens foram feitas com papel milimetrado de área conhecida para posterior conversão de pixel para mm². As imagens foram lançadas em Software IMAGE J® para a quantificação da perda óssea alveolar (POA). A área de reabsorção da hemiarcada, onde a periodontite foi induzida, foi dada pela subtração da área da ponta de cúspide até a borda óssea remanescente, pela respectiva área na

hemiarcada contralateral, controle próprio do animal. Esta área foi apresentada em mm² (GOES et al., 2010).

Análise Microtomográfica do Osso Alveolar

Os mesmos espécimes não-desmineralizados foram escaneados por um microtomógrafo cone beam (μ CT) (Skyscan 1172, Bruker, Kontich, Bélgica). O gerador de raios X foi operado sob potencial acelerado de 50 kV com feixe corrente de 200 μ A e um tempo de exposição de 560 ms por projeção. As imagens foram reproduzidas com um voxel de 6x6x6 μ m. Usando um software apropriado (Data Viewer®, versão 1.5.0, Bruker, Kontich, Bélgica), os três modelos dimensionais gerados foram rotacionados em uma posição padrão como descrito previamente (LISBOA et al., 2015). As medidas lineares de POA foram realizadas em 3 sítios diferentes: vestibular, furca e interproximal. Para o sítio interproximal, os dados coronais foram analisados usando software apropriado (CT-Analyser®, versão 1.13.5.1+, Bruker, Kontich, Bélgica). Parâmetros volumétricos tais como: Área Superficial da Trabécula, Número Trabecular, Porosidade Óssea e Fração do Volume Ósseo, também foram analisados (LISBOA et al., 2015, SOUSA et al., 2017).

Análise Histopatológica do Osso Alveolar

As análises histopatológicas foram realizadas em cortes seriados da hemiarcada. Para tanto, após a eutanásia as hemiarcadas foram removidas e fixadas em formol tamponado a 10% por 24 horas. A seguir, foram submetidas a tratamento com EDTA tamponado a 10%, por aproximadamente 30 dias, para a desmineralização, seguido de banho em água corrente por 24 horas. As peças foram armazenadas em álcool absoluto até sua inclusão em parafina. Foram feitos cortes seriados de 4 μ m e as lâminas obtidas foram coradas pelo método Hematoxilina–Eosina (H&E). Para a análise microscópica da hemiarcada, a região entre os 1^o e 2^o molares foi considerada, sendo avaliados os aspectos inflamatórios como presença/intensidade de infiltrado celular, além do estado de preservação do processo alveolar e cemento, atribuindo-se escores que variaram

de zero a três, de acordo com a intensidade dos achados, proposta por Leitão et al., (2005).

Estudo Histomorfométrico do Osso Alveolar

As mesmas lâminas usadas para análise histológica foram usadas para estudo histomorfométrico. Os critérios de inclusão das lâminas foram: presença da raiz dental, epitélio, e osso interproximal na mesma secção. As imagens dessas secções foram capturadas em magnificação de 40x. As primeiras e últimas secções foram excluídas e 4 regiões igualmente distantes de cada dente foram selecionadas para análise histométrica (GOES et al., 2014). Um observador treinado e que desconhecia os grupos do estudo, usando o software IMAGEJ® fez a contagem de osteoclastos e osteoblastos, considerando 5 campos por lâmina, na região entre 1º e 2º molares (SCHNEIDER et al., 2017).

Análise da Percentagem de Colágeno Total

A coloração de *Picrosirius Red* (PSR) é um método simples e sensível de detectar a presença de colágeno (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979). Para esta análise, secções histológicas de 3 µm foram dispostas em lâminas de vidro silanizadas e desparafinados em estufa a 60°C por 3h e três banhos de xilol (5 minutos). Após reidratação em série decrescente de álcool as lâminas foram incubadas em solução de *Picrosirius* (ScyTek®, Logan, UT, USA) por 30 minutos e então lavadas rapidamente em dois banhos de ácido clorídrico 5%, contra-coradas com hematoxilina de Harris por 45 segundos e montadas com Enhtellan®. Após preparo, as lâminas foram analisadas sob microscópio convencional. Para avaliação do colágeno foram fotografados 6 campos em um aumento de 200x (Microscópio Leica). As fotomicrografias foram avaliadas quantitativamente pelo software de análise de imagem ImageJ®, após calibração das imagens pelo comando Color Thershold (Image > Adjust > Color Thershold) na função RGB para as cores Vermelho (Mínimo de 71 e Máximo de 255), Verde (Mínimo de 0 e Máximo de 69) e azul (Mínimo de 0 e Máximo de 92). Depois da calibração as imagens foram convertidas para escala de cor de 8-bits (Image >

Type > 8-bit), binarizadas (Process > Binary > Make Binary) e mensurada a porcentagem de área total de colágeno marcada em preto (Analyse > Analyse Particles) (ANDRADE et al., 2011; FERREIRA JÚNIOR, 2016). A média das percentagens das lâminas foi utilizada como uma unidade de amostra e os dados foram apresentados como média percentual \pm E.P.M.

Imunohistoquímica para Wnt 10b e DKK-1

A partir dos blocos de parafina usados para análise histológica foram removidas secções de tecido que foram submetidos aos anticorpos anti-DKK-1 e Wnt10b utilizando o método de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU; RAINE, 1981).

Em seguida, foram feitos cortes seriados de 4 μ m em micrótomo apropriado e colocados em lâminas de poli-L-lisina, apropriadas para a realização de imunohistoquímica. Os cortes foram desparafinizados, hidratados em xilol e álcool e imersos em tampão citrato 0,1 M (pH 6,0) sob aquecimento em banho-maria, por 1 hora e 30 minutos para a recuperação antigênica a 69 °C. Após o resfriamento, obtido em temperatura ambiente durante 20 minutos, foram feitas lavagens com solução tamponada de fosfato (PBS), intercaladas com o bloqueio da peroxidase endógena com solução de H₂O₂ a 3% (30 minutos). Posteriormente, foi feito bloqueio de proteína com albumina sérica bovina (BSA) a 5% por 30 minutos. Os cortes foram incubados *overnight* com anticorpo primário policlonal anti-coelho para anti-Wnt10b diluído 1:200 (ABCAM®, Cambridge, MA, USA) em anticorpo diluente, para anti-DKK-1 diluído 1:100 (ABCAM®, Cambridge, MA, EUA). Após a lavagem em PBS, foi feita a incubação com secundário (de detecção) biotilado IgG de cabra e coelho diluído 1:400 (Santa Cruz Biotechnology®, Dallas, TX, EUA), por 30 minutos. Depois de lavado, os cortes foram incubados com o complexo estreptoavidina peroxidase conjugada (complexo ABC Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA) por 30 minutos. Após nova lavagem com PBS, seguiu-se coloração com o cromógeno 3,3'diaminobenzidine-peróxido (DAB), seguida por contra-coloração com hematoxilina de Mayer. Por fim, foi realizada a desidratação das amostras e

montagem das lâminas. Controles foram processados simultaneamente como descritos acima, para o controle negativo o anticorpo primário foi substituído por PBS-BSA 5% (HSU; RAINE, 1981; DALCICO et al., 2013) e para o positivo foram utilizados os tecidos de referência de acordo com o fabricante. As imagens da imunohistoquímica foram capturadas por meio de um microscópio de luz acoplado a uma câmera com sistema de aquisição LAZ 3.5 (LEICA DM 1000, Wetzlar, Alemanha). Foi realizada a determinação do percentual de células imunomarcadas positivamente ao redor do tecido ósseo localizado na região entre o 1º e 2º molar do rato em 05 campos por lâmina (ANDRADE et al., 2008; LISBOA et al., 2015).

Análise de IL-1 β e IL-8 no tecido gengival de ratos com periodontite submetidos a diabetes induzido, através ELISA

As concentrações de IL-1 β e IL-8 foram determinadas do tecido gengival dos ratos. Os tecidos gengivais foram removidos e armazenados a -80°C (DALCICO et al., 2013). O material foi homogeneizado em uma solução de RIPA Lysis Buffer System (Santa Cruz Biotechnology, EUA), e o sobrenadante foi usado para determinar os níveis de citocinas e foram quantificados pelos seguintes kits: IL-1 β -Rat IL-1 beta / IL-1F2 Quantikine ELISA Kit (R & D Systems, número de catálogo DY501) e IL-8 por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Todos os ensaios foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as placas de microtitulação foram revestidas durante a noite à temperatura ambiente (20-23° C) com um anticorpo de captura contra ratos (4,0 μ g / mL) ou IL-1 β (0,8 μ g / mL). A placa foi bloqueada pela adição de Diluente de Reagente a cada poço, incubada a temperatura ambiente durante um mínimo de 1 h. Após o bloqueio da placa, as amostras e o padrão em várias diluições foram adicionados e incubados à temperatura ambiente durante 2 h. A placa foi lavada três vezes com tampão e do Anticorpo de Detecção, diluído em Diluente de Reagente com NGS 2% (350 ng / mL) foi adicionado (100 μ L / poço). Após uma incubação adicional à temperatura ambiente durante 2 h, a placa foi lavada e adicionou-se Streptavidin-HRP. O reagente de cor (H₂O₂ e

tetrametilbenzidina, 100 µL / poço) foi adicionado 15 minutos mais tarde e a placa foi incubada no escuro à temperatura ambiente durante 15-20 min. A reação enzimática foi interrompida com H₂SO₄ e a absorbância foi medida a 450 nm. As concentrações de IL-1β e IL-8 foram expressas em pg / mL.

Dosagens sérica de Cálcio, Fósforo, Glicose e Fosfatase Alcalina Óssea (FAO)

Ao final do estudo, sob anestesia, foram coletados 2 ml de amostras de sangue de todos os animais a partir da veia cava destes. O grupo Naive foi considerado o controle para todas as dosagens séricas. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante coletado para avaliação de: FAO, um marcador de atividade osteoblástica, através de metodologia da inativação térmica (MOSS; WHITBY, 1975; GOES et al., 2012); A dosagem de Cálcio e Fósforo, como marcadores do metabolismo ósseo, de acordo com as instruções do fabricante (Labtest®, Lagoa Santa, MG, Brasil) e a glicose plasmática foi realizado ao final do estudo também para confirmação do quadro de DM tipo 2 até o final do estudo, sendo realizado por meio do método enzimático da glicose oxidase, seguindo as instruções do fabricante (Labtest®, Lagoa Santa, MG, Brasil).

Análise Estatística

A normalidade dos dados foram verificadas através do teste de Shapiro-Wilk. Os dados paramétricos foram apresentados como média \pm erro padrão da média (E. análise de variância ANOVA seguido pelo teste de Tukey no caso de homogeneidade de variâncias ($p \geq 0,05$) ou pelo teste Games-Howell caso não houvesse homogeneidade de variâncias ($p < 0,05$).

Os dados não paramétricos foram apresentados com mediana (valores extremos), sendo utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn. Em todas as situações foi adotado o nível de significância de $p < 0,05$.

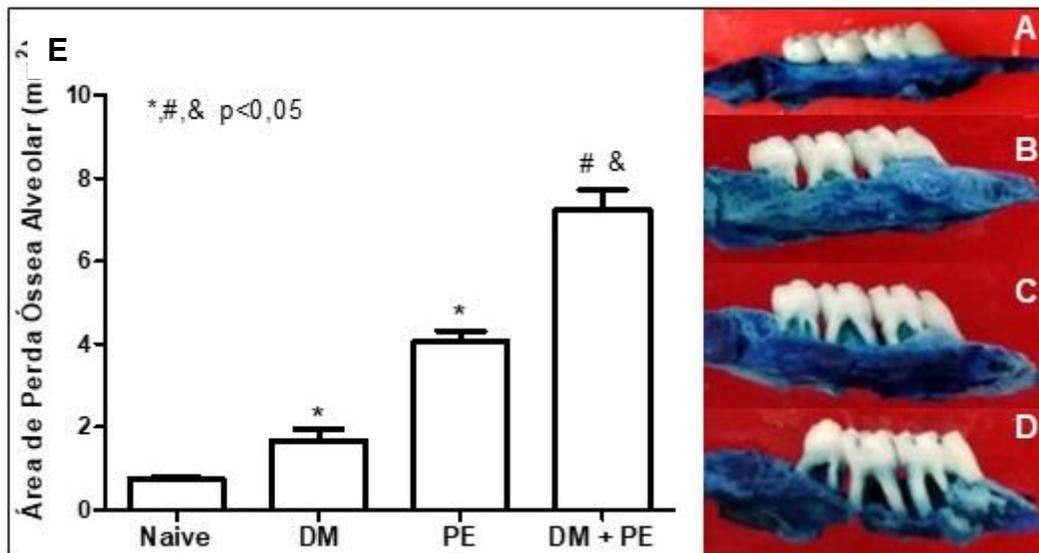
O software utilizado para todas as análises foi o IBM® SPSS® statistics 20 e gráficos elaborados usando recursos do GraphPad Prism® versão 6.0.

Resultados

Análise Macroscópica

Foram observados nos animais dos grupos DM ($1,67 \pm 0,29 \text{ mm}^2$) (Fig. 3B; 3E), PE ($4,06 \pm 0,25 \text{ mm}^2$) (Fig. 3C, 3E) e DM+PE ($7,25 \pm 0,46 \text{ mm}^2$) (Fig. 3D; 3E) que houve intensa perda óssea quando comparado aos animais do grupo Naive ($0,74 \pm 0,03 \text{ mm}^2$) (Fig. 3A; 3E) ($p < 0,05$). Os animais do grupo DM+PE ($7,25 \pm 0,46 \text{ mm}^2$) (Fig. 3D; 3E), mostram maior perda óssea quando comparado a DM ou PE isoladamente ($p < 0,05$).

Figura 3 - Análise morfométrica da hemimaxila de ratos submetidos à periodontite com diabetes induzido.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2018). Legenda: Análise morfométrica da hemimaxila de ratos do grupo Naive (A); DM (B); PE (C); e DM+PE (D). Barras representam média±EPM de 6 animais por grupo. (*) indica diferença quando comparado ao grupo Naive. (#) indica diferença quando comparado ao grupo PE. (&) indica diferença quando comparado ao DM (ANOVA e Tukey). ($p < 0,05$).

Análise microtomográfica

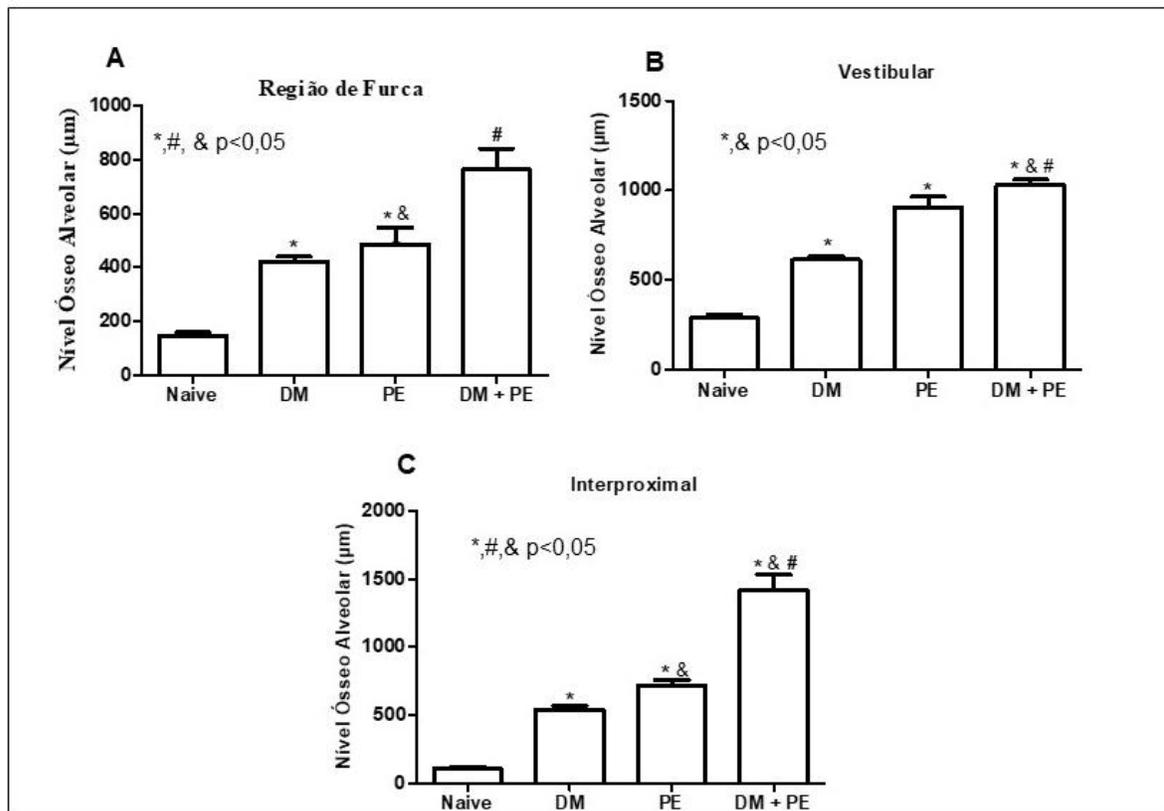
Considerando as medidas lineares foi visto que, na região de furca (Fig. 4A) os grupos DM ($422,10 \pm 18,73 \mu\text{m}$), PE ($486,9 \pm 61,53 \mu\text{m}$) e DM+PE ($763,8 \pm 77,17$) apresentaram significativa perda óssea quando comparado ao Naive

(147,3±11,95 μm) ($p<0,05$). O grupo PE (486,9± 61,53 μm) apresentou significativa perda óssea quando comparado ao DM isoladamente (422,10±18,73 μm). O grupo DM+PE (763,8±77,17 μm) apresentou aumento significante da perda óssea quando comparado aos grupos DM ou PE isoladamente.

Na região vestibular (Fig. 4B) observou-se que o grupo PE (929,4±51,87 μm), DM (614,7±19,35 μm) e DM+PE (764,6±46,88 μm) apresentaram maior perda óssea quando comparado ao grupo Naive (290,7±20,96 μm) ($p<0,05$). O DM+PE (764,6±46,88 μm) apresentou significativa perda óssea quando comparado ao grupo DM ou PE isoladamente ($p<0,05$).

Na região interproximal (Fig. 4C) o grupo DM (540,7±29,81 μm), PE (715,3± 39,87 μm) e DM+PE (1418±114,3) causaram aumento significante na perda óssea quando comparado ao grupo Naive (106,6±13,15 μm). O DM+PE (764,6±46,88 μm) apresentou significativa perda óssea quando comparado ao grupo DM ou PE isoladamente ($p<0,05$).

Figura 4 - Análise micro-tomográfica linear da hemimaxila de ratos diabéticos submetidos à periodontite.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2018). Barras representam média±EPM de 6 animais por grupo. (*) indica diferença quando comparado ao NAIVE. (#) indica diferença quando comprado ao grupo PE. (&) indica diferença quanto ao grupo DM (ANOVA e Tukey) ($p < 0,05$).

Na quantificação das análises volumétricas (Fig. 5) foi visto que o grupo DM ($5,06 \pm 0,14$ nº de trabéculas/mm), PE ($4,544 \pm 0,15$ nº de trabéculas/mm) e DM+PE ($4,00 \pm 0,19$ nº de trabéculas/mm) apresentaram redução significativa de trabéculas ósseas quando comparado ao Naive ($6,29 \pm 0,46$ nº de trabéculas/mm). Os animais submetidos a DM+PE ($4,00 \pm 0,19$ nº de trabéculas/mm) apresentaram redução do número de trabéculas quando comparado aos grupos DM e PE isoladamente (Fig. 5A) ($p < 0,05$).

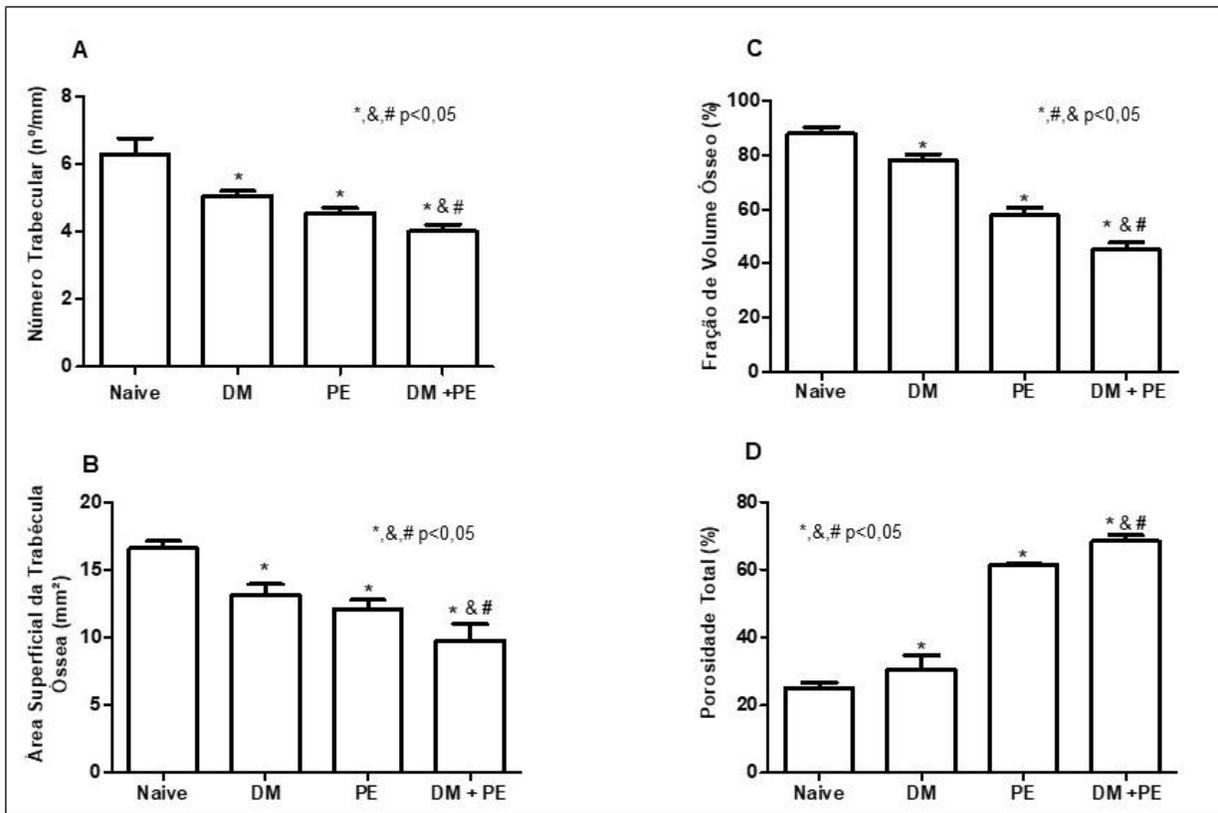
Quanto a área superficial da trabécula óssea (Fig.5B) observou-se que no grupo DM ($13,15 \pm 0,78$ mm²), PE ($12,11 \pm 0,66$ mm²) e e DM+PE ($9,76 \pm 1,241$ mm²) apresentaram redução quando comparado ao grupo Naive ($16,61 \pm 0,52$ mm²)

($p < 0,05$). Os animais do grupo DM+PE ($9,76 \pm 1,241 \text{mm}^2$) apresentaram uma redução significativa da área superficial da trabécula óssea comparado ao DM e PE isoladamente ($p < 0,05$).

Quanto ao volume ósseo (Fig. 5C) o grupo PE ($57,84 \pm 2,67\%$ de osso), DM ($78,07 \pm 2,12\%$ de osso) e DM+PE ($45,09 \pm 2,69\%$ de osso) evidenciaram uma redução significativa quando comparado ao grupo Naive ($87,88 \pm 2,34\%$ de osso). O grupo DM+PE ($45,09 \pm 2,69\%$ de osso) apresentou uma redução significativa da fração do volume ósseo quando comparado aos grupos PE e DM isoladamente.

Em relação a porosidade óssea total (Fig. 5D) os grupos DM ($30,43 \pm 4,32\%$), PE ($61,44 \pm 0,40\%$) e DM+PE ($68,48 \pm 1,882\%$) apresentaram aumento significativo da porosidade óssea quando comparado ao Naive ($25,00 \pm 1,71\%$). O DM+PE ($68,48 \pm 1,882\%$) apresentou aumento de forma significativa da porosidade óssea quando comparado aos grupos DM e PE isoladamente.

Figura 5 - Análise micro-tomográfica volumétrica da hemimaxila de ratos diabéticos submetidos a periodontite.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2018). Barras representam média±EPM de 6 animais por grupo. (*) indica diferença quando comparado ao NAIVE. (#) indica diferença quando comprado ao grupo PE. (&) indica diferença quanto ao grupo DM (ANOVA e Tukey) (p<0,05).

Análise histopatológica

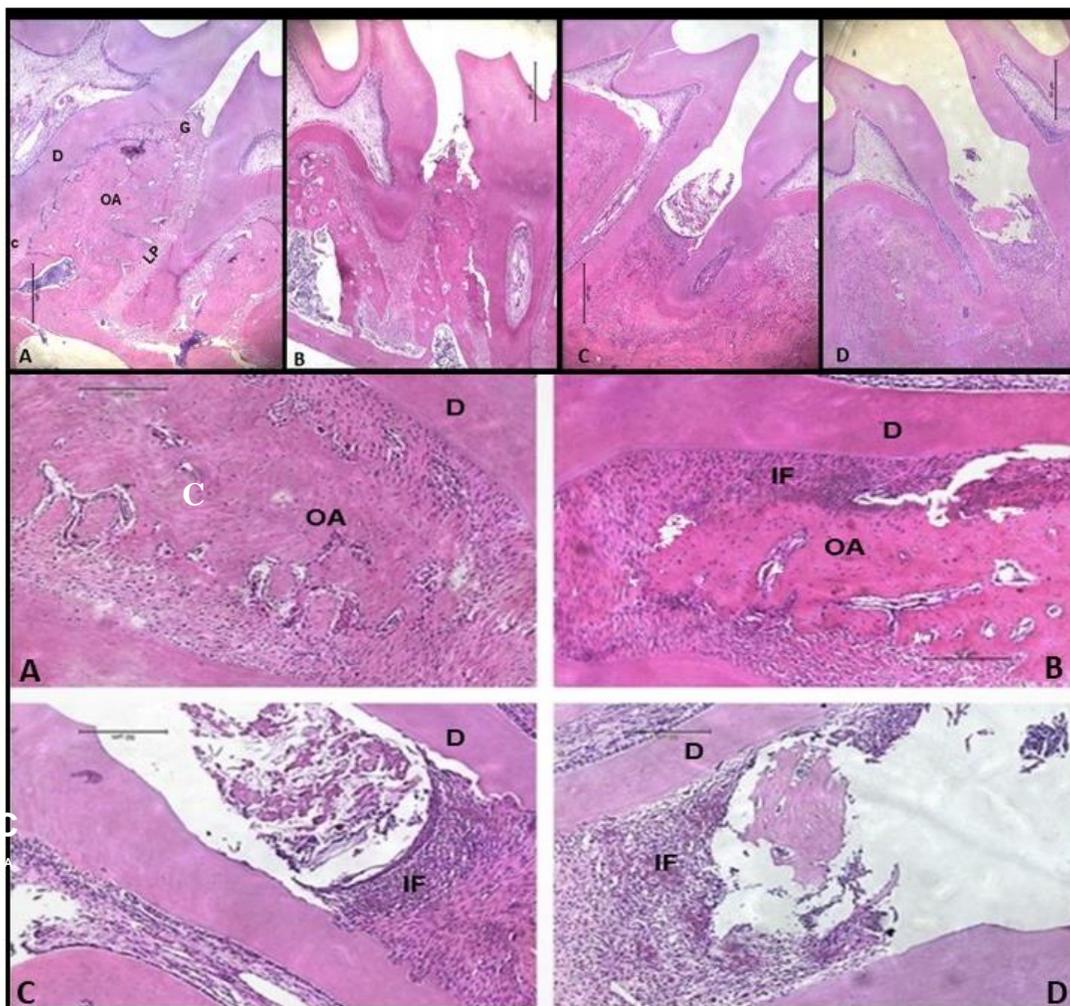
A análise histopatológica do tecido periodontal pode ser vista na Tabela 1. De forma geral as hemimaxilas dos grupos Naive (Fig. 6A) apresentaram tecido periodontal mais organizado, sem alterações teciduais e infiltrado inflamatório. No grupo DM foram observadas discretas alterações teciduais (Fig. 6B) e infiltrado inflamatório moderado. O grupo PE apresentou intensa reabsorção óssea bem como intensa alteração tecidual (Fig.6C), com muitos focos inflamatórios no tecido periodontal. O grupo DM+PE (Fig. 6D) apresentou reabsorção óssea grave, além de excessivos focos de infiltrados inflamatórios.

Tabela 1 - Análise histopatológica do tecido periodontal de ratos diabéticos submetidos à periodontite.

Escores	Grupos Experimentais			
	Naive	DM	PE	DM+PE
	0 (0-0)	1 (1-2) *	2 (2-3) *	3 (3-3) #, &

Fonte: Elaborado pelo Autor (2018). Legenda: DM=Diabetes Mellitus, PE=Periodontite experimental. Valores são apresentados em Mediana. (*) indica diferença quando comparado ao NAIVE. (#) indica diferença quando comprado ao grupo PE. (&) indica diferença quanto ao grupo DM. (Teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn) ($p < 0,05$).

Figura 6 - Análise histopatológica do periodonto de ratos diabéticos submetidos à periodontite.



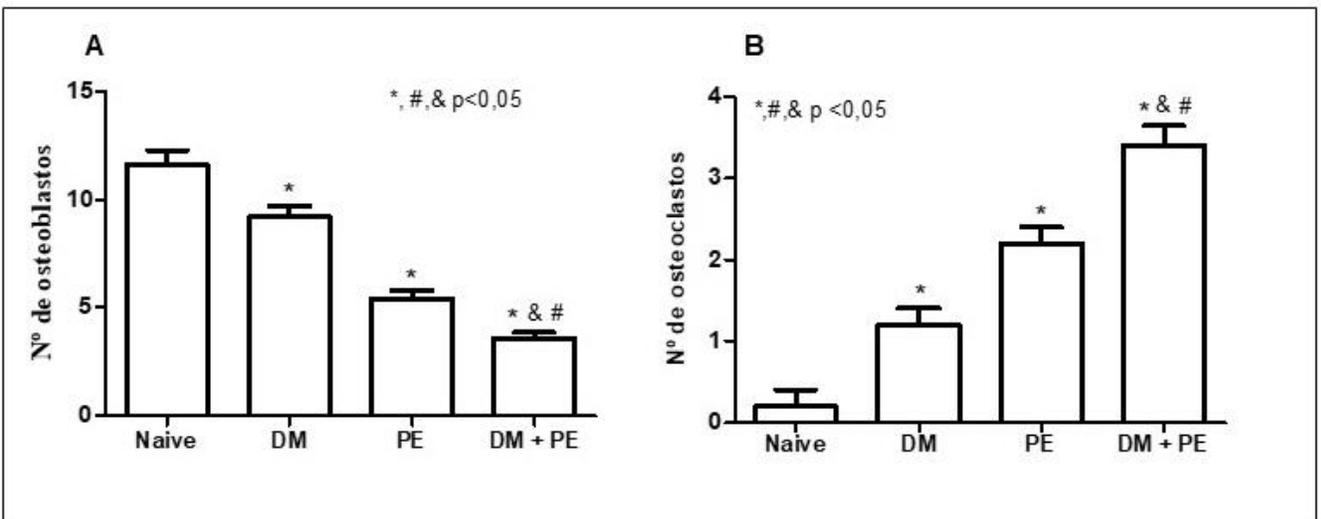
Fonte: Elaborado pelo Autor (2018). Análise histopatológica da hemimaxila de animais do grupo Naive (A); grupo DM (B); grupo PE (C); e grupo DM+PE (D). G = gengiva; LP = ligamento periodontal; D = dentina; OA = osso alveolar; C = cimento. Barra – 50 μ m, Hematoxilina e Eosina (H&E). (40x; 100x magnificação).

Análise histomorfométrica

Os animais dos grupos DM ($9,20 \pm 0,48$ células/mm²), PE ($5,40 \pm 0,40$ células/mm²) e DM+PE ($3,60 \pm 0,24$ células/mm²) apresentaram uma redução significativa na contagem de osteoblastos quando comparado ao Naive ($11,60 \pm 0,67$ células/mm²) (Fig. 7A). O grupo DM+PE ($3,60 \pm 0,24$ células/mm²) apresentou uma redução significativa quando comparado aos grupos DM e PE isoladamente ($p < 0,05$).

Na contagem de osteoclastos (Fig. 7B) os grupos DM ($1,20 \pm 0,20$ células/mm²), PE ($2,20 \pm 0,20$ células/mm²) e DM+PE ($3,40 \pm 0,24$ células/mm²) apresentaram aumento no número de osteoclastos quando comparado Naive ($0,20 \pm 0,20$ células/mm²) ($p < 0,05$). O grupo DM+PE ($3,40 \pm 0,24$ células/mm²) evidenciou aumento significativo desta célula quando comparado aos grupos PE e DM isoladamente.

Figura 7 - Contagem de osteoclastos e osteoblastos no periodonto de ratos submetidos a periodontite e diabetes experimental.

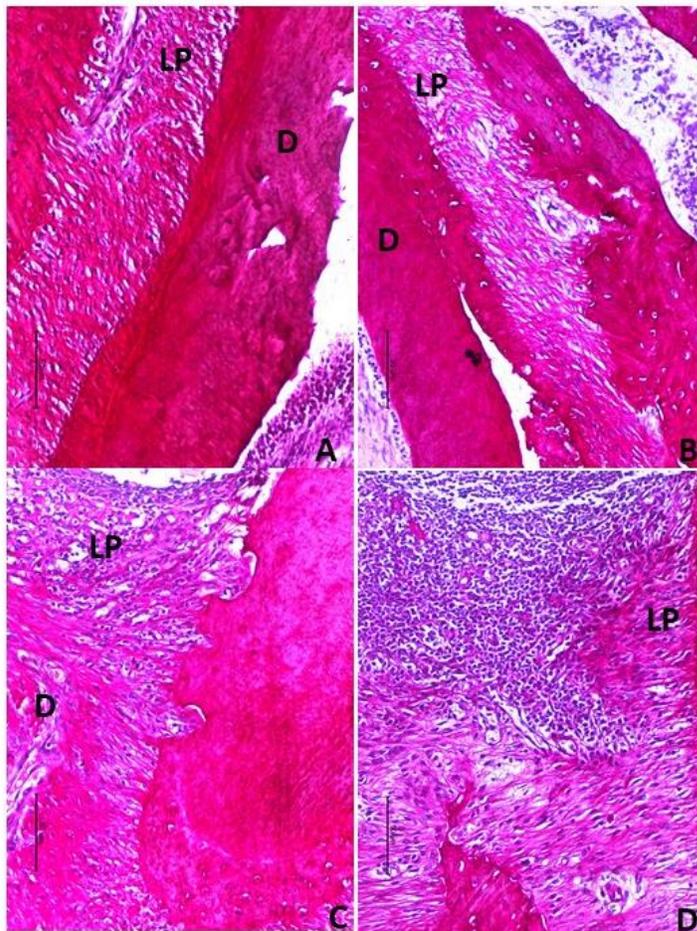


Fonte: Elaborado pelo Autor (2018). Barras representam média±EPM de 6 animais por grupo. (*) indica diferença quando comparado ao grupo Naive. (#) indica diferença quando comparado ao grupo PE. (ANOVA e Tukey). ($p < 0,05$).

Análise do percentual de colágeno total no ligamento periodontal.

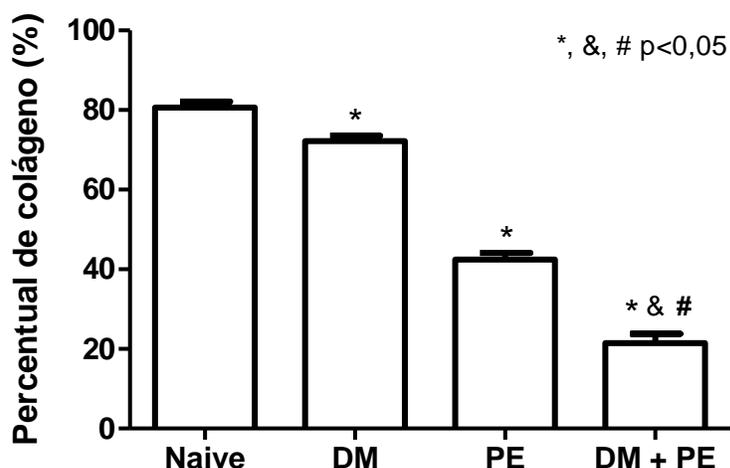
Usando a coloração de *Picrosirius red* foi possível observar uma redução significativa no percentual de colágeno no ligamento periodontal dos animais dos grupos PE (Fig. 8C;9) ($42,47 \pm 1,65\%$), DM (Fig. 8B;9) ($72,22 \pm 1,31\%$) e grupo DM+PE (Fig. 8D;9) ($21,45\% \pm 2,377$) quando comparado ao Naive (Fig. 8A;9) ($80,64 \pm 1,47\%$). O percentual de colágeno no ligamento periodontal dos animais do grupo DM+PE (Fig. 8D;9) ($21,45\% \pm 2,377$) apresentou uma redução significativa quando comparado aos grupos PE (Fig.8C;9) ($42,47 \pm 1,65\%$) e DM (Fig. 8B;9) ($74,82 \pm 2,35\%$) isoladamente ($p < 0,05$).

Figura 8 – Fotomicrografia do ligamento periodontal de ratos submetidos a periodontite e diabetes experimental.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2018). Fotomicrografia: Naive (A), DM (B) PE (C) DM+PE (D). Coloração Picrosirius Red (200x magnificação). LP = ligamento periodontal; D = Dentina.

Figura 9- Percentual de colágeno total de ratos diabéticos submetidos à periodontite.



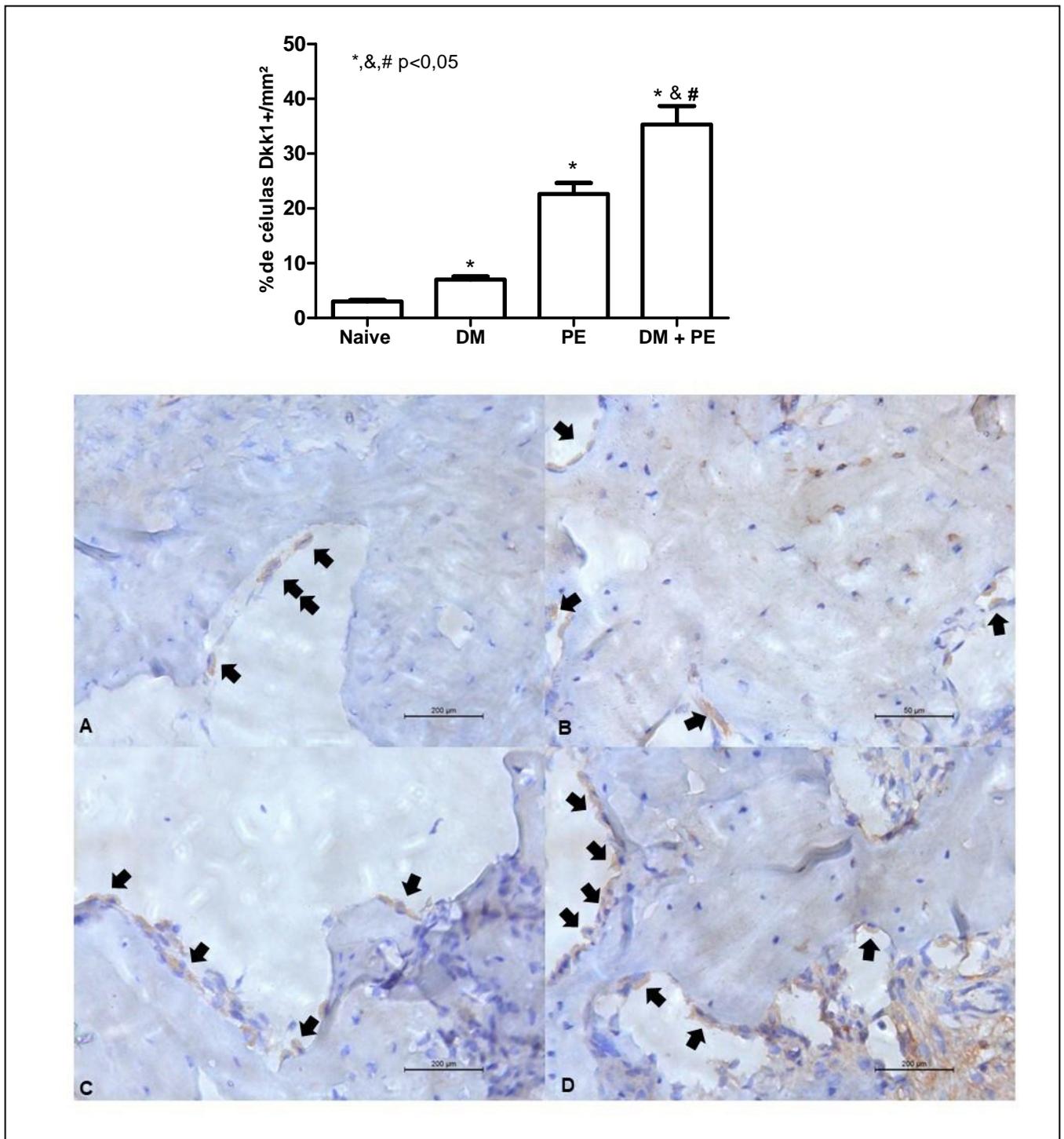
Fonte: Elaborado pelo Autor (2018). Barras representam média±EPM de 6 animais por grupo. (*) indica diferença quando comparado ao grupo Naive. (#) indica diferença quando comparado ao grupo PE. (&) indica diferença quando comparado DM (ANOVA e Tukey) ($p < 0,05$).

Análise imunohistoquímica para Wnt10 e dkk-1

Em relação à via de sinalização Wnt, os animais do grupo PE (Fig. 10C) ($22,67 \pm 1,99\%$), DM (Fig.10B) ($7,00 \pm 0,57\%$) e grupo DM+PE (Fig.10D) ($35,33 \pm 3,37\%$) mostraram aumento da percentagem de células imunopositivas para Dkk-1 quando comparado ao grupo Naive (Fig.10A) ($3,00 \pm 0,25\%$). O grupo DM+PE (Fig.10D) ($35,33 \pm 3,37\%$) apresentou um aumento significativo no percentual de células imunopositivas para Dkk-1 quando comparado ao grupo PE e DM isoladamente.

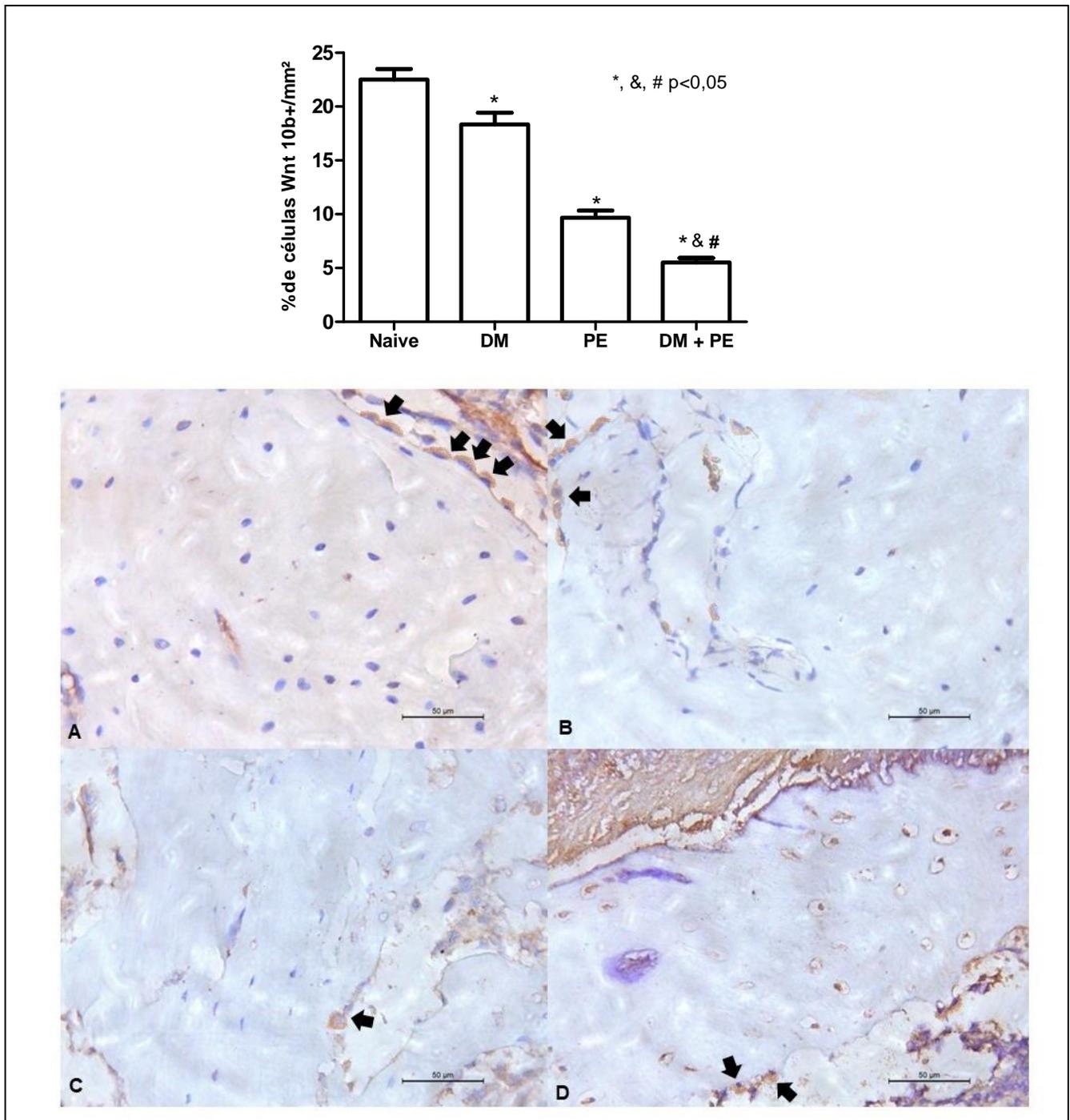
Considerando a percentagem das células imunopositivas para Wnt10b o grupo PE (Fig.11C) ($9,66 \pm 0,66\%$), DM (Fig.11B) ($18,33 \pm 1,08\%$) e grupo DM+PE (Fig.11D) ($35,33 \pm 3,37\%$) foram observados redução significativa na imunomarcção para Wnt10b quando comparado ao grupo Naive (Fig.11A) ($22,50 \pm 0,99\%$). O grupo DM+PE (Fig.11D) ($5,50 \pm 0,42\%$) apresentou uma redução significativa quando comparado ao grupo PE e DM individualmente.

Figura 10 - Análise imunohistoquímica para DKK-1 em ratos diabéticos submetidos a periodontite.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2018). Legenda: Fotomicrografia mostrando a imunoposição de DKK-1 na hemimaxila de ratos que foram submetidos a periodontite e diabetes experimental. Naive (A), DM (B) PE (C) e DM+ PE (D). Setas pretas indicam a imunomarcção. Barra – 50- 200 μm. (400x magnificação)

Figura 11 - Análise imunohistoquímica para Wnt 10b em ratos diabéticos submetidos a periodontite.



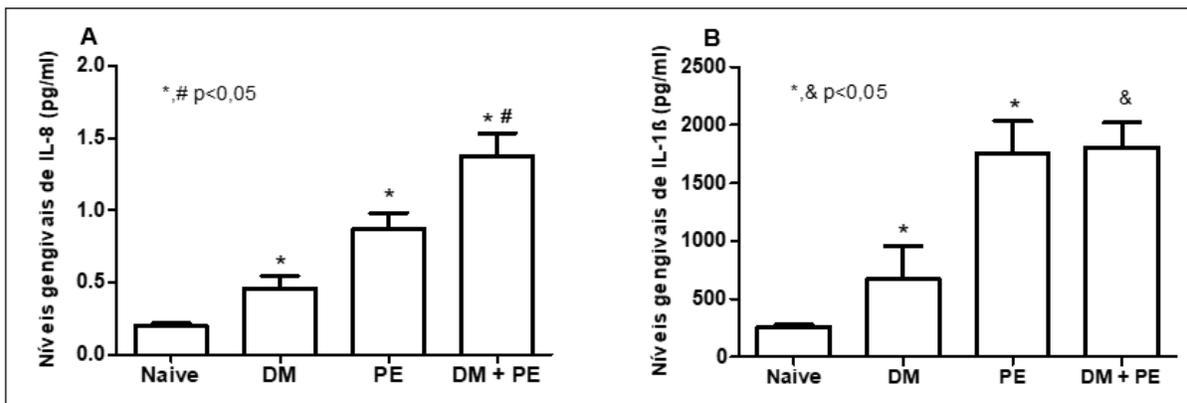
Fonte: Elaborado pelo Autor (2018). Legenda: Fotomicrografia mostrando a imunoposição de WNT-10b na hemimaxila de ratos que foram submetidos a periodontite e diabetes experimental. Naive (A), DM (B) PE (C) e PE + DM (D). Setas pretas indicam a imunomarcção. Barra – 50μm. (400x magnificação).

Quantificação dos níveis gengivais de IL-8 e IL-1 β

Quanto a IL-8 (Fig. 12A) os animais dos grupos DM ($0,39\pm 0,10$ pg/ml) e PE ($0,71\pm 0,17$ pg/ml) apresentaram aumento significativo nos níveis gengivais de IL-8 quando comparado ao grupo Naive ($0,19\pm 0,022$ pg/ml). O grupo DM+PE ($1,37\pm 0,15$ pg/ml) apresentou aumento significativo de IL-8 na gengiva quando comparado aos grupos PE e DM isoladamente.

Quanto a IL-1 β (Fig. 12B), os grupos DM ($671,0\pm 288,8$ pg/ml) e PE ($1753 \pm 278,7$ pg/ml) apresentaram aumento significativo dos níveis gengivais de IL-1 β quando comparado ao grupo Naive ($255,0\pm 22,81$ pg/ml). O grupo DM+PE ($1806\pm 215,7$ pg/ml) apresentou aumento considerável quando comparado ao grupo DM ($p<0,05$). Porém, não houve diferença significativa nos níveis de IL-1 β quando comparado ao grupo PE.

Figura 12 - Níveis gengivais de IL-8 e IL-1 β em ratos submetidos a periodontite e diabetes experimental.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2018). Legenda: Níveis gengivais de IL-8 e IL-1 β em animais submetidos a periodontite e diabetes experimental. Barras representam média \pm EPM de 6 animais por grupo. (*) indica diferença quando comparado ao grupo Naive. (#) indica diferença quando comparado ao grupo PE. (&) indica diferença quando comparado ao grupo DM (ANOVA e Tukey) ($p<0,05$).

Análise dos níveis séricos de Cálcio, Fósforo, Glicose e Fosfatase Alcalina Óssea (FAO).

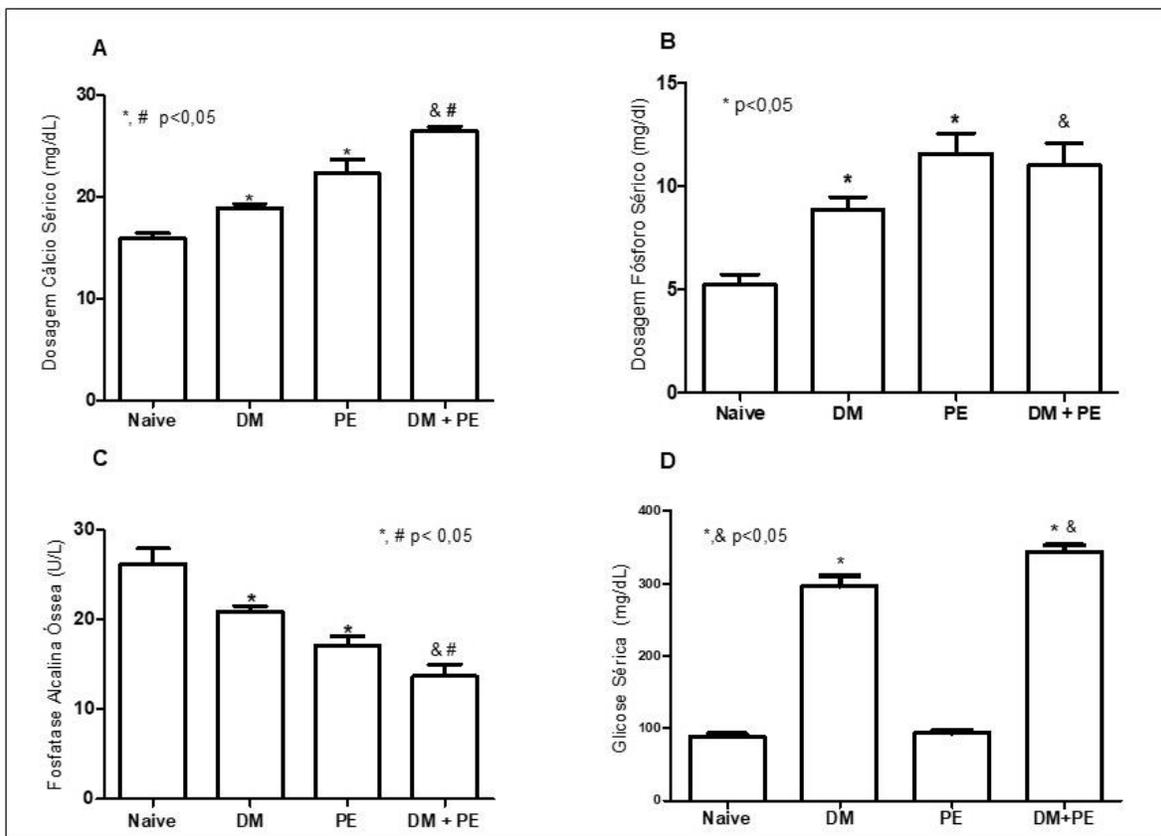
O ensaio bioquímico de Cálcio sérico (Fig. 13A) apresentou aumento significativo quando comparado os grupos DM ($18,91 \pm 0,42$ mg/dL) e PE ($22,32 \pm 1,36$ mg/dL) ao Naive ($15,9 \pm 0,58$ mg/dL). O grupo DM+PE ($26,47 \pm 0,47$ mg/dL) apresentou um aumento nos níveis séricos de cálcio quando comparado aos grupos DM e PE isoladamente ($p < 0,05$).

Quanto aos níveis séricos de Fósforo (Fig. 13B) evidenciou-se que o grupo DM ($8,86 \pm 0,60$ mg/dL), PE ($11,56 \pm 0,98$ mg/dL) apresentaram aumento significativo de fósforo sérico quando comparado ao Naive ($5,21 \pm 0,50$ mg/dL) ($p < 0,05$). DM+PE ($11,0 \pm 1,07$ mg/dL) apresentou diferença significativa quando comparado ao DM. Porém, não houve diferença significativa entre os níveis séricos de fósforo dos animais do grupo DM+PE quando comparado ao PE isoladamente.

Foi evidenciado uma redução dos níveis séricos de FAO (Fig. 13C) quando comparado ao grupo DM ($18,90 \pm 0,6122$ U/L) e PE ($17,11 \pm 1,054$ U/L) ao Naive ($26,19 \pm 1,730$ U/L). O grupo DM+PE ($13,36 \pm 1,44$ U/L) apresentou diminuição significativa da FAO sérica quando comparado a DM e PE isoladamente.

Os animais incluídos nos grupos diabéticos (DM ou DM + PE) apresentaram alterações clínicas e laboratoriais compatíveis com a doença tais como perda de peso, aumento da ingestão líquida e aumento do débito urinário. Analisando a glicose plasmática dos animais (Fig. 13D) foi possível observar um aumento significativo dos níveis sanguíneos de glicose nos animais do grupo DM ($296,36 \pm 14,27$ mg/dL) quando comparado ao Naive ($88,42 \pm 3,72$ mg/dL). Os animais do grupo DM+PE ($343,81 \pm 9,21$ mg/dL) apresentaram uma piora no controle glicêmico quando comparados ao grupo DM isoladamente ($p < 0,05$).

Figura 13 - Níveis séricos de Cálcio, Fósforo, Glicose e Fosfatase Alcalina Óssea de ratos submetidos a periodontite e diabetes induzido.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2018). Legenda: Níveis séricos de Cálcio (A), Fósforo (B), Fosfatase Alcalina Óssea (C) e Glicose (D) de animais submetidos a periodontite e diabetes experimental. Barras representam média±EPM de 6 animais por grupo. (*) indica diferença quando comparado ao grupo Naive. (#) indica diferença quando comprado ao grupo PE. (&) indica diferença quando comparado ao grupo DM. (ANOVA e Tukey) ($p < 0,05$).

Discussão

Os resultados desse estudo mostraram que a PE causa intensa perda óssea, em concordância com outros trabalhos do nosso grupo (BEZERRA et al., 2000, 2002, de LIMA et al., 2005, ALENCAR et al., 2002, LIMA et al., 2004, LEITÃO et al., 2004, 2005, MENEZES et al., 2005, de MENEZES et al., 2012, GOES et al., 2010, 2012, 2014, 2016; DALCICO et al., 2013; GONÇALVES et al., 2014; ALEXANDRE et al., 2017; SOUSA et al., 2016, 2017; LIMA et al., 2017).

Na análise macroscópica, de forma interessante, foi observado perda óssea significativa nos animais do grupo DM, confirmada pelo micro CT. Na literatura encontramos que em humanos, o diabetes está relacionado à diminuição da massa esquelética e ao atraso no reparo de fraturas (SOEJIMA; LANDING, 1986; HERSKIND et al., 1992) e que pacientes diabéticos exibem reduzida densidade e formação óssea, sugerindo uma menor atividade osteoblástica (KRAKAUER et al., 1995; MUNOZ-TORRES et al., 1996). Vários mecanismos têm sido propostos para justificar as anormalidades ósseas nos pacientes diabéticos, como a menor expressão do Fator de Crescimento Insulínico (IGF-1) ou do Fator de Crescimento Fibroblástico (FGF) que pode contribuir para a redução na síntese de matriz osteóide (VERHAEGHE et al., 1992; KAWAGUCHI et al., 1994). De acordo com Liu et al. (2006), animais diabéticos apresentaram aumento significativo dos níveis de inflamação local e continuaram a perder osso durante o experimento. Além disso, tiveram uma capacidade significativamente menor de reparo ósseo quando comparado aos animais não diabéticos (LIU et al., 2006). Mais recentemente, um estudo de Jing et al (2015) analisando o fêmur de animais diabéticos, por micro-CT observou-se que na fração do volume do osso os camundongos diabéticos apresentaram 35% menor na fração do volume ósseo quando comparado ao controle. Estes estudos contribuem com os nossos achados em relação a perda óssea nos animais com DM apenas.

No presente estudo também foi observado que a associação entre DM+PE piorou a perda óssea quando comparado a DM ou PE isoladamente. Evidenciando assim, que o diabetes nos animais com periodontite agravou e potencializou a perda óssea. Sabe-se que os diabéticos apresentam níveis de

mediadores pró-inflamatórios aumentados tanto sistemicamente quanto no ambiente periodontal, o que pode levar à maior destruição de um periodonto infectado (LIU et al., 2006; MEALEY, 2006). O estímulo constante do sistema imunológico por bactérias ou por alterações sistêmicas, como o diabetes, gera uma resposta inflamatória exacerbada que resulta na conseguinte reabsorção óssea e na osteogênese diminuída (GRAVES et al., 2011).

A análise histopatológica confirma os achados macroscópicos e microtomográficos deste estudo, onde o grupo DM apresentou aumento na intensidade do infiltrado inflamatório quando comparado ao Naive. Em estudo de Vozarova et al. (2002) foi detectado um aumento nos marcadores inflamatórios em indivíduos aparentemente saudáveis e que posteriormente vieram a desenvolver o diabetes. No diabetes à liberação de citocinas e de outros mediadores inflamatórios, resulta no recrutamento local de monócitos, que se diferenciam em macrófagos, os quais liberam mais fatores pró-inflamatórios e quimiocinas, não só localmente, bem como sistemicamente, propagando a resposta inflamatória a vários outros tecidos (SHOELSON et al., 2006). Ademais, o intenso infiltrado inflamatório visto no grupo DM associado PE pode contribuir de sobremaneira para a destruição óssea alveolar (LIU et al., 2006; NAGUIB et al., 2004; LALLA et al., 1998). Toker e seus colaboradores (2018), em estudo pré-clínico, mostraram que o infiltrado inflamatório no grupo de ratos com DM+PE foi maior do que no grupo controle e periodontite isoladamente. Corroborando assim com os resultados do presente estudo.

Em análises histométricas foi possível mensurar a presença de osteoblastos e osteoclastos nos animais do presente estudo. Assim, observamos que no grupo diabetes (DM) houve redução de osteoblastos e aumento de osteoclastos ao redor do osso alveolar. Segundo Liu et al., (2006) os animais diabéticos tendem a perder osso e tem uma capacidade significativamente menor de reparo. Podendo isto ser consequência da produção reduzida de matriz óssea por célula ou da diminuição no próprio número de osteoblastos capazes de secretarem essa matriz. O diabetes, gera uma resposta inflamatória exacerbada que resulta na formação de osteoclastos e na diminuída osteogênese (SHOELSON et al., 2006).

Segundo Zheng et al., (2018) em estudo pré-clínico mostrou que os animais diabéticos e periodontite, isoladamente, apresentaram considerável aumento dos osteoclastos comparado ao grupo controle. Sugerindo assim, desequilíbrio entre o processo de reabsorção e formação óssea nos animais diabéticos do presente estudo.

No grupo periodontite associado a diabetes houve uma redução significativa de osteoblastos e um aumento acentuado de osteoclastos quando comparado aos demais grupos do estudo. O estudo de Toker et al., (2018) mostra que o grupo PE associado a DM evidenciou redução significativa de osteoblastos e aumento nos osteoclastos próximo ao osso alveolar. A presença e persistência de mediadores imunoinflamatórios em pacientes com DM associado PE são alguns dos fatores principais que desregulam a homeostasia óssea, desencadeando a osteoclastogênese exacerbada e o agravamento da doença periodontal (GRAVES et al., 2005; NAGUIB et al., 2004; MEALEY, 2006). Como mostrado no presente estudo houve o agravamento da periodontite no grupo DM + PE e destruição tecidual considerável do periodonto comparado ao grupo DM e PE isoladamente.

Quanto ao colágeno total no ligamento periodontal os resultados evidenciaram que o diabetes influenciou na diminuição do percentual de colágeno nas fibras do ligamento periodontal quando comparado ao grupo controle. Segundo Luo et al. (2017), o mau funcionamento de células mononucleares em pacientes diabéticos, induzido pela inflamação, pode estimular a secreção das metaloproteinases (MMP)-8 e -9. Porém este estímulo acontece de forma exacerbada e desordenada ocasionando desequilíbrio na homeostasia da matriz colágena em pacientes diabéticos. Vale lembrar que as metaloproteinases estão envolvidas na degradação de fibras colágenas tendo despertado interesse por ser encontrada em várias doenças inflamatórias locais e sistêmicas como a periodontite e diabetes (THOMPSON; LOFTUS, 2002; EMINGIL et al., 2006).

No grupo DM+PE observou-se uma redução de colágeno total no ligamento periodontal quando comparado ao grupo DM ou PE individualmente. Segundo Bastos et al. (2017) em estudo clínico os indivíduos DM tipo 2, não compensados, aumentaram positivamente as metaloproteinases (MMP-8 e MMP-1) associadas a

doença periodontal crônica, o que pode contribuir para uma maior degradação da matriz extracelular e ruptura periodontal na periodontite relacionada ao DM.

Considerando a via de sinalização Wnt o presente estudo mostrou que no grupo DM o percentual de células imunopositivas para Wnt10b foi reduzido, enquanto que houve um aumento do percentual de células imunopositivas para Dkk-1. Um mecanismo candidato para a supressão da formação óssea no diabetes envolve a via de sinalização de Wnt. Semelhante ao fenótipo ósseo em ratos diabéticos, os ratos Wnt10b *knockout* têm baixa densidade óssea predominantemente devido à formação óssea suprimida (BENNETT et al., 2007). Em estudo mais recente, Jing et al., (2015) apresenta que a imunomarcagem de Wnt10b, no fêmur de ratos diabéticos foi menor quando comparado ao controle. Sabe-se ainda que as citocinas pró-inflamatórias estão envolvidas na supressão da expressão de WNT10b nos osteoblastos (RAUNER et al., 2013). Considerando a expressão de DKK-1, em estudo clínico os níveis sérico e gengival de DKK1 foram avaliados por imunensaio multiplex e a proteína gengival e/ou os níveis de mRNA de DKK1 foram maiores em pacientes com DM quando comparado ao controle (MIRANDA et al., 2018), o que corrobora com os resultados deste estudo.

No grupo DM+PE houve aumento do percentual de células imunopositivas para Dkk-1 associado a redução do percentual de células imunopositivas para Wnt10b quando comparado a DM ou PE isoladamente, corroborando com os resultados da histometria, uma vez que essa via tem participação direta na osteogênese e função do osteoblasto. Considerando os trabalhos recentes do nosso grupo, a periodontite isoladamente mostrou afetar a via de sinalização Wnt aumentando a imunomarcagem de DKK-1 ao mesmo tempo reduzindo a imunoexpressão de WNT 10b (SOUSA et al., 2017; LIMA et al., 2017). Analisando o DM isoladamente, um estudo mostrou aumento da expressão DKK1 *in vivo* e *in vitro* em células-tronco mesenquimais derivadas do ligamento periodontal em diabéticos com doença periodontal crônica (LIU et al., 2015). Assim, sabendo que a expressão dos antagonistas da via WNT são aumentados durante condições inflamatórias (WANG et al., 2011), podemos inferir que a associação de DM com

PE, leva a um quadro imunoinflamatório local e sistêmico pode provavelmente contribuir para maior expressão desta proteína na via WNT. Na literatura não foi encontrado nenhum artigo que reportasse diretamente o papel da via Wnt quando da associação entre diabetes e periodontite.

As interleucinas são membros do grupo das citocinas, que desempenham papel importante na patogênese da periodontite e diabetes, dentre estas temos as citocinas pró-inflamatórias IL-8 e IL-1 β (GRAVES et al., 2003; SHOELSON et al., 2006). No presente estudo foi possível observar que no grupo DM houve aumento de IL-1 β e IL-8 quando comparado ao Naive. Os pacientes diabéticos apresentam níveis séricos aumentados de citocinas inflamatórias circulantes (VOZAROVA et al., 2002; SHOELSON et al., 2006). Corroborando nossos resultados, em estudo realizado em cães diabéticos por Javed et al. (2014) observou-se que os níveis médios de IL-6 ($p < 0,01$) e IL-8 ($p < 0,05$) foram maiores em cães com diabetes do que aqueles sem diabetes. Além disso, em outro estudo a indução de diabetes em camundongos resultou em redução na densidade óssea acompanhada por aumento na expressão de RANKL e IL-1 β (MOTYL; MCCABE, 2009). Como a expressão de citocinas específicas depende da resposta imuno-inflamatória do hospedeiro e processos inflamatórios estão associados ao diabetes tipo II, sugere-se que as citocinas inflamatórias devem estar expressas no diabetes.

No grupo DM+PE foi observado aumento significativo das citocinas IL-1 β e IL-8 quando comparado aos demais grupos do estudo. Na literatura existem evidências suficientes de que a IL-1 β é um mediador importante na iniciação e progressão da doença periodontal (POPOVA; MLACHKOVA, 2010). No diabetes algumas das citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , permanecem elevadas nos pacientes diabéticos e podem promover a atividade osteoclástica e a reabsorção óssea por modificarem a via RANK/RANKL/OPG (GARCIA-HERNANDEZ et al., 2012). Assim, sugere-se que quando associadas, as duas patologias, tenhamos expressão exacerbada de citocinas pró-inflamatórias no tecido periodontal destes animais, como IL-1 β e IL-8.

Em relação aos níveis séricos de Cálcio e Fósforo plasmático nos grupos DM, PE e DM+PE ambos apresentaram diferença significativa quando comparado

ao grupo Naive. Os níveis significativos de cálcio nos animais com DM foi um fato considerado de interesse, podendo este está relacionado a lesões renais, comum em pacientes diabéticos, o que leva o acúmulo de diversos resíduos no sangue (LIAO et al., 2016) e juntamente com este achado a discreta reabsorção óssea no grupo DM pode ter contribuído para elevação do cálcio sérico neste grupo.

Assim, o presente estudo vem a contribuir com a literatura científica que indica que o cálcio e fósforo são importantes como marcadores no processo de reabsorção óssea (ARABACI et al., 2015). Nishida et al. (2000) relacionou as concentrações elevadas de cálcio sérico à progressão da doença periodontal. É interessante ressaltar que no presente trabalho o grupo de animais com PE associado a DM experimental apresentou um aumento significativo nos níveis séricos de Ca e P plasmáticos. Este resultado sugere que a intensa reabsorção óssea e provável falhas renais decorrentes do DM nesse grupo tenham contribuído para estes achados.

Nas dosagens séricas de FAO foi analisada que grupos DM, PE e PE+DM causaram uma diminuição significativa, nos níveis séricos de FAO quando comparado ao Naive. O grupo DM+PE apresentou uma redução significativa nos níveis séricos de FAO em comparação com DM ou PE isoladamente. Estes achados corroboram com resultados semelhantes já encontrados por pesquisadores do mesmo grupo de estudo, como no estudo de Goes et al. (2012), Sousa et al. (2017), ao qual apresentou que o grupo PE causou um aumento na reabsorção óssea alveolar considerando análises macroscópicas, radiográficas, micro-tomográficas e histológicas, e também na redução nos níveis séricos de FAO. Um dado interessante no presente estudo é que o grupo DM experimental apresentou uma redução significativa de FAO quando comparado ao Naive. Este dado reforça a idéia de que o grupo diabetes independente de associação com PE apresenta alterações nos marcadores de metabolismo ósseo (KRAKAUER et al., 1995; MUNOZ-TORRES et al., 1996). Sugerindo está associado ao processo de reabsorção óssea consequente do próprio quadro de DM .

Assim, considerando os parâmetros clínicos e laboratoriais apresentados no estudo, evidenciou-se o estabelecimento do quadro característico de diabetes

mellitus tipo 2 nos ratos DM induzidos por STZ/NTC. Vale ressaltar que a nicotinamida, uma vitamina hidrossolúvel do grupo B, precursora da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NAD), oferece proteção às células β pancreáticas contra grande variedade de insultos tóxicos ou imune (DULIN et al., 1969). Então, quando se realiza a administração de baixa doses de STZ e nicotinamida há indução de DM2 em roedores, e não DM1, pois ela inibe a ação da poli (ADP-ribose) sintase, levando a uma homeostase nos níveis de NAD intracelular, e protegendo as células pancreáticas (UCHIGATA et al.,1983).

O presente estudo ressalta ainda que os animais do grupo DM+PE apresentaram índices glicêmicos significativamente maiores do que o grupo DM. Assim, os resultados apresentados corroboram com as evidências científicas de que a periodontite não tratada, piora o controle metabólico da diabetes (BRANDÃO; SILVA; PENTEADO, 2011). A presença de infecções orais exacerba os efeitos deletérios da diabetes mellitus aumentando efetivamente os níveis de glicose no sangue (CINTRA et al., 2017). Em estudo realizado por Rodrigues et al (2015) os roedores com diabetes experimental e periodontite indicaram maiores concentrações plasmáticas de glicose e colesterol quando comparados aos animais diabéticos sem periodontite. Assim, mediante as constatações clínicas e laboratoriais do estado diabético nos ratos conclui-se que esta condição evidenciou o agravamento no controle glicêmico dos animais submetidos a DM associado PE experimental.

Conclusão

Em suma podemos concluir que o DM potencializou os efeitos destrutivos da periodontite experimental no osso alveolar de ratos, promovendo reabsorção óssea, redução do número de osteoblastos, bem como sua função, e aumento do número do osteoclastos. O DM também aumentou a intensidade do infiltrado inflamatório periodontal, com aumento de citocinas inflamatórias. A via Wnt parecer ter papel fundamental nestas alterações, visto que agonista (WNT-10b) e antagonista (DKK-1) desta via apresentaram imunomarcações no periodonto dos ratos deste estudo. Assim, considerando os achados deste estudo, sugerimos o aprofundamento do estudo da via Wnt/ β -catenina em condições patológicas como a associação da periodontite e diabetes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERS, J. et al. Canonical Wnt signaling inhibits osteoclastogenesis independent of osteoprotegerin. **J Cell Biol**, v. 200, n. 4, p. 537-549, 2013.

ALVES, C. et al. Mecanismos patogênicos da doença periodontal associada ao diabetes melito. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 51, p. 1050-7. 2007.

ALEXANDRE, J. T. M. et al. Anti-inflammatory and antiresorptive effects of *Calendula officinalis* on inflammatory bone loss in rats. **Clinical Oral Investigations**, p. 1–11, 2017.

ALENCAR, V.B. et al. Disodium chlodronate prevents bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol**, v. 73, n. 3, p. 251-256, 2002.

AL-KHABBAZ, A. K.; AL-SHAMMARI, K. F. Diabetes mellitus and periodontal health: dentists' knowledge. **Medical Principles and Practice**, Basel, v. 20, n. 6, p. 538–544, 2011.

ANTUNES, S.F. et al. Diabetes mellitus e a doença periodontal. **Rev Odonto Cienc**, v. 18, p.107-11. 2003.

ANDRADE, F. R. et al. Expression of bone resorption regulators (RANK, RANKL, and OPG) in odontogenic tumors. **Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol Endod**. n. 106, v. 4, p. 548-555, 2008.

ARABACI, T. et al. Therapeutic Effects of Melatonin on Alveolar Bone Resorption After Experimental Periodontitis in Rats. A Biochemical and Immunohistochemical Study. **Journal of Periodontology**, v. 10, p. 1–10, 2015.

BARKER, N. The canonical Wnt/beta-catenin signalling pathway. **Methods Mol Biol**, v. 468, p. 5-15, 2008.

BASCONES-MARTÍNEZ, A. et al. Periodontal disease and diabetes-Review of the Literature. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**. v. 16, p. 722-729, 2011.

BASCONES-MARTÍNEZ, A. et al. Periodontal disease and diabetes. **Adv Exp Med Biol**, v. 771, p. 76-87, 2012.

BASTOS, M.F. et al. Diabetes may affect the expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors more than smoking in chronic periodontitis. **J Periodontal Res**. v.52, p.292-299, 2017.

BJELLAND, S. et al. Dentists, diabetes and periodontitis. **Australian Dental Journal**. v. 47, p. 202–272, 2002.

BEZERRA, M.M. et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol**, v. 71, p. 1009-1014, 2000.

BEZERRA, M.M. et al. Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 35, p. 613616, 2002.

BENNETT, C.N. et al. Wnt10b increases postnatal bone formation by enhancing osteoblast differentiation. **J Bone Miner Res**, v. 22, p.1924–1932, 2007.

BOYLE, W.J; SIMONET W.S; LACEY D.L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v. 423, p. 337-342, 2003.

BORRELL, L. N; PAPAPANOU, P. N. Analytical epidemiology of periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**. v. 32, 132-158.2005.

BRANDÃO, D; SILVA, A; PENTEADO, L. Relação bidirecional entre a doença periodontal e diabetes mellitus. **Odontologia Clínico-Científica**, v. 10, n. 2, p. 117–120, 2011.

CAVAGNI, J. et al. Obesity may increase the occurrence of spontaneous periodontal disease in Wistar rats. **Arch Oral Biol**. v. 58, n. 8, p. 1034-1039, 2013.

CINTRA, L. T. A. et al. Oral health, diabetes, and body weight. **Archives of Oral Biology**, v. 73, p. 94–99, 2017.

CHAPPLE, I. L. et al. Compromised GCF total antioxidant capacity in periodontitis: cause or effect? **J Clin Periodontol**, v. 34, p. 103–110, 2007.

CHAPPLE, I. L.; MATTHEWS J.B. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. **Periodontology**. v. 43, p. 160–232, 2007.

CHAPPLE, I. L. C; GENCO R. Diabetes and periodontal diseases: Consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 40, p. 106–112, 2013.

COCHRAN, D.L. Inflammation and bone loss in periodontal disease. **J Periodontol**, v. 79, p. 1569-1576, 2008.

COLLIN, H.L. et al. Periodontal findings in elderly patients with noninsulin dependent diabetes mellitus. **Journal of Periodontology**. v.69, n.3, p. 962-966, 1998.

CORRADO, A. et al. RANKL/OPG Ratio and DKK-1 Expression in Primary

Osteoblastic Cultures from Osteoarthritic and Osteoporotic Subjects. **J Rheumatol**, v. 40, p. 684-694, 2013.

DALCICO, R. et al. Protective mechanisms of simvastatin in experimental periodontal disease. **J Periodontol**, v. 84, n. 8, p. 1145-1157, 2013.

DEFRONZO, R. A. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **The Medical Clinics of North America**, v. 88, n. 4, p. 787–835, 2004.

DESHPANDE, K. et al. Diabetes and periodontitis. **J Indian Soc Periodontol**, v.14, p. 207–212, 2010.

DE LIMA, V. et al. Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. **Eur J Oral Sci**. v. 108, p. 123-129, 2000.

DE MENEZES, A.M. et al. S-nitrosoglutathione decreases inflammation and bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol**, v. 83, p. 514-521, 2012.

DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (2017-2018). São Paulo: Editora Clannad, 2017.

DULIN, W. E. et al. Studies on the ability of compounds to block the diabetogenic activity of streptozotocin. **Diabetes**, v. 18, p. 459-466, 1969.

EMINGIL, G. et al. Gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase (MMP)-7, extracellular MMP inducer, and tissue inhibitor of MMP-1 levels in periodontal disease. **J Periodontol**, v.77, n.12, p. 2040-50, 2006.

FAZELI FARSANI, S. et al. Global trends in the incidence and prevalence of type 2 diabetes in children and adolescents: a systematic review and evaluation of methodological approaches. **Diabetologia**, v. 56, p. 1471– 1488, 2013.

GARCIA-HERNANDEZ, A. et al. High glucose concentrations alter the biomineralization process in human osteoblastic cells. **Bone**, v. 50, p. 276-288, 2012.

GARLET, G.P. et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. **Oral Microbiol Immunol**, v. 21, p. 12-20, 2006.

GOES, P. et al. Effect of Atorvastatin in radiographic density on alveolar bone loss in wistar rats. **Braz Dent J**, v. 21, p. 193-198, 2010.

GOES, P. et al. Effect of alendronate on bonespecific alkaline phosphatase on

periodontal bone loss in rats. **Arch Oral Biol**, v. 57, p. 1537-1544, 2012.

GOES, P. et al. Low-dose combination of alendronate and atorvastatin reduces ligature-induced alveolar bone loss in rats. **J Periodontal Res**. v. 49, p. 45-54, 2014.

GONÇALVES, D.C. et al. Infliximab attenuates inflammatory osteolysis in a model of periodontitis in Wistar rats. **Exp Biol Med**. v. 239, p. 442-453, 2014.

GRAVES, D.T; COCHRAN, D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. **J Periodontol**, v. 74, p. 391-401, 2003.

GRAVES, D. T. et al. Inflammation is more persistent in type 1 diabetic mice. **J Dent Res**, v. 84, p. 324-8, 2005.

GRAVES, D.T; OATES, T; GARLET, G. P. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. **Journal of Oral Microbiology**, v. 3, p. 1-15, 2011.

GREGHI S.L.A, et al. Relação entre diabetes mellitus e doença periodontal. **Rev APCD**, v.56, p.265-9. 2002.

GROSSI, S.G; GENCO R.J. Periodontal disease and diabetes mellitus: a two-way relationship. **Ann Periodontol**, v. 3, p. 51-61, 1998.

GYORFI, A. et al. Neurogenic component in ligature-induced periodontitis in the rat. **J Clin Periodontol**, v. 21, p. 601-605, 1994.

HARDY, R; COOPER, M.S. Bone loss in inflammatory disorders. **J Endocrinol**, v. 201, p. 309-320, 2009.

HERSKIND, A. M. et al. Diabetes mellitus and healing of closed fractures. **Diabete Metab**, v. 18, p. 63-4, 1992.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, p. 860-7, 2006.

HOLMEN, S.L. et al. Essential role of b-catenin in postnatal bone acquisition. **J Biol Chem**. v. 280, p. 2162–2168, 2005.

HOUSTIS, N. et al. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. **Nature**, v. 440, p. 944-948, 2006.

HU, H. et al. Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. **Development**, v.132, p. 49–60, 2005.

HSU, S.M; RAINE, L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. **J Histochem Cytochem**, v. 29, p. 1349-53, 1981.

ISLAM, M. S. Effects of the aqueous extract of white tea (*Camellia sinensis*) in a streptozotocin-induced diabetes model of rats. *Phytomedicine*. **international journal of phytotherapy and phytopharmacology**. v. 19, p. 25–31, 2011.

JAVED, F. Whole salivary interleukin-6 and matrix metalloproteinase-8 levels in patients with chronic periodontitis with and without prediabetes. **J Periodontol**, v.85, p. 234-241, 2014.

JING, Z. et al. Loss of Bone and Wnt10b Expression in Male Type 1 Diabetic Mice Is Blocked by the Probiotic *Lactobacillus reuteri*. **Endocrinology**, v.156, p.3169–3182, 2015.

KAWAGUCHI, H. et al. Stimulation of fracture repair by recombinant human basic fibroblast growth factor in normal and streptozotocin-diabetic rats. **Endocrinology**. v. 135, p. 774-81,1994.

KILKENNY, C. et al. Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. **J Pharmacol Pharmacother**. v. 1, p. 94-99, 2010.

KOROMANTZOS, P. A. et al. A randomized, controlled trial on the effect of non-surgical periodontal therapy in patients with type 2 diabetes. Part I: effect on periodontal status and glycaemic control. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 38, p. 142–147, 2011.

KUBOTA, T; MICHIGAMI, T; OZONO, K. Wnt signaling in bone metabolism. **J Bone Miner Metab**, v. 27, n. 3, p. 265-271, 2009.

KRAKAUER, J. C. et al. Bone loss and bone turnover in diabetes. **Diabetes**, v. 44, p. 775-82,1995.

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, p.13-19, 1998.

LACONO, V.et al. In vivo assay of crevicular leucocyte migration. Its development and potential applications. **Journal of Periodontology**, v. 56, p 56-62,1985.

LEITÃO, R.F. et al. Locally applied isosorbide decreases bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol**, v. 75, p. 1227-1232, 2004.

LEITÃO, R.F.Nitric oxide synthase inhibition prevents alveolar bone resorption in

experimental periodontitis in rats. **J Periodontol**, v. 76, n. 6, p. 956-963, 2005.

LIAO, D. et al. Renoprotective effect of atorvastatin on STZ-diabetic rats through inhibiting inflammatory factors expression in diabetic rat. **European review for medical and pharmacological sciences**. v. 20, p. 1888–1893, 2016.

LI, X. et al. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. **J Biol Chem**. v. 280, p. 1983–1987, 2005a.

LI, X. et al. Dkk2 has a role in terminal osteoblast differentiation and mineralized matrix formation. **Nat Genet**. v. 37, p. 945–952, 2005b.

LIU, R. et al. Diabetes enhances periodontal bone loss through enhanced resorption and diminished bone formation. **J Dent Res**, v.85, p.510–514. 2006.

LIU, Q. et al. DKK1 rescues osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from periodontal ligaments of patients with diabetes mellitus induced periodontitis. **Scientific Reports-Nature**, v. 5, p. 1–11, 2015.

LISBOA, M.R. et al. Effects of electroacupuncture on experimental periodontitis in rats. **J Periodontol**, v. 86, p. 801-811, 2015.

LISTGARTEN, M.A. Similarity of epithelial relationships in the gingival of rat and man. **J Periodontol**, v. 46, p. 67-680, 195.

LIMA, V. et al. Effects of tumor necrosis factor-alpha inhibitors pentoxifylline and thalidomide on alveolar bone loss in short-term experimental periodontal disease in rats. **J Periodontol**, v. 75, p. 162-168, 2004.

LIMA, M. et al. The effect of Calendula officinalis on oxidative stress and bone loss in experimental periodontitis. **Frontiers in Physiology**, v. 8, p. 1–9, 2017.

LOPES, J. et al. Stress oxidativo e seus efeitos na insulino-resistência e disfunção das células β -pancreáticas: Relação com as complicações do diabetes Mellitus tipo 2. **Acta Med Port**, v. 21, p. 293-302, 2008.

LUO, S. et al. Expression and Significance of MMPs in Synovial Fluid, Serum and PBMC Culture Supernatant Stimulated by LPS in Osteoarthritis Patients with or Without Diabetes. **Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes**, v. 43, p.1-10, 2017.

MASIELLO, P. et al. Development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. **Diabetes**, v. 47, p. 224–229, 1998.

MALANDRINO, N; SMITH, R. J. Personalized medicine in diabetes. **Clinical Chemistry**, v. 57, p. 231–240, 2011.

MANGAN, D; SELWITZ, R.H; GENCO, R. Infections associated with diabetes mellitus. **N Engl J Med**, v. 342, p. 896, 2000.

MEALEY, B.L. Position Paper on Diabetes and Periodontal Diseases. **J Periodontol**, v. 71, p. 664-678, 1999.

MEALEY, B.L. Diabetes and periodontal disease: two sides of a coin. *Compend Contin Educ Dent*, v. 21, p. 943-946, 2000.

MEALEY, B. L. Periodontal disease and diabetes. A two-way street. **J Am Dent Assoc**, v. 137, p. 26-31, 2006.

MADEIRO, A.T; BANDEIRA F.G; FIGUEIREDO, C.R.L. A estreita relação entre diabetes e a doença periodontal inflamatória. **Odontologia Clín-Científ.** v.4, p. 7-12, 2005.

MENEZES, A.M. et al. Effect of sodium alendronate on alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol**, v. 76, p. 1901-1909, 2005.

MIRANDA, T. S. et al. Antagonists of Wnt/ β -catenin signalling in the periodontitis associated with type 2 diabetes and smoking. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 45, p. 293–302, 2018.

MOSS, D.W; WHITBY, L.G. A simplified heat-inactivation method for investigating alkaline phosphatase isoenzymes in serum. **Clin Chim Acta.** v. 61, p. 63-71, 1975.

MOTYL, K; MCCABE, L. R. Streptozotocin, type I diabetes severity and bone. **Biol Proced Online**, v. 11, p. 296-315, 2009.

MUNOZ-TORRES, M. et al. Bone mineral density measured by dual X-ray absorptiometry in Spanish patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **Calcif Tissue Int.** v. 58, p. 316-9, 1996.

NAGUIB, G. et al. Diabetes prolongs the inflammatory response to a bacterial stimulus through cytokine dysregulation. **J Invest Dermatol**, v.123, p.87–92, 2004.

NAKASHIMA, T. et al. Protein expression and functional difference of membranebound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: Modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 275, p. 768-775, 2000.

NISHIDA, M. et al. Calcium and the risk for periodontal disease. **J Periodontol**, v.71, p.1057-1066, 2000.

NOVAES, J.A.B; MACEDO, G.M; ANDRADE, P.F. Interrelação doença periodontal e diabetes mellitus. **R Periodontia**, v.17, p. 39-44, 2007.

OKAMOTO, K; TAKAYANAGI, H. Regulation of bone by the adaptive immune system in arthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 13, p. 219, 2011.

OLIVER, R.C; TERVONEN, T. Diabetes — a risk factor for periodontitis in adults? **J Periodontol**, v. 65, p. 530-538, 1994.

PETERSEN PE, OGAWA H. Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach. **J Periodontol**. v.76, p.2187-2193, 2005.

PIHLSTROM, B.L; MICHALOWICZ, B.S; JOHNSON, N.W. Periodontal diseases. **Lancet**. v. 366, p. 1809-1820, 2005.

POPOVA, C; MLACHKOVA, A. Gingival Tissue IL-1 β and PGE 2 Levels in Patients with Chronic Periodontitis after Additional Therapy with Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. **Journal of IMAB**, v. 16, p. 27–30, 2010.

RAUNER, M. et al. Advances in osteoimmunology: pathophysiologic concepts and treatment opportunities. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 160, p. 114-125, 2013.

REDLICH, K; SMOLEN, J.S. Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention. **Nat Rev Drug Discov**. v. 11, p. 234-250, 2012.

RODRIGUES, L. Glicosilação de proteínas como importante fator no desenvolvimento das complicações do diabetes. **Boletim da SBEM**, p.23-34,2001.

RODRIGUES, I.L. et al. Efeito do tratamento periodontal não cirúrgico no nível de hemoglobina glicada em pacientes portadores de diabetes tipo 2 com periodontite crônica: uma revisão sistemática de literatura. **Braz J Periodontol**, v. 25, p. 47-56, 2015.

SALVI, G.E; BECK, J.D; OFFENBACHER, S. PGE2, IL-1 beta, and TNF-alpha responses in diabetics as modifiers of periodontal disease expression. **Ann Periodontol**, v. 3, p. 40-50, 1998.

SASTROWIJOTO, S. H. et al. Improved metabolic control, clinical periodontal status and subgingival microbiology in insulin-dependent diabetes mellitus. A prospective study. **J Clin Periodontol**, v. 17, p. 233-42,1990.

SILVA, S.R. Medicina periodontal: a arte da integração. **Rev Assoc Paul Cir Dent**. v.58, p.7-17. 2004.

SILVA, M. et al. Efeito da estreptozotocina sobre os perfis glicêmico e lipídico e o estresse oxidativo em hamsters. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.55, p. 46-53, 2011.

SHIN, C.S. et al. Dominant negative Ncadherin inhibits osteoclast differentiation by interfering with beta-catenin regulation of RANKL, independent of cell-cell adhesion. **J Bone Miner Res**. v. 20, p. 2200-2212, 2005.

SOUSA, L.H.T. et al. Effects of atorvastatin on periodontitis of rats subjected to glucocorticoid-induced osteoporosis. **J Periodontol**, v. 87, p. 1206-1216, 2016.

SOUSA, L.H.T. et al. Effects of glucocorticoid-induced osteoporosis on bone tissue of rats with experimental periodontitis. **Archives of Oral Biology**, v. 77, p. 55-61, 2017.

SOUSA, R.R et al. O paciente odontológico portador de diabetes mellitus: uma revisão de literatura. **Pes Bras Odontoped Clín Integr**. v.3, p. 71-77, 2003.

SOEJIMA, K; LANDING, B. H. Osteoporosis in juvenile-onset diabetes mellitus: morphometric and comparative studies. **Pediatr Pathol**, v. 6, p. 289-99, 1986.

SCHNEIDER, P.P. et al. Histological evaluation of the effects of corticotomy on induced orthodontic movement in rats. **Rev. odontol. UNESP**, v. 46, p. 368–373, 2017.

SHOELSON, S. E; LEE, J; GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 116, p. 1793-801, 2006.

TATSUEI, S.M. et al. Aplicação da biomecânica no tratamento de casos complexos: caso clínico de paciente adulto com comprometimento periodontal: Biomechanics use in complex cases treatment: case report of a periodontally compromised adult patient. **Revista Clínica de Ortodontia Dental Press**. v.16, p.90-106, 2017.

TOKER, H. et al. Morphometric and histopathological evaluation of the effect of grape seed proanthocyanidin on alveolar bone loss in experimental diabetes and periodontitis. **Journal of Periodontal Research**, v.0, p.1–9, 2018.

THOMPSON, M.M; LOFTUS, I.M. The role Of Matrix Metalloproteinases in Vascular Disease. **Vascular Medicine**. v. 7: 117-133. 2002.

UCHIGATA, Y. et al. Effect of poly(ADP-ribose) synthetase inhibitor administration to rats before and after injection of alloxan and streptozotocin on islet proinsulin synthesis. **Diabetes**, v. 32, p. 316-3188, 1983.

VARELLIS, M.L.Z. O paciente com necessidades especiais na odontologia:

manual prático. São Paulo: **Editora Santos**. v.13, p.239-252, 2005.

VAN DYKE, T.E; SERHAN, C.N. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. **J Dent Res**. v.82, p.82–90, 2003.

VAN DYKE, T.E. The management of inflammation in periodontal disease. **J Periodontol**. v. 79, p. 1601-1608, 2008.

VERHAEGHE, J. et al. The effects of systemic insulin, insulin-like growth factor-I and growth hormone on bone growth and turnover in spontaneously diabetic BB rats. **J Endocrinol**, v. 134, p. 485-92,1992.

VOZAROVA, B. et al. High white blood cell count is associated with a worsening of insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 51, p. 455-61, 2002.

WADDINGTON, R.J.; MOSELEY, R; EMBERY, G. Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. **Oral Dis.**, v. 6, p. 138–151, 2000.

WANG, S. Y. et al. Circulating Dickkopf-1 is correlated with bone erosion and inflammation in rheumatoid arthritis. **J. Rheumatol**. v.38, p.821–827. 2011.

WU, J; YAN, L. Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic β cell glucotoxicity. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**. v.8, p. 181–188, 2015.

YUAN, H. et al. Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand antagonists inhibit tissue inflammation and bone loss in experimental periodontitis. **J Clin Periodontol**. v. 38, p. 1029-1036, 2011.

ZUPAN, J; JERAS, M; MARC, J. Osteoimmunology and the influence of pro-inflammatory cytokines on osteoclasts. **Biochem Med**. v. 23, p. 43-63, 2013.

ZHENG, J. et al. Diabetes Activates Periodontal Ligament Fibroblasts via NF- κ B In Vivo. **Journal of Dental Research**, v.1, p.220-300, 2018.

ANEXOS

ANEXO 1- DECLARAÇÃO DE ANUÊNCIA DO COMITÊ DE ÉTICA EM ANIMAIS (CEUA) UFC- CAMPUS SOBRAL



Universidade Federal do Ceará – *Campus Sobral*
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
Rua: Av. Comte. Maurocêlio Rocha Pontes, 100, Derby
CEP: 62.042-280 Sobral-CE
Fone/Fax: (88) 3611.8000

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada: **Efeitos da atorvastatina na perda óssea alveolar de ratos diabéticos: participação da via WNT/ β -Catenina**, registrada com o nº **05/16**, sob a responsabilidade de **Prof. Dra. Paula Goes Pinheiro Dutra** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) *Campus Sobral*, em reunião de 06/07/16.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/08/16 até 01/07/17
Espécie/linhagem/raça	Rato Heterogênico Wistar
Nº de animais	348
Peso/Idade	180-220g/3 meses
Sexo	♂
Origem	Biotério Central de Fortaleza

Sobral, 07 de julho de 2016.

Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA