



Centro de Pós-Graduação
Pesquisa e Extensão

DOUTORADO EM ODONTOLOGIA

TAMIRES SZEREMESKE DE MIRANDA

**INIBIDORES DA VIA WNT/ β -CATENINA NA PERIODONTITE
CRÔNICA ASSOCIADA À FATORES DE RISCO.**

Guarulhos
2017

TAMIRES SZEREMESKE DE MIRANDA

**INIBIDORES DA VIA WNT/ β -CATENINA NA PERIODONTITE
CRÔNICA ASSOCIADA À FATORES DE RISCO.**

Dissertação apresentada à Universidade Guarulhos
para obtenção do título de Doutora em Odontologia
Área de Concentração: Periodontia
Orientadora: Profa. Dra. Poliana Mendes Duarte

Guarulhos
2017

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas Fernando Gay da Fonseca

M672i

Miranda, Tamires Szeremeske de
Inibidores da via Wnt/ β -catenina na periodontite crônica associada à
fatores de risco. / Tamires Szeremeske de Miranda. -- 2017.
61 f.; 31 cm.

Orientador: Profª. Dr. Poliana Mendes Duarte

Tese (Doutorado em Odontologia) – Centro de Pós-Graduação e
Pesquisa e Extensão, Universidade Guarulhos, Guarulhos, SP, 2017.

1. Periodontite 2. Diabetes 3. Tabagismo 4. Sinalização Wnt/ β -
catenina I Título II. Duarte, Poliana Mendes (Orientador). III. Universidade
Guarulhos

CDD. 617.6

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Joaquim e Tânia, que estão sempre ao meu
lado com muito amor e carinho.

Dedico também ao meu filho Mateus, que me fez enxergar a vida de outra forma,
me tornando mais forte e decidida!

Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por ouvir minhas preces, iluminar meus pensamentos e guiar meus passos.

Ao meu pai e minha mãe pelo amor, cuidado e incentivo. Obrigada por tudo!

À minha irmã, meu cunhado e afilhada Lara pelo amor, incentivo e amizade de sempre.

À minha orientadora, professora Poliana Mendes Duarte, por quem tenho muita admiração.

Obrigada pelos ensinamentos, pelo carinho, paciência e amizade.

À Juliana Perez-Chaparro pela amizade e ensinamentos. Obrigada pelo carinho!

Aos professores do Centro de Pós-Graduação e Pesquisa do Curso de Odontologia, principalmente Magda Feres, Marta Ferreira Bastos, Hélio por contribuírem com seus ensinamentos de excelência. Tenho orgulho de fazer parte da Pós-graduação da UnG.

À Daiane Fermiano, compartilhamos experiências semelhantes durante esse período, obrigada pela amizade e carinho de sempre!

Aos colegas Ronaldo, Cláudia, Silvia, Sheyla e Bernal pela amizade e companhia durante os módulos.

Aos alunos de iniciação científica, Danielle, Priscila, Matheus, Letícia e Denise. Obrigada pela ajuda e dedicação que tiveram com o estudo e principalmente comigo.

À Izilvânia, pelos ensinamentos no laboratório, carinho e atenção que sempre teve comigo.

À Camila pela ajuda na clínica e Samanta pelos serviços prestados.

Aos pacientes que participaram, pela confiança e por terem contribuído para a realização desse estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pela bolsa de estudos e pelo auxílio para realização desta pesquisa (Processo Fapesp 2013/23743-9).

TREM BALA

Não é sobre ter todas as pessoas do mundo pra si,
é sobre saber que em algum lugar alguém zela por ti.
É sobre cantar e poder escutar mais do que a própria voz,
é sobre dançar na chuva de vida que cai sobre nós.

É saber se sentir infinito num universo tão vasto e bonito,
é saber sonhar.

E, então, fazer valer a pena cada verso daquele poema sobre acreditar.

Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu,
é sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu.
É sobre ser abrigo e também ter morada em outros corações,
e assim ter amigos contigo em todas as situações.

A gente não pode ter tudo.
Qual seria a graça do mundo se fosse assim?
Por isso, eu prefiro sorrisos,
e os presentes que a vida trouxe pra perto de mim.

Não é sobre tudo que o seu dinheiro é capaz de comprar,
e sim sobre cada momento sorriso a se compartilhar.
Também não é sobre correr contra o tempo pra ter sempre mais,
porque quando menos se espera a vida já ficou pra trás.

Segura teu filho no colo,
sorria e abraça seus pais enquanto estão aqui.
Que a vida é trem-bala, parceiro e a gente é só passageiro prestes a partir!

Ana Vilela

RESUMO

A sinalização Wnt/ β -catenina, que controla a diferenciação dos osteoblastos, representa uma das vias mais importantes que regula a atividade das células ósseas. Esclerostina (SOST) e Dickkopf (DKK) são inibidores essenciais desta via. No entanto, seus papéis na periodontite relacionada à fatores de risco não foram estudados até o presente momento em humanos. Portanto, este estudo avaliou os níveis locais e séricos dos inibidores da sinalização Wnt/ β -catenina, SOST e DKK1, em pacientes com periodontite crônica (PC) apresentando diabetes (DM), hábito de fumar e ambas condições. Além disso, as correlações entre esses inibidores e de ambos com fatores relacionados ao metabolismo ósseo e patógenos periodontais também foram estudadas. Indivíduos com PC foram alocados em um dos seguintes grupos: Controle (n = 30): não fumantes e não-diabéticos, DM (n = 33): não fumantes com DM tipo 2, F (n = 26): fumantes não-diabéticos e FDM (n = 25): fumantes com DM tipo 2. Os níveis séricos e gengivais de proteína e RNAm do ligante do ativador do receptor do fator nuclear-kB (RANKL), osteoprotegerina (OPG), SOST, DKK1, interleucina (IL)-6, IL-1 β e fator de necrose tumoral (TNF)- α foram avaliados por imunoensaio multiplex e por PCR quantitativo, respectivamente. O biofilme subgengival foi analisado por PCR quantitativo para sete patógenos periodontais. Os níveis locais proteicos de DKK1 foram maiores em todos os grupos apresentando fatores de risco, enquanto os níveis de SOST foram maiores nos grupos compostos por tabagistas comparado ao grupo controle (p<0,05). Os níveis de RNAm para DKK1 e SOST nos tecidos e os níveis de proteína SOST no soro foram maiores no grupo DM que no controle (p<0,05). Os níveis de RNAm para DKK1 foi positivamente correlacionado com SOST nos grupos DM, FDM e controle. DKK1 e SOST também apresentaram algumas correlações com outros mediadores em nível de RNAm e proteína, principalmente nesses grupos (p<0,05). A expressão gênica de DKK1 foi positivamente associada à *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*, enquanto a expressão de SOST foi negativamente correlacionada com essas espécies no grupo DM. No grupo FDM, a expressão de SOST foi positivamente correlacionada às espécies *Porphyromonas gingivalis*, *Eubacterium nodatum* e *Prevotella intermedia*, enquanto a expressão de DKK1 foi negativamente correlacionada ao *P. gingivalis*. Em conclusão, SOST e DDK1 estavam aumentados localmente em pacientes com PC apresentando DM tipo 2, hábito de fumar e ambas as condições. Os níveis circulantes de SOST estavam aumentados em não-fumantes com DM. O DM, sozinho ou combinado com o tabagismo, foi o principal fator que influenciou as correlações do SOST e DKK1 entre si e de ambos com os fatores relacionados ao metabolismo ósseo e com os patógenos periodontais.

Palavras-chave: periodontite, diabetes, tabagismo, sinalização Wnt / β -catenina.

ABSTRACT

The Wnt/ β -catenin signaling that regulates osteoblast differentiation represents one of the crucial pathways regulating bone cell activity. Sclerostin (SOST) and Dickkopf (DKK) are essential inhibitors of this pathway. However, their roles in the periodontitis related to risk factors have not been studied so far in human. Therefore, this study evaluated the local and serum levels of the inhibitors of the Wnt/ β -catenin signaling, SOST and DKK-1, in patients with chronic periodontitis (CP) presenting diabetes (DM) smoking habit and both conditions. Furthermore, the correlations between them with each other and both with bone metabolism-related factors and periodontal pathogens were assessed. Subjects with CP were allocated into one of the following groups: Control (n=30): non-diabetic non-smokers, DM (n=33): non-smokers with type 2 DM, S (n=26): non-diabetic smokers and SDM (n=25): smokers with type 2 DM. Serum and gingival protein and mRNA levels of the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL), osteoprotegerin (OPG), SOST, DKK1, interleukin (IL)-6, IL-1 β and tumor necrosis factor (TNF)- α were evaluated by multiplex bead immunoassays and quantitative PCR, respectively. Subgingival biofilm were analyzed by quantitative PCR for seven periodontal pathogens. Local protein levels of DKK1 were higher in all groups presenting risk factors while SOST levels were higher in both smoking groups than control group (p<0.05). The mRNA levels of DKK1 and SOST in tissues and the protein levels of SOST in serum were greater in the DM group than the control (p<0.05). The mRNA levels of DKK1 positively correlated with SOST in the DM, SDM and control groups. DKK1 and SOST also exhibited some correlations with other mediators at mRNA and protein levels mainly in these groups (p<0.05). Gene expression of DKK-1 was positively associated with *Tannerella forsythia* and *Treponema denticola* while SOST expression negatively correlated with these species in the DM group. In the SDM group, expression of SOST was positively associated with *Porphyromonas gingivalis*, *Eubacterium nodatum* and *Prevotella intermedia* while DKK1 expression negatively correlated with *P. gingivalis*. In conclusion, SOST and DDK1 were locally upregulated in patients with CP presenting type 2 DM, smoking habit and both conditions. Circulating levels of SOST were increased in non-smokers with DM. DM, alone or combined with smoking, was the main factor that influenced the correlations of SOST and DKK1 with each other and both with bone metabolism-related factors and key periodontal pathogens.

Key-words: periodontitis, diabetes, smoking, Wnt/ β -catenin signaling.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Periodontite e os fatores de risco	10
1.2. Sistema ligante do receptor do ativador do fator nuclear kappa-B (RANKL)- osteoprotegerina (OPG)- receptor do ativador do fator nuclear kappa-B (RANK)	15
1.3. Via Wnt/ β -catenina	19
1.3. Justificativa	22
2. PROPOSIÇÃO	23
3. ARTIGO CIENTÍFICO	24
4. CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
ANEXO	61

1. INTRODUÇÃO

1.1. Periodontite e os fatores de risco

Microrganismos compatíveis com o hospedeiro e patogênicos coexistem e interagem entre si formando uma comunidade bacteriana complexa denominada biofilme dental, reconhecido como o principal fator etiológico das doenças periodontais e responsável pelo estabelecimento, progressão e manutenção da periodontite (KINANE & MARK BARTOLD, 2007). Durante muitos anos, estudos na área de microbiologia periodontal têm investigado, por meio de diferentes técnicas os microrganismos que compõem o biofilme dental, especialmente as principais espécies patogênicas. Em um estudo clássico realizado em 1998, Socransky et al. organizaram as espécies bacterianas presentes no biofilme dental em complexos microbianos, de acordo com o grau de interação entre as espécies bem como o nível de patogenicidade e sucessão das mesmas na composição e formação do biofilme. De acordo com esse estudo, foi estabelecido que os complexos roxo, verde, amarelo e o grupo dos *Actinomyces* agrupam espécies compatíveis com o hospedeiro que são os primeiros colonizadores da superfície dental e/ou radicular. Já os complexos laranja e vermelho são formados por espécies relacionadas às doenças periodontais e seus respectivos sinais clínicos (isto é, bolsa, perda de inserção e sangramento) e se instalam após a colonização dos quatro primeiros complexos. O complexo laranja é composto pelas espécies *Fusobacterium nucleatum ssp.*, *Fusobacterium periodonticum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Parvimonas micra*, *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracilis* e *Streptococcus constellatus*. O complexo vermelho, por sua vez, abrange as principais espécies periodontopatogênicas, sendo elas *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*.

Em 2001, usando clonagem e sequenciamento de Sanger, Paster et al. sugeriram um possível papel de espécies microbianas cultiváveis e não ainda cultiváveis na etiologia da periodontite, confirmando a hipótese de que a diversidade da microbiota oral era mais complexa do que se pensava anteriormente. Posteriormente, uma série de outros estudos utilizando abordagens moleculares propuseram a existência de novos patógenos periodontais além dos clássicos anteriormente descritos (KUMAR et al., 2005; MATARAZZO et al., 2011; TELES et al., 2011; GRIFFEN et al., 2012; ABUSLEME et al., 2013). Assim, uma revisão sistemática

publicada em 2014 compilou dados de estudos de associação que buscaram identificar novos patógenos periodontais. Os resultados dessa revisão demonstraram evidência científica para a associação de 17 espécies/filotipos do domínio Bactérias, do filo *Candidatus saccharibacteria* e do domínio *Archaea* com a etiologia da periodontite (PÉREZ-CHAPARRO et al., 2014).

Paralelamente ao avanço dos estudos que identificaram o papel dos microrganismos como determinante na etiologia das doenças periodontais, estudos focados nas respostas inflamatórias e imunológicas do hospedeiro frente à agressão dos microrganismos nos tecidos periodontais também evoluíram (COCHRAN, 2008; GONZALES, 2015). Neste contexto, foi observado que características sistêmicas e ambientais que modulem os aspectos microbiológicos e/ou imunológicos podem agir como riscos para as doenças periodontais, agravando a destruição dos tecidos de proteção e suporte dental. Assim, diversos estudos científicos têm apontado alguns indicadores de risco (por exemplo, osteoporose, estresse, obesidade) e corroborado a informação de que o diabetes melito [DM] e o tabagismo são fatores de risco pois interferem negativamente na progressão e gravidade das doenças periodontais (HEITZ-MAYFIELD, 2005; KNIGHT et al., 2016).

O DM é uma doença com altos índices de incidência e prevalência no Brasil e no mundo. Foi publicado na sétima edição do atlas da Federação Internacional de Diabetes que, em 2015, existiam cerca de 29,6 milhões de diabéticos nas Américas Central e do Sul e 415 milhões em todo o mundo, sendo um diabético a cada 11 indivíduos. Além disso, foi reportado que o Brasil é o quarto país com maior índice de adultos diabéticos (14,3 milhões) e estimado que em 2040 cerca de 642 milhões de indivíduos da população mundial serão portadores de DM (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION [IDF], 2015). Duncan et al. (2017) observaram que entre 1990 a 2015, a prevalência de DM aumentou cerca de 2,5%, sendo que a taxa de mortalidade por diabetes aumentou 90% enquanto a taxa de complicações sistêmicas causadas pelo DM, como a doença renal crônica, dobrou. Os principais fatores de risco para o DM foram altos índices de massa corporal, associado a má alimentação, falta de atividade física e tabagismo. Dentre as diversas formas de DM, o DM tipo 2 é a mais comum em adultos, sendo causado por um transtorno no metabolismo da insulina que pode ser atribuído à sua insuficiência de secreção e/ou inibição de ação. A hiperglicemia crônica gerada pela deficiência ou inação da insulina afeta o metabolismo de carboidratos, lipídios, proteínas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE [OMS], 1999; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION [ADA], 2012). O DM é atualmente um

dos principais problemas de saúde pública no mundo devido às consequências clínicas de suas complicações como retinopatia, neuropatia, nefropatia e microangiopatia. Além de complicações sistêmicas, o DM também resulta em complicações bucais, em destaque o aumento do risco de periodontite que tem sido sugerida como a sexta complicação da doença (MEALEY & OCAMPO, 2007; BASCONES-MARTÍNEZ et al., 2014).

Por muitos anos, diversos estudos epidemiológicos em diferentes populações têm avaliado a influência do DM e da hiperglicemia crônica nas doenças periodontais. Esses estudos corroboram a evidência de que a prevalência, gravidade e progressão da perda de inserção periodontal são mais elevadas em diabéticos quando comparados aos não-diabéticos (EMRICH et al., 1991; LÖE, 1993; TAYLOR et al., 1998; NOVAK et al., 2008; KAUR et al., 2009; PRESHAW et al., 2010; SUSANTO et al., 2011; JIMENEZ et al., 2012; KIM et al., 2013; GENCO & BORGNAKKE, 2013; ABDULJABBAR et al., 2017). Há mais de duas décadas, Emrich et al. (1991) realizaram um dos primeiros estudos sobre a relação do DM e as doenças periodontais em uma população de índios Pima no Arizona (Estados Unidos) que apresentavam alta prevalência de DM. Mil trezentos e quarenta e dois índios foram avaliados e observou-se que os portadores de DM tipo 2 apresentavam maior prevalência e cerca de 3 vezes mais chances de desenvolver doença periodontal quando comparados aos índios não-diabéticos. Logo em seguida, outros dois estudos com elevado número de indivíduos concordaram com os achados anteriores e concluíram que, em média, indivíduos diabéticos apresentam cerca de 3,3 vezes mais chances de perder osso alveolar que os não-diabéticos (GROSSI et al., 1994; TAYLOR et al., 1998). Subsequentemente, diversas evidências na literatura obtidas de diferentes populações comprovaram que o DM é um fator de risco para o aumento da prevalência e gravidade das doenças periodontais (AL-OTAIBI et al., 2008; NOVAK et al., 2008; FERNANDES et al., 2009; SUSANTO et al., 2011; SERRANO et al., 2012). Novak et al. (2008) observaram que indivíduos latino-americanos com DM apresentaram maiores médias de profundidade de sondagem e perda dentária que não-diabéticos. No mesmo ano, outro estudo em uma população de sauditas também demonstrou que indivíduos diabéticos apresentavam maior risco para desenvolver periodontite (AL-OTAIBI et al., 2008). Fernandes et al. (2009) reportaram maior prevalência de periodontite de moderada a avançada, em uma população de africanos com DM residentes nos Estados Unidos. Em 2011, em uma população da Indonésia, Susanto et al. notaram maior prevalência e progressão da doença periodontal em diabéticos tipo 2. Serrano et al. (2012) observaram maior

inflamação periodontal (cerca de 18% mais) em colombianos com DM quando comparados a não-diabéticos. Além disso, a duração do DM, os níveis de glicemia em jejum e hemoglobina glicada (HbA1c) bem como a adesão ao auto-controle da doença são fatores que podem interferir nos efeitos do DM sobre os tecidos periodontais (KIM et al., 2013). Recentemente um estudo objetivou comparar os parâmetros inflamatórios periodontais e peri-implantares entre pacientes com pré-diabetes, DM tipo 2 e não-diabéticos. Os parâmetros inflamatórios periodontais e peri-implantares (índice de placa, profundidade de sondagem, sangramento à sondagem e mobilidade) foram maiores nos pacientes pré-diabéticos e diabéticos em comparação aos não-diabéticos. No entanto, não houve diferenças entre diabéticos e pré-diabéticos (ABDULJABBAR et al., 2017).

Assim como o DM, uma epidemia de doenças relacionadas ao consumo de cigarros e outras formas de tabaco tem atingido diversos países, sendo uma das maiores causas de mortalidade no mundo. De acordo com a Organização Mundial de Saúde existe 1,1 milhões de tabagistas no mundo. No Brasil, cerca de 17,5% da população são usuários de algum tipo de tabaco, percentual equivalente a cerca de 25 milhões de pessoas (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER [INCA], 2011). Dados de um levantamento realizado em 16 países (Reino Unido, Estados Unidos, Bangladesh, Brasil, China, Egito, Índia, México, Filipinas, Polônia, Rússia, Tailândia, Turquia, Ucrânia, Uruguai e Vietnã) com indivíduos acima de 15 anos demonstrou que existem 3 bilhões de tabagistas, sendo a maior porcentagem homens. No entanto, o hábito de fumar inicia-se mais precocemente em mulheres. Além disso, baixos índices de abandono reforçam a visão de que maiores esforços para prevenir o consumo e promover a cessação do uso de tabaco são necessários para reduzir a morbidade e mortalidade devidas doenças associadas ao consumo de tabaco (GIOVINO et al., 2012). De fato, a combustão do tabaco produz uma série de constituintes citotóxicos e carcinogênicos, dentre os quais, a nicotina, o monóxido de carbono, as substâncias oxidantes reativas se destacam como as mais tóxicas e com potenciais imunomodulatórios (TALHOUT et al., 2011; LEE et al., 2012a). Já está comprovado que o tabagismo aumenta o risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, doenças obstrutivas pulmonares e cânceres de pulmão (JHA et al., 2006). Além do impacto deletério do tabagismo na saúde geral, o mesmo apresenta efeitos nocivos na saúde oral, incluindo o fracasso de implantes, cânceres orais e doenças periodontais.

Há mais de 70 anos diversos estudos demonstraram que tabagistas apresentam maior prevalência, gravidade e progressão de periodontite, sendo assim um reconhecido fator de risco

(LINDEN et al., 1994; HEITZ-MAYFIELD, 2005; VOUIROS et al., 2009; EKE et al., 2012; GENCO & BORGNAKKE, 2013). Uma das primeiras evidências sobre o impacto negativo do consumo de tabaco nos tecidos periodontais foi publicada em 1947, na qual Pindborg avaliou oficiais da marinha e observou que indivíduos que consumiam grandes quantidades de cigarros apresentavam maior acúmulo de cálculo e sangramento gengival, aumentando as chances de desenvolvimento de gengivite ulcerativa necrosante. Com o passar dos anos, outros estudos corroboraram com esses achados de que o consumo de cigarro era deletério para os tecidos periodontais. Axelsson et al. (1998) avaliaram a condição bucal de indivíduos fumantes e não-fumantes em diversas faixas etárias de (1093 indivíduos, separados nos grupos: 35, 50, 65 e 75 anos de idade). A porcentagem de fumantes em 35, 50, 65 e 75 anos de idade foi de 35%, 35%, 24% e 12%, respectivamente. Os autores observaram que para todas as faixas etárias os indivíduos fumantes apresentaram maiores médias de perda de inserção. Além disso, no grupo composto por indivíduos de 75 anos de idade, 41% dos fumantes eram edentulos em comparação com 35% dos não-fumantes. Logo, os autores concluíram que o tabagismo é um importante risco para a periodontite e a perda de dentes em todas as faixas etárias. Em 2002, Jansson e Lavstedt publicaram resultados de um estudo prospectivo ao longo de 20 anos, no qual investigaram a influência do tabagismo sobre a perda óssea e dentária. Quinhentos e sete indivíduos dentados foram examinados entre 1970 e 1990. Em 1970, 50,7% dos indivíduos eram fumantes, em 1990 essa porcentagem diminuiu para 31,0%. O tabagismo foi significativamente correlacionado ao aumento da perda óssea ao longo dos anos. Por outro lado, os indivíduos que pararam de fumar perderam significativamente menos osso durante este mesmo período. Schätzle et al. (2010) também realizaram 2 avaliações clínicas em 119 não-fumantes e 17 fumantes em um intervalo de 20 anos. De acordo com esse estudo, os fumantes apresentaram índices de placa e sangramento à sondagem significativamente maiores do que os não-fumantes após completarem a idade de 35 anos. Os resultados demonstraram ainda que com o envelhecimento (média de 50 anos de idade) a perda de inserção progrediu significativamente mais rápida em fumantes do que em não-fumantes (2,31mm e 1,57 mm de perda de inserção, respectivamente). Corroborando com os achados anteriores, Thomson et al. (2013) por meio de um estudo coorte avaliaram a perda de inserção periodontal em indivíduos aos 26, 32 e 38 anos de idade. Foi observado que entre 32 e 38 anos a perda de inserção dobrou em relação a perda de inserção entre 26 e 32 anos. Além disso, fumantes apresentaram maior risco de perda de inserção que não-fumantes. Mais tarde, em

2015, outro estudo coorte também observou que em um intervalo de 4 anos os tabagistas apresentaram maior perda de inserção e perda dentária (cerca de 3 vezes mais chances) do que indivíduos não tabagistas (DIETRICH et al., 2015). Em 2015, Nociti et al. reuniram evidências, por meio de uma revisão de literatura narrativa, sobre o impacto do cigarro na progressão da periodontite. De acordo com autores, estudos clínicos realizados em diversas populações são unânimes em demonstrar que fumantes apresentam maior risco para o desenvolvimento de periodontite e maior progressão da doença em comparação a não-fumantes.

1.2. Sistema ligante do receptor do ativador do fator nuclear kappa-B (RANKL)-osteoprotegerina (OPG)- receptor do ativador do fator nuclear kappa-B (RANK)

A reabsorção do osso alveolar, estimulada pelo processo imunoinflamatório iniciado e mantido pelos patógenos periodontais, é um dos sinais mais importantes da periodontite. Tem sido descrito que a perda óssea decorrente da periodontite envolve uma interação bidirecional entre as células ósseas e imunoinflamatórias (GRAVES et al., 2011). Neste contexto, existe um interesse por parte da comunidade científica em elucidar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na perda óssea associada à periodontite.

Em 1997, Simonet et al. isolaram uma glicoproteína pertencente à superfamília do fator de necrose tumoral (TNF) e a denominaram de OPG. Em contraste com os demais membros dessa família, a mesma não se encontra ancorada nas membranas celulares e não apresenta uma estrutura de domínio intracelular, atuando apenas no ambiente extracelular (SIMONET et al., 1997). Com o objetivo de elucidar o papel dessa proteína, esses autores realizaram ensaios *in vitro* e *in vivo*. *In vitro*, a administração de OPG inibiu a diferenciação osteoclástica. *In vivo*, ratos transgênicos que expressavam OPG em excesso desenvolveram osteopetrose, patologia caracterizada pelo aumento da densidade óssea e diminuição da atividade osteoclástica. Adicionalmente, a administração de OPG recombinante aumentou a densidade óssea em ratos normais e evitou que ratas ovariectomizadas perdessem tecido ósseo na mesma proporção que a administração de bisfosfonatos.

Um ano mais tarde, em 1998, Yasuda et al. identificaram outros dois membros da superfamília do TNF, o RANK e seu ligante, RANKL, e verificaram que estas moléculas também ocupavam papel decisivo no processo de reabsorção óssea. De acordo com os autores, o RANKL

presente na membrana de osteoblastos e células estromais era responsável pela sinalização da reabsorção óssea e pela diferenciação de pré-osteoclastos em osteoclastos. Os autores demonstraram que o RANKL sinalizava para o RANK, um receptor transmembrana tipo I expresso em células precursoras de osteoclastos, macrófagos e monócitos e em osteoclastos maduros e células dendríticas. A interação RANKL/RANK resultava na formação e atividade dos osteoclastos e consequentemente, na reabsorção do tecido ósseo. Em contrapartida, a OPG era capaz de regular este processo de reabsorção por se unir ao RANKL, evitando assim a interação RANKL/RANK (TROEN, 2003).

A partir de então, foi estabelecido que o sistema RANKL-OPG-RANK está diretamente envolvido na diferenciação e ativação de osteoclastos, sendo uma das principais vias regulatórias de perda óssea em várias desordens ósseas, incluindo osteoporose, artrite reumatóide, cânceres e periodontite (CROTTI et al., 2003; BELIBASAKIS & BOSTANCI, 2012). Em 2003, Liu et al. compararam a expressão gênica de RANKL e OPG nos tecidos periodontais de pacientes com periodontite moderada e avançada e indivíduos periodontalmente saudáveis. De acordo com resultados, a expressão gênica de RANKL foi significativamente maior na periodontite avançada. Em contraste, a expressão gênica de OPG em pacientes com periodontite avançada e moderada foi menor do que nos periodontalmente saudáveis. Além disso, tanto células epiteliais como células inflamatórias dos tecidos periodontais expressaram RANKL. Esses achados foram confirmados por Crotti et al. (2003) que demonstraram níveis significativamente maiores de RANKL e menores de OPG no tecido de pacientes com periodontite quando comparado aos tecidos saudáveis. Corroborando esses estudos em tecidos periodontais, Mogi et al. (2004) observaram maiores concentrações de RANKL e RANKL/OPG e menor concentração de OPG no fluido gengival de pacientes com periodontite em relação aos pacientes saudáveis. Mais tarde, em 2006, Lu et al. reportaram que os níveis de RANKL estavam mais elevados no fluido gengival de sítios com periodontite comparados a sítios saudáveis, embora as expressões de OPG e RANKL não apresentaram correlação com a gravidade da doença. Bostanci et al. (2007) avaliaram os níveis de RANKL e OPG no fluido gengival de pacientes com gengivite e diferentes formas de periodontite, incluindo periodontite crônica, periodontite agressiva generalizada e periodontite crônica em pacientes sob terapia imunossupressora. De acordo com os resultados, os níveis de RANKL foram menores no fluido de saúde e gengivite quando comparado aos diferentes grupos de periodontite. Além disso, os níveis de OPG foram maiores em saúde do que

os grupos de gengivite e periodontites. Assim, de acordo com os achados da literatura, níveis aumentados de RANKL, reduzidos de OPG e uma elevada proporção RANKL/OPG têm sido encontrados nos tecidos periodontais acometidos por periodontite quando comparado aos periodontalmente saudáveis (BELIBASAKIS & BOSTANCI, 2012).

Uma vez demonstrado o envolvimento do sistema RANKL-OPG-RANK na regulação do metabolismo ósseo na periodontite, foi sugerido que o mesmo poderia ser modulado pela presença dos fatores de risco para doenças periodontais. Entretanto, resultados controversos sobre os efeitos do DM e do tabagismo nos níveis periodontais de RANKL e OPG têm sido observados. Tal divergência entre os estudos pode ser explicada pelas diferenças entre o controle glicêmico, número de cigarros consumidos por dia bem como duração do DM e tabagismo. Além disso, diferenças entre as metodologias usadas para detectar RANKL e OPG e as fontes biológicas de avaliação (soro, fluido gengival, saliva e tecido) também podem explicar as divergências entre os estudos.

Em 2007, Duarte et al. avaliaram os efeitos do DM tipo 2 nos níveis de RANKL e OPG no tecido gengival acometido por periodontite. Os autores não encontraram diferenças significativas na expressão gênica de RANKL/OPG no tecido gengival de pacientes diabéticos, quando comparado aos não-diabéticos com periodontite. Santos et al. (2010) demonstraram que o controle glicêmico poderia influenciar os níveis periodontais de RANKL e OPG, uma vez que o fluido gengival de pacientes diabéticos tipo 2 com controle glicêmico precário apresentavam quantidade total e concentração de RANKL e RANKL/OPG maiores que os indivíduos com bom controle glicêmico. Ribeiro et al. (2011) observaram que pacientes com periodontite portadores de DM tipo 2 apresentaram níveis proteicos aumentados de RANKL no fluido gengival quando comparado aos pacientes sem periodontite. Entretanto, a razão RANKL/OPG não foi influenciada pela presença do DM. Duarte et al. (2012) não observaram diferenças significativas para expressão gênica de RANKL e OPG em tecidos com periodontite de pacientes não-diabéticos e diabéticos controlados e não-controlados. Recentemente, em 2016, Xu et al. reportaram que diabéticos tipo 2 com periodontite apresentaram menores níveis séricos de OPG e maiores de RANKL e RANKL/OPG, quando comparados aos indivíduos sistemicamente saudáveis com e sem periodontite. Os resultados ainda demonstraram uma correlação positiva entre os níveis séricos de RANKL e os parâmetros periodontais.

Ao longo dos últimos 10 anos, alguns estudos focaram na avaliação dos efeitos do tabagismo no sistema RANKL-OPG-RANK em sítios com periodontite na tentativa de encontrar uma possível explicação para a perda óssea alveolar exacerbada em fumantes acometidos por infecção periodontal. César-Neto et al. (2007) observaram maior expressão gênica da proporção RANKL/OPG em fumantes que em não-fumantes com periodontite crônica. Outro estudo realizado em 2007 não demonstrou diferenças significativas entre fumantes e não-fumantes em relação aos níveis séricos de RANKL. Entretanto, fumantes apresentaram menor concentração sérica de OPG e maior RANKL/OPG quando comparados aos não-fumantes. Neste contexto, os autores concluíram que a perda óssea em fumantes com periodontite pode ser parcialmente explicada pela supressão de OPG (LAPPIN et al., 2007). Um ano mais tarde, Buduneli et al. (2008) compararam as concentrações salivares de RANKL e OPG entre fumantes e não-fumantes com periodontite crônica. De acordo com esses autores, a concentração de OPG salivar foi significativamente menor enquanto a razão RANKL/OPG foi maior em fumantes em comparação aos não-fumantes. Os autores concluíram que as concentrações salivares de RANKL e OPG são afetadas pelo tabagismo. Em 2010, Ozçaka et al. avaliaram pacientes fumantes e não-fumantes com e sem periodontite crônica em relação aos níveis circulantes de RANKL e OPG. De acordo com os achados desse estudo, fumantes e não-fumantes com periodontite exibiram concentrações plasmáticas de OPG e RANKL semelhantes e fumantes com periodontite crônica exibiram concentrações séricas de OPG significativamente mais baixas e maior razão RANKL/OPG que controles fumantes periodontalmente saudáveis. Um estudo recente realizado por Behfarnia et al. (2016) avaliou a concentração de RANKL e OPG em amostras de soro, saliva e fluido gengival de pacientes com e sem periodontite crônica, fumantes e não-fumantes. De acordo com esses autores, as concentrações de RANKL e OPG na saliva, soro e fluido não foram significativamente diferentes entre os grupos. A razão RANKL/OPG na saliva foi significativamente maior no grupo dos não-fumantes com periodontite comparado aos grupos controle (periodontalmente saudável) e fumante com periodontite. Portanto, os autores concluíram que o hábito de fumar não afeta a reabsorção óssea dirigida pelo sistema RANKL-OPG-RANK.

Em 2012, Belibasakis e Bostanci realizaram uma revisão narrativa com objetivo de compilar evidências científicas sobre o papel de RANKL e OPG nas doenças periodontais, e avaliar o potencial dessas moléculas como biomarcadores de diagnóstico e prognóstico da

doença. De acordo com a literatura inserida nessa revisão, existem fortes evidências de que os níveis de RANKL e a razão RANKL/OPG estão aumentados enquanto os níveis de OPG estão diminuídos na periodontite. Entretanto, o impacto do DM e do tabagismo nos níveis desses fatores relacionados à osteoclastogênese permanece incerto e controverso.

1.3. Via Wnt/ β -catenina

Embora o sistema RANKL-OPG-RANK seja apontado como crucial na perda óssea relacionada à periodontite por diversos estudos, outras vias regulatórias das células ósseas também têm sido sugeridas como importantes no controle da homeostase do tecido ósseo e na patogênese de várias doenças associadas à perda de tecido ósseo (GLASS et al., 2005; GLASS & KARSENTY, 2006). Nesse contexto, a sinalização Wnt/ β -catenina tem sido alvo de muitos estudos científicos nas últimas décadas em doenças como osteoporose, espondilite, artrite reumatoide e cânceres. Vale ressaltar que enquanto o sistema RANKL-OPG-RANK regula a formação dos osteoclastos, a via Wnt/ β -catenina está envolvida na regulação da diferenciação dos osteoblastos.

As proteínas associadas à via Wnt regulam a diferenciação e função de diversos tipos celulares incluindo de osteoblastos, tanto na formação óssea embriogênica quanto pós-natal. Essa via é composta por 19 glicoproteínas que desencadeiam cascatas de sinalização múltiplas essenciais para o desenvolvimento embrionário e regeneração de tecidos, divididas em duas sub-vias, canonical e não-canonical (MONROE et al., 2012). A via Wnt canonical, também conhecida por via Wnt/ β -catenina, é uma das mais importantes na sinalização Wnt e ocupa um papel importante na diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos maduros e funcionais, cuja ativação leva ao aumento e a inibição à diminuição da massa óssea (GLASS et al., 2005; GLASS & KARSENTY, 2006). Por mais de uma década, as vias de sinalização Wnt foram foco de estudos tentando elucidar os processos envolvidos no metabolismo ósseo, incluindo o desenvolvimento esquelético, a manutenção da massa óssea e o potencial terapêutico de agentes farmacológicos para a regeneração tecidual (MONROE et al., 2012).

A sinalização da via Wnt/ β -catenina é regulada por inibidores fisiológicos, incluindo a proteína 1 relacionada ao *dickkopf* (DKK1) e a esclerostina (SOST), que são predominantemente

expressos pelos osteócitos, mas podem também ser expressos por diversos tipos de células (POOLE et al., 2005; ROSSINI et al., 2013; QUARLES et al., 2013). Atuando como inibidores, DKK1 ou SOST se ligam aos co-receptores de proteínas relacionadas à receptores de baixa intensidade-5 (LRP) ou LRP-6, inibindo a fosforilação e inativação de glicogênio sintase quinase 3 (GSK3 β) e, subsequentemente, resultando na destruição da β -catenina (HIE et al., 2011). A β -catenina, por sua vez, é uma proteína citoplasmática e nuclear que atua como um ativador transcripcional e regula a transcrição de genes responsáveis pela proliferação e diferenciação celular. Além disso, os antagonistas DKK1 e SOST também podem impedir a maturação de receptores Wnt e/ou a interação Wnt ligantes e receptores bem como o bloqueio de receptores e co-receptores Wnt.

Os dados mais interessantes do papel da via Wnt/ β -catenina na regulação da homeostase óssea são suportados por estudos demonstrando que DKK1 e SOST contêm a formação óssea (GLASS et al., 2005; GLASS & KARSENTY, 2006; BARON & KNEISSEL, 2013). A inibição de SOST aumenta consideravelmente a massa, densidade e formação óssea em estudos em humanos e em animais. Da mesma forma, a inativação de DKK1 é capaz de estimular a formação óssea e aumenta o reparo de fraturas (GLASS et al., 2005; GLASS & KARSENTY, 2006; BARON & KNEISSEL, 2013). Ainda mais interessante, a sinalização Wnt não está implicada apenas na formação óssea, mas também na regulação da reabsorção óssea por meio da diminuição da expressão de RANKL e aumento da expressão de OPG pelos osteoblastos (GLASS et al., 2005; SPENCER et al., 2006), sugerindo que o aumento dos níveis de seus inibidores SOST e DKK1 podem contribuir indiretamente para a perda de tecido ósseo (ROSSINI et al., 2013).

Com o desenvolvimento de técnicas moleculares e imunológicas capazes de detectar as proteínas relacionadas à via Wnt/ β -catenina em fluidos e tecidos, foi possível constatar que níveis alterados de seus antagonistas DKK1 e SOST desempenham um papel importante na patogênese de diversas doenças como artrite reumatóide, metástases ósseas, mieloma múltiplo, espondilite anquilosante e osteoporose (ROSSINI et al., 2013). Uma das possíveis explicações para os altos níveis de DKK1 e SOST em tais doenças pode estar relacionada aos níveis elevados de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α e IL-1 β durante a patogênese das mesmas. Em modelos de artrite em camundongos e na artrite reumatóide em humanos, por exemplo, a indução da produção de DKK1 por TNF- α foi relacionada à uma perda óssea exacerbada (DIARRA et al.,

2007). Por outro lado, os níveis de DKK1 foram significativamente diminuídos em pacientes com artrite reumatóide tratados com inibidores de TNF- α e com o receptor antagonista da IL-1 (IL-1ra) (WANG et al., 2011). *In vitro*, o TNF- α aumentou rapidamente a expressão de DKK-1 em osteoblastos e inibiu a diferenciação destas células (HEILAND et al., 2010). Adicionalmente, o bloqueio de DKK-1 não apenas preveniu o impedimento da osteoblastogênese, mas também conteve a expressão de SOST estimulada pelo TNF- α em osteoblastos diferenciados *in vitro* e *in vivo*. (HEILAND et al., 2010). Assim, a indução da expressão de SOST pelo TNF- α foi capaz de inibir a diferenciação de osteoblastos pelo impedimento da sinalização Wnt (LEE et al., 2012b). Além disso, o TNF- α também induziu a expressão de SOST em osteoblastos humanos e em osteoblastos imaturos derivados de camundongos (STEWART et al., 1999; QUARLES et al., 2013). Tais achados sugerem que, embora os osteócitos sejam as principais células que expressam SOST em condições de normalidade do tecido ósseo, osteoblastos imaturos também podem expressar SOST em condições de inflamação onde existe níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, contribuindo para a perda óssea.

Na periodontite, um estudo em ratos demonstrou que a inibição farmacológica de SOST, por meio de um anticorpo monoclonal, restaurou a perda óssea induzida por ligadura (TAUT et al., 2013). Em humanos, foi observado que os níveis de DKK1 e SOST estão aumentados em nível de proteína e RNAm nos tecidos gengivais de sítios doentes em indivíduos com periodontite crônica, quando comparado aos indivíduos sem periodontite. Os níveis séricos de SOST, mas não de DKK1, também estavam mais elevados nos pacientes com periodontite crônica. Além disso, maiores níveis teciduais de TNF- α ocorreram paralelamente ao aumento de ambos inibidores, sugerindo o envolvimento dessa citocina pró-inflamatória com as funções de SOST e DKK1. Esses resultados foram os primeiros indícios da possível atuação de DKK1 e SOST na periodontite em humanos (NAPIMOGA et al., 2014). Um ano mais tarde, em 2015, Kim et al. observaram maior perda de osso alveolar, menor formação óssea e maior expressão de TNF- α simultaneamente à maior expressão de SOST em ratos diabéticos com periodontite em comparação aos não-diabéticos. Esses foram os primeiros indícios do papel do SOST na periodontite relacionada ao DM.

1.4. Justificativa

Diversos estudos têm focado em uma melhor compreensão dos processos moleculares e celulares envolvidos na perda de inserção e na perda óssea na periodontite relacionada ao DM e ao tabagismo. Entretanto, os verdadeiros mecanismos que explicam a maior gravidade e progressão de periodontite em consumidores de tabaco e em diabéticos ainda não foram totalmente elucidados. Em geral, existem evidências *in vitro*, em animais e em humanos que ambos fatores de risco podem alterar a resposta imune inata contra patógenos bem como modular a resposta imune adaptativa, incluindo a supressão e/ou exacerbação do sistema imunoinflamatório, por meio de múltiplos caminhos de sinalização intracelular envolvidos na produção de mediadores nos tecidos periodontais e na perda óssea (JAVED et al., 2012; LEE et al., 2012a).

Embora estudos prévios já tenham avaliado os níveis de vários mediadores imunoinflamatórios e relacionados à perda óssea em fluidos e tecidos de diabéticos e fumantes com periodontite, o possível envolvimento dos antagonistas da via Wnt/ β -catenina, DKK1 e SOST, ainda não foi investigado em tais grupos de risco para periodontite. Terapias com foco na “inibição dos inibidores” da Wnt/ β -catenina já têm sido propostas para o tratamento de diversas doenças que envolvem perda óssea (BARON & KNEISSEL, 2013; ROSSINI et al., 2013). Dessa forma, o entendimento dos mecanismos envolvidos na perda óssea alveolar em pacientes de risco para a periodontite é um passo inicial para a sugestão e desenvolvimento de futuras terapias mais específicas para esses pacientes, que poderiam modular a resposta do hospedeiro e a perda óssea e serem usadas como adjunto à terapia anti-infecciosa periodontal.

2. PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste estudo foram:

- 1- Avaliar os níveis séricos e periodontais dos inibidores da via Wnt/ β -catenina, DKK1 e SOST, em pacientes com periodontite crônica que apresentam DM tipo 2, hábito de fumar e ambas condições.
- 2- Estabelecer a relação desses inibidores entre si e com outros biomarcadores relacionados ao metabolismo ósseo (RANKL, OPG, IL-1 β , IL-6 e TNF- α) e com patógenos periodontais subgingivais.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Inhibitors of Wnt/ β -catenin signaling in the chronic periodontitis associated to diabetes and smoking

Artigo científico nas normas do *Journal Clinical Periodontology*.

Running title: DKK1 and SOST in periodontitis associated to risk factors.

Key-words: chronic periodontitis; diabetes mellitus; smoking; sclerostin, DKK1.

Abstract

Aim: This study evaluated the levels of sclerostin (SOST) and Dickkopf (DKK)-1 in the chronic periodontitis (CP) associated with type 2 diabetes (DM) and/or smoking. Relationships between SOST, DDK1, bone metabolism-related factors and pathogens were assessed. **Material and Methods:** The study population included non-diabetic non-smokers (control), non-smokers with DM (DM group), non-diabetic smokers (S group) and smokers with DM (SDM group), all with CP. Serum and gingival levels of SOST, DKK1, RANKL, OPG, IL-1 β , IL-6, and TNF- α were evaluated by multiplex immunoassay. Gene expression of these biomarkers and subgingival levels of seven pathogens were assessed by qPCR. **Results:** Gingival protein and/or mRNA levels of DKK1 and SOST were higher in subjects with DM and/or smoking than in controls ($p < 0.05$). Serum levels of SOST were higher in DM group than in control ($p < 0.05$). DKK1 positively correlated with SOST and both with other biomarkers in the DM, SDM and control groups ($p < 0.05$). DKK-1 and SOST correlated with pathogens, especially in both groups with DM. **Conclusions:** SOST and DKK1 were upregulated in patients with CP presenting DM and/or smoking. DM, alone or with smoking, particularly influenced the correlations of SOST and DKK1 with each other and with bone metabolism-related factors and pathogens.

Introduction

Alveolar bone loss is one of the main hallmarks of periodontitis. The mechanisms by which the host response against pathogens disturbs the homeostatic balance of bone formation and resorption in periodontitis remain unclear (Hienz et al. 2015). Crucial pathways regulating bone cell activity are the receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK)/RANK ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) system (Liu & Zhang 2015) and the Wnt/ β -catenin signaling (Duan & Bonewald 2016). The former regulates osteoclast formation and has been shown to be involved in periodontitis (Belibasakis & Bostanci 2015). The latter controls osteoblast differentiation and has been poorly studied in periodontal diseases.

Wnts are a large family of secreted glycoproteins able to activate nuclear β -catenin. β -catenin, a cytoplasmic and nuclear protein, acts as a transcriptional activator and regulates transcription of target genes responsible for cell proliferation and differentiation. The Wnt/ β -catenin pathway, called the canonical pathway, is therefore, an important regulator of osteoblast proliferation and survival and, ultimately, bone formation. Besides the role of Wnt signaling in osteoblastogenesis, evidence has also suggested its involvement in osteoclast cells. Wnt pathway components, including receptors, inhibitors and activators, are expressed in osteoclast lineage cells (Qiang et al. 2010). Furthermore, β -catenin indirectly regulates osteoclastogenesis by increasing the OPG/RANKL ratio and reducing bone resorption (Glass et al. 2005).

Sclerostin (SOST) and Dickkopf (DKK) are among the most important inhibitors of the Wnt/ β -catenin pathway, preventing nuclear translocation of β -catenin by interfering in the interactions between the Wnt proteins and their receptors. DKK-1 is one of the most well characterized secreted Wnt inhibitor, suppressing bone formation and contributing in

inflammation (Chae et al. 2016). Likewise, SOST is an osteocyte-derived negative regulator of bone formation (Sebastian & Loots 2017).

The deletion of the SOST gene or the blockage of SOST function restored bone defects in periodontitis models (Taut et al. 2013, Ren et al. 2015, Yang et al. 2016). Furthermore, the number of SOST-positive osteocytes was higher in diabetic rats with periodontitis than non-diabetic controls (Kim et al. 2015). In human, SOST and DKK1 were upregulated in periodontal tissues with chronic periodontitis (CP) (Napimoga et al. 2014). Despite these previous evidence on the involvement of SOST and DKK1 in periodontal breakdown, their levels in the periodontitis related to smoking and DM, which are major risk factors for periodontal diseases (Knight et al. 2016), have not been studied in humans so far. Therefore, the main aim of this study was to evaluate local and serum levels of DKK1 and SOST in CP associated with type 2 diabetes (DM) and/or smoking. Secondary aims were to assess the relationships between DKK1 and SOST with each other and with pro-inflammatory cytokines, osteoclastogenesis-related factors and key periodontal pathogens.

Material and Methods

Study Population

Subjects with generalized CP were consecutively selected from the population seeking dental treatment in Guarulhos University (Guarulhos, SP, Brazil) and distributed into one of the following groups: Control- non-diabetic non-smokers, DM- non-smokers with type 2 DM, S- non-diabetic smokers and, SDM- smokers with type 2 DM. All eligible individuals were invited to participate in the study, thoroughly informed of its nature, potential risks and benefits of their participation in the study and signed their informed consent. During the screening of volunteers,

medical and dental histories were obtained. Levels of glycated hemoglobin (HbA1c; High-Performance Liquid Chromatography method) and fasting plasma glucose (FPG; Glucose Oxidase method) were assessed for all subjects by the Guarulhos University Clinical Analysis Laboratory during screening. This study protocol was approved by Ethics Committee in Clinical Research of the Guarulhos University (CAAE:25526913.8.0000.5506). All volunteers were referred to the Guarulhos University Dental Clinic in order to receive periodontal treatment.

Inclusion criteria

General: All subjects were >30 years old, had generalized CP (Armitage 1999) and at least 15 teeth, excluding third molars. They should present >30% of sites with probing depth (PD) and clinical attachment level (CAL) ≥ 4 mm and bleeding on probing (BoP) and, a minimum of six teeth distributed in the four quadrants with at least one site with PD and CAL ≥ 5 mm and BoP. The subjects should have at least two tooth indicated to exodontia, due to advanced periodontitis (sites with PD and CAL ≥ 7 mm with BoP, mobility and/or bone loss achieving more than half of the root).

Smokers: Cigarette smoking history was obtained by questionnaire. The smokers should have smoked at least 10 cigarettes per day for at least the past 10 years.

Diabetics: The diabetic subjects required a diagnosis of DM confirmed by a physician, dating from at least 3 years prior to the study. They were also required to have HbA1c >6.5% and FPG >99 mg/dl.

Non-diabetics: Subjects with no history of DM presenting HbA1c $\leq 6.0\%$ and FPG <99mg/dl.

Non-smokers: The non-smokers had never smoked.

Exclusion criteria

Exclusion criteria were: pregnancy, lactation, subgingival periodontal therapy during the previous 12 months, use of antibiotics, anti-inflammatory, immunosuppressive therapies during

the previous 6 months, history of use of bone-related medications (e.g. hormone-replacement, calcitonin, bisphosphonates, denosumab, etc), regular use of mouthrinses containing antimicrobials, systemic conditions that could affect the progression of periodontitis (except DM) and major complications of DM (i.e. ulcers, gangrene, amputation, neuropathy and nephropathy).

Periodontal measurements and calibration exercise

One examiner (T.S.M) performed all clinical examinations. The following parameters were assessed at six sites per tooth, excluding third molars, using a manual periodontal probe (UNC15, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA): plaque accumulation (1/0), BoP (presence/absence), PD (mm) and CAL (mm). Calibration was performed according to the protocol proposed by Araujo et al. (2003), and the standard error of measurement (SE) was calculated. The intra-examiner variability was 0.22mm for PD and 0.23mm for CAL. The agreement for categorical variables [i.e. BoP, MB and plaque] was 94% (Kappa-light test).

Gingival tissue sampling

Two gingival biopsies, with junctional and sulcular epitheliums and connective tissue were harvested from two teeth per patient indicated for exodontia due to advanced periodontitis. The gingival tissues were divided in two fragments. One fragment was stored in RNA later (Ambion Inc., Austin, TX, USA) at -80°C for gene expression, while the other was stored in protease inhibitor buffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at -80°C for protein analysis.

Serum sampling

Fasted peripheral blood samples were collected in the morning into an appropriate tube (Serum BD Vacutainer® Plus Plastic Serum Tubes, BD, Franklin Lakes, NJ). Immediately after

blood collection, the serum was separated from blood by centrifugation (10 min at 1,400 rpm, 4°C) and stored in aliquots at -80°C.

Protein analysis

The gingival and serum protein levels of SOST, DKK1, RANKL, OPG, interleukin (IL)-6, IL-1 β and tumor necrosis factor (TNF)- α sample were analyzed by a multiplex immunoassay using a commercially available kit (Milliplex® MAP Human Bone Panel, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) and a plate reader (Magpix®, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA), according to the manufacturer's recommendations. The amount of protein in each sample was analyzed by software (Milliplex® Analyst Software, Merck Millipore, Billerica, MA, USA), using standard curves and logistic parameters as references. The Bradford protein (Bradford Reagent, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) assay was used to measure the concentration of total protein in each tissue sample, according to the manufacturer's recommendations (Bradford 1976). Results were reported as the amount of biomarker (pg) per total tissue protein (mg) or per milliliter of serum.

Gene expression analysis

The mRNA levels of SOST, DKK1, RANKL, OPG, IL-6, IL-1 β and TNF- α and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were analyzed by real time PCR, as previously described (Duarte et al. 2012). The amplification profiles, primer sequences and lengths of PCR products are presented in Table 1. The results were taken as the relative amounts of the target gene, using GAPDH as the internal reference gene by means of a relative quantification tool (LightCycler Software 4, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

Microbiological analysis

After supragingival plaque removal, subgingival biofilm was sampled with curettes from the deepest sites of the two teeth selected for exodontia and placed in microtubes containing 150µl of TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.6). The samples were analyzed individually for the levels of *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Eubacterium nodatum*, *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum ssp.* and *Prevotella intermedia* by real time PCR, as previously described (Miranda et al. 2014). Absolute quantification of target species was performed using standard curves prepared with reference strains. The determination of DNA content in controls was based on the genome size of each species and the mean weight of one nucleotide pair (Dolezel et al. 2003). The level of detection was set to 10^3 bacteria. The primers used for each bacterial species and the amplification profiles are described in Table 1.

Statistical Analysis

A post hoc analysis was conducted to determine the power of the analyses presented in this study. Considering differences of at least 83.5 pg/mg for the tissue protein levels of DKK1 (primary outcome variable) between the control and DM group and a standard deviation of 80.5 pg/mg, it was determined that 20 subjects per group would provide 90% power with an alpha of 0.05.

The mean percentages of sites with plaque and BoP, the mean full-mouth PD and CAL, the mean PD and CAL of the sampled teeth, the levels of HbA1c, the number of cigarettes smoked per/day, the duration of DM and smoking, the mean protein and mRNA levels of the biomarkers in gingival tissues, the levels of each bacterium species and the levels of biomarkers in serum were computed for each subject and, subsequently, across groups. Data were examined for normality by the Shapiro-Wilk test and non-parametric methods were used for data that did

not achieve normal distribution. The significance of differences for age, HbA1c and clinical parameters was compared using One-way ANOVA, followed by post hoc analyses using the Tukey test. The T-test was used to compare the number of cigarettes smoked per day and the duration of DM and smoking. The significance of differences for gender was compared by the Chi-square test. The significance of differences for the mRNA and protein levels in tissue and serum was compared using the Kruskal Wallis test, followed by post hoc analyses using the Dunn test. Spearman's coefficient of correlation was used for bivariate correlations between serum and tissue protein levels and between SOST and DKK1 and the other biomarkers studied at mRNA and protein levels. Multivariate linear regression analyses were carried out to establish the relationship between the gene expression of biomarkers (independent variables) and the levels of periodontal pathogens (dependent variables). Box-Cox transformation was carried out before multivariate linear regression analyses to correct for asymmetry, generate normal distribution of the data and stabilize variance. The results were reported as standard coefficients (β) in multivariate linear regression models. The level of significance for all analyses was set at 5%.

Results

This study was conducted between March 2014 and September 2016. One hundred and fourteen subjects (33 in the DM group, 26 in the S group, 25 in the SDM group and 30 in the control group), ranging from 34 to 70 years of age, were selected out of almost 600 screened. There were no differences among groups for gender, age and periodontal parameters. HbA1c levels were significantly higher in both groups with DM than in the control and S groups ($p < 0.05$, Table 2). DM treatment included diet, use of oral hypoglycemic agent (metformin) and insulin did not differ between both diabetic groups (data not shown).

Table 3 presents the tissue protein and mRNA levels of all biomarkers. The protein levels of DKK1, IL-6 and TNF- α were significantly higher in the periodontal tissue of all groups presenting risk factors than the control ($p < 0.05$). The tissue levels of SOST were higher in both smoking groups than the control group ($p < 0.05$). Subjects presenting only DM exhibited higher protein levels of OPG and IL-1 β and higher gene expression of DKK1 and SOST than the control ($p < 0.05$).

The serum levels of SOST and TNF- α were higher in the DM group while the serum levels of IL-6 were higher in both smoking groups, compared to the control ($p < 0.05$; Table 4). Furthermore, the levels of SOST in serum positively correlated with its levels in tissue in the control and DM groups ($p < 0.05$, Table 5).

Table 6 presents the correlation coefficients between DKK1 and SOST and the other biomarkers at mRNA and protein levels. In the control group, the mRNA levels of DKK1 presented positive correlations with SOST and OPG and a negative correlation with IL-6. Moreover, the mRNA levels of SOST positively correlated with the expression of OPG ($p < 0.05$). The mRNA levels of DKK1 positively correlated with SOST in the DM group. The gene expression of DKK1 negatively correlated with OPG, while the expression of SOST was positively correlated with TNF- α expression, in the S group ($p < 0.05$). In the SDM group, DKK1 and SOST positively correlated with each other and with all the other biomarkers ($p < 0.05$). The protein levels of DKK1 were positively correlated with OPG, TNF- α and IL-1 β in the control and DM groups and with TNF- α in the SDM group ($p < 0.05$). The protein levels of SOST presented positive correlations with RANKL, OPG and TNF- α in the SDM group and a negative correlation with IL-6 in the DM group ($p < 0.05$).

Table 7 presents the statistically significant relationships between the gene expressions of biomarkers and the levels of pathogens. In the control group, *F. nucleatum ssp* was positively correlated with SOST, IL-1 β , TNF- α and RANKL and negatively correlated with OPG. In the DM group, *T. forsythia* was positively associated with DKK1, IL-1 β and IL-6 and negatively associated with SOST. *T. denticola* was positively associated with DKK1 and IL-1 β and negatively associated with SOST. *P. gingivalis*, *P. micra* and *E. nodatum* were positively associated with IL-1 β . In the SDM group *P. gingivalis*, *E. nodatum* and *P. intermedia* were positively correlated with SOST while the *P. gingivalis* were negatively correlated with DKK1 (p<0.05).

Discussion

This study evaluated the levels of two inhibitors of the Wnt/ β -catenin signaling, DKK1 and SOST, and their relationships with pro-resorptive cytokines and osteoclastogenesis-related factors in patients with CP presenting DM, smoking or both. The associations between gene expressions of these biomarkers with key periodontal pathogens were also assessed. Overall results indicated that the tissue levels of both inhibitors were upregulated in patients with DM and/or smoking habit. Furthermore, DKK1 and SOST correlated with each other, with the other bone metabolism-related biomarkers and with periodontal pathogens and, the risk factors differentially affected these correlations. Together, these findings suggest that DKK1 and SOST could be critical contributors to periodontitis under the challenge of DM and/or smoking habit, due to downregulation of the Wnt/ β -catenin signaling and, consequently, of the osteoblastogenesis.

When compared to the control, gene expression and serum levels of SOST were higher in the DM group. Furthermore, tissue levels of DKK1 were increased in both groups with DM, while its mRNA levels were upregulated in the DM group. Previous investigations have indicated a possible role of hyperglycemia in upregulating the levels of SOST. Hyperglycemia increased SOST at mRNA and protein levels in osteoblast lineage cells (Kang et al. 2015). The gene expression of SOST was upregulated in the tibia of rats with type 2 DM (Nuche-Berenguer et al. 2010, Hie et al. 2011) and, the number of SOST-positive osteocytes was increased in rats with DM and periodontitis (Kim et al. 2015). Furthermore, patients with type 2 DM present higher circulating levels of SOST than non-diabetic subjects (García-Martín et al. 2012, Gaudio et al. 2012, Gennari et al. 2012) and, association between elevated systemic levels of SOST and risk of fractures (Yamamoto et al. 2013). A previous study in rats (Hie et al. 2011) showed that DM decreased osteoblastogenesis through the inhibition of Wnt signaling by increasing the expressions of both SOST and DKK1. Interestingly, in the current study, the levels of SOST in serum were positively correlated with its levels in tissues of patients from the DM group. This finding indicates a possible correspondence between local and systemic levels of SOST in patients with hyperglycemia, which does not occur in the presence of smoking.

SOST and DKK1 protein levels were significantly increased in the periodontal tissues of smokers with and without DM. Previous studies have demonstrated no association between smoking habit and serum levels of SOST or DKK1 in systemic conditions like ankylosing spondylitis (Sakellariou et al. 2017), menopause (Kalem et al. 2017) and abdominal aortic calcification (Szulc et al. 2014). In periodontitis, there has not been any evidence on the influence of smoking on SOST and DKK1. Therefore, the current study provides the first evidence that Wnt/ β -catenin signaling might be impaired by SOST and DKK1 upregulation in diseased

periodontal tissues under the challenge of smoking. Although one could argue that changes in the mRNA should also be seen in the translated protein, such linkage may not necessarily exist. Studies evaluating the concordance between protein and RNA expressions have found wide variability, probably due to technological sensitivities and the actual biological differences between transcript and protein abundances (Pascal et al. 2008).

Close correlations between DKK1 and SOST with one another and with the other biomarkers were found in the current study, indicating that they might affect the regulation and function of one another. A previous study showed that DKK1 induces SOST expression *in vitro* and *in vivo* (Heiland et al. 2010). Moreover, TNF- α and IL-1 β induce the expression of DKK-1 and SOST in systemic conditions (Heiland et al. 2010, Wang et al. 2011, Kim et al. 2012, Baek et al. 2014, Choe et al. 2016). The upregulation of TNF- α occurred simultaneously to the increase of SOST in the periodontitis in diabetic rats (Kim et al. 2015) and of SOST and DKK1 in CP in human (Napimoga et al 2014). Noteworthy, DKK1 and SOST inversely correlated with IL-6 in the control and in the DM groups, respectively. These findings suggest that TNF- α , IL-1 β and IL-6 might interact differently with the Wnt/ β -catenin antagonists in periodontitis. An inverse correlation of DKK1 with IL-6 levels was also demonstrated in inflamed arthritic joints (Yeremenko et al. 2015). Previous studies have shown that DKK1 and SOST up-regulated the expression of RANKL and down-regulated that of OPG (Fujita & Janz 2007, Wijenayaka et al. 2011). Unexpectedly, positive correlations between DKK1 and SOST, and OPG were seen in the control, DM and SDM groups. In the same groups, OPG also positively correlated to RANKL (unshown data). The increase of OPG in parallel with the increase of DKK1, SOST and RANKL might be a regulatory mechanism to control bone resorption in these groups. In summary,

smoking and DM seem to differentially affect the cross-talk between DKK1 and SOST and, the pro-inflammatory cytokines and osteoclastogenesis-related factors.

To date, there are few evidences on the role of the antagonists of the Wnt/ β -catenin signaling in infections. Stimulation of different types of cells by virus or LPS induced the expression of DKK1 (Butler et al. 2013, Orellana et al. 2014, Zhang et al. 2017). On the other hand, the infection with *Rickettsia conorii* downregulated endothelial-derived DKK1, probably as mechanism by which this species escapes the immune response at infected sites (Astrup et al. 2012). In this study, the majority of associations of DKK1 and SOST with pathogens were observed in both groups with DM. In non-smokers with DM, DKK1 positively while SOST inversely correlated with two species of the red complex. In smokers with DM, SOST positively while DKK1 negatively correlated to *P. gingivalis*. Furthermore, SOST were positively correlated with two species of the orange complex. Therefore, the cross-talk between pathogens and DKK1 and SOST seems to be differently affected by risk factors. Interestingly, specific pathogens seem to trigger or silence the expression of one or other antagonist of the Wnt/ β -catenin pathway, according to the influence of hyperglycemia and the hyperglycemia plus smoking. Notably, although the levels/prevalence of the target periodontal pathogens did not differ among groups (unshown data) in this study, a recent investigation (Ganesan et al. 2017) observed that smokers, diabetic and diabetic-smokers with periodontitis exhibited distinct microbiome. Smokers had a robust core microbiome, predominantly with anaerobes species and sparse microbial co-occurrence networks. Diabetics and diabetic-smokers presented heterogeneous microbiome, enriched by facultative species and strong inter-generic networks. Hence, it is speculated that the distinctive microbiome associated with single and combined risk

factors might affect the biomarker-biomarker and biomarker-pathogen relationships observed in this study.

The main strength of this study is that it provides the first insights into the levels of DKK1 and SOST in patients with CP with DM and/or smoking. Furthermore, groups were matched for age and gender and the periodontal samples matched for disease severity. This study has also limitations. Due to its cross-sectional nature, the consequence of the altered levels of DKK-1 and SOST over the long term is missed. Additional mechanistic studies are required to elucidate the role of DKK1 and SOST in the periodontitis related to risk factors, beyond the associations reported in this study.

In conclusion, SOST and DDK1 were upregulated in patients with CP with type 2 DM and/or smoking. Local levels of SOST and DKK1 correlated with each other and with bone metabolism-related factors and key periodontal pathogens and, these relationships were differently influenced by the risk factors.

References

- Araujo, M. W., Hovey, K. M., Benedek, J. R., Grossi, S. G., Dorn, J., Wactawski-Wende, J., Genco, R. J. & Trevisan, M. (2003) Reproducibility of probing depth measurement using a constant-force electronic probe: analysis of inter- and intraexaminer variability. *Journal of Periodontology* **74**, 1736-1740.
- Armitage, G. C. (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology* **4**, 1-6.
- Astrup, E., Lekva, T., Davì, G., Otterdal, K., Santilli, F., Oie, E., Halvorsen, B., Damàs, J.K., Raoult, D., Vitale, G., Olano, J. P., Ueland, T. & Aukrust, P. (2012) A complex interaction between *Rickettsia conorii* and Dickkopf-1--potential role in immune evasion mechanisms in endothelial cells. *PLoS One* **7**, e43638. doi: 10.1371/journal.pone.0043638.
- Baek, K., Hwang, H. R., Park, H. J., Kwon, A., Qadir, A. S., Ko, S. H., Woo, K. M., Ryoo, H. M., Kim, G. S. & Baek, J. H. (2014) TNF- α upregulates sclerostin expression in obese mice fed a high-fat diet. *Journal Cell Physiological* **229**, 640-650. doi: 10.1002/jcp.24487.
- Belibasakis, G. N. & Bostanci, N. (2012) The RANKL-OPG system in clinical periodontology. *Journal of Clinical Periodontology* **39**, 239-248. doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.01810.x.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **7**, 248-254.
- Butler, J. S., Dunning, E. C., Murray, D. W., Doran, P. P. & O'Byrne, J. M. (2013) HIV-1 protein induced modulation of primary human osteoblast differentiation and function via a Wnt/ β -catenin-dependent mechanism. *Journal of Orthopaedic Research* **31**, 218-226. doi: 10.1002/jor.22196.
- Chae, W. J., Ehrlich, A. K., Chan, P. Y., Teixeira, A. M., Henegariu, O., Hao, L., Shin, J. H., Park, J. H., Tang, W. H., Kim, S. T., Maher, S. E., Goldsmith-Pestana, K., Shan, P., Hwa, J., Lee, P. J., Krause, D. S., Rothlin, C. V., McMahon-Pratt, D. & Bothwell, A. L. (2016) The Wnt Antagonist Dickkopf-1 Promotes Pathological Type 2 Cell-Mediated Inflammation. *Immunity* **16**, 246-258. doi: 10.1016/j.immuni.2016.01.008.
- Choe, J. Y., Hun Kim, J., Park, K. Y., Choi, C. H. & Kim, S. K. (2016) Activation of dickkopf-1 and focal adhesion kinase pathway by tumour necrosis factor α induces enhanced migration of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **55**, 928-938. doi: 10.1093/rheumatology/kev422.
- Dolezel, J., Bartos, J., Voglmayr, H. & Greilhuber, J. (2003) Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology* **51**, 127-128.

Duan, P. & Bonewald, L. F. (2016) The role of the wnt/ β -catenin signaling pathway in formation and maintenance of bone and teeth. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **77**(Pt A), 23-29. doi: 10.1016/j.biocel.2016.05.015.

Duarte, P. M., Miranda, T. S., Lima, J. A., Dias Gonçalves, T. E., Santos, V. R., Bastos, M. F. & Ribeiro, F. V. (2012) Expression of immune-inflammatory markers in sites of chronic periodontitis in patients with type 2 diabetes. *Journal of Periodontology* **83**, 426-434. doi: 10.1902/jop.2011.110324.

Fujita, K. & Janz, S. (2007) Attenuation of WNT signaling by DKK-1 and -2 regulates BMP2-induced osteoblast differentiation and expression of OPG, RANKL and M-CSF. *Molecular Cancer* **30**, 71.

García-Martín, A., Rozas-Moreno, P., Reyes-García, R., Morales-Santana, S., García-Fontana, B., García-Salcedo, J. A. & Muñoz-Torres, M. (2012) Circulating levels of sclerostin are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **97**, 234-241. doi: 10.1210/jc.2011-2186.

Ganesan, S.M., Joshi, V., Fellows, M., Dabdoub, S.M., Nagaraja, H.N., O'Donnell, B., Deshpande, N.R. & Kumar, P.S. (2017) A tale of two risks: smoking, diabetes and the subgingival microbiome. *The ISME journal* **11**, 2075-2089. doi: 10.1038/ismej.2017.73.

Gaudio, A., Privitera, F., Battaglia, K., Torrisi, V., Sidoti, M. H., Pulvirenti, I., Canzonieri, E., Tringali, G. & Fiore, C. E. (2012) Sclerostin levels associated with inhibition of the Wnt/ β -catenin signaling and reduced bone turnover in type 2 diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **97**, 3744-3750. doi: 10.1210/jc.2012-1901.

Gennari, L., Merlotti, D., Valenti, R., Ceccarelli, E., Ruvio, M., Pietrini, M. G., Capodarca, C., Franci, M. B., Campagna, M. S., Calabrò, A., Cataldo, D., Stolakis, K., Dotta, F. & Nuti, R. (2012) Circulating sclerostin levels and bone turnover in type 1 and type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **97**, 1737-1744. doi: 10.1210/jc.2011-2958.

Glass, D. A. 2nd, Bialek, P., Ahn, J. D., Starbuck, M., Patel, M. S., Clevers, H., Taketo, M. M., Long, F., McMahon, A. P., Lang, R. A. & Karsenty, G. (2005) Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Developmental Cell* **8**, 751-764.

Heiland, G. R., Zwerina, K., Baum, W., Kireva, T., Distler, J. H., Grisanti, M., Asuncion, F., Li, X., Ominsky, M., Richards, W., Schett, G., & Zwerina, J. (2010) Neutralisation of Dkk-1 protects from systemic bone loss during inflammation and reduces sclerostin expression. *Annals of the Rheumatic Diseases* **69**, 2152-2159. doi: 10.1136/ard.2010.132852.

Hie, M., Iitsuka, N., Otsuka, T. & Tsukamoto, I. (2011) Insulin-dependent diabetes mellitus decreases osteoblastogenesis associated with the inhibition of Wnt signaling through increased expression of Sost and Dkk1 and inhibition of Akt activation. *International Journal of Molecular Medicine* **28**, 455-462. doi: 10.3892/ijmm.2011.697.

- Hienz, S. A., Paliwal, S. & Ivanovski, S. (2015) Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis. *Journal of Immunology Research* **2015**, 615486. doi: 10.1155/2015/615486.
- Kalem, M. N., Kalem, Z., Akgun, N. & Bakırarar, B. (2017) The relationship between postmenopausal women's sclerostin levels and their bone density, age, body mass index, hormonal status, and smoking and consumption of coffee and dairy products. *Archives of Gynecology and Obstetrics* **295**, 785-793. doi: 10.1007/s00404-017-4288-x.
- Kang, J., Boonanantanasarn, K., Baek, K., Woo, K.M., Ryoo, H. M., Baek, J. H. & Kim, G. S. (2015) Hyperglycemia increases the expression levels of sclerostin in a reactive oxygen species- and tumor necrosis factor-alpha-dependent manner. *Journal of Periodontal & Implant Science* **45**, 101-110. doi: 10.5051/jpis.2015.45.3.101.
- Kim, B. J., Bae, S. J., Lee, S. Y., Lee, Y. S., Baek, J. E., Park, S. Y., Lee, S. H., Koh, J. M. & Kim, G. S. (2012) TNF- α mediates the stimulation of sclerostin expression in an estrogen-deficient condition. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **424**, 170-175. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.06.100.
- Kim, J. H., Lee, D. E., Woo, G. H., Cha, J. H., Bak, E. J. & Yoo, Y. J. (2015) Osteocytic sclerostin expression in alveolar bone in rats with diabetes mellitus and ligature-induced periodontitis. *Journal of Periodontology* **86**, 1005-1011. doi: 10.1902/jop.2015.150083.
- Knight, E. T., Liu, J., Seymour, G. J., Faggion, C. M. Jr. & Cullinan, M. P. (2016) Risk factors that may modify the innate and adaptive immune responses in periodontal diseases. *Periodontology 2000* **71**, 22-51. doi: 10.1111/prd.12110.
- Liu, W. & Zhang, X. (2015) Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)/RANK/osteoprotegerin system in bone and other tissues (review). *Molecular Medicine Reports* **11**, 3212-3218. doi: 10.3892/mmr.2015.3152.
- Miranda, T. S., Feres, M., Perez-Chaparro, P. J., Favari, M., Figueiredo, L. C., Tamashiro, N. S., Bastos, M. F. & Duarte, P. M. (2014) Metronidazole and amoxicillin as adjuncts to scaling and root planing for the treatment of type 2 diabetic subjects with periodontitis: 1-year outcomes of a randomized placebo-controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **41**, 890-899. doi: 10.1111/jcpe.12282.
- Napimoga, M. H., Nametala, C., da Silva, F. L., Miranda, T. S., Bossonaro, J. P., Demasi, A. P. & Duarte, P. M. (2014) Involvement of the Wnt- β -catenin signalling antagonists, sclerostin and dickkopf-related protein 1, in chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **41**, 550-557. doi: 10.1111/jcpe.12245.
- Nuche-Berenguer, B., Moreno, P., Portal-Nuñez, S., Dapía, S., Esbrit, P. & Villanueva-Peñacarrillo, M. L. (2010) Exendin-4 exerts osteogenic actions in insulin-resistant and type 2 diabetic states. *Regulatory Peptides* **159**(1-3), 61-66. doi: 10.1016/j.regpep.2009.06.010.

- Orellana, J. A., Sáez, J. C., Bennett, M. V., Berman, J. W., Morgello, S. & Eugenin, E. A. (2014) HIV increases the release of dickkopf-1 protein from human astrocytes by a Cx43 hemichannel-dependent mechanism. *Journal of Neurochemistry* **128**, 752-763. doi: 10.1111/jnc.12492.
- Pascal, L. E., True, L. D., Campbell, D. S., Deutsch, E. W., Risk, M., Coleman, I. M., Eichner, L. J., Nelson, P. S. & Liu, A. Y. (2008) Correlation of mRNA and protein levels: cell type-specific gene expression of cluster designation antigens in the prostate. *BMC Genomics* **23**, 246. doi: 10.1186/1471-2164-9-246.
- Qiang, Y. W., Chen, Y., Brown, N., Hu, B., Epstein, J., Barlogie, B. & Shaughnessy, J. D. Jr. (2010) Characterization of Wnt/beta-catenin signalling in osteoclasts in multiple myeloma. *British Journal of Haematology* **148**, 726-738. doi: 10.1111/j.1365-2141.2009.08009.x.
- Ren, Y., Han, X., Ho, S. P., Harris, S. E., Cao, Z., Economides, A. N., Qin, C., Ke, H., Liu, M. & Feng, J. Q. (2015) Removal of SOST or blocking its product sclerostin rescues defects in the periodontitis mouse model. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **29**, 2702-2711. doi: 10.1096/fj.14-265496.
- Sakellariou, G. T., Iliopoulos, A., Konsta, M., Kenanidis, E., Potoupnis, M., Tsiridis, E., Gavana, E. & Sayegh, F. E. (2017) Serum levels of Dkk-1, sclerostin and VEGF in patients with ankylosing spondylitis and their association with smoking, and clinical, inflammatory and radiographic parameters. *Joint, Bone, Spine: Revue du Rhumatisme* **84**, 309-315. doi: 10.1016/j.jbspin.2016.05.008.
- Sebastian, A. & Loots, G. G. (2017) Transcriptional control of Sost in bone. *Bone Mar*; **96**: 76-84. doi: 10.1016/j.bone.2016.10.009.
- Szulc, P., Schoppet, M., Rachner, T. D., Chapurlat, R. & Hofbauer, L. C. (2014) Severe abdominal aortic calcification in older men is negatively associated with DKK1 serum levels: the STRAMBO study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* Feb; **99**, 617-624. doi: 10.1210/jc.2013-3201.
- Taut, A. D., Jin, Q., Chung, J. H., Galindo-Moreno, P., Yi, E. S., Sugai, J. V., Ke, H. Z., Liu, M. & Giannobile, W. V. (2013) Sclerostin antibody stimulates bone regeneration after experimental periodontitis. *Journal of Bone and Mineral Research* **28**, 2347-2356. doi: 10.1002/jbmr.1984.
- Wang, S. Y., Liu, Y. Y., Ye, H., Guo, J. P., Li, R., Liu, X. & Li, Z. G. (2011) Circulating Dickkopf-1 is correlated with bone erosion and inflammation in rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology* **38**, 821-827. doi: 10.3899/jrheum.100089.
- Wijenayaka, A. R., Kogawa, M., Lim, H. P., Bonewald, L. F., Findlay, D. M. & Atkins, G. J. (2011) Sclerostin stimulates osteocyte support of osteoclast activity by a RANKL-dependent pathway. *PLoS One* **6**, e25900. doi: 10.1371/journal.pone.0025900.
- Yang, X., Han, X., Shu, R., Jiang, F., Xu, L., Xue, C., Chen, T. & Bai, D. (2016) Effect of sclerostin removal in vivo on experimental periodontitis in mice. *Journal of Oral Science* **58**, 271-276. doi: 10.2334/josnusd.15-0690.

Yamamoto, M., Yamauchi, M. & Sugimoto, T. (2013) Elevated sclerostin levels are associated with vertebral fractures in patients with type 2 diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **98**, 4030-4037. doi: 10.1210/jc.2013-2143.

Yeremenko, N., Zwerina, K., Rigter, G., Pots, D., Fonseca, J. E., Zwerina, J., Schett, G. & Baeten, D. (2015) Tumor necrosis factor and interleukin-6 differentially regulate Dkk-1 in the inflamed arthritic joint. *Arthritis & Rheumatology* **67**, 2071-2075. doi: 10.1002/art.39183.

Zhang, R., Real, C. I., Liu, C., Baba, H. A., Gerken, G., Lu, M. & Broering, R. (2017) Hepatic expression of oncogenes Bmi1 and Dkk1 is up-regulated in hepatitis B virus surface antigen-transgenic mice and can be induced by treatment with HBV particles or lipopolysaccharides in vitro. *International Journal of Cancer* **141**, 354-363. doi: 10.1002/ijc.30742.

Table 1 - Primer sequences, amplification profile and estimated length of PCR product for each biomarker and bacterial species.

Gene Species/ strain	Sequence	Amplification profile [temperature (°C)/time (s)]	Length of PCR product (bp)
RANKL	5' TACACGACTCAGTATCCATGC 3' AAGGTCAACCCGTAATTGC	95/10, 56/5, 72/6	158
OPG	5' TCCGGAAACAGTGAATCAACTC 3' TCTCTGCGTTTACTTTGGTGC	95/10, 56/5, 72/6	151
SOST	5' GAGGAGGCAGAAATGGAAG 3' AGGACTAGAAACCACATCTACAG	95/10, 55/5, 72/8	188
DKK1	5' CTGTCCTGAAAGAAGGTCAAGT 3' TGTGAAGCCTAGAAGAATTACTGG	95/10, 56/5, 72/7	150
IL-6	5' GCAGGACATGACAACCTCATC 3' AAGTTCTGTGCCAGTGG	95/10, 56/5, 72/6	159
IL-1 β	5' CACCTTCTTTCCCTTCATCTTTG 3' GCTTTCAGTTCATATGGACCAG	95/10, 56/5, 72/7	158
TNF- α	5' CCAGGGACCTCTCTCTAATCA 3' CTGGTTATCTCTCAGCTCCAC	95/10, 56/5, 72/7	178
GAPDH	5' CTGAGTACGTCGTGGAGTC 3' TGATGATCTTGAGGCTGTTGTC	95/10, 56/5, 72/7	187
<i>P. intermedia</i> ATCC 25611	5' CCACATATGGCATCTGACGTG 3' TCAATCTGCACGCTACTTGGC	95/10, 59/10, 72/10	233
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	5' TGCAACTTGCCTTACAGAGGG 3' ACTCGTATCGCCCGTTATTC	95/10, 57/10, 72/14	344
<i>T. forsythia</i> ATCC 43037	5' GATAGGCTTAACACATGCAAGTC 3' GTTGCGGGCAGGTTACATAC	95/10, 57/10, 72/4	99
<i>E. nodatum</i> ATCC 33099	5' CTTCGGAACAGTGGAGAC 3' CTCTGTGACGGCCATTG	95/10, 56/10, 72/9	225
<i>P. micra</i> ATCC 33270	5' TGAGCAACCTACCTTACACAG 3' GCCCTTCTTACACCGATAAATC	95/10, 56/10, 72/5	112
<i>F. nucleatum ssp.</i> ATCC 10953	5' GCGCGTCTAGGTGGTTAT 3' GTAGTCCGCTTACCTCTCCAG	95/10, 58/10, 72/4	105

T. denticola 5' GACGCAAACGCATTAAGTG
ATCC 35405 3' GCTACGCTGCCATATCT 95/10, 56/10, 72/7 174

ATCC: American Type Culture Collection, RANKL: receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, OPG: osteoprotegerin, SOST: sclerostin, DKK: Dickkopf, IL: interleukin, TNF: tumor necrosis factor, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Table 2 - Demographic characteristics, glycemic and periodontal parameters (mean \pm SD).

Parameters	Groups				p-value
	Control	DM	S	SDM	
Gender (M%)	40.0	36.4	34.6	31.8	0.98*
Age (years)	51.9 \pm 8.7	55.9 \pm 9.3	51.4 \pm 7.9	54.1 \pm 7.9	0.19 #
Years of smoking	-	-	24.6 \pm 13.2	27.1 \pm 12.2	0.53 **
Cigarettes/day (n)	-	-	13.3 \pm 1.3	17.0 \pm 4.8	0.06 **
Years of DM	-	6.7 \pm 3.2	-	6.2 \pm 2.5	0.58 **
HbA1c (%)	5.9 \pm 0.2 ^a	7.7 \pm 0.5 ^b	5.7 \pm 0.4 ^a	7.3 \pm 0.3 ^b	0.00 #
FM % of sites with plaque	58.6 \pm 23.1	76.8 \pm 19.9	71.4 \pm 20.1	72.8 \pm 23.2	0.32 #
FM % of sites with BoP	35.7 \pm 26.2	43.8 \pm 25.1	36.2 \pm 28.8	29.6 \pm 17.1	0.64 #
FM PD (mm)	3.3 \pm 0.8	3.8 \pm 0.8	3.8 \pm 1.2	3.6 \pm 0.8	0.09 #
FM CAL (mm)	4.2 \pm 1.2	5.2 \pm 1.3	4.9 \pm 1.6	4.9 \pm 1.3	0.07 #
Sampled teeth PD (mm)	5.7 \pm 1.5	5.9 \pm 1.6	5.4 \pm 1.5	5.5 \pm 1.8	0.56 #
Sampled teeth CAL (mm)	8.4 \pm 1.9	8.4 \pm 2.0	7.9 \pm 2.0	8.0 \pm 2.0	0.10 #

Different letters indicate differences among groups ($p < 0.0001$).

* Chi-square test; # One-way ANOVA; ** T-test.

PD: probing depth; CAL: clinical attachment level; BoP: bleeding on probing; HbA1c: glycated hemoglobin; SD: standard deviation; DM: diabetes mellitus; S: smoking; SDM: smoking plus DM; FM: full-mouth

Table 3 – Tissue protein and mRNA levels (median [mean \pm SD]) for all biomarkers.

Biomarkers	Groups				
	Control	DM	S	SDM	
Protein levels (pg/mg)	DKK1	36.60 (43.1 \pm 27.9)	65.54 (126.6 \pm 133.2) †	51.02 (74.6 \pm 84.1) †	63.80 (80.4 \pm 48.8) †
	SOST	196.58 (247.9 \pm 174.2)	150.24 (168.5 \pm 138.7)	263.41 (298.9 \pm 179.8) †	273.07 (287.0 \pm 141.4) †
	RANKL	14.36 (20.0 \pm 16.4)	14.43 (39.5 \pm 63.6)	17.27 (54.5 \pm 81.5)	12.17 (17.5 \pm 15.5)
	OPG	90.75 (143.9 \pm 124.4)	253.989(327.8 \pm 292.9) †	169.76 (200.3 \pm 180.3)	113.62 (135.2 \pm 88.6)
	RANKL/OPG	0.13 (0.20 \pm 0.16)	0.12 (0.23 \pm 0.33)	0.15 (0.43 \pm 0.76)	0.13 (0.23 \pm 0.33)
	IL-6	7.01 (13.7 \pm 25.3)	58.21 (86.1 \pm 84.5) †	24.52 (56.9 \pm 84.3) †	14.69 (19.9 \pm 17.3) †
	TNF- α	0.32 (0.4 \pm 0.3)	1.86 (2.2 \pm 1.8) †	1.37 (1.6 \pm 0.8) †	0.92 (1.1 \pm 0.7) †
	IL-1 β	1.46 (9.6 \pm 19.8)	8.25 (22.6 \pm 30.4) †	4.37 (22.2 \pm 30.1)	1.35 (4.9 \pm 13.9)
Gene expression (mRNA target gene/GAPDH)	DKK1	0.36 (1.2 \pm 2.1)	0.99 (27.7 \pm 104.7) †	0.11 (1.1 \pm 0.4)	0.11 (2.0 \pm 9.4)
	SOST	0.08 (0.6 \pm 1.4)	0.29 (11.3 \pm 35.4) †	0.00 (0.3 \pm 0.9)	0.01 (0.4 \pm 1.4)
	RANKL	0.02 (0.87 \pm 2.1)	0.08 (2.1 \pm 3.9)	0.06 (1.0 \pm 4.1)	0.01 (1.34 \pm 1.4)
	OPG	0.29 (1.1 \pm 1.9)	0.27 (1.31 \pm 2.0)	0.06 (0.40 \pm 0.85)	0.26 (2.7 \pm 9.2)
	RANKL/OPG	0.64 (1.6 \pm 3.5)	0.20 (1.2 \pm 2.7)	0.38 (5.5 \pm 13.9)	0.34 (1.1 \pm 0.2)
	IL-6	0.26 (87.2 \pm 228.9)	5.00 (67.1 \pm 127.5)	0.39 (31.9 \pm 89.4)	0.03 (117.5 \pm 504.2)
	TNF- α	0.01 (0.0 \pm 0.0)	0.04 (0.3 \pm 1.1)	0.01 (0.1 \pm 0.4)	0.00 (0.3 \pm 1.4)
	IL-1 β	0.23 (1.3 \pm 1.9)	0.23 (2.3 \pm 4.8)	0.30 (4.1 \pm 9.2)	0.34 (1.6 \pm 3.8)

† Significantly different from the control group (Kruskal-Wallis and Dunn's test; $p < 0.05$). DKK: Dickkopf, SOST: sclerostin, RANKL: receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, OPG:

osteoprotegerin, IL: interleukin, TNF: tumor necrosis factor, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, SD: standard deviation, DM: diabetes mellitus, S: smoking, SDM: smoking plus DM.

Table 4 – Protein (pg/ml) levels (median [mean \pm SD]) of biomarkers in serum.

Biomarker	Groups			
	Control	DM	S	SDM
DKK1	326.86 (606.4 \pm 622.7)	487.90 (821.4 \pm 719.8)	506.90 (764.2 \pm 746.4)	259.65 (439.1 \pm 462.1)
SOST	1403.00 (1410.1 \pm 571.9)	2062.44 (2203.8 \pm 1142.1) †	1403.00 (1466.2 \pm 809.29)	1155.00 (1302.7 \pm 790.1)
RANKL	0.07 (1.8 \pm 5.2)	0.29 (10.6 \pm 17.9)	0.06 (5.4 \pm 19.5)	0.06 (1.7 \pm 5.9)
OPG	188.68 (198.5 \pm 96.0)	234.44 (254.7 \pm 119.0)	169.27 (202.5 \pm 126.67)	190.75 (248.7 \pm 140.6)
RANKL/OPG	0.00 (0.01 \pm 0.03)	0.00 (0.04 \pm 0.08)	0.00 (0.02 \pm 0.08)	0.00 (0.00 \pm 0.03)
IL-6	0.44 (0.9 \pm 1.1)	0.56 (1.8 \pm 4.5)	1.00 (1.8 \pm 2.14) †	1.04 (3.0 \pm 5.5) †
TNF- α	1.05 (1.3 \pm 1.1)	1.38 (1.8 \pm 1.1) †	1.26 (1.2 \pm 0.5)	1.41 (1.9 \pm 2.0)
IL-1 β	0.32 (0.4 \pm 0.2)	0.35 (0.4 \pm 0.2)	0.29 (0.3 \pm 0.05)	0.29 (0.5 \pm 0.5)

† Significantly different from the control group (Kruskal-Wallis and Dunn's test; $p < 0.05$).

DKK: Dickkopf, SOST: sclerostin, RANKL: receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, OPG: osteoprotegerin, IL: interleukin, TNF: tumor necrosis factor, SD: standard deviation, DM: diabetes mellitus, S: smoking, SDM: smoking plus DM.

Table 5 - Correlation coefficients between the serum and tissue protein levels of each biomarker.

Biomarker	Groups			
	Control	DM	S	SDM
DKK1	-0.16	0.06	-0.18	0.19
SOST	0.44 *	0.53 *	-0.01	0.14
RANKL	-0.02	-0.02	-0.07	0.18
OPG	-0.11	0.24	-0.19	0.28
IL-6	-0.14	0.15	0.02	0.26
TNF- α	0.04	0.08	0.22	0.09
IL-1 β	-0.22	0.15	-0.16	0.06

* Spearman's Rank Correlation ($p > 0.05$).

DKK: Dickkopf, SOST: sclerostin, RANKL: receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, OPG: osteoprotegerin, IL: interleukin, TNF: tumor necrosis factor, DM: diabetes mellitus, S: smoking, SDM: smoking plus DM.

Table 6 - Correlation coefficients between DKK1 and SOST and the other studied biomarkers at mRNA and protein levels.

		mRNA							Protein						
		DKK1	SOST	RANKL	OPG	IL-6	TNF- α	IL-1 β	DKK1	SOST	RANKL	OPG	IL-6	TNF- α	IL-1 β
Control	DKK1	1.00	0.73**	0.42	0.69**	-0.51*	-0.01	-0.41	1.00	0.12	0.06	0.77**	0.40	0.83**	0.65**
	SOST	-	1.00	0.19	0.61*	-0.31	-0.03	-0.38	-	1.00	0.11	-0.19	-0.07	0.28	-0.29
DM	DKK1	1.00	0.88**	0.08	0.32	-0.33	0.25	0.38	1.00	0.01	-0.14	0.70**	0.41	0.62**	0.47*
	SOST	-	1.00	0.23	0.36	-0.21	0.15	0.34	-	1.00	0.31	-0.07	-0.56**	-0.28	0.03
S	DKK1	1.00	0.13	-0.06	-0.45*	0.33	0.21	0.34	1.00	-0.38	-0.14	0.26	0.28	-0.16	0.21
	SOST	-	1.00	0.41	-0.04	0.16	0.60**	0.23	-	1.00	0.41	-0.16	-0.41	0.42	-0.31
SDM	DKK1	1.00	0.72**	0.77**	0.72**	0.50*	0.79**	0.72**	1.00	0.35	-0.04	0.41	0.40	0.47*	0.14
	SOST	-	1.00	0.54*	0.69**	0.73**	0.63**	0.87**	-	1.00	0.57**	0.52*	0.19	0.64**	0.33

Spearman's Rank Correlation (* p>0.05, ** p>0.01).

DKK: Dickkopf, SOST: sclerostin, RANKL: receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, OPG: osteoprotegerin, IL: interleukin, TNF: tumor necrosis factor, DM: diabetes mellitus, S: smoking, SDM: smoking plus DM.

Table 7 - Multivariate linear regression analysis showing the statistically significant relationships between the gene expressions of biomarkers and the levels of bacterial species.

Group	Independent variable	β	p-value
Control	Regression analysis for <i>F. nucleatum</i>		
	SOST	0.30	0.00
	IL-1 β	0.73	0.00
	TNF- α	0.41	0.00
	RANKL	0.28	0.04
	OPG	-0.97	0.00
DM	Regression analysis for <i>T. forsythia</i>		
	DKK1	1.20	0.04
	SOST	-1.70	0.04
	IL-1 β	1.08	0.00
	IL-6	0.54	0.00
	Regression analysis for <i>T. denticola</i>		
	DKK1	1.7	0.04
	SOST	-2.35	0.04
	IL-1 β	0.98	0.02
	Regression analysis for <i>P. gingivalis</i>		
	IL-1 β	0.93	0.01
	Regression analysis for <i>P. micra</i>		
	IL-1 β	0.64	0.04
	Regression analysis for <i>E. nodatum</i>		
IL-1 β	1.29	0.04	
SDM	Regression analysis for <i>P. gingivalis</i>		
	DKK1	-1.20	0.02
	SOST	1.80	0.01
	Regression analysis for <i>E. nodatum</i>		
	SOST	1.2	0.04
	Regression analysis for <i>P. intermedia</i>		
	SOST	1.3	0.02

DKK: Dickkopf, SOST: sclerostin, RANKL: receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, OPG: osteoprotegerin, IL: interleukin, TNF: tumor necrosis factor, DM: diabetes mellitus, SDM: smoking plus DM.

4. CONCLUSÃO

SOST e DKK1 estavam aumentados localmente em pacientes com PC apresentando DM tipo 2, hábito de fumar e ambas as condições. Os níveis circulantes de SOST estavam aumentados em não-fumantes com DM. O DM, sozinho ou combinado com o tabagismo, foi o principal fator que influenciou as correlações do SOST e DKK1 entre si e de ambos com os fatores relacionados ao metabolismo ósseo e com os patógenos periodontais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abduljabbar T, Al-Sahaly F, Al-Kathami M, Afzal S, Vohra F. Comparison of periodontal and peri-implant inflammatory parameters among patients with prediabetes, type 2 diabetes mellitus and non-diabetic controls. *Acta Odontol Scand.* 2017 Jul; 75(5): 319-24.

Abusleme L, Dupuy AK, Dutza N, Silva N, Burleson JA, Strasbaugh LD, et al. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME J.* 2013; 7: 1016-25.

Al-Otaibi DH, Babay NA, Habib SS, Almas K. Assessment of lipid profile in Saudi type 2 diabetic and non-diabetic periodontal patients. *Saudi Med J.* 2008 May; 29(5): 723-27.

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2012 Jan; 35 Suppl 1: S64-71.

Axelsson P, Paulander J, Lindhe J. Relationship between smoking and dental status in 35-, 50-, 65-, and 75-year-old individuals. *J Clin Periodontol.* 1998 Apr; 25(4): 297-05.

Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med.* 2013 Feb; 19(2): 179-92.

Bascones-Martínez A, González-Febles J, Sanz-Esporrín J. Diabetes and periodontal disease. Review of the literature. *Am J Dent.* 2014 Apr; 27(2): 63-7.

Behfarnia P, Saied-Moallemi Z, Javanmard SH, Naseri R. Serum, saliva, and GCF concentration of RANKL and osteoprotegerin in smokers versus nonsmokers with chronic periodontitis. *Adv Biomed Res.* 2016 Apr; 21(5): 80.

Belibasakis GN, Bostanci N. The RANKL-OPG system in clinical periodontology. *J Clin Periodontol.* 2012 Mar; 39(3): 239-48.

Bostanci N, Ilgenli T, Emingil G, Afacan B, Han B, Töz H, et al. Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: implications of their relative ratio. *J Clin Periodontol.* 2007 May; 34(5): 370-76.

Buduneli N, Biyikoğlu B, Sherrabeh S, Lappin DF. Saliva concentrations of RANKL and osteoprotegerin in smoker versus non-smoker chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 2008 Oct; 35(10): 846-52.

César-Neto JB, Duarte PM, de Oliveira MC, Tambeli CH, Sallum EA, Nociti FH Jr. Smoking modulates interleukin-6: interleukin-10 and RANKL: osteoprotegerin ratios in the periodontal tissues. *J Periodontal Res.* 2007 Apr; 42(2): 184-91.

Cochran D. Inflammation and Bone Loss in Periodontal Disease. *J Periodontol.* 2008; 79: 1569-76.

Crotti T, Smith MD, Hirsch R, et al. Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *J Periodontal Res.* 2003; 38: 380-87.

Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med.* 2007 Feb; 13(2): 156-63.

Dietrich T, Walter C, Oluwagbemigun K, Bergmann M, Pischon T, Pischon N, et al. Smoking, Smoking Cessation, and Risk of Tooth Loss: The EPIC-Potsdam Study. *J Dent Res.* 2015 Oct; 94(10): 1369-75.

Duarte PM, Neto JB, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr. Diabetes modulates gene expression in the gingival tissues of patients with chronic periodontitis. *Oral Dis.* 2007 Nov; 13(6): 594-99.

Duarte PM, Miranda TS, Lima JA, Dias Gonçalves TE, Santos VR, Bastos MF, et al. Expression of immune-inflammatory markers in sites of chronic periodontitis in patients with type 2 diabetes. *J Periodontol.* 2012 Apr; 83(4): 426-34.

Duncan BB, Schmidt MI, Ewerton Cousin, Moradi-Lakeh M, Passos VMA, França EB, et al. The burden of diabetes and hyperglycemia in Brazil-past and present: findings from the Global Burden of Disease Study 2015. *Diabetol Metab Syndr.* 2017 Mar; 14(9): 18.

Eke PI, Wei L, Borgnakke WS, Thornton-Evans G, Zhang X, Lu H, et al. Periodontitis prevalence in adults ≥ 65 years of age, in the USA. *Periodontol 2000.* 2016 Oct; 72(1): 76-95.

Emrich LJ, Shlossman M, Genco RJ. Periodontal disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol.* 1991; 62: 123-31.

Fernandes JK, Wiegand RE, Salinas CF, Grossi SG, Sanders JJ, Lopes-Virella MF, et al. Periodontal disease status in gullah african americans with type 2 diabetes living in South Carolina. *J Periodontol.* 2009 Jul; 80(7): 1062-28.

Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2013 Jun; 62(1): 59-94.

Giovino GA, Mirza SA, Samet JM, Gupta PC, Jarvis MJ, Bhala N, et al. GATS Collaborative Group. Tobacco use in 3 billion individuals from 16 countries: an analysis of nationally representative cross-sectional household surveys. *Lancet.* 2012 Aug 18; 380 (9842): 668-79.

Glass DA 2nd, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, et al. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell.* 2005 May; 8(5): 751-64.

Glass DA 2nd, Karsenty G. Canonical Wnt signaling in osteoblasts is required for osteoclast differentiation. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Apr; 1068: 117-30.

Gonzales JR. T- and B-cell subsets in periodontitis. *Periodontol 2000.* 2015 Oct; 69(1): 181-00.

Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol.* 2011 Jan 17; 3.

Griffen AL, Beall CJ, Campbell JH, Firestone ND, Kumar PS, Yang ZK, et al. Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *ISME J.* 2012; 6: 1176-85.

Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE, et al. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol.* 1994; 65: 260-67.

Heiland GR, Zwerina K, Baum W, Kireva T, Distler JH, Grisanti M, et al. Neutralisation of Dkk-1 protects from systemic bone loss during inflammation and reduces sclerostin expression. *Ann Rheum Dis.* 2010 Dec; 69(12): 2152-59.

Heitz-Mayfield LJ. Disease progression: identification of high-risk groups and individuals for periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2005; 32 Suppl 6: 196-09.

Hie M, Iitsuka N, Otsuka T, Tsukamoto I. Insulin-dependent diabetes mellitus decreases osteoblastogenesis associated with the inhibition of Wnt signaling through increased expression of Sost and Dkk1 and inhibition of Akt activation. *Int J Mol Med.* 2011 Sep; 28(3): 455-62.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Organização PanAmericana da Saúde. Pesquisa especial de tabagismo - PETab: relatório Brasil. Rio de Janeiro: Inca. 2011.

International Diabetes Federation. *IDF Diabetes atlas.* 7th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation. 2015.

Jansson L, Lavstedt S. Influence of smoking on marginal bone loss and tooth loss--a prospective study over 20 years. *J Clin Periodontol.* 2002 Aug; 29(8): 750-56.

Javed F, Al-Askar M, Al-Hezaimi K. Cytokine profile in the gingival crevicular fluid of periodontitis patients with and without type 2 diabetes: a literature review. *J Periodontol.* 2012 Feb; 83(2): 156-61.

Jha P, Chaloupka FJ, Corrao M, Jacob B. Reducing the burden of smoking world-wide: effectiveness of interventions and their coverage. *Drug Alcohol Rev.* 2006; 25: 597-09.

Jimenez M, Hu FB, Marino M, Li Y, Joshipura KJ. Type 2 diabetes mellitus and 20 year incidence of periodontitis and tooth loss. *Diabetes Res Clin Pract.* 2012 Dec; 98 (3): 494-00.

Kaur G, Holtfreter B, Rathmann W, Schwahn C, Wallaschofski H, Schipf S, et al. Association between type 1 and type 2 diabetes with periodontal disease and tooth loss. *J Clin Periodontol.* 2009 Sep; 36(9): 765-74.

Kim EK, Lee SG, Choi YH, Won KC, Moon JS, Merchant AT, et al. Association between diabetes-related factors and clinical periodontal parameters in type-2 diabetes mellitus. *BMC Oral Health.* 2013 Nov 7; 13: 64.

- Kim JH, Lee DE, Woo GH, Cha JH, Bak EJ, Yoo YJ. Osteocytic sclerostin expression in Alveolar Bone in Rats with Diabetes Mellitus and Ligature-Induced Periodontitis. *J Periodontol*. 2015 Aug; 86(8): 1005-11.
- Kinane DF, Mark Bartold P. Clinical relevance of the host responses of periodontitis. *Periodontol* 2000. 2007; 43: 278-93.
- Knight ET, Liu J, Seymour GJ, Faggion CM Jr, Cullinan MP. Risk factors that may modify the innate and adaptive immune responses in periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 2016 Jun; 71(1): 22-51.
- Kumar PS, Griffen AL, Moeschberger ML, Leys EJ. Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S clonal analysis. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 3944-55.
- Lappin DF, Sherrabeh S, Jenkins WM, Macpherson LM. Effect of smoking on serum RANKL and OPG in sex, age and clinically matched supportive-therapy periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 2007 Apr; 34(4): 271-77.
- Lee J, Taneja V, Vassallo R. Cigarette smoking and inflammation: cellular and molecular mechanisms. *J Dent Res*. 2012; 91: 142-49.
- Lee SS, Sharma AR, Choi BS, Jung JS, Chang JD, Park S, et al. The effect of TNF α secreted from macrophages activated by titanium particles on osteogenic activity regulated by WNT/BMP signaling in osteoprogenitor cells. *Biomaterials*. 2012 Jun; 33(17): 4251-63.
- Linden GJ, Mullally BH. Cigarette smoking and periodontal destruction in young adults. *J Periodontol*. 1994; 65: 718-23.
- Liu D, Xu JK, Figliomeni L, Huang L, Pavlos NJ, Rogers M, et al. Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction. *Int J Mol Med*. 2003 Jan; 11(1): 17-21.
- Löe H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 1993; 16: 329-34.
- Lu HK, Chen YL, Chang HC, Li CL, Kuo MY. Identification of the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand system in gingival crevicular fluid and tissue of patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res*. 2006 Aug; 41(4): 354-60.
- Matarazzo F, Ribeiro AC, Feres M, Faveri M, Mayer MP. Diversity and quantitative analysis of Archaea in aggressive periodontitis and periodontally healthy subjects. *J Clin Periodontol*. 2011; 38: 621-27.
- Mealey BL, Ocampo GL. Diabetes mellitus and periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2007; 44: 127-53.

- Mogi M, Ootogoto J, Ota N, Togari A. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Dent Res*. 2004 Feb; 83(2): 166-69.
- Monroe DG, McGee-Lawrence ME, Oursler MJ, Westendorf JJ. Update on Wnt signaling in bone cell biology and bone disease. *Gene*. 2012 Jan 15; 492(1): 1-18.
- Napimoga MH, Nametala C, da Silva FL, Miranda TS, Bossonaro JP, Demasi AP, et al. Involvement of the Wnt- β -catenin signalling antagonists, sclerostin and dickkopf-related protein 1, in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2014 Jun; 41(6): 550-57.
- Nociti FH Jr, Casati MZ, Duarte PM. Current perspective of the impact of smoking on the progression and treatment of periodontitis. *Periodontol 2000*. 2015 Feb; 67(1): 187-10.
- Novak MJ, Potter RM, Blodgett J, Ebersole JL. Periodontal disease in Hispanic Americans with type 2 diabetes. *J Periodontol*. 2008; 79: 629-36.
- Organização Mundial da Saúde. O diagnóstico, definição e classificação do Diabetes Mellitus e suas complicações. Parte 1: Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus. WHO/NCD/NCS/99.2 Ed. Genebra; 1999.
- Ozçaka O, Nalbantsoy A, Köse T, Buduneli N. Plasma osteoprotegerin levels are decreased in smoker chronic periodontitis patients. *Aust Dent J*. 2010 Dec; 55(4): 405-10.
- Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol*. 2001 Jun; 183(12): 3770-83.
- Pérez-Chaparro PJ, Gonçalves C, Figueiredo LC, Faveri M, Lobão E, Tamashiro N, et al. Newly identified pathogens associated with periodontitis: a systematic review. *J Dent Res*. 2014 Sep; 93(9): 846-58.
- Pindborg JJ. Tobacco and gingivitis. I. Statistical examination of the significance of tobacco in the development of ulceromembranous gingivitis and in the formation of calculus. *J Dent Res*. 1947; 26: 261-64.
- Poole KE, van Bezooijen RL, Loveridge N, Hamersma H, Papapoulos SE, Löwik CW, et al. Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *FASEB J*. 2005 Nov; 19(13): 1842-44.
- Preshaw PM, de Silva N, McCracken GI, Fernando DJ, Dalton CF, Steen ND, et al. Compromised periodontal status in an urban Sri Lankan population with type 2 diabetes. *J Clin Periodontol*. 2010 Feb; 37(2): 165-71.
- Quarles LD, Yohay DA, Lever LW, Caton R, Wenstrup RJ. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. *J Bone Miner Res*. 1992 Jun; 7(6): 683-92.

Rossini M, Gatti D, Adami S. Involvement of WNT/ β -catenin signaling in the treatment of osteoporosis. *Calcif Tissue Int.* 2013 Aug; 93(2): 121-32.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.* 1997 Apr 18; 89(2): 309-19.

Ribeiro FV, de Mendonça AC, Santos VR, Bastos MF, Figueiredo LC, Duarte PM. Cytokines and bone-related factors in systemically healthy patients with chronic periodontitis and patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2011 Aug; 82(8): 1187-96.

Rossini M, Gatti D, Adami S. Involvement of WNT/ β -catenin signaling in the treatment of osteoporosis. *Calcif Tissue Int.* 2013 Aug; 93(2): 121-32.

Santos VR, Lima JA, Gonçalves TE, Bastos MF, Figueiredo LC, Shibli JA, et al. Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand/osteoprotegerin ratio in sites of chronic periodontitis of subjects with poorly and well-controlled type 2 diabetes. *J Periodontol.* 2010 Oct; 81(10): 1455-65.

Schätzle M, Løe H, Ramseier CA, Bürgin W, Ånerud Å, Boysen H, et al. Clinical course of chronic periodontitis: effect of lifelong light smoking (20 years) on loss of attachment and teeth. *J Investig Clin Dent.* 2010 Aug; 1(1): 8-15.

Serrano C, Perez C, Rodríguez M. Periodontal conditions in a group of Colombian type 2 diabetic patients with different degrees of metabolic control. *Acta Odontol Latinoam.* 2012; 25(1): 132-39.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998 Feb; 25(2): 134-44.

Spencer GJ, Utting JC, Etheridge SL, Arnett TR, Genever PG. Wnt signaling in osteoblasts regulates expression of the receptor activator of NF κ B ligand and inhibits osteoclastogenesis in vitro. *J Cell Sci.* 2006; 119: 1283-96.

Stewart K, Walsh S, Screen J, Jefferiss CM, Chainey J, Jordan GR, et al. Further characterization of cells expressing STRO-1 in cultures of adult human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res.* 1999; 14: 1345e56.

Susanto H, Nesse W, Dijkstra PU, Agustina D, Vissink A, Abbas F. Periodontitis prevalence and severity in Indonesians with type 2 diabetes. *J Periodontol.* 2011 Apr; 82(4): 550-57.

Talhout R, Schulz T, Florek E, van Benthem J, Wester P, Opperhuizen A. Hazardous compounds in tobacco smoke. *Int J Environ Res Public Health.* 2011; 8: 613-28.

Taut AD, Jin Q, Chung JH, Galindo-Moreno P, Yi ES, Sugai JV, et al. Sclerostin antibody stimulates bone regeneration after experimental periodontitis. *J Bone Miner Res.* 2013 Nov; 28(11): 2347-56.

Taylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M, Knowler WC, et al. Non-insulin dependent diabetes mellitus and alveolar bone loss progression over 2 years. *J Periodontol.* 1998; 69: 76-83.

Teles FRF, Teles RP, Siegelin Y, Paster B, Haffajee AD, Socransky SS. RNA-oligonucleotide quantification technique (ROQT) for the enumeration of uncultivated bacterial species in subgingival biofilms. *Mol Oral Microbiol.* 2011; 26: 127-39.

Thomson WM, Shearer DM, Broadbent JM, Foster Page LA, Poulton R. The natural history of periodontal attachment loss during the third and fourth decades of life. *J Clin Periodontol.* 2013 Jul; 40(7): 672-80.

Troen BR. Molecular mechanisms underlying osteoclast formation and activation. *Exp Gerontol.* 2003; 38: 605-14.

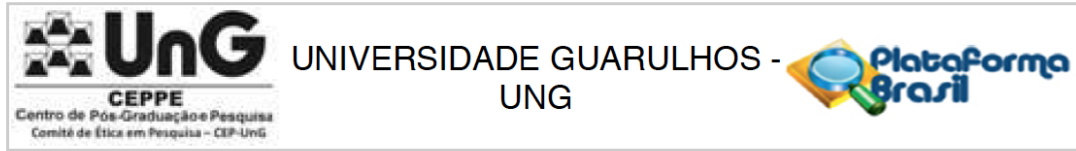
Vouros ID, Kalpidis CD, Chadjipantelis T, Konstantinidis AB. Cigarette smoking associated with advanced periodontal destruction in a Greek sample population of patients with periodontal disease. *J Int Acad Periodontol.* 2009; 11: 250-57.

Wang SY, Liu YY, Ye H, Guo JP, Li R, Liu X, et al. Circulating Dickkopf-1 is correlated with bone erosion and inflammation in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2011 May; 38(5): 821-27.

Xu JL, Meng HX, He L, Wang XE, Zhang L. The Effects of Initial Periodontal Therapy on the Serum Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand/Osteoprotegerin System in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Periodontitis. *J Periodontol.* 2016 Mar; 87(3): 303-11.

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998 Mar 31; 95(7): 3597-02.

ANEXO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência dos fatores de risco para periodontite crônica no perfil imunoinflamatório, nos antagonistas da sinalização Wnt/ β -catenina e no perfil microbiológico subgingival

Pesquisador: Poliana Mendes Duarte

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 25526913.8.0000.5506

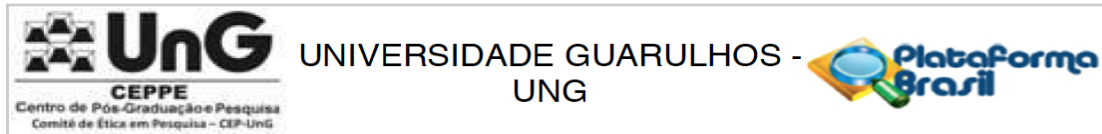
Instituição Proponente: Universidade Guarulhos - UNG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 518.426

Data da Relatoria: 28/01/2014



Continuação do Parecer: 518.426

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto está apto a ser desenvolvido.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

A pesquisa pode ser iniciada. Esta aprovação é válida pelo período previsto no cronograma. Enviar relatório final, via Plataforma Brasil até 31 de janeiro de 2017.

GUARULHOS, 30 de Janeiro de 2014

Assinador por:
Jumara Sílvia Van De Velde
 (Coordenador)