



Mestrado em Odontologia
Área de Concentração em Implantodontia

CRISTIANA FERNANDES PLUTARCO NOGUEIRA

**NÍVEIS DE RNA MENSAGEIRO DE DKK1 EM DIFERENTES
CONDIÇÕES PERIODONTAIS E PERI-IMPLANTARES**

Guarulhos
2020

CRISTIANA FERNANDES PLUTARCO NOGUEIRA

**NÍVEIS DE RNA MENSAGEIRO DE DKK1 EM DIFERENTES
CONDIÇÕES PERIODONTAIS E PERI-IMPLANTARES**

Dissertação apresentada à
Universidade Univeritas UNG para para obtenção
do título de Mestre em Odontologia.
Área de Concentração: Implantodontia
Orientadora: Profa. Dra. Tamires Szeremeske de Miranda
Co-orientador: Prof. Dr. Jamil Awad Shibli

Guarulhos
2020

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas Fernando Gay da Fonseca

N778n

Nogueira, Cristiana Fernandes Plutarco

Níveis de RNA mensageiro de DKK1 em diferentes condições periodontais e peri-implantares. / Cristiana Fernandes Plutarco Nogueira. - 2020.

27 f.; 31 cm.

Orientadora: Prof^a. Dra. Tamires Szeremeske de Miranda

Co-orientador: Prof^o. Dr. Jamil Awad Shibli

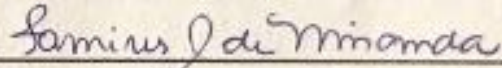
Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Centro de Pós-Graduação e Pesquisa e Extensão, Universidade Guarulhos, Guarulhos, SP, 2020.


1. Peri-implantite 2. Periodontite 3. Wnt/ β -catenina 4. DKK1 I. Título II. Miranda, Tamires Szeremeske de (Orientadora). III. Universidade Guarulhos

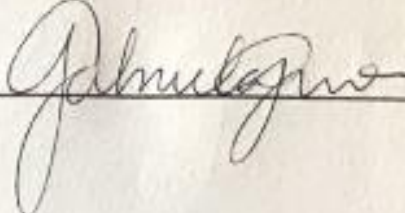
CDD. 617.6

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, intitulada “NÍVEIS DE RNA MENSAGEIRO DOS INIBIDORES DA VIA WNT/ β -CATENINA NA PERI-IMPLANTITE” em sessão pública realizada em 14 de fevereiro de 2020, considerou a candidata CRISTIANA FERNANDES PLUTARCO NOGUEIRA aprovada.

COMISSÃO EXAMINADORA:

1. Profa. Dra. Tamires S. de Miranda (UNG) 

2. Profa. Dra. Daiane Fermiano Brunale (UMC) 

3. Profa. Dra. Gabriela Giro (UNG) 

Guarulhos, 14 de fevereiro de 2020.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Afrânio e Inês, que sempre acreditaram no meu potencial e ficaram sempre ao meu lado com muito amor e carinho. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, pois nos momentos mais difíceis de minha vida, ele permitiu que eu tomasse a direção correta.

Ao meu pai e minha mãe pelo amor, cuidado e dedicação. Obrigada por tudo! AMO MUITO VOCÊS!

Agradeço (em memória) minha querida avó Mimosa Mota, de onde estiver sei que torce por mim.

Às minhas filhas Julia e Giovanna que amo tanto.

Aos professores do Centro de Pós-Graduação e Pesquisa do Curso de Odontologia da UnG, por contribuírem com seus ensinamentos de excelência.

Agradecimento especial ao prof. Doutor Sérgio Jaime pois através de sua orientação encontrei essa equipe maravilhosa de professores incluindo prof. Doutor Jamil Shibli.

Aos funcionários da UnG pela convivência e profissionalismo.

Aos pacientes pela paciência e cooperação.

Agradeço a todas as pessoas, que direta ou indiretamente contribuíram na elaboração desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo apoio ao programa de Pós-graduação em Odontologia.

RESUMO

A periodontite e peri-implantite é uma doença infecciosa causada pelo biofilme dental que resulta em perda progressiva do osso de suporte do dente e implante. Diversos estudos têm buscado uma melhor compreensão dos processos moleculares e celulares envolvidos na perda de inserção e óssea na periodontite. No entanto, poucas investigações têm sido feitas em relação a peri-implantite, principalmente quando relacionado com o possível envolvimento do antagonista da via Wnt/ β -catenina (DKK1). Sendo assim, o principal objetivo do presente estudo foi avaliar os níveis de RNAm de DKK1 em tecidos peri-implantares saudáveis e doentes. Como avaliação secundária, objetivou-se comparar os níveis de RNAm de DKK1 entre os tecidos periodontais e peri-implantares. Foram selecionados 40 participantes adultos (>35 anos) com periodontite generalizada, saúde periodontal, peri-implantite ou saúde peri-implantar, os quais foram divididos nos seguintes grupos: Grupo I- 11 indivíduos com peri-implantite; Grupo II- 14 indivíduos com periodontite; Grupo III- 6 indivíduos com saúde peri-implantar e Grupo IV- 9 indivíduos com saúde periodontal. Amostras de tecidos periodontais e peri-implantares foram coletados de pelo menos um sítio por paciente e analisados quanto aos níveis de RNAm de DKK1 por PCR em tempo real. Não houve diferenças estatisticamente significante nos níveis de mRNA de DKK1 entre os quatro grupos ($p > 0,05$). Em conclusão, os tecidos periodontais e peri-implantares, em condições de saúde ou doença, não apresentaram diferenças nos níveis de mRNA de DKK1.

Palavras-chaves: Peri-implantite; Periodontite; Wnt/ β -catenina; DKK1.

ABSTRACT

Periodontitis and peri-implantitis is an infectious disease caused by dental biofilm that results in progressive loss of the supporting bone of the tooth and implant. Several studies have sought a better understanding of the molecular and cellular processes involved in insertion and bone loss in periodontitis. However, few investigations have been made regarding a peri-implant, mainly when related or with possible antagonistic effects via Wnt / β -catenin (DKK1). Therefore, the main objective of the present study was to assess DKK1 mRNA levels in peri-implant and impaired tissues. As a secondary evaluation, it aims to compare DKK1 mRNA levels between periodontal and peri-implant tissues. Forty adult participants (> 35 years old) with generalized periodontics, periodontal health, peri-implantitis or peri-implant health were selected, which were divided into the following groups: Group I-11, with peri-implantitis; Group II-14 individuals with periodontitis; Group III- 6 individuals with peri-implant health and Group IV- 9 individuals with periodontal health. Samples of periodontal and peri-implant tissues were collected at least one site per patient and analyzed up to DKK1 mRNA levels by real-time PCR. There were no statistically significant differences in DKK1 mRNA levels between four groups ($p > 0.05$). In conclusion, periodontal and peri-implant tissues, in health or disease conditions, do not show differences in DKK1 mRNA levels.

Keywords: peri-implantitis; Periodontitis; Wnt / β -catenin; DKK1.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Doença periodontal e Peri-implantar.....	10
1.2. Via Wnt/ β -catenina.....	11
1.3. Justificativa.....	14
2. PROPOSIÇÃO	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. População de estudo.....	16
3.2. Critérios de inclusão e exclusão.....	16
3.3. Delineamento experimental.....	18
3.4. Exame clínico e radiográfico.....	18
3.5. Avaliação por expressão gênica.....	19
3.5. Análises estatísticas.....	22
4. RESULTADO	23
5. DISCUSSÃO	24
6. CONCLUSÃO	26
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1 Doença periodontal e Peri-implantar

A cavidade oral possui uma rica e diversificada microbiota e seu equilíbrio permite um estado de saúde. O biofilme é uma “comunidade bacteriana” que agrega diversas espécies, as quais se aderem em superfícies lisas e não descamativas. Contudo alterações na composição do biofilme, como o aumento da quantidade dos microorganismos patogênicos leva á uma resposta inflamatória do hospedeiro ocasionando destruição dos tecidos de proteção e sustentação periodontal e peri-implantar, gerando assim um estado de doença (MARSH, 2003). Dessa forma o biofilme bacteriano é considerado o principal fator etiológico das doenças periodontais e peri-implantares (KUULA et al., 2008).

Em 1998, Socransky et al. agruparam as espécies bactérias em complexos de acordo com a patogenicidade. As espécies compatíveis com hospedeiro e que são as primeiras colonizadoras foram agrupadas nos complexos amarelo, roxo, verde e dos *Actinomyces ssp.*, já as espécies patogênicas foram agrupadas no complexo laranja e vermelho. Sendo o complexo vermelho composto pelas principais espécies relacionadas as doenças periodontais: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*. Em relação as doenças peri-implantares, alguns estudos demonstram que do ponto de vista microbiológico, o biofilme da peri-implantite se assemelha ao da periodontite, o que implica no maior risco de doença peri-implantar em pacientes com doença periodontal (MOMBELLI et al., 1987; MOMBELLI et al., 2011). As três bactérias pertencentes ao complexo vermelho e consideradas periodontopatogênicas podem ser encontradas em altos níveis na peri-implantite (SHIBLI et al., 2008; AMMANN et al.; 2013).

Assim como a doença periodontal, a lesão nos tecidos peri-implantares pode ser classificada em dois tipos. Quando se limita a tecidos moles circundantes aos implantes, os quais apresentam sangramento a sondagem sem perda de inserção óssea, é denominada mucosite. No entanto, quando o estímulo infeccioso persiste e a inflamação torna-se exacerbada, ocorre o comprometimento não só dos tecidos moles, mas também do tecido ósseo ao redor do implante, passando a ser denominada de peri-implantite (ZITZMANN-BERGLUNDTH, 2008; ALGRAFFE et al., 2011). Dessa forma a

gingivite se assemelha com as características clínicas da mucosite, assim como a periodontite com a peri-implantite. Conseqüentemente, ambas as doenças se não diagnosticada e devidamente tratadas, podem resultar em progressiva perda óssea que será a responsável pela perda do dente ou implante (CHARALAMPAKIS et al., 2011).

A Peri-implantite possui diversas similaridades com a periodontite e estudos periodontais tem auxiliado no entendimento dos distúrbios peri-implantares uma vez que as doenças peri-implantares ainda são pouco estudadas (BELIBASAKIS, 2014). Contudo, existem diferenças fundamentais entre as duas patologias, sendo uma das principais, a falta do ligamento periodontal nos implantes dentários (HEITZMAYFIELD et al., 2010). Pela sua função de barreira física, a ausência do ligamento possibilita uma penetração mais profunda de bactérias e uma maior susceptibilidade à infecções endógenas (BELIBASAKIS, 2014). Outra diferença, se refere ao menor suprimento sanguíneo, que afeta a disponibilidade de nutrientes e células do sistema imune, importantes para regular a infecção e os processos inflamatórios, além de uma menor produção de fluido sulcular (DONATH, 1992; BELIBASAKIS, 2014).

1.2 Via Wnt/ β -catenina

A reabsorção óssea é uma das principais características da periodontite e peri-implantite, no entanto, os reais mecanismos pelos quais os hospedeiros respondem aos agentes agressores provocando uma instabilidade no equilíbrio durante a formação e reabsorção óssea em ambas as doenças ainda permanece obscura (HIENZ et al., 2015). As principais células responsáveis pelo metabolismo ósseo são os osteoblastos e osteoclastos. Por muitos anos, a principal via de regulação óssea estudada foi a dos osteoclastos, conhecida como sistema RANKL (Ligante do receptor do ativador do fator nuclear kappa-B) - OPG (osteoprotegerina) - RANK (Receptor do ativador do fator nuclear kappa-B) (LIU & ZANG, 2015). De acordo com a literatura 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 relação a periodontite, diversos estudos demonstraram ao longo dos anos que os níveis de RANKL e a razão RANKL/OPG estão aumentados enquanto os níveis de OPG estão diminuídos quando comparado com indivíduos periodontalmente saudáveis (LIU et al., 2003; CROTTI et al., 2003; BOSTANCI et al., 2007; BELIBASAKIS & BOSTANCI, 2012). Quanto a peri-implantite, os níveis de RANKL e a razão RANKL/OPG também estão aumentados enquanto os de OPG também apresentam-se diminuídos. Um recente estudo (LIU et al., 2019) observaram que a diferenciação dos osteoclastos foi relativamente regulada na presença da infecção dos tecidos periodontais e peri-implantares, e a relação RANKL/OPG foi maior na peri-implantite do que na periodontite. Este estudo também demonstrou que a peri-implantite e a periodontite exibem perfis de expressão de RNAs não codificantes (lncRNA) e mRNA significativamente diferentes, sugerindo que as vias relacionadas à diferenciação dos osteoclastos são comparativamente mais ativas na peri-implantite.

Na procura por melhor entendimento, uma das vias de sinalização intracelular que ativa a atividade dos osteoblastos, a Wnt/ β -catenina, vem sendo estudada em diversas doenças que alteram o metabolismo ósseo, como artrite reumatóide, miolema múltiplo, espondilite anquilosante e osteoporose (ROSSINI et al., 2013). No entanto, na área da odontologia, a via Wnt/ β -catenina têm sido pobremente estudada (DUAN & BONEWALD, 2016).

As Wnts formam uma larga família de glicoproteínas secretadas capazes de ativar a β -catenina, uma proteína citoplasmática e nuclear que atua como ativador e regulador da transcrição dos principais genes responsáveis pela proliferação e diferenciação das células ósseas. A Wnt/ β -catenina chamada também de via canônica é um importante regulador da proliferação de osteoblastos, além disso evidências também sugerem seu envolvimento nas homeostase das células osteoclásticas (QIANG et al., 2010). A β -catenina regula indiretamente a osteoclastogenese pelo aumento da proporção OPG/RANKL reduzindo assim a atividade dos osteoclastos (GLASS et al., 2005).

A proteína 1 relacionada ao dickkopf (DKK1) está entre os mais importantes inibidores dessa via de sinalização intracelular, impedindo a translocação nuclear da β -catenina pela interferência das interações entre as proteínas Wnt e seus receptores, suprimindo a formação óssea e contribuindo para inflamação (CHAE et al., 2016). De

fato, os dados mais interessantes do papel da via Wnt/ β -catenina na regulação da homeostase óssea são suportados por estudos onde observaram que DKK1 contém a formação óssea (GLASS et al., 2005; GLASS & KARSENTY, 2006; BARON & KNEISSEL, 2013). Estes estudos demonstraram que 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). Interessantemente, 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 seu inibidor DKK1 podem contribuir indiretamente para a perda de tecido ósseo (ROSSINI et al., 2013).

Na periodontite, em um estudo em humanos, foi observado que os níveis de DKK1 estão aumentados em nível de proteína e RNA mensageiro (RNAm) nos tecidos gengivais de sítios doentes em indivíduos com periodontite crônica, quando comparados aos indivíduos sem periodontite. No entanto em níveis séricos de DKK1 não houve diferenças significativas. Além disso, maiores níveis teciduais de TNF-alfa ocorreram paralelamente ao aumento de DKK1, sugerindo o envolvimento de citocinas pró-inflamatórias com as funções de DKK1. Esses resultados foram os primeiros indícios da possível atuação de DKK1 na periodontite em humanos (NAPIMOGA et al., 2014). Três anos mais tarde, um estudo do nosso grupo de pesquisa demonstrou que os níveis de DDK1 estavam aumentados localmente em pacientes com periodontite associado ao diabetes tipo 2, hábito de fumar e ambas as condições. O DM, sozinho ou combinado com o tabagismo, foi o principal fator que influenciou as correlações DKK1 com os fatores relacionados ao metabolismo ósseo e com os patógenos periodontais (MIRANDA et al., 2017).

Na implantodontia, outro importante inibidor da via Wnt/ β -catenina, esclerostina (SOST), foi avaliado até o presente momento. Um estudo em 2014 sugeriu que sRANKL, OPG e SOST apresentam um importante papel como biomarcadores para o prognóstico na peri-implantite. As concentrações de RANK, sRANKL, OPG e SOST aumentaram significativamente em pacientes com peri-implantite em comparação com pacientes com tecidos peri-implantares saudáveis. Quando comparado peri-implantite e mucosite foram encontrados níveis significativamente mais altos de SOST em amostras de peri-implantite. Já em comparações entre mucosite e tecidos peri-implantares

saudáveis, os níveis de RANK e catepsina-K foram significativamente maiores na mucosite (RAKIC et al., 2014). Recente, outro estudo avaliou os níveis de alguns mediadores envolvidos no metabolismo ósseo. O grupo com peri-implantite apresentou maiores níveis SOST, indutor fraco de apoptose relacionado ao TNF (TWEAK), RANKL e OPG quando comparado ao grupo de saúde peri-implantar (YAKAR et al., 2019).

1.3 Justificativa

Em resumo, a peri-implantite é uma doença infecciosa mediada por biofilme que resulta em perda progressiva do osso de suporte do implante. Em comparação com a periodontite, a peri-implantite geralmente é mais agressiva, com progressão comparativamente rápida e resultados de tratamento menos previsíveis, especialmente em casos mais avançados. Diversos estudos têm buscado uma melhor compreensão dos processos moleculares e celulares envolvidos na perda de inserção e óssea na periodontite e peri-implantite. No entanto, até o momento nenhum estudo investigou os níveis de DKK1 nos tecidos peri-implantares.

2. PROPOSIÇÃO

Os objetivos do presente estudo foram:

Avaliar os níveis de RNAm do inibidor da via Wnt/ β -catenina (DKK1) em tecidos peri-implantares saudáveis e doentes.

Comparar os níveis de RNAm de DKK1 entre os tecidos periodontais e peri-implantares.

MATERIAL E MÉTODOS

População de estudo

Foram selecionados 40 participantes adultos (>35 anos), do gênero masculino ou feminino com periodontite generalizada, saúde periodontal, peri-implantite ou saúde peri-implantar que procuraram atendimento nas clínicas odontológicas da Universidade Univeritas UNG. Os participantes foram informados verbalmente e por escrito dos objetivos, de seus riscos e benefícios por uma pessoa não envolvida no estudo. Os participantes que concordaram em participar do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), responderam à um questionário de anamnese e receberam a terapia periodontal e peri-implantar gratuitamente, estando de acordo com as diretrizes e normas do Conselho Nacional de Saúde (Resolução n° 466/2012). O projeto foi aprovado ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Guarulhos.

3.2 Critérios de inclusão e exclusão

3.2.1 Critérios gerais de exclusão

Critérios considerados para todos os grupos:

- ter utilizado antibióticos nos 6 meses que antecederam o estudo;
- fazer uso de corticoides, anti-inflamatórios não-esteróides, imunossupressores, moduladores dos receptores de estrógeno bem como medicamentos que possam influenciar o metabolismo ósseo (alendronato, calcitonina e outros) durante os 6 meses anteriores ao estudo;
- apresentar periodontite generalizada;
- ser fumante ou ex-fumante (últimos 5 anos);
- portadores de diabetes; osteoporose, desordens imunes, hepatite ou outras desordens sistêmicas que possam comprometer a resposta de defesa do indivíduo;
- estar grávida ou lactante;
- possuir próteses que dificultassem o acesso à sondagem.

3.2.1 Critérios de inclusão específicos

A) Indivíduos com peri-implantite

Baseado em estudo prévio (MELO et al., 2005), os indivíduos incluídos apresentaram as seguintes condições clínicas:

sangramento à sondagem e/ou supuração, profundidade de sondagem maior que 4mm; perda óssea radiográfica maior que 3mm, no mínimo 50% de remanescente ósseo peri-implantar (caso contrário, este implante foi considerado perdido);

apresentar pelo menos uma prótese implanto-suportada, utilizando implantes de superfície lisa (titânio comercialmente puro), hexágono externo e rosqueáveis, sob função há no mínimo 1 ano, acometido pela peri-implantite (caso o indivíduo apresentasse mais que um implante acometido pela peri-implantite, apenas um implante foi avaliado);

ausência de mobilidade, quebra de parafusos ou soltura dos componentes protéticos junto às próteses implanto-suportadas, na tentativa de minimizar a influência de possíveis traumas oclusais;

apresentar boas condições de saúde geral (não ter problemas cardíacos, imunológicos, diabetes, etc).

B) Indivíduos com periodontite

Foram selecionados indivíduos que atenderam inicialmente aos critérios indicados à seguir, mas que após o tratamento periodontal convencional de raspagem e alisamento radicular, permaneceram com sítios com profundidade de sondagem maior ou igual a 5mm, com sangramento à sondagem.

Mínimo 15 dentes, excluindo-se os terceiros molares e dentes indicados para extração;

Com periodontite estágios III e IV, graus A e B, apresentando no mínimo 30% dos sítios com profundidade de sondagem e nível clínico de inserção maior ou igual a 5mm.

C) Indivíduos clinicamente sadios

Foram selecionados indivíduos que apresentaram em todos os sítios profundidades de sondagem até 4mm, e nível clínico de inserção até 4mm, sem sangramento à sondagem, com indicação de cirurgias reconstrutivas/corretivas (Grupo III), e gengivectomia ou aumento de coroa clínica (Grupo IV).

3.3 Delineamento experimental

Inicialmente, todos os indivíduos foram submetidos à anamnese, exame clínico periodontal e exame radiográfico. Após a realização das coletas para análise imunológica todos receberam profilaxia profissional para remoção do biofilme supragengival e adequação do meio, assim como instrução de higiene oral nos dentes e implantes.

Foram formados quatro grupos de indivíduos:

Grupo I: 11 indivíduos com peri-implantite

Grupo II: 14 indivíduos com periodontite

Grupo III: 6 indivíduos com saúde peri-implantar

Grupo IV: 9 indivíduos com saúde periodontal

3.4 Exame clínico e radiográfico

Os parâmetros clínicos avaliados em implantes e dentes foram:

Presença (1) ou ausência (0) de biofilme bacteriano visível,

Presença (1) ou ausência (0) de sangramento marginal,

Presença (1) ou ausência (0) de sangramento à sondagem,

Presença (1) ou ausência (0) de supuração,

Profundidade de sondagem (mm) – caracterizada pela distância da margem peri-implantar ou margem gengival até o fundo da bolsa,

Nível clínico de inserção (mm) – caracterizada pela distância de ponto fixo

previamente determinado (junção conector/implante ou barra em casos de overdentures ou junção cimento-esmalte) até o fundo da bolsa.

O exame peri-implantar foi realizado por um examinador previamente treinado e calibrado. As medidas de profundidade de sondagem e nível clínico de inserção foram determinadas utilizando uma sonda periodontal manual do tipo Carolina do Norte (PCPUNC 15 Hu-friedy Mfg Co Inc. Chigago IL, Estados Unidos América). As mensurações foram realizadas em 6 faces do implante ou dente: mesiovestibular, médio-vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual, médio-lingual e distolingual. A metodologia empregada para a calibração tanto para a mensuração realizada nos dentes remanescentes quanto para os implantes osseointegrados foi preconizada por Araújo et al. (2003) no qual se avaliou o erro padrão da medida (e.p.m) e o erro médio percentual

(e.m.p) para os parâmetros clínicos contínuos (profundidade de sondagem, nível clínico de inserção). O e.p.m e e.m.p intraexaminador obtido para os dentes remanescentes foram respectivamente de 0,22mm e 5,2% para a profundidade de sondagem, 0,30mm e 6,33% para nível clínico de inserção. Já os valores de e.p.m e e.m.p intra-examinador obtidos para os implantes foi de 0,09mm e 2,2% para a profundidade de sondagem e 0,08mm e 3,99% para nível clínico de inserção. As variáveis categóricas (índice de placa, sangramento marginal, sangramento a sondagem e supuração) considerando somente a presença ou ausência do parâmetro clínico foram obtidas, para dentes e implantes, a média do nível de concordância utilizando o teste Kappa Light no valor de 89%.

Os exames radiográficos foram realizados por meio de filmes do tipo Ektaspeed (Kodak, Eastman, CO, Estados Unidos da América) utilizando-se posicionadores para a técnica do paralelismo adaptado para cada paciente com o auxílio de 19 silicone de condensação. As radiografias obtidas foram processadas pelo método tempo-temperatura e logo após digitalizadas por meio de câmera digital (Canon EOS 300D, Tokyo, Japão). Para obtenção da perda óssea vertical, foram realizadas as mensurações da distância entre o conector protético e a crista óssea alveolar peri-implantar, utilizando-se o software Image Tool 3.0 (<http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>). Estas mensurações foram realizadas por um único examinador previamente treinado.

3.5 Avaliação por Expressão gênica

3.5.1 Seleção dos sítios para coleta: peri-implantar, periodontal e saudável

O sítio peri-implantar de maior profundidade de sondagem com presença de sangramento e ou supuração foi selecionado para as coletas de amostras de tecido peri-implantar destinados às análises imunológicas (Grupo I). Quando dois ou mais sítios no mesmo implante apresentavam a mesma profundidade de sondagem, sangramento e ou supuração, o sítio mais anterior foi o escolhido. A coleta foi realizada no momento do tratamento cirúrgico peri-implantar.

Com objetivo de obter biópsia de uma área representativa do processo inflamatório periodontal (Grupo II), o tecido gengival foi removido ao redor de dentes com periodontite avançada com bolsas >5mm, com sangramento a sondagem e submetidos a cirurgia de raspagem em campo aberto.

As coletas em indivíduos com saúde peri-implantar (Grupo III) foram realizadas em situações clínicas de indicação de cirurgias reconstrutivas/corretivas ou em áreas de implantes saudáveis ao lado de regiões que receberiam um novo implante.

Para os indivíduos com saúde periodontal (Grupo IV), as coletas de tecido foram realizadas em situações clínicas de indicação de gengivectomia ou aumento de coroa clínica.

3.5.2 Extração do RNA

Após a remoção, os tecidos gengivais foram acondicionados em uma solução de RNAlater® (Ambion Inc., Austin, TX), para evitar a degradação do RNA. As amostras permaneceram incubadas a 4°C durante 24 horas e em seguida foram armazenadas a -20°C até o momento da extração. Primeiramente, a solução de RNA later foi aspirada e o tecido foi acondicionado em nitrogênio líquido para trituração. A amostra triturada foi então colocada no reagente TRIZOL (Gibco BRL, Life Technologies, Rockville, MD, USA), homogeneizada durante 30 segundos e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. Após este período, foi adicionado clorofórmio (Sigma, St. Louis, MO, USA), as amostras foram agitadas em vórtex e centrifugadas a 11.500rpm por 15 minutos em uma temperatura de 4°C. A porção aquosa foi transferida para outro tubo, no qual foi adicionado isopropanol, agitado, incubado por 20 minutos a uma temperatura de -20°C e centrifugado da mesma forma como descrito acima. Depois de finalizado esse processo, foi formado um precipitado o qual foi lavado com etanol gelado a 75% e seco a temperatura ambiente. As amostras de RNA foram subsequentemente resuspensas em aproximadamente de 30 a 50µL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e armazenadas a -70°C. Finalmente, a concentração de RNA foi determinada por meio de um espectrofotômetro. Em seguida, 1 µg do RNA total foi avaliado quanto a sua qualidade por meio de eletroforese em gel de agarose 1%.

3.5.3 Tratamento com DNase

As amostras de RNA total foram tratadas para a eliminação de qualquer resíduo de DNA com DNase (DNA-free™, Ambion Inc., Austin, TX, USA), conforme recomendação do fabricante. Nos tubos contendo o RNA total extraído foi adicionada a solução tampão e a DNase turbo, baseado na concentração de RNA previamente avaliada. Após agitação e centrifugação, os mesmos permaneceram incubados em a 37°C durante 30 minutos. Finalmente, foi acrescentado o inativador e a solução foi

agitada e centrifugada. O RNA total foi novamente quantificado por meio de um espectrofotômetro.

3.5.4 Transcrição reversa

Cerca de 2 µg da amostra de RNA total livre de DNA foi utilizado para a síntese do cDNA. Para isto, as reações foram realizadas para um volume final de 40 µL utilizando o kit First-strand cDNA synthesis (Roche Diagnostic Co., Indianápolis, IN, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Inicialmente, as amostras foram incubadas por 10 minutos a 25°C e, em seguida, por 60 minutos a 42°C. Concluída a segunda etapa de incubação, as amostras foram incubadas por 5 minutos a 95°C e então por 5 minutos a 4°C para resfriamento. Os reagentes utilizados e suas respectivas concentrações foram: solução tampão (1x), MgCl₂ (5mM), desoxinucleotídeos (1mM), primers randomizados (3,2µg), inibidor de RNase (50U), e transcriptase reversa AMV (20U).

3.5.5 PCR em tempo real (RT-PCR)

1- Desenho dos Primers: Os primers para GAPDH (gene de referência) e DKK1 foram desenhados com o auxílio de um programa desenvolvido especificamente para elaboração de primers para o LightCycler (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Todos os primers foram verificados quanto a sua especificidade por meio da verificação da curva de Melting utilizando-se sempre controles positivos e negativos. A tabela 1 apresenta a sequência dos primers, perfil de amplificação e tamanho dos produtos utilizados neste estudo.

Tabela 1. Desenho e condições de amplificação dos primers.

Gene	Sequência	Perfil de amplificação [temperatura (°C)/tempo (s)]	Tamanho do produto (bp)
DKK1	5' CTGTCCTGAAAGAAGGTCAAGT 3' TGTGAAGCCTAGAAGAATTACTGG	95/10, 56/5, 72/7	150
GAPDH	5' CTGAGTACGTCGTGGAGTC 3' TGATGATCTTGAGGCTGTTGTC	95/10, 56/5, 72/7	187

2- Otimização das reações: A eficiência das reações para cada gene foi otimizada anteriormente ao início das reações propriamente ditas. Concentrações variando de 2 a 5mM de cada par de primers foram utilizadas para se determinar em quais condições a reação apresentava a melhor eficiência, conforme sugestões do fabricante do equipamento, escolheu-se a de 5 mM para os três primers.

3- Reações de RT-PCR (etapa a ser realizada): As reações de RT-PCR foram realizadas com o sistema LightCycler (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), utilizando o kit FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). O perfil das reações foi determinado seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante do equipamento. A água foi utilizada como controle negativo, e o produto das reações foi quantificado utilizando-se o programa do próprio fabricante (LightCycler Relative Quantification Software -Roche Diagnostics GmbH). Os níveis de expressão do gene GAPDH foram utilizados como referência (housekeeping) para a normalização dos valores.

3.6 Análises estatísticas

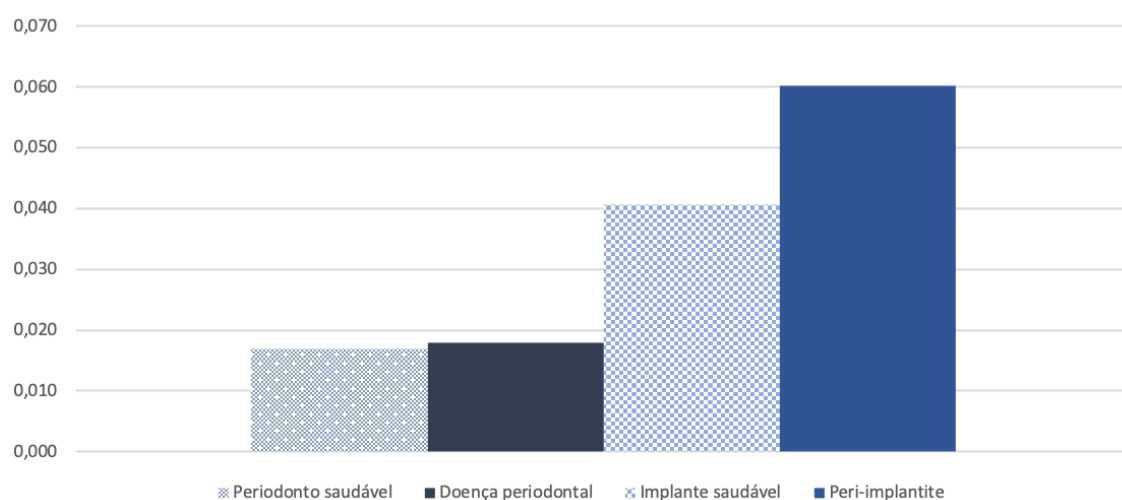
Os dados foram submetidos à um teste de normalidade, Kolmogorov-Smirnov, para escolha de métodos estatísticos paramétricos ou não-paramétricos. Foram obtidas médias dos parâmetros clínicos para cada dente ou implante, em seguida para cada grupo experimental. Os dados clínicos e de expressão gênica foram submetidos ao teste Kruskal-Wallis. Para todas as avaliações será adotado um nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

A Tabela 2 apresenta os dados demográficos clínicos de cada grupo.

O gráfico 1 apresenta os níveis de mRNA de DKK1 em todos os grupos experimentais. Não houve diferenças estatisticamente significante nos níveis de mRNA de DKK1 entre os quatro grupos ($p > 0,05$).

Gráfico 1. Níveis de mRNA de DKK1 nos grupos experimentais.



* Teste Kruskal-Wallis ($p > 0,05$)

5. DISCUSSÃO

Este estudo avaliou os níveis do inibidor da sinalização Wnt / β -catenina, DKK1, em pacientes com diferentes condições periodontais, alocados em quatro grupos distintos: saúde periodontal, periodontite, saúde peri-implantar e peri-implantite. De acordo com os resultados, inesperadamente os níveis de DKK1 não diferiu entre os quatro grupos.

Até o presente momento, na implantodontia, o único inibidor da via Wnt / β -catenina avaliado por alguns estudos é a esclerostina (SOST). Um estudo em 2014 sugeriu que sRANKL, OPG e SOST apresentam um importante papel como biomarcadores para o prognósticos na peri-implantite. As concentrações de RANK, sRANKL, OPG e SOST aumentaram significativamente em pacientes com peri-implantite em comparação com pacientes com tecidos peri-implantares saudáveis. Quando comparado peri-implantite e mucosite foram encontrados níveis significativamente mais altos de SOST em amostras de peri-implantite. Já em comparações entre mucosite e tecidos peri-implantares saudáveis, os níveis de RANK e catepsina-K foram significativamente maiores na mucosite (RAKIC et al., 2014). Recente, outro estudo avaliou os níveis de alguns mediadores envolvidos no metabolismo ósseo. O grupo com peri-implantite apresentou maiores níveis SOST, indutor fraco de apoptose relacionado ao TNF (TWEAK), RANKL e OPG quando comparado ao grupo de saúde peri-implantar (YAKAR et al., 2019). Uma possível explicação para nossos resultados, é que talvez o SOST tenha um papel maior como antagonista da sinalização de Wnt / β -catenina nas infecções, uma vez que, existem poucas evidências sobre o papel dos antagonistas da sinalização de Wnt / β -catenina nas infecções. A estimulação de diferentes tipos de células por vírus ou LPS induziu a expressão de DKK1 (Butler et al. 2013, Orellana et al. 2014, Zhang et al. 2017). Por outro lado, a infecção por *Rickettsia conorii* desregulou a DKK1 derivada do endotélio, provavelmente como mecanismo pelo qual essa espécie escapa da resposta imune nos locais infectados (Astrup et al. 2012).

Além disso, nem sempre o produto final do mRNA será a proteína traduzida, estudos que avaliaram a concordância entre as expressões de proteínas e RNA encontraram ampla variabilidade, provavelmente devido às sensibilidades tecnológicas e às reais diferenças biológicas entre a transcrição e a abundância de proteínas (Pascal et al. 2008).

A principal força deste estudo é que ele fornece as primeiras informações sobre os níveis de mRNA de DKK1 em tecidos peri-implantares. Este estudo também tem limitações. Um pequeno número de amostras foram avaliadas, e devido à sua natureza transversal, a consequência dos níveis alterados de DKK1 a longo prazo é perdida. Estudos mecanísticos adicionais são necessários para elucidar o papel de DKK1 na periodontite e na peri-implantite.

6. CONCLUSÃO

Os tecidos periodontais e peri-implantares, em condições de saúde ou doença, não apresentaram diferenças nos níveis de mRNA de DKK1.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Algraffe H, Borumandi F, Cascarini L. Per-implantitis. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2011; 50(8): 689-94.
- Ammann TW, Bonstanci N, Belibasakis GN, Thuruleer T. Validation of a quantitative real time PCR assay and comparison with fluorescence microscopy and selective agar plate counting for species specific quantification of an in vitro subgingival biofilm model. *J Periodontol Res.* 2013; 48(4): 517-26.
- Araujo MW, Hovey KM, Benedek JR, Grossi SG, Dorn J, Wactawski-Wende J, Genco RJ, Trevisan M. Reproducibility of probing depth measurement using a constant-force electronic probe: analysis of inter- and intraexaminer variability. *J Periodontol.* 2003; 74: 1736-1740.
- Astrup E, Lekva T, Davì G, Otterdal K, Santilli F, Oie E, Halvorsen B, Damås JK, Raouf D, Vitale G, Olano JP, Ueland T, Aukrust P. A complex interaction between *Rickettsia conorii* and Dickkopf-1--potential role in immune evasion mechanisms in endothelial cells. *PLoS One.* 2012; 7:e43638.
- Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med.* 2013 Feb; 19(2): 179-92.
- Belibasakis GN, Bostanci N. The RANKL-OPG system in clinical periodontology. *J Clin Periodontol.* 2012 Mar; 39(3): 239-48.
- Belibasakis GN. Microbiological and immunopathological aspects of periimplants diseases. *Arch Oral Bio.* 2014; 59(1):69-72
- 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.
- Butler JS, Dunning EC, Murray DW, Doran PP, O'Byrne JM. HIV-1 protein induced modulation of primary human osteoblast differentiation and function via a Wnt/ β -catenin-dependent mechanism. *J Orthopaedic Res.* 2013; 31:218-26.
- Charalampakis G, Rabe P, Leonhardt A, Dahlien G A follow up study of periimplantitis cases after treatment. *J Clin Periodontol* 2011; 38: 864-871
- Chae WJ, Ehrlich AK, Chan PY, Teixeira AM, Henegariu O, Hao L, Shin JH, Park JH, Tang WH, Kim ST, Maher SE, Goldsmith-Pestana K, Shan P, Hwa J, Lee PJ, Krause DS, Rothlin CV, McMahon-Pratt D, Bothwell AL. The Wnt Antagonist

Dickkopf-1 Promotes Pathological Type 2 Cell-Mediated Inflammation. *Immunity*. 2016 Feb 16; 44(2):246-58.

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.

Donath K. Pathogenesis of both pocket formation around dental implants. *J Dent Assoc S Afr*. 1992; 47(5): 204-208.

Duarte PM, de Lorenzo Abreu L, Vilela A, Feres M, Giro G, Miranda TS. Protein and mRNA detection of classic cytokines in corresponding samples of serum, gingival tissue and gingival crevicular fluid from subjects with periodontitis. *J Periodontal Res*. 2019 Apr; 54(2):174-179.

Duan P, Bonewald LF. The role of the wnt/ β -catenin signaling pathway in formation and maintenance of bone and teeth. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2016; 77(Pt A), 23-9.

Glass DA 2nd, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, Taketo MM, Long F, McMahon AP, Lang RA, Karsenty G. 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.

Hienz SA, Paliwal S, Ivanovski S. Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis. *J Immunol Res*. 2015; 2015:615486.

Heitz-Mayfield L J Peri implant disease: diagnosis and risk indicators. *J Clin. Periodontol*. 2008 Set; 35 (8 Suppl): 292-304.

Kuula H, Salo T, Pirila E, Hagstrom J, Luomanen M Gutierrez Fernandez A et al Human betadefensin 1 and 2 and matrix metalloproteinase 25 and 26 expression in chronic and aggressive periodontitis and peri implantitis. *Arch Oral Bio*. 2008; 53(2): 175-86

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.

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*. 2015; 11:3212-18.

Liu Y, Liu Q, Li Z, Acharya A, Chen D, Chen Z, Mattheos N, Chen Z, Huang B. Long non-coding RNA and mRNA expression profiles in peri-implantitis vs periodontitis. *J Periodontal Res.* 2019 Dec; 19.

Marsh PD Are dental diseases examples of ecological catastrophes???. *Microbiology* 2003; 149 (Pt 2): 279-94

Melo L. Avaliação microbiológica, clínica e da matriz metaloproteinase-8 (MMP-8) na peri-implantite (tese). Guarulhos: Universidade Guarulhos; 2005.

Miranda TS, Napimoga MH, Feres M, Marins LM, da Cruz DF, da Silva HDP, Duarte PM. Antagonists of Wnt/ β -catenin signalling in the periodontitis associated with type 2 diabetes and smoking. *J Clin Periodontol.* 2018 Mar; 45(3): 293-302.

Mombelli A, Van O O Sten MA, Shurch E, Jr., L and NP, The Microbiots associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiol. Immune.* 1987; 2(4): 145-51

Mombelli A, Decaillet F. The characteristics of biofilms in peri implant disease. *J Clin. Periodontol* 2011; 38 Suppl 11: 203-13

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.

Orellana JA, Sáez JC, Bennett MV, Berman JW, Morgello S, Eugenin EA. HIV increases the release of dickkopf-1 protein from human astrocytes by a Cx43 hemichannel-dependent mechanism. *Journal of Neurochemistry.* 2014; 128: 752-63.

Pascal LE, True LD, Campbell DS, Deutsch EW, Risk M, Coleman IM, Eichner LJ, Nelson PS, Liu AY. Correlation of mRNA and protein levels: cell type-specific gene expression of cluster designation antigens in the prostate. *BMC Genomics.* 2008; 23: 246.

Qiang YW, Clen Y, Brown N, Hu B, Epstein J, Barlogie B, Shaighnessy JD Jr. Characterization of WNT /beta catenina signalling in osteoclasts in multiple myeloma. *British Journal of Haematology.* 2019; 148:726-38.

Rakic M, Struillou X, Petkovic-Curcin A, Matic S, Canullo L, Sanz M, Vojvodic D. Estimation of bone loss biomarkers as a diagnostic tool for peri-implantitis. *J Periodontol.* 2014 Nov; 85(11):1566-74.

Ren Y, Han X, Ho SP, Harris SE, Cao Z, Economides AN, Fend JQ. Removal of sort or blocking its product sclerotin resumes defects in the periodontitis mouse model The Fase B Journal. 2015; 29:2702-11.

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.

Shibli JA, Melo L, Ferrari DS, Figueiredo LC , Faveri M, Feres M. Composition of supra and sub gingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clin Oral Implants Res.* 2008; 19(10): 975-82

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 signalig in osteoblasts regulates expression of the receptor activator of NFkappaB ligand and inhibits osteoclastogenesis in vitro. *J Cell Sci.* 2006; 119: 1283-96.

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.

Yakar N, Guncu GN, Akman AC, Pınar A, Karabulut E, Nohutcu RM. Evaluation of gingival crevicular fluid and peri-implant crevicular fluid levels of sclerostin, TWEAK, RANKL and OPG. *Cytokine.* 2019 Jan; 113:433-39.

Yang X, Han X, Shu R, Jiang F, Xu L, Xue C, Chen T, Bai D. Effect of sclerostin removal in vivo on experimental periodontitis in mice. *Journal of Oral Science.* 2016; 58:271-76.

Zhang R, Real CI, Liu C, Baba HA, Gerken G, Lu M, Broering R. 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.* 2017; 141:354-63.

Zitzmann NU, Berglundh T. Definition and prevalence of peri-implant diseases. *J Clin Periodontol.* 2008 Sep;35(8 Suppl):286-91.