



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

YURI ARBEX DE CASTRO LIMA

**SINALIZAÇÃO DA VIA WNT/B-CATENINA NA
PROGRESSÃO DE DOENÇA PERIODONTAL
EXPERIMENTAL**

**PIRACICABA
2018**

YURI ARBEX DE CASTRO LIMA

**SINALIZAÇÃO DA VIA WNT/B-CATENINA NA
PROGRESSÃO DE DOENÇA PERIODONTAL
EXPERIMENTAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Cirurgião Dentista.

Orientador: Dra. Cristiane Ribeiro Salmon

Coorientador: Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Júnior

O PRESENTE EXEMPLAR REFERE-SE À
VERSÃO FINAL DO TRABALHO DE
CONCLUSÃO DE CURSO APRESENTADO
PELO ALUNO YURI ARBEX DE CASTRO
LIMA

PIRACICABA
2018

Ficha Catalográfica

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

L628s Lima, Yuri Arbex de Castro, 1995-
Sinalização da via Wnt/Beta-Catenina na progressão de doença periodontal experimental / Yuri Arbex de Castro Lima. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Cristiane Ribeiro Salmon.
Coorientador: Francisco Humberto Nociti Junior.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Doenças periodontais. 2. Via Wnt/beta-catenina. I. Salmon, Cristiane Ribeiro, 1975-. II. Nociti Junior, Francisco Humberto, 1967-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações adicionais complementares

Título em outro idioma: Wnt/Beta-Catenin pathway signaling in the progression of experimental periodontal disease

Palavras-chave em inglês:

Periodontal diseases

Wnt/Beta-catenin pathway

Titulação: Cirurgião-Dentista

Data de entrega do trabalho definitivo: 01-10-2018

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do seu Diretor, Prof. Dr. Guilherme Elias Pessanha Henriques, e de seu coordenador de graduação, Prof. Dr. Wander José da Silva, lugar a que sou eternamente grato pela minha formação não só como Cirurgião Dentista, mas como ser humano. Foram 5 anos de grandes vitórias, grandes derrotas e incessável crescimento pessoal.

Ao Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti, pela iniciativa e boa vontade de me aceitar como aluno de iniciação científica logo no segundo ano de curso.

À Dra. Cristiane Ribeiro Salmon, por toda a sua orientação, oportunidade e aprendizado obtido durante a iniciação científica e congressos nos quais apresentei o projeto, e à aluna de pós-graduação Elis Lira, pela ajuda em laboratório e em clínica.

Aos meus amigos Henrique Satake, Rafel Cabello, Bruna Moretti e Lucas Farah, que estão presentes desde a minha vinda a Piracicaba, dos momentos mais difíceis aos mais alegres da graduação. Sem vocês eu definitivamente não chegaria até aqui.

Aos meus amigos de Fortaleza, Fernando Otávio, Lucas Santos e Gabriel Dimitri, que não hesitavam em conversar à distância comigo nos meus dias mais solitários.

Aos meus tios Maria Inês e Ivan do Valle, por todo o suporte desde o vestibular até minha estabilização em Piracicaba.

A todas as outras pessoas envolvidas na minha trajetória durante a graduação, por toda e qualquer ajuda que ofereceram.

Por último, porém não menos importante, aos meus pais Rômulo Mota e Marilza Arbex e à minha irmã Marina Arbex, por estarem presentes desde sempre. Obrigado pelo carinho, incentivo, companheirismo e amor, que nunca estiveram ausentes.

RESUMO

A β -catenina, uma proteína efetora da via canônica de sinalização da Wnt, tem um importante papel no desenvolvimento e homeostasia dos tecidos, e está envolvida na patogênese de doenças inflamatórias, incluindo o câncer. Este projeto teve como objetivo analisar a expressão de β -catenina no periodonto durante a progressão da doença periodontal crônica experimental (DPCE) em camundongos. A indução da periodontite foi feita graças a colocação de ligadura de fio de algodão ao redor dos primeiros molares inferiores de camundongos, enquanto o lado contralateral foi utilizado como controle. Os animais foram sacrificados por perfusão com solução de Karnovsky após 3 e 7 dias de indução da periodontite, as mandíbulas foram dissecadas e processadas para obtenção de cortes histológicos mesio-distais seriados dos grupos periodontite e controle. Amostras de 6 animais de cada grupo foram utilizadas para análise histomorfométrica da região de furca. Cortes histológicos de 5 animais de cada grupo foram preparados, submetidos a reações de imunohistoquímica e contracolorados com hematoxilina. A análise histomorfométrica demonstrou uma perda de tecido ósseo significativa ($p < 0,05$, ANOVA) na região de furca dos 1^{os} molares após 7 dias da DPCE. Os resultados imunohistoquímicos demonstraram a expressão da β -catenina na região do ligamento periodontal (LP) contendo infiltrado inflamatório e adjacente às áreas de reabsorção óssea dos dentes com DPCE, com maior intensidade de marcação no período inicial de 3 dias da DPCE, quando comparado ao PDE 7 dias e ao controle. Dentro dos limites deste trabalho, conclui-se que a via Wnt/ β -catenina pode desempenhar um relevante papel na progressão da doença periodontal, o que a torna um alvo importante para terapias que tem como objetivo limitar a destruição dos tecidos periodontais frente à agressão do biofilme dental bacteriano.

Palavras-chave: Doença periodontal. Wnt/ β -catenina.

ABSTRACT

B-catenin, an effector protein of the canonical signaling pathway of Wnt, plays an important role in the development and homeostasis of tissues, and is involved in the pathogenesis of inflammatory diseases, including cancer. This project aimed to analyze the expression of β -catenin in the periodontium during the progression of experimental chronic periodontal disease (DPCE) in mice. Induction of periodontitis was performed by placing a cotton cord ligature around the lower first molars of mice, while the contralateral side was used as a control. The animals were sacrificed by perfusion with Karnovsky solution after 3 and 7 days of induction of periodontitis, the mandibles were dissected and processed to obtain histological mesio-distal sections serialized from the periodontitis and control groups. Samples of 6 animals from each group were used for histomorphometric analysis of the furca region. Histological sections of 5 animals from each group were prepared, submitted to immunohistochemical reactions and hematoxylin-contracted. The histomorphometric analysis showed a significant bone loss ($p < 0.05$, ANOVA) in the furcation region of the 1st molars after 7 days of the CAPD. The immunohistochemical results demonstrated the expression of β -catenin in the region of the periodontal ligament (LP) containing inflammatory infiltrate and adjacent to the areas of bone resorption of the teeth with ECDD, with greater marking intensity in the initial period of 3 days of ECDD when compared to PDE for 7 days and control. Within the limits of this work, it is concluded that the Wnt / β -catenin pathway may play an important role in the progression of periodontal disease, which makes it an important target for therapies that aim to limit the destruction of periodontal tissues against aggression of the bacterial dental biofilm.

Keywords: Periodontal disease. Wnt / β -catenin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Modelo experimental de indução de peridontite ...	16
Figura 2	Imagens de captura de tela durante análise histométrica ...	17
Figura 3	Cortes histológicos ...	19
Figura 4	Resultados morfométricos das medidas ...	20
Figura 5	Reações de imunohistoquímica para β -catenina ...	21

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
3 PROPOSIÇÃO	14
4 MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 Análise estatística	18
4.2 Imunohistoquímica	18
5 RESULTADOS	19
6 DISCUSSÃO	22
7 CONCLUSÃO	23
REFERÊNCIAS	24
ANEXOS	
Anexo 1 – Verificação de Originalidade e Prevenção de Plágio	
Anexo 2 - Comitê de Ética em Pesquisa da FOP/UNICAMP	
Anexo 3 – Iniciação Científica	

1 INTRODUÇÃO

As doenças periodontais correspondem a processos infecciosos nos tecidos de suporte e proteção dos dentes que envolvem interações complexas entre as bactérias e o hospedeiro, sofrendo influência ainda de fatores genéticos e ambientais (Socransky et al., 1984). As alterações que acontecem na transição de uma condição de saúde para periodontite passam por eventos celulares e moleculares diversos, coordenados pelo sistema imune do hospedeiro, com o objetivo de protegê-lo do desafio microbiano (Gibbons, 1984).

Ainda que a existência de bactérias do biofilme dental seja obrigatória na evolução da doença periodontal, o reflexo imunológico do hospedeiro desempenha uma importante função na patogênese dessa doença, porque contribui para o processo da inflamação ou porque modula os resultados produzidos pelas bactérias (Genco, 1992). Na periodontite, as bactérias presentes no sulco gengival produzem enzimas e toxinas (lipopolissacarídeos) que induzem as células inflamatórias nos tecidos de suporte dental, resultando na liberação de citocinas e fatores locais (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, PGE₂ e FNT α). Estes fatores podem agir diretamente sobre os osteoblastos, dificultando sua função e reduzindo o número de células funcionais bem como ainda incentivando a produção e ativação dos osteoclastos. Esta cascata inteira de eventos ocasiona na destruição do tecido conjuntivo periodontal e osso alveolar (Page e Kornman, 2000). Assim, há indicação de que existe ação destrutiva e protetora nos tecidos periodontais por parte do hospedeiro.

A via de sinalização Wnt é uma rede de proteínas mediadoras da comunicação celular, transmitem sinais a partir de receptores da superfície das células, passando pelo citoplasma e chegando finalmente à base onde a cascata de sinalização leva a expressão de determinados genes. A ativação da via Wnt é conservada evolutivamente, tem sua função em diversas espécies passando pela mosca da fruta aos seres humanos. Participam de diversos processos celulares, na embriogênese e na homeostase de tecidos nos adultos (Inestrosa, 2010), como ossos, coração, músculos e outros. Distúrbios na sinalização da Wnt/ β -catenina estão associados a alterações como inflamação, envelhecimento, osteoporose, doenças degenerativas e câncer (Logan e Nusse, 2004 e Mohammed et al. 2016) em decorrência do acréscimo da reprodução de genes relevantes para o crescimento,

proliferação, diferenciação, apoptose, estabilidade genética, migração e angiogênese (Angers e Moon, 2009).

Apesar de alguns trabalhos sugerirem o envolvimento da via Wnt/ β -catenina em eventos relacionados aos tecidos periodontais, como diferenciação osteogênica (Zhou et al. 2013) e reabsorção óssea (Napimoga et al. 2014, Ren et al. 2015), e o conhecimento da sua associação à doenças inflamatórias, há uma escassez de estudos que comprovem a participação dessa importante via de sinalização na progressão da doença periodontal. Um maior conhecimento sobre uma possível participação da via Wnt/ β -catenina na patogênese da periodontite poderá contribuir para identificar fatores específicos que poderão servir como fatores terapêuticos objetivando limitar a destruição dos tecidos periodontais frente à agressão do biofilme dental bacteriano.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Embora haja uma escassez de estudos que confirmem a participação da via Wnt/ β -catenina durante a progressão da doença periodontal, alguns trabalhos sugerem seu envolvimento na doença e sua associação a inflamações.

Em 2014, Yong Li et al. afirmaram que a sinalização Wnt / β -Catenina atua como um circuito de retroalimentação negativa para suprimir a inflamação em células epiteliais alveolares, e previne a lesão celular de reações inflamatórias excessivas. Este estudo revela um novo mecanismo imunorregulador nas células epiteliais alveolares em resposta à infecção bacteriana.

Em 2018, Liu et al. afirmaram que a via de sinalização Wnt / β -catenina está relacionada ao metabolismo do osso alveolar. Neste estudo, eles avaliaram a interação entre esta via e a rota EMMPRIN / MMPs na periodontite. Eles acreditavam que a expressão do indutor destas metaloproteinases na matriz celular se relacionam com a gravidade da inflamação. Por fim, concluíram que durante a periodontite, a presente via de sinalização regula negativamente as rotas EMMPRIN / MMP-2, 9 e o bloqueio de EMMPRIN atenua seu funcionamento.

Vallée e Lecarpentier (2018) em um recente trabalho, afirmavam que inflamação é um processo patológico que acompanha, promove e até inicia cânceres. Em seu estudo, mostravam que a sinalização WNT/ β -catenina é regulada positivamente em processos inflamatórios, enquanto o PPAR γ (Receptor Gama Ativado por Proliferador de Peroxissoma), é geralmente regulado negativamente, o que ajuda a explicar, em parte, o perfil oposto e unidirecional da sinalização WNT/ β -catenina canônica e o PPAR γ nesses três processos frequentes e mórbidos (inflamação, estresse oxidativo e muitos tipos de câncer) que potencializam uns aos outros. Por fim, concluíram que os agonistas de PPAR γ promovem a repressão do ciclo celular, a diferenciação celular e a apoptose e reduzem a inflamação, a angiogênese, o estresse oxidativo, a proliferação celular, a invasão e a migração celular. Além disso, mostraram que a via canônica WNT/ β -catenina e o PPAR γ parecem ser bastante comuns em inflamação, estresse oxidativo e cânceres.

Em junho de 2018, Wong et al. publicaram um trabalho afirmando que o desequilíbrio da sinalização Wnt/ β -catenina em células renais está associado à

disfunção renal. Com o objetivo de identificar a função desempenhada pela Wnt/ β -catenina tubular, eles geraram um camundongo transgênico expressando condicionalmente a β -catenina estabilizada especificamente nos túbulos renais após a administração de tamoxifeno. Passadas quatro semanas, esses camundongos apresentaram proteinúria e elevados níveis de nitrogênio ureico no sangue comparados a camundongos não-transgênicos, o que mostrava um efeito prejudicial da sinalização ativada. Isso foi associado à infiltração do túbulo-interstício predominantemente por macrófagos M1 e à expressão exacerbada de quimiocitoquinas inflamatórias. Eles induziram a proteinúria através de uma sobrecarga por injeção intraperitoneal de albumina de soro bovino com baixa endotoxina por quatro semanas, o que agravou a proteinúria e aumentou os níveis de nitrogênio uréico no sangue em uma extensão significativamente maior em camundongos transgênicos. Observaram que a disfunção renal se correlacionou com o grau de infiltração de macrófagos M1 no túbulo-interstício e que houve superexpressão de TLR-4 cortical e NLRP-3 nos camundongos transgênicos, independente da injeção de albumina de soro bovino. Por fim, concluíram em seu trabalho que a ativação condicional da sinalização tubular renal Wnt/ β -catenina em um novo modelo de camundongo transgênico demonstra que esta via aumenta a inflamação intrarrenal via o eixo inflamassoma TLR-4 / NLRP-3 na proteinúria por sobrecarga.

Em maio de 2018, Swafford et al., que defendiam que a sinalização anormal de Wnt/ β -catenina ocorre em várias doenças inflamatórias, investigaram a importância da sinalização Wnt canônica em CD11c (antígeno) + APCs (célula apresentadora de antígeno) no controle da inflamação intestinal. Usando um modelo murino de colite ulcerativa, eles demonstraram que a sinalização Wnt canônica em APCs CD11c + intestinais controla a inflamação intestinal por transmitir um fenótipo antiinflamatório. A deleção genética de receptores Wnt, proteínas relacionadas ao receptor de lipoproteína de baixa densidade 5 e 6 (LRP5 / 6) em APCs CD11c + em camundongos LRP5 / 6 Δ CD11c, resultou em inflamação intestinal aumentada com aumento da gravidade histopatológica do tecido colônico, causado por um aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias dependentes de microbiota e diminuição da expressão de fatores imuno-regulatórios. O resultado do experimento foi uma alteração da microflora e da homeostase das células T. Além disso, em seu estudo, demonstraram

que a ativação condicional de β -catenina em APCs CD11c + em camundongos LRP5 / Δ CD11c reduziu a inflamação intestinal e diminuiu a gravidade histopatológica do tecido colônico, o que revela um mecanismo pelo qual as APCs intestinais controlam a inflamação intestinal e a homeostase imune através da via de sinalização Wnt canônica.

3 PROPOSIÇÃO

Este projeto teve como objetivo analisar a expressão de β -catenina nos tecidos periodontais durante a progressão da doença periodontal em um modelo experimental de indução à periodontite em camundongos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho foi aplicado um experimental modelo de estímulo da doença periodontal por instalação de ligadura nos 1^{os} molares inferiores de camundongos. Camundongos (Swiss Webster) machos adultos, pesando 30-40g, originários do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB), foram condicionados no biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba/Unicamp em gaiolas plásticas cobertas com maravalha e alimentados com ração própria para animais de laboratório e água “ad libitum”. Estes experimentos foram realizados dentro das normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os procedimentos foram autorizados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia da Unicamp - Bioterismo da Unicamp (CEMIB), mediante protocolo de número 3132-1. Foi feita anestesia desses animais com uma dose intraperitoneal de cloridrato de xylasina (8,8mg/Kg - Rompun®, Bayer S.A.) e cloridrato de ketamina (130mg/Kg - Dopalen® - Sespo Ind. e Com. LTDA) e posicionados em um aparato de Doku modificado (Figura 1A e B). A ponta do bisel de uma agulha de insulina será introduzida na ameia entre os 1^o e 2^o molares inferiores para facilitar a passagem da ligadura de fio de algodão na região interproximal. Uma ligadura de fio de algodão foi posicionada ao nível do sulco gengival de um dos 1^{os} molares inferiores, aleatoriamente selecionado, terminando com um nó voltado para mesial (Johnson, 1975. Figura 1C), enquanto o controle foi feito com o dente contralateral. Dividiu-se os animais em dois grupos aleatórios e eles foram, então, sacrificados por perfusão intracardíaca com solução de Karnovsky modificada após 3 e 7 dias de indução da doença periodontal experimental (DPCE).

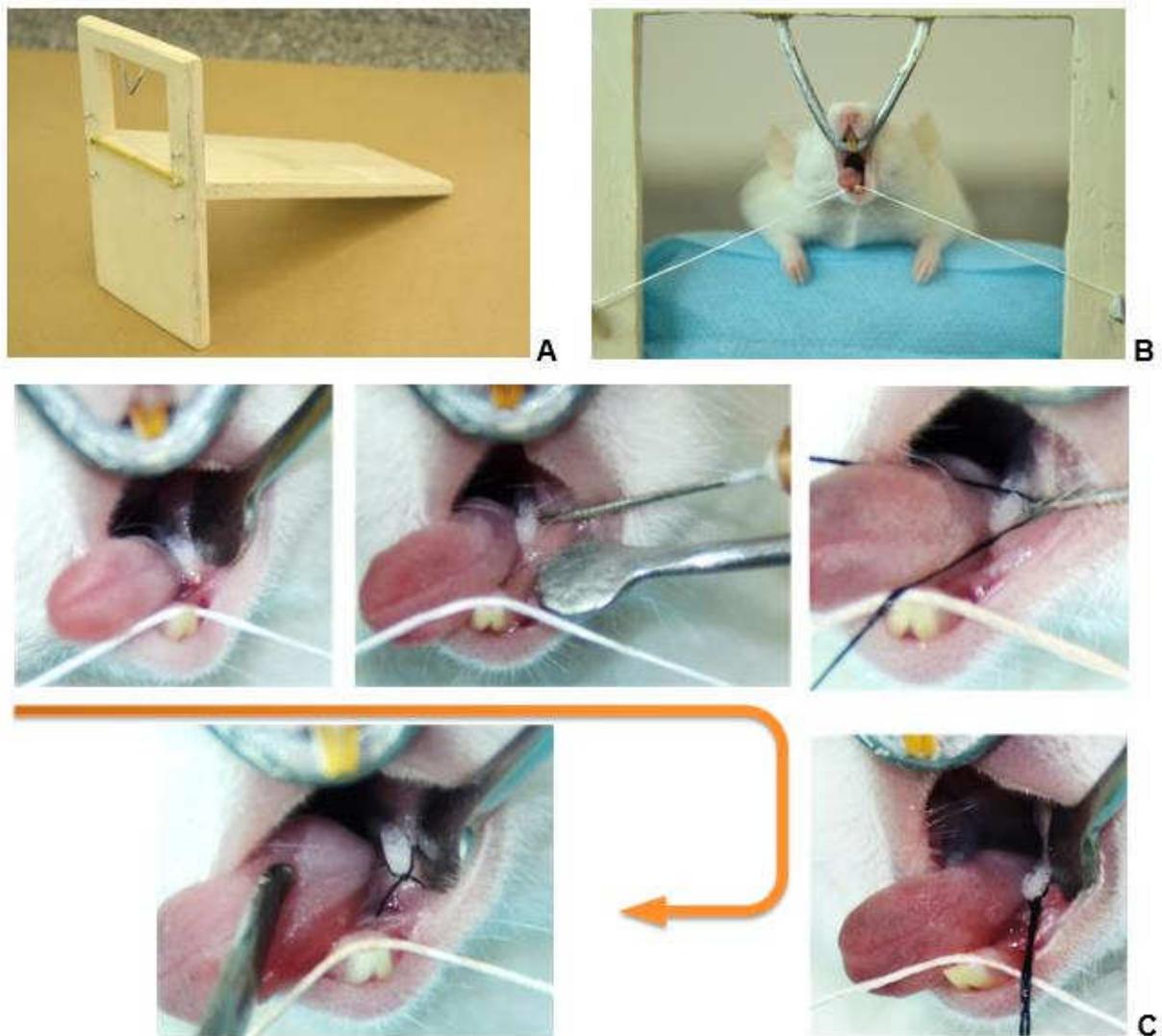


Figura 1 – Modelo experimental de indução de peridontite por instalação de ligadura de algodão na região da margem gengival de camundongos. (A) Aparato de Doku modificado. (B) Animal anestesiado e posicionado no aparato de Doku. (C) Sequência de passos para instalação de ligadura no 1º molar inferior.

Após sacrifício dos animais, as hemimandíbulas foram dissecadas, fixadas por imersão em solução de Karnovsky modificada por 24 horas e descalcificadas em solução de EDTA a 10%. As amostras foram aparadas, e processadas histologicamente por técnica de rotina para inclusão em parafina. Para análise histométrica, cortes seriados mesio-distais de 6 μ m da região dos 1^{os} molares de 8 animais foram colocados em lâminas de vidro, desparafinizados, hidratados e corados com hematoxilina e eosina. Do total de cortes obtidos, foram selecionados aqueles que continham as raízes completas e a região de bifurcação das raízes dos primeiros

molares inferiores. Determinou-se, então, o quanto de volume foi perdido em osso inter-radicular na região de furca usando o princípio de Cavalieri (Gundersen e Jensen, 1987 e 1999). Foram selecionados 10 cortes por dente distanciados regularmente entre si. Os cortes foram fotografados sob visualização em microscópio num aumento de 10X. O programa Image-Pro Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA), foi usado para mensurar a extensão de osso perdido na área de furca dos 1^{os} molares inferiores. As medidas de área foram realizadas por um único examinador calibrado e sego no estudo (YACL). A Figura 2 ilustra a medida das áreas de perda óssea na região de furca dos molares inferiores.

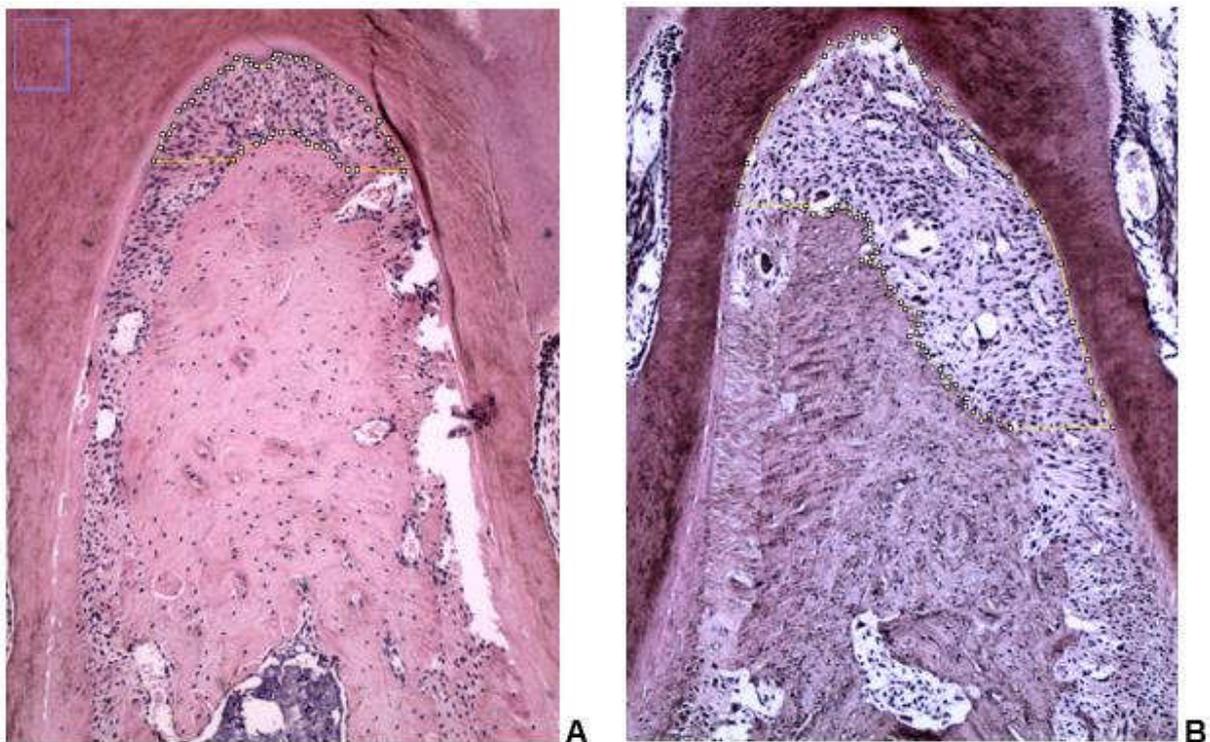


Figura 2 – Imagens de captura de tela durante análise histométrica usando o Programa Image-Pro. As imagens de cortes histológicos da região de furca dos 1^{os} molares inferiores ilustram a medida de área do PDL na região da crista óssea delimitada pela linha amarela, no grupo controle (A) e no grupo tratado para indução da DPCE (B).

4.1 Análise estatística

No presente trabalho, a quantidade de tecido ósseo interradicular destruído foi considerada como variável de resposta (quantitativamente), e a indução da periodontite foi o fator em estudo, como foi anteriormente definido. O volume da perda óssea interradicular de cada dente testado foi calculado obtendo-se a área total (mm²) de 10 cortes, a partir das quais foi obtida a média por animal, e posteriormente calculando-se as médias dos grupos (n=8). Os resultados quantitativos das áreas dos grupos foram comparados utilizando o teste de Análise de Variância (ANOVA), adotando-se $\alpha=0,05$, seguido pelo teste de Tukey.

4.2 Imunohistoquímica

Para a imunolocalização da β -catenina no periodonto (gengiva, ligamento periodontal, osso alveolar e cimento), tanto nos grupos com indução à periodontite quanto nos controles, foram obtidos cortes seriados mesio-distais de 4 μ m da região dos 1^{os} molares de 5 animais. Os cortes foram colocados em lâminas silanizadas, desparafinizados, hidratados e incubados com Proteinase K (Dako, Usa) para recuperação antigênica. O bloqueio da atividade da peroxidase endógena será feito por incubação com peróxido de hidrogênio 6% seguido pelo bloqueio de reatividade não específica com BSA (“bovine serum albumin”) 4% em tampão fosfato de sódio. Incubou-se os cortes em anticorpo primário purificado “rabbit anti- β -catenin” (1:100, ab32572Abcam, USA) durante a noite, seguido por incubação com anticorpo secundário biotilado (LSAB2 System-HRP, Dako, USA). A imunoreatividade foi visualizada usando solução de diaminobenzidina (DAB) e as lâminas foram contracoradas com hematoxilina. Os cortes foram analisados sob microscópio e fotografados para registro dos resultados qualitativos encontrados.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos da análise histológica das amostras dos grupos controle e com DPCE demonstraram que houve perda óssea na região de crista óssea na bifurcação das raízes dos molares induzidos à DPCE por 3 e 7 dias quando comparados com o grupo controle (Figura 3). Isso demonstra que o modelo usado para a avaliação da progressão da doença periodontal em camundongos foi eficiente, quando a maioria dos trabalhos na literatura utilizando este modelo foram realizados em ratos (Kose et al., 2016 / Meulman et al., 2011 / Peruzzo et al., 2010 / Marques et al., 2009). A análise histométrica demonstrou que é notório um significativo aumento ($p < 0,05$) da área de perda óssea nos dentes com DPCE após 7 dias, quando comparada aos outros grupos, 3 dias de DPCE e controle (Figura 4).

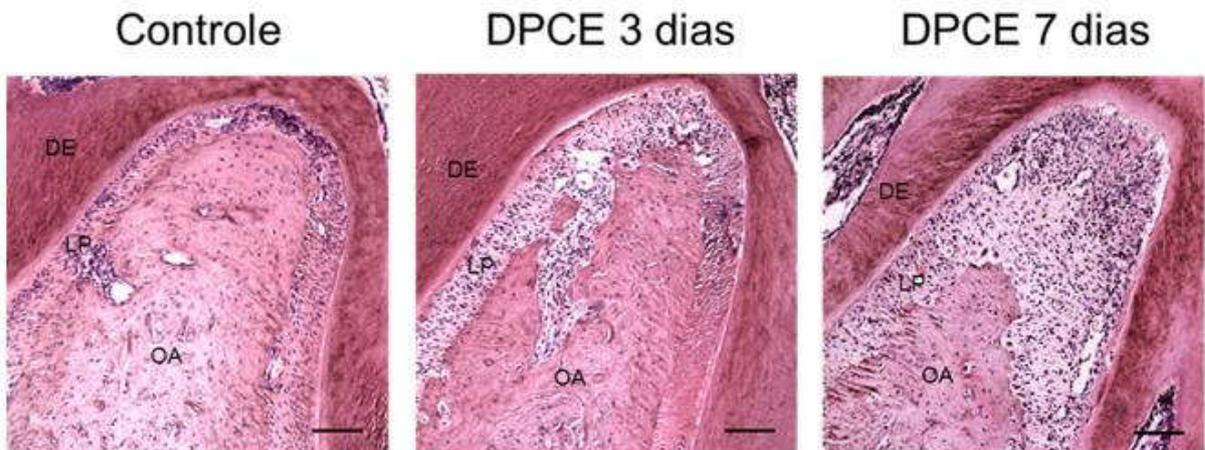


Figura 3 - Cortes histológicos corados em HE mostram a região de furca dos grupos estudados. Uma maior reabsorção óssea pode ser observada em DPCE- 7 dias. DE- dentina; LP – ligamento periodontal; AO – osso alveolar. Ampliação de 10x. Barra=100 μ m.

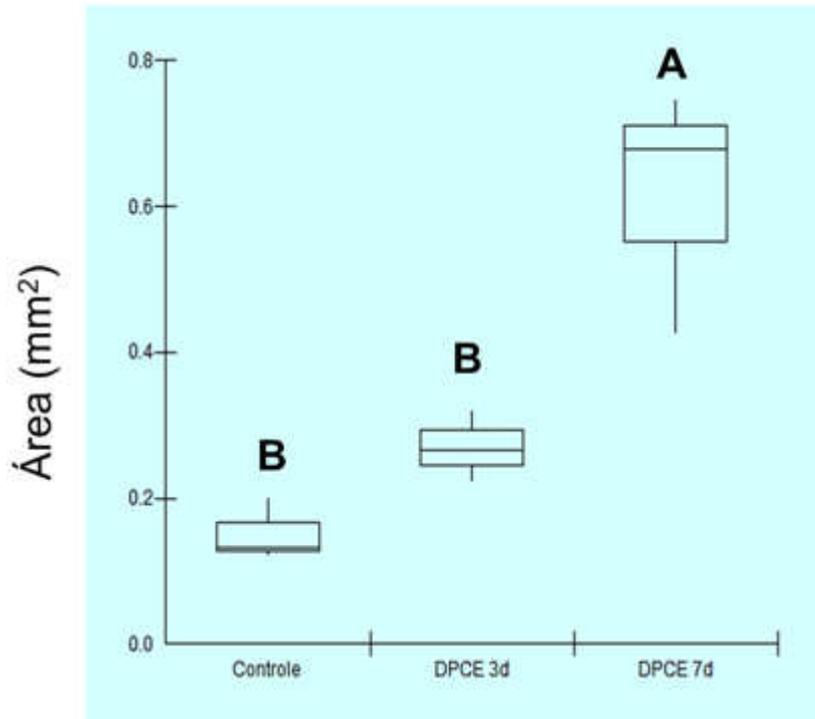


Figura 4 - Gráfico mostrando os resultados morfométricos das medidas de área do LP na região de furca dos grupos estudados. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$, ANOVA seguido de teste Tukey).

Os resultados das reações de imunohistoquímica demonstraram que a β -catenina é fracamente expressa nos tecidos periodontais, em algumas regiões do osso, do PL e em regiões de infiltrado linfocitário no tecido gengival dos animais controle. Entretanto, a expressão da β -catenina foi alterada no LP dos animais induzidos à DPCE, com um sinal de marcação mais intensa no período mais inicial de 3 dias de DPCE. A β -catenina foi mais expressa nas áreas do LP onde havia presença de infiltrado inflamatório e adjacente às áreas de absorção óssea (Figura 5). As imagens em maior aumento mostram a presença da β -catenina na região do núcleo de células do LP localizadas próximas às regiões de absorção óssea (Figura 5), sugerindo uma provável ativação da via de sinalização Wnt canônica durante o processo inflamatório do LP causado pelo acúmulo de biofilme induzido na DPCE. A diminuição da expressão da β -catenina aos 7 dias de DPCE pode sugerir que a ativação desta via é crucial na fase inicial do processo inflamatório no LP acometido por doença periodontal

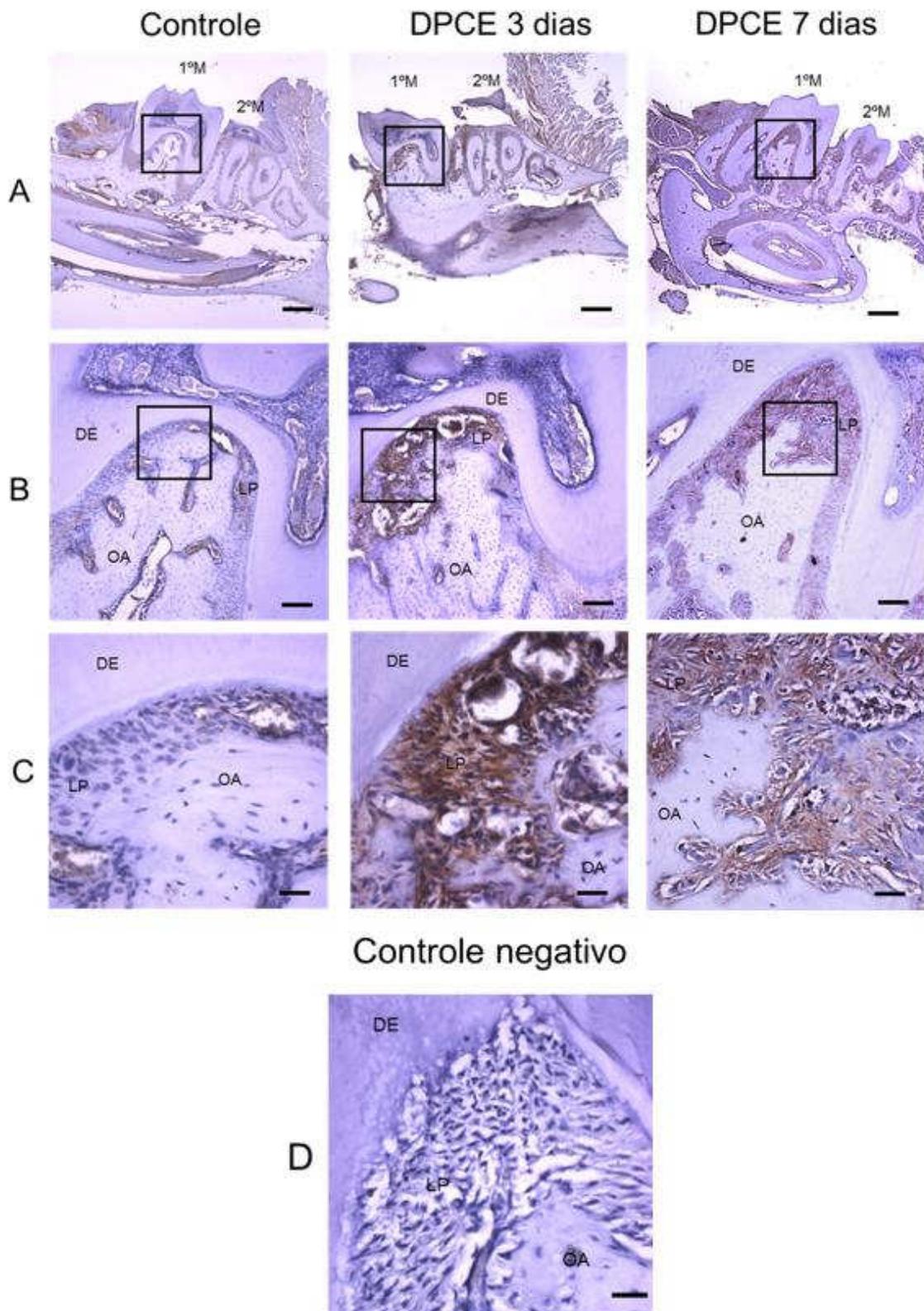


Figura 5 – Reações de imunohistoquímica para β -catenina. Os resultados mostram maior expressão da β -catenina no LP da região de furca dos grupos submetidos à DPCE. Os quadrados em (A) e (B) delimitam imagem em maior aumento em (B) e (C), respectivamente. DE- dentina; LP – ligamento periodontal; AO – osso alveolar. Barra (A)=500 μ m, (B)=100 μ m, (C e D)=25 μ m.

6 DISCUSSÃO

É notório que ao comparar este estudo com os de outros pesquisadores citados anteriormente, há uma clara relação entre a via Wnt/ β -catenina e processos inflamatórios, embora nenhum deles tenham relacionado essa via a tecidos de suporte periodontal. O maior desafio deste projeto foi justamente comprovar algo relativamente novo, para que a ciência possa evoluir cada vez mais no combate a inflamações, especificamente à doença periodontal.

O projeto de pesquisa proposto inicialmente incluía a análise de 4 grupos experimentais, sendo um grupo controle, e 3 grupos tratados por indução de doença periodontal crônica experimental (DPCE), nos períodos de 3, 7 e 15 dias. No presente trabalho, obtivemos sucesso na utilização do modelo experimental em camundongos nos períodos de 3 e 7 dias. Os experimentos também foram realizados para períodos mais longos de DPCE, 15 e 21 dias. Entretanto, a manutenção da ligadura de algodão por períodos mais longos se mostrou desafiadora. Não conseguimos obter um número suficiente de animais para obtenção de resultados quantitativos e qualitativos consistentes. Acreditamos que o estudo da participação da via Wnt/ β -catenina na progressão da doença periodontal deve incluir períodos mais longos da doença, e para tanto, algumas modificações do modelo experimental em camundongos podem ser feitas em estudos futuros.

Além disso, grande parte dos trabalhos relacionados à via Wnt/ β -catenina relacionam essa via ao início de cânceres, como algumas pesquisas citadas anteriormente. Também há muitos trabalhos que a relacionam a inflamações em órgãos que não fazem parte da cavidade bucal, como estômago, rim etc. É preciso que os pesquisadores percebam a importância dessa via nos processos patológicos da cavidade oral e que sejam publicados cada vez mais trabalhos sobre isso, pois a doença periodontal é apenas um dos processos inflamatórios da boca que podem ter relação com a via de sinalização Wnt/ β -catenina.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos e considerando os limites deste estudo, pode-se concluir que a via Wnt/ β -catenina pode desempenhar um relevante papel na progressão da doença periodontal, o que a torna um alvo importante para terapias que tem como objetivo limitar a destruição dos tecidos periodontais frente à agressão do biofilme dental bacteriano.

REFERÊNCIAS

Socransky SS, Haffajee AD, Goodson JM, Lindhe J. New concepts of destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1984 Jan;11(1):21-32.

Mohammed MK, Shao C, Wang J, Wei Q, Wang X, Collier Z, et al. Wnt/beta-catenin signaling plays an ever-expanding role in stem cell self-renewal, tumorigenesis and cancer chemoresistance. *Genes Dis*. 2016;3:11-40.

Angers S, Moon RT. Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009 Jul;10(7):468-77. doi: 10.1038/nrm2717.

Napimoga MH, Nametala C, da Silva FL, Miranda TS, Bossonaro JP, Demasi AP, Duarte PM. Involvement of the Wnt- β -catenin signalling antagonists, sclerostin and dickkopf-related protein 1, in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2014 Jun;41(6):550-7. doi: 10.1111/jcpe.12245.

Johnson IH. Effects of local irritation and dextran sulphate administration on the periodontium of the rat. *J Periodontal Res*. 1975;10:332-45.

Gundersen HJ, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc*. 1987 Sep;147(Pt 3):229-63.

Meulman T, Peruzzo DC, Stipp RN, Gonçalves PF, Sallum EA, Casati MZ, Goncalves RB, Nociti FH Jr. Impact of Porphyromonas gingivalis inoculation on ligature-induced alveolar bone loss. A pilot study in rats. *J Periodontal Res*. 2011 Oct;46(5):629-36. doi: 10.1111/j.1600-0765.2011.01385.x. Epub 2011 Jul 4.

Peruzzo DC, Benatti BB, Andersen ML, Tufik S, Casati MZ, Nociti FH Jr. Evidence that metyrapone in the presence of inflammation modulates cytokine mRNA expression. *Cytokine*. 2010 Dec;52(3):184-9. doi: 10.1016/j.cyto.2010.07.007. Epub 2010 Aug 10.

Marques MR, dos Santos MC, da Silva AF, Nociti FH, Jr., Barros SP. Parathyroid hormone administration may modulate periodontal tissue levels of interleukin-6, matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in experimental periodontitis. *J Periodontal Res*. 2009;44:744-50.

Li Y, Shi J, Yang J, Ma Y, Cheng L, Zeng J, Hao X, Ma C, Wang Y, Liu X. A Wnt/ β -catenin negative feedback loop represses TLR-triggered inflammatory responses in

alveolar epithelial cells. *Mol Immunol*. 2014 Jun;59(2):128-35. doi: 10.1016/j.molimm.2014.02.002. Epub 2014 Mar 4.

Liu X, Zhang Z, Pan S, Shang S, Li C. Interaction between the Wnt/ β -catenin signaling pathway and the EMMPRIN/MMP-2, 9 route in periodontitis. *J Periodontal Res*. 2018 Jun 14. doi: 10.1111/jre.12574.

Vallée A, Lecarpentier Y. Crosstalk Between Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma and the canonical WNT/ β -Catenin Pathway in Chronic Inflammation and Oxidative Stress During Carcinogenesis. *Front Immunol*. 2018 Apr 13;9:745. doi: 10.3389/fimmu.2018.00745. eCollection 2018.

Wong DWL, Yiu WH, Chan KW, Li Y, Li B, Lok SWY, Taketo MM, Igarashi P, Chan LYY, Leung JCK, Lai KN, Tang SCW. Activated renal tubular Wnt/ β -catenin signaling triggers renal inflammation during overload proteinuria. *Kidney Int*. 2018 Jun;93(6):1367-1383. doi: 10.1016/j.kint.2017.12.017. Epub 2018 Mar 28.

Swafford D, Shanmugam A, Ranganathan P, Hussein MS, Koni PA, Prasad PD, Thangaraju M, Manicassamy S. Canonical Wnt Signaling in CD11c(+) APCs Regulates Microbiota-Induced Inflammation and Immune Cell Homeostasis in the Colon. *J Immunol*. 2018 May 1;200(9):3259-3268. doi: 10.4049/jimmunol.1701086. Epub 2018 Mar 30.

ANEXOS

Anexo 1 – Verificação de Originalidade e Prevenção de Plágio

SINALIZAÇÃO DA VIA WNT/B-CATENINA NA PROGRESSÃO DE DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL

RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE



FONTES PRIMÁRIAS

1	repositorio.ufrn.br Fonte da Internet	3%
2	clonerresources.com Fonte da Internet	3%
3	Submitted to Universidade Estadual de Campinas Documento do Aluno	3%
4	repositorio.unesp.br Fonte da Internet	1%
5	site.ufvjm.edu.br Fonte da Internet	1%
6	www.revistasobrape.com.br Fonte da Internet	1%
7	Saadi-Thiers, Kenza, Olivier Huck, Pierre Simonis, Peggy Tilly, Jean-Etienne Fabre, Henri Tenenbaum, and Jean-Luc Davideau. "Periodontal and Systemic Responses in	1%

Anexo 2 - Comitê de Ética em Pesquisa da FOP/UNICAMP

	 CEUA/Unicamp
<p>Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp</p>	
<p>CERTIFICADO</p>	
<p>Certificamos que o projeto "<u>Análise de expressão de genes relacionados com a via Wnt na progressão de doença periodontal experimental</u>" (protocolo nº <u>3132-1</u>), sob a responsabilidade de <u>Profa. Dra. Karina Gonzales Silvério Ruiz / Marcela Di Moura Barbosa</u>, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.</p>	
<p>O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em <u>12 de agosto de 2013</u>.</p>	
 Prof. Dra. Ana Maria A. Guoratto Presidente	<p>Campinas, 12 de agosto de 2013.</p>  Fátima Alonso Secretária Executiva
CEUA/UNICAMP Caixa Postal 6109 13063-970 Campinas, SP - Brasil	Telefone: (19) 3521-8358 E-mail: comite@unicamp.br http://www.fop.unicamp.br/ceua/

Anexo 3 – Iniciação Científica



Universidade Estadual de Campinas
Pró-Reitoria de Pesquisa
Programas de Iniciação Científica e Tecnológica
www.prp.unicamp.br | Tel. 55 19 3521-4891

Declaração

Declaro para os devidos fins, que o(a) aluno(a) **YURI ARBEX DE CASTRO LIMA, RA 157610**, foi bolsista junto ao Programa Institucional de Bolsas Pesquisa do Serviço de Apoio ao Estudante - SAE/Unicamp, com bolsa vigente no período de 01/01/2017 a 31/07/2017, sob a orientação do(a) Prof(a). Dr(a). **CRISTIANE RIBEIRO SALMON** (FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA - FOP, UNICAMP) para o desenvolvimento do Projeto "*Sinalização da via Wnt/ β -catenina na progressão de doença periodontal experimental*".

Pró-Reitoria de Pesquisa, 24 de setembro de 2018.



Mirian Cristina Marcançola
PRP / PIBIC - Unicamp
Matr. 299062