

A ATUAÇÃO DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA NA DOENÇA PERIODONTAL

EMANOELY ANZILIERO LOPES^{1,2*}, SILVIANE CUNICO CARNEIRO
FÜCHTER³, EDUARDO AUGUSTO DE BRITO PRATES⁴, DÉBORA TAVARES DE
RESENDE E SILVA⁵, SARAH FRANCO VIEIRA DE OLIVEIRA MACIEL^{2,6}

1 Introdução

A doença periodontal (DP) é uma doença inflamatória crônica, onde é desencadeada pelo acúmulo do biofilme dental, depositada nos tecidos de suporte (periodonto) dos elementos dentários. O biofilme dental possui em sua composição um grande número de bactérias, que são capazes de causar danos na cavidade bucal. A DP estimula, por meio do sistema imune, localmente e em sítios distantes, concentrações elevadas de citocinas e proteínas pró-inflamatórias (PERES et al., 2019). Como um dos patógenos orais mais estudados, a *Porphyromonas gingivalis* (P. gingivalis) tem um papel central no desenvolvimento da DP, sendo apontada como a bactéria causadora da doença e capaz de driblar os mecanismos de defesa imune a fim de garantir sua sobrevivência no hospedeiro, causando injúrias ao periodonto (ALMEIDA-DA-SILVA et al., 2016).

Frente aos danos causados pela DP na cavidade bucal e sua associação com doenças sistêmicas, o interesse em compreender a DP e seu mecanismo de ação vem crescendo. Na literatura, encontram-se estudos que relacionam a DP com o sistema inflamatório, e mais recentemente com o sistema purinérgico (YILMAZ, 2008). A sinalização purinérgica refere-se ao processo pelo qual purinas e pirimidinas extracelulares medeiam as respostas celulares, após a estimulação de receptores específicos. A presença de receptores purinérgicos em organismos multicelulares primitivos (FOUNTAIN; BURNSTOCK, 2009), combinada com

¹ Graduanda em Medicina, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Chapecó, Brasil. Contato: emanoely.lobes@estudante.uffs.edu.br

² Grupo de Pesquisa: Estudos Biológicos e Clínicos em Patologias Humanas

³ Mestranda no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Chapecó, Brasil.

⁴ Graduando em Medicina, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Chapecó, Brasil.

⁵ Professora Doutora em Medicina e Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Chapecó, Brasil.

⁶ Professora Doutora em Medicina e Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Chapecó, Brasil. **Orientadora.**

ampla dispersão de receptores purinérgicos em todos os tipos celulares, reflete seu papel central em inúmeros processos fisiológicos e fisiopatológicos. Durante a inflamação, células estressadas ou infectadas podem liberar trifosfato de adenosina (ATP) para o meio extracelular, que pode ser hidrolisado em adenosina por ectonucleotidasas, como a ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1 (CD39) e a 5'-nucleotidase (CD73) (BURNSTOCK; KNIGHT, 2004).

2 Objetivos

Analisar a atividade das enzimas CD39 e CD73 em linfócitos, e os níveis séricos de ATP em participantes com diagnóstico de DP e em participantes saudáveis.

3 Metodologia

Foi realizado um estudo transversal com análise quantitativa, onde foram avaliados parâmetros do sistema purinérgico na DP em 82 indivíduos na cidade de Belmonte (Santa Catarina, Brasil). O estudo incluiu participantes com e sem o diagnóstico de DP, organizados em três grupos: participantes saudáveis (N= 25), gengivite (N= 25), periodontite (N= 32). Nas amostras de linfócitos, foi analisado a atividade enzimática de componentes do sistema purinérgico (CD39 e CD73). No soro dos participantes foi avaliada as concentrações de ATP extracelular. Foi realizada coleta de 20 mL de sangue periférico de cada participante, utilizando um tubo BD Vacutainer®. A atividade das enzimas CD39 e CD73 foi determinada como descrito por Leal et al. (2005). A análise quantitativa de ATP circulante foi realizada por ensaio bioluminescente utilizando o *ATP Determination Kit* (Invitrogen).

4 Resultados e Discussão

Em linfócitos, a hidrólise de ATP (Figura 1A) foi diminuída em participantes com periodontite, em comparação com o grupo controle ($p < 0,001$), sendo essa diminuição mais expressiva entre indivíduos com gengivite e periodontite ($p < 0,0001$). A figura 1B apresenta a hidrólise de ADP diminuída entre os grupos gengivite e periodontite ($p < 0,01$). A figura 1C apresenta a diminuição da hidrólise de AMP entre os grupos com DP gengivite e periodontite ($p < 0,01$), e entre os grupos controle e periodontite ($p < 0,0001$).

Altos níveis de ATP extracelular foram encontrados em pacientes com DP em comparação ao grupo controle (Figura 1D). Percebemos também um aumento expressivo conforme a progressão da DP.

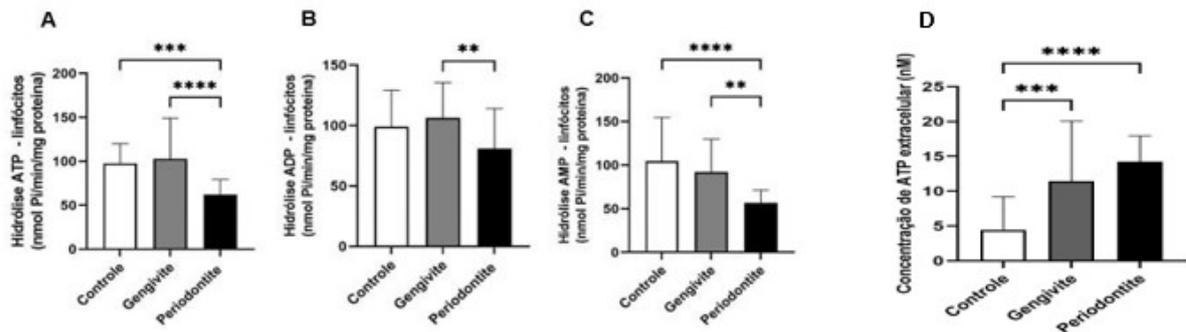


Figura 1. Hidrólise de ATP (A), ADP (B) e AMP (C) em linfócitos de indivíduos controle e com DP (gengivite e periodontite). A atividade de CD39 foi medida pela hidrólise de ATP e ADP, enquanto a atividade de CD73 foi medida pela hidrólise de AMP. Análise estatística: ANOVA de uma via.

Níveis extracelulares de ATP (D) no soro de indivíduos controle e pacientes com DP. ATP extracelular foi determinado como produção de bioluminescência usando um sistema de reação luciferina-luciferase (emissão máxima ~ 560 nm em pH 7,8) através de um kit comercial (Invitrogen®). Os dados foram expressos em nM de ATP no soro.

Valores com de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. *($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$); **** ($p < 0,0001$).

Componentes do sistema purinérgico, as enzimas CD39 e CD73 são as principais metabolizadoras de nucleotídeos, participando da regulação da inflamação e do sistema imunológico. Devido à capacidade dessas enzimas de converter ATP em adenosina, elas são capazes de mover as células imunológicas de um estado pró-inflamatório para um estado anti-inflamatório. Dependendo do contexto fisiopatológico em que estão inseridas, essas enzimas podem modular o significado de várias doenças, incluindo a DP (LEE et al., 2020).

Nossos resultados indicam uma redução significativa na hidrólise de nucleotídeos realizada pelas enzimas CD39 e CD73 em linfócitos de pacientes com DP, em comparação com indivíduos controle. A quantificação do ATP sérico demonstrou níveis aumentados em pacientes com DP, desempenhando um papel pró-inflamatório, atuando como um padrão molecular associado ao dano (DAMP), devido as agressões geradas pela *P. gingivalis* (patógeno crucial na DP). O aumento do ATP extracelular favorece a descompensação do sistema imunológico, com alta liberação de citocinas pró-inflamatórias para o meio (BURNSTOCK; KNIGHT, 2018).

5 Conclusão

Apesar de poucos trabalhos publicados envolvendo a DP e a quantificação dos componentes do sistema purinérgico, o presente estudo demonstrou que a DP é inerentemente sistêmica, não se limitando ao periodonto, visto que as análises em sangue periférico demonstraram alterações consideráveis em relação as enzimas CD39 e CD73, e nos níveis sérios de ATP. Também foi observado que quanto maior a gravidade da DP, menor é a hidrólise de ATP e ADP pela CD39, e de AMP pela CD73, e maiores os níveis do eATP.

Referências Bibliográficas

ALMEIDA-DA-SILVA, C. L. C. et al. Purinergic signaling during *Porphyromonas gingivalis* infection. **Biomedical Journal**, v. 39, n. 4, p. 251–260, ago. 2016.

BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G. E. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. **International Review of Cytology**, v. 240, p. 31–304, 2004.

BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G. E. The potential of P2X7 receptors as a therapeutic target, including inflammation and tumour progression. **Purinergic Signalling**, v. 14, n. 1, p. 1–18, mar. 2018.

FOUNTAIN, S. J.; BURNSTOCK, G. An evolutionary history of P2X receptors. **Purinergic Signalling**, v. 5, n. 3, p. 269–272, set. 2009.

LEAL, D.B. et al. Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1721, p.9-15, 2005.

LEE, J. S. et al. Host surface ectonucleotidase-CD73 and the opportunistic pathogen, *Porphyromonas gingivalis*, cross-modulation underlies a new homeostatic mechanism for chronic bacterial survival in human epithelial cells. **Virulence**, v. 11, n. 1, p. 414–429, 31 dez. 2020.

PERES, M. A. et al. Oral diseases: a global public health challenge. **Lancet (London, England)**, v. 394, n. 10194, p. 249–260, 20 jul. 2019.

YILMAZ, Ö. The chronicles of *Porphyromonas gingivalis*: the microbium, the human oral epithelium and their interplay. **Microbiology**, v. 154, n. 10, p. 2897–2903, 1 out. 2008.

Palavras-chave: Sistema purinérgico. Inflamação. Periodontite. Gengivite.

Nº de Registro no sistema Prisma: PES-2021-0556.

Financiamento UFFS.