



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL**  
**CAMPUS CHAPECÓ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**  
**CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

**SILVIANE CUNICO CARNEIRO FÜCHTER**

**SISTEMA PURINÉRGICO, ESTRESSE OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO NA**  
**DOENÇA PERIODONTAL**

**CHAPECÓ**

**2023**

**SILVIANE CUNICO CARNEIRO FÜCHTER**

**SISTEMA PURINÉRGICO, ESTRESSE OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO NA  
DOENÇA PERIODONTAL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas, sob a orientação da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel.

**CHAPECÓ**

**2023**

## UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

Rodovia SC 484, Km 02  
Bairro Fronteira Sul  
Chapecó, SC – Brasil  
Caixa Postal 181  
CEP: 89815-899

### Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Fuchter, Silviane Cunico Carneiro  
SISTEMA PURINÉRGICO, ESTRESE OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO  
NA DONÇA PERIODONTAL / Silviane Cunico Carneiro Fuchter.  
-- 2023.  
61 f.

Orientadora: Doutora Sarah Franco Vieira de Oliveira  
Maciel

Co-orientadora: Doutora Débora Tavares de Resende e  
Silva

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da  
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biomédicas, Chapecó,SC, 2023.

1. Doença periodontal. 2. Inflamação. 3. Sistema  
purinérgico. 4. Estresse oxidativo. I. , Sarah Franco  
Vieira de Oliveira Maciel, orient. II. , Débora Tavares  
de Resende e Silva, co-orient. III. Universidade Federal  
da Fronteira Sul. IV. Título.

**SILVIANE CUNICO CARNEIRO FÜCHTER**

**SISTEMA PURINÉRGICO, ESTRESSE OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO NA  
DOENÇA PERIODONTAL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS. Para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas defendido em banca examinadora em 15/02/2023

Aprovado em: 15/02/2023

BANCA EXAMINADORA



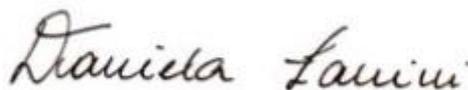
---

Profª Dra. Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel - UFFS  
Presidente da banca/orientadora



---

Profª Dra. Beatriz da Silva Rosa Bonadiman - UNOCHAPECÓ  
Membro titular externo



---

Profª Dra. Daniela Zanini – UFFS  
Membro titular interno

Chapecó/SC, fevereiro de 2023

## RESUMO

A doença periodontal (DP) é caracterizada pela presença de um processo inflamatório crônico, devido ao acúmulo de biofilme bacteriano e a resposta do hospedeiro frente a esses patógenos, tendo como consequência a destruição dos tecidos de suporte das estruturas dentais. Estudos têm revelado que componentes do sistema purinérgico, estresse oxidativo (EO) e da inflamação estão relacionados com o desenvolvimento e a progressão da DP. O objetivo foi avaliar parâmetros clínicos periodontais, a modulação do sistema purinérgico, do EO e da inflamação em pacientes com DP, comparados com indivíduos sem a doença. Trata-se de um estudo transversal com análise quantitativa, com total de 82 participantes, sendo 25 indivíduos saudáveis e 57 indivíduos com DP. Dos resultados observados, houve redução significativa na hidrólise de Trifosfato de Adenosina (ATP), Difosfato de adenosina (ADP) e Monofosfato de adenosina (AMP) em linfócitos dos indivíduos do grupo com DP em relação ao grupo controle, indicando que indivíduos com DP apresentaram redução da atividade da NTPDase 1 (CD39) e Ecto-5'-nucleotidase (CD73). A atividade da Adenosina Deaminase (ADA) na saliva e soro dos indivíduos com DP foi significativamente maior em comparação ao grupo controle. O ATP extracelular (eATP) demonstrou aumento estatisticamente significativo na DP. A concentração sérica da Proteína C Reativa (PCR) apresentou aumento estatisticamente significativo em indivíduos com DP. Nas análises do estresse oxidativo (EO), houve diminuição estatisticamente significativa das defesas antioxidantes dos indivíduos com DP nas análises de Vitamina C e Superóxido dismutase (SOD), e um aumento dos níveis séricos nas análises referentes a determinação de espécies reativas (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico/TBARS e espécies reativas de oxigênio/EROs). Através do questionário de autorrelato de condição periodontal, podemos traçar o perfil dos participantes acometidos pela DP, além de visualizar os principais hábitos e fatores associados ao desencadeamento e manutenção da DP, sendo que no grupo com DP, poucos participantes relataram fazer uso de fio dental, não escovavam os dentes todos os dias e não vão ao dentista regularmente. Portanto, vemos que as enzimas do sistema purinérgico estão presentes na modulação da DP, levando indivíduos acometidos pela doença a um estado pró-inflamatório. Contribuindo para geração de espécies reativas e a desordem entre defesas as antioxidantes e oxidantes, dificultando a ação sistema imune, aumentando marcadores séricos de inflamação (PCR).

**Palavras-chave:** Doença periodontal. Sistema purinérgico. Inflamação. Estresse oxidativo.

## ABSTRACT

Periodontal disease (PD) is characterized by the presence of a chronic inflammatory process, due to the accumulation of bacterial biofilm and the host's response to these pathogens, resulting in the destruction of supporting tissues of dental structures. Studies have revealed that components of the purinergic system, oxidative stress (OS) and inflammation are related to the development and progression of PD. The objective was to evaluate periodontal clinical parameters, the modulation of the purinergic system, OS and inflammation in patients with PD, compared with individuals without the disease. This is a cross-sectional study with quantitative analysis, with a total of 82 participants, 25 healthy individuals and 57 individuals with PD. From the observed results, there was a significant reduction in the hydrolysis of Adenosine Triphosphate (ATP), Adenosine Diphosphate (ADP) and Adenosine Monophosphate (AMP) in lymphocytes of individuals in the group with PD in relation to the control group, indicating that individuals with PD presented reduced activity of NTPDase 1 (CD39) and Ecto-5'-nucleotidase (CD73). Adenosine Deaminase (ADA) activity in the saliva and serum of individuals with PD was significantly higher compared to the control group. Extracellular ATP (eATP) showed a statistically significant increase in PD. The serum concentration of C-Reactive Protein (CRP) showed a statistically significant increase in individuals with PD. In the analyzes of oxidative stress (OS), there was a statistically significant decrease in the antioxidant defenses of individuals with PD in the analyzes of Vitamin C and Superoxide Dismutase (SOD), and an increase in serum levels in the analyzes referring to the determination of reactive species (reactive substances to thiobarbituric acid/TBARS and reactive oxygen species/ROS). Through the questionnaire of self-report of periodontal condition, we can profile the participants affected by PD, in addition to visualizing the main habits and factors associated with the triggering and maintenance of PD, and in the group with PD, few participants reported using dental floss, didn't brush their teeth every day and don't go to the dentist regularly. Therefore, we see that the enzymes of the purinergic system are present in the modulation of PD, leading individuals affected by the disease to a pro-inflammatory state. Contributing to the generation of free radicals and the disorder between antioxidant and oxidant defenses, hindering the action of the immune system, increasing serum markers of inflammation (CRP).

**Keywords:** Periodontal disease. Purinergic system. Inflammation. Oxidative stress.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Hidrólise de ATP, ADP e AMP em linfócitos .....	29
Figura 2 - Atividade da ADA na saliva, soro e em linfócitos .....	30
Figura 3 - Níveis extracelulares de ATP .....	31
Figura 4 - Concentração sérica de PCR .....	32
Figura 5 - Atividade da MPO .....	32
Figura 6 - Níveis séricos de PSH .....	33
Figura 7 - Níveis séricos de Vitamina C .....	34
Figura 8 - Atividade da SOD .....	35
Figura 9 - Níveis séricos de TBARS .....	37
Figura 10 -Níveis séricos de EROs .....	38

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Questionário de condição periodontal.....	39
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

5'-AMPc	3'-5' - monofosfato de adenosina cíclico
AAP	Academia Americana de Periodontia
ADA	Adenosina Deaminase
Ado	Adenosina
ADP	Difosfato de adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
AR	Artrite reumatoide
ATP	Trifosfato de Adenosina
CBA	Cytometric Bead Array
CD	Cirurgião-dentista
CD39	Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1
CD73	Ecto-5'-nucleotidase
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
COVID-19	Coronavírus 2019
DAMP	Padrão molecular associado ao dano
DM1	Diabetes tipo 1
DM2	Diabetes tipo 2
DP	Doença periodontal
DTNB	5,5'-dítio bis-nitrobenzólico
eATP	ATP extracelular
EDTA	Ácido etileno diamino tetra-acético
E-NPP	Ectonucleosídeo pirofosfatase/fosfodiesterase
E-NTPDase /CD39	Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1
EO	Estresse oxidativo
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EPI's	Equipamento de proteção individual
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2

IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-17 a	Interleucina-17 alfa
LPSs	Lipopolissacarídeos
MPO	Mieloperoxidase
N	Número amostral
NAD+	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo oxidado
NDKs	Nucleosídeo-difosfato quinases
NF-k $\beta$	Fator nuclear kappa $\beta$
NIC	Nível Inserção Clínica
PCR	Proteína C Reativa
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
Pi	Fosfato inorgânico
Rpm	Rotações por minuto
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
UBS	Unidade Básica de Saúde
UFFS	Universidade Federal da Fronteira Sul
UNOESC	Universidade do Oeste de Santa Catarina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
1.1	PROBLEMA.....	12
1.2	HIPÓTESE.....	12
1.3	OBJETIVOS.....	12
<b>1.3.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>12</b>
<b>1.3.2</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>12</b>
1.4	JUSTIFICATIVA.....	13
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>14</b>
2.1	DOENÇA PERIODONTAL .....	14
2.1.1	<b>DP e doenças sistêmicas .....</b>	<b>15</b>
2.2	SISTEMA PURINÉRGICO.....	16
2.3	SISTEMA PURINÉRGICO E DP.....	18
2.4	INFLAMAÇÃO NA DP.....	19
2.5	ESTRESSE OXIDATIVO.....	20
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>22</b>
3.1	DESENHO DO ESTUDO .....	22
<b>3.1.1</b>	<b>Critérios de inclusão e exclusão.....</b>	<b>23</b>
3.2	AUTORRELATO DE CONDIÇÃO PERIODONTAL.....	23
3.3	COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO.....	23
<b>3.3.1</b>	<b>Processamento e separação dos componentes sanguíneos.....</b>	<b>24</b>
3.4	MARCADORES INFLAMATÓRIOS: DETERMINAÇÃO SÉRICA DA PROTEÍNA C REATIVA (PCR) E ATIVIDADE DA MPO.....	25
3.5	ENSAIOS ENZIMÁTICOS E DOS NÍVEIS SÉRICOS DE ATP.....	25
3.6	BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	25
3.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	26
3.8	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	26
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	28
4.2	PARÂMETROS DO SISTEMA PURINÉRGICO.....	28

4.3	PROTEÍNA C REATIVA (PCR).....	31
4.4	ESTRESSE OXIDATIVO.....	32
<b>4.4.1</b>	<b>Antioxidantes.....</b>	<b>32</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Marcadores de Danos Oxidativos.....</b>	<b>35</b>
4.5	QUETIONÁRIO DE AUTORRELATO DE CONDIÇÃO PERIODONTAL.....	38
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>47</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>48</b>
	<b>ANEXO A.....</b>	<b>55</b>
	<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>58</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal (DP) é uma doença inflamatória crônica desencadeada por bactérias que compõe o biofilme dental, que causa destruição dos tecidos de suporte dentário (periodonto), com alta prevalência em todo o mundo. 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*) é considerada um patógeno-chave, com papel central no desenvolvimento da DP, ela busca driblar os mecanismos de defesa imune, afim de garantir sua sobrevivência no hospedeiro, causando injúrias ao periodonto (ALMEIDA-DA-SILVA *et al.*, 2016). Embora a DP não seja fatal, os patógenos periodontais podem adentrar através da circulação sistêmica e se instalar em outros órgãos e sistemas, levando ao desenvolvimento de algumas doenças sistêmicas como as cardíacas, endócrinas, metabólicas, infecciosas, autoimunes e neoplásicas (MATSUSHITA *et al.*, 2020).

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 processo inflamatório, e mais recentemente com o sistema purinérgico e com o estresse oxidativo (EO)(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 (FOUNTAIN; BURNSTOCK, 2009), combinada com ampla dispersão de receptores purinérgicos por todo o corpo, reflete seu papel central em inúmeros processos fisiológicos e fisiopatológicos (BURNSTOCK; KNIGHT, 2004).

Durante a inflamação, células estressadas ou infectadas podem liberar trifosfato de adenosina (ATP) para o meio extracelular, que pode ser hidrolisado em adenosina por ectonucleotidases, como as enzimas NTPDase 1 (CD39) e Ecto-5'-nucleotidase (CD73) (RAMOS-JUNIOR *et al.*, 2020).

A principal causa da destruição do periodonto é devido a resposta inadequada do hospedeiro aos microrganismos e seus produtos. Os leucócitos polimorfonucleares, considerados a primeira linha de defesa, são responsáveis pela morte dos microrganismos através de processos oxidativos. Por sua vez, a morte oxidativa (superóxido, radicais hidroxila, ácido hipocloroso, peróxido de hidrogênio e cloraminas) leva à geração de espécies reativas de

oxigênio (EROs), enquanto a morte não oxidativa é mediada por várias enzimas lisossômicas, peptídeos e proteínas (ACQUIER *et al.*, 2016). Na presença de DP, os neutrófilos tornam-se hiperativos e causam EO excessivo e dano tecidual. Assim, um desequilíbrio entre enzimas proteolíticas e seus inibidores, e EROs e sistemas de defesa antioxidante, leva à destruição do tecido periodontal (BARTOLD; VAN DYKE, 2013).

No decorrer do referencial teórico, evidências mostrando que a sinalização purinérgica e o EO podem modular a sobrevivência da *P. gingivalis*, além de discutir seu papel na modulação do sistema imune na DP.

## 1.1 PROBLEMA

O sistema purinérgico e o EO estão relacionados ao desenvolvimento e agravamento de diversas doenças, incluindo a DP, e pouco se conhece sobre a atividade e expressão dos componentes biológicos desses sistemas, e a modulação frente a inflamação presente na DP.

## 1.2 HIPÓTESE

A pesquisa traz a seguinte hipótese: a modulação do sistema purinérgico e do EO estão envolvidos no processo inflamatório, relacionado ao estabelecimento e progressão da DP, pelo aumento do ATP extracelular advindo das injúrias ao periodonto.

## 1.3 OBJETIVOS

### 1.3.1 Objetivo Geral

Avaliar parâmetros clínicos periodontais, componentes da sinalização purinérgica, biomarcadores de EO e marcadores inflamatórios em participantes portadores da DP, comparados com indivíduos sem a doença.

### 1.3.2 Objetivos Específicos

- a) Analisar a atividade das enzimas CD39 e CD73 em linfócitos, e da adenosina deaminase (ADA) em linfócitos, soro e na saliva de participantes com diagnóstico de DP e de participantes saudáveis;

- b) Analisar os níveis séricos de ATP em participantes com diagnóstico de DP e em participantes saudáveis;
- c) Analisar os níveis séricos da proteína C reativa (PCR) e a atividade da Mieloperoxidase (MPO), em participantes com diagnóstico de DP e em participantes saudáveis;
- d) Analisar marcadores do EO: Atividade da Superóxido dismutase (SOD) e os níveis séricos da Vitamina C, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), EROs e Tióis Proteicos (PSH) em participantes com diagnóstico de DP e em participantes saudáveis;
- e) Analisar parâmetros de cuidados e hábitos com saúde bucal nos participantes com diagnóstico de DP e nos participantes saudáveis.

#### 1.4 JUSTIFICATIVA

A DP está entre as doenças com maior prevalência no mundo, gerando grande impacto na saúde pública, devido ao seu tratamento longo e de alto custo, além de causar danos ao periodonto, tendo consequência a perda dentária, deficiência na fala, dificuldades na alimentação, baixa autoestima e redução da qualidade de vida. Os resultados adversos da DP não se restringem apenas à cavidade bucal, afetando negativamente outros sistemas do corpo humano, sendo associados com doenças como o câncer colorretal, Alzheimer, diabetes, artrite reumatoide, complicações na gravidez, doenças cardiovasculares, dentre outras condições (MOMBELLI, 2003).

Apesar dos estudos e esforços que são realizados envolvendo o sistema purinérgico e EO e suas ações celulares, carecem de estudos para entender como as enzimas e outros componentes desses sistemas agem durante o processo inflamatório na DP, a fim de melhorar o diagnóstico e tratamento dos pacientes acometidos pela doença.

Ao pesquisar sobre a atuação do sistema purinérgico e do EO na DP, a Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) campus Chapecó se coloca na vanguarda científica. Assim, reafirma a sua importância em ser uma universidade pública em uma região afastada das capitais, e a difunde em âmbito nacional e internacional, valorizando os cursos de pós-graduação, visto que mune alunos de conhecimentos mais aprofundados.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 DOENÇA PERIODONTAL

A DP é caracterizada pela presença de um processo inflamatório crônico, devido ao acúmulo bacteriano organizado (biofilme) e a resposta do hospedeiro frente a esses patógenos, tendo como consequência a destruição dos tecidos de suporte das estruturas dentais (periodonto) (VAN DYKE; SERHAN, 2003; FREDMAN *et al.*, 2011; SÁNCHEZ *et al.*, 2013). Esses microrganismos que habitam a cavidade oral representam cerca de 50% das bactérias do corpo humano, em torno de 6 bilhões de bactérias, e dentre elas, aproximadamente 500 espécies (MOMBELLI, 2003).

Cerca de 50 a 90% da população adulta mundial são afetados pela DP (PIHLSTROM *et al.*, 2005), caracterizada pela condição patológica que acomete o periodonto, prejudicando sua função de proteção e sustentação dentária (NOVAK, 2002). Além de danos locais, a DP é capaz de produzir alterações fisiológicas danosas em vários outros locais do organismo, onde aumenta a predisposição para outras complicações sistêmicas (PAGE, 1998).

Os primeiros registros de classificações da DP foram no século XVIII, onde levavam em consideração os aspectos clínicos apresentados pela doença. O periodonto não estava inserido no conceito inicial, então acreditava-se que essa afecção bucal poderia ser dividida em danos a gengiva e danos ao osso (SCHLUGER *et al.*, 1981).

A gengiva saudável apresenta em média 10% de infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo adjacente ao epitélio, com o aumento da permeabilidade vascular e a migração de linfócitos. A gengivite inicial apresenta cerca de 15% de infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo, com a migração de linfócitos, neutrófilos e outras células inflamatórias. Já a gengivite estabelecida tem uma maior concentração de infiltrado inflamatório e plasmócitos. Na DP, além da gengivite estabelecida, ocorre a perda de inserção apical, com a presença de 50% ou mais de plasmócitos no infiltrado inflamatório, ocorrendo uma maior permeabilidade vascular e aumento do fluxo de drenagem de exsudato para o meio externo (KINANE, 2001).

A periodontite pode ser dividida em periodontite agressiva e periodontite crônica, ambas causam danos ao periodonto, com perda progressiva dos tecidos de suporte dos dentes (ARMITAGE, 1999).

A periodontite crônica é a mais prevalente, com progressão lenta e intercalada, com maior acometimento na população adulta. A prevalência e grau de severidade aumentam com a idade, onde um mesmo indivíduo pode apresentar diferentes graus de progressão, porém

quando se apresenta de forma isolada (menos de 30% dos sítios acometidos), é dado o nome de periodontite localizada, já quando se trata de mais de 30% de comprometimento do periodonto, é denominada periodontite generalizada. Tanto na periodontite localizada como na generalizada, sua classificação de severidade se dá pela perda do nível de inserção, avaliada clinicamente, onde divide-se em: leve, com perda de 1 a 2 mm; moderada, com perda de 3 a 4 mm; ou severa, com perda de inserção clínica (NIC) igual ou maior a 5 mm, segundo a Academia Americana de Periodontia (AAP, 1999).

### **2.1.1 DP e doenças sistêmicas**

A multidisciplinariedade é uma tendência mundial na área da saúde que agrega os conhecimentos das mais variadas enfermidades, pois ela busca pelo entendimento dos vários aspectos de uma doença, onde confere melhor conhecimento dos seus fatores predisponentes intrínsecos e extrínsecos, fatores de risco, mecanismos de regulação e cura. Nesse contexto, a DP cada vez mais vem sendo associada a doenças sistêmicas, baseados em mecanismos inflamatórios, metabólicos e infecciosos (TEIXEIRA *et al.*, 2019). Diante disso, apresentamos algumas condições sistêmicas que se relacionam com a DP.

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune sistêmica. A mesma ocorre quando o sistema imunológico começa a produzir imunoglobulinas contra as proteínas do organismo, encontradas no líquido sinovial e nas articulações. A conexão entre a AR e DP deve-se a presença de bactérias anaeróbias Gram-negativas, que são frequentemente encontradas na DP e nos sítios de inflamação da AR (DETERT *et al.*, 2010). A *P. gingivalis*, em particular, é capaz de invadir e colonizar os condrócitos humanos da articulação do joelho, interferindo no ciclo celular e levando essas células a apoptose (PISCHON *et al.*, 2009).

A diabetes é uma das endocrinopatologias mais prevalentes, afetando a população mundial numa idade cada vez mais jovem. É classificada como diabetes tipo 1 (DM1), no qual as células beta produtoras de insulina são destruídas, e diabetes tipo 2 (DM2), no qual o pâncreas produz continuamente insulina, porém devido a uma incapacidade de absorção das células musculares e adiposas, a glicose na corrente sanguínea não consegue ser suficientemente metabolizada, criando a chamada "resistência insulínica" (FARDIN *et al.*, 2009). A associação entre a DP e DM2 é devido a DP ativar a imunidade inata através da regulação de secreção de citocinas pró-inflamatórias pelos monócitos e leucócitos polimorfonucleares. Na DP, devido a presença de bactérias Gram-negativas que liberam uma endotoxina lipopolissacarídea (LPS), é desencadeada uma resposta imunológica exacerbada,

aumentando consideravelmente os níveis locais de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e prostaglandina E2. Estas ganham a circulação sistêmica, onde podem perpetuar o estado inflamatório a órgãos e tecidos. O aumento de interleucinas nos tecidos aumenta a resistência à insulina e os níveis de glicose circulante (TUNES; FOSS-FREITAS, 2010).

O aumento brusco de hormônios femininos durante a gestação pode exacerbar a inflamação gengival com a presença de biofilme na superfície dos dentes. A prevenção da formação do biofilme dentário depende muito da presença de hábitos adequados de higiene bucal e do acompanhamento da gestante pelo dentista durante o pré-natal. Pesquisas vem demonstrando a associação existente entre a DP e a saúde geral da mãe e do seu bebê, podendo gerar resultados adversos na gravidez, como parto prematuro, bebês de baixo peso ao nascimento e pré-eclâmpsia (KATZ *et al.*, 2009).

Estudos que traçam relações entre a DP e o Alzheimer apresentaram testes realizados em portadores de Alzheimer em que a bactéria *P. gingivalis* foi encontrada no cérebro e no líquido espinhal dos pacientes. Como a doença se caracteriza pela perda sináptica e pela morte neuronal em regiões do cérebro responsável por funções cognitivas e de memória, pessoas com esse diagnóstico podem ter a alimentação e a higiene bucal comprometidas. Além disso a infecção oral com *P. gingivalis* prejudica a função cognitiva, aumentando a deposição de placas amiloides que são tóxicas para os neurônios e suas sinapses, reconhecida como o primeiro passo para o desenvolvimento do Alzheimer (DOMINY *et al.*, 2019).

O aumento da *P. gingivalis* pode ocorrer principalmente pela falha na remoção do biofilme dental, através da escovação, uso do fio dental e mastigação, bem como, não realizar consultas odontológicas com frequência (KATZ *et al.*, 2009), resultando em translocação já documentada para uma variedade de tecidos, incluindo artérias coronárias (FORNER *et al.*, 2006), placenta (KATZ *et al.*, 2009), e fígado (ISHIKAWA *et al.*, 2013). Um estudo recente demonstrou que 100% dos pacientes com doença cardiovascular apresentavam colonização arterial pela *P. gingivalis* (MOUGEOT *et al.*, 2017).

## 2.2 SISTEMA PURINÉRGICO

Os nucleotídeos ATP, difosfato de adenosina (ADP), monofosfato de adenosina (AMP) e o nucleosídeo adenosina (Ado) participam de diferentes processos celulares, como estímulo ou inibição da apoptose, proliferação, migração, diferenciação, secreção de fatores de crescimento e mediadores inflamatórios. Sendo assim, processos patofisiológicos

fundamentais, como o câncer e doenças com importante componente inflamatório (como a DP), são modulados pela sinalização purinérgica (DI VIRGILIO; ADINOLFI, 2017).

Experiências de clonagem identificaram quatro receptores de Ado (P1) acoplados a proteína G (A1, A2A, A2B, A3), sete subtipos de receptores de canais iônicos para nucleotídeos P2X (P2X1-7), e oito subtipos de receptores para nucleotídeos acoplados à proteína G (P2Y1, 2, 4, 6, 11-14) (OCHOA-CORTES *et al.*, 2014). Os receptores P1 estão presentes na superfície celular em todos os órgãos e tecidos, permitindo a ativação de suas vias de sinalização, e representam alvos farmacológicos importantes (GESSI *et al.*, 2004). Os nucleotídeos extracelulares, como ATP e ADP, são hidrolisados pelas ectoenzimas, principalmente ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase, sendo o subtipo 1 a CD39), ectonucleosídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPP) e CD73. Os nucleotídeos ATP e ADP regulam a inflamação e imunidade através da ativação de receptores P2 purinérgicos/pirimidinérgicos (P2X e P2Y). As enzimas E-NTPDases interagem funcionalmente com os receptores P2Y, por exemplo, terminando a sinalização do receptor P2, modulando a dessensibilização do receptor, alterando especificidades da resposta ou até mesmo gerando moléculas de sinalização (ADP) a partir de ATP (KUNZLI *et al.*, 2011).

As ectonucleotidases (CD39, E-NPP, CD73) são enzimas que fazem a hidrólise dos nucleotídeos extracelulares da adenina. A CD39 e a E-NPP são responsáveis pela hidrólise dos nucleotídeos ATP e ADP, formando AMP, que será metabolizado pela enzima CD73 formando Ado (ROBSON, *et al.*, 2006). Posteriormente, a Ado é convertida pela enzima ADA em inosina e hipoxantinas (ROBSON *et al.*, 2006; YEGUTKIN, 2008), metabólitos menos ativos e menos tóxicos. A Ado é um importante marcador inflamatório (OCHOA-CORTES *et al.*, 2014).

A ADA e as ectonucleotidases são enzimas de membrana que têm a capacidade de controlar os níveis de nucleotídeos na circulação (MALDONADO, *et al.*, 2012). As E-NPPs 1, 2 e 3 são os subtipos capazes de hidrolisar nucleotídeos (ROBSON *et al.*, 2006), como 3'-5'-monofosfato de adenosina cíclico (5'-AMPc) a AMP; ATP a AMP e difosfato inorgânico (PPi); ADP a AMP e fosfato inorgânico (Pi); nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado (NAD<sup>+</sup>) a AMP e nicotinamida mononucleotídeo (ZIMMERMANN, 2001). As E-NTPDases controlam a biodisponibilidade de ATP (CARDOSO *et al.*, 2015). São oito membros – E-NTPDases 1 – 8, que diferem entre si quanto à especificidade de substrato, distribuição e localização tecidual (ZIMMERMANN, 2001). Essa classe de ectoenzimas está ancorada à membrana plasmática via domínios hidrofóbicos com o sítio ativo voltado para o meio extracelular (ROBSON *et al.*, 2006). A ecto-5'-nucleotidase tem sete membros, seis citosólicos e uma ectoenzima (CD73), que também está ancorada à membrana plasmática. Essa enzima gera Ado extracelular a partir

do AMP. Na maioria dos tecidos, sua atividade é o passo limitante da velocidade de formação de Ado a partir de nucleotídeos de adenina (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998). A ADA catalisa a desaminação da Ado e desoxiadenosina em inosina e desoxiinosina. Apesar de grande parte desta enzima estar presente no meio intracelular, ela também está localizada na superfície celular, sendo encontrada alterada em situações patológicas (SPYCHALA, 2000).

### 2.3 SISTEMA PURINÉRGICO E DP

O sistema de sinalização purinérgica tem um amplo papel fisiológico e patológico (FRANKE *et al.*, 2012; BURNSTOCK; DI VIRGILIO, 2013), onde se tratando da DP, está presente relacionado à inflamação dos tecidos de sustentação (periodonto), como na remodelação óssea, onde ocorre a transmissão de sinais de nucleotídeos extracelulares via receptores purinérgicos da família P2 (KIM *et al.*, 2018).

No periodonto acometido pela DP, as vias de sinalização purinérgica subjacentes às respostas associadas com a ativação dos receptores P2 (P2X5 e P2X7), secretam citocinas, devido a ligação entre o ATP com esses receptores. Quando ativado, os receptores, regulam várias funções celulares, como a proliferação e a apoptose, onde apresentam papel crucial na inflamação e remodelação óssea, além disso, os receptores purinérgicos estão envolvidos na ativação do inflamassoma, favorecendo a secreção de citocinas pró-inflamatórias no ambiente (GARTLAND *et al.*, 2012).

Os principais processos imunológicos mediados pela sinalização do receptor P2X7 de ATP extracelular (eATP) incluem morte celular, motilidade celular, fagocitose microbiana e processamento da liberação de citocinas pró-inflamatórias. Essas respostas específicas do hospedeiro induzidas por eATP suportam a ideia de que essa pequena molécula de sinalização derivada do hospedeiro pode ser usada para controlar ou limitar a colonização patogênica dos tecidos do hospedeiro. De fato, avanços na rede de sinalização purinérgica identificaram a liberação de eATP após a infecção como vital para a resposta imune inata a uma variedade de patógenos, como a *P. gingivalis* (BOURS *et al.*, 2006).

O patógeno periodontal oportunista *P. gingivalis* é um colonizador bem-sucedido da mucosa oral que pode invadir e se espalhar intercelularmente no epitélio gengival humano sem alertar o sistema imunológico para sua presença (YILMAZ, 2008). A *P. gingivalis* possui uma variedade de estratégias de evasão imune, e a enzima nucleosídeo-difosfato quinase (NDK) parece ser um componente emergente de seu arsenal de moléculas efetoras. Dado que os níveis locais de eATP participam na ativação de processos imunológicos altamente regulados para

limitar a infecção, a prevenção das respostas iniciais do hospedeiro mediadas por eATP parece ser essencial para o estabelecimento de infecções crônicas bem-sucedidas por *P. gingivalis* (HAJISHENGALLIS, 2009).

NDKs catalisam a transferência de ortofosfatos de trifosfatos de nucleosídeos, como ATP, para difosfatos de nucleosídeos, permitindo assim controlar os *pools* de nucleotídeos dentro das células (SPOONER; YILMAZ, 2012). Além disso, NDKs secretadas podem ser usadas por bactérias persistentes intracelulares, como a *P. gingivalis*, para mascarar sua presença no sistema imunológico do hospedeiro, eliminando eATP (COUTINHO-SILVA; OJCIUS, 2012). Ao contrário de muitas outras bactérias infecciosas, a *P. gingivalis* pode estimular a produção de pró interleucina 1 beta (pró IL-1 $\beta$ ) biologicamente inativa em tecidos gengivais infectados, mas não induz liberação significativa da forma ativa secretada de IL-1 $\beta$ . A secreção ativa de IL-1 $\beta$  em tecido gengival infectado por *P. gingivalis* ocorre apenas após estimulação com eATP (YILMAZ, 2008). A *P. gingivalis* inibe a apoptose mediada pelo P2X7, desencadeada por ATP em tecido gengival infectado, bem como a geração de EROs celulares induzida por eATP. Esses estudos implicam em um papel potencialmente crítico para *P. gingivalis*, na modulação da resposta imune do hospedeiro, desencadeando a secreção de citocinas inflamatórias em indivíduos com DP (CHOI *et al.*, 2013).

## 2.4 INFLAMAÇÃO NA DP

Sabe-se que a inflamação é um evento fisiológico frente a agressões, sejam elas por estresse, calor, agentes químicos, infecções ou lesões. A inflamação inicial no periodonto é considerada uma defesa fisiológica que combate os danos gerados pelos microrganismos presentes no biofilme dental, onde inicia-se o processo de cicatrização, ao invés de uma resposta patológica. Porém quando essa agressão se torna persistente, a inflamação pode gerar danos ao tecido, como a sua ruptura. A DP ocorre devido a uma falha na resolução da inflamação, resultando na inflamação crônica e destrutiva (KINANE, 2008). Já inflamação inicial é a resposta imune protetora ao biofilme, onde são vistos fatores de virulência que interagem com o hospedeiro, desencadeando a migração de células primárias de defesa e a secreção de citocinas pró-inflamatórias da resposta inata, dentre elas a IL-6, IL-1 e TNF- $\alpha$  (CEKICI *et al.*, 2014).

A PCR é uma proteína de fase aguda, sendo conhecida como um importante marcador inflamatório inespecífico, porém altamente sensível. É produzida pelas células hepáticas em resposta a lesões que o organismo possa ter sofrido (GOMES-FILHO *et al.*, 2011). Infecção

sistêmica, trauma e hipóxia estão associados ao aumento da produção de PCR. Além disso, citocinas inflamatórias, como IL-6, IL-1 e TNF- $\alpha$  podem desencadear a produção de PCR pelos hepatócitos (PANDEY, 2014).

A destruição periodontal resulta devido a ação de vários produtos tóxicos liberados pelas bactérias patogênicas específicas, bem como da resposta do hospedeiro contra estas e seus produtos. A resposta inflamatória resulta em ulceração gengival ao redor do dente, o que pode permitir que células bacterianas intactas ou seus produtos, incluindo lipopolissacarídeos, peptidoglicanos e enzimas hidrolíticas, adentrem na circulação sistêmica (MUSALIAH *et al.*, 2014). O sistema imunológico reage através da liberação de citocinas pró-inflamatórias, as quais parecem mediar as vias locais e sistêmicas de inflamação. À vista disso, uma resposta inflamatória aguda não específica é desencadeada, ocasionando a síntese de proteínas de fase aguda como a PCR (CHAPPLE *et al.*, 2013).

## 2.5 ESTRESSE OXIDATIVO

O EO é um estado de desequilíbrio entre radicais livres e a degradação insuficiente desses radicais por sistemas antioxidantes. As EROs são agentes oxidantes que podem causar vários danos em nível celular, de proteínas e DNA (SIES, 1991; VALKO, 2007; PHAM-HUY *et al.*, 2008). Os antioxidantes agem como mecanismo de defesa do organismo frente a agentes oxidantes, onde buscam reparar os danos por eles causados (VALKO *et al.*, 2007; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Evidências sugerem que o EO pode ser um agente causal tanto da inflamação local (periodonto) quanto da inflamação sistêmica. O EO, devido ao aumento de oxidantes e/ou a diminuição de antioxidantes, causa danos aos componentes celulares vitais, levando a destruição de tecidos devido a inativação de proteínas e pela peroxidação lipídica (CEKICI *et al.*, 2014). A geração de ERO no periodonto é potencializada pela presença de patógenos nocivos a ele. A DP é a associação entre microrganismos patogênicos e a resposta imunoinflamatória do hospedeiro. Os LPSs e outros componentes celulares dos microrganismos podem levar à produção de citocinas pró-inflamatórias, ocorrendo a ativação de vias de sinalização, a proteína ativadora 1 (AP-1) e o fator nuclear kappa $\beta$  (NF- $\kappa$   $\beta$ ). Ambos podem fazer tanto o recrutamento como a ativação de células imunes, onde geram a liberação de Erro. A AP-1 realiza o recrutamento e ativação de leucócitos polimorfonucleares hiper-responsivos (PMNs), e o NF- $\kappa$   $\beta$  culmina na destruição dos tecidos periodontais, devido à maior ativação de osteoclastos e por consequência o aumento das metaloproteinases de matriz

(MMP). A superprodução de peróxidos lipídicos, mediadores inflamatórios e proteínas oxidadas a partir da degradação do tecido leva ainda ao recrutamento e ativação de fagócitos (DAHIYA *et al.*, 2013).

Essas células de defesa do hospedeiro, por meio da fagocitose, induzem uma 'explosão oxidativa', que é caracterizada por um aumento no consumo de oxigênio e aumento da produção de ERO e outros produtos metabólicos (VO *et al.*, 2020).

As EROs resultam na degradação dos tecidos periodontais devido a sua capacidade de oxidar moléculas, como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, além de regular a transdução de sinal e a transcrição de genes envolvidos nas respostas imunoinflamatórias e morte celular. Isso produz ainda um círculo vicioso entre a liberação de EROs e a degradação dos tecidos periodontais por meio da cascata imunoinflamatória (DAHIYA *et al.*, 2013).

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de estudo transversal, com análise quantitativa, onde foram avaliados parâmetros inflamatórios, do sistema purinérgico e do EO na DP. O estudo incluiu participantes com e sem o diagnóstico de DP, organizados em dois grupos: participantes saudáveis (N= 25) e com DP (N= 57), previamente ao início do tratamento cirúrgico e/ou farmacológico. Os participantes foram selecionados a partir de contato prévio dos pesquisadores com o serviço público na atenção primária à saúde, onde foram selecionados durante consulta odontológica na Unidade Básica de Saúde (UBS) do município de Belmonte/SC, sendo a única UBS do município (Unidade Sanitária Sede de Belmonte), seguindo os critérios de inclusão e exclusão abaixo descritos. O tamanho amostral foi definido por conveniência. A coleta de material biológico e dos questionários foram realizados no ano de 2021, durante o período de pandemia da COVID-19, sendo então adotados todos os protocolos de segurança vigentes na UBS. Anteriormente à coleta das amostras biológicas, foi realizado contato com os participantes (pessoalmente na UBS ou por telefone), onde foram repassadas as informações pertinentes ao projeto, necessidade da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A), e para responder as questões de autorrelato de condição periodontal (ANEXO A). Dos indivíduos que concordaram com os objetivos da pesquisa, foram coletadas amostras de sangue periférico e de saliva. Os participantes saudáveis (controles) foram selecionados na UBS (pacientes em consultas de rotina). A assinatura do TCLE (APÊNDICE A), respostas as questões de autorrelato de condição periodontal (ANEXO A), coleta de sangue e de saliva, ocorreram nas dependências da UBS. Nas amostras sanguíneas foi realizada a separação dos linfócitos, soro e plasma. Nas amostras de linfócitos foram avaliadas a atividade enzimática de componentes do sistema purinérgico a partir da hidrólise de ATP, ADP e AMP, e a atividade da ADA no soro, saliva e linfócitos. Os níveis de eATP e PCR foram aferidas no soro. Nas amostras de plasma foi avaliada a atividade da MPO. As análises do EO (Vitamina C, TBARS e PSH) também foram avaliadas no soro dos participantes do estudo. No sangue total (ST) foi avaliada a atividade da SOD. As análises bioquímicas e moleculares foram realizadas nos laboratórios de pesquisa biológica da UFFS campus Chapecó e na Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC), no período de 2021 e 2022. A partir dessas análises, foram realizadas as comparações dos resultados obtidos entre os grupos e a verificação de alterações nos sistemas biológicos avaliados devido à presença da DP.

### 3.1.1 Critérios de inclusão e exclusão

Como critérios de inclusão:

- a) Participantes voluntários, com idade entre dezoito (18) anos completos e setenta (70) anos, com diagnóstico de DP;
- b) Os participantes controles voluntários, com idade entre dezoito (18) anos completos e setenta (70) anos, que não apresentavam DP em relação aos participantes com a DP).

Como critérios de exclusão:

- a) Participantes submetidos a tratamento periodontal nos seis meses anteriores à data de coleta dos materiais biológicos;
- b) Participantes que tenham recebido terapia antibiótica/anti-inflamatória nos seis meses anteriores à data de coleta dos materiais biológicos;
- c) Participantes que faziam uso de medicamentos que possam desencadear efeitos adversos no periodonto (anti-histamínicos, cortisona, hormônios, nifedipina e ciclosporina);
- d) Participantes gestantes, lactantes, diabéticos, fumantes, hipertensos e oncológicos.

### 3.2 AUTORRELATO DE CONDIÇÃO PERIODONTAL

Logo após a assinatura do TCLE (APÊNDICE A), os participantes foram submetidos a aplicação de questões de autorrelato da condição periodontal (ANEXO A).

A presente análise foi realizada a partir das respostas aos questionários de autorrelato de condição periodontal (ANEXO A), de Genco e colaboradores (2007). A população participante incluiu 82 indivíduos, de ambos os sexos com idade entre 18 e 70 anos, que após consulta odontológica responderam ao questionário, do qual foram selecionadas 14 perguntas, todas com respostas objetivas relacionadas à saúde bucal e condição socioeconômica do paciente.

### 3.3 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

A abordagem dos participantes ocorreu em sala reservada no setor de enfermagem da UBS. Foi realizada coleta de trinta mililitros (30 ml) de sangue total divididos em tubos *vacutainer* com Ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA; isolamento de linfócitos e de plasma), com citrato de sódio (separação do ST) e em tubos sem anticoagulante (separação do soro).

A coleta de sangue dos participantes foi realizada em um único momento, antes do início do tratamento cirúrgico e/ou farmacológico dos pacientes com periodontite. A coleta de saliva foi realizada com *Salivette*® (recipiente cônico com filtro absorvente), onde os participantes foram orientados a enxaguar a boca com água três vezes, posteriormente, receberam o filtro absorvente diretamente na cavidade bucal pelo coletador devidamente paramentado, a fim de evitar contaminação do filtro, respeitando um período de três minutos. Após esse procedimento, o filtro foi colocado no recipiente para a centrifugação. As amostras de saliva foram congeladas a -20 °C até o momento das análises. Nos laboratórios de pesquisa biológica da UFFS campus Chapecó, os materiais biológicos dos participantes foram devidamente processados e armazenados. As amostras separadas de linfócitos, soro, plasma e ST foram congeladas em freezer a -80 °C para as posteriores análises.

### **3.3.1 Processamento e separação dos componentes sanguíneos**

Para o isolamento de linfócitos, as amostras de sangue coletadas com EDTA foram diluídas em volume igual de solução salina. Posteriormente, a amostra diluída foi transferida para um tubo cônico contendo *Lymphoprep* (Ficoll-Histopaque), seguida de centrifugação a 1800 rotações por minuto (rpm), em temperatura ambiente, por 30 minutos. Após a centrifugação, ocorre a formação de um gradiente de densidade. Neste, forma-se uma camada intermediária composta pelas células mononucleares (linfócitos e monócitos) entre as camadas de plasma e Ficoll. Esta nuvem de células foi cuidadosamente retirada sobre a camada superior (plasma) e transferida para tubo cônico limpo. Sobre as células foi acrescentada solução salina, seguida por centrifugação por 10 minutos a 1500 rpm. Em seguida, descartamos o sobrenadante e acrescentamos solução salina até a lavagem das células e remoção das plaquetas (Leal, 2005).

Para separação do plasma, foi coletado ST e centrifugado por 15 minutos a 3500 rpm. O plasma vai estar no sobrenadante, sendo retirado com uma pipeta e colocado em um eppendorf.

A separação de ST foi através da coleta em tubo com citrato de sódio, sendo levemente homogeneizado e separado em alíquotas com 300 ul.

A separação do soro foi através da coleta de ST em tubo sem anticoagulante, centrifugado por 15 minutos a 3500 rpm. O soro fica no sobrenadante, foi retirado com uma pipeta e transferido para um eppendorf.

### 3.4 MARCADORES INFLAMATÓRIOS: DETERMINAÇÃO SÉRICA DA PROTEÍNA C REATIVA (PCR) E ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO)

As medidas de PCR foram realizadas pelo método imunoturbidimétrico usando ultrakits sensíveis (PCR-us - sensibilidade de 0,05 mg/dl) (DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, Alemanha) (DE OLIVEIRA *et al.*, 2017).

A atividade da MPO é uma heme enzima produzida por mediadores inflamatórios e liberada a partir de leucócitos, onde a mesma é capaz de atuar na ativação de neutrófilos e linfócitos. A MPO catalisa a reação de íons de cloreto com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para gerar grandes quantidades de ácido hipocloroso (HOCl), uma espécie reativa de oxigênio que reage ainda mais para gerar oxigênio singlete e radical hidroxil (SUZUKI *et al.*, 1983). Na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como agente oxidante, a MPO catalisa o acoplamento oxidativo de fenol e AAP originando um produto colorido, a quinoneimina, com uma absorbância máxima de 512nm. Os resultados foram expressos em uM de quinoneimina produzido em 30 min (uMq/30min).

### 3.5 ENSAIOS ENZIMÁTICOS E DOS NÍVEIS SÉRICOS DE ATP

A atividade das enzimas do sistema purinérgico foi verificada nos linfócitos (CD39, CD73, ADA), no soro (ADA) e na saliva (ADA) dos participantes com a DP e controles. A atividade das enzimas CD39 e CD73 foi determinada como previamente descrito por LEAL (2005). A atividade da enzima ADA nos linfócitos foi determinada de acordo com o protocolo já descrito por GIUSTI e GALANTI (1984).

A atividade da ADA na saliva e soro foi determinada por kit comercial (Ebram Products Laboratory Ltda.®, SP, Brasil) de acordo com a desaminação da Ado em inosina por via cinética. Os valores foram expressos em UI(CHIELLE *et al.*, 2015).

A análise quantitativa de ATP circulante foi realizada utilizando o *ATP Determination Kit* (Invitrogen®) por ensaio de bioluminescência com luciferase de vaga-lume recombinante e seu substrato D-luciferina, no soro de pacientes com DP e dos indivíduos saudáveis. O ensaio é baseado no requisito da luciferase para ATP na produção de luz (emissão máxima ~ 560 nM em pH 7,8 (KARAMOHAMED; GUIDOTTI, 2001)). Foi realizada a solução de reação padrão e ajustado os volumes de acordo com os requisitos específicos. Após 15 minutos de incubação, a luminescência foi medida pelo Varioskan e representada como nM.

### 3.6 BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

Foi determinada a atividade da enzima SOD no ST dos indivíduos com DP e controles; os grupamentos SH, TBARS e quantificação de EROs no soro de indivíduos com DP e controles; a dosagem de Vitamina C no plasma de indivíduos com DP e controles.

A atividade da SOD foi efetuada pelo sistema de detecção adrenalina-adenocromo de acordo com o descrito por MC CORD e FRIDOVICH (1969). A determinação dos grupamentos SH proteicos foi realizada segundo o método descrito por ELLMAN (1959). Os níveis de TBARS foram determinadas através do método de JENTZSCH *et al.* (1996) modificado. A dosagem da Vitamina C foi realizada de acordo com a metodologia descrita por JACQUES-SILVA (2001). A quantificação de EROs foi realizada de acordo com o método de ALI, LEBEL e BONDY (1992).

### 3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise estatística foi realizada com o *software GraphPad Prism 9.0* (San Diego, CA, EUA). O teste de Shapiro-Wilk testou a normalidade. *Outliers* foram excluídos usando o teste de Grubbs. Sobre as variáveis do estudo, as diferenças entre pacientes com DP e indivíduos controle foram avaliadas pelo teste *t* de *Student* e teste de Mann-Whitney para dados não paramétricos. Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão. Foram consideradas estatisticamente significantes as diferenças em que a probabilidade de rejeição da hipótese de nulidade foi menor que 5% ( $p < 0,05$ ).

Para análise estatística do questionário de autorrelato de condição periodontal, após a tabulação dos dados, foram aplicados o teste *t* de *student* para as variáveis discretas; e *Qui-quadrado* para as variáveis qualitativas, utilizando a ferramenta *Epi Info*. Para a realização dos cálculos foram estabelecidas respostas de referência, sendo então comparadas com as demais respostas. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

### 3.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Todos os procedimentos realizados foram submetidos à avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFFS, de acordo com as normas da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde sobre Pesquisa envolvendo seres humanos, onde foi aprovado, sob o Número do Parecer: 4.662.702. Para participar do estudo, os indivíduos selecionados tiveram

que concordar com o exposto no TCLE (APÊNDICE A), fornecido pelos pesquisadores. Todos os participantes da pesquisa foram advertidos acerca dos riscos e benefícios trazidos pela sua participação e pelos procedimentos de coleta de materiais biológicos, sendo que dados pessoais foram mantidos em sigilo e cada participante foi identificado por um número distinto. Durante o desenvolvimento da pesquisa, que compreende os anos de 2021, 2022 e 2023, o material coletado ficará em posse da pesquisadora responsável e está sendo mantido em armário com cadeado, na sala da pesquisadora, nas dependências da UFFS campus Chapecó, ou em freezer no laboratório de pesquisa nas dependências da UFFS campus Chapecó, o qual apenas os pesquisadores envolvidos têm acesso. Após o período de cinco anos, os arquivos (físicos ou digitais) serão destruídos, arquivos físicos serão picotados e/ou queimados, arquivos digitais serão deletados, materiais biológicos adequadamente descartados.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Um total de 82 participantes foram incluídos no estudo, sendo 25 participantes no grupo controle (sem DP) e 57 pacientes com DP, destes, 25 participantes com gengivite e 32 com periodontite. Quanto ao sexo: dos participantes no grupo controle, 17 eram do sexo feminino (68%) e 8 do sexo masculino (32%); no grupo com DP, 31 eram do sexo feminino (54%) e 26 do sexo masculino (45%).

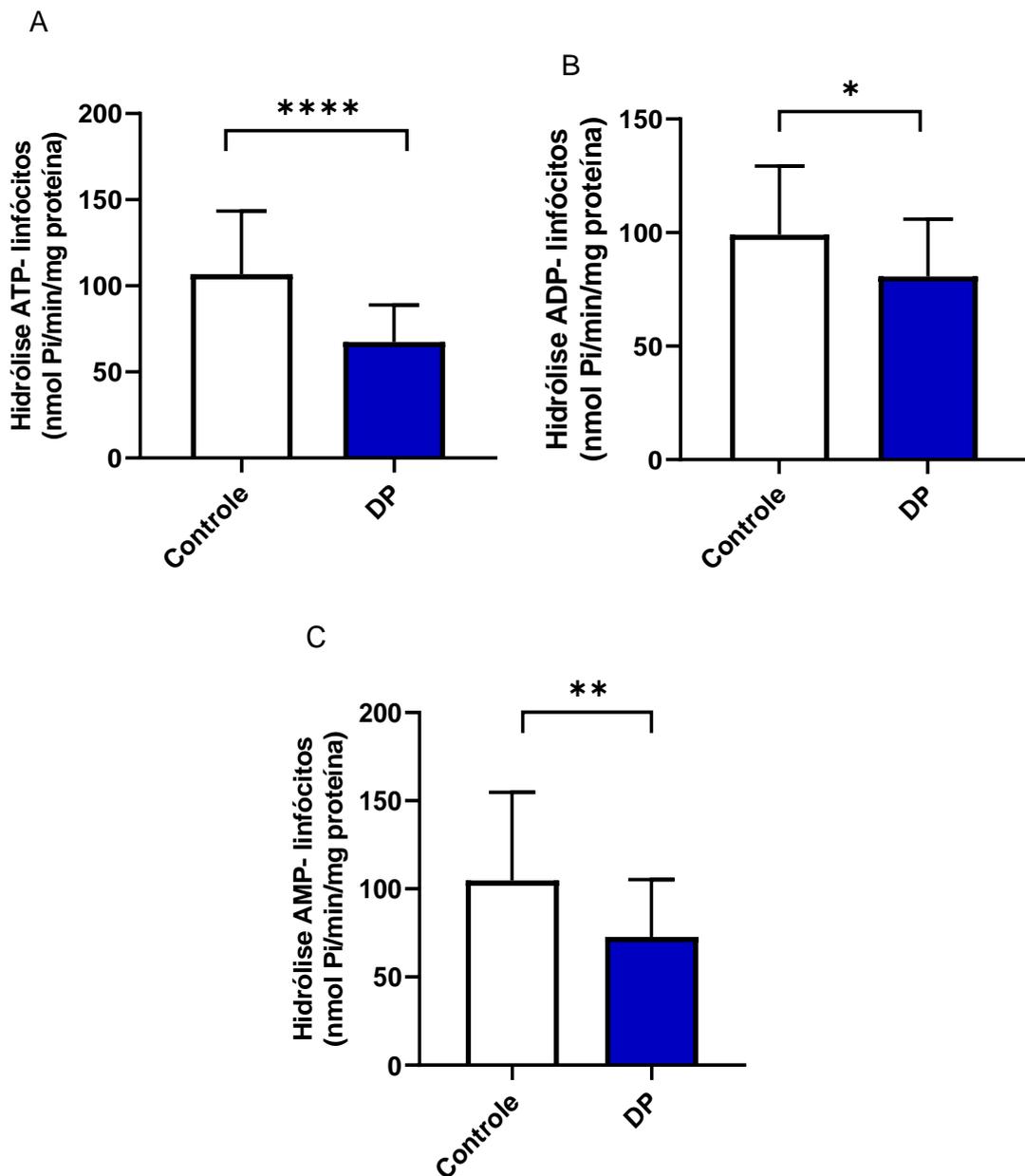
No grupo controle não houve sangramento gengival ou presença de bolsas periodontais durante a sondagem, sendo conferido em mais de um sítio (diversas faces dentais e em diferentes elementos dentais). Em participantes com gengivite, houve sangramento gengival durante a sondagem, porém não apresentaram bolsas periodontais. Em participantes com periodontite, houve sangramento gengival e presença de bolsa periodontal com perda de inserção clínica de 3 mm ou maior. Em todos os participantes foram realizadas várias sondagens, para descartar DP localizada (somente em um elemento dentário), seguindo a classificação de DP da AAP (1999).

### 4.2 PARÂMETROS DO SISTEMA PURINÉRGICO

Em linfócitos (Figura 1A, B, C) a hidrólise de ATP, ADP e AMP foi diminuída em participantes com DP, em comparação com o grupo controle, apresentando diferença estatisticamente significativa em todas as análises apontadas acima, sendo que os valores encontrados para cada grupo foi de: hidrólise de ATP na Figura 1A ( $106,8 \pm 36,58$  nmol Pi/min/mg no grupo controle e  $67,39 \pm 21,52$  nmol Pi/min/mg no grupo com DP) com valor de  $p < 0,0001$ ; hidrólise de ADP na Figura 1B ( $99,06 \pm 30,19$  nmol Pi/min/mg no grupo controle

e  $80,71 \pm 25,28$  nmol Pi/min/mg no grupo com DP) com valor de  $p < 0,05$ ; e hidrólise de AMP na Figura 1C ( $104,7 \pm 50,03$  nmol Pi/min/mg no grupo controle e  $72,79 \pm 32,44$  nmol Pi/min/mg no grupo com DP) com valor de  $p < 0,01$ . Os valores foram apresentados pela média e desvio padrão. N= 82 participantes, sendo 25 participantes no grupo controle e 57 participantes no grupo com DP.

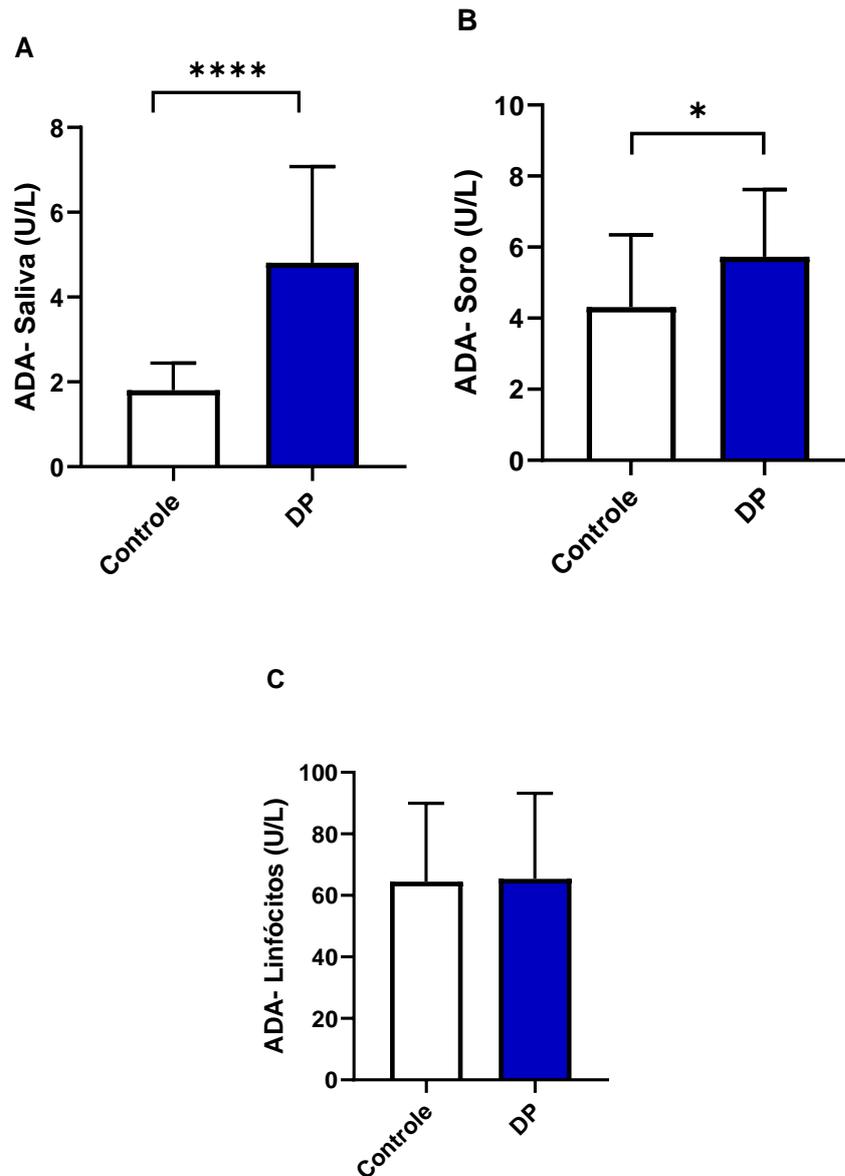
**Figura 1:** Hidrólise de ATP, ADP e AMP em linfócitos



Hidrólise de ATP, ADP e AMP em linfócitos de indivíduos controle e com DP. 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: Teste *t* de Student. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. N= 82. **A/B/C** Houve redução significativa na hidrólise de ATP, ADP e AMP em linfócitos de indivíduos com DP, quando comparados com participantes controle; \*( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ).

A Figura 2 ilustra a atividade da ADA na saliva, linfócitos e soro, de participantes controle e com DP. A ADA na saliva e soro (Figura 2A e 2B, respectivamente) demonstrou aumento significativo na sua atividade no grupo com DP em comparação com o grupo controle. Em linfócitos (Figura 2C) não houve diferença estatisticamente significativa quanto à atividade da ADA, sendo que os valores encontrados para cada grupo foram de: saliva ( $1,804 \pm 0,6405$  U/L no grupo controle e  $4,812 \pm 2,265$  U/L no grupo com DP) com valor de  $p < 0,0001$ ; soro ( $4,311 \pm 2,265$  U/L no grupo controle e  $5,732 \pm 1,890$  U/L no grupo com DP) com valor de  $p < 0,05$ ; e linfócitos ( $64,47 \pm 25,52$  U/L no grupo controle e  $65,38 \pm 27,85$  U/L no grupo com DP), com valor de  $p < 0,8946$ . Os valores foram apresentados pela média e desvio padrão. N= 82 participantes, sendo 25 participantes no grupo controle e 57 participantes no grupo com DP.

**Figura 2:** Atividade da ADA na saliva, soro e linfócitos



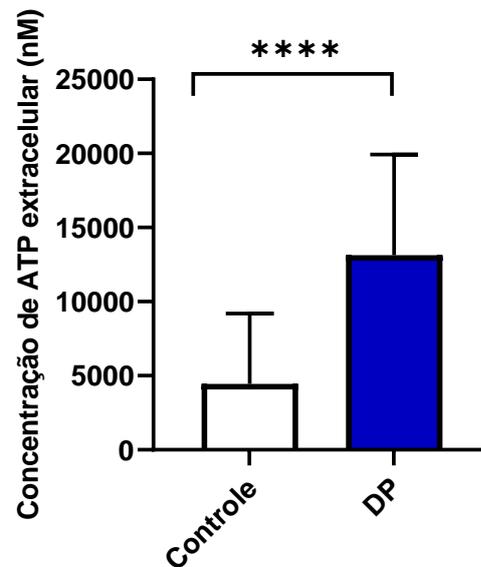
**Atividade da ADA** na saliva (A), soro (B) e linfócitos (C) de indivíduos controle e com DP. Os resultados foram expressos em unidades por litro (U/L). Análise estatística: Teste *t* de Student. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. N= 82.

**A/B-** A atividade da ADA apresentou aumento significativo na saliva e soro no grupo da DP em comparação com o grupo controle.

**C-** Não houve diferença estatisticamente significativa na atividade da ADA em linfócitos. Valor de  $p < 0,8946$ . \* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ).

Para confirmar as alterações nos níveis de eATP, este foi quantificado por bioluminescência no microambiente extracelular. A Figura 3 mostra que altos níveis de eATP foram observados em pacientes com DP em comparação com o grupo controle, com diferença estatística entre os grupos, sendo que os valores encontrados para cada grupo foram de:  $4438 \pm 1768$  nM no grupo controle e  $13141 \pm 6785$  nM no grupo com DP, com valor de  $p < 0,0001$ . Os valores foram apresentados pela média e desvio padrão. N= 82 participantes, sendo 25 participantes no grupo controle e 57 participantes no grupo com DP.

**Figura 3:** Níveis extracelulares de ATP

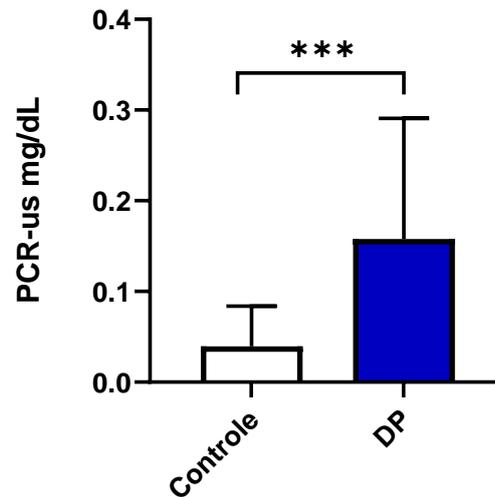


**Níveis extracelulares de ATP** em indivíduos controle e pacientes com DP. Os dados foram expressos em nM de ATP no soro, com aumento significativo do eATP em indivíduos com DP, quando comparados com indivíduos do grupo controle. Análise estatística: Teste *t* de Student. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. N= 82.

\* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ).

#### 4.3 PROTEÍNA C REATIVA-ULTRASSENSIVEL (PCR)

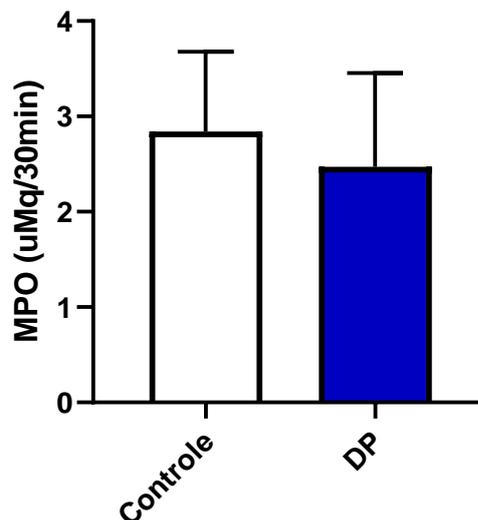
Quando a concentração sérica de PCR foi comparada entre o grupo controle e DP, foi verificada diferença estatisticamente significativa (Figura 4). Indivíduos com DP apresentaram concentrações de PCR maiores do que indivíduos controle, sendo que os valores encontrados para cada grupo foram de:  $0,03935 \pm 0,01452$  mg/dL no grupo controle e  $0,1578 \pm 0,1331$  mg/dL no grupo com DP, com valor de  $p < 0,001$ . Os valores foram apresentados pela média e desvio padrão. N= 65 participantes, sendo 21 participantes no grupo controle e 44 participantes no grupo com DP.

**Figura 4:** Concentração sérica de PCR

**Concentração sérica de PCR.** Aumento significativo de PCR em indivíduos com DP, quando comparados com indivíduos do grupo controle. Análise estatística: Teste de Mann-Whitney. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.  $N = 65$ .

\* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ).

A análise realizada avaliando os níveis séricos da MPO não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos, sendo que os valores encontrados para cada um foi de:  $2,842 \pm 0,8377$  uMq/30min no grupo controle e  $2,472 \pm 0,9818$  uMq/30min no grupo com DP, com valor de  $p < 0,0977$ . Os valores foram apresentados pela média e desvio padrão, e estes podem ser observados na Figura 5.  $N = 82$  participantes, sendo 25 participantes no grupo controle e 57 participantes no grupo com DP.

**Figura 5:** Atividade da MPO

**Atividade da MPO.** Não houve diferença estatisticamente significativa. Análise estatística: Teste *t* de Student. Valor de  $p < 0,0977$ .  $N=82$ .

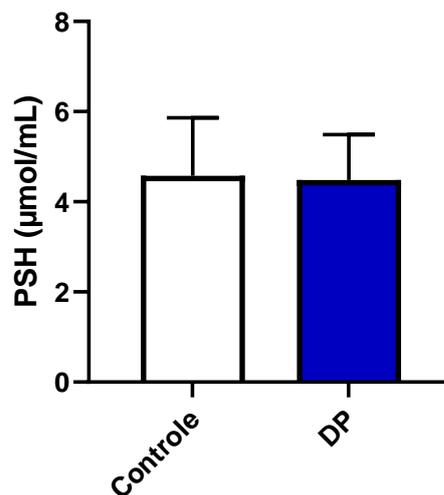
\* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ).

#### 4.4 PARÂMETROS DO ESTRESSE OXIDATIVO

##### 4.4.1 Antioxidantes

A quantificação dos níveis plasmáticos de PSH não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e DP, sendo que os valores encontrados para cada grupo foram de:  $4,579 \pm 1,282 \mu\text{mol/mL}$  no grupo controle e  $4,482 \pm 1,006 \mu\text{mol/mL}$  no grupo com DP, com valor de  $p < 0,7086$ . Os valores foram apresentados pela média e desvio padrão, e estes podem ser observados na Figura 6.  $N= 82$  participantes, sendo 25 participantes no grupo controle e 57 participantes no grupo com DP.

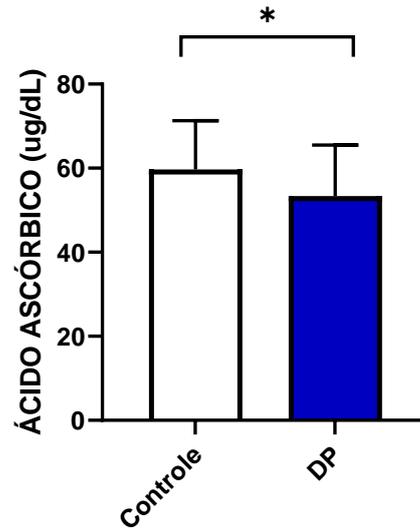
**Figura 6:** Níveis séricos de PSH



**Níveis séricos de PSH.** Os dados foram expressos em  $\mu\text{mol/mL}$ . Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Análise estatística: Teste *t* de Student.  $p < 0,7086$ .  $N=82$ .

\* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ).

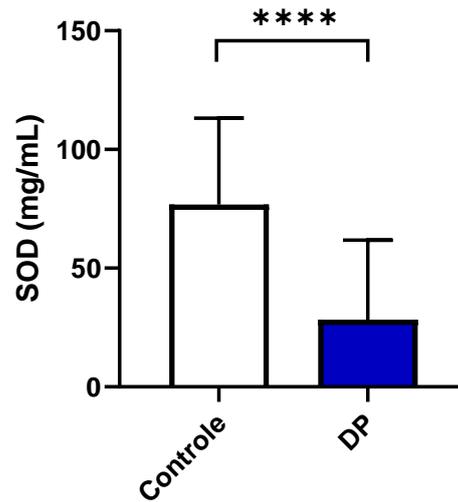
A concentração de Vitamina C no soro dos indivíduos do grupo com DP evidenciou uma diminuição significativa quando comparados aos indivíduos do grupo controle. Sendo que os valores encontrados para cada grupo foram de:  $59,67 \pm 11,66 \text{ug/dL}$  no grupo controle e  $53,39, \pm 12,11 \text{ug/dL}$  no grupo com DP, com valor de  $p < 0,05$ . Os valores foram apresentados pela média e desvio padrão, e estes podem ser observados na Figura 7.  $N= 75$  participantes, sendo 25 participantes no grupo controle e 50 participantes no grupo com DP.

**Figura 7:** Níveis séricos de Vitamina C

**Níveis séricos de Vitamina C.** Houve diminuição significativa de Vitamina C em indivíduos com DP, quando comparados com indivíduos do grupo controle. Análise estatística: Teste *t* de Student. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.  $N=75$ .

\* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ).

Referente a atividade da enzima SOD no ST dos indivíduos participantes do estudo, demonstrou uma diminuição estatisticamente significativa em indivíduos com DP, quando comparados com indivíduos do grupo controle, sendo que os valores encontrados para cada grupo foram de:  $76,77 \pm 36,45$  mg/mL no grupo controle e  $28,31 \pm 12,47$  mg/mL no grupo com DP, com valor de  $p < 0,0001$ . Os valores foram apresentados pela média e desvio padrão, e estes podem ser observados na Figura 8.  $N= 82$  participantes, sendo 25 participantes no grupo controle e 57 participantes no grupo com DP.

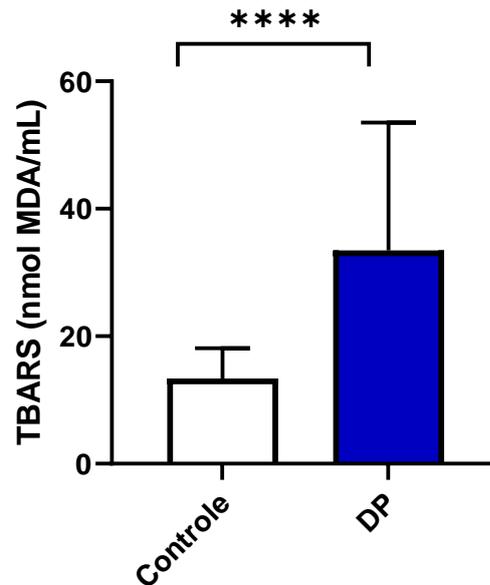
**Figura 8:** Atividade da SOD

**Atividade da SOD.** Os dados foram expressos em mg/mL. Houve diminuição da atividade da SOD em indivíduos com DP, quando comparados com indivíduos do grupo controle. Análise estatística: Teste *t* de Student. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. N=82.

\* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ).

#### 4.4.2 Marcadores de Danos Oxidativos

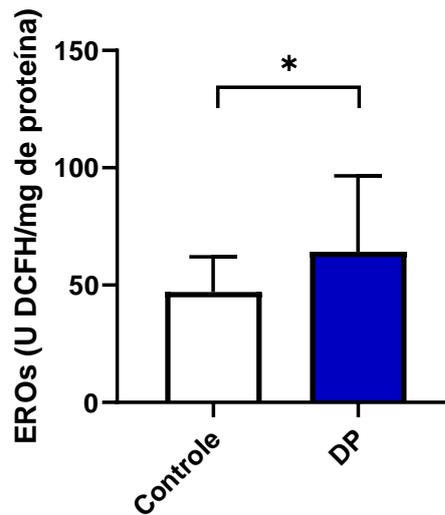
Os níveis séricos de TBARS estão demonstrados na Figura 9, onde apresentou aumento estatisticamente significativo em indivíduos com DP em relação aos controles, sendo que os valores encontrados para cada grupo foram de  $13,40 \pm 4,752$  nmol MDA/mL no grupo controle e  $33,47 \pm 20,07$  nmol MDA/mL no grupo com DP, com valor de  $p < 0,0001$ . Os valores foram apresentados pela média e desvio padrão. N= 82 participantes, sendo 25 participantes no grupo controle e 57 participantes no grupo com DP.

**Figura 9:** Níveis séricos de TBARS

**Níveis séricos de TBARS.** Os dados foram expressos em nmol MDA/mL. Houve aumento estatisticamente significativo nos níveis séricos de TBARS em indivíduos com DP quando comparados com indivíduos do grupo controle. Análise estatística: Teste *t* de Student. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. N=82.

\* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ).

Os níveis séricos de EROs estão demonstrados na Figura 10, com aumento estatisticamente significativo em indivíduos com DP, sendo que os valores encontrados para cada grupo foram de:  $47,05 \pm 15,01$  U DCFH/mg de proteína no grupo controle e  $64,18 \pm 32,43$  U DCFH/mg de proteína no grupo com DP, com valor de  $p < 0,05$ . Os valores foram apresentados pela média e desvio padrão. N= 82 participantes, sendo 25 participantes no grupo controle e 57 participantes no grupo com DP.

**Figura 10:** Níveis séricos de EROs

**Níveis séricos de EROs.** Os dados foram expressos em U DCFH/mg. Houve aumento estatisticamente significativo nos níveis séricos de EROs em indivíduos com DP quando comparados com indivíduos do grupo controle. Análise estatística: Teste *t* de Student. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.  $N=82$ .

\* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ).

#### 4.5 QUESTIONÁRIO DE AUTORRELATO DE CONDIÇÃO PERIODONTAL

A média de idade dos 82 participantes foi  $43 \pm 15,09$  anos, sendo que os indivíduos com DP possuem média de idade maior ( $52 \pm 13,46$  anos) em relação aos indivíduos controle ( $34 \pm 13,84$  ano);  $p=0,0001$ . Referente ao sexo, não houve diferença estatística entre os grupos;  $p=0,1952$ .

Em relação às visitas regulares ao consultório odontológico (mínimo 1x/ano), houve uma distribuição irregular dos participantes dos diferentes grupos ( $p=0,0001$ ), onde no grupo controle, todos (100%) frequentam o dentista regularmente, e no grupo com DP, somente (54,4%) relataram frequentar regularmente o consultório odontológico. Além da não regularidade, o espaço de tempo em relação à última visita ao dentista apresentou-se um fator relevante, onde 13 (22,8%) indivíduos com DP relataram ficar mais de 3 anos sem realizar consultas odontológicas, já no grupo controle, ninguém respondeu ficar mais de 3 anos sem realizar consultas odontológicas ( $p=0,0013$ ).

Indivíduos que tiveram algum dente extraído também mostraram relação com a frequência de DP na população estudada. Dos 53 participantes que informaram ter sofrido perda

de dentes naturais, 44 (83,01%) estavam alocados no grupo com DP, e apenas 9 (16,98%) eram do grupo controle ( $p=0,0003$ ).

Outro parâmetro de relevância é a relação entre escovação e o desenvolvimento da DP, em que 59,64% dos participantes do grupo com DP não escovam os dentes mais que duas vezes por dia, em contrapartida os indivíduos controle, somente 8% responderam que não escovam os dentes duas vezes ou mais por dia ( $p=0,0004$ ). O não uso de fio dental também apresentou relação. Dos 17 participantes que destacaram nunca ter utilizado fio dental, 16 (94,11%) apresentavam DP ( $p=0,0001$ ). Por outro lado, 18 (69,92%) de 26 participantes que relataram fazer uso do fio dental todos os dias estão no grupo controle.

Sangramento gengival também se relacionou com a presença da DP. No grupo controle, somente 4 (16%) indivíduos relataram ter tido algum tipo de sangramento gengival, e 21(84%) indivíduos referem nunca ter percebido algum tipo de sangramento gengival. Já no grupo com DP, 40 (70,17%) indivíduos relataram ter tipo sangramento gengival em algum momento e somente 17 (29,82%) relataram não ter tido sangramento gengival ( $p<0,001$ ).

Por fim, referente à escolaridade, percebeu-se relação entre baixa escolaridade e o desenvolvimento de DP. Dentre os 15 (26,3%) participantes que apresentavam ensino fundamental incompleto, todos apresentavam DP. Em contraponto, o grupo controle apresentou maior nível de escolaridade, onde maior parte dos participantes do respectivo grupo, responderam que possuem ensino superior incompleto ou completo (26,4%) ( $p=0,0002$ ).

**Tabela 1.** Questionário de autorrelato de condição periodontal

Distribuição da população do estudo por itens autorrelatados (N= 82)				
Variável	Total de participantes	Categorias		
		Controle	Doença periodontal	P
Número de participantes	82 (100)	25 (30,5%)	57 (69,5%)	-
<b>1. Idade (anos, média IC 95%)</b>	43 (39 - 46)	34 (29-38)	52 (47 - 57)	<b>0,0001</b>
<b>2. Sexo</b>				
<b>Feminino</b>	47 (57,3%)	17 (20,7%)	30 (36,6%)	0,1952
<b>Masculino</b>	35 (42,7%)	8(9,8%)	27(32,9%)	
<b>4. Você vai ao dentista regularmente? (pelo menos 1x/ano)</b>				
<b>Não</b>	25 (30,9%)	0	26(45,6%)	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Sim</b>	57 (69,1%)	25 (100%)	31 (54,4%)	
<b>5. Quando foi sua última visita ao dentista?</b>				<b>0,0013</b>

<b>Entre 6 meses e 1 ano</b>	57(69,5%)	25 (100%)	32 (56,1%)	
<b>1 a 3 anos</b>	8 (9,8%)	0	8 (14,0%)	
<b>Mais que 3 anos</b>	13 (15,8%)	0	13 (22,8%)	
<b>Não lembra/respondeu</b>	4 (4,9%)	0	4 (7,1%)	
<b>6. Você teve algum dente extraído?</b>				
<b>Entre 6 meses e 1 ano</b>	10 (12,2%)	5(20,0%)	5 (8,8%)	
<b>1 a 3 anos</b>	10 (12,2%)	4 (16,0%)	6 (10,5%)	<b>0,0027</b>
<b>Mais que 3 anos</b>	35 (42,7%)	3 (12,0%)	32 (56,1%)	
<b>Não lembra/respondeu</b>	27 (32,9%)	13 (52,0%)	14 (24,6%)	
<b>7. Você já fez tratamento gengival?</b>				
<b>Não</b>	69 (84,1%)	23 (92,0%)	46 (80,7%)	0,3816
<b>Sim</b>	11 (13,4%)	2 (18,0%)	9 (15,8%)	
<b>Não respondeu</b>	2 (2,4%)	0	2 (3,5%)	
<b>8. Você já fez cirurgia gengival?</b>				
<b>Não</b>	77 (93,9%)	24 (96,0%)	53 (92,9%)	0,6359
<b>Sim</b>	3 (3,7%)	1 (4,0%)	2 (3,5%)	
<b>Não respondeu</b>	2 (2,4%)	0	2 (3,5%)	
<b>9. Qual frequência você escova os dentes?</b>				
<b>Não todo dia</b>	10 (12,2%)	0	10 (17,5%)	
<b>Uma vez ao dia</b>	10 (12,2%)	0	10 (17,5%)	<b>0,0004</b>
<b>Duas vezes ao dia</b>	16 (19,5%)	2 (8,0%)	14 (24,6%)	
<b>Mais que duas vezes ao dia</b>	45 (54,9%)	23 (92,0%)	22 (38,6%)	
<b>Não respondeu</b>	1 (1,2%)	0	1(1,8%)	
<b>10. Qual frequência você usa fio dental?</b>				
<b>Até uma vez por semana</b>	23(28,1%)	1(4,0%)	22 (38,6%)	
<b>Mais que uma vez por semana</b>	16(19,5%)	5(20,0%)	11 (19,3%)	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Todo dia</b>	26(31,7%)	18(72,0%)	8 (14,0%)	
<b>Nunca/Não respondeu</b>	17(20,7%)	1(4,0%)	16 (28,1%)	
<b>11. Você perdeu algum dos seus dentes naturais?</b>				
<b>Não</b>	27 (32,9%)	16 (64,0%)	11 (19,3%)	<b>0,0003</b>
<b>Sim</b>	53 (64,6%)	9 (36,0%)	44 (77,2%)	
<b>Nunca/Não respondeu</b>	2 (2,4%)	0	2 (3,5%)	
<b>12. Gengivas feridas ou inchadas?</b>				
<b>3 meses atrás</b>	7 (8,5%)	1 (4,0%)	6 (10,5%)	
<b>1 ano atrás</b>	17 (20,7%)	7 (28,0%)	10 (17,5%)	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Sim</b>	20 (24,4%)	0	20 (35,1%)	

<b>Não</b>	27 (33,0%)	17 (68,0%)	10 (17,5%)	
<b>Nunca/Não respondeu</b>	11(13,4%)	0	11 (19,3%)	
<b>13. Gengivas sangrando?</b>				
<b>3 meses atrás</b>	6 (7,3%)	0	6 (10,5%)	<b>&lt;0,0001</b>
<b>1 ano atrás</b>	13 (15,9%)	4 (16,0%)	9 (15,8%)	
<b>Sim</b>	25 (30,5%)	0	25 (43,9%)	
<b>Não</b>	29 (35,4%)	21 (84,0%)	8 (14,0%)	
<b>Nunca/Não respondeu</b>	9 (10,9%)	0	9 (15,8%)	
<b>14. Escolaridade?</b>				
<b>Ensino fundamental incompleto</b>	15 (18,3%)	0	15 (26,3%)	<b>0,0002</b>
<b>Ensino Fundamental completo</b>	6 (7,3%)	1 (4,0%)	6 (10,5%)	
<b>Ensino médio incompleto</b>	5 (6,1%)	0	5 (8,8%)	
<b>Ensino médio completo</b>	16 (19,5%)	3 (12,0%)	12 (21,1%)	
<b>Ensino superior incompleto</b>	10 (12,2%)	7 (28,0%)	3 (5,3%)	
<b>Ensino superior completo</b>	26 (31,7%)	14 (56,0%)	12 (21,1%)	
<b>Não estudei/Não respondeu</b>	4 (4,9%)	0	4 (7,0%)	

Legenda: #, valores de referência para as análises de *Qui-quadrado*.

## 5 DISCUSSÃO

Há pesquisas substanciais dedicadas à compreensão da fisiopatologia da DP. Porém, estudos buscando desvendar e compreender as vias de sinalização celular e sua associação com o sistema imunológico merecem mais atenção. Baseando-se nisso, o presente estudo buscou compreender a associação do sistema purinérgico, EO e da inflamação, tanto no periodonto quanto seu impacto sistêmico em indivíduos com DP.

Componentes do sistema purinérgico, as enzimas CD39, CD73 e a ADA são as principais metabolizadoras de nucleotídeos, participando da regulação da inflamação e do sistema imunológico. Devido à capacidade dessas enzimas de converter ATP em Ado, 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).

Os resultados obtidos em nosso estudo indicam uma redução significativa na hidrólise de nucleotídeos realizada pelas enzimas CD39 e CD73 em linfócitos de pacientes com DP, em comparação com linfócitos de indivíduos controle (Figura 1). Além disso, foram observados altos níveis de eATP em pacientes com DP, em comparação com indivíduos controle (Figura 3), desempenhando um papel pró-inflamatório, atuando como um padrão molecular associado ao dano (DAMP), frente as injúrias geradas pela *P. gingivalis*. O organismo humano reconhece uma variedade de moléculas exógenas como sinais de perigo, referidos como DAMPs. O eATP está entre as moléculas que são liberadas pelo dano celular, e evidências mostram que o mesmo pode atuar como um DAMP durante estímulos inflamatórios. O ATP no ambiente extracelular pode gerar uma ativação descontrolada do sistema imunológico (BURNSTOCK; KNIGHT, 2018), desencadeando uma cascata de citocinas, caracterizada pela liberação exacerbada de mediadores inflamatórios, incluindo de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  (LEE; YILMAZ, 2018).

Estudo realizado por LEE e colaboradores (2020) demonstrou que a enzima CD73 apresenta-se diminuída em linfócitos de pacientes contaminados com *a P. gingivalis in vitro*, onde também apresentaram expressão significativamente maior de citocinas pró-inflamatórias e respostas anti-inflamatórias reduzidas, levando a compreensão de que a CD73, estando diminuída, ocorre a regulação negativa da inflamação, e o ambiente se torna pro-inflamatório. Esses dados corroboram nossos resultados, visto que em indivíduos com DP ocorreu a diminuição da atividade da CD73, resultando em um maior nível de inflamação no hospedeiro, também demonstrado pelos resultados da análise da PCR, onde encontramos maiores níveis de

PCR em indivíduos com DP em comparação ao grupo controle (Figura 4). Os resultados da PCR serão melhor discutidos adiante.

A Figura 2 ilustra a atividade da ADA na saliva, linfócitos e soro, de participantes controle e com DP, a fim de demonstrar sua atividade local e sistêmica. A ADA na saliva e soro apresentou aumento significativo na sua atividade em indivíduos com DP na comparação com o grupo controle. Em linfócitos não houve diferença estatisticamente significativa quanto à atividade da ADA. Sendo assim, esses resultados sugerem sinalização anti-inflamatória (diminuição da quantidade de Ado extracelular) local e sistêmica em indivíduos com DP.

A via da Ado é um mecanismo poderoso na proteção de lesões aos tecidos humanos, além da regulação da resposta inflamatória (DIKENSOY *et al.*, 2002). A ADA é uma enzima que hidrolisa a Ado em inosina, sendo que ela busca inibir a produção de citocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-12 (AHMADI, M. *et al.*, 2017).

Em um ambiente inflamado, os níveis elevados de ADA aumentam a quantidade de inosina, tentando inibir a cascata de citocinas inflamatórias, atuando como um mecanismo anti-inflamatório na DP. Há evidências limitadas de níveis aumentados ou diminuídos de ADA na DP (SARHAT *et al.*, 2018).

Em um estudo conduzido por Aydınyurt (2019), os níveis de ADA foram avaliados em pacientes fumantes com gengivite e periodontite, e foi observado um aumento significativo em seus níveis em participantes com DP. No estudo de Sarhat e colaboradores (2018), os níveis de ADA na saliva em pacientes com DP foram maiores em pacientes diabéticos e com periodontite, do que em indivíduos diabéticos, mas com periodonto saudável. Ainda, esse estudo demonstrou a atividade sérica da ADA aumentada em pacientes diabéticos com DP, corroborando com nosso estudo, que demonstrou aumento da ADA na saliva e soro de indivíduos com DP, revelando seu efeito sobre a inflamação local e sistêmica. Até onde sabemos, o nosso estudo é o primeiro a avaliar a alteração dos níveis de ADA em pacientes com DP sem outras condições de doenças prévias que pudessem modular a atividade da ADA, tanto local como sistêmica (cigarro, diabetes, hipertensão e artrite reumatoide).

A PCR é um importante marcador de inflamação, sendo produzida pelo fígado como resultado de vários tipos de lesões, incluindo doenças infecciosas. Mediadores inflamatórios decorrentes da DP podem estimular os hepatócitos a produzirem PCR, entre eles a IL-1, IL-6 e o TNF- $\alpha$  (PARASKEVAS; HUIZINGA; LOOS, 2008). Nesse sentido, a infecção periodontal pode levar à uma inflamação sistêmica, com aumento significativo dos níveis séricos da PCR.

Nossos resultados mostram que os indivíduos com DP apresentaram maiores concentrações de PCR em relação aos indivíduos controle (Figura 4). Torrungruang (2019),

também demonstrou que os níveis de PCR aumentam com a gravidade da DP. Outros trabalhos mostram que casos de periodontite crônica estão associados a níveis mais elevados de PCR (BOLLA *et al.*, 2017; CHANDY *et al.*, 2017; RAMICH *et al.*, 2018). Esses resultados relacionam a DP com uma maior produção desse marcador inflamatório em níveis sistêmicos em indivíduo acometidos pela DP, corroborando com os achados de Esteves (2020).

Já em outro estudo foi avaliado a MPO em amostras *in vitro*, um importante componente da defesa inata do hospedeiro, conhecido pela sua potente atividade antimicrobiana, onde apresentou um aumento dos seus níveis séricos em camundongos com periodontite induzida por ligadura (YAMALIK *et al.*, 2000), diferente do nosso estudo, onde a MPO (Figura 5) não apresentou diferença estatística nos níveis séricos dos indivíduos com DP em relação aos controles, porém essa divergência pode ser explicada pela diferença entre as espécies avaliadas.

Até o momento há poucos estudos avaliando o efeito do desequilíbrio na atividade dos antioxidantes e oxidantes em indivíduos com DP e suas alterações sistêmicas. Embora a DP seja desencadeada por placa bacteriana (biofilme), a maior parte da destruição dos tecidos parece ser mediada pela resposta anormal do hospedeiro às bactérias específicas e seus produtos. Essa resposta é caracterizada por inflamação exagerada envolvendo a liberação de enzimas proteolíticas e por EROs (DURSUN *et al.*, 2016).

A validação de que uma doença bucal seria capaz de alterar níveis de marcadores séricos de um indivíduo demonstraria a repercussão sistêmica desta doença ou condição (NIBALI; DONOS, 2013), abrindo-se um grande e inexplorado campo de investigação (TAYLOR; PRESHAW, 2016). Em nosso estudo foram avaliados os níveis séricos dos indivíduos controle e com DP de marcadores do EO, e os resultados mostram níveis de antioxidantes diminuídos (Vitamina C e SOD; Figuras 7 e 8, respectivamente) e de oxidantes aumentados (TBARS e EROs; Figuras 9 e 10, respectivamente) em indivíduos com DP, em relação aos indivíduos do grupo controle.

Estudos indicaram que o excesso de EROs e a depleção dos níveis de antioxidantes no fluido crevicular gengival (CHAPPLE; MILWARD; DIETRICH, 2007; KONOPKA *et al.*, 2007; TSAI *et al.*, 2005) são responsáveis pela ativação local crônica da inflamação periodontal e destruição tecidual. O recrutamento de neutrófilos no tecido gengival e a liberação de enzimas proteolíticas e EROs, são hoje considerados os dois principais aspectos da resposta do hospedeiro à estimulação do antígeno bacteriano em indivíduos susceptíveis à periodontite. Devido a percepção de que o EO está intimamente ligado aos danos ao periodonto, alguns autores iniciaram suas pesquisas para investigar se esse processo também pode resultar em uma resposta inflamatória sistêmica (MATTHEWS *et al.*, 2007). Evidências adicionais de modelos

animais confirmam níveis mais altos de peroxidação lipídica, peróxidos de hidrogênio e dano oxidativo ao DNA com periodontite experimental (YAMAMOTO *et al.*, 2010).

Estudos anteriores também demonstraram que os níveis e o potencial antioxidante são reduzidos tanto na gengiva quanto no soro de indivíduos com periodontite (CHAPPLE; MATTHEWS, 2007; KONOPKA *et al.*, 2007). Isso foi replicado em modelos experimentais de DP, demonstrando uma redução na Vitamina C (SANBE *et al.*, 2009) e diminuição geral das defesas oxidativas gengivais (TOMOFUJI *et al.*, 2006), corroborando com os achados do presente estudo, onde o nível sérico da Vitamina C, um importante antioxidante, está diminuído em indivíduos que apresentam DP (Figura 7).

Li e colaboradores (2019) avaliaram níveis de SOD e EROs em indivíduos saudáveis e com DP, onde encontraram resultados semelhantes ao nosso estudo, onde a SOD (Figura 8) estava diminuída nos indivíduos com DP, e as EROs (Figura 10) aumentadas, indicando que os indivíduos com DP estavam sob EO.

O conjunto de variáveis avaliadas no questionário de autorrelato de condição periodontal parece ser uma boa estratégia para identificação da DP em pesquisas epidemiológicas. Os resultados do nosso estudo apontam possíveis desencadeantes da DP (Tabela 1), como não utilizar fio dental, não escovar os dentes todos os dias e não realizar consulta com dentista regularmente (pelo menos uma consulta a cada 6 meses). Em seu estudo, Eke (2016) avaliou adultos com 65 anos ou mais, onde participantes que não faziam uso do fio dental também foram mais frequentes no grupo com DP quando comparados ao grupo controle. Ainda, em seu estudo Eke (2016) pode demonstrar que o grau de escolaridade também apresentou associação com a DP, onde participantes com menor grau de escolaridade pertencem ao grupo com DP. Em estudo realizado por MAÇANEIRO e colaboradores (2015), os resultados foram semelhantes aos nosso, onde pacientes com DP apresentavam menor nível de escolaridade comparado com pacientes sem a doença.

Hábitos de higiene bucal, como o uso de fio dental e escovação dentária executadas de maneira correta, são as principais ferramentas para o controle de patologias bucais, incluindo a DP, visto que é através desses mecanismos de limpeza, que ocorre a remoção de grande parte da placa bacteriana, responsável pelo desencadeamento de afecções bucais. Consultas regulares ao dentista, também são de suma importância, uma vez que, a placa bacteriana quando calcificada, já não é mais possível ser removida durante a escovação ou com o uso do fio dental, sendo necessário realizar limpeza mecânica com instrumentos odontológicos que possibilitem a sua retirada.

O grau de escolaridade é um fator predisponente a DP, onde indivíduos que não foram inseridos no meio escolar, muitas vezes não receberam informações de qualidade e nem estímulos ao desenvolvimento de hábitos saudáveis, incluindo a higiene bucal. Neste sentido, destaca-se o papel dos cirurgiões-dentistas (CDs), principalmente aqueles inseridos no sistema público, que devem ser mediadores de conhecimento, transmitindo de maneira clara e objetiva as informações necessárias para a mobilização e conscientização da população, visto que o CD está inserido em políticas públicas de saúde na escola e no atendimento da população em geral.

Diante dos resultados do presente estudo, é importante salientar suas limitações e perspectivas futuras. A pesquisa supracitada é pioneira em algumas análises envolvendo o sistema purinérgico e EO, sendo assim, primeiramente buscou desvendar se tais mecanismos possam ter ação na DP. Ainda, uma importante análise está sendo realizada, o perfil de expressão de citocinas pró e anti inflamatórias (por citometria de fluxo com o kit comercial Cytometric Bead Array, BD), onde a mesma terá um valioso papel em demonstrar se ocorre ou não uma cascata de citocinas com perfil inflamatório envolvendo indivíduos com a DP, e sua relação com os parâmetros do sistema purinérgico avaliados. Esses dados serão apresentados nas publicações que já estão sendo redigidas. A partir desse ponto, esse estudo abre espaço para futuras pesquisas com potenciais terapêuticos, envolvendo a análise de receptores purinérgicos e possíveis antagonistas, ou ainda substâncias antioxidantes capazes de equilibrar a exacerbação dos radicais livres, a fim de controlar a inflamação local e sistêmica.

## 6 CONCLUSÃO

Nosso estudo fornece evidências de que, em indivíduos com DP ocorre a modulação do sistema purinérgico, onde apresentam altos níveis de eATP, que desempenha um papel pró-inflamatório, contribuindo para a sobrevivência e proliferação de bactérias responsáveis pelo desenvolvimento da DP na cavidade bucal, e possibilitando ainda sua migração para outros tecidos do corpo humano, sendo fortemente associado com doenças sistêmicas. Em um ambiente pró-inflamatório, como o de indivíduos com DP, o EO também desempenha sua ação, com a geração de radicais livres e diminuição das defesas antioxidantes, deixando os mesmos susceptíveis a inflamação sistêmica, como podemos verificar na análise da PCR, onde a mesma encontra-se aumentada em indivíduos com DP. Ainda, podemos concluir que hábitos de higiene bucal impactam diretamente no desenvolvimento e manutenção da DP.

Nossa pesquisa buscou esclarecer que a DP sem outras condições ou comorbidades associadas, está sob ação da sinalização purinérgica e do EO, além de demonstrar que uma doença bucal é capaz de alterar marcadores séricos e desencadear repercussão sistêmica. Através desse estudo, acreditamos que pesquisas futuras envolvendo estratégias terapêuticas para tratamento da doença possam ser um importante alvo.

## REFERÊNCIAS

- ACQUIER, A. B. *et al.* Parameters of oxidative stress in saliva from patients with aggressive and chronic periodontitis. **Redox Report : Communications in Free Radical Research**, v. 22, n. 3, p. 119–126, 20 jun. 2016.
- AHMADI-MOTAMAYEL, F. *et al.* Evaluation of Salivary and Serum Antioxidant and Oxidative Stress Statuses in Patients with Chronic Periodontitis: A Case-Control Study. **Frontiers in Physiology**, v. 8, p. 189, 2017.
- ALI, S. F., LEBEL, C. P., BONDY, S. C. Reactive Oxygen Species Formation as a Biomarker of Methylmercury and Trimethyltin Neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v. 13, n. 3, 1992.
- 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.
- AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. International workshop for a classification of periodontal diseases and conditions. **Ann. Periodontol.**, v. 4, p. 1-112, 1999.
- ARMITAGE, G. C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. **Ann. Periodontol.**, v. 4, n. 1, p. 1-6, 1999.
- AYDİNYURT, H. Ş.; TAŞKİN, C.; ESKİN, K. Sigara Kullanan Bireylerde Farklı Teşhise Sahip Dişlerin Adenozin Deaminaz ve Katalaz Seviyelerinin Karşılaştırılması. **Van Sağlık Bilimleri Dergisi**, v. 12, n. 2, p. 1–7, 29 dez. 2019.
- BARTOLD, P. M.; VAN DYKE, T. E. Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. Unlearning learned concepts. **Periodontology 2000**, v. 62, n. 1, p. 10.1111/j.1600-0757.2012.00450.x, jun. 2013.
- BOLLA, V. *et al.* Evaluation of Serum C-reactive Protein Levels in Subjects with Aggressive and Chronic Periodontitis in Comparison with Healthy Controls: A Clinico-biochemical Study. **International Journal of Applied and Basic Medical Research**, v. 7, n. 2, p. 121–124, 2017.
- BURNSTOCK, G.; DI VIRGILIO, F. Purinergic signalling and cancer. **Purinergic Signalling**, v. 9, n. 4, p. 491–540, dez. 2013.
- 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.
- CARDOSO, A. M. *et al.* Impact of ectonucleotidases in autonomic nervous functions. **Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical**, 2015.

- CEKICI, A. *et al.* Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. **Periodontology** 2000, v. 64, n. 1, p. 57–80, fev. 2014.
- CHANDY, S. *et al.* Evaluation of C-Reactive Protein and Fibrinogen in Patients with Chronic and Aggressive Periodontitis: A Clinico-Biochemical Study. **Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR**, v. 11, n. 3, p. ZC41–ZC45, mar. 2017.
- CHAPPLE, I. L. C.; GENCO, R.; WORKING GROUP 2 OF THE JOINT EFP/AAP WORKSHOP. Diabetes and periodontal diseases: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 40, p. S106–S112, abr. 2013.
- CHAPPLE, I. L. C.; MILWARD, M. R.; DIETRICH, T. The Prevalence of Inflammatory Periodontitis Is Negatively Associated with Serum Antioxidant Concentrations. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 3, p. 657–664, 1 mar. 2007.
- CHIELLE, E. O. *et al.* Adenosine deaminase, dipeptidyl peptidase-IV activities and lipid peroxidation are increased in the saliva of obese young adult. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, v. 53, n. 7, 1 jan. 2015.
- CHOI, C. H. *et al.* P. gingivalis-Nucleoside-diphosphate-kinase Inhibits ATP-Induced Reactive-Oxygen-Species via P2X7 Receptor/NADPH-Oxidase Signaling and Contributes to Persistence. **Cellular microbiology**, v. 15, n. 6, p. 961–976, jun. 2013.
- COUTINHO-SILVA, R.; OJCIUS, D. M. Role of extracellular nucleotides in the immune response against intracellular bacteria and protozoan parasites. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 14, p. 1271–1277, nov. 2012.
- DAHIYA, P. *et al.* Reactive oxygen species in periodontitis. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 17, n. 4, p. 411–416, 2013.
- DE OLIVEIRA, L. C. *et al.* Maternal C-reactive protein concentrations during pregnancy and birth weight in a prospective cohort in Rio de Janeiro, Brazil. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 30, n. 19, p. 2346–2353, 2 out. 2017.
- DETERT, J. *et al.* The association between rheumatoid arthritis and periodontal disease. **Arthritis Research & Therapy**, v. 12, n. 5, p. 218, 2010.
- DI VIRGILIO, F.; ADINOLFI, E. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. **Oncogene**, v. 36, p. 1-11, 2017.
- DIKENSOY, O. *et al.* Increased pleural fluid adenosine deaminase in brucellosis is difficult to differentiate from tuberculosis. **Respiration; International Review of Thoracic Diseases**, v. 69, n. 6, p. 556–559, 2002.
- DOMINY, S. S. *et al.* *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. **Science Advances**, v. 5, n. 1, p. eaau3333, 4 jan. 2019.
- DURSUN, E. *et al.* Oxidative Stress and Periodontal Disease in Obesity. **Medicine**, v. 95, n. 12, p. e3136, mar. 2016.

- EKE, P. I. *et al.* Periodontitis prevalence in adults  $\geq 65$  years of age, in the USA. **Periodontology** 2000, v. 72, n. 1, p. 76–95, out. 2016.
- ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, n. 1, p. 70–77, maio 1959.
- ESTEVEZ-LIMA, R.-P. *et al.* Association between periodontitis and serum c-reactive protein levels. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 12, n. 9, p. e838–e843, 1 set. 2020.
- FARDIN, A.C; ARANEGA, Alessandra Marcondes; JARDIM, Ellen Cristina Gaetti; JARDIM JÚNIOR, Elerson Gaetti. **Cuidados especiais no atendimento cirúrgico de pacientes diabéticos**. Revista da ABRO (Baurú), v.6, p. 524 - 533, 2009.
- FORNER, L. *et al.* Incidence of bacteremia after chewing, tooth brushing and scaling in individuals with periodontal inflammation. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 33, n. 6, p. 401–407, jun. 2006.
- FOUNTAIN, S. J.; BURNSTOCK, G. An evolutionary history of P2X receptors. **Purinergic Signalling**, v. 5, n. 3, p. 269–272, set. 2009.
- FRANKE, H. *et al.* Pathophysiology of astroglial purinergic signalling. **Purinergic Signalling**, v. 8, n. 3, p. 629–657, set. 2012.
- FREDMAN, G. *et al.* Impaired Phagocytosis in Localized Aggressive Periodontitis: Rescue by Resolvin E1. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, 14 set. 2011.
- GARTLAND, A. *et al.* Polymorphisms in the P2X7 receptor gene are associated with low lumbar spine bone mineral density and accelerated bone loss in post-menopausal women. **European Journal of Human Genetics**, v. 20, n. 5, p. 559–564, maio 2012.
- GESSI, S. *et al.* Elevated expression of A3 adenosine receptors in human colorectal cancer is reflected in peripheral blood cells. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 17, p. 5895-5901, set. 2004.
- GIUSTI, G.; GALANTI, B. Methods of enzymatic analysis. **Weinheim: Verlag Chemie**, 1984.
- GOMES-FILHO, I. S. *et al.* Chronic Periodontitis and C-Reactive Protein Levels. **Journal of Periodontology**, v. 82, n. 7, p. 969–978, jul. 2011.
- HAJISHENGALLIS, G. Porphyromonas gingivalis-Host Interactions: Open War or Intelligent Guerilla Tactics? **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 11, n. 6–7, p. 637–645, 2009.
- ISHIKAWA, M. *et al.* Oral Porphyromonas gingivalis translocates to the liver and regulates hepatic glycogen synthesis through the Akt/GSK-3 $\beta$  signaling pathway. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1832, n. 12, p. 2035–2043, dez. 2013.

- JACQUES-SILVA, M. C. *et al.* Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. **Pharmacology & Toxicology**, v. 88, n. 3, p. 119–125, mar. 2001.
- JENTZSCH, A. M. *et al.* Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 2, p. 251–256, 1996.
- KARAMOHAMED, S.; GUIDOTTI, G. Bioluminometric Method for Real-Time Detection of ATPase Activity. **BioTechniques**, v. 31, n. 2, p. 420–425, ago. 2001.
- KATZ, J. *et al.* Localization of *P. gingivalis* in Preterm Delivery Placenta. **Journal of Dental Research**, v. 88, n. 6, p. 575–578, jun. 2009.
- KIM, H. *et al.* The purinergic receptor P2X5 contributes to bone loss in experimental periodontitis. **BMB Reports**, v. 51, n. 9, p. 468–473, set. 2018.
- KINANE, D. F. Causation and pathogenesis of periodontal disease. **Periodontology 2000**, v. 25, p. 8-20, 2001.
- KINANE, D., F. P. *gingivalis* interactions with epithelial cells. **Frontiers in Bioscience**, v.13, n. 13, p. 966, 2008.
- KONOPKA, T. *et al.* Total antioxidant status and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in gingival and peripheral blood of periodontitis patients. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 55, n. 6, p. 417–425, dez. 2007.
- KUNZLI, B. M. *et al.* Impact of CD39 and purinergic signalling on the growth and metastasis of colorectal cancer. **Purinergic Signal**, v. 7, n. 2, p. 231-241, jun. 2011.
- 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.
- LEE, J. S.; YILMAZ, Ö. Unfolding Role of a Danger Molecule Adenosine Signaling in Modulation of Microbial Infection and Host Cell Response. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, p. 199, 9 jan. 2018.
- LI, X. *et al.* Severe periodontitis may influence cementum and dental pulp through inflammation, oxidative stress, and apoptosis. **Journal of Periodontology**, v. 90, n. 11, p. 1297–1306, nov. 2019.
- MAÇANEIRO, C. A. R. *et al.* Nível de Informação sobre Doenças Periodontais: Relação com o Grau de Escolaridade. **Revista da Faculdade de Odontologia de Lins**, v. 25, n. 2, p. 11–18, 30 dez. 2015.
- MALDONADO, P. A. *et al.* Role of the purinergic system in patients with cervical

intraepithelial neoplasia and uterine cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 66, n. 1, p. 6–11, fev. 2012.

MALDONADO, S. C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, v. 2(2), p. 409–430, 2006.

MATSUSHITA, K. *et al.* Periodontal Disease and Periodontal Disease-Related Bacteria Involved in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. **Journal of Inflammation Research**, v. Volume 13, p. 275–283, jun. 2020.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049–6055, 25 nov. 1969.

MOMBELLI, A. Periodontitis as an infectious disease: specific features and their implications: **Periodontitis as an infectious disease**. **Oral Diseases**, v. 9, p. 6–10, jun. 2003.

MOUGEOT, J.-L. C. *et al.* *Porphyromonas gingivalis* is the most abundant species detected in coronary and femoral arteries. **Journal of Oral Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 1281562, 1 jan. 2017.

MUSALAIHAH, S. V. V. S. *et al.* Evaluation of nonsurgical periodontal therapy in chronic periodontitis patients with anemia by estimating hematological parameters and high-sensitivity C-reactive protein levels. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 6, n. 5, p. 64, 2014.

NIBALI, L.; DONOS, N. Periodontitis and Redox Status: A Review. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 15, p. 2687–2697, 1 mar. 2013.

NOVAK, M.J. Classification of disease and conditions affecting the periodontium. In: NEWMAN, M.G., TAKEI, H.H., CARRANZA, F.A. **Carranza's Clinical Periodontology**, v. 9, p. 64-73, dez. 2002.

OCHOA-CORTES, F. *et al.* Potential for developing purinergic drugs for gastrointestinal diseases. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 20, n. 7, p. 1259–1287, jul. 2014.

PAGE, R.C. The Pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of a paradigm. **Ann Periodontol**, v. 3, n. 1, p. 108-120, 1998.

PANDEY, A. C-Reactive Protein (CRP) and its Association with Periodontal Disease: A Brief Review. **JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH**, 2014.

PARASKEVAS, S.; HUIZINGA, J. D.; LOOS, B. G. A systematic review and meta-analyses on C-reactive protein in relation to periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 35, n. 4, p. 277–290, 2008.

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.

PHAM-HUY, LA.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health.

**International Journal of Biomedecical Science**, v.4, n.2, p.89-96, 2008.

PIHLSTROM, B. L.; MICHALOWICZ, B. S.; JOHNSON, N. W. Periodontal diseases. **Lancet (London, England)**, v. 366, n. 9499, p. 1809–1820, 19 nov. 2005.

PISCHON, N. *et al.* Effects of Porphyromonas gingivalis on cell cycle progression and apoptosis of primary human chondrocytes. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 68, n. 12, p. 1902–1907, dez. 2009.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for Purines and Pyrimidines. **Pharmacological Reviews**, v. 50, n. 3, 1998.

RAMICH, T. *et al.* Inflammatory serum markers up to 5 years after comprehensive periodontal therapy of aggressive and chronic periodontitis. **Clinical Oral Investigations**, v. 22, n. 9, p. 3079–3089, 2018.

RAMOS-JUNIOR, E. S. *et al.* CD73-Dependent Adenosine Dampens Interleukin 1 $\beta$ -Induced CXCL8 Production in Gingival Fibroblasts: Association with Heme Oxygenase-1 (HO-1) And Adenosine Monophosphate–Activated Protein Kinase (AMPK). **Journal of periodontology**, v. 91, n. 2, p. 253–262, fev. 2020.

SANBE, T. *et al.* Vitamin C intake inhibits serum lipid peroxidation and osteoclast differentiation on alveolar bone in rats fed on a high-cholesterol diet. **Archives of Oral Biology**, v. 54, n. 3, p. 235–240, mar. 2009.

SÁNCHEZ, G. A. *et al.* Relationship between salivary leukotriene B<sub>4</sub> levels and salivary mucin or alveolar bone resorption, in subjects with periodontal health and disease. **Journal of Periodontal Research**, v. 48, n. 6, p. 810–814, dez. 2013.

SARHAT, D. E. R. *et al.* The Effect of Diabetic Patients with Chronic Periodontitis on Serum Paraoxonase, Adenosine Deaminase. v. 15, n. 1, p. 5, 2018.

SCHLUGER, S.; YOUDELIS R.A. e PAGE, R.C. **Periodontia**. Rio de Janeiro, Interamericana, 1981.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **The American Journal of Medicine**, v.91, n.3C, p.31S-38S, 1991.

SPOONER, R.; YILMAZ, Ö. Nucleoside-diphosphate-kinase: a pleiotropic effector in microbial colonization under interdisciplinary characterization. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 3, p. 228–237, mar. 2012.

SPYCHALA, J. Tumor-promoting functions of adenosine. **Pharmacol Ther**, v. 87, n. 2-3, p.161–73, ago/set. 2000.

TAYLOR, J. J.; PRESHAW, P. M. Gingival crevicular fluid and saliva. **Periodontology** 2000, v. 70, n. 1, p. 7–10, fev. 2016.

TEIXEIRA, K. C. F.; SANTOS, L. M. DOS; AZAMBUJA, F. G. Análise da eficácia da higiene oral de pacientes internados em unidade de terapia intensiva em um hospital de alta complexidade do Sul do Brasil. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São**

**Paulo**, v. 30, n. 3, p. 234, 10 abr. 2019.

TOMOFUJI, T. *et al.* Oxidative damage of periodontal tissue in the rat periodontitis model: Effects of a high-cholesterol diet. **FEBS Letters**, v. 580, n. 15, p. 3601–3604, 26 jun. 2006.

TORRUNGRUANG, K. *et al.* Periodontitis is associated with elevated serum levels of cardiac biomarkers-Soluble ST2 and C-reactive protein. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 46, n. 8, p. 809–818, ago. 2019.

TUNES, R. S.; FOSS-FREITAS, M. C. Impact of Periodontitis on the Diabetes-Related Inflammatory Status. 2010.

VALKO, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry e Cell Biology**, v.39, n.1, p.44-84, 2007.

VAN DYKE, T. E.; SERHAN, C. N. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. **Journal of Dental Research**, v. 82, n. 2, p. 82–90, fev. 2003.

VASCONCELOS *et al.*, 2007. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.30, n.5, p.1323- 1338, 2007.

VO, T. T. T. *et al.* The Promising Role of Antioxidant Phytochemicals in the Prevention and Treatment of Periodontal Disease via the Inhibition of Oxidative Stress Pathways: Updated Insights. **Antioxidants**, v. 9, n. 12, p. 1211, 1 dez. 2020.

YAMALIK, N. *et al.* The Importance of Data Presentation Regarding Gingival Crevicular Fluid Myeloperoxidase and Elastase-Like Activity in Periodontal Disease and Health Status. **Journal of Periodontology**, v. 71, n. 3, p. 460–467, mar. 2000.

YEGUTKIN, G. Nucleotide and nucleoside - converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. **BBA**, v. 1783, n. 5, p. 673 – 694, 2008.

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.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. **Drug Develop Res**, vol. 52, n. 1-2, p. 44-56, maio. 2001.

## ANEXO A

## Questões de autorrelato de condição periodontal

<b>Questões</b>	
<i>GENCO et al., (2007)</i>	
1- Você vai ao dentista regularmente? (pelo menos 1 x ao ano)	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não
2- Quanto tempo faz desde que você fez sua última visita ao dentista?	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Entre 6 meses</li> <li>b. Entre 1 ano</li> <li>c. Aproximadamente 1 a 3 anos</li> <li>d. Mais que 3 anos</li> <li>e. Não me lembro</li> <li>f. Nunca</li> </ul>
3- Quanto tempo faz desde você fez a última limpeza dental?	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Entre 6 meses</li> <li>b. Entre 1 ano</li> <li>c. Aproximadamente 1 a 3 anos atrás</li> <li>d. Mais que 3 anos atrás</li> <li>e. Não me lembro</li> <li>f. Nunca</li> </ul>
4- Você teve algum dente extraído	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Entre 6 meses</li> <li>b. Entre 1 ano</li> <li>c. Aproximadamente 1 a 3 anos atrás</li> <li>d. Mais que 3 anos atrás</li> <li>e. Não me lembro</li> <li>f. Nunca</li> </ul>
5- Você ouviu falar que tem doença gengival?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não
6- Você já fez tratamento gengival?	<input type="checkbox"/> data: (mês/ ano) <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
7- Você já fez alguma cirurgia gengival?	<input type="checkbox"/> data: (mês/ ano) <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
8- Qual a frequência que você escova seus dentes?	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Não todo dia</li> <li>b. Uma vez ao dia</li> <li>c. Duas vezes ao dia</li> <li>d. Mais que duas vezes ao dia</li> </ul>

9- Qual a frequência que você usa fio dental?	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Não toda semana</li> <li>b. Uma vez por semana</li> <li>c. Mais que uma vez por semana</li> <li>d. Todo dia</li> <li>e. Nunca</li> </ul>
10- Você escova sua língua?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
11- Você perdeu algum de seus dentes naturais?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
12- Se sim, porque você perdeu algum dente?	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Cáries</li> <li>b. Doença gengival</li> <li>c. Acidente (trauma)</li> <li>d. Dentes tracionados</li> <li>e. Extração por necessidades ortodônticas</li> <li>f. Outro</li> </ul>
13- Você acha que teve algum problema gengival?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não

14- Você teve alguma das condições bucais seguintes? (Marque apenas um item por condição)					
	3 meses atrás	1 ano atrás	Sempre	Nunca	Não sei
a. Dor de dente	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
b. Gengivas feridas ou inchadas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
c. Gengivas sangrando	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
d. Mau hálito crônico	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
e. Aftas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
f. Dentes sensíveis a frio ou quente	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
g. Abscessos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
h. Dentes perdidos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
15- Você já passou por algum dos procedimentos abaixo? (marque apenas uma opção por procedimento)					
	3 meses atrás	1 ano atrás	Sempre	Nunca	Não sei
a. Cirurgia gengival (para doença gengival)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
b. Limpeza dental	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
c. Coroas ou pontes dentais	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
d. Prótese dental parcial removível	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
e. Tratamento de canal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
f. Implante	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
g. Cirurgia para tumor ou outra condição de sua boca ou lábios	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

h. Tratamento radio ativo para tumor ou outra condição de sua boca ou lábios	( )	( )	( )	( )	( )
i. Enxertos	( )	( )	( )	( )	( )

## APÊNDICE A

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)  
Comitê de Ética em Pesquisa CEP/UFFS

Prezado (a) participante,

Você está sendo convidado (a) para participar da pesquisa: **Sistema purinérgico, estresse oxidativo e inflamação na periodontite**, desenvolvida por discente (alunos) e docentes (professores) do curso de mestrado em Ciências Biomédicas da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus Chapecó – SC, sob coordenação da Professora Dra. Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel. Demais Colaboradores: Débora Tavares de Resende e Silva, Eduardo Ottobelli Chielle, Michele Gassen Kellermann e Silviane Cunico Carneiro Fuchter.

### 1. Objetivo Central

Avaliar parâmetros clínicos periodontais, modulação do sistema purinérgico, estresse oxidativo e inflamação em pacientes portadores da periodontite, comparados com pacientes sem a doença. A doença periodontal (DP) está relacionada com muitos agravos na cavidade bucal e doenças sistêmicas, onde vê-se possível relação da modulação do sistema purinérgico, estresse oxidativo no processo inflamatório relacionado a DP. Há necessidade de mais estudos, a fim de melhorar o diagnóstico e tratamento dos pacientes acometidos com a DP.

### 2. Critério de Inclusão

**Pacientes:** ambos os sexos, com diagnóstico de periodontite, maiores de 18 anos de idade, que até o momento não realizaram raspagem coronaradicular e/ou tratamento da periodontite com medicamentos. Serão excluídos pacientes que fazem uso de medicamentos que possam desencadear efeitos adversos no periodonto (anti-histamínicos, cortisona, hormônios, nifedipina e ciclosporina), pacientes gestantes ou lactantes, pacientes com diagnóstico anterior de câncer, fumantes ou com doenças inflamatórias crônicas (diabetes, hipertensão, doença de chron, retocolite ulcerativa, artrite reumatoide). Controles: com base no pareamento por idade (mais ou menos 3 anos) e sexo em relação aos pacientes, que não apresentem diagnóstico de periodontite ou de doenças inflamatórias crônicas. Sua participação não é obrigatória e você tem plena autonomia para decidir se deseja ou não participar, além de poder desistir da colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem ônus ou necessidade de explicação. Você não receberá remuneração e nenhum tipo de recompensa nesta pesquisa.

### 3. Mecanismos para garantir o sigilo e privacidade

Serão garantidas a confidencialidade e a privacidade das informações por você prestadas. As amostras biológicas e os dados clinicopatológicos serão identificados por numeração sequencial, não tendo vínculo com a identificação do paciente. O material coletado ficará em posse da pesquisadora responsável e será mantido em armário com cadeado, na sala da pesquisadora, nas dependências da UFFS campus Chapecó, ou em freezer no laboratório de pesquisa nas dependências da UFFS campus Chapecó, o qual apenas os pesquisadores envolvidos têm acesso. As informações coletadas dos prontuários médicos e odontológicos, dos pacientes envolvidos na pesquisa, será realizada em computador onde somente os pesquisadores terão acesso. Utilização de senha de alta segurança e uso de antivírus e *anti-malwares* no computador. Mínimo acesso a páginas de internet, restringindo-se somente a página referente aos prontuários eletrônicos do e-SUS. A qualquer momento você poderá solicitar aos pesquisadores informações sobre sua participação e/ou sobre a pesquisa, o que poderá ser feito através dos meios de contato explicitados neste Termo. Caso ocorra desistência, os materiais biológicos e as informações clinicopatológicas dos participantes serão descartados e destruídos.

#### **4. Identificação do participante ao longo do trabalho**

Seu nome não será mencionado durante qualquer etapa desta pesquisa, bem como em quaisquer publicações, cursos, relatórios e afins. Apenas o nome da Instituição será mencionado. Para manter o seu anonimato, será utilizada uma codificação numérica sequencial. Cada participante terá um número distinto em todos os materiais e dados relacionados a ele.

#### **5. Tempo de duração da coleta/procedimento/experimento**

A sua participação na pesquisa consiste em: 1. Pacientes - responder aos questionários de estilo e qualidade de vida e questões de autorrelato de condição periodontal; coleta e utilização dos materiais biológicos (sangue, saliva e biopsia gengival); disponibilização das **informações dos prontuários médicos e odontológicos** referentes à idade, sexo, história familiar, comorbidades (hipertensão, síndrome metabólica, diabetes, entre outras), reação alérgica a anestésicos e histórico de hemorragias. A pesquisa não irá gerar nenhum prejuízo no diagnóstico e tratamento da doença em questão; 2. Controles - responder aos questionários de estilo e qualidade de vida e questões de autorrelato de condição periodontal; coleta e utilização do material biológico (sangue e saliva) coletado durante a entrevista com os pesquisadores. As coletas serão realizadas pelos pesquisadores responsáveis e/ou enfermeira, em ambiente adequado na própria Unidade Básica de Saúde (UBS) do município de Belmonte/SC, a Unidade Sanitária Sede de Belmonte. O tempo de duração das coletas será de no máximo 30 minutos. Caso a coleta de material biológico e dados de prontuários e questionários ocorram durante o período de pandemia da COVID-19 serão adotados todos os protocolos de segurança, vigentes na UBS, desde a higienização e adequação do ambiente como o uso obrigatório de EPI's.

#### **6. Guarda dos dados e materiais coletados na pesquisa**

Todos os materiais biológicos serão guardados em freezer, devidamente identificados com numeração sequencial, nome do projeto e pesquisador responsável. Os outros materiais provenientes da pesquisa ficarão guardados em armário trancado com chave, ao qual somente o pesquisador responsável terá acesso. As tabelas com informações dos participantes da pesquisa ficarão guardadas nos computadores dos pesquisadores envolvidos, com acesso somente com senha. Todos os materiais serão mantidos pelo período de duração da pesquisa (5 anos). Após o término da pesquisa, os materiais biológicos e dados clinicopatológicos serão descartados.

#### **7. Benefícios diretos (individuais ou coletivos) aos participantes da pesquisa**

Durante o período de coleta de material biológico dos pacientes e controles, serão ofertadas consultas odontológicas e tratamento da DP, com retorno programado. A pesquisa também propiciará o desenvolvimento do conhecimento científico sobre a participação do sistema purinérgico e do estresse oxidativo no desenvolvimento e progressão da doença periodontal, possibilitando avanços nos processos de diagnóstico, tratamento e no prognóstico geral.

#### **8. Previsão de riscos ou desconfortos**

Esta pesquisa pode acarretar alguns riscos aos participantes, entretanto, cabe aos pesquisadores amenizá-los ou eliminá-los. Para realização das análises biológicas, será coletada uma amostra de sangue (30 ml) dos participantes. Tal procedimento poderá gerar desconforto, além de hematoma no local da punção. Para amenizar ou eliminar os riscos de desconforto e possíveis lesões, este procedimento será realizado por profissional da saúde (enfermeira) devidamente capacitado. Caso ocorra hematoma no local da punção será realizado compressas de gelo por 15 minutos (paciente deve prosseguir com as compressas de gelo por 15 minutos a cada hora pelas primeiras seis horas após a punção). Outros danos que podem ser decorrentes da pesquisa são os estéticos e funcionais, visto que a retirada de uma amostra do tecido gengival pode ocasionar recessão gengival e danos estéticos, porém, com o uso do punch, é possível retirar o mínimo possível de tecido gengival, e a área de coleta será distante da margem gengival, onde resultará em uma cicatrização rápida, sem necessidade de sutura e mínimo desconforto ao paciente. Caso ocorra a recessão gengival, o paciente receberá atendimento odontológico onde

será realizado o reposicionamento cirúrgico da gengiva, utilizando a própria gengiva adjacente para recobrir a área exposta. O procedimento será realizado por um dos pesquisadores envolvidos, dentista na UBS onde serão realizadas as coletas.

**9. Divulgação dos resultados da pesquisa**

A devolutiva dos resultados obtidos na pesquisa será realizada por meio de publicações científicas e participação em eventos científicos da área, com palestras e com o uso de *pôster* e *banner* ou informativos online. Os dados pessoais dos participantes não serão divulgados em nenhum momento, preservando o anonimato. Os principais resultados provenientes da pesquisa serão divulgados individualmente para cada participante por contato telefônico e/ou por e-mail.

Caso concorde em participar, uma via deste termo ficará em seu poder e a outra será entregue ao pesquisador. Desde já agradecemos sua participação!

Belmonte – SC, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_

Assinatura do Pesquisador Responsável

**Contato profissional com o(a) pesquisador(a) responsável:** Tel: 49-30254508/ e-mail: sarah.maciel@uffs.edu.br. Em caso de dúvida quanto à condução ética do estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFFS: Tel e Fax - 49- 2049-3745/ e-mail: cep.uffs@uffs.edu.br.

**Endereço para correspondência:** Comitê de Ética em Pesquisa da UFFS, Universidade Federal da Fronteira Sul, Bloco da Biblioteca, Sala 310, 3º andar, Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul, CEP 89815-899, Chapecó, Santa Catarina, Brasil.

Declaro que entendi os objetivos e condições de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Nome completo do participante e contato:

\_\_\_\_\_

Assinatura:

\_\_\_\_\_