



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Biociências
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

**Caracterização do papel da Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNP) nos mecanismos
de regulação da atividade osteoclástica.**

Autor
Candida Deves

Orientador
Prof. Dr. Eraldo L. Batista Jr.

Co-orientador
Prof. Dr. Diógenes S. Santos

Porto Alegre

Março de 2010



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Biociências
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

**Caracterização do papel da Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNP) nos
mecanismos de regulação da atividade osteoclástica.**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular
como requisito para a obtenção
do grau de Mestre.

Autor
Candida Deves

Orientador
Prof. Dr. Eraldo L. Batista Jr.

Co-orientador
Prof. Dr. Diógenes S. Santos

Porto Alegre

Março de 2010

ÍNDICE

Agradecimentos	I
Resumo	IV
Abstract	V
1.Introdução e Objetivos	1
1.1 Introdução	1
1.1.1 Tecido ósseo e osteoclastogênese	1
1.1.2 Osteoclastogênese mediada por linfócitos T	4
1.1.3 Doença periodontal	5
1.1.4 Purina Nucleosídeo Fosforilase	7
1.2 Objetivo geral	12
1.2.1 Objetivos específicos	12
2. Manuscrito	13
Title Page	14
Abstract	15
Introduction	16
Materials and methods	19
Results	27
Discussion	31
Acknowledgments	35
References	36
Legends	41
Figures	45
3. Considerações Finais	54
Referências Bibliográficas	57
Anexo I	
Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS	61
Anexo II	
Aprovação do Comitê de Ética para o Uso de Animais da PUCRS	62
Anexo III	
Artigo aceito pela revista Journal of Periodontal Research	63
Anexo IV	
Carta de aceitação do Artigo	64

RESUMO

A Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNP) é uma enzima envolvida no metabolismo de purinas que catalisa a fosforólise reversível de nucleosídeos purínicos tais como (deoxi)inosina e (deoxi)guanosina formando suas bases purínicas correspondentes e (deoxi)ribose-1-fosfato. A PNP é considerada uma enzima chave na via de salvamento de purinas de células de mamíferos. Especificamente, células T são dependentes da atividade da PNP para manter suas funções e sensíveis a alterações da mesma. O presente estudo tem como objetivo determinar se o bloqueio farmacológico da PNP com um análogo do estado de transição da enzima (Immucillin-H) é capaz de impedir a perda óssea em dois modelos de doença periodontal induzida em ratos. Dados experimentais mostram que o Immucillin-H inibiu a perda óssea induzida por ligaduras e por lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano assim como reduziu o número de osteoclastos e células inflamatórias. Ensaio *in vitro* revelaram que o Immucillin-H não age diretamente inibindo a diferenciação de células precursoras de osteoclastos, no entanto, afeta a osteoclastogênese mediada por linfócitos. Importante, a incubação de linfócitos T CD4+ pré-ativados e tratados com Immucillin-H diminuiu a secreção de RANKL. Desta forma, o Immucillin-H apresenta grandes premissas como uma droga no uso de doenças caracterizadas por alterações no metabolismo ósseo.

Palavras-chave: Purina nucleosídeo fosforilase, linfócitos T, reabsorção óssea, osteoclastos, Immucillin-H.

ABSTRACT

Purine Nucleoside Phosphorylase (PNP) is a purine-metabolizing enzyme that catalyzes the reversible phosphorolysis of purine nucleosides such as (deoxy)inosine and (deoxy)guanosine (dGuo) to their respective bases and (deoxy)ribose-1-phosphate. It is a key enzyme in the purine salvage pathway of mammalian cells. T-cells rely on PNP activity to maintain its functions and are particularly sensitive to PNP deficiency. The present investigation sought to determine whether the pharmacological blockage of PNP activity with a transition state analog (Immucillin-H) can arrest bone loss in two models of induced periodontal disease in rats. Experimental data showed that immucillin-H inhibited bone loss induced by ligatures and bacterial LPS, with reduced number of infiltrating osteoclasts and inflammatory cells. In vitro assays revealed that Immucillin cannot directly abrogate differentiation of osteoclast precursor cells but affects lymphocyte-mediated osteoclastogenesis. On the other hand, incubation of pre-activated T-CD4⁺ with Immucillin-H decreased RANKL secretion with no compromise of cell viability. Immucillin-H, an analog of the transition state of PNP activity, holds great promise as a drug in the treatment of diseases characterized by imbalances of bone metabolism.

Keywords: Purine nucleoside phosphorylase, T-lymphocytes, bone resorption, osteoclasts, Immucillin-H.

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVO

1.1 Introdução

1.1.1 Tecido ósseo e osteoclastogênese

O sistema esquelético exerce funções essenciais no suporte mecânico e na homeostase mineral. Osso é um tecido dinâmico que está sendo constantemente renovado, em resposta a estresse mecânico e mudanças hormonais (Voronov et al., 2005; Vega et al., 2007). Ademais, o esqueleto ósseo abriga elementos hematopoiéticos, protege vísceras e determina o tamanho e a forma do corpo (Kumar et al., 2005; Lerner et al., 2006). Duas células específicas são responsáveis pela manutenção constante da massa óssea; os osteoblastos (células formadoras de osso) e os osteoclastos (células que reabsorvem osso) (Liu et al., 2007; Voronov et al., 2005; Vega et al., 2007).

A remodelagem óssea ocorre dentro da unidade de remodelagem óssea e envolve o equilíbrio dinâmico entre reabsorção e formação do tecido ósseo. Cada ciclo de remodelagem inicia com a transformação de uma superfície óssea quiescente para uma superfície óssea reabsortiva. Os osteócitos têm função de transportar sinais locais aos osteoblastos e osteoclastos na superfície óssea, através de um sistema canalicular. A reabsorção óssea dentro de uma unidade de remodelagem é finalizada pela apoptose dos osteoclastos e é seguida por sinais enviados aos osteoblastos para preencherem as lacunas de reabsorção (Vega et al., 2007).

Células osteoprogenitoras são estimuladas por fatores de crescimento, como as proteínas morfogenéticas ósseas (do inglês Bone Morphogenetic Proteins ou BMPs), pertencentes à superfamília TGF- β , as quais promovem a divisão celular e

produção de precursores que irão se diferenciar em osteoblastos (Kumar et al., 2005). Os osteoblastos estão localizados na superfície do osso e tem função de sintetizar, transportar e organizar muitas proteínas da matriz óssea. Essas células também iniciam o processo de mineralização, expressam receptores celulares que ligam diversos hormônios (hormônio da paratireóide [PTH], vitamina D e estrogênio), citocinas, fatores de crescimento e proteínas da matriz extracelular. Os osteoblastos também possuem função de controlar a diferenciação dos osteoclastos, processo chamado de osteoclastogênese, do qual participam diversos reguladores positivos e negativos. Os osteoblastos secretam Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF) e o ligante do receptor ativador do fator nuclear kB (RANKL) que são necessários para a diferenciação dos osteoclastos, no entanto também secretam osteoprotegerina (OPG), que bloqueia esta ação (Vega et al., 2007).

O osteoclasto é a célula responsável pela reabsorção óssea sendo esta, derivado de células progenitoras hematopoiéticas que também dão origem a monócitos e macrófagos. Em ratos, uma série de fatores de transcrição, incluindo PU.1 e Fos são essenciais para o desenvolvimento de um fenótipo de osteoclasto (Kumar et al., 2005). Algumas citocinas e fatores de crescimento são cruciais para a diferenciação e maturação dos osteoclastos em humanos, incluindo as interleucinas (IL)-1, IL-3, IL-6, IL-11, o fator de necrose tumoral α (TNF α), o fator de estimulação de colônia de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) e o fator de estimulação de colônia de macrófagos (M-CSF) (Vega et al., 2007).

O sistema parácrino é essencial no metabolismo ósseo e seus mediadores incluem as moléculas RANK (Receptor Ativador para Fator Nuclear kB), RANKL e OPG. O RANK é um membro da família TNF de receptores expresso principalmente em linhagens de células monocíticas tais como, os pré-osteoclastos. A interação

entre as células ósseas e essas citocinas permite que os osteoblastos e as células estromais controlem o desenvolvimento dos osteoclastos, assegurando a correta formação e reabsorção óssea (Kumar et al., 2005; Vega et al., 2007). Quando o receptor é ativado por seu ligante, RANKL, através do contato célula-célula, a osteoclastogênese é iniciada. RANKL é produzido e expresso nas membranas celulares dos osteoblastos e das células estromais medulares; sua principal função é a estimulação da formação do osteoclasto, interferindo no metabolismo ósseo, fusão, diferenciação, ativação e sobrevivência. A ação do RANKL pode ser bloqueada por outro membro da família de receptores TNF, a OPG, uma proteína solúvel produzida pelo tecido ósseo, células medulares hematopoiéticas e células do sistema imunológico. A OPG inibe a osteoclastogênese ligando-se ao RANKL, impedindo a interação entre RANK e RANKL; desta forma, o aumento da reabsorção óssea é causado pela diminuição da expressão de OPG (Wittrant et al., 2004).

1.1.2. Osteoclastogênese mediada por linfócitos T

Doenças crônico-inflamatórias, tais como artrite reumatóide, periodontites, deficiência de estrogênio (osteoporose pós-menopausa) estão associadas à diminuição da massa óssea local e sistêmica devido à reabsorção óssea progressiva e excessiva mediada por osteoclastos. (Wyzga et al., 2004; Gao et al., 2007; Ikeda et al., 2004). Em condições de quebra da homeostase tecidual, os linfócitos T ativados apresentam uma função relevante na regulação da perda óssea, através da produção de RANKL, levando à indução da osteoclastogênese. (Wyzga et al., 2004). A reabsorção óssea é estimulada em decorrência da produção desequilibrada de fatores pró- e anti-osteoclastogênicos, caracterizando um estado de ativação do

sistema imune, principalmente pela síntese elevada de IFN- γ , potente ativador de células apresentadoras de antígenos e mediador central da imunidade adaptativa pelas células Th1 (Gao et al., 2007). Esse evento pode ser observado, por exemplo, em condições inflamatórias associadas à deficiência de estrogênio, onde células T ativadas secretam IFN- γ , resultando em uma expressão elevada de MHC II, através do fator de transcrição CIITA, gerando, portanto, um aumento da apresentação antigênica por células dendríticas e macrófagos (Pacifici, 2008). Por outro lado, a deficiência de estrogênio amplifica substancialmente a ativação de células T e a osteoclastogênese pela diminuição da produção de antioxidantes em diferentes tipos celulares, levando ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS). ROS estimulam, também, a apresentação antigênica e produção de TNF α por osteoclastos maduros. Os efeitos combinados do IFN- γ e do aumento de ROS levam, portanto, ao aumento da apresentação antigênica, à ativação elevada de células T, as quais secretam os fatores osteoclastogênicos RANKL e TNF α . O TNF α , por sua vez, estimula células estromais medulares e osteoblastos a produzirem RANKL e M-CSF, levando à formação osteoclástica. Outras citocinas, tais como: IL-1 e IL-7 igualmente implicam na perda óssea exacerbada, devido aos seus efeitos repressores sobre a atividade de osteoblastos, resultando no bloqueio da formação óssea (Weitzmann et al., 2006; Pacifici, 2008).

1.1.3 Doença periodontal

As doenças periodontais caracterizam-se por uma série de eventos inflamatórios resultantes da resposta dos tecidos de suporte dentário à presença de patógenos orais organizados sob a forma de um biofilme (Socransky and Haffajee, 2002). O acúmulo e a alteração progressiva do perfil bacteriano predominante leva a

uma resposta dos tecidos periodontais caracterizada pela presença de infiltrado inflamatório. Com a permanência do biofilme e, conseqüentemente, de fatores de virulência bacterianos, leucócitos polimorfonucleares e monócitos são recrutados a partir da rede vascular terminal e migram para o sítio de inflamação a fim de fagocitar e destruir patógenos (Wyzga et al., 2004). Dentre os fatores de virulência bacterianos, os lipopolissacarídeos são capazes de ativar linfócitos e leucócitos através da interação com receptores específicos, induzindo a expressão de citocinas e proteínas quimiotáticas que amplificam ainda mais a resposta inflamatória (Eley and Cox, 2003). Associado a isso, enzimas líticas colagênicas como colagenases e estromelina são produzidas, promovendo desorganização da matriz extracelular, com conseqüente perda de inserção periodontal (Uitto et al., 2003). Monócitos, também povoando o infiltrado inflamatório, podem se diferenciar em osteoclastos a partir de sinais extracelulares e iniciar a reabsorção do osso alveolar. Nessa etapa, linfócitos têm um papel preponderante, produzindo RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand), moléculas-chave nos mecanismos de ativação osteoclástica (Han et al., 2006).

Evidências recentes mostram que o biofilme bacteriano age como um elemento desencadeador do processo (Socransky and Haffajee, 2002). No entanto, a maior parte da destruição é de fato mediada pela resposta do hospedeiro representada por linfócitos, macrófagos e neutrófilos. O papel de linfócitos e da resposta imune no processo de destruição do osso alveolar na periodontite parece ser preponderante. Nesse contexto, foi demonstrado que linfócitos presentes no periodonto também expressam RANKL, sendo capazes de modular a osteoclastogênese num modelo de doença periodontal induzido pela inoculação de um patógeno periodontal em ratos (Han et al., 2006). Assim, células do sistema

imune representam alvos estratégicos para a compreensão e o desenvolvimento de abordagens terapêuticas que visem controlar a progressão da doença periodontal e reduzir a morbidade a ela relacionada.

1.1.4 Purina Nucleosídeo Fosforilase

A purina nucleosídeo fosforilase (do inglês Purine Nucleoside Phosphorylase - PNP) é uma enzima que age como catalisadora da reação reversível de fosforólise de nucleosídeos purínicos, formando a base purínica guanina e α -ribose 1-fosfato (Bzowska et al., 2000). Como substrato, a PNP utiliza basicamente inosina e guanosina, derivadas da hidrólise de ribonucleotídeos e 2-deoxiguanosina (dGuo), esta última originada diretamente da degradação do DNA. Através desse processo enzimático, purinas são resgatadas (via de salvamento de purinas) gerando nucleotídeos para síntese de DNA e RNA em células cuja atividade proliferativa esteja aumentada. Duas enzimas que utilizam dGuo como substrato são PNP e deoxicitidina quinase (dCyK). Enquanto a PNP catalisa a fosforólise de dGuo em guanina e ribose 1-fosfato, a dCyK catalisa a conversão de dGuo em dGMP, o qual é convertido em dGTP. dGuo apresenta maior afinidade pela PNP em relação à dCyK. Na presença de inibidores da PNP, a proliferação espontânea *in vitro* de células T é suprimida, devido ao acúmulo de dGTP nessas células (Fig. 1). O acúmulo intracelular de dGTP em células T está relacionado com a incapacidade de nucleotídeos atravessarem a membrana celular resultando na inibição da síntese de DNA e replicação celular (Bantia et al., 2001; Kilpatrick et al., 2003).

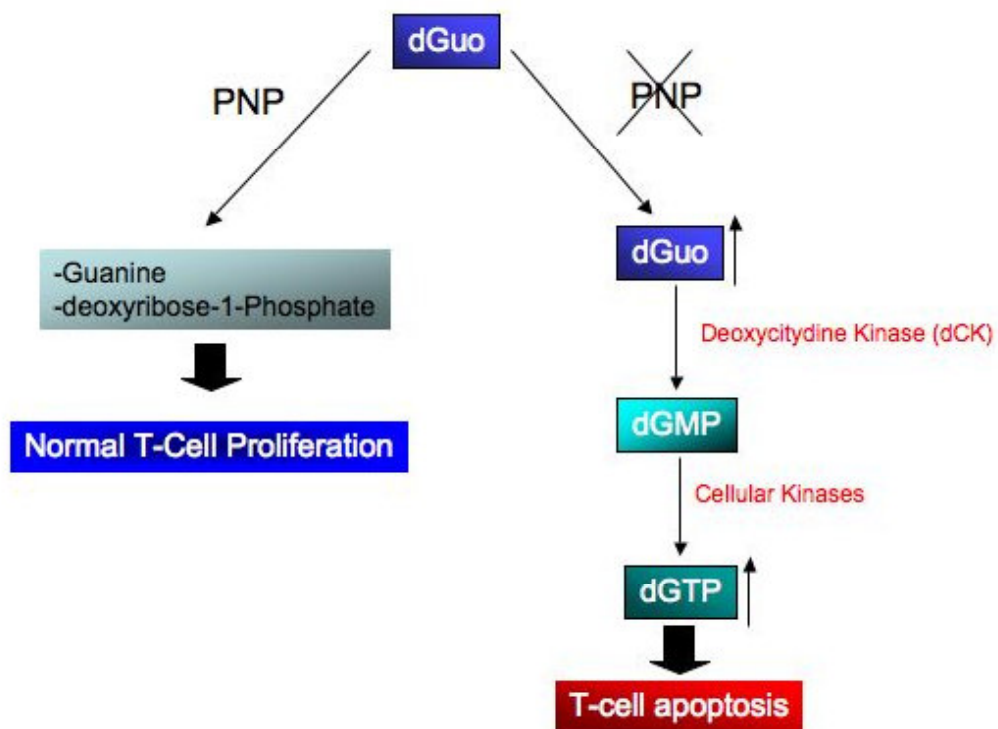


Figura 1. PNP catalisa a fosforólise reversível de deoxiguanosina (dGuo), gerando guanine e deoxirribose-1 fosfato. O acúmulo de dGuo devido a deficiência ou bloqueio de PNP induz a uma cascata de eventos enzimáticos levando a apoptose de células T. Adaptada de Kazmers et al., 1981.

A importância da PNP na integridade do sistema imune tornou-se relevante a partir da descrição de uma imunodeficiência encontrada em crianças que não possuíam a enzima PNP (Giblett et al., 1975). Essas crianças exibiam uma depleção seletiva de células T, sugerindo que a atividade da PNP é necessária para a proliferação normal de células T humanas. A atividade da PNP já foi verificada em tecidos e secreções de diferentes espécies de mamíferos (Jonsson et al., 1992; Mohamedali et al., 1993; Silva et al., 2004). Mutações deste gene têm sido relacionadas a deficiências na proliferação de linfócitos T, sem comprometimento da linhagem B (Giblett et al., 1975; Kilpatrick et al., 2003). Linfócitos T são largamente dependentes da PNP para manter suas funções. O fato de que a PNP é tão importante nessa população de células e, conseqüentemente, na imunidade celular, a torna um alvo de grande interesse para o desenvolvimento de drogas com potencial terapêutico em doenças autoimunes e crônico-inflamatórias como artrite reumatóide, doença de Crohn e psoríase.

Seguindo essa premissa, esforços recentes levaram ao desenvolvimento do Immucillin-H (BCX-1777), uma droga inibitória análoga do estado de transição da PNP (Banti et al., 2002; Lewandowicz et al., 2003), que tem apresentado efeitos promissores no controle de leucemias em estudos clínicos de fase I (Bantia et al., 2004). O Immucillin-H foi capaz de inibir a proliferação de linhagens de células T humanas malignas e células T ativadas na presença de dGuo (Kilpatrick et al., 2003). Linfócitos isolados de ratos, cães, camundongos e macacos respondem à administração de Immucillin-H em cultura, sendo que, em humanos, a droga é capaz de suprimir a proliferação de linfócitos (Banti et al., 2002). O perfil crônico-inflamatório de diversas doenças e a importância da imunidade celular na reabsorção

óssea fazem da PNP e de drogas dirigidas a seu bloqueio controlado alvos de estudo bastante promissores.

Resultados de um estudo por nós conduzido (Batista et al., 2010; manuscrito aceito para publicação, ver anexo III) indicaram atividade intensa da PNP no fluido gengival de pacientes com doença periodontal severa. Interessantemente, o tratamento desses pacientes levou à redução significativa da atividade da PNP que foi positivamente correlacionada à melhoria observada nas variáveis clínicas. Da mesma forma, resultados relativos à expressão gênica de RNA mensageiro (mRNA) de PNP foi maior em sítios onde havia presença de uma resposta imune/inflamatória em relação ao controle. Estudos em cultura de células TCD4+ de memória extraídas do sangue periférico de humanos saudáveis e posteriormente incubadas com o mitógeno Concanavalina A (ConA), revelaram um aumento na atividade específica da PNP em relação a células não estimuladas. Foi verificada também a expressão do mRNA da PNP de linfócitos TCD4+ de memória humanos incubados com ConA; nossos resultados indicaram que a expressão do mRNA de PNP aumentou após 24 h de ativação atingindo um valor 6 vezes maior após 48 h de incubação em relação às células não estimuladas.

Tendo em vista os resultados apresentados acima, a PNP parece ser uma enzima fundamental na regulação da resposta mediada por linfócitos TCD4+, entretanto seu papel nos eventos mediados por linfócitos que levam à reabsorção óssea não estão claros. Assim, estudos dirigidos à investigação do uso de bloqueadores da PNP sobre a perda óssea em modelos de doença periodontal em animais fazem-se necessários a fim de melhor estabelecer o potencial destes compostos no tratamento destas alterações.

3. Considerações Finais

Nossos resultados fornecem as primeiras evidências documentadas de estudos controlados empregando um análogo do estado de transição da PNP (Immucillin-H) no manejo de processos no campo da osteoimunologia. A purina nucleosídeo fosforilase (PNP) é uma enzima que age como catalisador da reação reversível da fosforólise de nucleosídeos purínicos, formando a base purínica guanina e α -ribose 1-fosfato (Bzowska et al. 2000). Através desse processo enzimático, purinas são resgatadas, pela via de salvamento de purinas, em células cuja atividade proliferativa esteja aumentada. Além do mais, mutações deste gene têm sido relacionadas a deficiências na proliferação de linfócitos T sem comprometimento da linhagem B (Giblett et al. 1975).

Linfócitos T são largamente dependentes da PNP para manter suas funções (Banti et al. 2002; Lewandowicz et al. 2003). O fato de que a PNP é tão importante nessa população de células e, conseqüentemente, na imunidade celular, a torna um alvo de grande interesse para o desenvolvimento de drogas com potencial terapêutico em doenças autoimunes e crônico-inflamatórias como artrite reumatóide, doença de Crohn e psoríase.

No presente estudo, o emprego do análogo do estado de transição da PNP bloqueou a perda óssea induzida por inflamação a níveis compatíveis com animais não submetidos à doença periodontal. Contrariamente, animais que receberam apenas veículo apresentaram severa destruição do suporte ósseo na região delimitada pela posição da ligadura e injeções de LPS. A análise histológica demonstrou uma redução significativa do número de células inflamatórias

concentradas na região da furca, bem como redução no número de células multinucleadas compatíveis com a morfologia de osteoclastos.

Nesse primeiro grupo de experimentos optamos pelos modelos de doença periodontal por serem os mesmos bem caracterizados e envolverem um grupo mais heterogêneo de tecidos submetidos a um complexo ecossistema. A doença periodontal é classicamente definida como uma alteração desencadeada por patógenos organizados sob a forma de um biofilme e mediada principalmente por resposta Th1 (Carayol et al. 2006), embora evidências recentes sugiram uma resposta mais plástica com possível participação de Th17 (Ouyang et al., 2008). O controle da perda óssea através do emprego de um bloqueador da PNP demonstra a importância desta enzima na modulação da resposta inflamatória e atividade destrutiva mediada por osteoclastos em modelos de acúmulo natural de biofilme (ligadura) e fator de virulência bacteriano (LPS).

Adicionalmente, experimentos *in vitro* em cultura de células osteoprogenitoras e linfócitos T CD4+ de camundongos foram conduzidos com a finalidade de propor um mecanismo de ação do análogo de transição da PNP sendo que este poderia estar ocorrendo diretamente sobre a osteoclastogênese, sobre osteoclastos diferenciados e/ou sobre linfócitos T. Resultados obtidos neste estudo indicam que linfócitos T CD4+ respondem ao tratamento do Immucillin-H levando a redução da atividade específica da PNP e de RANKL em cultura de células e também, levando a diminuição da formação de osteoclastos em ensaio de co-cultura de células. De acordo com os resultados *in vivo* e *in vitro* por nós apresentados, a PNP assume um papel fundamental na montagem da resposta mediada por linfócitos T associada à ativação da osteoclastogênese e da perda óssea. Por outro lado, não houve efeito

direto sobre osteoclastos, sugerindo que a PNP não tem maior participação na ativação direta de osteoclastos ou efeito direto sobre a osteoclastogênese.

Como demonstrado, bloqueadores da PNP tornam-se uma alternativa terapêutica promissora para o tratamento de doenças caracterizadas pela ativação de mecanismos imunes cujo desfecho é a reabsorção óssea. Além disso, nossos resultados fornecem consistentes indicações de que um análogo do estado transição da PNP (Immucillin-H) pode ter aplicações mais amplas em patologias caracterizadas por alterações que levem perda de massa óssea.