



Bem-vindo Revista Periodontia Maio/Dezembro-1999

PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEASES PRESENTES NO FLUIDO DO SULCO GENGIVAL EM UMA FAMÍLIA COM PERIODONTITE JUVENIL LOCALIZADA

Sinopse

Ana Paula SOUZA e Paula Cristina TREVILATTO *

Vinícius A. TRAMONTINA, Maria Ângela N. MACHADO,
Getúlio da Rocha NOGUEIRA Filho**

Abstract

Antônio Wilson SALLUM***

Sérgio Roberto Peres LINE****

SINOPSE

A periodontite juvenil localizada (PJL) é um tipo de doença periodontal com início precoce e progressão rápida. O diagnóstico preciso desta doença somente pode ser realizado com certeza na fase inicial, restando ainda algumas dúvidas quando o exame clínico e radiográfico detectam perdas pequenas de inserção conjuntiva. Entretanto, a PJL representa um tipo grave de doença periodontal, com características peculiares, que muitas vezes exige a administração de coadjuvantes terapêuticos. Nos últimos anos, maior atenção tem sido dada ao estudo das proteases encontradas no fluido do sulco gengival (FSG), através de técnicas de biologia molecular e celular, na tentativa de melhor entender os eventos que ocorrem na PJL. O objetivo deste trabalho foi estudar o perfil eletroforético das proteases presentes no FSG em um grupo familiar com PJL e comparar com o perfil encontrado em um grupo controle normal.

UNITERMOS

Periodontite juvenil localizada, fluido do sulco gengival, proteases.

INTRODUÇÃO

A periodontite juvenil localizada (PJL) se caracteriza como uma desordem inflamatória que atinge os tecidos que dão sustentação ao dente. Com início na puberdade, este tipo de periodontite acomete praticamente em um mesmo grupo de dentes e apresenta vários graus de severidade. Se não diagnosticada e tratada corretamente há tempo, destrói os tecidos do periodonto e leva à perda do órgão dental rapidamente. Entretanto, o diagnóstico da PJL é limitado à história da doença, ao exame clínico e radiográfico, caracterizado por imagens que mostram lesões de perda óssea angular na interproximal dos dentes afetados.

Com o avanço das técnicas em biologia molecular e celular e com o melhor entendimento sobre a fisiologia do periodonto, têm crescido progressivamente as pesquisas que envolvem o diagnóstico da doença periodontal através de análise laboratorial dos fluidos e tecidos⁶.

O estudo da composição do fluido do sulco gengival (FSG) revela dados importantes para o melhor entendimento do processo e da fase de atividade da periodontite⁵, que apresenta ciclos de exacerbação e quiescência¹⁶. O FSG, que na doença é um exudato presente na bolsa periodontal, carrega considerável quantidade de moléculas que estão envolvidas com o processo destrutivo³. Entre estes biomarcadores, encontramos diversas proteases de grande interesse, visto que desempenham potente papel na destruição tecidual^{1,9}.

Entre estas proteases, citamos as colagenases e as gelatinases que degradam os diversos tipos de colágeno. As primeiras são enzimas sintetizadas por fibroblastos e neutrófilos leucócitos polimorfonucleados

(PMN), responsáveis pela quebra da tripla hélice do colágeno tipo I encontrado abundantemente no periodonto. As segundas, classificadas como gelatinase A, produzida por fibroblastos e macrófagos^{4, 11} e gelatinase B, sintetizada por neutrófilos PMN e células epiteliais^{7,10}, são responsáveis pela degradação do colágeno tipo IV, participando também da degradação do colágeno tipo I que foi previamente clivado pelas colagenases². Ambas apresentam alta atividade durante a doença periodontal ativa.

O objetivo deste trabalho foi investigar através de zimografia o perfil eletroforético das proteases presentes no FSG em um grupo familiar composto por dez irmãos portadores de PVL, com idade variando entre 10 a 24 anos, que apresentavam desde pequenas até grandes perdas de estruturas periodontais e comparar com o perfil eletroforético encontrado em um grupo controle formado por indivíduos normais.

MATERIAL E MÉTODOS

Escolha dos grupos de estudo

Dentre os irmãos do grupo com PVL, dois eram do sexo masculino (idade média de 11 anos) e oito eram do sexo feminino (idade média de 16 anos). Todos eles eram filhos do mesmo pai e da mesma mãe. Os pacientes receberam tratamento na clínica de pós-graduação em periodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-Unicamp, e o

critério usado para o diagnóstico de PJI foi o de Page e Schroeder¹³. A mãe dos irmãos do grupo com PJI (48 anos) foi utilizada como controle interno da pesquisa. Nove estudantes de odontologia, sete mulheres e dois homens (idade média de 21 anos), que apresentavam saúde gengival satisfatória, formaram o grupo controle. O protocolo utilizado foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOP/Unicamp.

Coleta do FSG

As amostras de FSG foram coletadas de bolsas periodontais (> 4 mm) após prévio exame clínico e radiográfico. A superfície do dente foi limpa, seca e isolada com rolos de algodão. Três tiras de papel filtro foram utilizadas, sendo colocadas de forma que invadiam em 1 mm o sulco gengival e, assim, foram mantidas por três minutos para coleta do FSG. Após, o fluido absorvido foi diluído em 50 mL de tampão contendo 0,2 M NaCl, 10 mM CaCl₂, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5^{17, 18}. Os volumes não foram estimados porque os parâmetros avaliados eram de caráter qualitativo e não quantitativo.

Zimografia

A atividade proteolítica nas amostras de FSG foi analisada por zimografia em gel de poliacrilamida a 10%, contendo 0,05% de gelatina ou 0,03% de caseína como substrato. A zimografia é uma técnica eletroforética específica para detectar atividade enzimática. As amostras de FSG foram incubadas em 100 mL de tampão de amostra não-redutor por 20 min a 70°C, sendo então 50 mL de cada amostra aplicados em um gel contendo gelatina e 50 mL aplicados em um gel contendo caseína. Após eletroforese a 20 mA, os géis foram lavados por duas vezes em Triton X-100 por 20 min à temperatura ambiente e incubados por 24 horas a 37°C em tampão Tris-HCl 50 mM/CaCl₂ 5 mM, pH 7,4.

Em seguida, os géis foram corados com 0,05% Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio Rad, Richmond, CA). A atividade enzimática foi detectada como bandas descoradas.

Um padrão de massa molecular (Sigma) foi utilizado para determinar a massa aproximada das enzimas.

RESULTADOS

As bandas detectadas no ensaio zimográfico em gel de gelatina demonstraram um perfil eletroforético semelhante no fluido do sulco gengival de todos os irmãos portadores de PVL. Múltiplas formas de enzimas capazes de degradar gelatina foram verificadas entre os indivíduos do grupo. As bandas maiores apresentaram massa molecular aproximada entre 80-92 kDa, havendo outras bandas com massa molecular menor (figura 1).

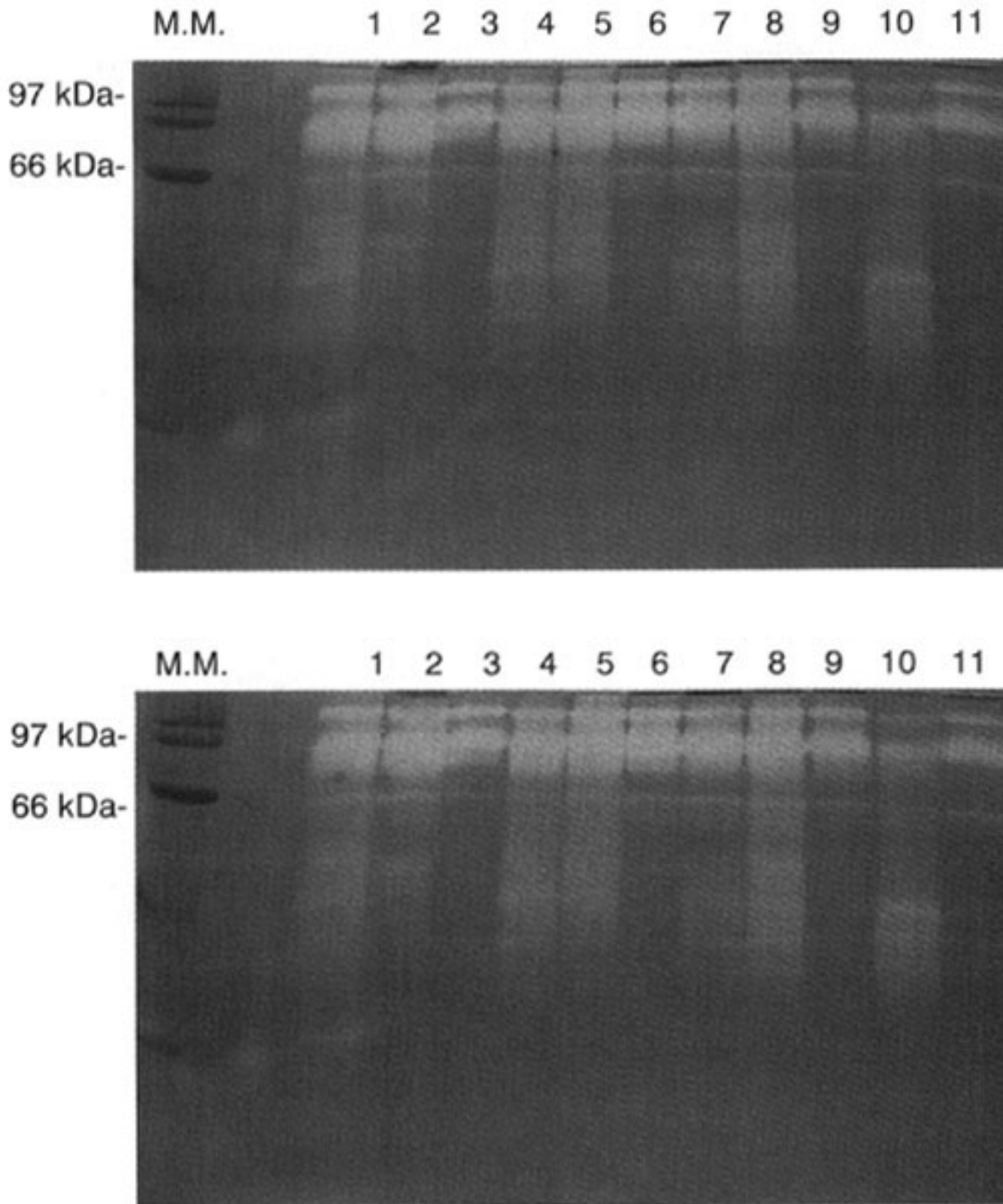
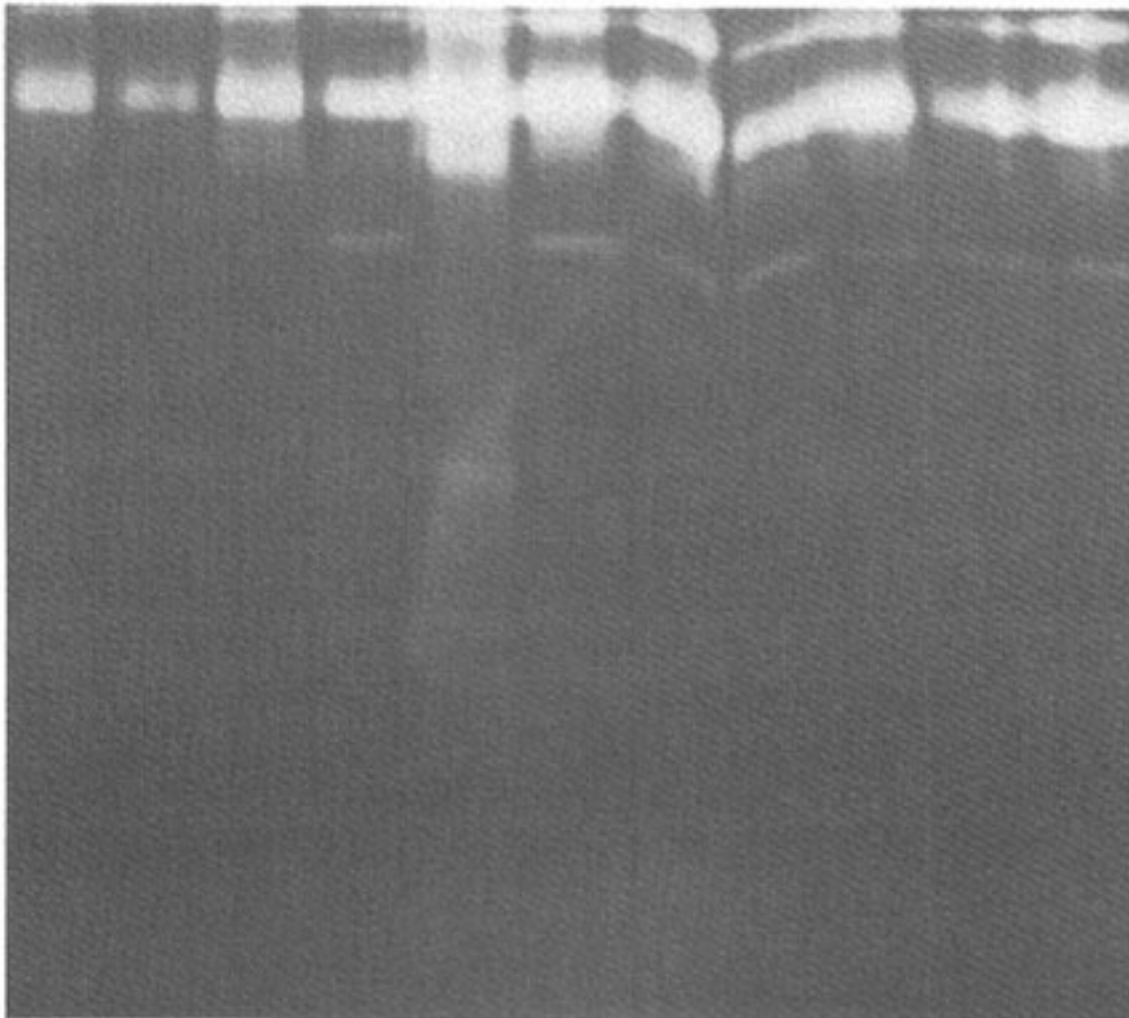


Figura I

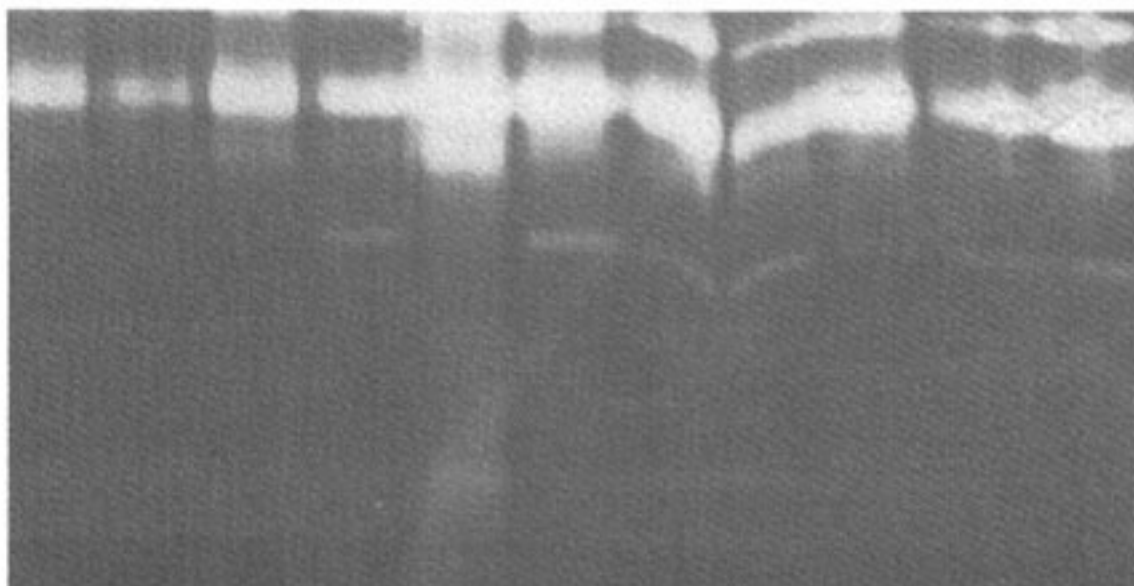
FIGURA I: Zimografia em gel de poliacrilamida contendo gelatina. As bandas claras representam a atividade de proteases existentes no FSJ dos irmãos portadores de PjL (1 a 10). Nota-se a presença somente de proteases com massas moleculares maiores no FSG da mãe destes indivíduos (11).

O perfil de bandas presente no fluido do sulco gengival da mãe dos indivíduos apresenta, entretanto, somente bandas com maior massa molecular. Entre os indivíduos do grupo controle o mesmo foi observado, aparecendo somente bandas com maior massa molecular (figura 2).

97 kDa-



97 kDa-



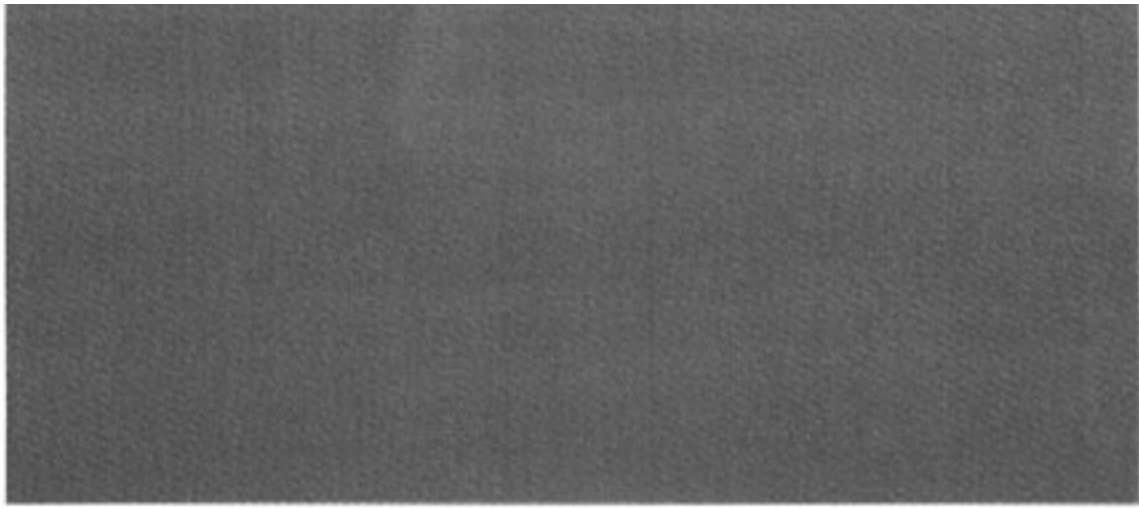


Figura II

FIGURA II: Zimografia em gel de poliacrilamida contendo gelatina. As bandas claras representam a atividade de proteases existentes no FSG de alguns indivíduos não afetados pertencentes ao grupo controle.

No ensaio zimográfico em gel de caseína, as bandas encontradas entre os irmãos portadores de PJL também apresentaram perfil eletroforético semelhante, com massa molecular de aproximadamente 70 kDa e 50 kDa (figura 3).

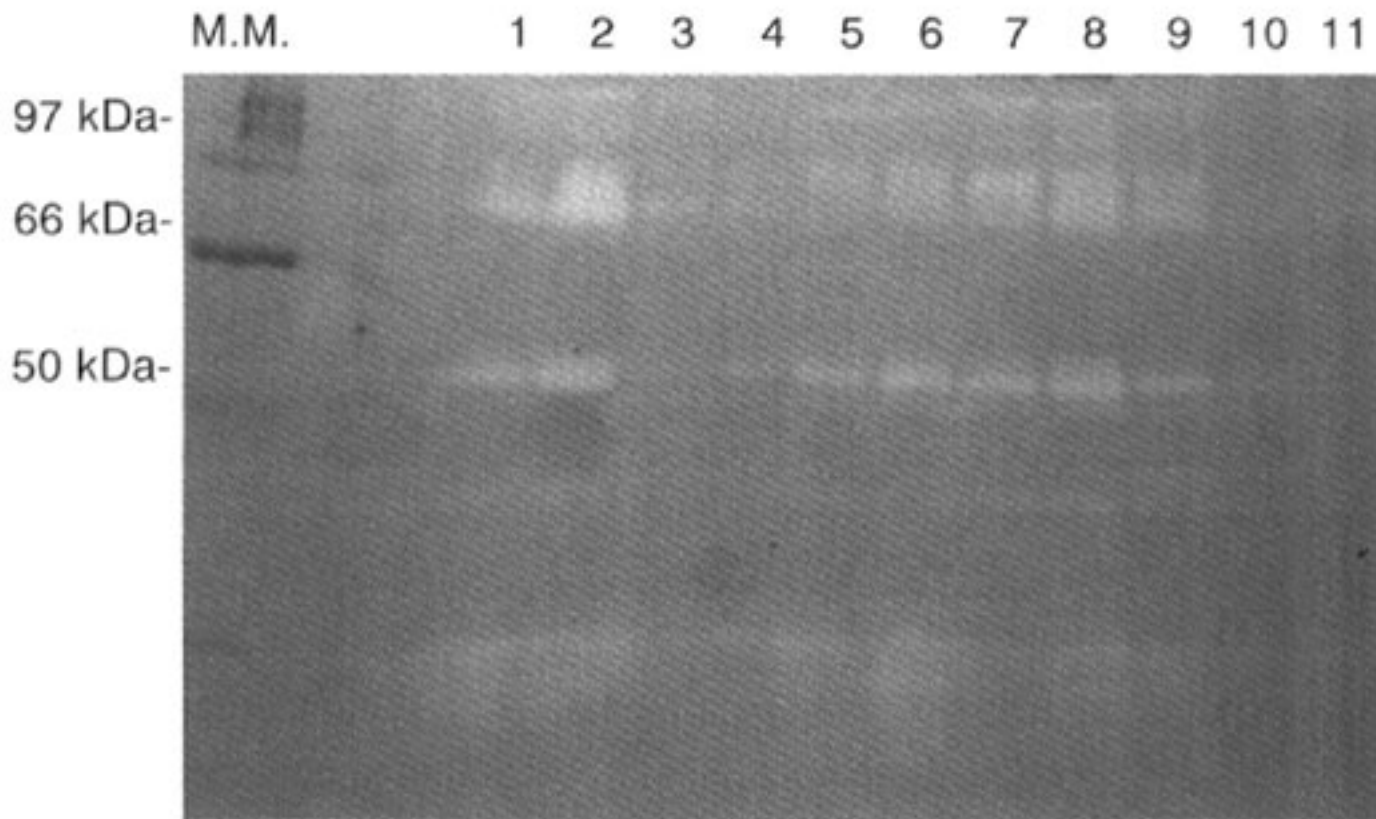
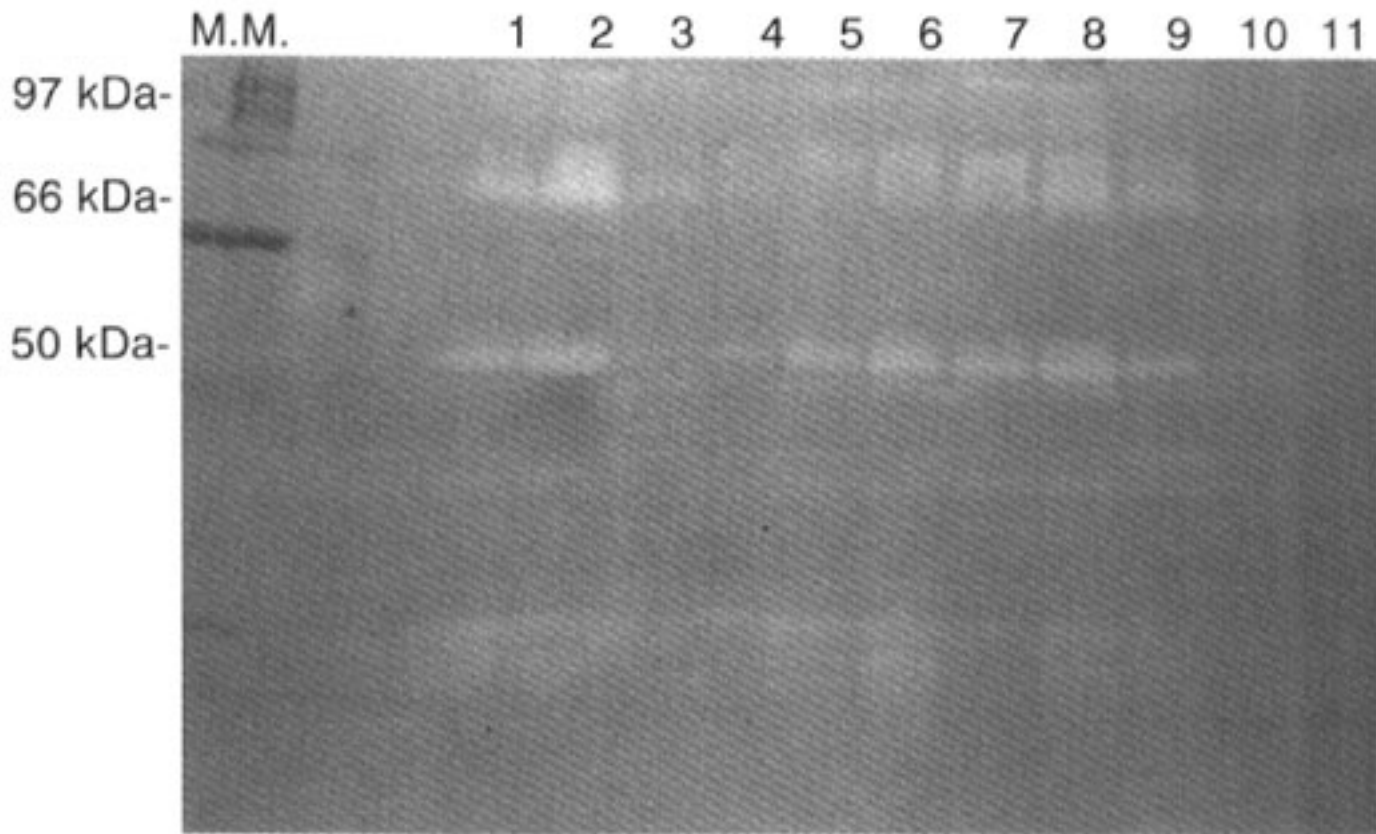


Figura III

FIGURA III: Zimografia em gel de poliacrilamida contendo caseína. As bandas claras representam a atividade de proteases existentes no FSG dos irmãos portadores de PJI (1 a 10). Note o padrão que se repete entre os irmãos afetados pela PJI, exceto em um dos indivíduos (10), e as bandas claras com massa molecular de 50kDa. O FSG da mãe destes indivíduos não demonstra atividade de proteases no gel contendo caseína, assim como os sujeitos do grupo controle não afetados (não mostrado).

Com relação à mãe destes indivíduos e aos indivíduos do grupo controle, nenhuma atividade enzimática foi verificada no gel de caseína.

DISCUSSÃO

A zimografia representa uma técnica eletroforética utilizada para detectar atividade enzimática em amostras contendo mínimas quantidades de proteases. A especificidade da técnica fica por conta do substrato oferecido às enzimas, visto que estas possuem a capacidade de degradar substratos específicos. Em nosso ensaio, foram utilizados géis contendo gelatina ou caseína para a verificação da atividade de proteases capazes de degradar esses substratos.

Amostras de fluido do sulco gengival de indivíduos com PJI e normais apresentaram atividade gelatinolítica de enzimas com alta massa molecular, aproximada entre 80-92 kDa. Estas poderiam corresponder à gelatinase B de 92 kDa, secretada principalmente por leucócitos PMN que habitualmente são encontrados no FSG⁸, e por células epiteliais^{10, 7, 14}. Bandas menores com massa molecular de 72 kDa, que poderiam

corresponder à forma da gelatinase A, foram detectadas nas amostras de indivíduos com PJI e em alguns do grupo controle, porém, em níveis mais baixos. Estes achados estão em concordância com outros estudos previamente realizados⁸. Segundo Suomalainen et al¹⁹, é possível que as proteases com massa de 92 kDa, encontradas no grupo com PJI, tenham origem não somente de PMN, mas também de outros tipos celulares, como fibroblastos.

A origem das proteases com bandas de menor massa molecular com atividade no gel de gelatina para o grupo com PJI está de acordo com a literatura^{5,12,8}, mas não é bem compreendida. Representa um achado importante já que a não presença destas formas no grupo controle pode evidenciar reflexos de processos associados com a inflamação e a doença periodontal nas amostras estudadas.

A atividade proteolítica encontrada no gel de caseína foi positiva somente para o grupo com PJI. A caseína é um substrato capaz de ser degradado por tipos de colagenases e estromelisinases, estando estas últimas mais relacionadas com a doença periodontal no adulto. As bandas possuem massa molecular entre 70 e 50 kDa, valores próximos à massa da colagenase de neutrófilos PMN (75 kDa) e fibroblastos (57/52 kDa). Não podemos afirmar, com certeza, que estas enzimas pertençam à classe das colagenases, o mesmo vale para as gelatinases. Isto só poderia ser feito após caracterização com anticorpos específicos.

Contudo, o quadro observado no grupo com PJI demonstra uma situação real, não encontrada em condições normais. Desse modo, se considerarmos verdade o que anteriormente foi dito, haveria demasiada quantidade de enzimas do tipo colagenase no FSG dos indivíduos com PJI, inclusive colagenases produzidas por fibroblastos, que são células não envolvidas com o processo inflamatório, mas que estariam de alguma forma funcionalmente alteradas durante a doença^{5, 8}.

Seymour et al¹⁵, estudando o efeito das tetraciclinas nas doenças periodontais, observaram que este medicamento tem excelente efeito na doença periodontal do adulto, o mesmo não sendo visto na periodontite juvenil. O autor sugere que há atividade de colagenase proveniente de leucócitos durante a periodontite do adulto, uma vez que tetraciclinas agem inibindo muito bem a atividade destas enzimas e atividade de colagenase de fibroblastos na periodontite juvenil, porque tetraciclinas não têm boa ação inibitória sobre estas.

O perfil das proteases encontradas no FSG deste grupo familiar mostrou um caráter alterado que se repete em todos os membros afetados. Uma caracterização clara e rigorosa através de vários modelos experimentais das proteases encontradas no FSG nos vários tipos de doença periodontal poderia servir de ferramenta valiosa para diagnosticar corretamente e entender o curso da doença. Com isso, os vários medicamentos administrados como coadjuvantes terapêuticos, que têm por função inibir a ação das proteases envolvidas na destruição tecidual, seriam melhor explorados e adequadamente administrados conforme o caso.

CONCLUSÃO

Notamos que o perfil das proteases encontradas no grupo com PJI difere do padrão normal, apresentando bandas de menor massa molecular com atividade gelatinolítica e atividade de proteases no gel de caseína não detectadas em situação normal.

ABSTRACT

Localized juvenile periodontitis (LJP) is a kind of periodontal disease with early start and quick progression. Accurate diagnosis of the disease only may be done in beginning, there being still some doubts when the clinical and radiographic exams show small attachment loss. LJP is a grave periodontal disease, with peculiar characteristics, since usually requires the use of medical therapy in conjunction with clinical treatment. In the past few years several authors have shown that gingival crevicular fluid (GCF) proteases play an important role in periodontal destruction. The study of GCF proteases has contributed to a better understanding of the cellular and molecular events which occur in LJP. The aim of this work was to study the electrophoresis profile of proteases present in GCF of a familiar group with LJP and to compare the results with normal subjects.

KEY WORDS

Localized juvenile periodontitis, gingival crevicular fluid, proteases.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - ATICI, K. et alli - Analysis of Gingival Crevicular Fluid Intracytoplasmic Enzyme Activity in Patients With Adult Periodontitis and Rapidly Progressive Periodontitis. A Longitudinal Study Model With Periodontal Treatment. J. Periodontol. 69: 1155-1163, 1998.
- 2 - BIRKEDAL-HANSEN, H. - Role of Matrix Metalloproteinases in Human Periodontal Disease. J. Periodontol. 64: 474-484, 1993.
- 3 - CIMASONI, G.- Crevicular Fluid Update. In Monographs in Oral Sciences 12: 1-52, 1983.
- 4 - COLLIER I.E. et alli - H-Ras Oncogene -Transformed Human Bronchial Epithelial Cells (TBE-1) Secrete a Single Metalloprotease Capable of Degrading Basement Membrane Collagen. J. Biol. Chem. 263: 6579-6587, 1988.
- 5 - GANGBAR S. et alli - Identification of Polymorphonuclear Leukocyte Collagenase and Gelatinase Activities in Mouthrinse Samples: Correlation With Periodontal Disease Activity in Adult and Juvenile Periodontitis. J. Periodont. Res. 25: 257-267, 1990.
- 6 - HAFFAJEE A.D. et alli - Clinical Risk Indicators for Periodontal Attachment Loss. J. Clin. Periodontol. 18: 117-125, 1991.
- 7 - HIBBS M. et alli - Biochemical and Immunological Characterization of Secreted Forms of Human Neutrophil Gelatinase. J. Biol. Chem. 25: 2493-2500, 1995.

- 8 - INGMAN T. et alli - Multiple Forms of Gelatinases/Type IV Collagenases in Saliva and Crevicular Fluid of Periodontitis Patients. J. Clin. Periodontol. 21: 26-31, 1994.
- 9 - JOHNSON W.N. - Crevicular Fluid Based Diagnostic Tests. Curr. Opin. Dent. 1: 52-65, 1991.
- 10 - MURPHY G. et alli - Partial Purification of Collagenase and Gelatinase from Human Polymorphonuclear Leukocytes. Analyses of Their Actions on Soluble and Insoluble Collagens. J. Biochem. 203: 209-211, 1982.
- 11 - MURPHY G. et alli - Purification and Characterization of a Bone metalloproteinase that Degrades Gelatin and Types IV and V Collagen. Biochim. Biophys. Acta 831: 49-58, 1985.
- 12 - OVERALL C.M. et alli - Evidence for Polymorphonuclear Leukocyte Collagenase and 92-Kilodalton Gelatinase in Gingival Crevicular Fluid. Infection and Immunity 59: 4687-4692, 1991.
- 13 - PAGE R.C. & SCHROEDER H.E. - Periodontitis in Man and Other Animals. A Comparative Review. Basel: Karger, 50-53, 1982.
- 14 - SALO T. et alli - Transforming Growth Factor-b1 Up-Regulates Type IV Collagenase Expression in Cultured Human Keratinocytes. J. Biol. Chem. 266: 11436-11441, 1991.
- 15 - SEYMOR, R.A. & HEASMAN, P.A. - Tetracyclines in the Management of periodontal Diseases. A Review. J. Clin. Periodontol. 22: 22-35, 1995.
- 16- SOCRANSKY S.S. et alli - New Concepts of Destructive Periodontal Disease. J. Clin. Periodontol. 11: 21-32, 1984.
- 17 - SORSA T. et alli - Comparison of Interstitial Collagenases from Human Gingiva, Sulcular Fluid and Polymorphonuclear Leukocytes. J. Periodont. Res. 23: 386-393, 1988.

18 - SORSA T. et alli - Cellular Source and Tetracycline-Inhibition of Gingival Crevicular Fluid Collagenase of Patients With Labile Diabetes Mellitus. J. Clin. Periodontol. 19: 146-149, 1992.

19 - SUOMALAINEN K. et alli - Collagenase Activity in Gingival Crevicular Fluid of Patients With Juvenile Periodontitis. Oral Microb. And immunol. 6: 24-29, 1992.

*** Alunas de Pós-graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental - Faculdade de odontologia de Piracicaba/UNICAMP**

**** Alunos de Pós-graduação em Clínica Odontológica - Área de Periodontia - Faculdade de Odontologia de Piracicaba UNICAMP**

***** Professor Titular do Depto. de Periodontia e Prótese - Faculdade de Piracicaba UNICAMP**

****** Professor Livre-Docente do Depto. de Morfologia - Faculdade de odontologia de Piracicaba/UNICAMP**

