

AUTO-ANTICORPOS NATURAIS EM PACIENTES COM E SEM DOENÇA PERIODONTAL

Ana Cristina de Oliveira SOLIS*
Nely Jorge da CUNHA*
Gabriela Gonsales Fernandes BARCELLOS*
Nelson Luiz MACEDO**
Mário Tsunezi SHIMIZU***
Carmelinda Schmidt UNTERKIRCHER***

- **RESUMO:** Foi analisada a resposta de auto-anticorpo natural no fluido gengival de indivíduos com o periodonto saudável e com periodontite. Pesquisaram-se duas diferentes especificidades: antitransferrina e antifibronectina. Os resultados mostraram que os níveis de auto-anticorpos para as duas proteínas estavam elevados na maioria dos indivíduos com doença periodontal quando comparados aos controles, principalmente com relação à fibronectina.
- **PALAVRAS-CHAVE:** Doença periodontal; fibronectina; ELISA.

Introdução

A doença periodontal é uma doença inflamatória crônica que afeta o periodonto de revestimento e de inserção.^{10, 12, 16} A doença evolui por surtos de reagudização, em sítios localizados, levando à destruição do tecido conjuntivo e ósseo.

* Estagiária da Disciplina de Periodontia - Faculdade de Odontologia - UNESP - 12245-000 - São José dos Campos - SP.

** Departamento de Cirurgia, Periodontia e Radiologia - Faculdade de Odontologia - UNESP - 12245-000 - São José dos Campos - SP.

*** Departamento de Biopatologia e Diagnóstico - Faculdade de Odontologia - UNESP - 12245-000 - São José dos Campos - SP.

O fluido gengival é o primeiro sinal clínico detectável da inflamação gengival. A transferrina e a fibronectina são proteínas encontradas no plasma e no fluido gengival.^{2, 4, 9, 14, 18, 20} A transferrina participa do metabolismo do ferro e é um componente de fase aguda da inflamação. Esta proteína modula as respostas imunes ao ocupar seus receptores na superfície dos linfócitos.^{3, 6}

A fibronectina é sintetizada por fibroblastos e é a maior glicoproteína da matriz extracelular (450.000 dáltons).^{14, 15} Sua função é envolver as células como uma rede de finos filamentos associados ao colágeno e a proteoglicanos. Está presente no plasma, na saliva e no fluido gengival. Junto com a laminina, a fibronectina modula a inserção de fibroblastos e células epiteliais gengivais às superfícies dentais.¹⁹ Está presente, em alta concentração, na membrana basal abaixo do epitélio gengival e na parede dos vasos sanguíneos.⁷

Na vigência de inflamação gengival ocorre uma drástica redução da concentração de fibronectina no nível do periodonto, provavelmente como resultado da ação direta de microrganismos.^{10, 17, 21} A característica opsônica de fibronectina facilita a fagocitose de certas espécies microbianas e talvez este fenômeno possa explicar a redução de fibronectina em certos sítios de doença periodontal. Além disso, parece que a fibronectina encontrada no local não tem atividade biológica.¹⁷

Como resultado do processo inflamatório, células, microrganismos, proteínas séricas e teciduais são degradados e devem ser removidos do local após opsonização. Deste processo, toma parte uma classe especial de anticorpos, os auto-anticorpos naturais. Estes anticorpos têm a interessante propriedade de ligar antígenos próprios e exógenos, participando assim dos processos fisiológicos que tendem a reestabelecer a homeostasia.⁵

O objetivo deste trabalho foi comparar o nível dos auto-anticorpos naturais em indivíduos com e sem doença periodontal e verificar se existe uma diferença qualitativa na resposta, quer se trate de uma proteína sérica ou da matriz extracelular.

Material e método

População estudada

Foram selecionados 29 indivíduos portadores de doença periodontal, 18 mulheres e 11 homens (idade média de 41 a 59 anos), e 25 indivíduos com o periodonto clinicamente saudável, 16 mulheres e 9 homens (idade média de 23 a 32 anos). O critério de eleição adotado para os pacien-

tes com periodontite baseou-se na presença de pelos menos três sítios com bolsas periodontais de profundidade igual ou superior a 5 mm. Os controles foram selecionados entre os alunos e estagiários da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, e apresentavam índices de placa e sangramento próximos de zero e profundidade de sulco à sondagem inferior a 3 mm.

Antes da coleta da amostra, cada indivíduo recebia uma explicação detalhada dos procedimentos aos quais seria submetido e quais eram os objetivos da pesquisa. A seguir, pedia-se seu consentimento verbal e escrito.

Exame clínico e coleta das amostras

Na análise clínica foram utilizados uma sonda periodontal milimetrada, com marcadores tipo Williams, e um espelho plano. Todo procedimento foi realizado numa cadeira clínica, com preparação do paciente e iluminação adequada.

Para a coleta do fluido gengival, foram utilizados cones de papel (Tanari, BR) n° 50, previamente esterilizados.

Os sítios escolhidos, em número de três por paciente, foram então secos com um jato de ar, e a área previamente isolada, com rolos de algodão, para evitar a contaminação com saliva.

O cone endodôntico era, então, inserido no sulco até encontrar uma certa resistência e ali permanecia por 2 minutos. Para cada sítio foram utilizados cinco cones de 15 mm de comprimento. A seguir, os cones foram colocados num tubo Ependorf estéril e conservados a -20°C até o uso. Cada cone absorvia cerca de 10 ml de fluido gengival. A capacidade de absorção do cone foi estabelecida previamente num ensaio em que se utilizaram pipeta Gilson P20 e quantidades definidas de solução fisiológica.

Teste de ELISA

Placas de poliestireno com 96 orifícios (Costar, USA) foram sensibilizadas com 5 ug/ml de transferrina (Sigma, St. Louis, MO) e 1 ug/ml de fibronectina (Sigma, St. Louis, MO) em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH 9,6, incubadas a 37°C por 2 horas e por 18 horas a 4°C. As concentrações dos antígenos e do conjugado foram estabelecidas previamente por titulação em bloco, utilizando-se amostras positivas e fluido gengival.

No momento do uso, as placas foram lavadas três vezes com solução salina tamponada fosfatada (PBS), e os sítios livres do poliestireno, bloqueados com 0,5% de gelatina em PBS. Após 30 minutos de incubação, as placas foram lavadas mais duas vezes com PBS acrescido de 0,01% de Tween-20 (PBS-T).

A seguir, foram adicionados 400 ul de PBS-T-gelatina a cada Eppendorf (diluição 1/8) contendo cinco cones de papel e agitou-se a preparação com o auxílio de um Vortex. Depois de pelo menos três ciclos de agitação e repouso, as amostras foram acrescentadas às placas, em duplicatas. Incubou-se, então, por 2 horas a 37°C e por toda noite em geladeira a 4°C.

No dia seguinte, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-T, e o conjugado anti IgG humana-peroxidase (1 ug/ml) adicionado.

Após mais um período de incubação de 1h30min, as placas foram novamente lavadas e 100 ul do substrato acrescentado. O substrato consistia de ortofenileno diamino (Sigma, St. Louis, MO) 0,5 mg/ml de tampão citrato-ácido cítrico a 0,1 M e H₂O₂ a 0,003%.

A reação desenvolvia-se por um período de 30 minutos e era bloqueada com 50 ul de H₂SO₄ a 2,5 N. As densidades óticas (DO) foram lidas a 492 nm, num leitor de ELISA (Bio Rad, modelo 3550).

Resultados

Estimaram-se os níveis de auto-anticorpos naturais presentes no fluido gengival de indivíduos saudáveis e de pacientes com doença periodontal. Foram estudados os auto-anticorpos das classes IgG, IgA e IgM.

Nos fluidos analisados, somente anticorpos IgG antitransferrina (formas holo e apo) e antifibronectina foram avaliados. IgA e IgM não foram detectados pelo ensaio de ELISA.

Em indivíduos saudáveis, os níveis de auto-anticorpos para os antígenos estudados eram muito baixos (holotransferrina, média = 0,026; apotransferrina, média = 0,024; fibronectina, média = 0,023). Já nos pacientes com doença periodontal foram encontrados, para os dois antígenos (holotransferrina, média = 0,298; apotransferrina, média = 0,289; fibronectina, média = 0,351), valores de DO dez vezes maiores que no grupo controle (Figuras 1 e 2). As maiores reatividades foram observadas para fibronectina.

Na análise estatística foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, com nível de significância $p < 0,1\%$.

Discussão

Neste trabalho analisamos a resposta de auto-anticorpos naturais no fluido gengival de indivíduos saudáveis e de pacientes com periodontite do adulto. Nosso objetivo foi verificar se neste quadro de doença inflamatória crônica ocorre elevação destes anticorpos.

Pesquisamos duas diferentes especificidades: antitransferrina e antifibronectina. A transferrina é uma proteína sérica importante no transporte de ferro no organismo de mamíferos; além disso, a proteína é um componente de fase aguda da inflamação, apresentando atividade bactericida e modulando as respostas imunes.^{1, 8}

A fibronectina é uma das principais glicoproteínas da matriz extracelular e está envolvida com o mecanismo de adesão celular e reparação tecidual.^{20, 22}

Nossos resultados mostraram que os níveis de auto-anticorpos para as duas proteínas próprias estavam elevados na maioria dos indivíduos com periodontite, quando comparados com os controles. Esse aumento de reatividade em IgG, embora esteja relacionado com exsudação no nível do sulco, também é reflexo de síntese local, pois amostras com traços evidentes de sangue nem sempre apresentavam valores mais elevados de DO.

Outro ponto que nos chamou a atenção foi a reatividade mais acentuada para fibronectina. Os valores de DO obtidos para esta glicoproteína foram mais elevados que para transferrina.

Essa reatividade pode estar correlacionada com a taxa de degradação da molécula, alvo de várias proteases endógenas e exógenas.^{13, 14, 21} É bem provável que a degradação proteolítica exponha regiões crípticas da molécula, que são, então, reconhecidas por linfócitos.

Esta hipótese é apoiada pelos achados de Pellat et al.¹⁷ que, utilizando fibronectina marcada com ¹²⁵I, comprovaram sua mais rápida degradação com extrato de placa dental de pacientes com periodontite do que com extrato de placa dental de crianças sem gengivite.¹⁷

A redução de fibronectina na mucosa bucal tem sido associada a um risco aumentado de infecção por gram-negativo.¹¹ Um dos microrganismos envolvidos na periodontite do adulto é o *Porphyromonas gingivalis*, que degrada a fibronectina originando um produto metabólico de 120 kDa.¹³

Embora os anticorpos estudados aqui não tenham um papel patogênico direto no quadro de periodontite, representam verdadeiros marcadores sorológicos de atividade inflamatória e talvez possam ajudar no tratamento peridontal de suporte, quando avaliados periodicamente.

Seria interessante investigar, em estudos posteriores, a resposta de auto-anticorpos para diferentes componentes da matriz extracelular, estabelecendo assim um painel de especificidade, útil na triagem desses pacientes, tal como se utiliza nas doenças auto-imunes.

Conclusão

Os pacientes com doença periodontal apresentaram níveis de auto-anticorpos naturais elevados quando comparados a indivíduos sadios, especialmente com relação à fibronectina.

Agradecimentos

Agradecemos à Fapesp, por financiar parte da pesquisa, e ao prof. Ivan Balducci, do Departamento de Odontologia Social e Clínica Infantil, pela análise estatística.

SOLIS, A. C. de O. et al. Autoantibodies in healthy and periodontal diseased subjects. *Rev. Odontol. UNESP (São Paulo)*, v.27, n.2, p.485-493, 1998.

- *ABSTRACT: The purpose of this study was to analyse the natural autoantibody response in healthy subjects and patients with periodontal disease. It was investigated two different specificities, antitransferrin and antifibronectin. The results shown high levels of autoantibody to either proteins in patients with periodontal disease when they were compared with controls. The great difference was observed to fibronectin.*
- *KEYWORDS: Periodontal disease; fibronectin; ELISA.*

Referências bibliográficas

- 1 ADONOGIANAKI, E., MOONEY, J., KINANE, D. F. The ability of gingival crevicular fluid acute phase proteins to distinguish healthy, gingivitis and periodontitis sites. *J. Clin. Periodontol.*, v.19, p.98-102, 1992.

- 2 ADONOGIANAKI, E. et al. Acute-phase proteins gingival crevicular fluid during experimentally induced gingivitis. *J. Periodontal Res.*, v.29, p.196-202, 1994.
- 3 AISEN, P. Transferrins. In:_____. *Iron in biochemistry and medicine*. London: Academic Press, 1980. p.87-129.
- 4 ASMAN, B., BERGSTRÖM, K., SODER, P. O. Ratio of alfa-1 antitrypsin to transferrin in gingival fluid and in blood from patients with periodontal disease. *Scand. J. Dent. Res.*, v.89, p.407-11, 1981.
- 5 AVRAMEAS, S. Natural antibodies: from 'horror autotoxicus' to "gnothi seauton". *Immunol. Today*, v.12, p.154-9, 1991.
- 6 BROCK, J. H., MAINOU-FOWLER, T. The role of iron and transferrin in lymphocyte transformation. *Immun. Today*, v.4, p.347-51, 1983.
- 7 CHO, M. I., LEE, Y. L., GARANT, P. R. Localization of fibronectin in gingival connective tissue of the beagle dog: immunofluorescent light microscopic findings. *J. Periodontol.*, v.56, p.677-87, 1985.
- 8 CURTIS, M. A. et al. Detection of high-risk groups and individuals for periodontal diseases. *J. Clin. Periodontol.*, v.16, p.1-11, 1989.
- 9 _____. The protein composition of gingival crevicular fluid sampled from male adolescents with no destructive periodontitis: Baseline data of a longitudinal study. *J. Periodontol. Res.*, v.25, p.6-16, 1990.
- 10 GENCO, R. J., SLOTS, J. Host responses in periodontal diseases. *J. Dent. Res.*, v.63, p.441-51, 1984.
- 11 GIBBONS, R. J., ETHERDEN, I. Fibronectin-degrading enzymes in saliva and their relation to oral cleanliness. *J. Periodontal Res.*, v.21, p.386-95, 1986.
- 12 HAFFAJEE, A. D., SOCRANSKY, S. S., GOODSON, J. M. Comparison of different data analyses for detecting changes in attachment level. *J. Clin. Periodontol.*, v.10, p.298-310, 1983.
- 13 LARJAVA, H. et al. Fibronectin fragmentation induced by dental plaque and bacteroides gingivalis. *Scand. J. Dent. Res.*, v.95, p.308-14, 1987.
- 14 LOPATIN, D. E., BYE, F. L., CAFFESSE, R. G. Concentrations of fibronectin in the sera and crevicular fluid in various stages of periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, v.16, p.359-64, 1989.
- 15 MARCHASE, R., BVOSBECK, K., ROTH, S. Intercellular adhesive specificity. *Biochem. Biophys. Acta*, v.457, p.385-416, 1976.
- 16 McFALL JUNIOR, W. Tooth loss in 100 treated patients with periodontal disease: a long term study. *J. Periodontol.*, v.53, p.539-49, 1982.
- 17 PELLAT, B. et al. Fibronectin-degrading activity in human crevicular fluid, gingival explants culture medium and bacterial plaques. *J. Biol. Buccale*, v.16, p.51-7, 1988.
- 18 TYNELIUS-BRATTHALL, G. Crevicular and salivary fibronectin before and after gingivitis treatment. *J. Clin. Periodontol.*, v.15, p.283-7, 1988.
- 19 UITTO, V. J. et al. Expression of fibronectin and integrins in cultured periodontal ligament epithelial cells. *J. Dent. Res.*, v.71, p.1203-11, 1992.

- 20 VARTIO, T. Fibronectin: multiple interactions assigned to structural domains. *Med. Biol.*, v.61, p.283-96, 1983.
- 21 WIKSTROM, M., LINDE, A. Ability of oral bacteria to degrade fibronectin. *Infect. Immun.*, v.51, p.707-11, 1986.
- 22 YAMADA, K. M., AKIYAMA, S. K. The interactions of cells with extracellular matrix components. In: ELSON, E., FRAZIER, W., GLAZER, L. (Ed.) *Cell membranes*. New York: Plenum Press, 1984. v.2, p.77-148.