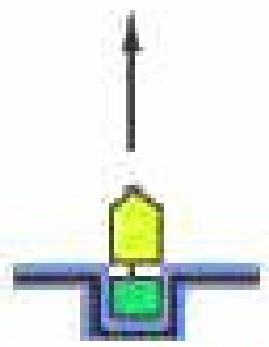


4. Make Avidin-Biotin-Peroxidase complex

Biotinylated Peroxidase



3. Bind the Avidin-Biotin-Peroxidase complex

# Aspectos inmunológicos

2. Incubate with biotinylated analog

Por Carlos Marcelo da Silva Figueredo, DDS, MDS, PhD

[cmfigueredo@hotmail.com](mailto:cmfigueredo@hotmail.com)

[www.periodontiamedica.com](http://www.periodontiamedica.com)



1. Receptor for Ligand

6. React for peroxidase

## ABC Detection of Biotinylated Ligands

# Nova ênfase da resposta do hospedeiro na patogênese da doença periodontal

- Uma grande variação na resposta inflamatória de um indivíduo para o outro (MOVIG et al.1988, POCIOT et al. 1992, SHAPIRA et al. 1994).
- Estudos epidemiológicos em gêmeos - metade da variabilidade da expressão da doença periodontal é controlada por fatores genéticos (MICHALOWICZ 1994 ).

# Nova ênfase da resposta do hospedeiro na patogênese da doença periodontal

- Estudos epidemiológicos demonstraram que parâmetros microbiológicos podem apenas explicar uma pequena parte da prevalência e incidência da doença (CRHISTERSSON et al. 1992, BECK et al. 1992, WHEELER et al. 1994).

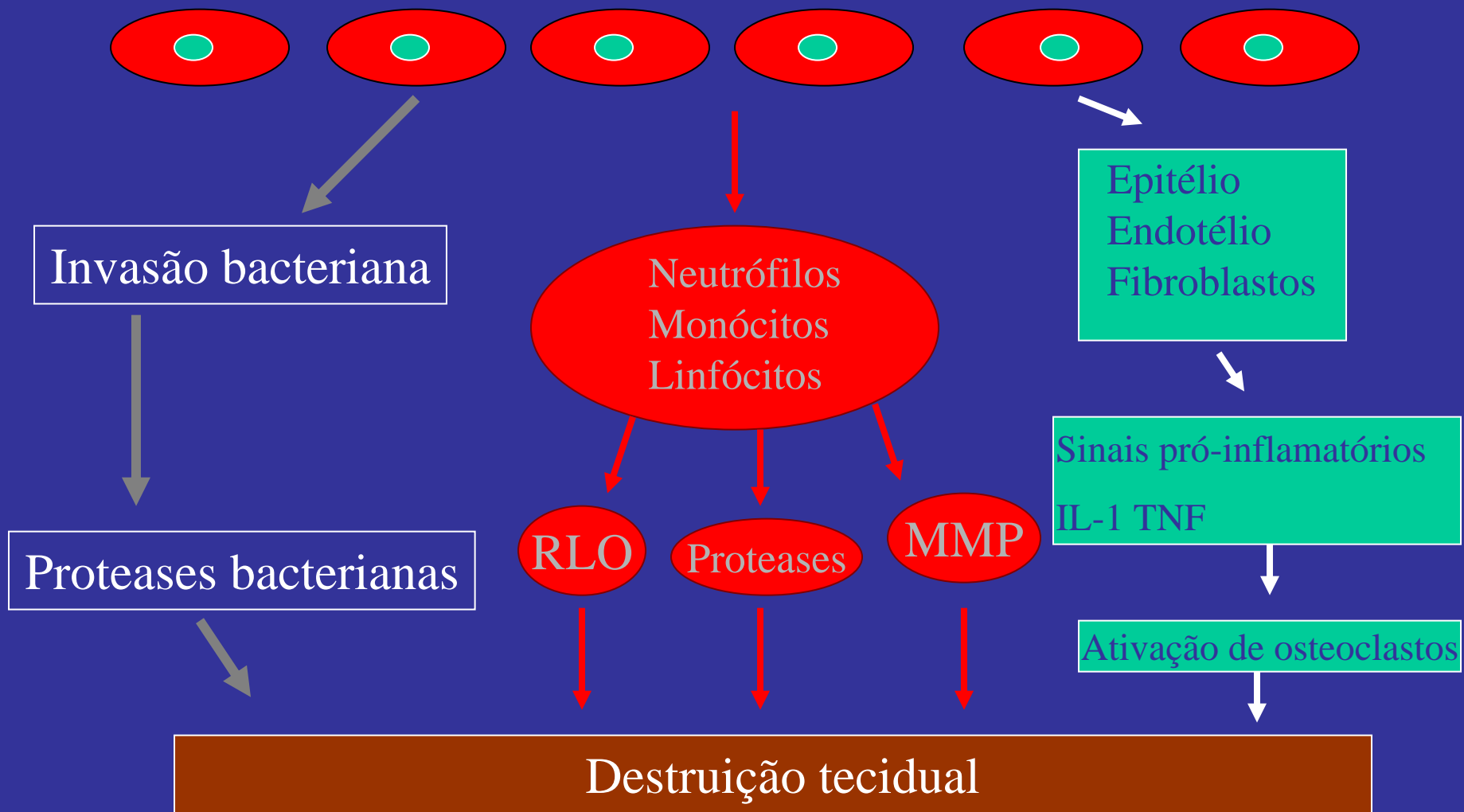
# O sistema imune e a destruição tecidual

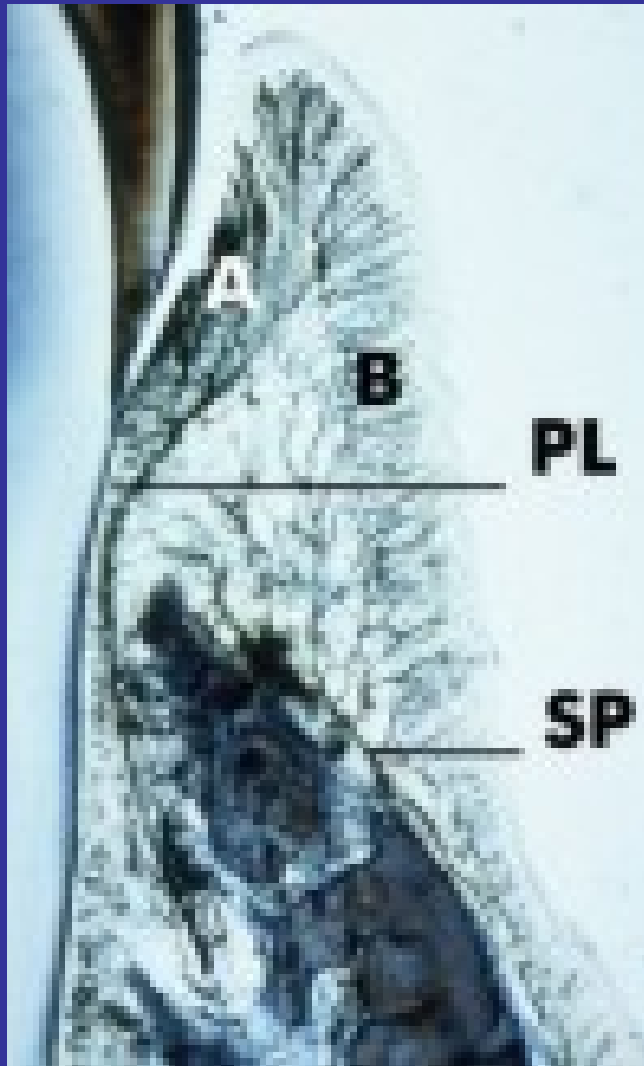
- Ação de neutrófilos e monócitos/ macrófagos através de suas enzimas lisossomiais.
- a indução de uma função indesejada do sistema inato pode ser parcialmente regulada pelo sistema adaptativo, através da produção de opsinas (anticorpos) e de citoquinas.

# O sistema imune e a destruição tecidual

- ATTSTRÖM & EGELBERG (1970) mostraram que 95-97% das células eram neutrófilos, 1.2% linfócitos, e 2-3% monócitos. Essa proporção se mantém a mesma quando o número de células aumenta.

# Patógenos periodontais





por Carlos Marcelo da Silva Figueredo, DDS, MDSc, PhD  
[www.periodontiamedica.com](http://www.periodontiamedica.com)

# **Lesões histológicas** (Page & Schroeder, 1976)

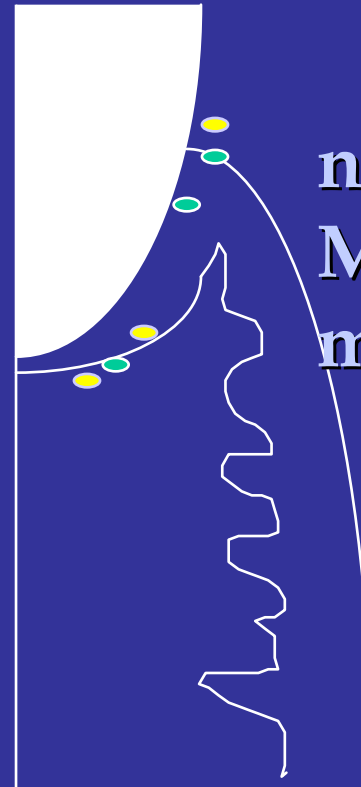
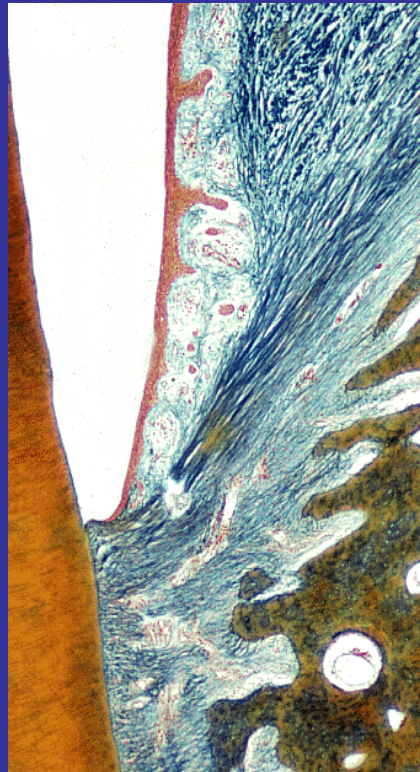
▣ **Inicial**

▣ **Precoce**

▣ **Estabelecida**

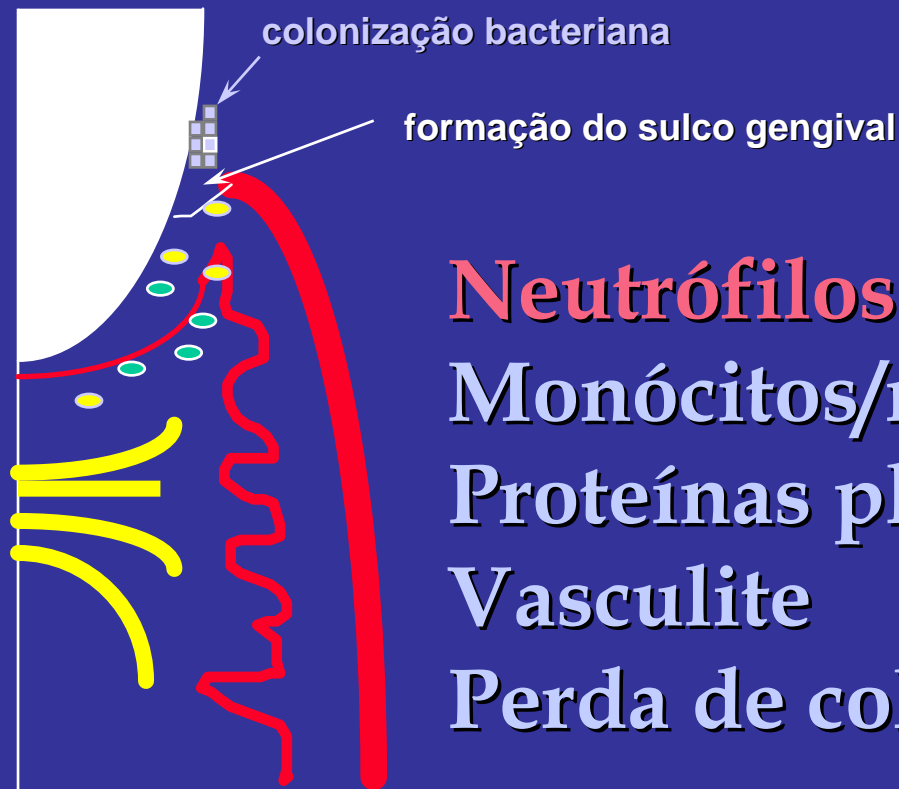
▣ **Avançada**

# Gengiva Clinicamente sadia

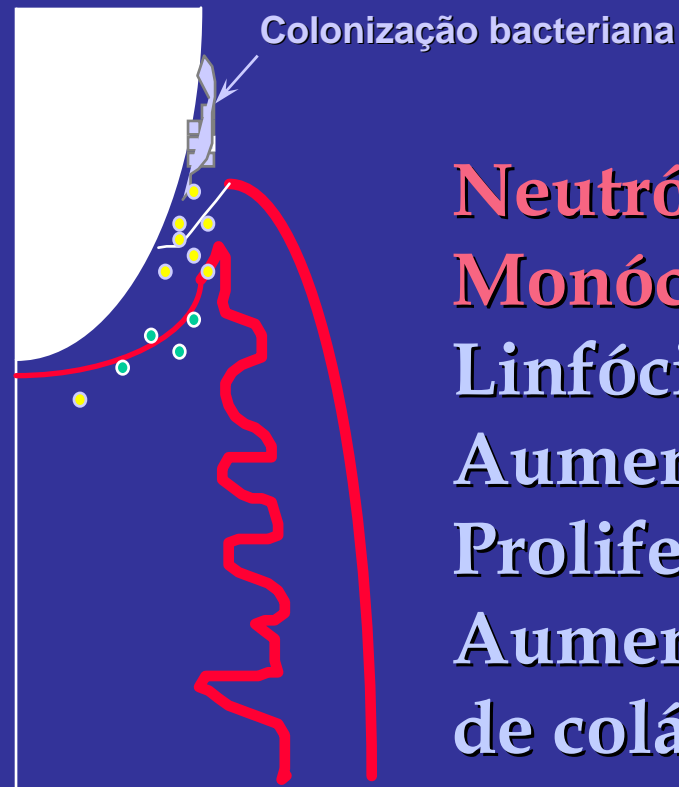


neutrófilos  
Monócitos/  
macrófagos

# Lesão inicial (1-4 dias)



# Lesão precoce (4-7 dias)



**Neutrófilos**

**Monócitos/macrófagos**

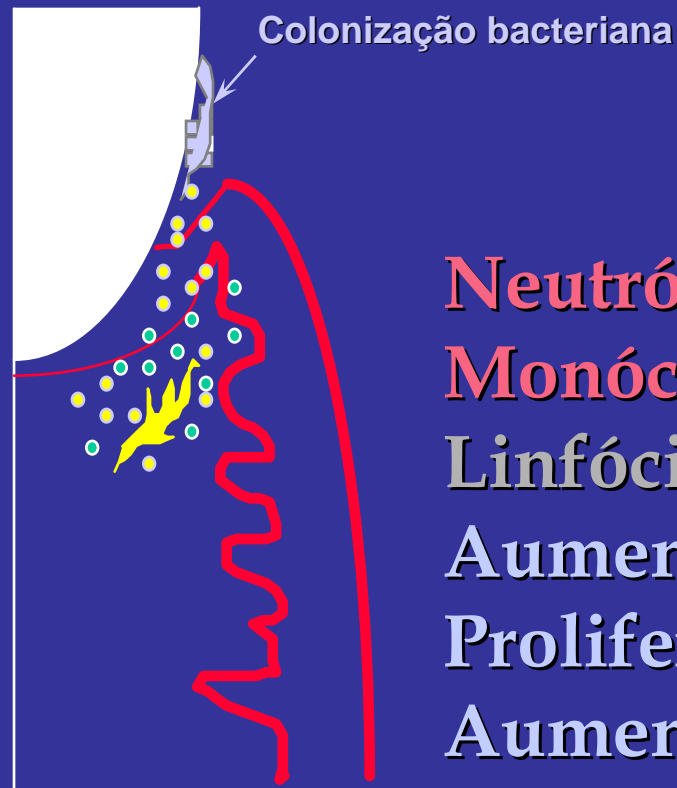
**Linfócitos (células B e T)**

**Aumento da vasculite**

**Proliferação de vasos**

**Aumento da perda  
de colágeno**

# Lesão estabelecida (7-14 dias)



**Neutrófilos**

**Monócitos/macrófagos**

**Linfócitos (células B e T)**

**Aumento da vasculite**

**Proliferação de vasos**

**Aumento da perda**

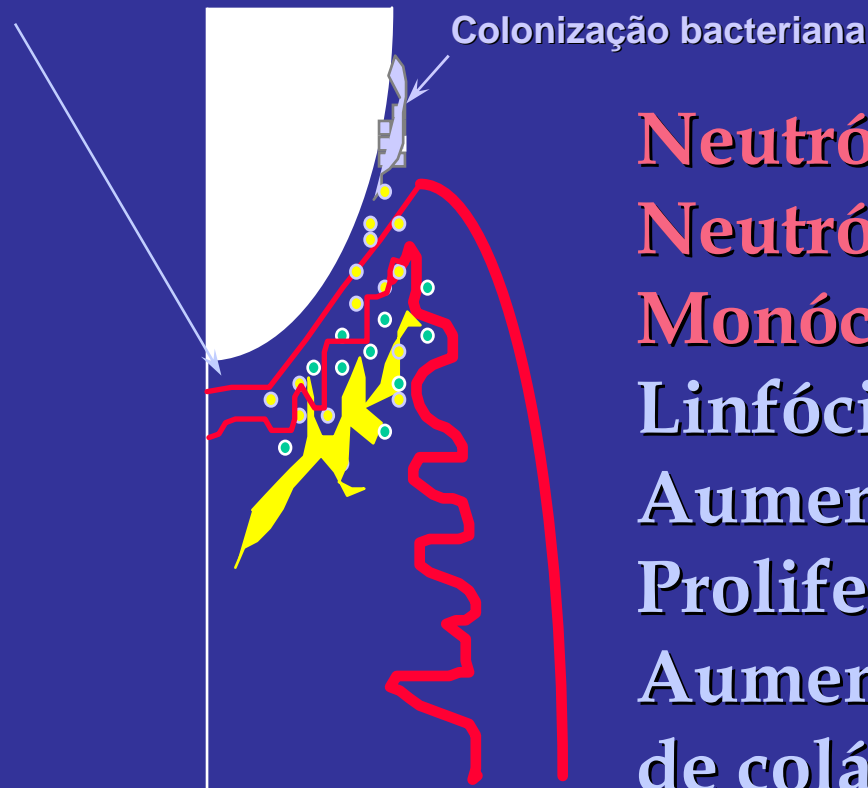
**de colágeno**

# Lesão avançada

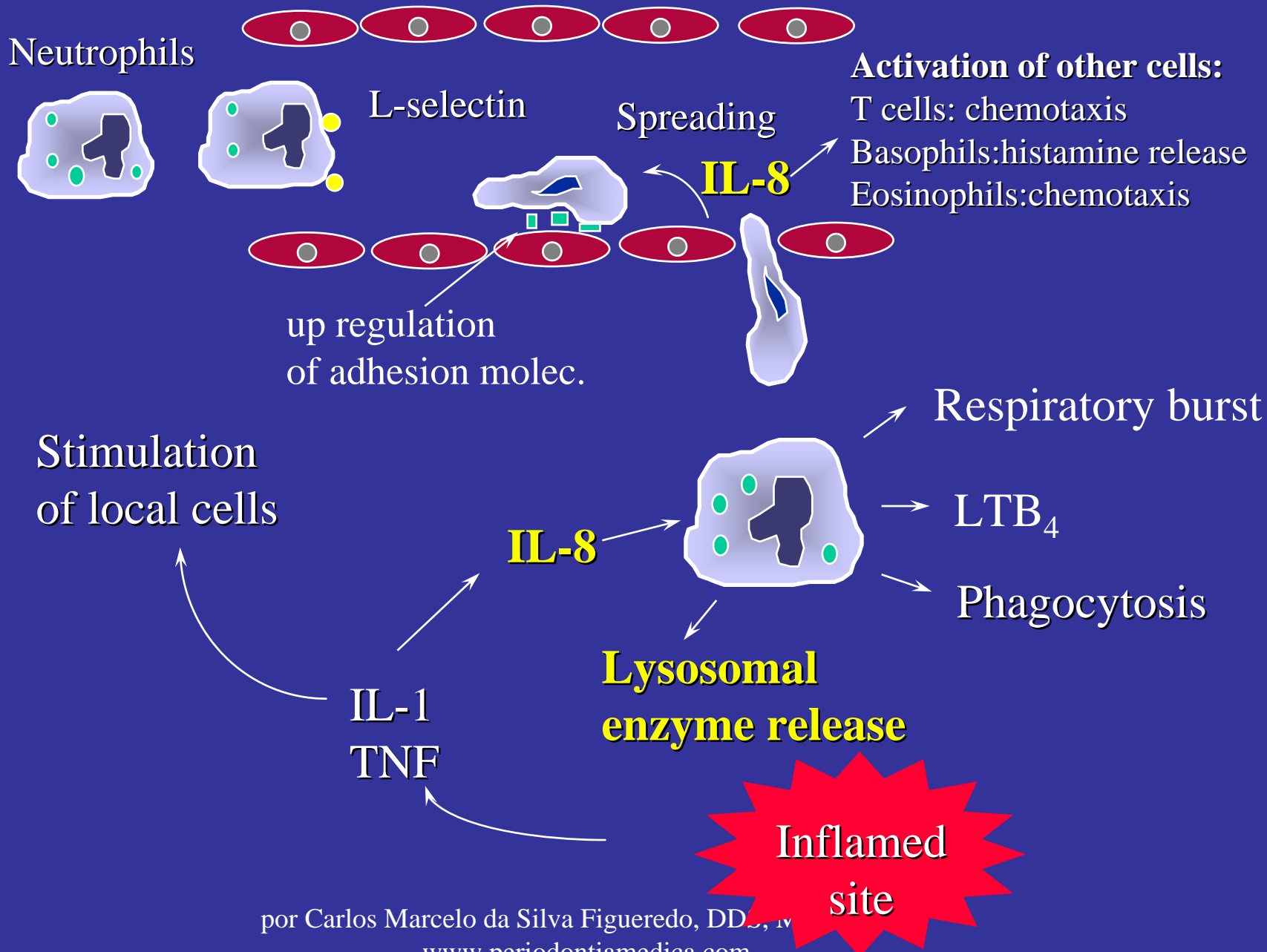


# GCF

Migração do  
epitélio juncional



**Neutrófilos**  
**Neutrófilos**  
**Monócitos/macrófagos**  
**Linfócitos (células B e T)**  
**Aumento da vasculite**  
**Proliferação de vasos**  
**Aumento da perda  
de colágeno**  
**Prod. IgG**



# Adhesive interactions (from Carlos & Harlan, 1994)

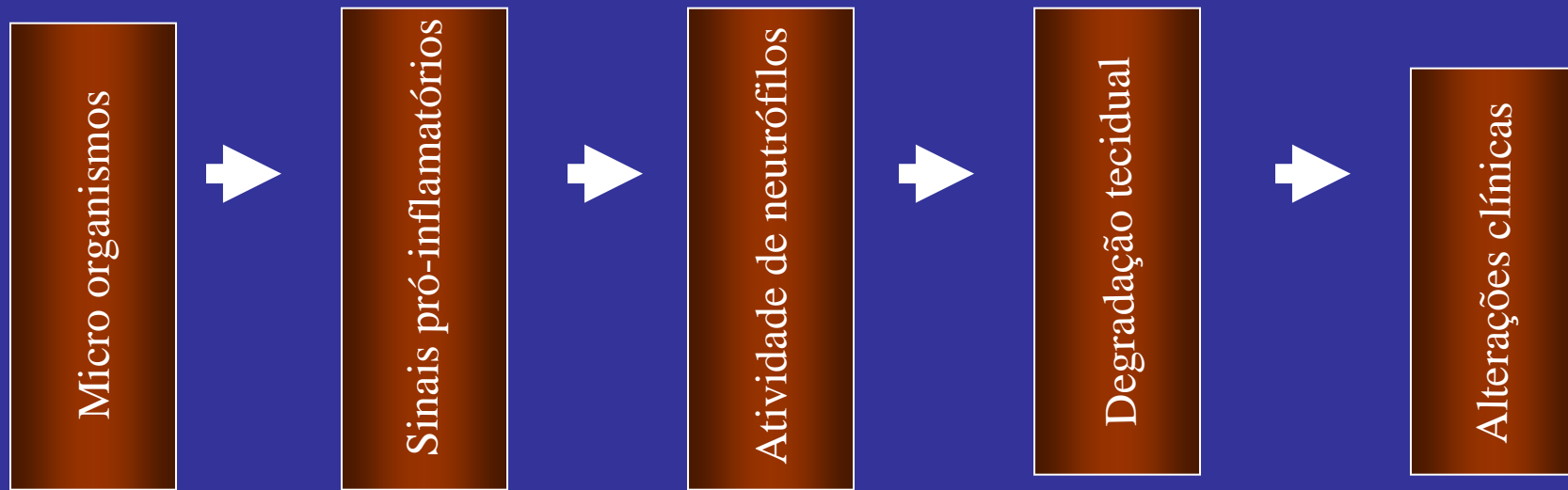
## Selectins

## Integrins and Ig-like

	Rolling	Activation	Firm adhesion	Trans migration	Migration
Leukocyte	L-selectin S <sub>Le</sub> x	Cytokine and chem. receptors	$\beta$ 2, $\beta$ 1 integrins (CD 11a, b, c and VLA-1, 2)	$\beta$ 2, $\beta$ 1 integrins	$\beta$ 2, $\beta$ 1 integrins
Endothelial	P-selectin L-selectin ligant E-selectin	IL-8 E-selectin	ICAM-1, 2 VCAM-1	ICAM-1 VCAM-1	
Tissue	Histamine Thrombin Oxidants LPS Leukotrienes Cytokines (IL-1 and TNF)	IL-5 IL-8 fMLP C5a	IL-1 TNF- $\alpha$ IL-4 IFN- $\gamma$	Chemokines Chemoattract	Extracellular matrix components Chemokines Chemoattract

por Carlos Marcelo da Silva Figueredo, DDS, MDSc, PhD

# Visão geral do projeto de pesquisa



Citoquinas em Plasma e GCF:  
IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ,  
IL-6, IL-8  
IL-13, IL-10  
IL-1 RA

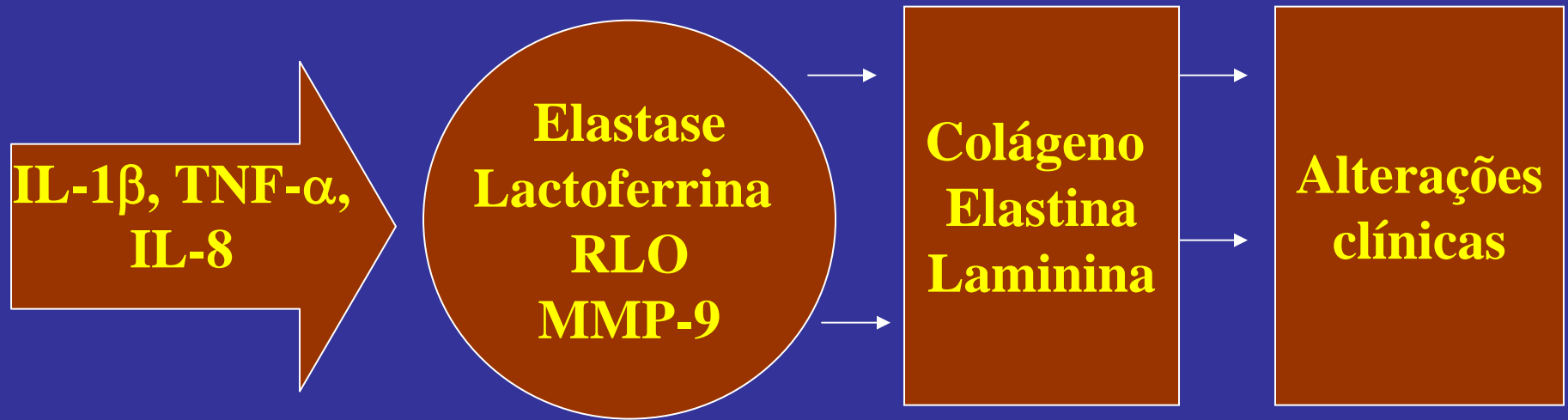
Liberação in vitro:  
Elastase, lactoferrina,  
A1AT, citocinas, e  
RLO  
  
No fluído:  
Protease, elastase,  
MMP-8, MMP-9,  
lactoferrina

Degradação  
No fluído:  
Laminina  
Elastina  
Colágeno

por Carlo

DDS, MDSc, PhD  
om

# Fluído gengival - tipos de análises



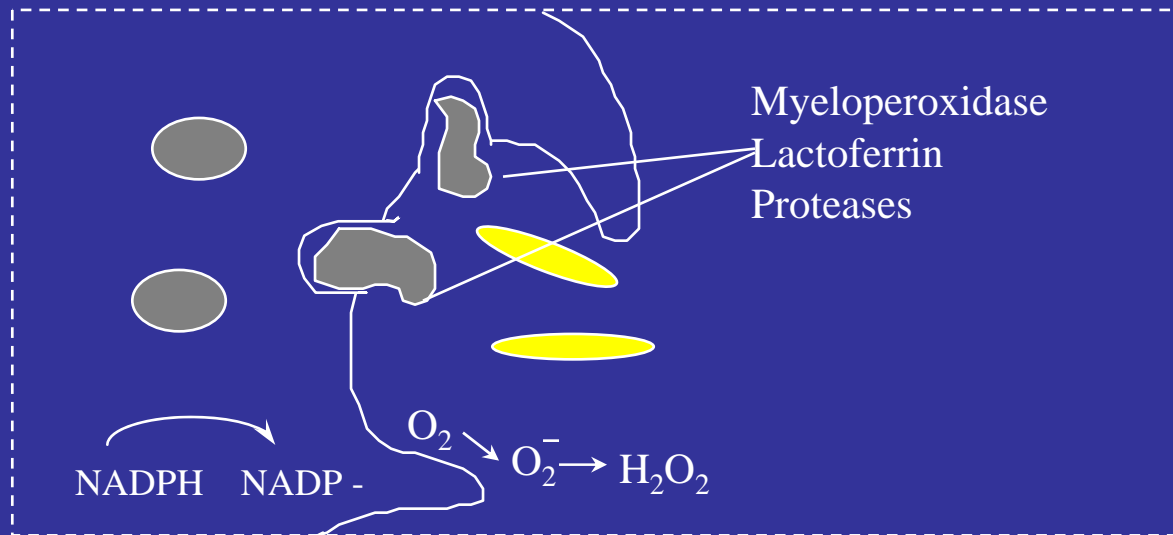
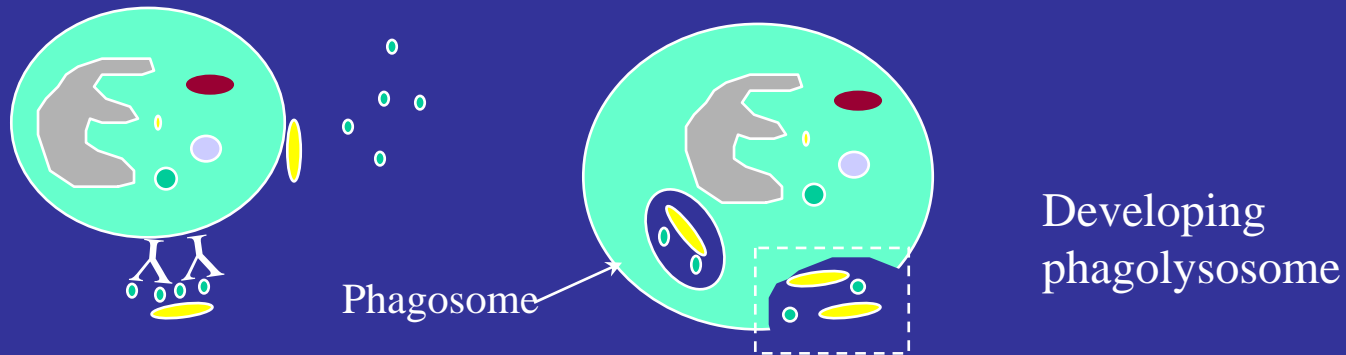
# Possíveis explicações para uma resposta aberrante

- Monócitos hiperreativos com um aumento da liberação de PGE2, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ .
- Aumento genético na produção de IL-1 $\beta$  e/ou outras substâncias pró-inflamatórias.

# Possíveis explicações para uma resposta aberrante

- Defeitos funcionais em neutrófilos que levem a um dano na quimiotaxia e fagocitose.
- Neutrófilos hiperreativos com aumento na liberação de radicais livres e proteases.

# Neutrófilos x bactéria (Lindhe 1997)



# Neutrófilos x Periodontite

## Mecanismos de ação:

 Pico respiratório

 Apoptose

 Fagocitose e degranulação

# Protease livre

*Protease:* enzimas com potencial destrutivo contra proteínas (colágeno, elastina, etc).

*Origem:* externa (bactérias) ou interna (produto da degranulação de células inflamatórias).

# Como agem?

Proteases bacterianas (placa)



migração de células inflamatórias



causam destruição tecidual ← Liberação extra celular de enzimas



# Como controlar?

- O organismo produz inibidores de protease que a inativa em milisegundos.
- Porém, acredita-se que na periodontite este equilíbrio é quebrado por uma parcial inativação dos inibidores.

(Weiss, 1989)

# Como controlar ?

Proteases livres



Produção de inibidores  
(A1AT e A2MG)




Controle da destruição  
tecidual.



Formação de complexos  
inibidores-proteases

# Inibidores de proteases

 **Estão presentes tanto na corrente sanguínea quanto no espaço intracelular.**

 **Principais: alpha 1 antitripsina e alpha 2 macroglobulina.**

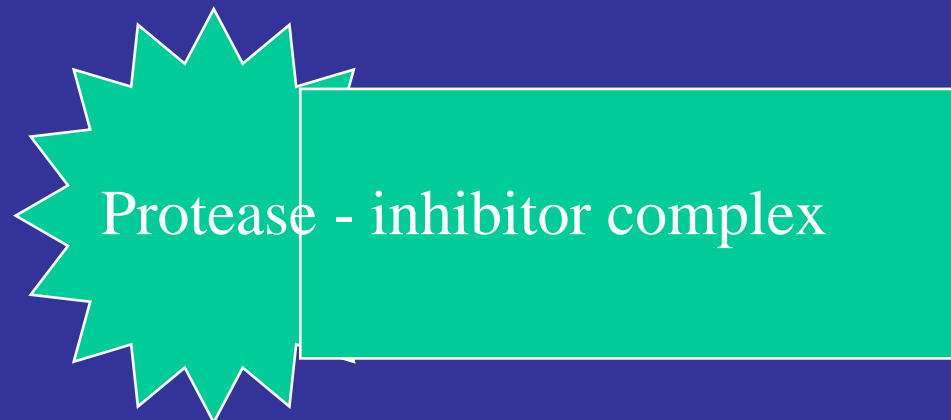
# Inibidores de proteases

- **A1AT:** Uma molécula muito menor que o A2MG, o que o torna principal inibidor de proteases no fluido gengival, porém não inibe proteases bacterianas.

*Ativa*



*Ativo*



*Inativado*

*Ativa*



*Inativo*



***Destruição tecidual***

# Protease livre

- Sendo assim, a presença de proteases livres poderia ser um importante indicador de doença periodontal ativa.

# **Protease activity in gingival crevicular fluid**

**Presence of free protease**

Figueredo, CMS & Gustafsson, A. *Journal of  
Clinical Periodontology* 1998; 25; 306-310.

# Aim

- **To determine the presence of free protease activity in GCF from inflamed sites with or without tissue destruction.**

# Material and methods

∟ 12 GG.

∟ 19 GP and d PP.

∟ FITC-conjugated casein.

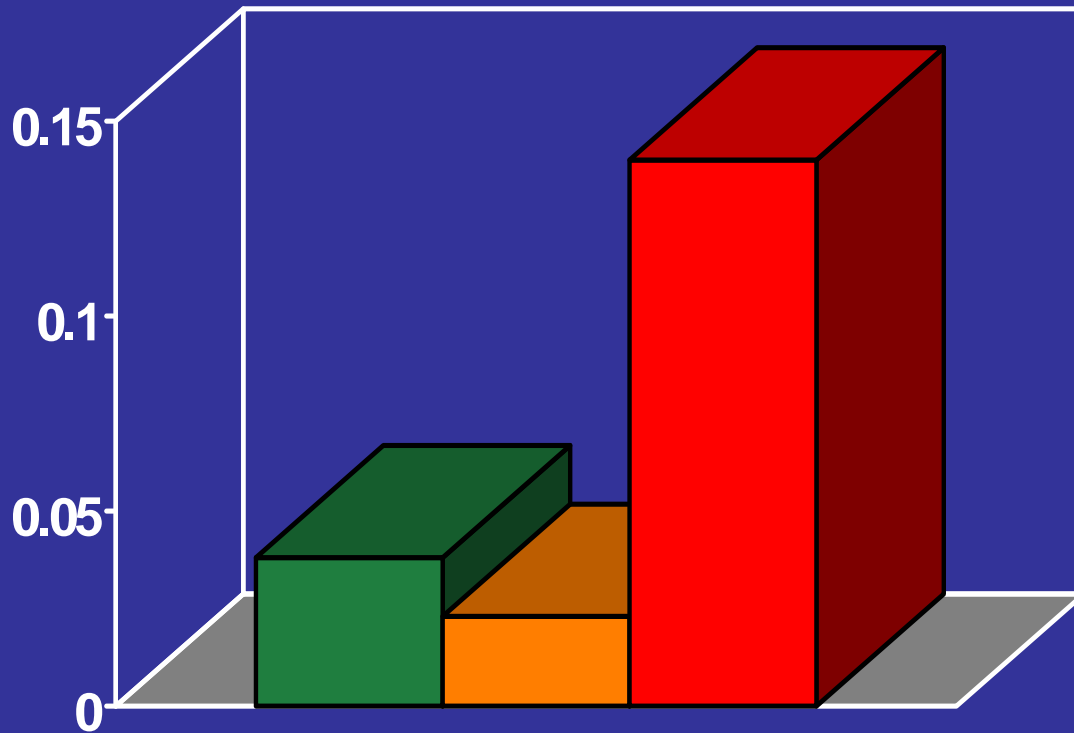
∟ Transferrin.

∟ A1AT - to analyze if the protease activity was sensitive to inhibition.

# Results

Test/ site	GG	GP	PP
Protease activity (ng)	25	52	230
Residual activity	1.2	1.0	6.4
Transferrin	729	266	590
Inhibition %	89	96	88

# Results



**Fig 1. Ratio between protease activity and transferrin**

# Conclusion

**Free protease can be found in GCF  
Higher concentration in sites with deep  
pockets.**

**The contribution from proteases  
insensitive to inhibition by A1AT is limited.**

# Neutrophil elastase

- Degrades collagen, proteoglycans and basement membranes components.
- Normally inhibited within milliseconds by A1AT and A2MG.

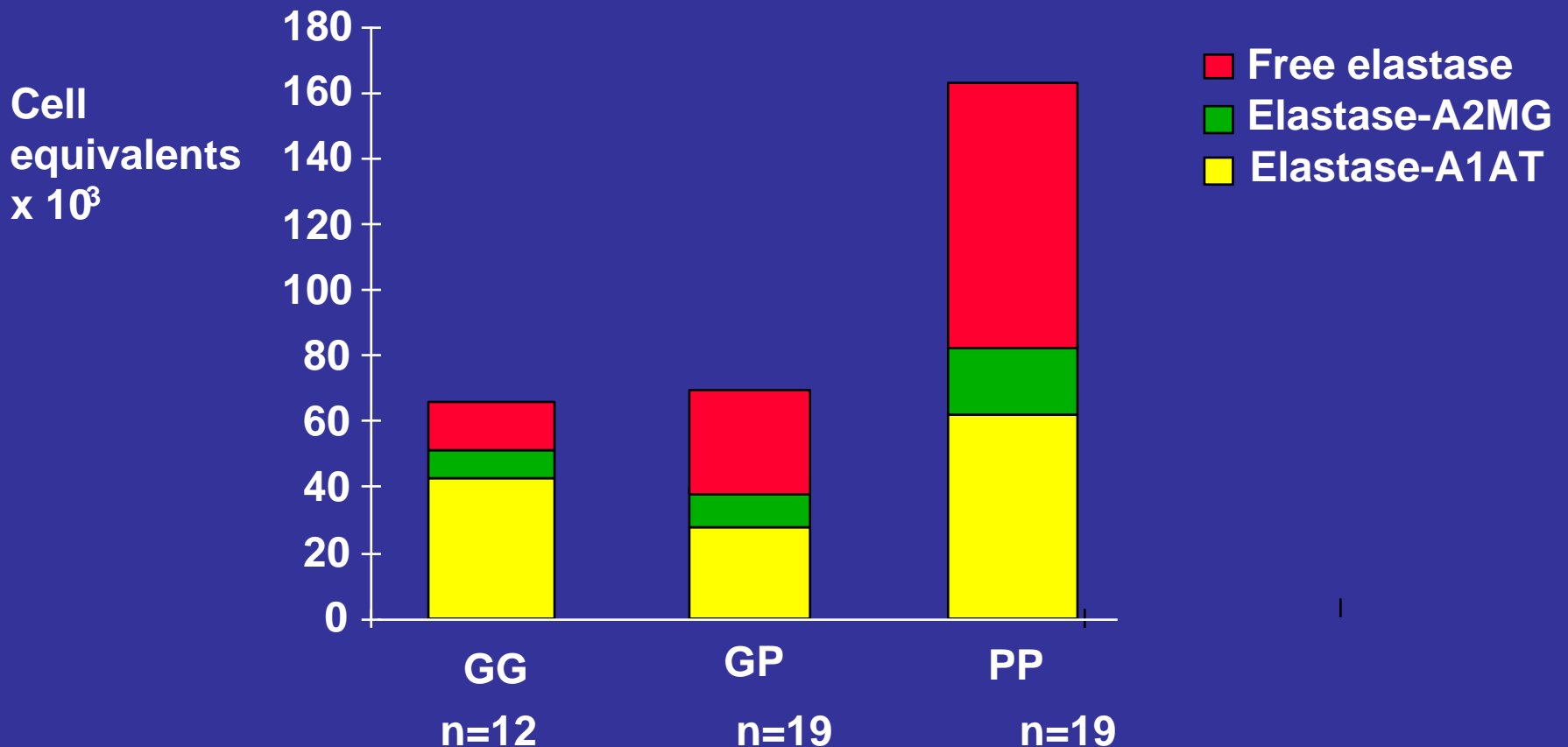
# Activity and inhibition of elastase

Figueredo, CMS & Gustafsson, A.  
*Journal Clinical Periodontology* 1998;  
25; 531-535.

# Material and methods

- **Chromogenic granulocyte elastase substrate.**
- **E-A1AT.**
- **E-A2MG.**

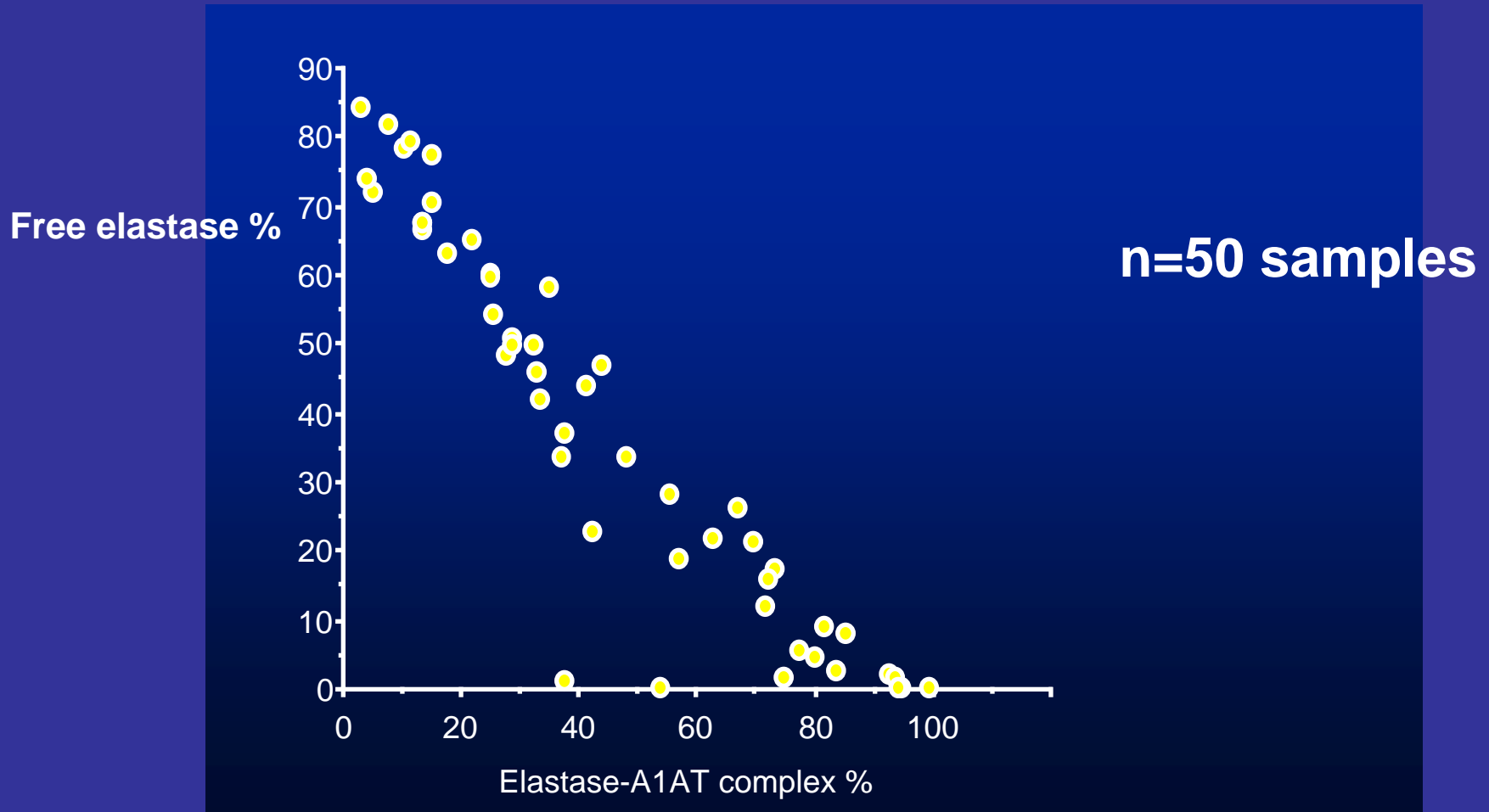
# Elastase in GCF



por Carlos Marcelo da Silva Figueredo, DDS, MDSc, PhD **Figueredo & Gustafsson -97**

[www.periodontiamedica.com](http://www.periodontiamedica.com)

# Correlation between the elastase Alpha-1-antitrypsin complex and free elastase



Figueredo & Gustafsson -97

por Carlos Marcelo da Silva Figueredo, DDS, MDSc, PhD  
[www.periodontiamedica.com](http://www.periodontiamedica.com)

# Conclusion

- The elevated levels of free elastase in sites with tissue destruction seem to be a combination of increased release of elastase and partial inactivation of A1AT.

# Hiperatividade celular – evidências científicas e possíveis causas

- Parece não haver diferença no número total de neutrófilos presentes em uma lesão de gengivite crônica e outra de periodontite (GUSTAFFSON et al. 1994).

# Hiperatividade celular – evidências científicas e possíveis causas

A hiperatividade de neutrófilos, uma das principais hipóteses para a destruição tecidual em inflamações crônicas, baseia-se na teoria de que essas células existem em três estágios:

- quiescência, pré-ativado e ativado.

# Hiperatividade celular – evidências científicas e possíveis causas

- Entre as substâncias com capacidade de pré-ativar neutrófilos estão a IL-1, IL-6, IL-8 e TNF.
- Tem sido convincentemente demonstrada *in vitro*, não apenas para a *periodontite*, como também para a síndrome da angústia respiratória aguda (ARDS) (LEE et al. 1981), e enfisema pulmonar (JANOFF 1985), entre outras doenças crônicas destrutivas.

# Hiperatividade celular – evidências científicas e possíveis causas

- Produção de radicais livres de oxigênio como marcadores de atividade celular (GUSTAFSSON & ÅSMAN 1996, FREDRIKSSON et al. 1998)
- Liberação excessiva de elastase por neutrófilos periféricos:
  - ▣ Periodontite Juvenil (ÅSMAN 1988)
  - ▣ Periodontite do adulto (FIGUEREDO et al. 1999).

# **Increased release of elastase from in vitro activated peripheral neutrophils in patients with periodontitis**

Figueredo CMS, Gustafsson A, Åsman B & Bergström K.  
(1999) *Journal of Clinical Periodontology* 26; 206-211.

# Introduction

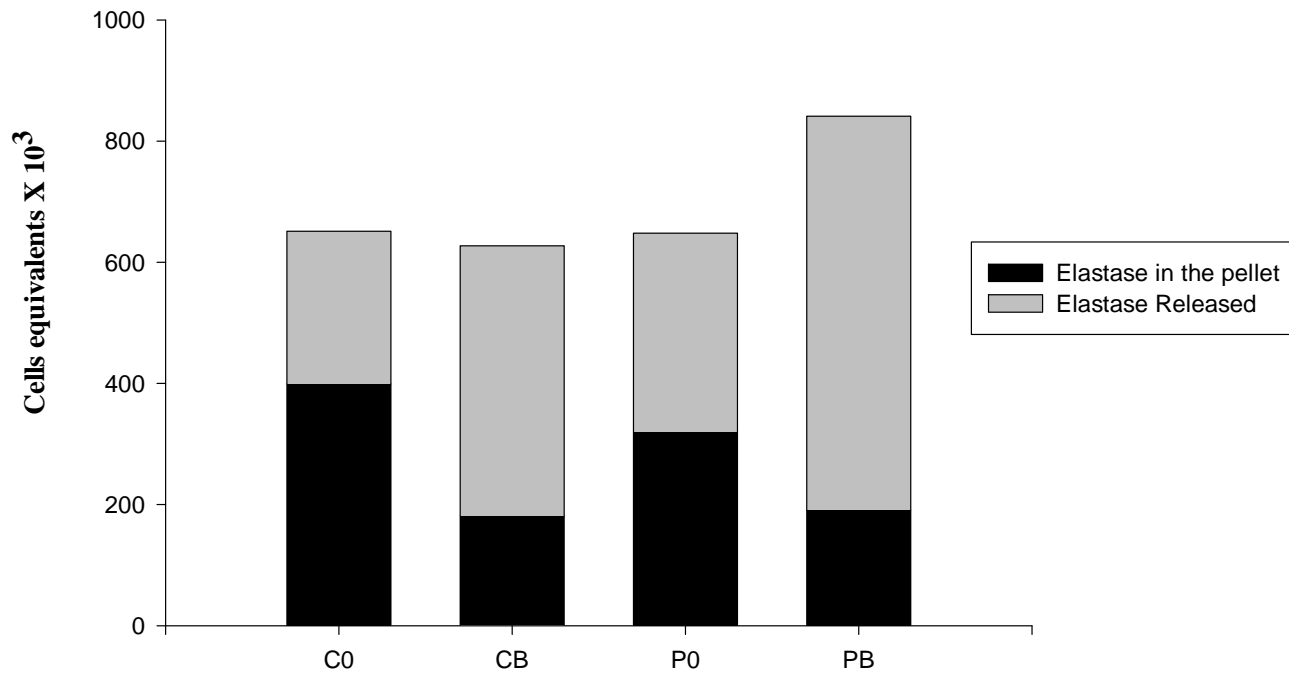
- **Gustafsson et al. (1994) - Increased activity per cell in GCF.**
- **Results demonstrated in Juvenile periodontitis.**
- **Failure in demonstrated the same in AP.**

# Material and Methods

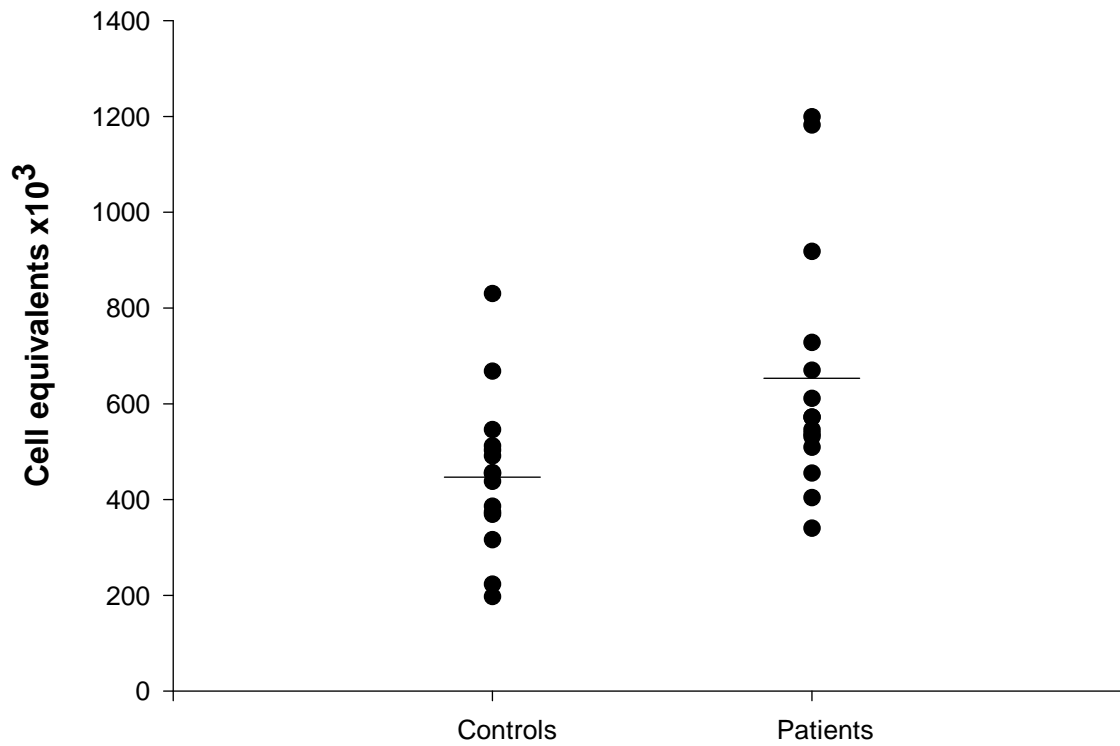
- 15 patients with periodontitis and 15 - sex- and age -matched healthy controls
- Leukocyte preparation.
- Degranulation:  
1.0 x 10<sup>6</sup> neutrophils +IgG opsonized *Staphylococcus aureus* (1:75) incubated in HBSS for 1h at +37°C.

# Material and Methods

- **Elastase activity.**
- **E-A1AT**
- **A1AT**
- **Lactoferrin.**
- **Intracellular A1AT (flow cytometry).**



por Carlos Marcelo da Silva Figueredo, DDS, MDSc, PhD  
[www.periodontiamedica.com](http://www.periodontiamedica.com)



por Carlos Marcelo da Silva Figueredo, DDS, MDSc, PhD  
[www.periodontiamedica.com](http://www.periodontiamedica.com)

# Results

	<i>C0</i>	<i>P0</i>	<i>CB</i>	<i>PB</i>
<b>Elastase released (cellsx10<sup>3</sup>)</b>	<b>252 (87)</b>	<b>328 (127)</b>	<b>445 (165)</b>	<b>650(267)</b>
<b>E-A1AT complex (a.u)</b>	<b>21.7 (2.1)</b>	<b>22.9 (2.5)</b>	<b>35.4 (2.8)</b>	<b>39.1 (4.0)</b>
<b>Total A1AT (μmol/L)</b>	<b>57.1 (59.8)</b>	<b>53.6 (29.4)</b>	<b>88.3 (29.1)</b>	<b>81.2 (21.2)</b>
<b>Lactoferrin (ng/mL)*</b>	<b>194 (32)</b>	<b>168 (43)</b>	<b>822 (198)</b>	<b>558 (88)</b>

\* N= 10.

# Results

	<i>C0 - CB*</i>	<i>P0 - PB*</i>	<i>C0 - P0**</i>
<b>Elastase released</b>	<b>0.002</b>	<b>0.001</b>	<b>0.024</b>
<b>Total elastase</b>	<b>NS</b>	<b>0.013</b>	<b>NS</b>
<b>Total A1AT (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>	<b>0.041</b>	<b>0.002</b>	<b>NS</b>
<b>E-A1AT complex (a.u)</b>	<b>0.007</b>	<b>0.002</b>	<b>NS</b>

# Conclusion

- **Neutrophils from AP release more elastase after *in vitro* activation.**
- **This higher activity is not due to impaired inhibition by A1AT.**