

Avaliação histomorfológica e imuno-histoquímica dos filamentos intermediários de citoqueratinas na gengivite crônica

Histomorphological and immunohistochemical evaluation of cytokeratin intermediate filaments in chronic gingivitis

Ketsia Bezerra MEDEIROS

Professora – Faculdade de Santa Maria – Cajazeiras – PB

Ruthinéia Diógenes Alves Uchôa LINS

Professora Doutora – Disciplina de Periodontia – Universidade Estadual da Paraíba – UEPB

Gustavo Pina GODOY

Éricka Janine Dantas SILVEIRA

Doutorando – Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN

Lélia Maria Guedes QUEIROZ

Professora Doutora – Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral – Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN

RESUMO

O presente trabalho objetivou estudar a influência do processo inflamatório na expressão dos filamentos intermediários de citoqueratinas utilizando espécimes de gengivite crônica, além de traçar um perfil destes polipeptídeos na gengiva inflamada. Para tanto, foi feita uma avaliação histomorfológica, no que diz respeito ao tipo e intensidade do infiltrado inflamatório presente na gengivite crônica e a análise imuno-histoquímica da expressão das citoqueratinas 10, 13, 14 e 16, quanto à localização topográfica no epitélio em 10 casos de gengivite crônica. Constatou-se que o tipo de infiltrado inflamatório presente na gengivite crônica foi intenso e predominantemente mononuclear. Quanto aos achados imuno-histoquímicos, observou-se uma redução e até mesmo a ausência de expressão da CK 10 em cerca de 70% da amostra, a expressão da CK 13 estendendo-se por toda a camada suprabasal na grande maioria dos casos (90%), bem como expressão da CK 14 em toda a extensão do epitélio (90%) e ainda expressão variável da CK 16. A partir destes achados, concluiu-se que a expressão das citoqueratinas é alterada durante a inflamação, e que o processo inflamatório interfere na maturação epitelial, cujas evidências foram encontradas nas mudanças no perfil destas proteínas na gengiva inflamada.

UNITERMOS

Queratina, epitélio oral; gengivite; inflamação

INTRODUÇÃO

As citoqueratinas (CKs) são os filamentos intermediários tipicamente encontrados no citoplasma das células epiteliais e constituem uma família com, no mínimo, vinte diferentes polipeptídeos. Estas proteínas estão divididas de acordo com seus pesos moleculares, pH e determinantes antigênicos, em tipo I, numeradas de 9 a 20 (polipeptídeos ácidos), geralmente menores e tipo II, numeradas de 1 a 8 (polipeptídeos neutros ou básicos)^{7,15,17}.

Elas são estáveis, resistentes à degradação, mostram grande fidelidade de expressão e antigenicidade. Diferente das outras proteínas do citoesqueleto, os filamentos intermediários de citoqueratinas mostram uma considerável especificidade tecidual. Assim, o epitélio normal apresenta um padrão característico de expressão de citoqueratinas. Entretanto, essa expressão varia com o tipo celular, estágio de desenvolvimento, diferenciação tecidual e mudanças patológicas^{8,14,18}.

As citoqueratinas participam na organização do complexo estrutural intramolecular, o qual mantém a forma da célula, ajudando a formar o arcabouço do citoesqueleto e conferindo estabilidade e resistência a estresses mecânicos^{8,14,16}. Os filamentos intermediários das células epiteliais exibem ainda apresentação seqüencial, onde a camada basal e as camadas suprabasais do epitélio se apresentam diferentes quanto à sua expressão, a qual varia também de acordo com a localização anatômica do epitélio e é afetada em alguns processos patológicos^{4,8,12,21}.

As CK 5 e CK 14 são expressas na camada basal dos epitélios estratificados, representando os marcadores “permanentes” destes epitélios^{2,4,21}. As CKs 4 e 13 são expressas principalmente nas camadas suprabasais do epitélio não ceratinizado da mucosa oral^{2,12}. As células suprabasais do epitélio ceratinizado expressam o par formado pelas CKs 1, 10 (específicas de diferenciação) considerado como marcador de ceratinização, por serem estes polipeptídeos típicos de tecido ceratinizado sadio^{2,6,12,13,15,19}. O epitélio estratificado quando em alta renovação (*fast cell turnover*), expressa também o par de CKs 6, 16^{4-6,15,19,21}.

O epitélio gengival está sujeito à ação patogênica dos microorganismos bucais, bem como das citocinas produzidas pelas células inflamatórias, as quais estão localizadas principalmente no tecido conjuntivo subjacente^{1,16}. A influência da inflamação no epitélio gengival tem sido objeto de vários estudos que demonstraram a relação existente entre a inflamação do tecido conjuntivo e a proliferação epitelial^{10,16}.

O estudo do perfil de citoqueratinas no epitélio gengival durante os processos inflamatórios poderá permitir o entendimento da intrincada relação existente entre o grau de inflamação do tecido conjuntivo e a expressão destes filamentos intermediários, uma vez que tem sido demonstrada a ocorrência de algumas alterações neste perfil no epitélio da gengiva inflamada. O presente trabalho propôs-se

a avaliar se o infiltrado inflamatório presente em espécimes de gengivite crônica altera a expressão das citoqueratinas 10, 13, 14 e 16 além de traçar um perfil destas proteínas no epitélio da gengiva inflamada, na tentativa de estabelecer uma relação entre a expressão das citoqueratinas e a presença da inflamação, visando uma melhor compreensão das alterações epiteliais que ocorrem na vigência de um processo inflamatório.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente experimento consistiu de estudo histomorfológico e análise imuno-histoquímica da expressão das citoqueratinas 10, 13, 14 e 16 em dez casos de gengivite crônica, pertencentes aos arquivos do Serviço de Anatomia Patológica do Programa de Pós-graduação em Patologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Os blocos de material incluído em parafina foram submetidos a cortes de 5mm de espessura e corados pela técnica da hematoxilina e eosina (H & E). As lâminas obtidas foram então submetidas ao estudo morfológico em microscopia de luz, realizando-se uma análise descritiva dos aspectos histopatológicos quanto ao tipo celular predominante e intensidade do infiltrado inflamatório presente.

Para o estudo imuno-histoquímico, foram realizados cortes de 3mm de espessura no material embocado em parafina, os quais foram submetidos à técnica da imuno-histoquímica, pelo método da estreptoavidina-biotina (SABC). A especificidade, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados estão listadas no Quadro 1.

Os resultados foram posteriormente comparados e discutidos com o padrão de expressão das referidas citoqueratinas em epitélio normal, já bem estabelecido na literatura pertinente.

A positividade das citoqueratinas foi avaliada com relação à localização da marcação no tecido epitelial (basal e suprabasal).

Quadro 1 – Especificidade, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados

| Especificidade | Diluição | Rec. antigênica Incubação | Tempo de | Fabricante |
|----------------|----------|---------------------------|----------|------------|
| CK 10 | 1:50 | Tripsina a 0,1% 37°, 30' | 60' | Dako |
| CK 13 | 1:80 | Steamer 20', citrato | 120' | Dako |
| CK 14 | 1:50 | Steamer 20', citrato | 30' | Novocastra |
| CK 16 | 1:40 | Steamer 20', citrato | 60' | Novocastra |

RESULTADOS

A análise morfológica dos espécimes de gengivite crônica encontra-se listado no Quadro 2.

O tipo de infiltrado inflamatório variou entre os espécimes, sendo este intenso em 100% da amostra como observado na Figura 1.

Quanto aos achados imuno-histoquímicos, verificou-se que a CK 10 apresentou marcação nos dois terços superiores da camada basal em 30% dos casos (Figura 2), havendo marcação por toda a camada basal em 20% da amostra. Esta ainda mostrou-se ausente em

30% dos espécimes, e em 20% dos casos observou-se apenas algumas células marcadas na porção mais superior do epitélio.

A CK 13 exibiu marcação em toda camada suprabasal em 90% dos casos (Figura 3), enquanto que focos de marcação distribuídos pelo epitélio foram identificados em 10% destes. Já a CK 14 apresentou imunopositividade em todas as camadas do epitélio, em 90% dos casos (Figura 4), enquanto que em apenas 10% destes observou-se marcação em todas as camadas epiteliais, exceto no terço superior.

Quadro 2 – Tipo e intensidade do infiltrado inflamatório presente na gengivite crônica

| AMOSTRA | CÉLULAS INFLAMATÓRIAS PREDOMINANTES | INTENSIDADE DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO |
|---------|-------------------------------------|--|
| Caso 1 | Linfócitos e plasmócitos | Intenso |
| Caso 2 | Linfócitos | Intenso |
| Caso 3 | Plasmócitos | Intenso |
| Caso 4 | Linfócitos | Intenso |
| Caso 5 | Linfócitos e plasmócitos | Intenso |
| Caso 6 | Linfócitos | Intenso |
| Caso 7 | Linfócitos | Intenso |
| Caso 8 | Plasmócitos | Intenso |
| Caso 9 | Linfócitos | Intenso |
| Caso 10 | Linfócitos e plasmócitos | Intenso |

No que diz respeito a marcação da CK 16, observou-se que em 30% dos casos houve positividade nos dois terços superiores da camada suprabasal (Figura 5), em 30% houve marcação por toda ca-

mada basal, em 10% esta esteve confinada a áreas focais na camada suprabasal. Em 30% dos casos, verificou-se ausência de marcação para a referida citoqueratina.



FIGURA 1 – Fotomicrografia evidenciando intenso infiltrado inflamatório (H/E 100x).

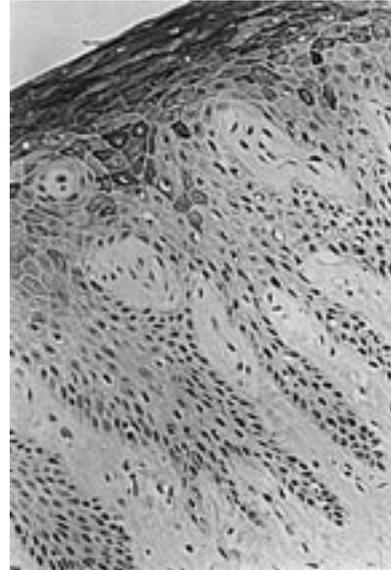


FIGURA 2 – CK 10 nos dois terços superiores da camada suprabasal do epitélio (SABC 200x).

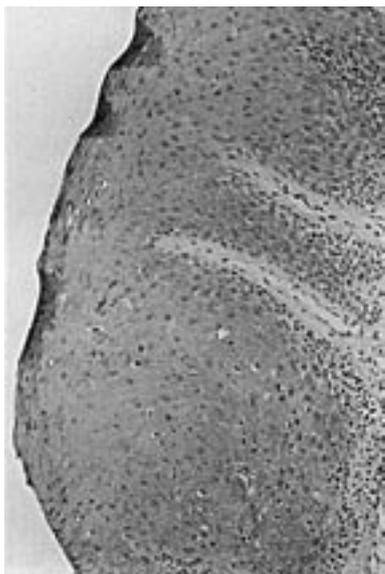


FIGURA 3 – CK 13 se estendendo por toda camada suprabasal do epitélio (SABC 100x).

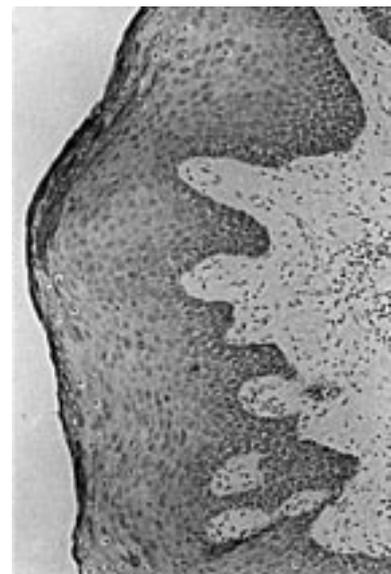


FIGURA 4 – Positividade para CK 14 em todas as camadas do epitélio (SABC 100x).



FIGURA 5 – CK 16 se estendendo por toda camada suprabasal do epitélio (SABC 100x).

DISCUSSÃO

A gengiva constitui um tecido que possibilita o estudo das mudanças na diferenciação epitelial frente a influências ambientais, merecendo destaque os danos ocasionados pela presença do biofilme dental, tendo como principal conseqüência as doenças inflamatórias³. Com relação ao tipo e intensidade do infiltrado inflamatório presente na gengivite crônica, observamos, no presente experimento, que este se apresentou intenso e constituído, especialmente, de linfócitos e plasmócitos, estando em acordo com os relatos de Joachim et al.⁹ (1990), Alves¹ (2000).

Neste estudo, buscou-se também observar a influência do processo inflamatório no tecido epitelial que reveste a gengiva, no que diz respeito à expressão dos filamentos intermediários de citoqueratinas, especificamente as CKs 10, 13, 14 e 16, objetivando traçar o perfil dessa expressão na gengivite crônica.

Observou-se que a CK 14 foi expressa em todas as camadas do epitélio gengival inflamado pela maioria dos espécimes observados (90%), ratificando os achados de Mackenzie & Gao¹⁰ (1993) e diferindo do padrão apresentado na mucosa oral normal, onde esta citoqueratina encontra-se confinada à camada basal do epitélio de revestimento^{3,6}.

Outros estudos também obtiveram resultados semelhantes. Dabelsteen et al.⁵ (1998), verificaram tal achado em epitélios em processo de reparo, enquanto Turatti²⁰ (1999) observou a expressão da CK 14 em todas as camadas do epitélio na maioria dos casos de líquen plano oral e displasia liquenóide analisados em seu estudo. A exemplo de Turatti²⁰ (1999), sugere-se que a extensão da expressão da CK 14 a todas as camadas epiteliais está relacionada com a inflamação, independente da natureza desta e também, com a tentativa de preservar a integridade estrutural do epitélio.

Com relação à CK 10, observou-se uma redução na expressão desta na quase totalidade dos espécimes. Estes resultados corroboram os achados de Bosch et al.³, 1989, Ouhayoun et al.¹⁶, 1990, Mackenzie & Gao¹¹, 1993. A redução da CK 10 parece estar associada às alterações no processo de diferenciação celular causadas pela inflamação. Nos casos onde não houve mudanças na expressão da CK 10 (20%), provavelmente as alterações inflamatórias não foram suficientes para acarretar em mudanças no padrão de expressão desta citoqueratina. Para Weiss, Eichner & Sun²¹ (1984) existe um delicado balanço entre ceratinização (uma forma de “diferenciação terminal”) e hiperproliferação. Tal fato foi comprovado após um estudo efetuado por estes pesquisadores, realizado em desordens hiperproliferativas, no qual foi observada a diminuição da CK 10 na maioria dos casos analisados. Em virtude disso, a diminuição da CK 10 observada em nossa amostra pode ser o reflexo do estado hiperproliferativo associado à inflamação, como relatado por Bosch et al.³ (1989).

O par formado pelas CKs 4, 13 somente é encontrado em epitélios ceratinizados como gengiva sob condições patológicas, sendo a mais comum delas, a inflamação, conforme pode ser visto nos estudos efetuados por Bosch et al.³, 1989, Ouhayoun et al.¹⁶, 1990, Sawaf et al.¹⁸, 1991, Mackenzie & Gao¹¹, 1993. Os achados da presente pesquisa identificam-se com os resultados destes autores, uma vez que, a maioria dos espécimes analisados (90%) exibiu marcação para a CK 13 que se estendeu por toda a camada suprabasal, provavelmente em virtude da relação inversa existente entre inflamação e ceratinização, como inferiram Ouhayoun et al.¹⁶ (1990).

Constituiu uma unanimidade entre os autores pesquisados que a CK 16 é expressa pelos epitélios estratificados em estados hiperproliferativos^{4,6,15,21}. A rápida indução da CK 16 sugere que este polipeptídeo

desempenha um papel de relevância na arquitetura celular, compatível com o estado hiperproliferativo, permitindo uma maior flexibilidade do citoesqueleto para que as células sofram divisões mais rápidas e/ou mais numerosas, na opinião de Weiss, (Eichner & Sun²¹, 1984, Dabelsteen et al.⁵, 1998). Observou-se no presente experimento um padrão de marcação variado, justificando a expressão desta CK ser associada ao estado hiperproliferativo relacionado à inflamação, que varia em cada caso.

O conhecimento sobre como as células manipulam os filamentos de citoqueratinas durante a divisão celular é limitado, assim como, se tais filamentos realmente influenciam este processo. É possível que as citoqueratinas associadas com hiperproliferação tenham propriedades compatíveis com divisões mais rápidas e/ou mais numerosas. A indução também pode ser um pré-requisito necessário para uma resposta hiperproliferativa controlada, o que sugere um papel mais ativo que passivo destes filamentos intermediários nas respostas hiperproliferativas.

Segundo Cooper et al.⁴ (1985), Mackenzie et al.¹¹ (1991), Morgan & Su¹⁵ (1994), McLean & Lane¹³ (1995), as citoqueratinas desempenham papéis funcionais no epitélio. A sua expressão varia de acordo com um largo espectro de fatores, quais sejam, tipo e propriedades do epitélio, estágio de desenvolvimento, diferenciação tecidual e alterações patológicas, como processos inflamatórios, tecidos hiperplásicos, neoplásicos ou que sofreram influências ambientais, como trauma, infecções virais e avitaminoses, conforme pode ser visto nos estudos efetuados por Weiss et al.²¹ (1984), Cooper, Schermer & Sun⁴ (1985), Sawaf et al.¹⁸ (1991), Maeda et al.¹² (1994), Heatley⁸ (1996), Mackenzie & Gao¹¹ (1996), Hansson et al.⁷ (2001). Entretanto, o verdadeiro papel das citoqueratinas nas diversas patologias ainda não foi esclarecido. Os relatos da literatura não esclarecem se a síntese de citoqueratinas precede as mudanças morfológicas vistas na microscopia de luz, ou se tais mudanças

representam a consequência das doenças. É possível que a chave para o entendimento dessas mudanças ocorra quando forem desvendados seus complexos processos regulatórios.

Frente aos resultados aqui encontrados, juntamente com os da literatura, comprovam que a expressão de citoqueratinas é afetada por vários estados patológicos. Entretanto, frente as diferenças observadas nos diversos estudos, o valor destes polipeptídios como marcadores específicos de certas doenças torna-se questionável, uma vez que o mesmo tipo de alteração pode ser observado em diversas patologias.

Outrossim, constatou-se com este experimento que a inflamação parece interromper a continuidade do processo de maturação celular epitelial, o que foi traduzido pela expressão reduzida da CK 10, pelo aparecimento da CK 13 e pela presença da CK 14 em todas as camadas do epitélio da gengiva inflamada. As investigações nesta área devem prosseguir, a fim de prover uma informação precisa, contributória e valiosa em relação aos referidos filamentos intermediários.

CONCLUSÕES

Em vista do exposto, podemos concluir que:

- O infiltrado inflamatório da gengivite crônica altera o padrão de expressão das citoqueratinas 10, 13, 14 e 16.
- A inflamação interfere no processo de maturação e diferenciação celular epitelial, traduzido pela presença da CK 14 em todas as camadas do epitélio da gengiva inflamada.
- A presença da inflamação altera o programa de diferenciação do epitélio gengival, demonstrado pela expressão reduzida da CK 10 e pelo aparecimento da CK 13.
- Existe um estado hiperproliferativo associado à inflamação, comprovado pela expressão da CK 16.

ABSTRACT

The aim of this investigation was to examine the influence of the inflammatory process in the expression of cytokeratin intermediate filaments by using surgical specimens of chronic gingivitis, describing a profile of these polipeptides in the inflamed gingiva. For this, a histomorphological evaluation in relation to the type and intensity of the inflammatory infiltrate was made, and an immunohistochemical analysis of cytokeratins 10, 13, 14 e 16 expression in 10 specimens of chronic gingivitis. It was found out that the type of inflammatory infiltrate of chronic gingivitis was intense and predominantly mononuclear. Regarding immunohistochemical findings, a reduction or disappearance of cytokeratin 10 was observed (30%), as well as the expression of cytokeratin 13 extending for all suprabasal layer in the majority of cases (90%), and also the cytokeratin 14 expression in full thickness of epithelium (90%), and a variable expression of cytokeratin 16. Therefore, we concluded that the expression of the cytokeratins is altered during inflammation, and that the inflammatory process affects the epithelial maturation, whose evidences were found in changes in the profile of those proteins in the inflamed gingiva.

UNITERMS

Keratins, oral epithelium, gingivitis, inflammation

REFERÊNCIAS

- Alves RD. Estudo morfológico dos tecidos periodontais saudáveis e acometidos por doença periodontal inflamatória. Natal; 2000. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Odontologia do Rio Grande do Norte].
- Boisnic S, Ouhayoun JP, Branchet MC, Frances C, Béranger JY, Le Charpentier Y et al. Alteration of cytokeratin expression in oral lichen planus. *Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995; 79(2): 207-15.
- Bosch FX et al. Extensive changes in cytokeratin expression patterns in pathologically affected human gingiva. *Virchows Archiv B Cell Pathol* 1989; 58(2): 59-77.
- Cooper D, Schermer A, Sun T. Classification of human epithelia and their neoplasms using monoclonal antibodies to keratins: strategies, applications, and limitations. *Lab Invest* 1985; 52(3): 243-56.
- Dabelsteen E. et al. Altered expression of epithelial cell surface glycoconjugates and intermediate filaments at the margins of mucosal wounds. *J Invest Dermatol* 1998; 111: 592-7.
- Depondt J, Shabana AH, Sawaf H, Gehanno P, Forest N. Cytokeratin alterations as diagnostic and prognostic markers of oral and pharyngeal carcinomas. A prospective study. *Eur J Oral Sci* 1999; 107: 442-54.
- Hansson A. et al. Expression of keratins in normal, immortalized and malignant oral epithelia in organotypic culture. *Oral Oncol* 2001; 37: 419-30.
- Heatley MK. Cytokeratins and cytokeratin staining in diagnostic histopathology. *Histopathology* 1996; 28: 479-83.
- Joachim F. et al. The plasma cell at the advancing front of the lesion in chronic periodontitis. *J Periodont Res* 1990; 25: 49-59.
- Mackenzie IC, Gao Z. Patterns of cytokeratin expression in the epithelia of inflamed human gingiva and periodontal pockets. *J Periodont Res* 1993; 28: 49-59.
- Mackenzie IC, Rittman G, Gao Z, Leigh I, Lane EB. Patterns of cytokeratin expression in human gingival epithelia. *J Periodont Res* 1991; 26: 468-78.
- Maeda H, Reibel J, Holmstrup P. Keratin staining pattern in clinically normal and diseased oral mucosa of lichen planus patients. *Scand J Dent Res* 1994; 102: 210-5.
- Mclean WHI, Lane B. Intermediate filaments in disease. *Cell Biol* 1995; 7: 118-25.
- Morgan PR, Shirlaw PJ, Johnson NW, Leigh IM, Lane EB. Potencial application of antikeratin antibodies in oral diagnosis. *J Oral Pathol* 1987; 16 (4): 212-22.
- Morgan PR, Su L. Intermediate Filaments in oral neoplasia. I. Oral cancer and epithelial dysplasia. *Oral Oncol Eur J Cancer* 1994; 30B (3): 160-66.
- Ouhayoun JP, Goffaux JC, Sawaf MH, Shabana AHM, Collin C, Forest N. Changes in cytokeratin expression in gingiva during inflammation. *J Periodont Res*, v. 25, p. 283-92, 1990
- Pelissier A, Ouhayoun JP, Sawaf MH, Forest N. Changes in cytokeratin expression during the development of the human oral mucosa. *J Periodont Res* 1992; 27: 588-98.
- Sawaf MH, Ouhayoun JP, Forest N. Cytokeratins profiles in oral epithelia: a review and new classification. *J Biol Bucal* 1991; 19 (3): 187-98.
- Shabana AHM et al. A comparative biochemical and immunological analysis of cytokeratin patterns in the oral epithelium of the miniatura pig and man. *Archs Oral Biol* 1989; 34(4): 249-59.
- Turatti E. Avaliação da expressão das citoqueratinas no líquen plano e na displasia líquenóide. São Paulo; 1999. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo].
- Weiss RA., Eichner R, Sun T. Monoclonal antibody analysis of keratin expression in epidermal diseases: a 48- and 56-kdalton keratin as molecular markers for hyperproliferative keratinocytes. *J Cell Biol* 1984; 98: 1397-406.

Recebido em: 24/03/04

Aprovado em: 14/09/04

Lélia Maria Guedes Queiroz
Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral
Av. Senador Salgado Filho, 1787, Lagoa Nova
CEP: 59056-000 Natal-RN
Fone: (84) 215-4108 Fax: (84) 215-4138
lmgqueiroz@hotmail.com