

**PAULA ERCILIA BERTOLINI CARVALHO CHAVES**

Cirurgiã Dentista

**QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS E IMUNOGLOBULINAS DA  
SALIVA E PLACA DENTAL DE CRIANÇAS, SUAS RELAÇÕES  
COM O FLUXO SALIVAR, ÍNDICES DE CARÍE, DE  
GENGIVITE E DE HIGIÊNE ORAL**

Orientador: Prof. Dr. LOURENÇO BOZZO

Tese apresentada à Faculdade de  
Odontologia de Piracicaba, da  
Universidade Estadual de Campi-  
nas, para obtenção do grau de  
Mestre em Biologia e Patologia  
Buco-Dental (Microbiologia e  
Imunologia).

PIRACICABA - SP  
1982

**UNICAMP**  
**BIBLIOTECA CENTRAL**

Dedico este Trabalho com amor

Aos meus pais, PEDRO e ERCILIA, que além de me darem a vida, deram-me uma formação cristã;

Ao meu esposo, OSVALDO, pelo incentivo e apoio;

Aos meus irmãos, PEDRO LEANDRO, PERCI, LEANDRA e LEANDRINHA, pelos anos que trilhamos juntos;

Ao meu filho PEDRO MANOEL, que desponta para a vida a qual, unidos, devemos palmilhar.

A G R A D E C I M E N T O S

- ao Professor Dr. ANTONIO CARLOS NEDER, D.D. Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pela oportunidade da realização deste trabalho;
- ao Professor Dr. ANTONIO CARLOS FERRAZ CORRÊA, Coordenador do Curso de Pós-Graduação do Departamento de Biologia e Patologia Buco-Dental, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela carinhosa atenção dispensada durante o curso;
- ã Professora Dra. SONIA VIEIRA, Titular de Bioestatística da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela segura orientação dada na realização da análise estatística;
- ao Professor Dr. JAIME APARECIDO CURY, Professor Assistente Doutor da Área de Bioquímica, pela excelente colaboração prestada na orientação sobre os métodos de quantificação de proteínas;
- ao Professor Dr. PEDRO BERTOLINI, Titular da Área de Microbiologia e Imunologia, que nos orientou nas reações sorológicas empregadas nesta pesquisa.

Este trabalho foi realizado com a colaboração da FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO, que concedeu à autora do mesmo Bolsa de Mestrado, através do Processo nº 12-Médicas 80/1504 - 7, a cuja Direção agradeço sensibilizada.

Ao Professor Doutor LOURENÇO BOZZO, Titular da Área de Patologia Buco-Dental da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, meu orientador, pela confiança e dedicação com que me distinguiu no desenvolver deste trabalho.

S U M Á R I O

	Pág.
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO .....	01
CAPÍTULO II - REVISÃO DA LITERATURA .....	05
2.1. Imunoglobulinas na saliva .....	08
2.2. Imunoglobulinas na placa dental ....	12
CAPÍTULO III - PROPOSIÇÃO .....	16
CAPÍTULO IV - MATERIAIS E MÉTODOS .....	18
4.1. Amostragem .....	19
4.2. Coleta da Saliva .....	20
4.3. Coleta de material de placa dental..	20
4.4. Determinação de proteínas .....	21
4.5. Quantificação de imunoglobulinas ...	22
4.6. Método estatístico .....	22
CAPÍTULO V - RESULTADOS .....	24
CAPÍTULO VI - DISCUSSÃO .....	37
CAPÍTULO VII - CONCLUSÕES .....	47
CAPÍTULO VIII - SUMMARY .....	49
CAPÍTULO IX - RESUMO .....	52
CAPÍTULO X - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	55

## ÍNDICE DE TABELAS

- TABELA 1 - Índice de Cárie Dentária (CPOD), Índice de Gengivite (PMA), Fluxo Salivar e Concentrações de Proteínas e Imunoglobulinas, de Saliva de 20 crianças, de ambos os sexos, de 10 a 14 anos de idade ..... 27
- TABELA 2 - Índice de Cárie Dentária (CPOD), Índice de Gengivite (PMA), Índice de Higiene Oral (IHOS), Peso Sêco e Concentrações de Proteínas e Imunoglobulinas de Placa Dental de 20 crianças, de ambos os sexos, de 10 a 15 anos de idade ..... 28
- TABELA 3 - Correlação entre concentrações de Imunoglobulinas da saliva e os Índices CPO, PMA e Fluxo Salivar ..... 29
- TABELA 4 - Correlação entre as concentrações de Imunoglobulinas na placa dental e os Índices CPO, PMA e IHOS ..... 30

## INDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Diagrama de dispersão para as variáveis CPOD e IgG, obtidas em saliva .....	31
GRÁFICO 2 - Diagrama de dispersão para as variáveis CPOD e IgA, obtidas em saliva .....	31
GRÁFICO 3 - Diagrama de dispersão para as variáveis PMA e IgG, obtidas em saliva .....	32
GRÁFICO 4 - Diagrama de dispersão para as variáveis PMA e IgA, obtidas em saliva .....	32
GRÁFICO 5 - Diagrama de dispersão para as variáveis Fluxo Salivar e IgG, obtidas em saliva .....	33
GRÁFICO 6 - Diagrama de dispersão para as variáveis Fluxo Salivar e IgA, obtidas em saliva .....	33
GRÁFICO 7 - Diagrama de dispersão para as variáveis CPOD e IgG, obtidas em placa dental .....	34
GRÁFICO 8 - Diagrama de dispersão para as variáveis CPOD e IgA, obtidas em placa dental .....	34
GRÁFICO 9 - Diagrama de dispersão para as variáveis PMA e IgG, obtidas em placa dental .....	35
GRÁFICO 10 - Diagrama de dispersão para as variáveis PMA e IgA, obtidas em placa dental .....	35
GRÁFICO 11 - Diagrama de dispersão para as variáveis IHOS e IgG, obtidas em placa dental .....	36

GRÁFICO 12 - Diagrama de dispersão para as variáveis  
IhOS e IgA, obtidas em placa dental ..... 36

## CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

A quantificação das imunoglobulinas séricas constitui um modelo para se avaliar uma série de respostas imunes em algumas doenças. Em determinadas condições clínicas as concentrações dos diferentes tipos de anticorpos podem variar significativamente. Assim, nos casos de mielomas, hipo ou macroglobulinemias, as células produtoras de imunoglobulinas produzem pequenas ou elevadas quantidades desses anticorpos.

O tipo de imunoglobulina varia também conforme a modalidade da infecção. Segundo alguns autores (TOMASI, 1965; SOOTHIL, 1966) um aumento de IgG sempre ocorre nas infecções bacterianas e de IgM nas infecções por vírus e protozoários.

As doenças auto-imunes, ainda de acordo com TOMAZI (1965), estariam associadas com valores anormais de imunoglobulinas IgG e IgA, que nestes casos estão aumentadas.

No lupus eritematoso sistêmico estão envolvidas variações nos teores de IgG e IgA, principalmente; na colite ulcerativa ocorre aumento discreto das mesmas; na artrite reu

matóide de baixo título aumentam pouco a IgA e IgG e na dea] to título são elevadas as concentrações de IgA e IgM (TOMASI, 1965).

Com relação às doenças localizadas na boca ou órgãos anexos, os níveis de imunoglobulinas foram investiga dos, mas não há uma concordância de pensamentos sobre o pa pel que as mesmas desempenham.

Nos casos de úlceras aftosas maiores ou menores, ocorre um aumento nos valores de IgG e IgA séricas, mas ape nas nos primeiros tipos eles são significativos.

Foi observado que nas ulcerações herpetiformes a IgA do soro e em menor escala a IgG estão também aumenta das.

Nos casos de liquen plano e gengivites ulcerati vas agudas ocorre o inverso, ou seja, os níveis de IgG estão significativamente diminuídos (LEHNER, 1969a).

Além das imunoglobulinas de origem sistêmica , que parecem desempenhar um papel importante na cavidade oral, também a produção local de anticorpos secretores tem sido e videnciada na saliva da mesma forma como ocorre em outras se creções externas (BRANDTZAEG et al, 1970).

Dessa forma, a demonstração de um sistema imuno lógico local nas glândulas salivares, por exemplo, tem esti mulado as investigações no sentido de relacionar as imunoglo bulinas da saliva com a cárie dental (LEHNER et al, 1967) , com as doenças dessas glândulas (MANDEL et al, 1969) e ainda com as doenças periodontais (CHANDLER et al, 1974).

Nos últimos anos atenção considerável tem sido dada aos processos imunitários que envolvem o binômio hospe deiro e placa dental.

Os anticorpos da placa se originam na saliva ou provêm do sulco gengival. Os níveis dos mesmos parecem variar em função de estímulos antigênicos da própria placa, de onde podem ser extraídos por técnicas adequadas.

A quantificação de imunoglobulinas de saliva e de placa dental, bem como o seu relacionamento com problemas da cavidade oral constitui o principal escôpo deste trabalho.

CAPÍTULO II - REVISÃO DA LITERATURA

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

A saliva total é uma mistura complexa da secreção das 3 principais glândulas salivares: a parótida, a submaxilar e a sublingual e de outras numerosas glândulas das membranas mucosas da cavidade oral.

É constituída de cerca de 99% de água, sendo que a parte orgânica (proteínas, carboidratos, lipóides, aminoácidos, vitaminas, etc.) é de pouco mais de 0,5% e a inorgânica (íons de Na, fosfatos, K, Cl, Ca, etc. ) de 0,25%.

Possue uma série de características que promovem o equilíbrio de sua flora microbiana, como capacidade tampão, ação mecânica através do seu fluxo, efeitos bactericidas exercidos pelo seu conteúdo em lisozima, tiocianatos e antagonismo da flora nativa aos agentes invasores.

A saliva possui também quantidades variáveis de imunoglobulinas cujo papel protetor é discutível. As principais das cinco atualmente conhecidas são a IgG e a IgA. A IgG é um anticorpo que atravessa a placenta, conferindo proteção contra as infecções, passa pelos vasos sanguíneos, difundindo-se pelos tecidos; é capaz de fixar complemento e possui

um coeficiente de sedimentação 7 S, com p.mol. de 150.000 daltons. As concentrações de IgG na saliva integral não estimulada são maiores que as concentrações na saliva colhida isoladamente das glândulas.

A presença de IgG na saliva total parece depender da transmissão extraglandular ocorrendo através da gengiva em função do grau de extensão da gengivite, como uma influência marcante no seu nível sérico.

A principal origem da IgG da saliva integral parece ser o fluído do sulco gengival.

Contudo, das imunoglobulinas encontradas nas diversas secreções humanas, como da parótida, lágrima e colostro, a IgA é praticamente encontrada em maior quantidade, embora constitua apenas 15% das imunoglobulinas séricas. As diferenças de estrutura são aparentes, pois a referida IgA tem um coeficiente de sedimentação 11 S enquanto que para a IgA sérica esse coeficiente é de 7 S; essa diferença de peso deve-se a um pequeno fragmento chamado "peça secretora" ou "peça de transporte". Tal peça confere certa estabilidade à imunoglobulina diante das enzimas proteolíticas das secreções, evitando a sua desnaturação. Ela parece ser produzida nas células epiteliais dos ductos de certas mucosas (GENCO, 1969).

Altas concentrações de IgA na saliva não estimulada parecem desempenhar um mecanismo importante na defesa das mucosas orais contra membros da microflora comensal bem como agentes infecciosos estranhos. Parece que a vacinação tópica e a infecção são mais efetivas no estímulo de uma resposta local da IgA do que a vacinação parenteral.

Durante os períodos em que o fluxo salivar é intenso, seu efeito simplesmente de lavagem, mantém o número

de bactérias dentro de um limite aceitável. Quando ele é praticamente nulo, ou seja, entre as refeições ou durante o sono, o alto título de IgA como anticorpo que é, age como uma força bacteriana efetiva. Contudo, os mecanismos pelos quais a IgA determina a eliminação de bactérias não são bem conhecidos. Essa imunoglobulina não fixa complemento pela via clássica como bem o demonstraram HEREMANS et al (1963) e ISHIZAKA et al (1965), embora agregados de IgA possam fazê-lo através da via alternada (GOTZE & MULLER-EBERHARD, 1971).

Alguns fatos mais recentes oferecem algumas evidências para uma ação de "anticorpo bloqueador", o que equivale dizer que o anticorpo secretor bloquearia a entrada de antígenos nos tecidos gengivais e influenciaria a aderência de bactérias entre si e das bactérias na superfície da boca. Essas conclusões encontram apoio em vários trabalhos experimentais; assim, OGRA et al (1968), mostraram que a IgA impede a replicação de vírus na superfície de mucosas. Foi demonstrado, também, por OLSON et al (1972) que a IgA inibe a aderência de *S. mutans* nas superfícies lisas dos dentes. A administração passiva de anticorpos diminui consideravelmente a adsorção de vibriões à mucosa intestinal, segundo experiências realizadas "in vitro" por FRETER (1970).

2.1. Imunoglobulinas na Saliva: Dois anos após a demonstração da atividade anticórpica em soros de indivíduos imunes à difteria, por VON BEHRING & KITASATO, foi evidenciada por SANARELLI (1892) a mesma atividade na saliva. A imunização de coelhos e humanos com toxóide diftérico permitiu observar diferenças na quantidade de anticorpos e duração dos mesmos no soro e na saliva (SCHUBERT, 1939).

A presença dos componentes imunoquímicos encontrados no soro foi observada na saliva integral por DREVON & DONIKIAN (1956), comparando a mobilidade eletroforética de proteínas em secreção de parótida e soro humano. Em 1960, EL LISON et al identificaram a fração gamaglobulina não sô em secreção de parótida como na saliva integral, empregando a difusão em gel e a imunoeletroforese.

As imunoglobulinas IgG e IgM foram identificadas nessa secreção por STOFFER et al (1962) por métodos imunoquímicos e somente um ano mais tarde é que CHORDIKER & TOMASI (1963) conseguiram demonstrar também a existência de IgA em secreção de parótida e em 1964 ISHIZAKA et al confirmaram sua presença também na saliva concentrada.

Em 1967, CLAMAN et al, mediram os níveis de imunoglobulinas de saliva e da parótida, através do método da eletroimunodifusão, em 40 adultos, normais e doentes; encontraram IgA nas quantidades de 2,8 a 15 mg/100 ml com média de 9,5 mg/100 ml. Em amostras seriadas do mesmo indivíduo encontrou variações consideráveis, entre amostras de parótida esquerda e direita poucas variações, porém os teores de IgA das parótidas sempre foram maiores que os das secreções misturadas das glândulas submandibulares e sublingual.

Um estudo relacionando as quantidades de imunoglobulinas IgG e IgA em indivíduos normais e portadores de úlcera oral recorrente, e líquen plano foi feito por LEHNER em 1969. Os pacientes portadores de úlcera oral recorrente apresentaram elevação do título de anticorpos não significante quando comparados com os normais; mas aqueles com úlceras aftosas maiores evidenciaram aumento dos títulos de IgA e IgG significantes ao nível de 5%; nos doentes com líquen pla

no os teores de IgG decresceram enquanto que os de IgA estavam aumentados. Com relação, ainda, à IgG, não a encontraram na secreção de parótida, pelo método empregado, mas constataram sua presença na saliva total.

Quantidades de imunoglobulinas em saliva não concentrada foram determinadas por LoGRIPPO et al (1969), em diversas situações, como em pacientes em jejum, antes e após a quecimento da saliva, em saliva colhida por estimulação artificial e ainda em saliva colhida em diferentes horas do dia. Os pacientes eram saudáveis com níveis de imunoglobulinas séricas normais. Os autores não conseguiram detectar IgM, enquanto que a IgA foi encontrada nos limites de 0,01 a 2,2mg/100 ml e IgG de 0 a 1,9 mg/100ml. Não observaram constância na relação de imunoglobulinas entre saliva e soro em pacientes normais e doentes.

Em estudo feito em 48 indivíduos com doença periodontal, TORCHINSKY (1970), dosou proteínas e as principais imunoglobulinas séricas e salivares. Seus resultados se situaram ao redor da média de 2,54 mg/100 ml de IgA salivar; os níveis variaram conforme o estado da doença periodontal, por ele designados de: estados de evolução precoce, 3,18 mg/100 ml; evolução tardia, 3,03 mg/100 ml; evolução precoce pequena, 1,85 mg/100 ml; evolução tardia pequena, 2,97 mg/100 ml. A IgG variou de 1,7 a 2,4 mg/100 ml com a média de 1,85 mg/100 ml.

SHILLITOE & LEHNER, em 1972, pesquisaram imunoglobulinas e frações do complemento no fluido do sulco gengival soro e saliva de 25 pacientes. Encontraram altas concentrações de IgG, IgA e IgM no fluido do sulco gengival, embora em média, essas concentrações fossem bem menores que as

existentes no soro. As proporções relacionadas entre soro e fluido do sulco foram de: IgG 3,7; IgA 2,0; IgM 2,6 e C<sub>3</sub> 3,7.

Investigando a presença de anticorpos para estreptococos cariogênicos, SIMS (1972) analisou amostras de saliva de dois grupos de estudantes de Odontologia com incidência de cáries pequena e elevada, constituídos de 12 alunos cada grupo. Para o primeiro grupo, com CPOD médio de 2,6 encontraram, em média, 1,36 mg/ml de IgG e 1,86 mg/ml de IgA e no segundo grupo, com CPOD médio de 24,7, acharam 1,06 mg/100 ml de IgG e 1,94 mg/100 ml de IgA.

Pesquisa sobre as relações entre os níveis de IgG e IgA com índice CPOD, idade e raça, foi feita por EVERHART e cols. (1972), usando saliva de 103 pessoas. Encontraram em todas as amostras, IgA numa concentração média de 3,8 mg/100, não tendo sido, porém, encontrada em 22 pessoas. Compararam os índices CPOD de pacientes com e sem IgG não tendo verificado diferenças nos dois grupos. Observaram ainda, que seus resultados indicavam valores de IgG e IgA mais elevados do que aqueles referidos por LEHNER et al (1967).

A correlação entre a concentração de IgA de saliva da parótida, colhida sem estímulo, e média de secreção com inflamação periodontal em vários graus de intensidade, foi investigada por CHANDLER et al (1974). Os autores referiram como conclusão que as concentrações de IgA e médias de secreção independem do grau de inflamação periodontal.

CHALLACOMBE, em 1976, comparou as quantidades de IgG, IgA e IgM contidas em saliva de parótida e média de secreção de IgA em 130 indivíduos, compreendendo um grupo com e outro sem cáries; encontrou correlação positiva entre o índice CPOD e os níveis séricos de IgG e IgA, mas não de IgM.

Concluíram que esses anticorpos presentes no sangue sugerem que a IgA salivar provavelmente contribua para a defesa contra a cárie.

As médias de quantidades de IgA e fluxo salivar foram determinadas por HANAH et al (1976). Para tanto empregaram amostras de saliva de 21 pacientes com estomatite aftosa, colhendo-as a cada 3 dias durante 3 semanas. Encontraram os seguintes níveis de IgA: nos pacientes na fase que os autores chamaram de "dormente", a média de IgA foi de 9,3 mg/100 ml, na fase "aguda", 7,8 mg/100 ml e nos indivíduos controles, 8,5 mg/100 ml. Determinaram também os níveis séricos de IgG e IgA. Relataram os autores não haver correlação entre condições clínicas dos pacientes com os níveis das imunoglobulinas estudadas.

Em Tese de Mestrado, o autor nacional, SINGI (1979), realizou um estudo comparativo entre os níveis de IgA na saliva total e de parótida de indivíduos portadores de periodontite. Compararam 20 pacientes portadores de periodontite e 20 indivíduos normais. Quantificou IgA através da imunodifusão radial simples. Verificou, ainda, o comportamento das proteínas totais quanto a sua concentração e taxa de secreção bem como suas correlações com a IgA. Dentre suas conclusões não observou alteração estatisticamente significativa na concentração de IgA, quer na saliva total, quer na saliva de parótida de indivíduos com periodontite.

2.2. Imunoglobulinas na Placa Dental: A placa dental ou placa bacteriana pode ser definida como um material mole, aderente à superfície dental, porção coronária ou radi

cular, e que não é removida por um jato de água ou pela escovação comum. Pode também ser considerada como densas massas bacterianas não calcificadas, firmemente aderidas às superfícies dos dentes e que resistem à lavagem pelo fluxo salivar. De um modo geral podemos dizer que ela é constituída de microrganismos (80%), material mucóide ou mucina, células epiteliais descamadas, leucócitos, restos de alimentos (carboidratos, proteínas e lipídios), pigmentos, enzimas e sais minerais.

Embora mecanismos naturais não específicos e mecanismos imunes específicos tenham sido descritos (SEYMOUR & GREENSPAN, 1979), muita atenção tem sido dada às respostas adaptativas. Anticorpos específicos para bactérias de placa tem sido demonstrados nos soros dos indivíduos (ORSTAVIK & BRANDTZAEG, 1977). Esses anticorpos séricos, provavelmente chegam até a placa, via fluído do sulco gengival (RUSSEL & HAWKES, 1978). Imunoglobulinas tem sido obtidas de extratos de placa dental (TAUBMAN, 1974). Todavia, poucas são as evidências de que algum componente específico da saliva possa ser encontrado nessa estrutura.

Em 1966, KRAMER & RAMANATHAM foram os primeiros a investigar depósitos sobre a superfície do esmalte dos dentes por imunofluorescência. Dentes de pacientes de 2,5 a 52 anos foram examinados. Demonstraram a presença de imunoglobulinas na superfície do esmalte, ligadas à película adquirida, mas não fizeram tal investigação em placa. Ainda através de técnicas de imunofluorescência direta, BRANDTZAEG et al (1968b), demonstraram a presença de IgA ligada tanto ao sedimento salivar, bem como a bactérias de placa. Estudando tecido periodontal inflamado foi possível verificar fluorescên-

cia em resíduos de placa aderentes a gengiva, através do uso de soro fluorescente anti IgG e anti IgA (PLATT et al, 1970).

Alguns trabalhos mais recentes, nos quais foram empregados técnicas imunológicas mais sensíveis, demonstraram a presença das imunoglobulinas IgG, IgA e traços de IgM em placa dental.

Em 1974, TAUBMAN et al investigaram as proporções relativas das imunoglobulinas e albumina em extratos de placa através do método da imunodifusão radial de MANCINI (1965). Essas quantificações foram realizadas em extratos obtidos pela suspensão de material de placa de vários indivíduos, em solução salina tampão-fosfato de pH 7,5 e em solução tampão HCl-glicina de pH 2,3. Os autores encontraram IgG e IgA em 4 placas e em uma delas apenas, traços de IgM. Segundo os autores, pelas elevadas concentrações em que a IgG e albumina são encontradas na placa, uma parte considerável das mesmas se originaria do fluido do sulco gengival, embora a saliva possa contribuir com uma parcela, a qual seria bem menor.

HOLT & MESTECKY (1975), demonstraram que tanto IgG como IgA podem ser quantificados em eluatos obtidos a partir de lavados de sedimento de placa com uréia 8 M. A presença de IgG, IgA e IgM foi detectada através da imunofluorescência em material de placa formada sobre tiras de celulóide (SCHWARTZ & GIBSON, 1973). Neste estudo, a IgG foi a imunoglobulina predominante e IgM foi encontrada em apenas uma das 17 superfícies examinadas. Empregando também a imunofluorescência, ORSTAVIK & KRAUS (1973), observaram IgA em película adquirida formada experimentalmente em cortes de esmalte de dente bovino, fixados em cilindros de acrílico e co

locados na boca de voluntários por 2 horas. IgG não foi detectada.

Em 1979, NEWMAN et al pesquisaram a presença e a distribuição das imunoglobulinas nas faces proximais de dentes extraídos de crianças, através da imunofluorescência. Obtiveram resultados positivos, com intensidade decrescente na seguinte ordem: Ig total IgG IgA IgM. A fluorescência foi maior no bordo apical da placa, principalmente no ponto de contacto dessa área. Esse fato pode ser relacionado com a prevalência de organismos lisados na região.

A presença de restos celulares bacterianos no bordo apical da placa (NEWMAN, 1979) sugere que a atividade anticórpica específica ou o fator antibacteriano pode ser atuante nessa região.

O estudo topográfico e a distribuição das diferentes imunoglobulinas, corresponde com os estudos feitos, sugerindo que o fluido gengival (via plasma e células plasmáticas da gengiva) seria a principal fonte das imunoglobulinas da placa.

O componente secretor também tem sido detectado em placa, o que sugere que parte das imunoglobulinas na placa supragengival é de origem salivar (TAUBMAN, 1974; HOLT & MESTECKY, 1975).

Com relação a IgG, segundo TAUBMAN (1974), ela se apresentaria sobretudo na forma degradada, em virtude da presença de vários enzimas na placa, sendo que o fragmento Fc seria o maior fragmento a ser presente. Ainda tem sido sugerido que anticorpos do fluido do sulco gengival, principalmente IgG, pode oferecer proteção contra as cáries de superfícies lisas dos dentes, pelo fato de banhar continuamente a superfície do esmalte, a partir do rebordo gengival (LEHNER et al 1975).

TABELA 1 - Índice de Cárie Dentária (CPOD), Índice de Gengivite (PMA), Fluxo Salivar e Concentrações de Proteínas e Imunoglobulinas, de saliva de 20 crianças, de ambos os sexos, 10 a 14 anos de idade.

CRIANÇAS	IDADE	SEXO	CPOD	PMA	FLUXO (ml/min)	PROTEÍNA (mg/100)	IgG mg/100	IgA mg/100
1	12	M	13	0,57	0,23	185,0	1,8	8,2
2	12	M	12	0,16	0,18	190,0	1,4	8,1
3	12	M	12	0,12	0,12	178,0	0,8	4,1
4	10	M	11	0,12	0,15	131,0	1,4	4,6
5	13	M	10	0,37	0,21	118,0	2,2	7,6
6	11	M	4	0,19	0,34	184,0	1,8	6,9
7	10	M	4	0,14	0,19	143,0	1,1	4,2
8	12	M	2	0,18	0,46	187,0	0,8	8,1
9	12	M	5	0,10	0,39	135,0	0,9	2,3
10	10	M	7	0,21	0,23	120,0	2,4	1,2
11	15	F	11	0,29	0,26	120,0	2,2	4,2
12	10	F	12	0,18	0,18	176,0	2,1	8,4
13	14	F	12	0,25	0,32	186,0	1,2	1,8
14	13	F	11	0,17	0,21	110,0	1,8	7,2
15	12	F	9	0,63	0,35	140,0	0,8	6,3
16	12	F	4	0,36	0,24	198,0	1,1	3,1
17	12	F	5	0,25	0,48	188,0	0,9	1,8
18	10	F	7	0,40	0,41	165,0	2,8	7,2
19	13	F	7	0,47	0,33	108,0	2,1	3,1
20	13	F	4	0,31	0,27	110,0	1,8	4,6

### CAPÍTULO III - PROPOSIÇÃO

### 3. PROPOSIÇÃO

Considerando que a bibliografia sobre imunoglobulinas da saliva evidenciou-nos uma série de dados controversos e que trabalhos semelhantes feitos com material de placa dental são poucos, procuraremos realizar o seguinte:

1. Estabelecer os índices CPOD, PMA, IHOS e Fluxo Salivar em crianças na faixa etária de 9 a 15 anos;
2. Determinar as quantidades de proteínas e imunoglobulinas IgG e IgA, em saliva integral, não estimulada e em material de placa dental;
3. Relacionar os níveis de imunoglobulinas a serem estudadas com os índices propostos.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Amostragem

Foram submetidos aos métodos de investigação deste trabalho, o material de placa dentária e a saliva colhidos de 20 crianças, de ambos os sexos, de idade variando entre 10 e 15 anos. Pertenciam elas ao "Berço da Fraternidade" da cidade de Araras (SP), às quais dispensamos tratamento odontológico.

A vantagem de se estudar um grupo dessa ordem reside no fato de que se pode ter um bom conhecimento dos costumes, hábitos de higiene, e principalmente da alimentação que é uniforme para todos, bem como a colaboração na prática de medidas profiláticas.

As 20 crianças cujo material nos interessou foram selecionadas após o levantamento dos Índices de Cárie Dentária (CPOD), segundo KLEIM & PALMER (1937); Gengivite (PMA), de acordo com SCHOUR & MASSLER (1947-1948, mod. TOLEDO, 1964) e de Higiene Oral (IHOS), segundo GREENE & VERMILLION (1964).

## CAPÍTULO IV - MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.2. Coleta da Saliva Total

A coleta da saliva foi feita 2 horas após o café da manhã. Cada criança recebeu um frasco com capacidade para 20 ml, esterilizado, onde vertiam a saliva, que afluía à boca com ligeiros movimentos da mesma. Não se empregou estímulo através da mastigação de parafina ou de uso de suco de limão.

O volume de saliva coletada durante 10 minutos foi medido e o fluxo salivar calculado.

Os frascos foram mantidos em banho de gelo picado para evitar ao máximo a desnaturação das proteínas, e assim transportados ao laboratório dentro do prazo de 2 - 3 horas.

A seguir, as amostras de saliva foram centrifugadas a 2.500 rpm durante 10 minutos, a 4°C. Os sobrenadantes foram separados e guardados, separadamente, a -20°C. Após 24 horas, procedeu-se ao descongelamento das amostras, aquecendo-as a 56°C, durante 30 minutos, antes de serem testadas.

#### 4.3. Coleta de Material de Placa Dentária

A coleta de material de placa foi feita após bochechos com água destilada, raspando-se todas as superfícies dos dentes presentes na boca, evitando-se a porção do sulco gengival e a contaminação com sangue.

O material obtido foi depositado em pequenos frascos contendo 0,5 ml de solução salina tampão-fosfato, de pH 7,5, conservados em banho de gelo picado, transportado ao

laboratório onde foi congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . até o uso.

Para se obter a quantidade de material de placa de cada criança, suficiente para as quantificações a serem feitas, foram necessárias coletas semanais durante alguns meses.

Obtidas as amostras, todo o material de placa de cada criança foi misturado, agitado fortemente e centrifugado a  $4^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos a 2.500 rpm; após a centrifugação o resíduo foi extraído com solução de glicina a 0,2 M tampoadada com HCl, pH 2,3 após agitação por 2 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ . O novo sobrenadante foi imediatamente neutralizado com hidróxido de sódio 5 N e combinado com o sobrenadante de salina tampão-fosfato. Foram tomadas alíquotas para a determinação do peso seco, as quais foram antes dializadas durante 48 hs contra água destilada. Essa mistura foi aquecida a  $56^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos e colocada em saco de diálise e concentrada ao volume de 1 ml por cobertura do saco com sacarose.

Quantidades de 20  $\mu\text{l}$  dessa mistura final foram aplicadas nas placas de imunodifusão com auxílio de micro-seringa manual de 10  $\mu\text{l}$ .

#### 4.4. Determinação de Proteínas

Para a determinação das quantidades de proteínas presentes nas amostras de salivas e extratos de placa, foi empregado o método de LOWRY et al (1951), usando albumina de soro bovino fração V Sigma como padrão e leitura em espectrofotômetro Baush & Lomb, Spectronic 20 em 600 nm.

#### 4.5. Quantificação de Imunoglobulinas

As imunoglobulinas foram quantificadas pelo método da imunodifusão radial de MANCINI et al. (1965), empregando-se placas de imunodifusão de baixa concentração, ou seja, LC-Partigen IgG e IgA (Behringwerke AG).

O princípio do referido método é a imunoprecipitação de antígeno, saliva ou eluato de placa, que se difunde radialmente sobre uma camada de ágar, devidamente tamponado, contendo um anti-soro específico. A amostra a examinar foi colocada em orifícios feitos no ágar com capacidade para conter 20  $\mu$ l. As placas foram mantidas em posição horizontal em câmara úmida, durante 50 horas, na temperatura ambiente. A determinação das quantidades de imunoglobulinas foi feita a partir de um gráfico construído com concentrações conhecidas, expressas em mg/100 ml, lançadas em abcissas, anotando-se nas ordenadas, o quadrado do diâmetro dos halos de precipitação obtidos.

Os controles foram realizados em cada lote de placas usadas e os diâmetros dos arcos de precipitação foram mediados com auxílio de microscópio estereoscópico, com aumento de 8X, usando-se a régua Behring específica para essa leitura.

Os resultados foram expressos em mg/100 ml de saliva ou de eluato de placa (mg/ml) e representam a média de duas mensurações das mesmas amostras.

#### 4.6. Método Estatístico

Foram calculados os coeficientes de correlação

dos valores de imunoglobulinas com os três diferentes Índices propostos. Para testar a significância da correlação foi usado o test t de Student.

## CAPÍTULO V - RESULTADOS

## 5. RESULTADOS

Os dados obtidos através do exame clínico de 20 crianças de ambos os sexos, com idades variando de 10 a 15 anos, e do exame laboratorial da saliva, constam na Tabela 1 (pág. 27).

Esses dados referem-se a Idade e Sexo, Índice de Cárie Dentária (CPOD), Índice de Gengivite (PMA), Fluxo Salivar e Quantificação de Proteínas e Imunoglobulinas (IgG e IgA).

Os dados obtidos através do exame clínico das mesmas crianças de ambos os sexos, com idade variando de 10 a 15 anos e do exame laboratorial de material de placa constam na Tabela 2 (pág. 28) com 6 amostras prejudicadas por contaminação.

Tais dados referem-se a Idade e Sexo, Índice de Cárie Dentária (CPOD), Índice de Gengivite (PMA), Índice de Higiene Oral (IHOS), Peso Sêco e Quantificação de Proteínas e Imunoglobulinas (IgG e IgA).

Com os valores que constam nas Tabelas 1 e 2, foram obtidos coeficientes de correlação das variáveis em es

tudo, mostrados na Tabela 3 (pág. 29) e Tabela 4 (pág. 30).

Para melhor visualizar a correlação entre os pa  
res de variáveis, foram traçados os diagramas de dispersão a  
presentados nos gráficos de nº 1 a 12 (págs.31 a 36).

TABELA 2 - Índice de Cárie Dentária (CPOD), Índice de Gengivite (PMA), Índice de Higiene Oral (IHOS), Peso Sêco e Concentrações de Proteínas e Imunoglobulinas de Placa Dental de 20 crianças, de ambos os sexos, de 10 a 15 anos de idade.

CRIANÇA	IDADE	SEXO	CPOD	PMA	IHOS	PESO SÊCO mg/ml	PROTEÍNA mg/ml	IgG µg/ml	IgA µg/ml
1	12	M	13	0,57	1,16	201	21,7	341	295
2	12	M	12	0,16	0,20	223	22,8	253	184
3	12	M	12	0,12	0,31	368	38,1	210	218
4	10	M	11	0,12	0,66	175	17,3	215	202
5	13	M	10	0,37	0,83	230	23,3	153	225
6	11	M	4	0,19	0,50	-	-	-	-
7	10	M	4	0,14	0,32	300	29,8	206	210
8	12	M	2	0,18	0,28	167	15,7	264	198
9	12	M	5	0,10	0,36	-	-	-	-
10	10	M	7	0,21	1,16	406	32,5	175	218
11	15	F	11	0,29	1,33	-	-	-	-
12	10	F	12	0,18	0,83	119	11,8	172	199
13	14	F	12	0,25	0,16	225	21,5	287	173
14	13	F	11	0,17	1,33	196	19,8	184	217
15	12	F	9	0,63	0,68	-	-	-	-
16	12	F	4	0,36	0,83	278	28,8	337	291
17	14	F	5	0,25	0,16	265	27,5	376	315
18	10	F	7	0,40	1,33	-	-	-	-
19	13	F	7	0,47	1,58	-	-	-	-
20	13	F	4	0,31	0,66	310	25,2	314	203

- Amostras prejudicadas por contaminação fúngica.

TABELA 3 - Correlação entre concentrações de Imunoglobulinas da saliva e os Índices CPO, PMA e Fluxo Salivar.

VARIÁVEIS	COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO	VALOR DE t
CPO e IgG	0,203	0,85
PMA e IgG	0,449	2,11*
FLUXO e IgG	-0,137	-0,58
CPO e IgA	0,080	0,33
PMA e IgA	0,256	1,11
FLUXO e IgA	-0,148	-0,63

\* O asterístico indica significância ao nível de 5%

TABELA 4 - Correlação entre as concentrações de Imunoglobulinas na placa dental e os índices CPO, PMA e IHOS.

VARIÁVEIS	COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO	VALOR DE t
CPO e IgG	-0,222	-0,90
PMA e IgG	0,505	2,46*
IHOS e IgG	-0,293	-1,39
CPO e IgA	-0,425	-1,98
PMA e IgA	-0,147	-0,15
IHOS e IgA	-0,251	-1,09

\* O asterístico indica significância ao nível de 5%.

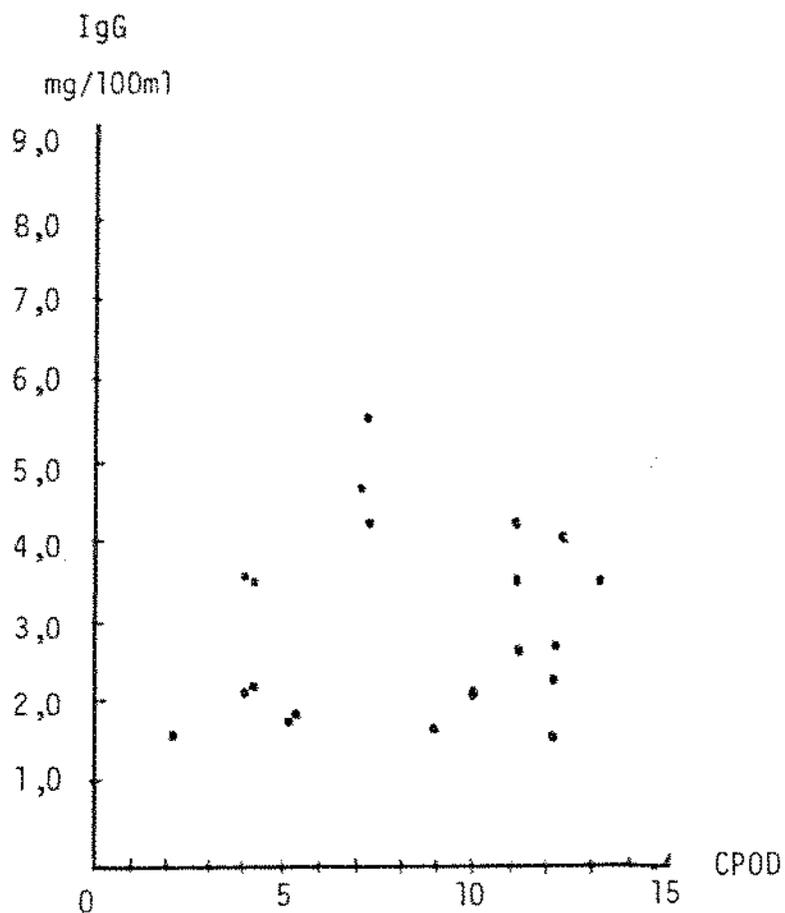


GRÁFICO 1 - Diagrama de dispersão para as variáveis CPOD e IgG, obtidas em saliva.

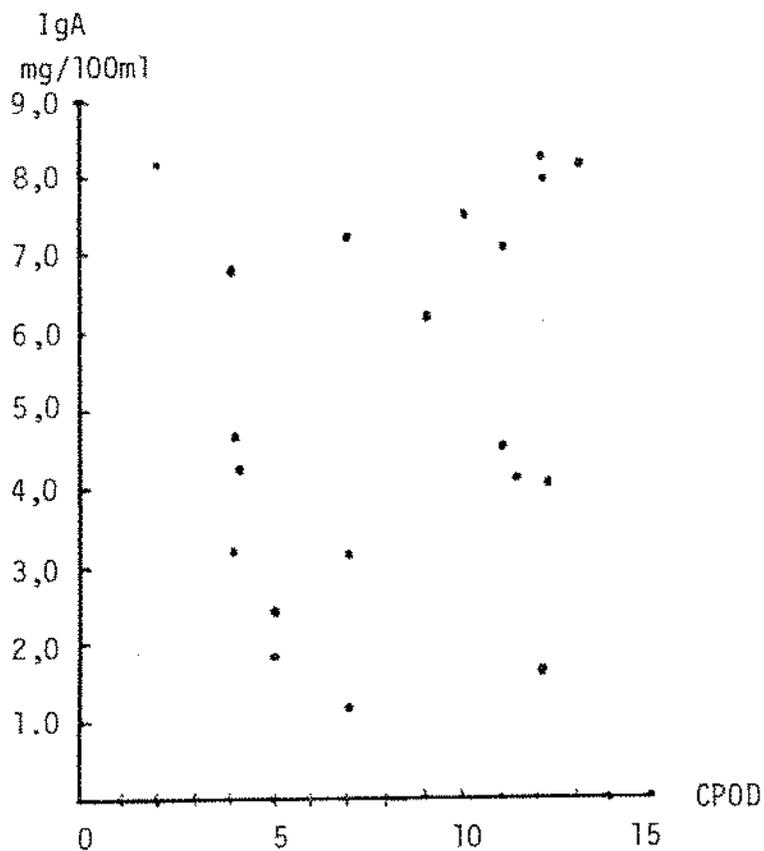


GRÁFICO 2 - Diagrama de dispersão para as variáveis CPOD e IgA, obtidas em saliva.

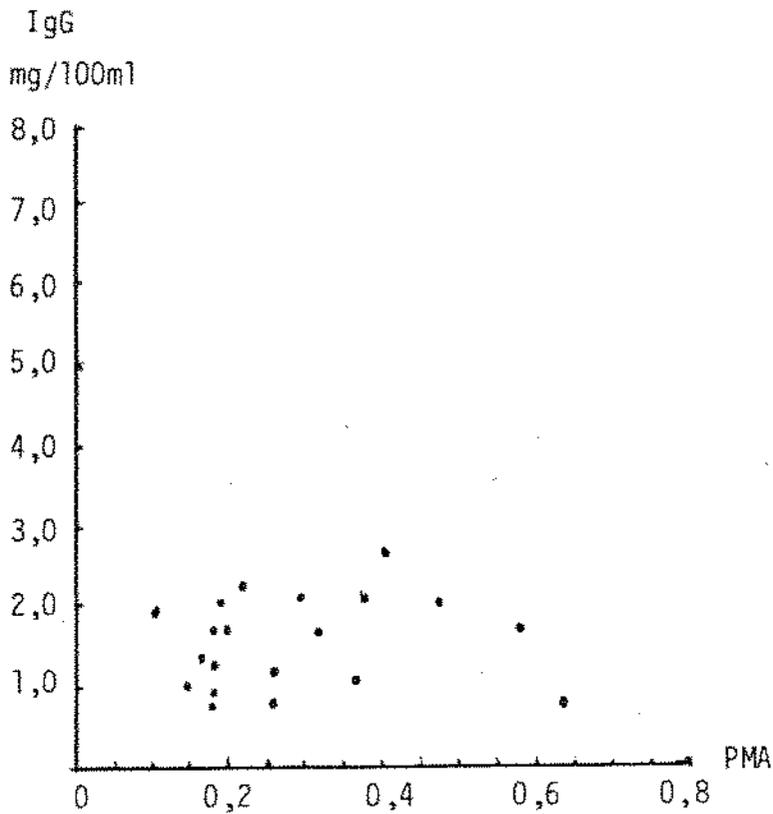


GRÁFICO 3 - Diagrama de dispersão para as variáveis PMA e IgG, obtidas em saliva

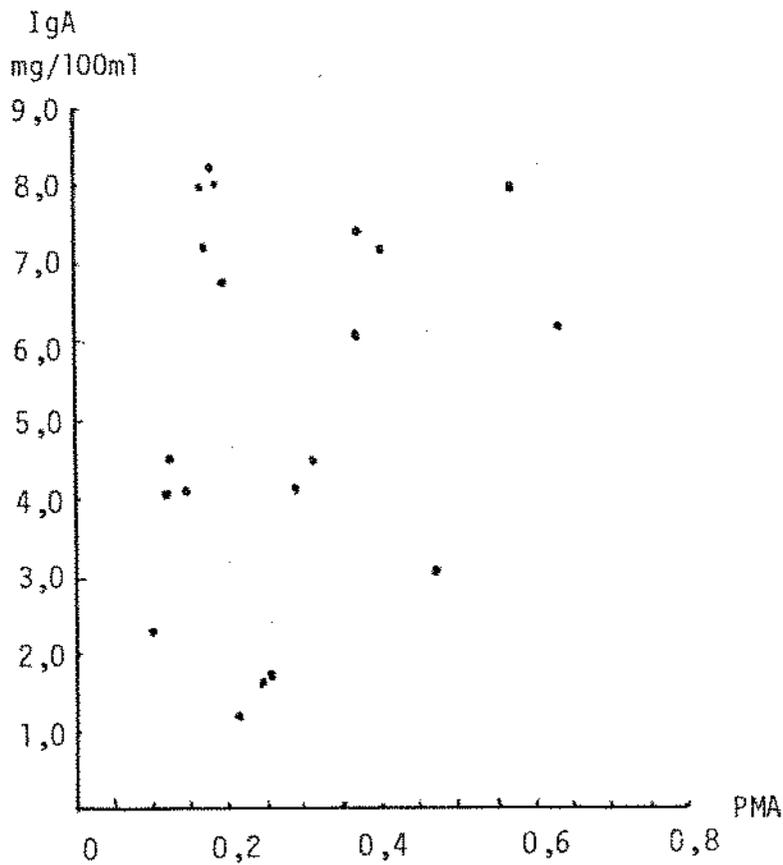


GRÁFICO 4 - Diagrama de dispersão para as variáveis PMA e IgA, obtidas em saliva.

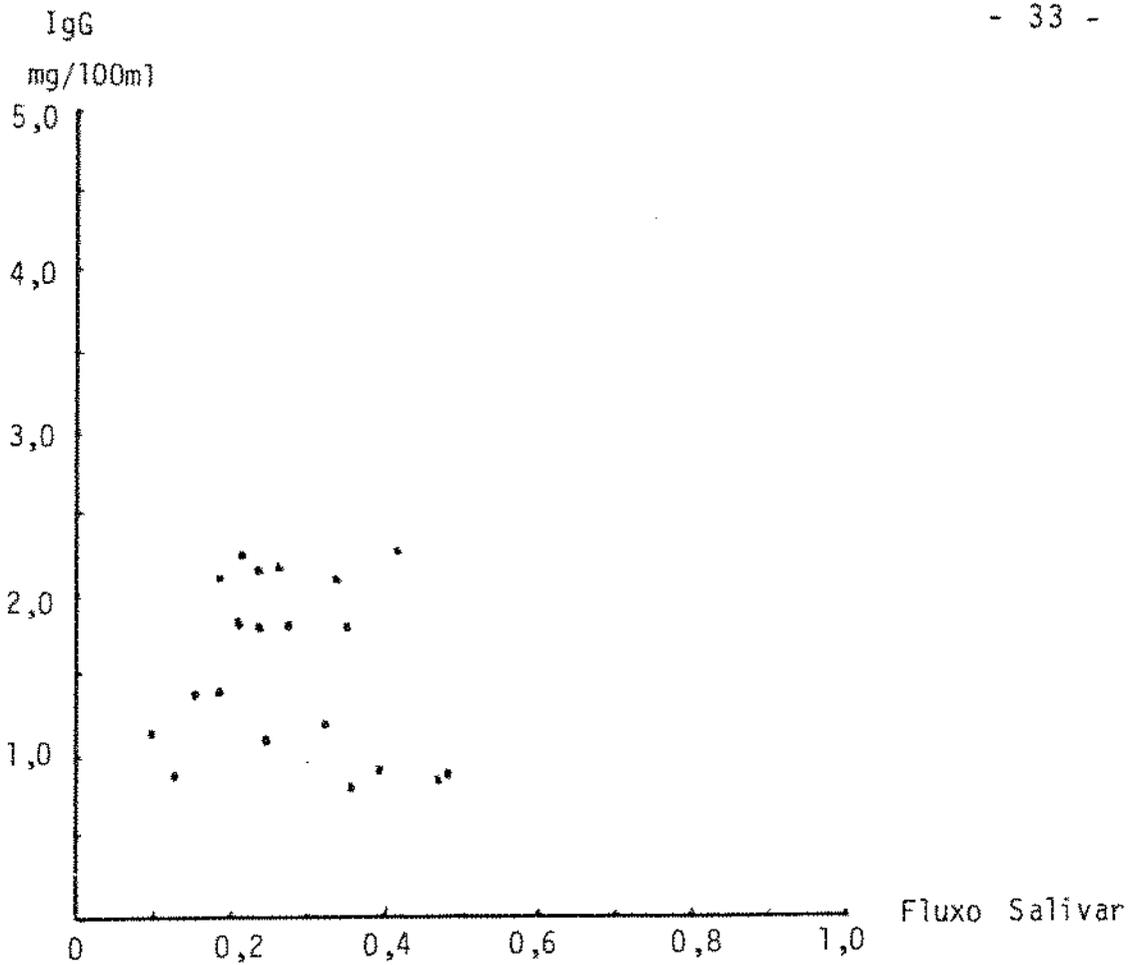


GRÁFICO 5 - Diagrama de dispersão para as variáveis Fluxo Salivar e IgG, obtidas em saliva.

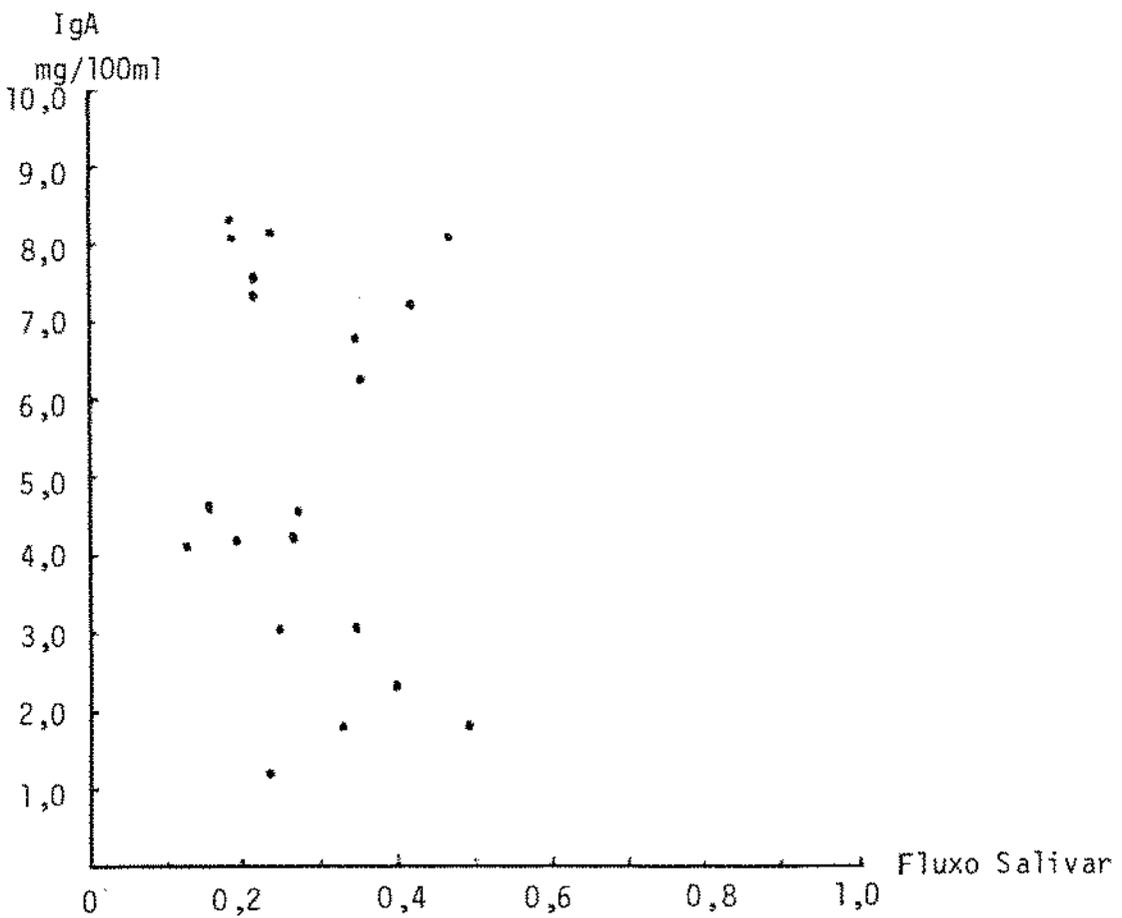


GRÁFICO 6 - Diagrama de dispersão para as variáveis Fluxo Salivar e IgA, obtidas em saliva.

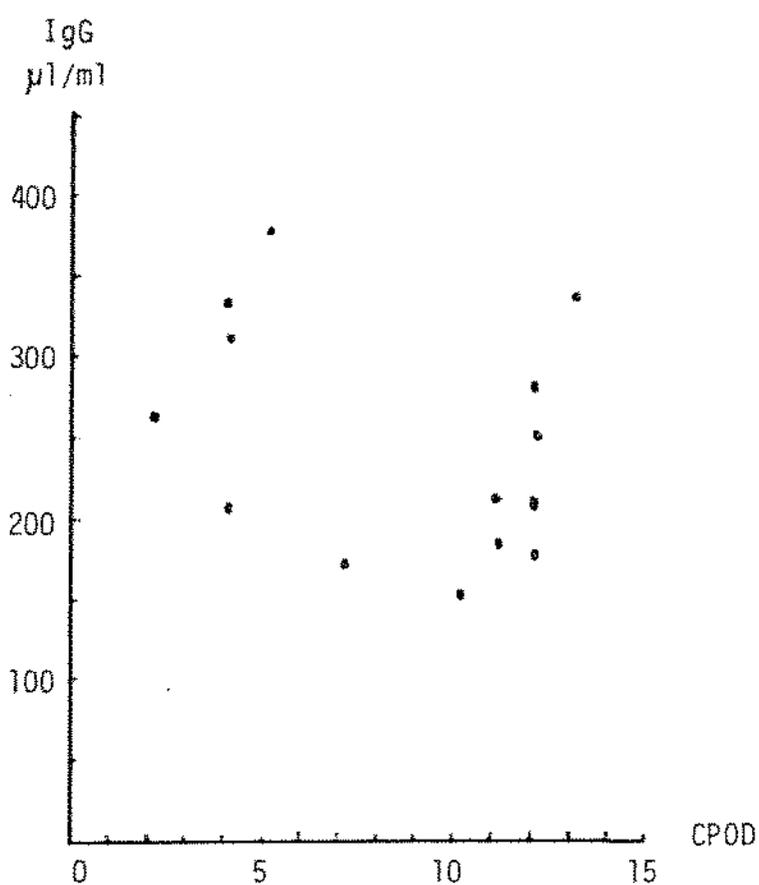


GRÁFICO 7 - Diagrama de dispersão para as variáveis CPOD e IgG, obtidas em placa dental.

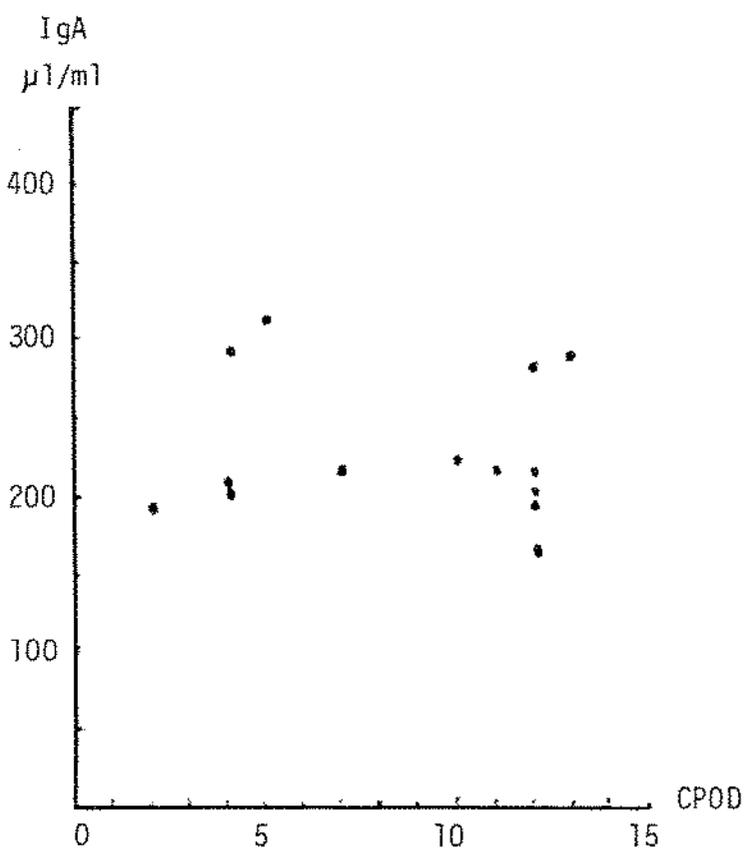


GRÁFICO 8 - Diagrama de dispersão para as variáveis CPOD e IgA, obtidas em placa dental.

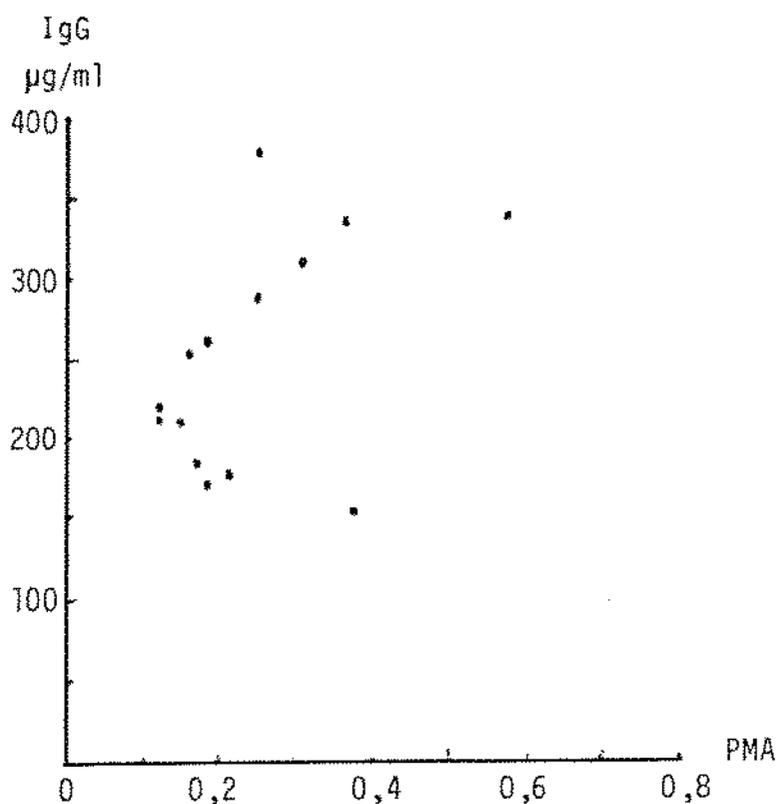


GRÁFICO 9 - Diagrama de dispersão para as variáveis PMA e IgG, obtidas em placa dental.

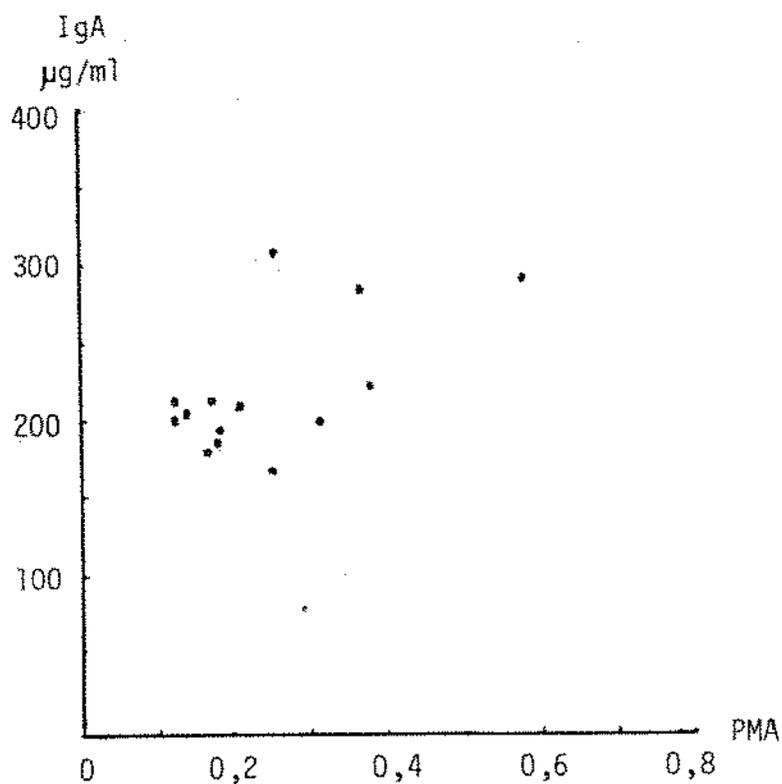


GRÁFICO 10 - Diagrama de dispersão para as variáveis PMA e IgA, obtidas em placa dental.

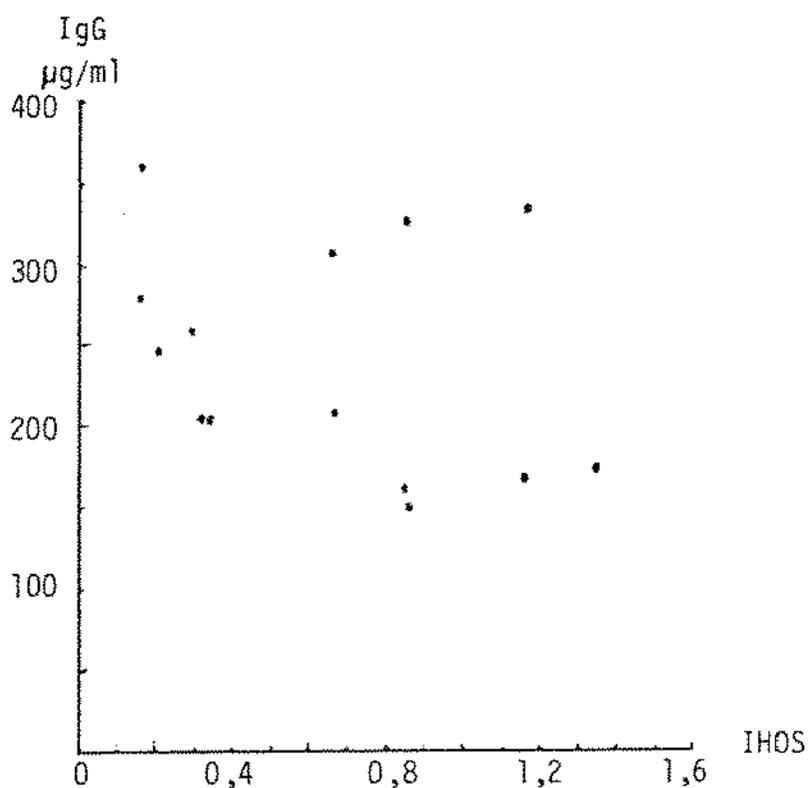


GRÁFICO 11 - Diagrama de dispersão para as variáveis IHOS e IgG, obtidas em placa dental.

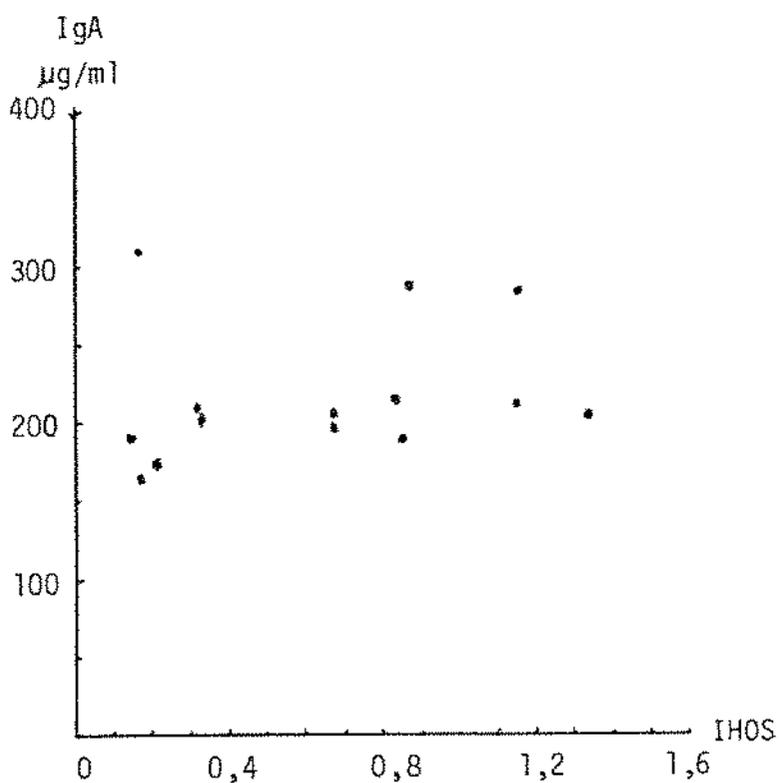


GRÁFICO 12 - Diagrama de dispersão para as variáveis IHOS e IgA, obtidas em placa dental.

## CAPÍTULO VI - DISCUSSÃO

## 6. DISCUSSÃO

As imunoglobulinas da saliva e do soro parecem desempenhar um papel importante na imunidade que se desenvolve em algumas doenças da boca, sobretudo a cárie dental e as alterações periodontais; isso porque a saliva banha continuamente os dentes e demais regiões da cavidade oral e as imunoglobulinas séricas são encontradas tanto no sulco gengival (HOLBERG & KILLANDER, 1971; SHILLITOE & LEHNER, 1972) como na saliva integral (BRANDTZAEG et al., 1970).

Na análise dos dados que obtivemos, as quantidades de imunoglobulinas determinadas em relação aos diversos itens estabelecidos, na saliva e na placa dental, só puderam ser comparadas em alguns aspectos. Os trabalhos revistos fornecem-nos dados comparativos com os processos de cárie, doença periodontal e fluxo salivar, mas não como índice de higiene oral. Além disso há uma discrepância com relação ao material analisado, seu tratamento e modo de coleta, padrões séricos empregados e metodologia na determinação das concentrações de imunoglobulinas.

Com relação à cárie dental, LEHNER et al (1967) verificaram que os indivíduos com elevado índice de cárie apresentavam maiores níveis de IgA sérica que aqueles de menor índice, embora essa diferença não fosse estatisticamente significativa. CHALLACOMBE (1976), confirmou os resultados acima referidos, assinalando, ainda, que encontrou correlação positiva com a IgA do soro, fato não reportado até então.

Imunoglobulinas na saliva de parótida e saliva integral têm sido investigadas. Assim, LEHNER et al (1967) e ZENGO et al (1972), verificaram que o título de IgA de saliva integral era alto em pessoas com pequeno número de cáries. Resultados opostos foram assinalados por SERRE et al (1972) e EVERHAT et al (1972), que referiram elevados títulos de IgA em indivíduos com grande número de cáries. Finalmente, SHKLAIR et al (1969) não verificaram qualquer tipo de correlação.

Como se pode observar, as afirmações dos autores cujos trabalhos foram consultados são conflitantes. De acordo com as Tabelas 1 e 2, os resultados que obtivemos permitem-nos deduzir que existe uma correlação positiva entre o índice CPO e as imunoglobulinas IgG e IgA, embora não significativa. Com relação a IgG salivar não encontramos dados que nos relatassem a ocorrência em maior ou menor quantidade paralelamente ao número de dentes acometidos pela cárie. As referências mais numerosas prendem-se à IgA e nesse particular os nossos dados corroboram parcialmente as afirmações de LEHNER et al (1967) e ZENGO et al (1972).

Ainda através das mesmas tabelas é possível verificar que ocorre uma relação positiva entre o índice PMA e

as imunoglobulinas investigadas, ou seja, quanto maior a incidência de gengivites, maiores os títulos de IgG e IgA. Estes nossos resultados coincidem com os de BRANTZÆG et al (1970) e LINDSTRON & FOLKE (1973). Todavia, os autores empregaram saliva integral estimulada ou não ou ainda secreção individual o que sem dúvida nenhuma dificulta a comparação direta dos resultados. Embora a correlação para a IgA não seja significativa, verifica-se que ela é estatisticamente significativa ao nível de 5% para a IgG. Esse fato é perfeitamente compreensível, diante das afirmações de vários pesquisadores de que a maior parte da IgG da saliva se origina no sulco gengival. Segundo SHILLITOE & LEHNER (1972), essa imunoglobulina está presente em quantidades elevadas no fluido do sulco gengival de pessoas com doença periodontal, embora tais níveis sejam menores que aqueles existentes no soro sanguíneo. Parece que as quantidades de IgG no líquido do sulco gengival depende das reações imunes dependentes de complemento (SHILLITOE & LEHNER, 1972).

O fato de termos detectado IgG na saliva de todas as crianças examinadas coincide com as observações de LEHNER (1969a), que também a encontrou em todas as amostras de saliva integral que examinou embora o mesmo não ocorresse na secreção das parótidas.

Com relação a IgA e alterações gengivais os trabalhos consultados diferem também em suas conclusões. Em 1973, LINDSTROM & FOLKE relataram não ter encontrado diferenças na concentração de IgA de pessoas sadias e aquelas portadoras de problemas do periodonto. Contrariando tais resultados BRANTZÆG et al (1970) referiram que a concentração de IgA na

saliva integral era bem maior nas pessoas doentes. Mostraram que esse aumento era devido não somente a IgA de coeficiente 7 S do sulco gengival, mas principalmente a IgA secretada - (11 S) pelas glândulas salivares.

Os dados que obtivemos parecem concordar com os do autor acima referido, pois indicam uma correlação positiva entre o índice de gengivite e os níveis de IgA, embora não estatisticamente significante. Acreditamos que quantidades - mais elevadas de IgA devam ser produzidas como resposta a um maior estímulo antigênico representado por agregados bacterianos, que em contacto com a mucosa oral representa um sistema de agressão variável na sua patogenicidade, porém, permanente.

Os resultados e conclusões diferentes dos pesquisadores se devem em grande parte às variações de métodos empregados nas suas investigações. A inconsistência dos dados sobre os teores de imunoglobulinas secretoras podem ser, em parte, devida ao fluxo salivar que, em muitos casos, não é considerado. Para eliminar essa variável alguns autores tem procurado expressar as quantidades de IgA em mg/100 do total de proteínas pelo fato de que a secreção da parótida, obtida por estímulo gustatório, realmente apresenta maior conteúdo proteico que a saliva obtida sem estímulo. No entanto, a IgA de parótida na secreção obtida através de estímulo diminui cerca de 3 a 4 vezes na sua concentração, insuficiente pois, para competir com o fluxo salivar (BRANDTZAEG, 1971). O mesmo fato foi observado com a secreção das glândulas submaxilares (MANDEL & KHURANA, 1969).

As nossas observações indicam, à semelhança dos autores citados, que também na saliva integral, não estimu-

lada, ainda assim as quantidades dos anticorpos pesquisados mostram uma correlação negativa com o fluxo, ou seja, quando este aumenta a concentração daqueles diminui, todavia tais variações não são significantes. As concentrações relativamente elevadas de IgA na saliva não estimulada favoreceram-nos a suposição de que ela desempenha importante papel nos mecanismos de defesa da mucosa oral.

O papel da placa como fator etiológico da cárie dental e doença periodontal tem sido reconhecido pelos pesquisadores; como tal, tem-se procurado conhecer seus componentes específicos.

A presença de imunoglobulinas em placa dental não tem sido convenientemente investigada, contudo, alguns autores relataram sua ocorrência empregando técnicas diversas.

Bactérias da placa ligadas a IgA foram evidenciadas através da imunofluorescência direta (BRANTZAEG et al, 1968). Ainda pela mesma técnica foi possível verificar que placa residual aderente a gengiva, com processos inflamatórios, reagia com soros anti-IgG e IgA marcados pela fluoresceína (PLATT et al, 1970).

As proteínas presentes na saliva ou no líquido do sulco gengival foram demonstradas também na placa (TOMASI et al, 1965).

Com relação a determinação das quantidades de IgG e IgA em placa encontramos na literatura apenas o trabalho de TAUBMAN (1974); por esse motivo seguimos a mesma metodologia empregada pelo autor com a finalidade de determinar os níveis dessas mesmas imunoglobulinas nas crianças estudadas. Algumas variações de técnica foram empregadas; assim, p. ex. o autor colheu material de placa de vários indivíduos ,

misturou-os e deu a essas misturas a designação de placa 1, repetindo-se o mesmo para as placas 2, 3 e 4. Na verdade, não representam elas o conteúdo de imunoglobulinas de um só paciente mas de 18, 30, 60 e 130 pessoas, respectivamente. Nós procedemos de maneira diferente. Colhemos material de placa de cada criança, semanalmente, armazenando-o em "freezer", até que o total nos fornecesse ao menos cerca de 500mg de material seco. Dessa forma, pudemos obter valores individuais de imunoglobulinas para compará-los com os índices próprios de cada criança.

No seu trabalho, TAUBMAN (1974), procurou determinar as imunoglobulinas específicas da placa a fim de obter evidências que pudessem indicar a origem e a função das mesmas. Através da difusão em gel encontrou IgA e IgG mas não IgM.

Empregando extratos de placas em solução salina tampão-fosfato conseguimos detectar as referidas imunoglobulinas em quantidades variáveis para cada criança examinada. Além dessa particularidade, em virtude do critério adotado, pudemos relacionar as concentrações de tais anticorpos com os índices propostos.

A análise dos nossos resultados mostra uma correlação negativa entre o índice CPO e as imunoglobulinas IgG e IgA, maior para esta última, todavia sem significância estatística.

Segundo alguns autores (WILLIAMS & GIBBONS, 1972), parece que tais anticorpos agem como fatores reguladores da flora bacteriana dos tecidos moles ou dos dentes. Segundo TAUBMAN (1974) seria difícil atribuir tal função à presença de imunoglobulinas na placa. De acordo com suas verificações a

maior parte da IgG de placa se apresentaria degradada, em virtude dos enzimas proteolíticos da placa, em um fragmento de peso molecular 27.000, semelhante ao determinante antigênico Fc. Dessa maneira ela não teria a função de anticorpo, propriedade que caracteriza os fragmentos Fab. Todavia, no entender de CHALACOMBE et al (1978), a IgG poderia passar intacta do soro para o sulco gengival. Foi sugerido também (LEHNER et al, 1975), que os anticorpos do sulco gengival poderiam exercer um efeito protetor contra as cáries de superfícies lisas, por banharem continuamente a superfície do esmalte dos dentes, a partir da margem gengival.

A IgA secretora seria mais resistente à degradação por parte de tais enzimas que a IgA sérica (STEWART, 1971); nestas condições ela manteria as suas propriedades de anticorpo.

A correlação não significativa, obtida entre as quantidades das duas imunoglobulinas e o índice CPO, não nos permitem afirmar que as mesmas exerçam uma função limitante do processo carioso.

A comparação do índice de gengivite com as quantidades de IgG evidenciou um aumento das mesmas, embora em concentrações estatisticamente significantes, quando a incidência de gengivite foi maior. Este fato parece confirmar-se pelos estudos mais recentes que indicam que os anticorpos séricos ganham acesso à placa via fluido gengival; a passagem de IgG intacta do soro para esse fluido gengival foi recentemente demonstrado por CHALLACOMBE & LEHNER (1978), o que contesta as afirmativas de TAUBMAN (1974). Com relação a IgA verificou-se uma correlação inversa; na saliva, vários autores

demonstraram que a IgA aumenta com a intensidade da doença pe  
riodontal (ØRSTAVIK & BRADTZAEG, 1975), embora tenham inves-  
tigado concentrações da referida imunoglobulina em secreção  
de parótida.

Outros autores não encontraram correlação, usan-  
do saliva integral; é bem verdade que as técnicas empregadas  
são bastante variadas (LINDSTROM & FOLKE, 1968). Na gengiva  
inflamada, todavia, foi demonstrada IgA em quantidades signi-  
ficantes (PLATT at al, 1970; GENCO at al, 1974); no en-  
tanto, a demonstração de que ela seria específica para anti-  
genos da placa não foi possível demonstrar de uma maneira  
conclusiva (BERGLUND, 1971; MAYRON & LISELLE, 1973).

Finalizando, o nosso trabalho mostrou que ocor-  
re uma relação inversa entre IgG e IgA e o índice de higiene  
oral. Parece que esse resultado é evidente, pois a remoção  
de material de placa parece conduzir a uma diminuição da flo-  
ra componente da mesma e, portanto, a uma menor solicitação  
imunológica do hospedeiro.

Falariam a favor dessa argumentação o fato de  
que anticorpos específicos para bactérias de placa foram de-  
monstrados por CHALLACOMBE & LEHNER (1976); ØRSTAVIK & LEH-  
NER (1978); na borda gengival de placa, NEWMAN (1975), evi-  
denciou a presença de células lisadas, sugerindo uma ativida-  
de de anticorpo específico que ocorreria nessa região. Ainda  
é fato conhecido que os microrganismos de placa atuam sobre  
os tecidos periodontais através de produtos de seu metaboli-  
smo, embora sua presença na intimidade dos mesmos não tenha  
sido evidenciada. Conclui-se que através de uma higiene oral  
adequada consiga-se reduzir o inóculo representado por bactē-  
rias ou seus produtos a um índice de agressão menor com pro-

dução de menores quantidade de anticorpos, embora não se possa tecer considerações precisas sobre as implicações que as quantidades de imunoglobulinas determinadas possam ter em relação ao índice de higiene oral.

## CAPÍTULO VII - CONCLUSÕES

## 7. CONCLUSÕES

Analisados os resultados obtidos, as seguintes conclusões podem ser sumarizadas:

1) Na saliva, os níveis de IgA e IgG, aumentaram com os índices de gengivite e CPOD;

2) As concentrações dos referidos anticorpos diminuem quando ocorre um aumento do fluxo salivar e vice-versa;

3) Na placa dental observou-se que, tanto a IgG como a IgA estão inversamente relacionadas com os índices CPO e de higiene oral;

4) Constatou-se um aumento de IgG significativo na placa dental em presença de alterações do periodonto, ao passo que a IgA, ao contrário, mostrou uma correlação negativa face às mesmas alterações;

5) A correlação entre a concentração de IgG na saliva e o índice de gengivite é positiva e estatisticamente significativa ao nível de 5%.

CAPÍTULO VIII - SUMMARY

## 8. SUMMARY

The presence of immunoglobulins in saliva and dental plaque seems to be linked to immune response triggered by antigens from oral microorganisms.

Some authors quantitated the levels of antibodies in saliva and dental plaque, specially IgG and IgA, and correlated the results with the incidence of caries and periodontal disease.

The present investigation had similar objectives, but also tried to add new data such as the correlation between oral hygiene and level immunoglobulins, and between immunoglobulins and saliva flow. The results also took in consideration the caries and gingival index.

The level of antibodies was measured from samples of saliva and dental plaque collected from 20 children, of both sexes, aged 10 to 15 years old.

After the necessary technical procedures 20  $\mu$ l of plaque or saliva samples were put in holes of immunoplates for the measurement of IgG and IgA by the immunodiffusion

technic (immunoplates accupack Behring).

The results were statistically treated to determine the correlation coefficient with the proposed indexes. The level of significance of these coefficients was calculated using the t test (Student).

The results suggest that in saliva the levels of IgA and IgG, specially the last, increase with the gingival and caries indexes, but decreases with the increase of saliva flow.

In dental plaque the studied immunoglobulins showed an inverse correlation with the oral hygiene and caries indexes. On the other hand IgG increased with gingival index, but IgA decreased.

The variations of antibodies measured in this work were not statistically significant, except the level of IgG in saliva and in plaque in relation to gingival index.

CAPÍTULO IX - RESUMO

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

## 9. RESUMO

A presença de imunoglobulinas na saliva e placa dental parece estar ligada a respostas imunológicas induzidas pelo estímulo de substâncias antigênicas representadas, principalmente, pelos microrganismos encontrados na boca e órgãos anexos.

A quantificação dos anticorpos aí presentes, sobretudo IgG e IgA, tem sido feita por alguns autores, que procuraram correlacionar os níveis determinados de tais proteínas com a incidência de cárie e doenças periodontais.

A presente investigação teve objetivos semelhantes, procurando acrescentar alguns dados a mais como a correlação entre os teores dessa imunoglobulinas e o índice de higiene oral, índice de cárie, índice de gengivite e fluxo salivar.

Com essa finalidade estudamos a saliva e material de placa de 20 crianças, de faixa etária de 10 a 15 anos, de ambos os sexos.

Após o tratamento das amostras de placa e de saliva, alíquotas de 20 ul das mesmas foram colocadas em orifí

cios de placas de imunodifusão (Immunoplates accupack Behring) adequadas para a determinação de quantidades variáveis de IgG e IgA.

Após a leitura dos resultados foram tratados estatisticamente para determinar-se os coeficientes de correlação com os índices propostos, verificando-se o nível de significância desses coeficientes através do teste t (Student).

As conclusões tiradas da análise feita permitem nos sugerir que na saliva, os níveis de IgG e de IgA, sobretudo da primeira, aumentam com o índice de gengivite e o índice de CPOD, mas diminuem quando ocorre aumento do fluxo salivar.

Na placa dental os dois tipos de Imunoglobulinas referidos estão inversamente relacionados com os índices de cárie e de higiene oral, sendo que a IgG aumentou em presença de alterações periodontais e a IgA mostrou correlação negativa face às mesmas alterações. As variações assinaladas, todavia, não são estatisticamente significantes, com exceção de IgG de saliva e placa em relação aos índices de gengivite.

CAPÍTULO X - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALANSMITH, M.; WYMER, B. & PRIETO, G. Repeated immunoglobulin determination in 15 individuals over a 6 month period. J. Allergy, 37: 114. Abst. 1966.
2. BERGLUND, S.E. Immunoglobulins in human gingiva with specificity for oral bacteria. J. Periodontol., 42: 546-51, 1971.
3. BRANDTZAEG, P. Human secretory immunoglobulins. VII- concentration of parotid IgA and other secretory proteins in relation to the rate of flow and duration of secretory stimulus. Archs. oral Biol., 16: 1295-310, 1971.
4. \_\_\_\_\_; FJELLANGER, I. & GJERULDSEN, S.T. Adsorption of immunoglobulin A onto oral bacteria in vivo. J. Bact., 96: 242, 1968b.
5. \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Human secretory immunoglobulins. I- Salivary secretions from individuals with normal or low levels of serum immunoglobulins. Scand. J. Haematol. (suppl.), 12: 4, 1970.

6. CHANDLER, D.C.; SILVERMAN, M.S.; LUNDBLAD, R.L. & McFALL, W.T. Human parotid IgA and periodontal disease. Arch. oral Biol., 19: 733-5, 1974.
7. CHALLACOMBE, S.J. Immunoglobulins in parotid saliva and serum in relation to dental caries in man. Caries Res., 10: 165-77, 1976.
8. \_\_\_\_\_ & LEHNER, T. Serum and salivary antibodies to cariogenic bacteria in man. J. Dent. Res., 55: C139 - C148, 1978.
9. \_\_\_\_\_; RUSSEL, M.W. & HAWKES, J.E. Passage of intact IgG from plasma to the oral cavity via crevicular fluid. Clin. Exp. Immunology. in NEUMAN, H.N.; SEYMOUR, G.J. & CHALLACOMBE, S.J. Immunoglobulins in human dental plaque. J. Periodontal Res., 14: 1-9, 1979.
10. CHORDIRKER, W.B. & TOMASI, T.B. Quantitative relations - hips in human serum and non-vascular fluids. Science, 142(3595): 1080-1, 1963.
11. CLAMAN, H.N.; MERRIL, D.A. & HARTLEY, T.F. Salivary immunoglobulins. Normal adult values and dissociation between serum and salivary levels. J. Allergy, 40: 151, 1967.
12. DREVON, B. & DONIKIAN, R. Sur les protéines de la salive parotidienne humaine. C.R.Soc.Biol., 150: 1206-8, Paris, 1956.
13. ELLISON, S.A.; MASHINO, P.A. & MANDEL, I.D. Immunochemical studies of human saliva. I. The demonstration of serum proteins in whole and parotid saliva. J. Dent. Res., 39: 892-8, 1960.

14. EVERHART, D.L.; GRIGSBY, W.R. & CARTER, W.H.Jr. Evaluation of dental caries experience and salivary immunoglobulins in whole saliva. J. Dent. Res., 51: 1487 - 91, 1972.
15. FRETER, R. Mechanism of action of intestinal antibody - in experimental cholera. II. Antibody-mediated antibacterial reaction at the mucosal surface. Infect.Immun., 2: 556, 1970.
16. GENCO, K.J. & TAUBMAN, M.A. Secretory IgA antibodies induced by local immunization. Nature, 221: 679, 1969.
17. \_\_\_\_\_; MASHIMO, P.A.; KRYGIER, G. & ELLISON, S.A. Antibody-mediated effects on the periodontium. J.Periodontol, 45: 330-7, 1974.
18. GÖTZE, O. & MULLER-EBERHARD, H.J. The C<sub>3</sub>-activator system: an alternate pathway of complement activation. J.Exp. Med., 134 suppl., 90, 1971.
19. GREENE, J.C. & VERMILLION, J.R. The simplified oral hygiene index. J. Am. dent. Ass., Chicago, 68: 1-13 , 1964.
20. HEREMANS, J.F.; VAERMAN, J.P. & VAERMAN, C. Studies on the immune globulins of human serum II. A study of the distribution of anti-Brucella and anti-Diphtheria antibody activities among  $\gamma_{SS}$ - ,  $\gamma_{Im}$ - and  $\gamma_{1a}$ - globulin fractions. J. Immunol., 91: 11, 1963.
21. HOLMBERG, K. & KILLANDER, J. Quantitative determinations of immunoglobulins IgG, IgA and IgM and identification of IgA-type in the gingival fluid. J. Periodont.Res., 6: 1-8, 1971.

22. HOLT, R.L. & MESTECKY, J. Studies on human dental plaque. Immunochemical characteristics. J. Oral Pathol., 4: 86-95, 1975.
23. ISHIZAKA, K.; DENNIS, E.G. & HORN BROOK, M. Presence of reagin and  $\gamma_1$ a-globulin in saliva. J. Allergy, 35 : 143, 1965.
24. KLEIM, H. & PALMER, C.E. Dental caries in American Indian children. Publ. Hlth. Bull., Wash., 239: 1-41, 1937.
25. KRAMER, I.R.H. & RAMANATHAN, K. The investigation of deposits on the surface of human enamel by means of a fluorescent antibody technique. Archs. oral Biol., 11: 1047-8, 1966.
26. LEHNER, T.; CARDWELL, J.E. & CLARRY, E.D. Immunoglobulins in saliva and serum in dental caries. Lancet, I. 1294-7, 1967.
27. \_\_\_\_\_. Immunoglobulin abnormalities in ulcerative gingivites. Brit. dent. J., 127: 165, 1969a.
28. \_\_\_\_\_; CHALLACOMBE, S.J. & CALDWELL, J. An immunological investigation into the prevention of caries in deciduous teeth of Rhesus monkeys. Archs. oral Biol., 20: 305-10, 1975.
29. LINDSTROM, F.D. & FOLKE, L.E.A. Salivary IgA in periodontal disease. Acta odont. Scand., 31: 31-4, 1973.
30. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-75, 1951.

31. MANDEL, I.D. & KHURANA, H.S. The relation of human salivary YA globulin and albumin to flow rate. Arch.oral Biol., 14: 1433, 1969.
32. MANCINI, G.; CARBONARA, A. & HEREMANS, J.P. Immunochemical quantitation of antigens by radial immunodiffusion. Immunochemistry, 2: 235-9, 1965.
33. MAYRON, L.W. & LOISELLE, R.J. Bacterial antigens and antibodies in human periodontal tissues. J. Periodontology, 44: 164-6, 1973.
34. MESTECKY, J.; KRAUS, F. & VOIGHT, S. Proportion of colostrum immunoglobulin-molecules containing secretory determinant. Immunology, 18: 237, 1970.
35. NEWMAN, H.N. The gingival border of plaque. Morphological studies in 8 to 15 year old children. Br. Dent. J., 138: 335-45, 1975.
36. \_\_\_\_\_; SEYMOUR, G.J. & CHALLACOMBE, S.J. Immunoglobulins in human dental plaque. J. Periodontal Res., 14: 1-9, 1979.
37. OGRA, P.L.; KARZON, D.T.; RICHTHAND, F. & MacGILLIVRAY, M. Immunoglobulin response in serum and secretions - after immunization with live and inactivated poliovaccine and natural infections. New Eng. J. Med., 279: 893, 1968.
38. OLSON, G.A.; BLEIWEIS, A.S. & SMALL, P.A. Adherence inhibition of Streptococcus mutans: an assay reflecting a possible role of antibody in dental caries prophylaxis. Infect. Immun., 5: 419, 1972.

39. ØRSTAVIK, D. & KRAUS, F.W. The acquired pellicle, imuno fluorescent demonstration of specific proteins. J. oral Path., 2: 68-76, 1973.
40. \_\_\_\_\_ & BRANDTZAEG, G.P. Serum antibodies to plaque bacteria in subjects with dental caries and gingivitis. Scand. J. Dent. Res., 85: 106-13, 1977.
41. PLATT, D.; CROSBY, R.G. & DALBOW, M.H. Evidence for the presence of immunoglobulins and antibodies in inflamed periodontal tissues. J. Periodont., 41: 215-22, 1970.
42. SANARELLI, G. Der menschliche speichel und die pathogenen mikroorganismen der mundhöhle; Centralbl Bakteriöl. und Parasitenkunde, 10: 817, 1892 in TAUBMAN, M.A. and SMITH, D. J. Secretory immunoglobulins and dental disease.
43. SCHWARTZ, H. & GIBSON, W.A. Immunogluorescent demonstration of IgG, IgM and IgA, in human dental plaque. I. A.D.R. Abst., 52: 139, 1973.
44. SERRE, A.; BENFREDJ, G. & LEVY, D. Les immunoglobulins A salivaires. Étude des correlations avec les indices de carie et de quelques facteurs de variabilité de résultats. Revue Immunolog. Ther. antimicrob., 36: 47-54, 1972.
45. SEYMOUR, G.J. & GREENSPAN, J.G. The phenotypic characterization of lymphocyte subpopulations in established human periodontal disease. In NEWMAN, H.N.; SEYMOUR, G. J. and CHALLACOMBE, S.J. Immunoglobulins in human dental plaque. Periodontal Res., 14: 1-9, 1979.

46. SHILITOE, E.J. & LEHNER, T. Immunoglobulins and complement in crevicular fluid, serum and saliva in man. - Archs. oral Biol., 17: 241-7, 1972.
47. SHKLAIR, I.L.; ROVELSTAD, G.M. & LAMBERTS, B.C. A study of some factors influencing phagocytosis of cariogenic streptococci by caries-free and caries-active individuals. J. dent. Res., 48: 842-5, 1969.
48. SHOUR, I. & MASSLER, M. Gingival disease in postwar Italy (1945): I. Prevalence of gingivites in various age groups. J. Am. dent. Res., Chicago, 35: 475-82, 1947.
49. SOOTHIL, J.F. Estimation of eight serum proteins by a gel diffusion precipitin technique. J. Lab. clin. Med., 59: 859-70, 1966.
50. STEWARD, M.W. Resistance of rabbit secretory IgA to proteolysis. Biochim. biophys. Acta, 236: 440-9, 1971.
51. STOFFER, H.R.; KRAUS, F.W. & HOLMES, A.C. Immunochemical identification of salivary proteins. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.), 111: 467, 1962.
52. TAUBMAN, M.A. Immunoglobulins of human dental plaque. Arch. oral Biol., 19: 439-46, 1974.
53. TOLEDO, B.E. Contribuição para o estudo da prevalência de gengivite em escolares da cidade de Araraquara, - brancos, nascidos no Brasil. Araraquara, 1964 (Tese de Doutorado - FFO).
54. TOMASI, T.B. & CARVALHO, N. Human secretory YA. Fed. - Proc., 27: 617, 1968.

55. TORCHISKY, J. Immunoglobulines sanguines et salivaires -  
dans les parodontopathies. Rev. Franc. Odonto-stomat.  
2: 223-36, 1970.
56. \_\_\_\_\_. Human gamma globulin Blood, 25: 382-403, 1965.
57. WILLIAMS, R.C. & GIBBONS, R.J. Inhibition of bacterial -  
adherence by secretory immunoglobulin A: mechanism of  
antigen disposal. Science, 177: 697-9, 1972.
58. ZENGO, A.N.; MANDEL, I.D.; GOLDMAN, R. & KHURANA, N.S. Sa  
livary studies in human caries resistance. Archs.oral  
Biol., 16: 557-60, 1972.