



1150016082



FOP

T/UNICAMP N17c

APARECIDO DO NASCIMENTO

CORRELAÇÕES ENTRE ASPECTOS CLÍNICOS, HISTOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS DA GENGIVITE CRÔNICA

Tese apresentada para o Concurso
de Livre Docência na Área de Clí-
nica Odontológica-Periodontia do
Departamento de Prótese e Perio-
dontia da Faculdade de Odontolo-
gia de Piracicaba da Universidade
Estadual de Campinas.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

BIBLIOTECA

T407

PIRACICABA
1981

Esta pesquisa foi realizada com o auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, processo 04-Biológicas 80/10297.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Neder, Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, exemplo de dinamismo e de dedicação à pesquisa, o qual sempre nos distinguiu com sua confiança.

Ao Prof. Dr. Luiz Valdrighi, Diretor Associado da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, de quem sempre recebemos todo apoio.

Ao Prof. Benecdito de Campos Vidal, que me distinguiu com a oportunidade de ingressar na carreira universitária e orientou minha formação científica.

Ao Prof. Dr. Lourenço Bozzo, Titular de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela substancial colaboração na programação e interpretação dos dados histopatológicos deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida, Livre Docente de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba que efetivamente contribuiu para a apresentação final deste trabalho.

Ao Sr. Antonio Kerches de Campos, pela colaboração na parte técnica histológica.

A Sra. Ivani do Carmo Guidolim Gerola, pela revisão de listagem Bibliográfica.

Ao Sr. Adário Cangiani pela execução das fotografias.

A todas as pessoas, que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

INDICE

INTRODUÇÃO	1
REVISTA DA LITERATURA	2
Sobre os Elementos do Sistema Imune no Fluido Gengival	2
Sobre Os Elementos do Sistema Imune no soro de Pacientes com Doença Periodontal Inflamatória Crônica	4
Sobre os Elementos do Sistema Imune no Tecido Gengival	6
MATERIAL E MÉTODO	17
RESULTADOS	22
Aspectos Histopatológicos	22
Gengivas com Índice Gengival = 0	22
Gengivas com Índice Gengival = 1	23
Gengivas com Índice Gengival = 2	24
Gengivas com Índice Gengival = 3	25
Imunofluorescência	26
FIGURAS	29
DISCUSSÃO	39

CONCLUSÕES	46
RESUMO	47
SUMMARY	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

INTRODUÇÃO

Antes da erupção dental, o tecido que envolve o epitélio reduzido do esmalte é, normalmente, livre de reações inflamatórias (MCHUGH 1961, MCHUGH 1963, ENGLER 1965). Imediatamente à erupção a junção dento-epitelial fica exposta à saliva, microrganismos, restos alimentares e influências mastigatórias (SCHROEDER 1970). Por causa disto, mesmo na gengiva clinicamente normal, ao exame microscópico, podem ser identificadas células próprias de uma reação inflamatória (ZACHINSKY 1954, ZACHRISSON & SCHULTZ-HAUDT 1968, SCHROEDER 1970, PAYNE et al. 1975). Esta condição decorre da presença constante de uma microbiota ou nível de placa dental considerado compatível com a normalidade gengival clínica (O'LEARY 1970, SOCRANSKY 1977).

Pesquisas em animais (LINDHE et al. 1975, SCHROEDER et al. 1975, HOPPS & JOHNSON 1976) e em humanos (LOE et al. 1965, HOLTHUIS 1977, BAEHNI et al. 1979, NORMAN et al. 1979, PATTERSON et al. 1979), demonstraram que o aumento dos níveis de placa dental e as modificações de sua composição (O'LEARY 1970, LISTGARTEN 1976) estão diretamente relacionados com o desenvolvimento da doença periodontal inflamatória crônica, que se manifesta com evidentes sinais clínicos de modificações de cor, contorno e textura da gengiva (STALLARD et al. 1970). Vários trabalhos descrevem os aspectos histopatológicos da doença periodontal (PAYNE et al. 1975, PAGE & SCHROEDER 1976). Nesta doença periodontal tem sido considerada a participação do sistema imune através das reações de imunidade celular (WILDE et al. 1977) e humoral (GENCO et al. 1974, MACKLER et al. 1978a).

Entretanto, não há concordância sobre os níveis de imunoglobulinas nos tecidos gengivais, nas várias condições clínicas da doença periodontal inflamatória crônica.

O objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência de imunoglobulinas em gengivas clinicamente normais e inflamadas, e correlacionar seus aspectos clínicos, histopatológicos e imunológicos.

REVISTA DA LITERATURA

REVISTA DA LITERATURA

Pesquisas clínicas levadas a efeito, segundo o modelo experimental preconizado por LÖE et al. (1965) demonstram que o acúmulo de placa dental induz a uma reação inflamatória gengival clinicamente observável - a gengivite crônica. Esta reação inflamatória do tecido gengival é atribuída à ação de componentes da placa dental, tais como enzimas (BAHN 1970, SNYDERMAN 1973), endotoxinas (BAHN 1970, MERGENHAGEN et al. 1970, SIMON et al. 1971, SNYDERMAN 1973), exotoxinas (BAHN 1970) e antígenos bacterianos (BAHN 1970, MERGENHAGEN et al. 1970, SNYDERMAN 1973, HORTON et al. 1974).

Segundo BRANDTZAEG (1973) dificilmente haverá qualquer processo patológico em evolução no organismo, que não envolva o sistema imune e a lesão periodontal não é uma exceção. E NISENGARD (1977) acrescenta que na patogênese e evolução da doença periodontal estão implicados os dois componentes da resposta imune, a imunidade mediada por células e a imunidade humoral.

SOBRE OS ELEMENTOS DO SISTEMA IMUNE NO FLUIDO GENGIVAL

A existência de um fluido na região do sulco gengival tem sido descrita em gengivas consideradas clinicamente normais de cães (BRILL & KRASSE 1958) e de humanos (BRILL & BJORN 1959, HATTING & HO 1980). Uma série de experimentos similares tendem a mostrar que o fluxo deste fluido origina-se na vascularização subjacente ao epitélio do sulco (LÖE & HOLM-PEDERSEN 1965, EGELBERG 1966), tem ínti

ma relação com a permeabilidade capilar (BRILL 1959) e passa do tecido conjuntivo sub-epitelial, por entre ou através das células do epitélio juncional (GRANT et al. 1972, BRANDTZAEG 1973, GOLDMAN & COHEN 1973, SCHLUGER et al. 1977).

BRILL & BRONNESTAM (1960) através de exame eletroforético de fluido colhido de sulco gengival humano, demonstraram que ele continha pelo menos sete diferentes proteínas do soro, entre as quais gama e beta globulina, podendo, assim exercer um efeito antibacteriano. Recentemente TOLLEFSEN & SALTVEDT(1980) estudaram os valores de várias proteínas do fluido, através de imunoeletroforese, e compararam com os valores do soro dos pacientes, concluindo que o fluido é exsudato inflamatório, de origem sérica, mas com a composição proteínica claramente modificada pelo meio local.

Considera-se que a gengiva normal, sem sinal de inflamação, não produz fluido gengival mensurável (OLIVER et al. 1969) e que o fluxo do fluido ou exsudação começa com a inflamação gengival (LOE & HOLM-PEDERSEN 1965) e é proporcional à sua severidade (GOLDMAN & COHEN 1973, HATTING & HO 1980).

Segundo SHAPIRO et al(1979)há íntima relação entre a quantidade de fluido do sulco e o índice clínico de inflamação gengival. Assim, o fluido do sulco passa a ser um aspecto indicativo da inflamação gengival (SCHENKEIN & GENCO 1977, HANCOCK et al. 1979) e considerado como um meio clínico disponível para estabelecer a distinção entre gengiva sã e inflamada (OLIVER et al. 1969).

As imunoglobulinas G, A e M estão no fluido gengi-

val de pacientes com doença periodontal, em níveis comparáveis BRANDTZAEG (1965) ou mais altos que no soro (SHILLITOE & LEHNER 1972).

Conforme SHILLITOE & LEHNER (1972) os dados indicam a ocorrência de uma reação imune complemento dependente no sulco gengival, favorecendo a classe de anticorpos IgG, de tal modo que a concentração relativa de IgG e de C'3 são mais baixas que as de IgM e IgA. Realmente em muitos pacientes pôde ser encontrada uma marcada diminuição em C'3 e C'4, sugerindo que o complemento pode ser ativado durante a inflamação gengival (SCHENKEIN & GENCO 1977). A grande quantidade de fluido gengival derivado do soro e contendo imunoglobulinas, que passa através do conjuntivo e tecido epitelial, possivelmente leve à formação de imune-complexos e à entrada de antígenos bacterianos (SCHLUGER et al. 1977).

NISENGARD & JARRETT (1976) observaram com técnica de imunofluorescência, que muitos pacientes com gengivite e todos com periodontite têm bactérias do sulco que reagem com imunoglobulinas.

SOBRE OS ELEMENTOS DO SISTEMA IMUNE NO SORO DE PACIENTES COM DOENÇA PERIODONTAL INFLAMATÓRIA CRÔNICA

As evidências clínicas de que a placa dental induz à inflamação gengival acrescentam-se estudos sobre a participação da reação imunológica celular e humoral na doença periodontal. A blastogênese que linfócitos de sangue periférico podem apresentar *in vitro* sob estímulo de diversos antígenos

nos microbianos da placa dental, tem sido apresentada como uma correlação entre tais bactérias e a reação imunológica mediada por células na doença periodontal (IVANYI & LEHNER 1970, IVANYI & LEHNER 1971, HORTON et al. 1972, PATTERS et al. 1976, PATTERS et al. 1977, LANG & SMITH 1977, SMITH & LANG 1977).

LANG & SMITH (1977) observaram que sob estímulo do *B. melaninogenicus* apenas linfócitos de sangue periférico de pacientes com doença periodontal avançada apresentaram blastogênese *in vitro*. *A. viscosus* e *A. naeslundii* estimularam a blastogênese linfócitos de pacientes com vários graus de severidade de doença periodontal, mas não os de pacientes com gengiva normal.

SMITH et al. (1978) confirmaram que *A. viscosus* foi capaz de estimular linfócitos de sangue periférico à blastogênese *in vitro* durante o desenvolvimento de gengivite experimental em humanos. Nestas condições o *A. viscosus* foi considerado como capaz de induzir uma resposta imune celular específica.

Embora haja dados conflitantes (KIGER et al. 1974) o estímulo dos linfócitos de sangue periférico de pacientes periodontais à blastogênese, por antígenos microbianos da placa dental tem sido correlacionado com o grau de evolução e severidade da doença (IVANYI & LEHNER 1970, IVANYI & LEHNER 1971, HORTON et al 1972, PATTERS et al. 1977).

Segundo ORSTRAVICK & BRANDTZAEG (1977), não foi encontrada uma associação significativa entre doença periodontal e o título de anticorpos séricos, cujos níveis se conser-

vam dentro das médias normais (HARVEY & GENCO 1977). Contudo, pesquisas indicam que as imunoglobulinas presentes na gengiva inflamada têm sua origem tanto no soro como nas células locais (BERGLUND 1971, MARTALLA et al. 1974, LALLY et al. 1980).

SOBRE OS ELEMENTOS DO SISTEMA IMUNE NO TECIDO GENGIVAL

SCHROEDER (1970) apresentou os parâmetros da inflamação gengival, que classificou como recente ("*early*") em humanos, estudando biópsias de gengiva marginal aderidas a pré-molares extraídos de 6 a 24 meses após a erupção dental. O autor descreveu, quantitativamente, as alterações estruturais dos tecidos gengivais exibindo variados graus de reação inflamatória. Os plasmócitos, em geral, perfaziam 90% do total das células inflamatórias. Como o plasmócito é local de síntese de anticorpos, sua presença foi interpretada como uma indicação da natureza imunológica da gengivite. Entretanto, as características que foram descritas não parecem de acordo com as de uma gengivite na fase recente ("*early*") conforme PAYNE et al. (1975) descreveram em gengivite experimental humana pelo acúmulo de placa dental. Biópsias gengivais tomadas aos dois e aos quatro dias do período experimental mostraram alterações dos vasos subjacentes ao epitélio junctional e alterações no colágeno perivascular. Aos oito dias de período experimental, o número de pequenas células mononucleares, a maioria linfócitos, triplicou no tecido conjuntivo. Em adição o número de fibroblastos, por unidade de área de tecido conjuntivo, diminuiu significativamente.

Assim, a partir de uma gengiva previamente normal, dentro do período de oito dias após o início do acúmulo de placa, uma lesão recente ("*early*") se desenvolveu, exibindo muitos aspectos característicos de hipersensibilidade retardada.

A seguir PAGE & SCHROEDER (1976) apresentaram uma revisão sobre os aspectos histopatológicos e ultraestruturais da doença periodontal, apresentando quatro estágios de sua evolução: lesão inicial ("*initial*"), lesão recente ("*early*"), lesão estabelecida ("*established*") e lesão avançada ("*advanced*").

Os aspectos de uma lesão inicial compreendem : a clássica vasculite sob o epitélio juncional, exsudação do fluido no sulco gengival, aumento de migração dos leucócitos no epitélio juncional, presença de proteínas séricas extravascularmente, especialmente fibrina, alteração da porção mais coronária do epitélio juncional, perda de colágeno perivascular. Esta lesão emerge dentro de dois a quatro dias em uma gengiva livre de infiltração e que ficou exposta ao acúmulo experimental de placa dental.

Os aspectos de uma lesão recente compreendem: acen^uação dos aspectos descritos para a lesão inicial, acúmulo de células linfóides imediatamente subjacentes ao epitélio juncional no local de inflamação aguda, alterações citopáticas nos fibroblastos residentes, possivelmente associadas a interações com células linfóides, perda adicional da trama de fibras colágenas que suportam a gengiva marginal, início da proliferação de células basais do epitélio juncional. Em

humanos esta lesão recente aparece dentro de quatro a sete dias após iniciado o acúmulo de placa dental em uma gengiva previamente livre de infiltrado inflamatório. As células linfóides perfazem, aproximadamente, 75% do total da população do infiltrado, enquanto os plasmócitos, se presentes, estão apenas na periferia lateral e apical da lesão.

Os aspectos de uma lesão estabelecida compreendem: persistência das manifestações da inflamação aguda, predominância de plasmócitos, presença de imunoglobulinas extra-vascularmente e no epitélio juncional, continuação da perda de substância do tecido conjuntivo notada na lesão recente, proliferação apical e extensão lateral do epitélio juncional, podendo existir ou não, clinicamente, uma bolsa periodontal em início de formação, sem perda óssea evidente. Enquanto muitos dos plasmócitos produzem imunoglobulinas G, um pequeno mas significativo número contém IgA e células contendo IgM são vistas muito raramente. A lesão estabelecida desenvolve-se dentro de 2 a 3 semanas após iniciado o acúmulo de placa em adultos previamente normais.

A lesão avançada é manifesta como uma periodontite.

É de notar que as alterações descritas para as lesões inicial, recente e estabelecida desta classificação, correspondem a estágios sequenciais de uma gengivite experimental pelo acúmulo de placa dental. Esta classificação das lesões baseia-se em dados histopatológicos e não distingue a sequência de sinais e sintomas reconhecidos clinicamente. Apoiada, porém, em dados morfológicos ela permite focar nossa atenção sobre importantes aspectos patológicos da doença

e sobre mecanismos patogênicos.

Paralelamente a esta classificação das lesões vários autores têm procurado também uma caracterização dos fenômenos imunológicos possivelmente envolvidos na evolução da doença periodontal inflamatória crônica.

ZACHRISSON (1968) por estudo histológico da gengivite experimental no homem já observara que após duas semanas os plasmócitos, frequentemente, eram mais numerosos que os linfócitos. Neste sentido interessantes observações foram feitas por WILDE et al. (1977), que induziram lesões gengivais em macacos e ratos com aplicação de Dinitrofluorobenzeno. Alterações exibindo aspectos característicos da lesão inicial induzida por placa apareceram em ambas as espécies dentro de 48-72 horas após a irritação. Tais alterações mostraram características da hipersensibilidade mediada por células, somente transitóriamente e dentro de 2 a 3 semanas houve predomínio de plasmócitos, que, juntamente com granulócitos, continuam a predominar na lesão através de seu curso.

HOPPS & JOHNSON (1976) estudaram a proliferação celular no infiltrado inflamatório de gengivite experimental em macacas, injetando timidina tritiada na gengiva, uma hora antes da realização da biópsia. As amostras foram tomadas - aos 3, 7, 14, 21, 42, 85, e 243 dias após iniciado o acúmulo de placa. O número de macrófagos marcados atingiu seu máximo no período de 6 a 12 semanas de experimentação. O número de linfócitos marcados, imunoblastos e células endoteliais atingiu seus níveis máximos somente em animais com doença estabelecida. Com seus resultados defendem o conceito de que

uma resposta do macrófago desempenha importante função na defesa do hospedeiro, durante os primeiros estágios do processo patológico, sendo substituído, gradualmente, por outro mecanismo de defesa, principalmente humoral, nos estágios posteriores de gengivites, como sugere o aumentado número de linfócitos e o muito alto número de plasmócitos.

O mecanismo de defesa principalmente humoral implica na presença de imunoglobulinas. BRANDTZAEG (1973) relatou que a substância fundamental do tecido conjuntivo na gengiva normal e particularmente na inflamada é permeado por imunoglobulinas. O infiltrado de lesões iniciais em macacos bem como aqueles de periodontite no homem são predominadas por células com IgG. A relação de imunócitos com IgG para IgA é de 4,3:1 em biópsias de gengiva com moderada infiltração e de 7,2:1 em biópsias com densa infiltração. Células contendo IgM são menos frequentes que células com IgA; IgD não foi pesquisada e células com IgE parecem ser muito raras. O autor considera que a formação local de imunoglobulinas em conexão com o desenvolvimento de inflamação gengival, deste modo, segue o modelo de uma clássica resposta imune sistêmica secundária, caracterizada pela progressiva predominância de síntese de IgG sobre IgA.

BRANDTZAEG (1966) havia já demonstrado também, com técnica de imunofluorescência, grandes quantidades de IgG, menores quantidades de IgA e traços de IgM penetrando o epitélio de gengiva inflamada.

MARTALLA et al. (1974) com técnica de imunofluorescência demonstraram IgG, IgA e IgM no tecido gengival com in

flamação crônica, concluindo que elas representavam anticorpos produzidos local e sistemicamente.

GENCO et al. (1974) avaliaram com imunofluorescência, a localização de imunoglobulinas e componentes do complemento (C'3) em gengivas clinicamente normais e gengivas patológicas adjacentes a bolsas periodontais infra-ósseas. As amostras foram processadas conforme três sequências, a saber: uma parte foi fixada em formalina tamponada a 4°C por quatro horas, seguida de lavagem em sacarose a 30%, durante 24 horas, para secções em criostato; outra parte foi imediatamente congelada, em gelo seco e seccionada em criostato; e uma terceira parte foi lavada em solução salina isotônica, por 48 horas, após o que foi fixada em formalina tamponada. Os autores chegaram aos seguintes resultados: no epitélio do sulco a gengiva clinicamente normal apresentou menos IgG do que a gengiva inflamada, enquanto que difundido pelo tecido conjuntivo esta imunoglobulina foi, praticamente, equivalente na gengiva normal e na inflamada; no tecido conjuntivo da gengiva normal havia menos plasmócitos contendo IgG do que na gengiva inflamada; na gengiva clinicamente normal não foi detectada IgA nem no epitélio do sulco nem nos plasmócitos; apenas pouca IgA pôde ser detectada difundida pelo tecido conjuntivo; na mesma gengiva normal pôde ser demonstrada IgM nas células epiteliais do sulco gengival e difundida no tecido conjuntivo, mas não em plasmócitos. Esta situação persistiu na gengiva inflamada, com acréscimo de IgM nos plasmócitos. Em nenhuma estrutura da gengiva normal a IgE foi detectada, enquanto esteve presente em plasmócitos de gengivas in

flamadas.

BIERS et al. (1975) através de imunodifusão avaliaram os níveis de imunoglobulinas IgG, IgA e IgM em misturas de gengivas clinicamente normais e de gengivas de pacientes com doença periodontal inflamatória crônica, sem definir seu estágio de evolução clínica. Relataram a presença de IgA e IgG na gengiva normal e na inflamada e embora os níveis de ambas tenham sido substancialmente mais altos na gengiva inflamada, a relação entre elas continuou a mesma. A IgM não pôde ser consistentemente demonstrada em gengiva inflamada com a técnica empregada.

Estes autores, argumentando que esta técnica parece ser superior à de imunofluorescência empregada por outros autores para descrição dos níveis de anticorpos gengivais, consideram necessários estudos adicionais para correlacionar impressões clínicas com os dados histológicos e medidas quantitativas de níveis de imunoglobulinas.

SCHWARTZ & DIBBLEE (1975) em cultura de tecido gengival humano clinicamente são, em seis casos estudados, demonstraram IgE indiretamente, e mostraram *in vitro* uma associação desta com a liberação de histamina dos mastócitos gengivais. Esta relação de IgE com os mastócitos representaria um subsídio a favor da reação anafilática localizada, como um mecanismo complexo que poderia também estar envolvido na doença periodontal inflamatória.

MACKLER et al. (1977) estudaram com imunofluorescência a distribuição das imunoglobulinas em gengivas clinicamente normais, com gengivite leve e em casos de periodonti

te com formação de bolsas. A gengiva normal continha poucos linfócitos e plasmócitos. As biópsias das áreas de gengivite suave estavam infiltradas pelos linfócitos sem imunoglobulinas associadas (94%) e poucos plasmócitos foram evidentes. Em contraste o tecido associado com periodontite (PI= 4.0 - 8.0) continha significante quantidade de imunoglobulinas associadas a linfócitos (78% IgG, 9% IgM e 4% IgA) e plasmócitos (67% IgG, 24% IgM e 8% IgA) distribuídos através do tecido.

Estes resultados indicaram que a natureza do infiltrado celular foi diferente na gengivite suave e na periodontite e que, a presença predominante de células contendo IgG e IgM, na periodontite, implicaria na participação de mecanismos efectores não específicos para a destruição do tecido periodontal.

MACKLER et al. (1978a) e MACKLER et al. (1978b) estudaram a incidência de sub-classes de IgG ligadas a linfócitos e plasmócitos em casos de gengivite suave, gengivite severa e periodontite com bolsas.

A gengivite suave foi caracterizada pela presença de linfócitos sem receptores IgG e Fc na superfície, sugestivo de célula timo dependente (T). Na gengivite severa a natureza do infiltrado celular mudou, aumentando o número de linfócitos com IgG1 (22%), IgG3 (17%), com menor proporção de IgG4 (7%) e IgG2 (1%). Uma incidência similar foi também achada nos plasmócitos. A maioria das sub-classes de IgG era ligada à membrana de linfócitos e servia como receptores para antígenos. Tais células são classicamente definidas co

mo linfócitos derivados da medula óssea (B) e servem como progenitoras de plasmócitos. Isto indicou que os estágios clínicos da doença periodontal humana são caracterizados por diferentes populações de linfócitos.

A periodontite destrutiva foi caracterizada por alto número de plasmócitos (57%) distribuídos através da gengiva. A incidência de sub-classes de IgG foi 25% IgG1, 19% IgG4, 18% IgG3 e 1% IgG2.

Estes dados adicionaram evidências de que o infiltrado celular no estágio mais destrutivo da doença periodontal, a periodontite, era primariamente composto de células derivadas da medula óssea (B).

SEYMOUR & GREENSPAN (1978) caracterizaram e identificaram linfócitos na lesão estabelecida da gengivite, empregando técnica de imunofluorescência indireta. A maioria dos linfócitos presentes mostraram reação positiva para IgM e IgG, e os autores sugeriram que tal lesão inflamatória periodontal crônica em humanos poderia ser considerada como predominantemente por células B.

GROSS et al. (1979) com imunodifusão radial realizaram uma determinação quantitativa de imunoglobulinas G, M e A em gengivas normais, inflamadas com os graus 1 e 2 do índice gengival de LOE & SILNESS, e de outro grupo com periodontite e bolsas que variavam de 4 a 6 milímetros.

A gengiva normal, com índice gengival zero, mostrou uma extensa variação em concentração de IgA e IgG, indicando uma grande variabilidade nos níveis dessas imunoglobulinas nas amostras obtidas de diferentes pacientes.

A determinação das concentrações de imunoglobulinas A, G e M nos tecidos gengivais clinicamente normais, e nos inflamados, de pacientes com moderada periodontite, mostrou que os níveis de IgA e IgG aumentaram no tecido inflamado. A IgM foi detectada, embora não consistentemente, em ambas as gengivas, normal e inflamada, na seguinte frequência: em 6 das 15 com índice gengival zero; em 8 de 17 com índice gengival 1 e em 8 de 20 com índice gengival 2.

LALLY et al. (1980) prepararam cultura de tecido gengival com doença periodontal avançada, caracterizada por infiltração de plasmócitos, e de tecido gengival histologicamente normal, para detectarem *in vitro*, através da incorporação de ^{14}C -lisina e ^{14}C -isoleucina, combinada com imunoeletroforese e autorradiografia, a síntese de imunoglobulinas. Os autores detectaram síntese de IgG e IgA mas não de IgM nos tecidos gengivais cronicamente inflamados. No tecido gengival histologicamente normal ou predominantemente fibrotico não foi detectada síntese de imunoglobulinas. Tais resultados indicaram que a síntese local ocorre nos tecidos gengivais patológicos, sugerindo que as imunoglobulinas do sulco e do tecido gengival não são todas derivadas da circulação.

Empregando técnica de imunofluorescência GARROCHO (1980) identificou IgG, IgA, IgM em gengivas normais e em gengivites crônicas do homem. Seus resultados referem que no tecido conjuntivo das gengivas normais houve reação positiva para IgG, e IgA na maioria dos casos estudados, considerando a distribuição para IgG difusa e escassa para IgM e IgA. Nas gengivites crônicas foi verificado um aumento na

difusão de IgG no epitélio gengival, sendo que IgA e IgM foram também encontradas.

Como visto, as pesquisas demonstram elementos da reação imune no quadro da doença periodontal inflamatória crônica. É admitido que a lesão periodontal apresenta características que sugerem atividade imunológica dos tipos humoral e celular (Conclusões do XIII Seminário Latino Americano de Odontologia 1980), podendo a reação imunológica e, por conseguinte os fenômenos próprios decorrentes, ser considerados como uma componente no quadro geral da doença periodontal. Entretanto, é de notar que ainda não são acordes os resultados dos estudos sobre a atividade imunológica celular e principalmente sobre as imunoglobulinas presentes nos tecidos envolvidas nas várias fases da doença periodontal inflamatória crônica.

Em face do exposto, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de verificar, com técnica de imunofluorescência direta, a ocorrência de imunoglobulinas em gengivas humanas e seus aspectos histopatológicos nas várias condições clínicas, segundo o Índice Gengival de LOE & SILNESS (1963). Com estes dados estabelecer correlações entre aspectos clínicos, histopatológicos e imunológicos da gengiva humana clinicamente normal e com gengivite crônica.

MATERIAL E MÉTODO

MATERIAL E MÉTODO

Vinte pacientes da faixa etária de 20 a 25 anos, de ambos os sexos, cujos exames anamnésicos não revelaram doença sistêmica, foram selecionados, distribuídos em quatro grupos de estudo, com base no Índice Gengival (IG) de LOE & SILNESS (1963), aplicado na região de interesse, pois este índice é baseado nas características clínicas da gengiva.

- Grupo - Cinco pacientes com IG igual a zero, ausência
IG=0 de inflamação gengival clínica.
- Grupo - Cinco pacientes com IG igual a 1 (um) ou
IG=1 seja, gengiva com inflamação leve, ligeira alteração de cor e pouca alteração da textura.
- Grupo - Cinco pacientes com IG igual a 2 (dois) ou
IG=2 seja, gengiva com inflamação moderada, edemaciada, hipertrofiada, moderadamente brilhante, vermelha, com hemorragia à sondagem.
- Grupo - Cinco pacientes com IG igual a 3 (três) ou
IG=3 seja, gengiva com inflamação severa, intensamente vermelha e com hipertrofia, ulceração, tendência à hemorragia espontânea.

Neste estudo foi considerado, para fins de registro, o índice gengival somente dos locais das biópsias.

Sob anestesia local infiltrativa, com Xylocaina a 2% (Astra Química do Brasil Ltda.) foi feita uma biópsia de,

aproximadamente, 1,5mmx4mm, a partir da margem gengival, procurando remover toda extensão da parede gengival do sulco gengivo-dental, nos casos de gengiva normal. Nos casos de gengiva inflamada a biópsia foi feita por gengivectomia em todo contorno vestibular do dente, até os limites das regiões proximais. O tecido foi, então cuidadosamente removido, desinserindo-o de osso e/ou dente subjacente. As regiões operadas foram sempre protegidas com cimento cirúrgico.

Imediatamente à biópsia as amostras de gengiva foram imersas em solução salina isotônica a 4°C (GENCO et al. 1974) e a seguir recortadas com gilete, sobre uma placa de parafina, para preparar os fragmentos de 1,5mmx4mm das áreas de interesse. Os cortes, para obtenção dos fragmentos, foram orientados para estabelecer uma posição para a inclusão da gengiva em parafina, de modo a obter secções no plano vestibulo-lingual, acompanhando o eixo longitudinal do dente e passando por epitélio e conjuntivo.

Tais fragmentos, devidamente identificados, foram acondicionados em suportes de gaze e mergulhados na mesma solução salina isotônica, a 4°C, assim permanecendo, em constante agitação suave, por 36 a 48 horas, para lavagem. Após esta lavagem os fragmentos de gengiva foram fixados em etanol a 95% por um período de 16 a 24 horas a 4°C, para posterior processamento e inclusão em parafina, de ponto de fusão 51-53°C (SAINTE-MARIE 1962). Este processamento obedeceu à seguinte sequência:

- 1- após fixação, desidratação em quatro trocas de álcool absoluto a 4°C, com duração de uma a duas horas cada troca.

- 2- diafanização, em três banhos de xilol pré-resfriado a 4°C, com duração de uma a duas horas em cada banho; após o último as peças foram deixadas, em xilol, à temperatura ambiente, até atingirem entre 20°C e 30°C.
- 3- inclusão: a) a peça passou por quatro banhos de parafina filtrada, a 51-53°C, com duração de duas horas cada banho; b) a seguir foi incluída em parafina, a 51-53°C, e o bloco, após o resfriamento, foi permanentemente conservado em geladeira.

Com o micrótomo regulado para cinco micrômetros, foram feitas secções seriadas, da maneira usual, mas com pouco tempo de flutuação em banho-maria a 40°C, para aplicação sobre a lâmina de vidro, sem emprego de albumina.

As lâminas numeradas e marcadas indicando o grupo experimental foram conservadas sempre em geladeira.

Para cada amostra de gengiva, em cada série de seis lâminas, a de número três foi corada com hematoxilina e eosina, para observações dos aspectos histopatológicos, ao Fotomicroscópio II (Carl Zeiss Oberkochen). As demais secções foram preparadas para observação de imunofluorescência como descrito a seguir:

1- Desparafinização- em dois banhos consecutivos de xilol pré-resfriado, a 4°C, com agitação suave.

2- Remoção do xilol- feita em 5 banhos de etanol a 95%, a 4°C, com duração de 10 a 15 segundos cada um.

3- Remoção do álcool- feita através de 5 banhos de solução tampão fosfato, recém preparada, a 4°C, com duração

de 2 a 3 minutos cada banho. A solução tampão fosfato, pH 7,2, recomendação de Behring, foi a seguinte:

NaCl (cloreto de sódio)	8.5 g
Na ₂ HPO ₄ (fosfato de sódio)	17.24g
KH ₂ PO ₄ (fosfato de potássio)	2.28g
Água Destilada	qsp 1 litro

4- Exposição ao reagente- após a lavagem em solução tampão fosfato a lâmina foi cuidadosamente seca, com papel de filtro, e a secção de gengiva coberta com o reagente imunológico.

Assim, as secções foram coradas para imunoglobulinas usando isotiocianato de fluoresceína conjugado com anti-soros humano, produzido em coelhos (Hoechst-Instituto Behring) para as seguintes imunoglobulinas IgG, IgA, IgM, IgE e IgGAM. Esses conjugados tinham a relação molar F/P de ca. 2,5⁺1,5, a concentração protéica total após adição de albumina humana de ca. 40⁺5g/l e o conteúdo de anticorpos específicos de ca. 10⁺5% da concentração gama globulínica.

O conjugado fluoresceína-anti-soro humano para estas imunoglobulinas, na diluição de 1:10, foi aplicado sobre as secções mantidas durante 30 (trinta) minutos em um pequeno recipiente fechado, contendo também um pouco da solução tampão, para manter um nível de umidade relativa do ar, que evitasse evaporação do reagente.

5- Montagem da lâmina- após submetida ao reagente imunológico as lâminas foram lavadas, com a solução tampão fosfato. Para montagem da lamínula foi usada uma solução de

uma parte de glicerol e nove partes da solução tampão.

As lâminas assim preparadas foram observadas imediatamente ou conservadas em geladeira, para observação dentro do período de 12 horas, no máximo. Os exames foram efetuados em um microscópio Zeiss para fluorescência, com luz transmitida, tendo como fonte uma bomba de mercúrio de alta pressão HBO 200W/4, cuja emissão abrange o espectro inicial, rico em radiação ultra-violeta. Os filtros empregados foram: de excitação BG3 com combinação dos filtros supressores 65 e 44.

Para cada paciente foram feitas observações de 5 lâminas preparadas com cada um dos conjugados: IgG, IgA, IgM, IgE e IgGAM.

A avaliação das imunoglobulinas presentes foi baseada em contagens de pontos de uma ocular integradora (Zeiss KpLW - 10X) incidentes sobre áreas que apresentaram fluorescência associada à exposição a cada um dos conjugados, com aumento de 520X.

Em cada lâmina foram feitas 3 leituras; cada leitura computou 4 campos da ocular integradora, que a esta ampliação compreendia um quadrado de aproximadamente 180 micrômetros de lado, cada um com 25 pontos possíveis de impacto. Estas contagens foram feitas no tecido conjuntivo em geral da amostra.

De cada amostra gengival foi tomada a média destas três leituras referidas.

Para cada série de lâminas coradas para IgG, IgA, IgM, IgE e IgGAM, uma secção foi montada sem ser tratada com conjugado, para servir como contraprova sobre fluorescência inespecífica ou natural.

RESULTADOS

ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS

As características histológicas das gengivas clinicamente normais assim como daquelas que apresentavam diferentes estágios de resposta inflamatória, foram examinadas, em secções coradas pela hematoxilina e eosina, e estão abaixo descritas, agrupadas segundo seus índices gengivais (IG).

GENGIVAS COM ÍNDICE GENGIVAL = 0

As gengivas com IG=0 (Figs. 1 e 2) apresentaram microscopicamente as seguintes características: O epitélio da margem livre da gengiva apresentou-se uniformemente estruturado, ortoqueratinizado, com expansões digitiformes regularmente distribuídas em toda a extensão (Fig.3). Na região do sulco o epitélio apresentou-se irregular, sem expansões digitiformes, infiltrado com alguns poucos leucócitos, membrana basal com descontinuidade em alguns locais. No território conjuntivo, imediatamente abaixo do epitélio sulcular, ou mesmo da margem gengival livre, pôde observar-se a trama vascular, feixes de colágeno, fibroblastos, mastócitos, macrófagos e linfócitos.

O aspecto microscópico mais significativo nestas gengivas é que, embora classificadas como não apresentando inflamação clínica, elas sempre exibiram um pequeno grau de alteração no epitélio do sulco e discreto infiltrado de linfócitos no córion. Alguns linfócitos também foram encontrados na região reticular do córion gengival, assim como uma

estruturação regular dos feixes de fibras colágenas (Fig.4).

GENGIVAS COM ÍNDICE GENGIVAL = 1

As gengivas humanas assim classificadas (Figs.5 e 6) apresentaram microscópicamente as seguintes características: O epitélio da margem livre da gengiva não apresentou alterações marcantes, exibindo características semelhantes às daquelas das gengivas clinicamente normais, com IG=0. No epitélio do sulco, contudo, foi observada uma maior intensidade de edema intercelular e dissociação das células epiteliais, com presença de maior número de leucócitos nos espaços intercelulares. O tecido conjuntivo em toda a extensão da margem livre da gengiva, exibiu, além de fibroblastos e mastócitos, um moderado infiltrado inflamatório, constituído principalmente de macrófagos e linfócitos (Fig. 7). Próximo ao sulco gengival havia discreta diminuição das fibras colágenas. Juntamente com o colágeno desintegrado e em desintegração apareciam vasos dilatados e alguns plasmócitos (Fig. 7). O infiltrado inflamatório foi mais pronunciado na porção mediana do sulco, sendo que algumas poucas células esparsas puderam ser observadas em áreas mais profundas do território conjuntivo. Próximo ao epitélio do sulco apareceram alguns fibroblastos, junto a linfócitos e alguns plasmócitos (Fig. 8). Embora também houvesse algumas células inflamatórias próximo ao epitélio da margem livre da gengiva, a degradação do colágeno aí não pareceu tão acentuada (Fig. 7).

Um importante detalhe microscópico deste estágio da inflamação gengival foi a extensão do conjuntivo altera-

do, próximo ao sulco gengival, onde se observou uma infiltração de linfócitos mais acentuada. Dividindo, aproximadamente, a gengiva marginal em 3 terços no sentido vestibulo-lingual, poder-se-ia dizer que neste estágio da inflamação, as alterações conjuntivas mais significativas estariam afetando apenas o terço mais próximo do epitélio do sulco.

GENGIVAS COM ÍNDICE GENGIVAL = 2

As gengivas humanas assim classificadas (Figs.9 e 10) apresentaram microscópicamente as seguintes características: alterações do território conjuntivo mais extensas que aquelas das gengivas do estágio anterior, com IG=1. Também no epitélio as alterações foram mais notáveis, particularmente no epitélio do sulco gengival. A camada basal apresentou-se irregular, com aumento dos espaços intercelulares, infiltração de leucócitos por entre as células e perda de continuidade da membrana basal (Fig. 11). No conjuntivo, além da maior extensão das áreas de degradação do colágeno, também o número de linfócitos e particularmente o de plasmócitos aumentou significativamente (Figs. 12 e 13). Mais profundamente, já na porção reticular do córion gengival, particularmente nas áreas mais próximas à gengiva aderida foram observadas áreas focais de acúmulo de plasmócitos, linfócitos ao lado de áreas de fibrose (Fig. 13).

GENGIVAS COM ÍNDICE GENGIVAL = 3

As gengivas humanas assim classificadas (Figs.14 e 15) apresentaram microscópicamente aspectos que pareciam diferir do grupo anterior, IG=2, apenas no aspecto quantitativo ou de extensão da lesão. O epitélio da margem livre da gengiva mostrou paraqueratose, acantose e infiltração de alguns leucócitos por entre os queratinócitos. Já na região do sulco o epitélio se apresentou profundamente alterado, com acentuada descamação, perda de continuidade (ulcerações), intensa infiltração de leucócitos por entre as células epiteliais. Os espaços intercelulares apareceram aumentados e a membrana basal desintegrada em muitos pontos. No conjuntivo próximo ao sulco foram frequentes as áreas de degradação do colágeno, de infiltração predominantemente plasmocitária e de pronunciado edema (Fig. 16). Mais profundamente, no interior do tecido conjuntivo, áreas semelhantes a estas descritas interpõem-se a áreas focais de fibrose e infiltração predominantemente de linfócitos e de macrófagos (Fig. 17). Eventualmente podiam ser observadas algumas regiões de proliferação angioblástica e fibroblástica e de fenômenos exsudativos-vasculares.

IMUNOFLUORESCÊNCIA

As lâminas não coradas, usadas como contraprova, não apresentaram fluorescência, o que foi tomado como indicativo de ausência de fluorescência natural.

IgG e IgA foram observadas nas amostras gengivais dos pacientes de todos os 4 grupos deste estudo. As áreas fluorescentes, nas secções coradas para IgG, aumentaram de acordo com o Índice Gengival (Figs. 18 a 21).

IgA foi observada em proporções menores que IgG, mas também aumentou à medida que aumentou o Índice Gengival. Entretanto, houve um decréscimo de IgA no grupo IG=3. IgG e IgA mostraram, entre si, as seguintes relações: no grupo IG=0, 2.95:1; no grupo IG=1, 4.85:1; no grupo IG=2, 6,4:1 e no grupo IG=3, 55:1.

IgM foi observada, somente em algumas lâminas de pacientes do grupo Ig=2 em baixas proporções.

IgE foi observada somente nos pacientes do grupo IG=0.

A contagem relativa à imunofluorescência nas lâminas coradas para IgGAM, usada como controle, mostrou variação pequena em relação à soma das contagens feitas isoladamente para cada imunoglobulina.

Os resultados das contagens dos pontos da ocular integradora, que incidiram sobre áreas com fluorescência positiva, após o tratamento com os conjugados anti-imunoglobulinas G, A, M, E e GAM acham-se expressos na TABELA I e representados no Gráfico I.

TABELA I

Média, desvio padrão e erro padrão da média das computações de pontos com a ocular integradora em lâminas de biópsias gengivais processadas para imunofluorescência.

Imunoglobulina	IgG	IgA	IgM	IgE	IgGAM
Gengivas clinicamente normais.					
IG=0					
$\bar{x}$	0.0338	0.0114	0	0.0010	0.0485
s	0.0161	0.0055	0	0.0003	0.0250
S $\bar{x}$	0.0072	0.0024	0	0.0001	0.0112
Gengivas com inflamação leve.					
IG=1					
$\bar{x}$	0.0971	0.0200	0	0	0.1242
s	0.0421	0.0068	0	0	0.0441
S $\bar{x}$	0.0188	0.0030	0	0	0.0197
Gengivas com inflamação moderada.					
IG=2					
$\bar{x}$	0.3186	0.0497	0.0006	0	0.3973
s	0.1697	0.0302	0.0004	0	0.2052
S $\bar{x}$	0.0751	0.0135	0.0002	0	0.0918
Gengivas com inflamação severa.					
IG=3					
$\bar{x}$	0.6750	0.0122	0	0	0.6710
s	0.1004	0.0374	0	0	0.1228
S $\bar{x}$	0.0449	0.0016	0	0	0.0549

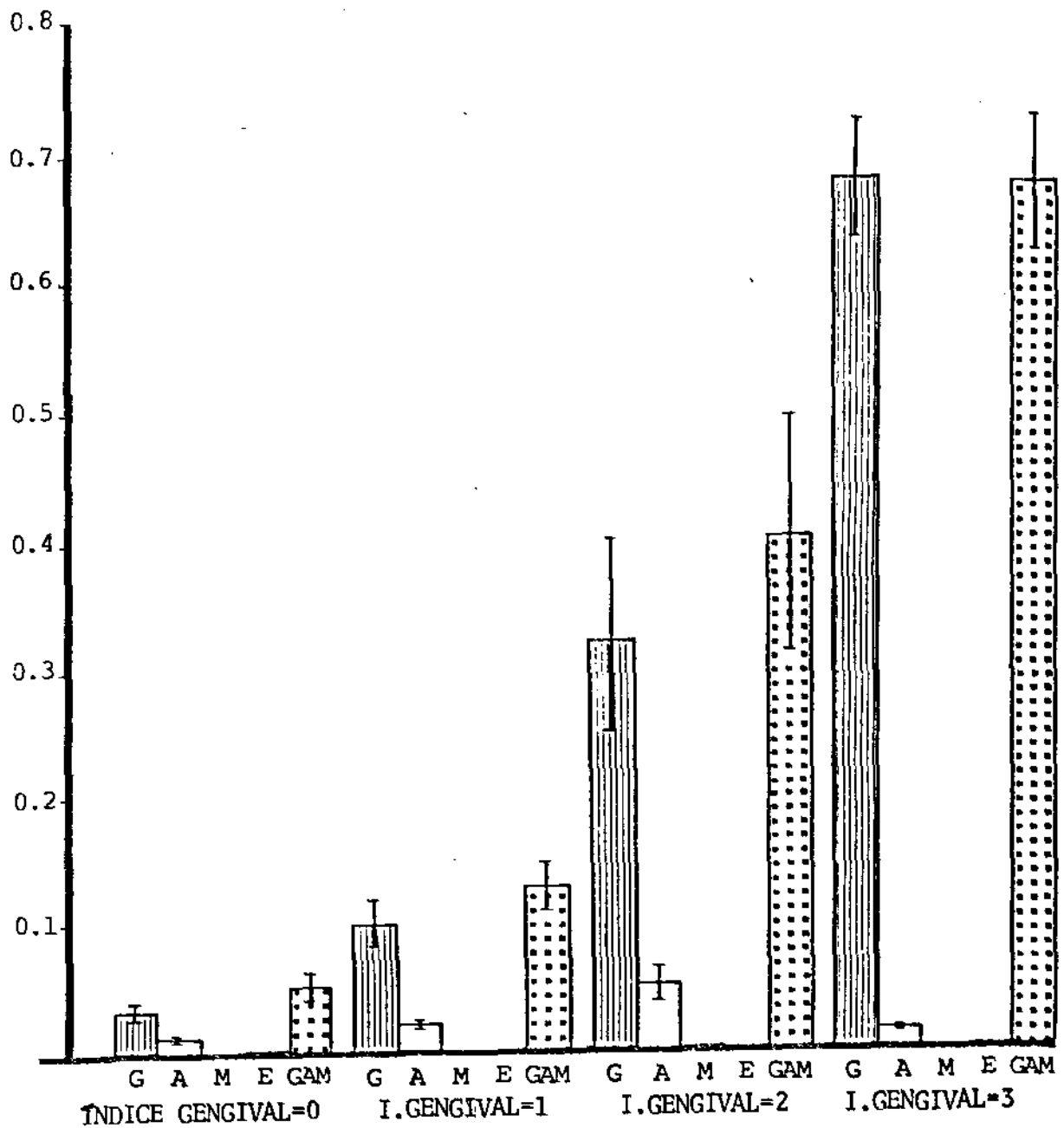


Gráfico 1- Proporções de pontos computados com Ocular Integradora Zeiss sobre áreas com fluorescência em lâminas de biópsias de gengivas humanas processadas para imunofluorescência com conjugado Isotiocianato de fluoresceína-anti: IgG, IgA, IgM, IgE e IgGAM.

FIGURAS



Fig. 1- Gengiva com Índice Gengival = 0. Aspecto clínico. Região vestibular de incisivo central superior direito.



Fig. 2- Gengiva com Índice Gengival = 0. Aspecto clínico. Região vestibular de incisivo lateral superior direito.

Fig. 3- Aspecto microscópico de gengiva com Índice Gengival = 0.

Características estruturais normais das células basais do epitélio, dos espaços intercelulares e da membrana basal. O tecido conjuntivo mostra fibroblastos, linfócitos, e macrófagos, vasos sanguíneos, e fibras colágenas. Aumento 480X.

Coloração- H.E.

Fig. 4- Gengiva com Índice Gengival = 0. Aspectos microscópicos da porção reticular do córion gengival, onde se observa uma maior concentração de fibras colágenas.

Aumento 480X. Coloração- H.E.

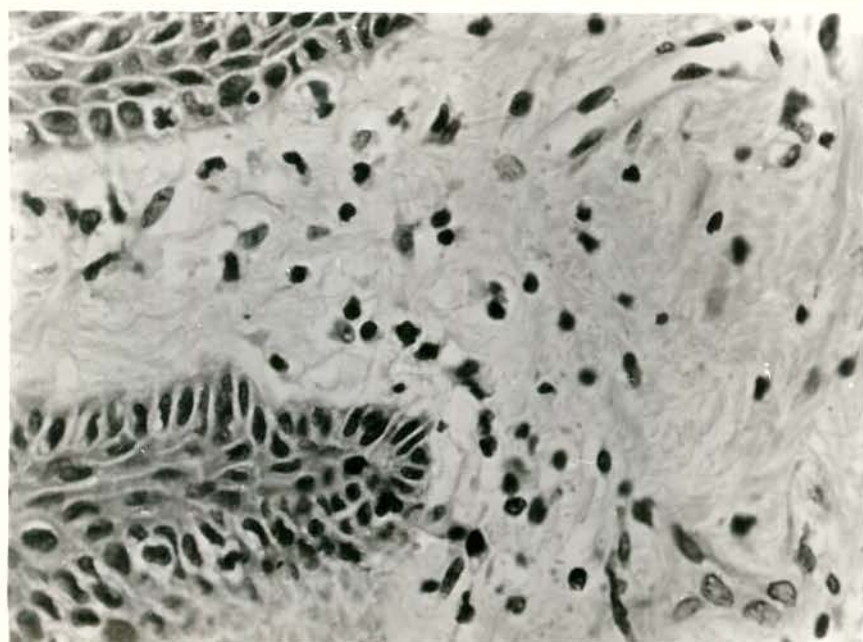




Fig. 5- Gingiva com Índice Gingival = 1. Aspecto clínico. Região vestibular, canino inferior esquerdo.



Fig. 6- Gingiva com Índice Gingival = 1. Aspecto clínico. Região vestibular de 2º pré-molar inferior esquerdo.

Fig. 7- Aspectos microscópicos de gengiva com Índice Gengival = 1.

Visão geral da margem gengival livre, exibindo paraqueratose, projeções papilares uniformes e uma infiltração de mononucleares no córion gengival. Aumento 80X
Coloração- H.E.

Fig. 8- Aspecto microscópico de gengiva com Índice Gengival = 1.

Detalhe do território conjuntivo próximo ao sulco gengival: degradação de feixes de fibras colágenas, fibroblastos, macrófagos, linfócitos e alguns plasmócitos.
Aumento 480X. Coloração- H.E.

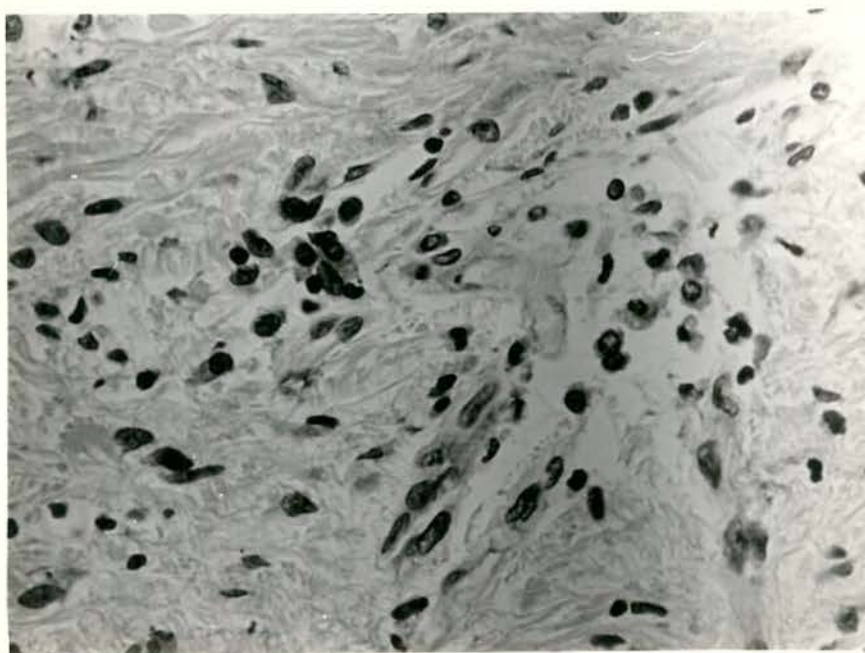
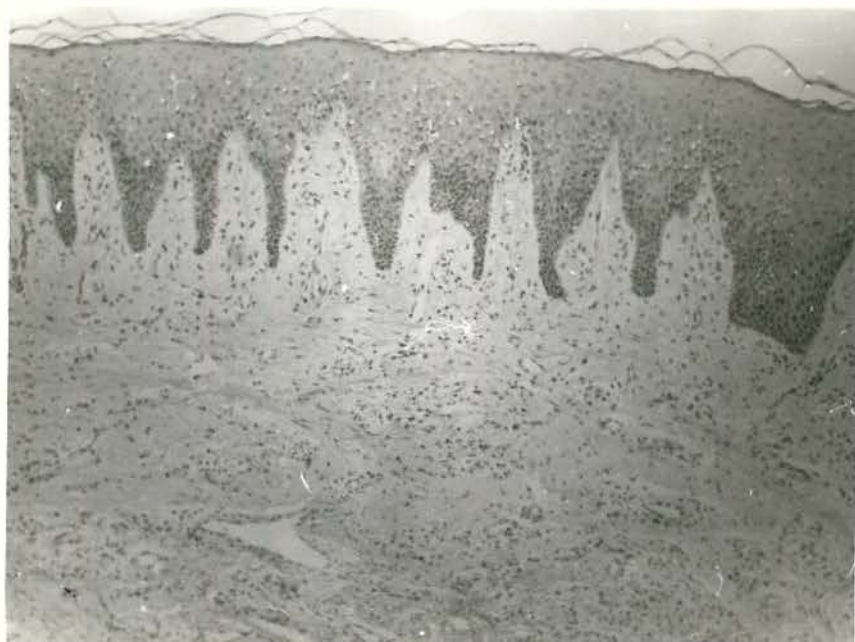




Fig. 9- Gingiva com Índice Gengival = 2. Aspecto clínico. Região vestibular de incisivo lateral superior direito.



Fig.10- Gingiva com Índice Gengival = 2. Aspecto clínico. Região vestibular de incisivo lateral superior direito.

Fig.11- Aspecto microscópico de gengiva com Índice Gengival = 2.

Parte do epitélio do sulco mostrando a irregularidade da camada basal, infiltração de leucócitos nos espaços intercelulares do epitélio juncional. Aumento 80X.

Coloração- H.E.

Fig.12- Aspecto microscópico de gengiva com Índice Gengival = 2.

No tecido conjuntivo além de macrófagos, neutrófilos, linfócitos, aparece um grande número de plasmócitos. Aumento 480X.

Coloração- H.E.

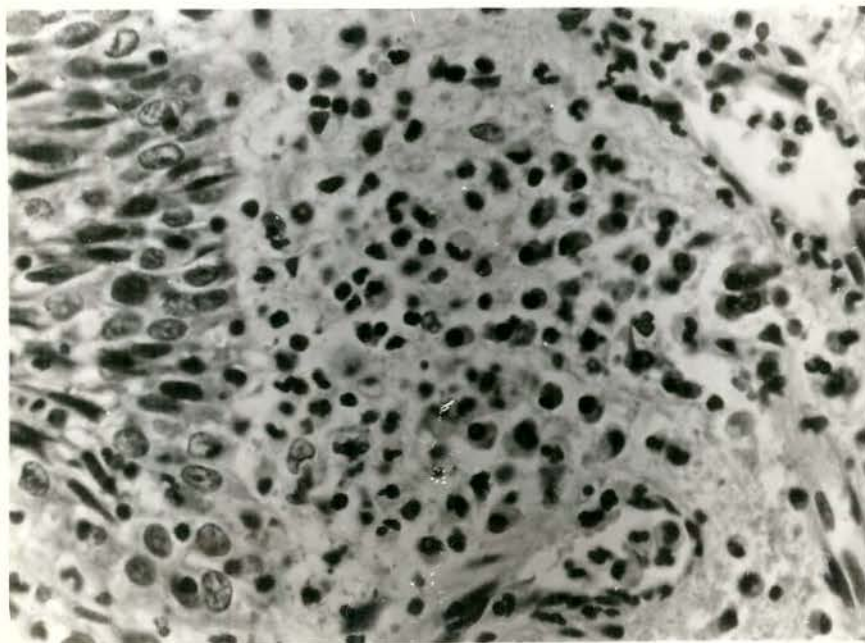


Fig. 13- Aspecto microscópico de gengiva com Índice Gengival = 2.

Áreas focais de acúmulo de linfócitos, macrófagos, fibroblastos e plasmócitos, ao lado de área de fibrose. Aumento 480X. Coloração- H.E.

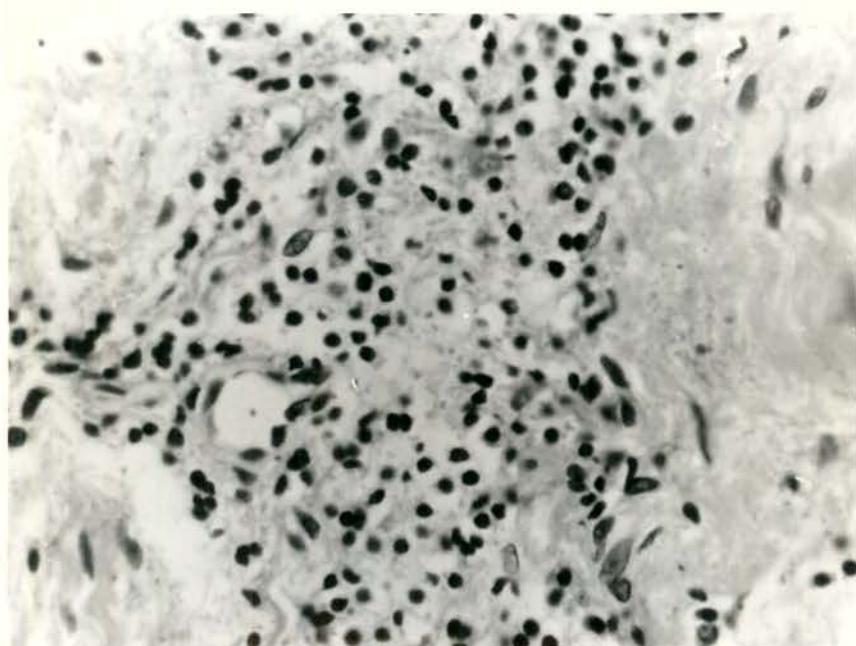




Fig.14- Gingiva com Índice Gingival = 3. Aspecto clínico. Região vestibular de incisivo lateral superior esquerdo.



Fig.15- Gingiva com Índice Gingival = 3. Aspecto clínico. Região vestibular de incisivo lateral superior direito.

Fig.16- Aspecto microscópico de gengiva com Índice Gengival = 3.

Território conjuntivo próximo ao sulco: de gradação do colágeno, infiltração de macrôfagos, linfócitos e plasmócitos.

Aumento 480X. Coloração- H.E.

Fig.17- Aspecto microscópico de gengiva com Índice Gengival = 3.

Área focal de infiltração de plasmócitos , linfócitos e macrófagos, ao lado de áreas de fibrose. Aumento 180X.

Coloração- H.E.

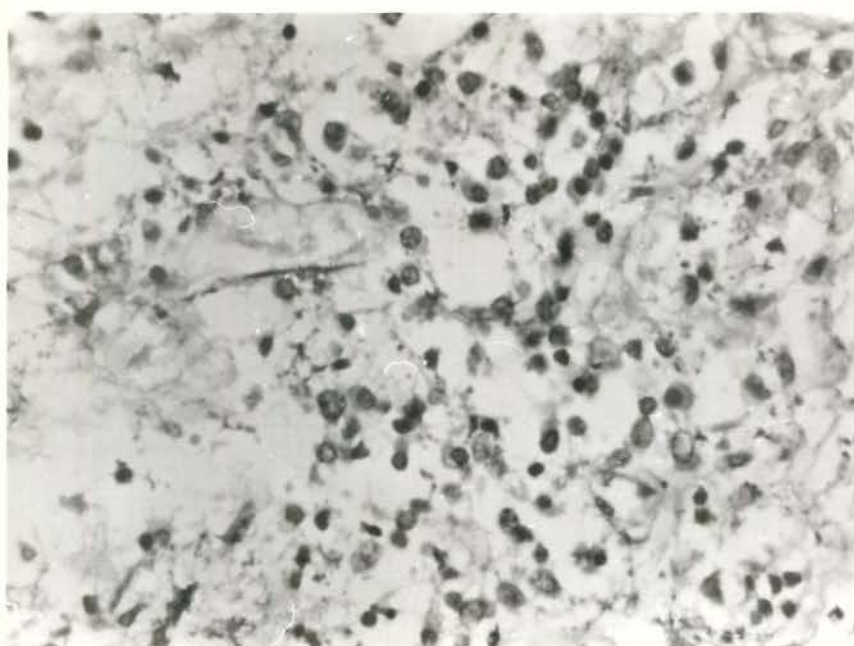
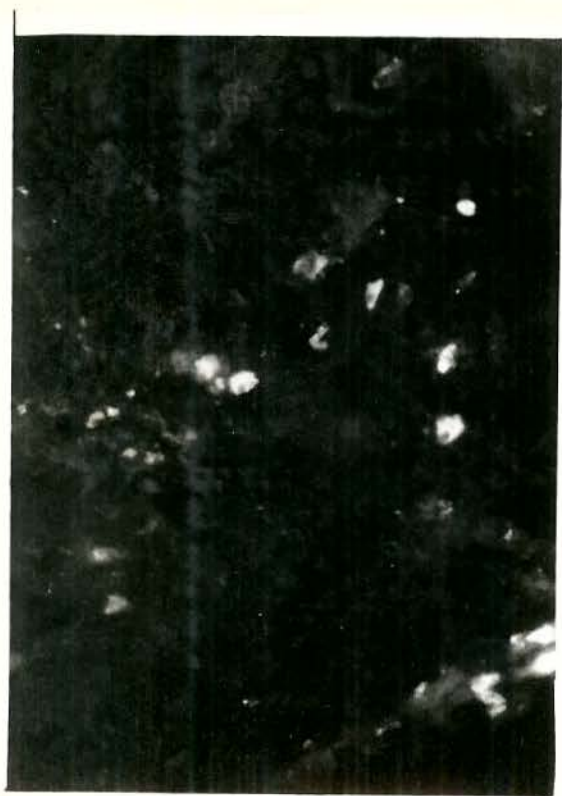


Fig. 18- Células com fluorescência positiva para IgG,
em gengiva humana lavada antes da fixação.
Índice Gengival = 0. Aumento 130X.

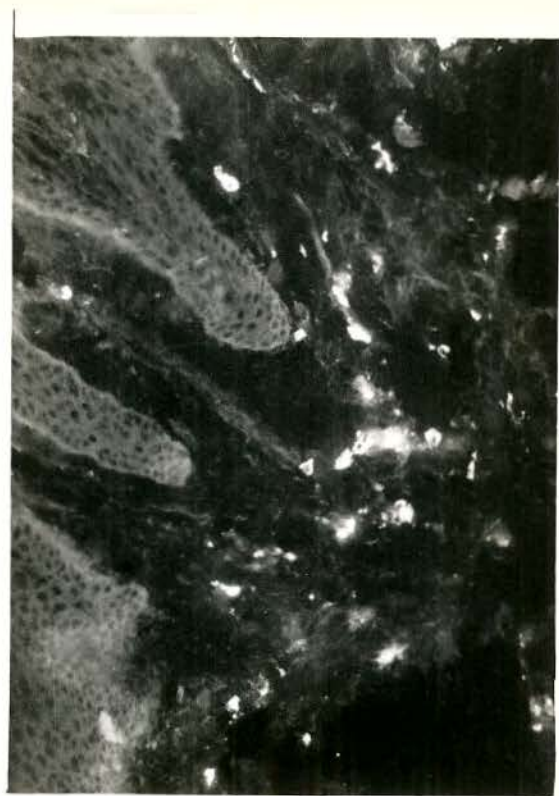
Fig. 19- Células com fluorescência positiva para IgG,
em gengiva humana lavada antes da fixação.
Índice Gengival = 1. Aumento 130X.

Fig. 20- Células com fluorescência positiva para IgG,
em gengiva humana lavada antes da fixação.
Índice Gengival = 2. Aumento 320 X

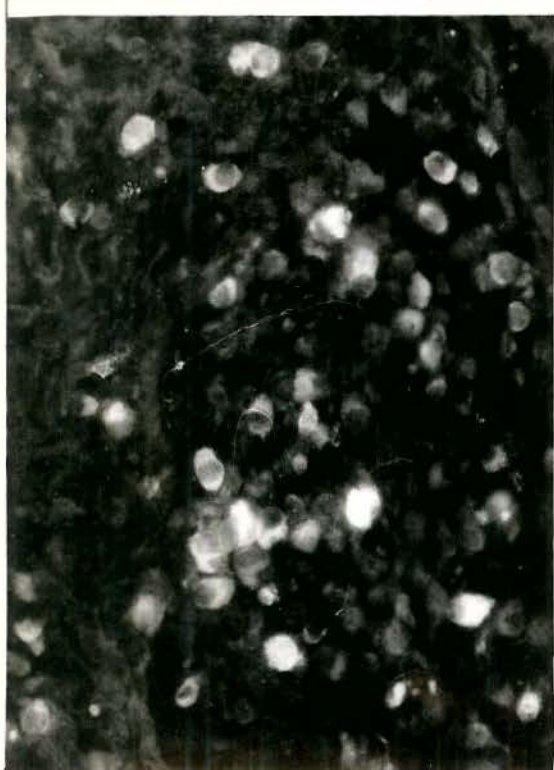
Fig. 21- Células com fluorescência positiva para IgG,
em gengiva humana lavada antes da fixação.
Índice Gengival = 3. Aumento 50X.



18



19



20



21

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que as gengivas sem sinais clínicos de inflamação (IG=0), apresentaram como significativo aspecto microscópico um pequeno infiltrado de linfócitos e macrófagos, especialmente no tecido conjuntivo subjacente ao epitélio juncional. Os aspectos ajustam-se ao quadro descrito por PAYNE et al. (1975) e por LINDHE et al. (1980) em gengivas clinicamente normais, que apresentou uma suave reação inflamatória. Neste grupo de gengivas IG=0 registramos a ocorrência de IgG e menores proporções de IgA, que mostraram entre si uma relação de 2.95:1. BIERSE et al. (1975) demonstraram a presença destas imunoglobulinas, pela técnica de imunodifusão analisando misturas de gengivas clinicamente normais e GARROCHO (1980) as detectou com técnica de imunofluorescência. Esta evidência é confirmada pela presença de IgG e IgA, que têm sido detectadas no lavado de sulcos gengivais de pacientes normais, e que são provenientes do tecido gengival, através do sulco (RIZZO & MERGENHAGEN 1977). IgG, menores proporções de IgA e IgM têm sido constatadas difundidas no tecido conjuntivo de gengiva normal (BRANDTZAEG 1973, GENCO et al. 1974) e IgG também em plasmócitos (GENCO et al. 1974). Pelo método de estudo ora empregado, as seções processadas para IgM apresentaram-se idênticas às contraprovas não coradas, pelo que lhes foi atribuído valor zero na computação com a ocular integradora ou seja, ausência de IgM.

A presença de imunoglobulinas, predominantemente IgG, a seguir IgA e depois IgE, são resultados deste traba-

lho, que sugerem sua síntese por outras células que não plasmócitos, pois estes não foram observados nas preparações coradas com hematoxilina-eosina. Considerando que a lavagem das biópsias, com salina isotônica, antes da fixação, remove ria as imunoglobulinas difundidas extracelularmente e as citofílicas, as observações referiram-se, evidentemente a imunoglobulinas intracelulares, sintetizadas por linfócitos B. Realmente, é provável que um tipo de resposta do hospedeiro humano aos antígenos da placa dental seja a produção de anti corpos pelos linfócitos B e sua progênie, os plasmmócitos (RIZZO & MERGENHAGEN 1977). BRANDTZAEG & TOLO (1977) afirmam que após o estímulo os linfócitos B se diferenciam em células produtoras de IgG, com morfologia variada, sendo os plasmócitos o estágio final. Estas imunoglobulinas da gengiva IG=0 podem, no caso, configurar uma resposta imunológica à presença constante do que O'LEARY (1970), SOCRANSKY (1977), SLOTS (1980) consideraram uma microflora ou microbiota compatível com a normalidade gengival clínica.

Os resultados sobre a presença de IgE em mononucleares das gengivas IG=0 apresentados contrapõem-se aos dados de GENCO et al. (1974), que a observaram somente em plasmócitos de gengivas inflamadas. BRANDTZAEG (1973) relatou que células contendo IgE são muito raras na gengiva enquanto SCHWARTZ & DIBBLEE (1975) demonstraram IgE, em cultura de tecido gengival humano clinicamente normal e sua relação com a liberação de histamina de mastócitos *in vitro*. Ora, no presente trabalho as imunoglobulinas observadas foram apenas as intracelulares. Quer fosse de origem sistêmica, quer de ori

gem local a IgE extracelular foi, certamente, removida pela lavagem das biópsias antes da fixação. Sabendo-se que mastócitos sofrem degranulação à presença de IgE e de antígeno específico, existem condições para uma reação do tipo anafilática local levando à manifestação de estágios iniciais da gengivite clinicamente observável. Nesta fase da gengivite, IG=1, a reação imunológica se modificaria, aumentando a síntese de IgG, já observada nas gengivas com IG=0. Os dados de SCHWARTZ & DIBBLEE (1975) representam, por sua vez, um subsídio a favor da reação anafilática localizada, como um possível mecanismo envolvido na doença periodontal inflamatória.

As gengivas do grupo IG=1 exibiram aspectos microscópicos compatíveis com os descritos por PAYNE et al. (1975) e PAGE & SCHROEDER (1976) como lesão recente, na qual os linfócitos perfazem, aproximadamente, 75% do total da população do infiltrado. Este quadro histológico, tem sido relatado em gengivite experimental, após quatro a oito dias de acúmulo de placa dental, a partir da gengiva normal. Em comparação com as gengivas IG=0, nas gengivas IG=1 foram observadas maiores extensões das áreas de infiltrado inflamatório, áreas de desintegração de fibras colágenas e plasmócitos. Estes dados estão condizentes com os de APPELGREN et al. (1979). Especialmente nos exemplares dos grupos IG=2 e IG=3 as diferenças, ao exame com microscopia óptica ordinária, referiram-se mais ao aspecto quantitativo ou de extensão, do que qualitativo da lesão. Nestas condições a diferenciação destas gengivas pode ser feita mais em função da extensão da lesão do que propriamente por características histológicas. Os aspec

tos microscópicos das biópsias dos grupos IG=2 e IG=3 apresentaram-se de acordo com o quadro histológico descrito por PAGE & SCHROEDER (1976) para a lesão estabelecida, que é observada dentro de duas a três semanas de gengivite experimental no homem.

Aos exames de imunofluorescência foram observados sempre resultados positivos para IgG e para IgA, em proporções crescentes com o aumento dos Índices Gengivais; apenas a IgA apresentou um decréscimo no grupo IG=3. A IgG apresentou para a IgA as seguintes relações: no IG=1, 4.85:1 e no IG=2, 6.41:1. Estes resultados parecem adequados quando confrontados com os de BRANDTZAEG (1973) o qual apresentou as seguintes relações de IgG para IgA: 4.3:1 nas biópsias com moderada infiltração e 7.2:1 em biópsias com densa infiltração, entretanto, sem uma caracterização dos aspectos clínicos correspondentes. Assim, faltam parâmetros com que comparar as biópsias do grupo IG=3 deste trabalho, que apresentaram relação IgG:IgA de 55:1. Tal resultado poderia também ser considerado como uma decorrência de que, em relação aos índices gengivais anteriores, neste IG=3 houve uma diminuição de IgA conjugada com um acentuado aumento de IgG.

No conjunto, os resultados da imunofluorescência das gengivas dos grupos IG=1, IG=2 e IG=3 apresentaram as variações crescentes de IgG e IgA de acordo com o que tem sido relatado por BRANDTZAEG (1973), GENCO et al. (1974), BIERSE et al. (1975), BRANDTZAEG & TOLO (1977), GROSS et al. (1979), LALLY et al. (1980). Estes resultados mostram que IgG progressivamente dominou sobre IgA, em conexão com o aumento dos

índices gengivais e, portanto, da inflamação gengival. Estas relações destas imunoglobulinas, na gengiva, seguiria, assim, o modelo de uma resposta imune sistêmica secundária, como referido por BRANDTZAEG (1973), RAMFJORD & ASH (1979).

Aos exames de imunofluorescência detectamos IgM, em baixas proporções, somente em quatro biópsias do grupo IG=2. Esta imunoglobulina tem sido detectada em gengivas inflamadas, pela técnica de imunodifusão. Assim, BIERSE et al. (1975) observaram baixos níveis em 6 de 16 gengivas inflamadas. GROSS et al. (1979) observaram IgM em baixos níveis em 6 de 15 gengivas com IG=0, em 8 de 17 com IG=1 e em 8 de 20 com IG=2. Nas avaliações empregando técnica de imunofluorescência BRANDTZAEG (1973), MARTALLA et al. (1974), GARROCHO (1980) relataram que células com fluorescência positiva para IgM são raramente encontradas, como confirmam PAGE & SCHROEDER (1976). Entretanto SEYMOUR & GREENSPAN (1979), empregando imunofluorescência indireta, para amostras representativas de gengiva com lesão estabelecida, apresentaram dados de que a maioria das células linfóides parecia mostrar IgM ligada à membrana celular. A baixa proporção de células com fluorescência positiva para IgM do presente trabalho poderia ser atribuída às razões seguintes: que grande soma das IgM da gengiva estaria ligada a membranas de células e ainda que a lavagem poderia remover também alguma porção da IgM intracelular. Isto se pode inferir comparando os resultados de GENCO et al. (1974) sobre os plasmócitos com imunofluorescência para IgM em gengivas inflamadas lavadas e não lavadas antes da fixação. Esta classe de imunoglobulina parece ser

de grande importância nos primeiros poucos dias da resposta imune primária. Quando um antígeno estranho é introduzido no hospedeiro pela primeira vez, a síntese de anticorpos IgM e IgG começa quase simultaneamente; entretanto, o nível de anticorpos IgM atinge o máximo dentro de poucos dias e então declina mais rapidamente que o nível de anticorpos IgG (BELLANTI 1978). Provavelmente, na gengiva, a dificuldade de detectar IgM seja devida a que ela esteja presente por curtos períodos de tempo, subsequentes às modificações das peculiaridades antigênicas da placa dental.

Com o conjunto dos resultados relativos às imunoglobulinas, que configuram a resposta imune humoral, procuramos estabelecer algumas correlações entre aspectos clínicos, histopatológicos e imunológicos da gengivite crônica. Na literatura há discrepâncias sobre as classes de imunoglobulinas que podem ser detectadas nos tecidos gengivais e suas proporções. Tais discrepâncias podem estar relacionadas com o fato de terem os Autores examinado tecidos gengivais tomados em diferentes estágios clínicos da doença periodontal inflamatória crônica, e mesmo a algumas variações de técnica. O método empregado neste trabalho possibilitou detectar imunoglobulinas das classes G, A, M, E, bem como suas variações, de acordo com as diversas condições clínicas da gengiva, conforme caracterização pelo Índice Gengival de LOE & SILNESS (1963). Estas imunoglobulinas intracelulares são de síntese local, corroborando os relatos de que anticorpos podem ser produzidos pelos plasmócitos na gengiva (RIZZO & MERGENHAGEN 1977, BERGLUND 1971, RAMFJORD & ASH 1979). As imunoglobuli-

nas G, A e E foram detectadas nas gengivas IG=0, que ao exame histológico evidenciaram aspectos de uma reação inflamatória suave. Desde que o sulco gengival abriga uma microflora compatível com a gengiva clinicamente normal (SOCRANSKY 1977, SLOTS 1980), porém capaz de prover antígenos, esta situação implicaria também em uma resposta imune, no caso secundária, dada a síntese preferencial de IgG. Modificações nas propriedades imunogênicas da placa dental, a partir do IG=0, provocariam uma intensificação da síntese de IgG como resposta do hospedeiro, ampliando as condições para a reação por imune-complexos, que associada com outros mecanismos imunológicos, levaria à alteração da homeostasia imunológica local e à manifestação da gengivite clinicamente observável. O constante predomínio de IgG sobre as demais gama globulinas, em todos os grupos de gengivas estudados (IG=0, IG=1, IG=2, IG=3), sugere que a manifestação clínica da gengivite crônica encerra uma resposta imunológica humoral secundária.

CONCLUSÕES

Em face dos resultados, nas condições do presente trabalho, apresentam-se as seguintes conclusões:

- 1- Imunoglobulinas das classes G, A, M e E podem ser sintetizadas pelos imunócitos gengivais.
- 2- Células com fluorescência positiva para IgG e IgA foram observadas em todas as gengivas humanas estudadas.
- 3- Fluorescência positiva para IgG, aumentou paralelamente ao Índice Gengival e ao aumento de lesão, observado ao exame histológico.
- 4- Em todas as gengivas examinadas as proporções de IgG foram maiores que as de IgA. As relações IgG:IgA aumentaram paralelamente ao Índice Gengival (IG) e ao aumento da lesão, observado ao exame histológico.
- 5- Células com fluorescência positiva para IgE foram observadas somente nas gengivas sem sinais clínicos de inflamação, com IG=0.
- 6- Células com fluorescência positiva para IgM foram observadas somente nas gengivas com Índice Gengival = 2.

RESUMO

Este trabalho procurou estabelecer correlações entre os aspectos clínicos, histopatológicos e imunológicos da gengivite crônica, em humanos. Vinte pacientes, com boa saúde geral, com idades de 20 a 25 anos, foram selecionados e distribuídos em 4 grupos, de acordo com o Índice Gengival (IG) de LOE & SILNESS (1963). As biópsias gengivais foram lavadas em salina isotônica a 4°C, durante 36-48 horas, fixadas em etanol 95% a 4°C, por 16-24 horas, e incluídas em parafina de baixo ponto de fusão, 51-53°C (SAINTE-MARIE, 1962). As imunoglobulinas intracelulares foram coradas com conjugado fluoresceína anti-soro humano para IgG, IgA, IgM, IgE e IgGAM. Para quantificação das imunoglobulinas foi empregado o procedimento de contagem de pontos de uma ocular integradora Zeiss, que incidiam sobre áreas fluorescentes. Nas gengivas IG=0, sem sinais clínicos de inflamação, foi observado pequeno infiltrado inflamatório de macrófagos e linfócitos no tecido conjuntivo e leucócitos entre as células do epitélio juncional. Na gengiva IG=1 foi observado moderado infiltrado inflamatório de macrófagos, linfócitos e alguns plasmócitos. Nas gengivas IG=2 e IG=3 foram observadas maiores áreas de degradação de colágeno, aumento do número de linfócitos e principalmente de plasmócitos. Pela imunofluorescência IgG e IgA foram detectadas em todas as gengivas, havendo sempre uma predominância de IgG sobre as demais imunoglobulinas estudadas. Com o aumento dos IG e das lesões observadas microscópicamente houve um contínuo aumento

de células contendo IgG intracelular. O mesmo fato foi observado com IgA, apenas com um decréscimo nas gengivas IG=3. As relações IgG:IgA foram: 2,95:1 no IG=0, 4,85:1 no IG=1, 6,4:1 no IG=2 e 55:1 no IG=3. IgE e IgM foram detectadas, em baixas proporções, somente nas gengivas IG=0 e IG=2, respectivamente. Estes resultados sugerem que as modificações nas propriedades imunogênicas da placa dental, a partir de IG=0, provocam uma intensificação da síntese de IgG, como resposta do hospedeiro, ampliando as condições para uma reação por imune-complexos, que associada a outros mecanismos imunológicos, levaria à alteração da homeostasia imunológica local e à manifestação da gengivite clinicamente observável. O constante predomínio de IgG sobre as demais gama globulinas, em todos os índices gengivais estudados, sugere que a manifestação clínica da gengivite crônica encerra uma resposta humoral secundária.

Summary

This work was designed to establish the correlations among the clinical, microscopical and immunological characteristics of naturally occurring gingivitis in humans. Twenty healthy patients, aged 20 to 25 years, were selected and distributed in four groups according to the Gingival Index system (GI) of LOE & SILNESS (1963). The gingival biopsies were washed for 36-48 hours in isotonic saline at 4°C, fixed in ice cold 95% ethanol for 16-24 hours at 4°C and embedded in low melting point (51-53°C) paraffin (Sainte-Marie 1962). The intracytoplasmic immunoglobulins were stained using anti-human fluorescein conjugated IgG, IgA, IgM, IgE and IgGAM (Behring Institute), in 1:10 dilution. The immunoglobulins quantification was performed employing the point counting procedure by using a Zeiss integration ocular. In the GI=0 gingivae, without clinical inflammation, the connective tissue had a mild inflammatory infiltrate of macrophages and lymphocytes, and leukocytes within the junctional epithelium. In the GI=1 gingivae, a moderate infiltrate of macrophages, lymphocytes and some plasma cells was found. In the GI=2 and GI=3 gingivae, larger areas of collagen degradation, and increase in lymphocytes and mainly plasma cells number were observed. By immunofluorescence techniques IgG and IgA were detected in all examined gingivae, with a constant predominance of IgG over the other gamma globulins. With increasing GI and microscopical lesions there was a simultaneous increase of IgG containing

100-1004
10034
T407

cells. The same occurred with IgA in all the GI, but GI=3. The average ratio of IgG:IgA was : 2.95:1 in GI=0, 4.85:1 in GI=1, 6.4:1 in GI=2 and 55.1 in GI=3. A small number of cells containing intracytoplasmic IgE and IgM were detected only in the gingivae with GI=0 and GI=2, respectively. Based on these results it is proposed that the changes in the immunogenic properties of the dental plaque, initiated in the gingivae GI=0, will increase the IgG synthesis as a host response. Consequently increase the possibilities of immune-complexes reaction, that associated with other immunological mechanisms can modify the local immunological homeostasis, with the development of a clinical detectable gingivitis. As IgG was the predominant immunoglobulin in all studied gingivae, it is suggested that the clinical manifestation of chronic gingivitis reflects a secondary humoral immune response.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APPELGREN, R.; ROBINSON, P.J.; KAMANSKI, E.J. Clinical and histologic correlations of gingivitis. J. Periodont., 50: 540-3, 1979.
- BAEHNI, P.; TSAI, C.C.; NORMAN, M.; STOLLER, N.; MCARTHUR, W.P.; TAICHMANN, N.S. Studies of host responses during experimental gingivitis in humans. J. Periodont. Res., 14: 279-88, 1979.
- BAHN, A. Microbial potential in the etiology of periodontal disease. J. Periodont., 41: 603-10, 1970.
- BELLANTI, J.A. Immunology II. Philadelphia, Saunders, 1978. p. 118.
- BERGLUND, S.E. Immunoglobulins in human gingiva with specificity for oral bacteria. J. Periodont., 42: 546-51, 1971.
- BRANDTZAEG, P. Immunochemical comparison of proteins in human gingival pocket fluid, serum and saliva. Archs. oral Biol., 10: 795-803, 1965.
- _____ Local factors of resistance in the gingival area. J. Periodont. Res., 1: 19-42, 1966.
- _____ Immunology of inflammatory periodontal lesions. Int. dent. J., 23: 438-53, 1973.
- _____ & TOLO, K. Immunoglobulin systems of the gingiva. In: LEHNER, T. The borderland between caries and periodontal disease. London, Academic Press, 1977. p. 145-83

BRILL, N. Influence of capillary permeability on flow of tissue fluid into gingival pockets. Acta odont. scand., 17: 23-33, 1959.

_____ & BJORN, H. Passage of tissue fluid into human gingival pockets. Acta odont. scand., 17: 11-21, 1959.

_____ & BRONNESTAM, R. Immuno-electrophoretic study of tissue fluid from gingival pockets. Acta odont. scand., 18: 95-100, 1960.

_____ & KRASSE, B. The passage of tissue fluid into the clinically healthy gingival pocket. Acta odont. scand., 16: 233-45, 1958.

BYERS, G.W.; TOTO, P.D.; GARGIULO, A.W. Levels of immunoglobulins IgG, IgA, and IgM in the human inflamed gingiva. J. Periodont., 46: 387-90, 1975.

CONCLUSÕES DO XIII Seminário Latino Americano de Odontologia: Aspectos imunológicos da doença periodontal inflamatória. Revta Ass. paul. Cirurg. dent., 34: 120, mar/abr. 1980.

EGELBERG, J. Permeability of the dento-gingival blood vessels. IV-Effect of histamine on vessels in clinically healthy and chronically inflamed gingivae. J. Periodont. Res., 1: 297-302, 1966.

ENGLER, W.O.; RAMFJORD, S.P.; HINIKER, J.J. Development of epithelial attachment and gingival sulcus in rhesus monkeys. J. Periodont., 36: 44-56, 1965.

- GARROCHO, A.A. Identificação de IgG, IgA, IgM e C-3 em gengivas normais e gengivites crônicas do homem. Belo Horizonte, 1980 30 p. (Tese (Mestrado)- Faculdade de Odontologia- U.M.G.)
- GENCO, R.J.; MASHIMO, P.A.; KRYGIER, G.; ELLISON, S.A. Antibody-mediated effects on the periodontium. J. Periodont., 45: 330-7, 1974.
- GOLDMAN, H.M. & COHEN, D.W. Periodontal therapy. 5. ed. St. Louis, Mosby, 1973 p. 25-8.
- GRANT, D.A.; STERN, I.B.; EVERETT, F.G. Orban's periodontics. A concept - theory and practice. St. Louis, Mosby, 1972. p. 38.
- GROSS, A.; SETTERSTROM, J.A.; D'ALESSANDRO, S.M.; VON SWOL, R.L. Immunoglobulins in periodontal tissues. I. Concentrations of immunoglobulins in normal and inflamed gingiva. J. Periodont., 50: 581-5, 1979.
- HANCOCK, E.B.; CRAY, R.J.; O'LEARY, T.J. The relationship between gingival crevicular fluid and gingival inflammation. A clinical and histologic study. J.Periodont., 50: 13-9, 1979.
- HARVEY, A.S. & GENCO, R.J. Gingival fluid and serum in periodontal diseases. I. Quantitative study of immunoglobulins, complement and other plasma proteins. J. Periodont., 48: 772-7, 1977.
- HATTING, J. & HO, E. The concentration of proteins in human gingival crevicular fluid. J. Periodont. Res., 15: 90-5, 1980.

HOLTHUIS, A.F.; HOLM-PEDERSEN, P.; FOLKE, L.E.A.

Interepithelial lymphocytes in experimental gingivitis in young and elderly individuals. J. Periodont., 12: 166-78, 1977.

HOOPS, R.M. & JOHNSON, N.W. Cell dynamics of experimental gingivitis in macaques. J. Periodont. Res., 11: 210-7, 1976.

HORTON, J.E.; LEIKEN, S.; OPPENHEIM, J. Human limphoproliferative reaction to saliva and dental plaque deposits. An *in vitro* correlation with periodontal disease. J. Periodont., 43: 522-7, 1972.

_____; OPPENHEIM, J.J.; MERGENHAGEN, S.E. A role for Cell-mediated immunity in the pathogenesis of periodontal disease. J. Periodont., 45: 351-60, 1974.

IVANYI, L. & LEHNER, T. Stimulation of lymphocyte transformation by bacterial antigens in patients with periodontal disease. Archs oral Biol., 15: 1089-96, 1970.

_____ & _____ Lymphocyte transformation by sonicates of dental plaque in human periodontal disease. Archs oral Biol., 16: 1117-21, 1971.

KIGER, R.D.; WRIGHT, W.H.; CREAMER, C.R. The significance of lymphocyte transformation response to various microbial stimulants. J. Periodont., 45: 780-5, 1974.

LALLY, E.T.; BAEHNI, P.C.; MC ARTHUR, W.P. Local immunoglobulin synthesis in periodontal disease. J. Periodont. Res., 15: 159-64, 1980.

- LANG, N.P. & SMITH, F.N. Lymphocyte blastogenesis to plaque antigens in human periodontal disease. I. Populations of varying severity of disease. J. Periodont. Res., 12: 298-309, 1977.
- LINDHE, J.; HAMP, S.E.; LOE, H. Plaque induced periodontal disease in beagle dogs. J. Periodont. Res., 10: 243-55, 1975.
- _____; LILJENBERG, B. LISTGARTEN, M. Some microbiological and histopathological features of periodontal disease in man. J. Periodont., 51: 264-9, 1980.
- LISTGARTEN, M.A. Structure of the microbial flora associated with periodontal disease in man. J. Periodont., 47: 1-18, 1976.
- LÖE, H. & HOLM-PEDERSEN, P. Absence and presence of fluid from normal and inflamed gingiva. Periodontics, 3: 171-7, 1965.
- _____; & SILNESS, J. Periodontal disease in pregnancy. I. Prevalence and severity. Acta odont. scand., 21: 553-51, 1963.
- _____; THEILADE, E.; JENSEN, S.B. Experimental gingivitis in man. J. Periodont., 36: 177-87, 1965.
- MACKLER, B.F.; FROSTAD, K.B.; ROBERTSON, P.B.; LEVY, B.M. Immunoglobulin bearing lymphocytes and plasma in human periodontal disease. J. Periodont. Res., 12: 37-45, 1977.

- MACKLER, B.F.; FANER, R.M.; SCHUR, P.; WRIGHT, III, T.E.;
LEVY, B.M. IgG subclasses in human periodontal disease.
II. Cytophilic and membrane IgG subclass immunoglobulins.
J. Periodont. Res., 13: 433-44, 1978a.
- _____; WALDROP, T.C.; SCHUR, P.; ROBERTSON, P.B.; LEVY,
B.M. IgG subclasses in human periodontal disease. I.
Distribution and incidence of IgG subclasses bearing
lymphocytes and plasma cells. J. Periodont. Res., 13:
109-19, 1978b.
- MARTALLA, W.H.; TOTO, P.D.; GARGIULO, A.W. Identification
of fluorescent antibodies in periodontitis. J. Periodont.,
45: 853-61, 1974.
- MCHUGH, W.D. The development of the gingival epithelium in
the monkey. Dent. Practnr, 11: 314-24, 1961.
- _____ Some aspects of the development of gingival
epithelium. Periodontics, 1: 239-44, 1963.
- MERGENHAGEN, S.E.; De ARAUJO, W.C.; VARAH, E. Antibody to
Leptotrichia buccalis in human sera. Archs oral Biol.,
10: 29-33, 1965.
- _____; TEMPEL, T.R.; SNYDERMAN, R. Immunology reactions
and periodontal inflammation. J. dent. Res., 49: 256-61,
1970.
- NISENGARD, R.J. The role of immunology in periodontal
disease. J. Periodont., 48: 505-16, 1977.
- _____ & JARRETT, C. Coating of subgingival bacteria with
immunoglobulin and complement. J. Periodont., 47: 518-21,
1976.

- NORMAN, M.E.; BAEHNI, P.C.; TSAI, C.C.; STOLLER, N.;
MCARTHUR, W.P.; TAICHMAN, N.S. Studies of host responses
during experimental gingivitis in humans. J. Periodont.
Res., 14: 361-9, 1979.
- O'LEARY, T.J. Oral hygiene agents and procedures.
J. Periodont., 41: 625-9, 1970.
- OLIVER, R.C.; HOLM-PEDERSEN, P.; LOE, H. The correlation
between clinical scoring, exudate measurements and
microscopical evaluation of inflammations in the gingiva.
J. Periodont., 40: 201-9, 1969.
- ORSTRAVIK, D. & BRANDTZAEG, P. Serum antibodies to plaque
bacteria in subjects with dental caries and gingivitis.
Scand. J. dent. Res., 85: 106-13, 1977.
- PAGE, R.C. & SCHROEDER, H. Pathogenesis of inflammatory
periodontal disease. A summary of current work.
Lab. Invest., 33: 215-49, 1976.
- PATTERS, M.R.; SEDRANSKY, N. GENCO, R.J. Lymphoproliferative
response during resolution and recurrence of naturally
occurring gingivitis. J. Periodont., 48: 373-80, 1977.
- _____ & _____ & _____ The lymphoproliferative
response during human experimental gingivitis. J. Periodont.
Res., 14: 269-8, 1979.
- _____ ; GENCO, J.R.; REED, M.J.; MASHIMO, P.A. Blastogenic
response of lymphocytes to oral bacterial antigens:
comparison of individuals with periodontal disease to
normal and edentulous subjects. Infect. Immun., 14: 1213-
20, 1976.

PAYNE, W.A.; PAGE, R.C.; OGILVIE, A.L.; HALL, W.B.

Histopathologic features of the initial and early stages of experimental gingivitis in man. J. Periodont. Res., 10: 51-64, 1975.

RAMFJORD, S.P. & ASH, M.M. Periodontology and periodontics. Philadelphia, Saunders, 1979 p. 229.

RIZZO, A.A. & MERGENHAGEN, S.E. Host responses in periodontal disease. In: International Conference on Research in the Biology of Periodontal Disease. Chicago, III., 12-15 June 1977. Chicago, III., College of Dentistry, 1977. Sect. 4. p.200-1.

SAINTE- MARIE, G. A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. J. Histochem. Cytochem., 10: 250-61, 1962.

SCHENKEIN, H.A. & GENCO, R.J. Gingival fluid and serum in periodontal diseases. I. Quantitative study of immunoglobulins, complement components, and other plasma proteins. J. Periodont., 48: 772-7, 1977.

SCHLUGER, S.; YOUDELIS, E.A.; PAGE, R.C. Periodontal Disease. Basic phenomena, clinical management, and occlusal and restorative interrelationships. Philadelphia, Lea & Febiger, 1977. p.222.

SCHROEDER, H.E. Quantitative parameters of early human gingival inflammation. Archs oral Biol., 15: 383-400, 1970.

_____; BEER, M.G.; ATTSTROM, R. Initial gingivitis in dogs. J. Periodont. Res., 10: 128-42, 1975.

- SCHWARTZ, J. & DIBBLEE, M. The role of IgE in the release of histamine from human gingival mast cells. J. Periodont., 46: 171-7.
- SEYMOUR, G.J. & GREENSPAN, J.S. The phenotypic characterization of lymphocyte subpopulations in established human periodontal disease. J. Periodont. Res., 14: 39-46, 1976.
- SHAPIRO, L.; GOLDMAN, H.; BLOOM, A. Sulcular exsudate flow in gingival inflammation J. Periodont., 50: 301-4, 1979.
- SHILLOTOE, E.J. & LEHNER, T. Immunoglobulins and complement in crevicular fluid, serum and saliva in man. Archs oral Biol., 17: 241-7, 1972.
- SIMON, B.I.; GOLDMAN, H.M.; RUBEN, P.M.; BAKER, E. The role of endotoxin in periodontal disease. III. Correlations of the amount of endotoxin in human gingival exudate with the histologic degree of inflammation. J. Periodont., 42: 210-6, 1971.
- SLOTS, J. Subgingival microflora and periodontal disease. Periodont. Abstr., 28: 76-7, 1980.
- SMITH, F.N. & LANG, N.P. Lymphocyte blastogenesis to plaque antigens in human periodontal disease. II. The relationship to clinical parameters. J. Periodont. Res., 12: 310-7, 1977.
- _____: _____; LÖE, H.A. Cell mediated immune responses to plaque antigens during experimental gingivitis in man. J. Periodont. Res., 13: 232-9, 1978.

- SNYDERMAN, R. Immunological mechanisms of periodontal tissue destruction. J. Am. dent. Ass., 87 (spec. issue): 1020-6, 1973.
- SOCRANSKY, S.S. Microbiology of periodontal disease - present status and future considerations. J. Periodont., 48: 497-504, 1977.
- STALLARD, R.E.; ORBAN, J.E.; HOVE, K.A. Clinical significance of the inflammatory process. J. Periodont., 41: 620-4, 1970.
- TOLLEFSEN, T. & SALTVEDT, E. Comparative analysis of gingival fluid and plasma by crossed immunoelectrophoresis. J. Periodont. Res., 15: 96-106, 1980.
- WILDE, G.; COOPER, M.; PAGE, R.C. Host tissue response in chronic periodontal disease. VI. The role of cell-mediated hypersensitivity. J. Periodont. Res., 12: 179-96, 1977.
- ZACHINSKY, L. Range of histologic variations in clinically normal gingiva. J. dent. Res., 33: 580-9, 1954.
- ZACHRISSON, B.U. Histologic study of experimental gingivitis in man. J. Periodont. Res., 3: 292-5, 1968.
- _____ & SCHULTZ-HAUDT, S.D. A comparative histologic study of clinically normal and chronically inflamed gingivae from the same individuals. Odont. Tidskr., 76: 179-92, 1968.