

ANÁLISE DE ANTICORPOS IgG e IgA ANTI-Streptococcus  
mutans  
NA GENGIVITE EM CRIANÇAS

Luciana Paula Lopes BARBI\*  
Carmelinda Schmidt UNTERKIRCHER\*\*  
Luiz Fernando de Almeida CANDELÁRIA\*\*\*

- **RESUMO:** Streptococcus mutans tem sido fortemente implicado como um dos agentes causadores da cárie dentária, sendo freqüentemente isolado da placa dentária humana. Neste estudo, examinamos a reatividade dos anticorpos IgG e IgA anti-S. mutans em amostras de fluido gengival de crianças com e sem gengivite, a fim de medir a participação deste microrganismo na reação inflamatória envolvendo os tecidos gengivais. Nossos achados mostraram um nível aumentado de IgG anti-S. mutans no fluido gengival de crianças com gengivite.
- **PALAVRAS-CHAVE:** Gengivite; imunoglobulinas; Streptococcus mutans.

## Introdução

A gengivite é definida como uma inflamação restrita aos tecidos gengivais e que tem como causa principal a placa bacteriana.<sup>2, 11, 12, 21, 24</sup> Sendo uma doença bastante freqüente em crianças, tanto na dentição

\* Aluna de Especialização em Odontopediatria – Faculdade de Odontologia – UNESP – 12245-000 – São José dos Campos – SP.

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

\*\*\* Departamento de Clínica Infantil – Faculdade de Odontologia – UNITAU – 12100-000 – Taubaté – SP.

decídua como mista, é importante que o odontopediatra conheça bem sua etiologia e patogênese, para fazer o diagnóstico correto, prevenção e tratamento.<sup>7, 24</sup> Para isso, é importante conhecer os microrganismos envolvidos na placa bacteriana, tanto na saúde gengival quanto na inflamação e a resposta imunológica que estes provocam, pois qualquer patologia tem início no desequilíbrio entre o fator agressor e a resposta do hospedeiro. Nesse ponto, achamos de grande valia, o conhecimento de como respondem os tecidos do periodonto à placa bacteriana, causando ou não doença.

Neste trabalho, analisamos os níveis de anticorpos IgG e IgA anti-*Streptococcus mutans* em crianças com e sem gengivite. Sabemos que esse microrganismo tem importante papel na placa bacteriana cariogênica, mas sua participação na inflamação gengival não tem sido discutida na literatura. Assim, com o objetivo de preencher essa lacuna no conhecimento relativo à etiologia das gengivites da infância, decidimos estudar a resposta imune humoral anti-*S. mutans* no fluido crevicular gengival.

## Material e método

### População estudada

Foram selecionadas quarenta crianças, com idades entre 3 e 11 anos, sendo vinte com gengivite (média de idade = 6,3 anos) e vinte sem gengivite (média de idade = 5,7 anos), da comunidade Emaús e do Lar do Menor da cidade de Ubatuba /SP. Todas as crianças com gengivite apresentavam pelo menos três sítios na arcada superior com inflamação gengival. Em cada criança foi realizado exame bucal com luz natural e com auxílio de afastadores de língua. Foram avaliados os índices CPOD e ceo. O índice CPOD representa a média de dentes permanentes cariados (C), extraídos (P) e obturados (O) por indivíduo, enquanto o índice ceo representa a média de dentes decíduos cariados (c), com extração indicada (e) e obturados (o) por criança.

Para cada criança foi preenchida uma ficha e as amostras coletadas, enumeradas de acordo com o número correspondente do paciente, acrescentando-se a letra "S" para os controles e "G" para os pacientes com gengivite.

## Coleta de amostras

As amostras de material do sulco gengival foram coletadas com cones de papel absorvente esterilizados (nº50, DENTSPLY), cortados numa altura de 15 mm, de maneira que cada cone poderia absorver aproximadamente 10 µl de fluido gengival. Isolado o sulco vestibular superior com roletes de algodão, os cones de papel, três para cada paciente, foram colocados no interior do sulco gengival vestibular com o auxílio de pinça clínica esterilizada, sendo mantidos em posição por três minutos. Após a coleta, os cones de papel foram colocados em tubos tipo ependorf e armazenados a -20°C até o uso.

## Antígeno de *S. mutans*

Para o preparo do antígeno, a cepa CCT 1910 (ATCC 35668) de *S. mutans* foi cultivada em 2.000 ml de caldo triptico de soja (TSB-DIFCO) distribuído em três frascos de Erlenmeyer, a 37°C, por 24 horas, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, o crescimento foi interrompido com formaldeído 0,075% e a cultura deixada por 18 horas a 4°C. A seguir, as células foram colhidas por centrifugação e lavadas três vezes em Tris-HCL 125 mM, EDTA 10 mM, pH 7,5. Em seguida, as células foram suspensas em 50 ml do mesmo tampão e acrescentado fluoreto de fenilmetil sulfonyl (P7626-SIGMA) numa concentração final de 5 mM. Pérolas de vidro foram então adicionadas à suspensão, que foi agitada vigorosamente por toda a noite, a 4°C. A seguir, o lisado foi centrifugado a 7.000 rpm, por 30 minutos, a 4°C, e o sobrenadante dialisado contra o mesmo tampão e liofilizado.

## Técnica ELISA

Placas de polistireno, com 96 orifícios (Costar, USA), foram sensibilizadas com 100 µg/ml (peso seco) de antígeno de *Streptococcus mutans* em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH 9,6 e incubados por 1 h e 30 min a 37°C e depois guardadas a 4°C até o uso. Antes do uso, as placas foram lavadas duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e os sítios livres do polistireno, bloqueados com 0,5% de gela-

tina (G) em PBS, por 30 min, a 37°C. Após esse período, as placas foram lavadas com PBS, contendo 0,01% de TWEEN 20 (PBS-T). A seguir, acrescentou-se aos ependorfs 300 µl de PBS-T-G, agitou-se vigorosamente num Vortex e incubou-se por 30 min a 37°C.

Após, adicionou-se aos orifícios das placas, já lavadas, 50 µl do fluido gengival diluído em duplicata e incubaram-se as amostras por 2 h a 37°C. Em seguida, após mais uma etapa de lavagem, foi adicionado o conjugado anti-IgG e anti-IgA humanas marcadas com peroxidase (SIGMA) numa concentração de (2 µg/ml), e as placas foram novamente incubadas por 1 h e 30 min, a 37°C.

O complexo antígeno-anticorpo foi revelado com o substrato consistindo de 20 ml de tampão citrado – ácido cítrico 0,1M, pH 5,5 com 10 mg de ortofenilenodiamino (OPD-SIGMA) e 20 µl de água oxigenada a 0,03 %.

A reação desenvolveu-se por 10 min, sendo em seguida bloqueada pela adição de 50 µl de ácido sulfúrico 2,5 N. As densidades óticas foram lidas a 492 nm, num leitor ELISA (BIO RAD-modelo 3550) equipado com impressora.

## Resultado

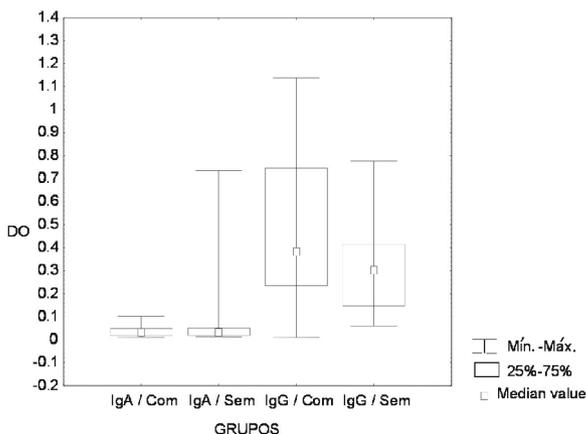


FIGURA 1 – Representação gráfica tipo BOX/WHISKER PLOT dos resultados obtidos na análise dos fluidos gengivais. Optamos por este tipo de gráfico porque coloca em evidência a metade principal da distribuição dos valores. Na parte central, faixa inter-quartil, encontram-se os dados mais estáveis e importantes.

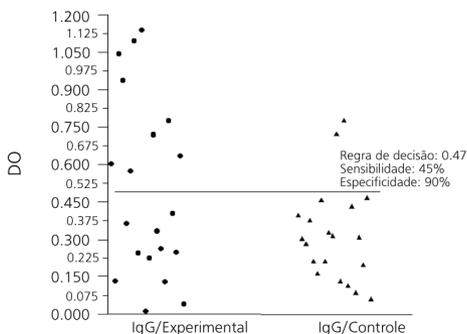


FIGURA 2 – Reatividade de IgG anti-*Streptococcus mutans* nos grupos experimental (n = 20) e controle (n = 20). Resultados expressos em DO a 492 nm. A linha contínua representa o valor de decisão igual a 0,47.

Os resultados obtidos foram expressos em valores de densidade ótica (DO) a 492 nm e são apresentados nas Figuras 1 e 2.

Pode-se observar que o valor mediano (0,3838) do grupo IgG com gengivite mostra que dez pacientes apresentaram valores superiores a quinze pacientes do grupo IgG sem gengivite, indicando, assim, uma maior resposta imunológica anti-*Streptococcus mutans*. Já os grupos IgA com gengivite e IgA sem gengivite apresentaram o mesmo desempenho, ou seja, sem diferença significativa do ponto de vista imunológico. A reatividade para IgA, embora muito reduzida, apresentou um valor discrepante, muito acima dos demais (DO = 0,73) no grupo controle.

Analisando os resultados de IgG, verificamos que o grupo IgG com gengivite apresentava valores medianos superiores ao grupo IgG sem gengivite, 0,3838 e 0,3044 respectivamente. A faixa interquartil (Q3 – Q1) apresentou maior variabilidade para o grupo IgG com gengivite. O teste “t” de Student indicou um valor de prova (p) de 0,051% muito próximo do valor convencional de significância de 5%. Se aumentássemos o tamanho da amostra, o teste estatístico teria maior poder e poderíamos, assim, evidenciar de modo mais claro uma diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos IgG com e sem gengivite.

Usando como regra de decisão o valor de 0,47 de DO para separação dos dois grupos IgG com e sem gengivite, observamos um valor de especificidade de 90% e sensibilidade de 45%. Nesta condição, no grupo

controle, 18 crianças apresentaram valores de DO abaixo de 0,47, enquanto no grupo experimental nove ficaram abaixo deste limiar.

Os índices CPOD e ceo também foram avaliados, mas os escores obtidos não apresentaram nenhuma correlação com os níveis de IgG.

## Discussão

A placa bacteriana é o fator etiológico determinante da gengivite, sendo apenas alguns microrganismos responsáveis pela ocorrência da inflamação gengival.<sup>2, 3, 7, 8, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 21, 24</sup>

Löe et al.<sup>14</sup> observaram que é necessário a colonização seqüencial e a maturação da placa bacteriana para que haja um quadro de gengivite. Em crianças, há fatores que favorecem esse crescimento bacteriano, como a presença de dentes em erupção com sulco gengival aumentado, as próprias alterações inflamatórias do tecido gengival durante a fase eruptiva, a dificuldade de higienização, o alto consumo de sacarose, a presença de lesões cariosas, dentes em processo de esfoliação e a presença de raízes residuais dos dentes decíduos.<sup>2, 24</sup>

Vários estudos demonstram que os estreptococos do grupo "mutans" colonizam a cavidade bucal a partir da erupção dos primeiros dentes decíduos, fazendo então parte da microbiota normal do hospedeiro.<sup>10, 23</sup>

Sabemos que na placa bacteriana próxima da gengiva sadia predominam várias espécies de estreptococos, incluindo *S. mutans*, e ainda que a gengivite está associada com uma mudança de microbiota, inicialmente dominada por cocos Gram-positivos, para uma microbiota mais complexa incluindo bactérias anaeróbias Gram-negativas e formas espiraladas.<sup>10</sup>

Como o *Streptococcus mutans* está presente, em maior ou menor quantidade, na placa bacteriana, esse microrganismo deve participar da etiologia da gengivite. *S. mutans* sintetiza um polissacarídeo extra-celular, o dextrano, com importante potencial para estimular as células B, sem o auxílio dos linfócitos T (estimulação policlonal). Além disso, os ácidos lipoteicóicos e o muramil dipeptídeo ativam os macrófagos que liberam o fator de necrose tumoral (FNT) iniciando o processo inflamatório.<sup>1</sup>

Na literatura científica, são raros os trabalhos que analisam os fatores de virulência de *S. mutans* com relação aos tecidos gengivais, dificultando a discussão de nossos resultados.

Duarte et al.<sup>4</sup> não consideram esse microrganismo agressivo para o periodonto, destacando apenas seu potencial cariogênico. Outros autores também discutem seu envolvimento na cárie dentária, sem mencionar seu papel na gengivite em crianças.<sup>8, 9, 10, 18, 20, 25</sup>

Entretanto, para Russel et al.,<sup>22</sup> o *S. mutans* é potencialmente agressivo para vários tecidos, e pessoas sistemicamente expostas a esse microrganismo podem desenvolver uma forte resposta imunológica de IgG e IgA, manifestando inclusive anticorpos com reatividade cruzada com o coração.

Na gengivite, a síntese local de anticorpos por plasmócitos presentes nos tecidos gengivais inflamados é mais importante na defesa imunológica que a resposta sistêmica, pois nesses locais os níveis de anticorpos específicos estão mais elevados que no soro e na saliva.<sup>12</sup> IgG e IgA estão possivelmente relacionadas com a neutralização dos estreptococos do grupo mutans e inibição de seus fatores de virulência pelo bloqueio dos determinantes de aderência, redução de hidrofobicidade e aglutinação bacteriana.<sup>6, 23</sup>

Segundo Ebersole et al.,<sup>5</sup> a resposta local de anticorpos específicos para determinadas bactérias da placa pode identificar sítios com risco potencial de desenvolvimento de lesão periodontal ativa antes mesmo dos primeiros sinais clínicos de doença periodontal.

Neste estudo, os níveis de IgA anti-*S. mutans* não foram significativos. Já a imunoglobulina IgG estava aumentada na vigência de inflamação gengival, sugerindo tratar-se de um transudato. A indução precoce de anticorpos séricos, da classe IgG, pelo *Streptococcus mutans*, pode ser importante na proteção do esmalte imaturo no período de erupção dos dentes e na neutralização de enzimas e outros metabólitos potencialmente tóxicos para os tecidos periodontais.

## Conclusão

Crianças com gengivite apresentam níveis mais altos de IgG anti-*Streptococcus mutans* no fluido gengival que crianças com gengiva sadia. Nenhuma diferença foi observada nos níveis de IgA específica para esse microrganismo.

BARBI, L. P. L., UNTERKIRCHER, C. S., CANDELÁRIA, L. F. A Anti-Streptococcus mutans IgG and IgA analysis in children with or without gingivitis. Rev. Odontol. UNESP (São Paulo), v.28, n.2, p.263-271, 1999.

- **ABSTRACT:** Streptococcus mutans has been strongly implicated as one of the causative agents of dental caries and it is frequently isolated from human dental plaque. In this study, we examined the reactivities of IgA and IgG antibodies against *S. mutans* in samples of crevicular fluid from children with or without gingivitis, in order to measure the participation of this microorganism in the inflammatory reaction affecting the gingival tissue. Our findings showed an increased level of IgG against Streptococcus mutans in crevicular fluid from children with gingivitis.
- **KEYWORDS:** Gengivitis; immunoglobulin; *S. mutans*.

## Referências bibliográficas

- 1 ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., POBER, J. S. Cellular and molecular immunology. 2.ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1994. p.262-69.
- 2 CARRANZA JUNIOR, F. A. et al. Periodontia clínica de Glickman. 5.ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1983. p.11-18, 71-79, 85-88 .
- 3 COCHRAN, D. L. et al. Remoção de placa e cálculo: considerações para o profissional. São Paulo: Quintessence, 1996. p.1-29.
- 4 DUARTE, C. A., MARCONDES, P. C., RAYEL, A. T. Transmissibilidade de microbiota bucal em humanos: repercursão sobre o dente e o periodonto: revisão da literatura. Rev. Periodontia, v.4, p.211-14, 1995.
- 5 EBERSOLE, J. L., TAUBMAN, M. A., SMITH, D. J. Gingival crevicular fluid antibody to oral microorganism. J. Periodontol. Res., v.20, p.349-56, 1985.
- 6 GREGORY, R. L. et al. Function of anti-Streptococcus mutans antibodies: inhibition of virulence factors and enzyme neutralization. Oral Microbiol. Immunol., v.5, p.181-88, 1990.
- 7 GUEDES-PINTO, A. C. Doenças periodontais na infância e adolescência. In: \_\_\_\_\_. Odontopediatria. 5.ed. São Paulo: Santos, 1990. p.385-415.
- 8 HARDIE, J. M. Oral microbiology: current concepts in the microbiology of dental caries and periodontal disease. Br. Dent. J., v.172, p. 271-78, 1992.
- 9 HIROSE, H. et al. Close association between Streptococcus sobrinus in the saliva of young children and smooth surface caries increment. Caries Res., v.27, p.292-97, 1993.
- 10 JORGE, A. O. C. Microbiologia bucal. São Paulo: Santos, 1995. p.121.

- 11 LASCALA, N. T., MOUSSALLI, N. H. *Compêndio terapêutico periodontal*. 2.ed. São Paulo: Artes Médicas, 1995. p.3-13, 92-107.
- 12 LINDHE, J. *Tratado de periodontologia clínica*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1992. p.493.
- 13 LISTGARTEN, M. A. The structure of dental plaque. *Periodontol.* 2000, v.5, p.52-65, 1994.
- 14 LOE, H., THEILADE, E., JENSEN, S. D. Experimental gingivitis in man. *J. Periodontol.*, v.36, p.177-87, May-June, 1965.
- 15 MANSON, J. D., ELEY, B. M. *Manual de periodontia*. 2.ed. São Paulo: Santos, 1993. p.43-156.
- 16 MOORE, L. V. H. et al. Bacteriology of human gingivitis. *J. Dent. Res.*, v.66, n.5, p.989-95, May, 1987.
- 17 MOORE, W. E. C., MOORE, L. V. H. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol.* 2000, v.5, p.66-77, 1994.
- 18 MORINUSHI, T., LOPATIN, D. E., TANAKA, H. The relationship between dental caries in the primary dentition and anti-S. mutans serum antibodies in children with Down's Syndrome. *J. Clin. Pediatr.*, v.19, p.279-84, 1995.
- 19 PAGE, R. C. Gingivitis. *J. Clin. Periodontol.*, v.13, p.345-55, 1986.
- 20 POLLARD, M. A., CURZON, M. E. J. Dental health and salivary *Streptococcus mutans* levels in a group of children with heart defects. *Int. J. Pediatr. Dent.*, v.2, p.81-5, 1992.
- 21 RAMFJORD, S. P., ASH JUNIOR, M. M. Patogênese e histopatologia da doença periodontal. In: \_\_\_\_\_. *Periodontologia e periodontia: teoria e prática moderna*. 2.ed. São Paulo: Santos, 1991. p.46-240.
- 22 RUSSELL, M. W. et al. Serum antibody responses to *Streptococcus mutans* antigens in humans systemically infected with oral streptococci. *Oral Microbiol. Immunol.*, v.7, p.321-25, 1992.
- 23 THYLSTRUP, A., FEJERSKOV, O. *Cariologia clínica*. 2.ed. São Paulo: Santos, 1995. p.42-69.
- 24 TOLEDO, O. A. Doença periodontal na criança. In: \_\_\_\_\_. *Odontopediatria fundamentos para a prática clínica*. São Paulo: Panamericana, 1986. cap.5, p.85-99.
- 25 TUKIA-KULMALA, H., TENOVUO, J. Intra-and-inter-individual variation in salivary flow rate, buffer effect, lactobacilli, and mutans *Streptococci* among 11 to 12 year-old schoolchildren. *Acta Odontol. Scand.*, v.51, p.31-7, 1993.