

VERIFICAÇÃO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA DA PRESENÇA DE ANTICORPOS NO SORO E NA SALIVA DE HUMANOS DIRIGIDOS CONTRA *Candida albicans*

Luiz Antonio Guimarães CABRAL*

RESUMO: Soro e saliva de 20 indivíduos sãos e de 20 pacientes com diagnósticos vários, que não "doença auto-imune", e apresentando sinais clínicos de candidíase bucal, foram investigados por imunofluorescência indireta (I.I.) quanto à presença de anticorpos (Acs) dirigidos contra *Candida albicans*. Os títulos séricos dos indivíduos normais variavam entre 4 e 64 e apenas um caso apresentou positividade de título 1 na saliva; nos pacientes com sinais clínicos de infecção bucal por *Candida* os títulos séricos, também todos positivos, variaram entre 32 e 2048 e na saliva a positividade foi constante com títulos de 1 a 16. Em um terceiro grupo, constituído de 30 pacientes com "doença auto-imune" e tratamento imunossupressor, os títulos séricos variavam de 32 a 2048 e os salivares de 1 a 8. Três pacientes com "doenças auto-imunes" sem o tratamento específico e sem sinais clínicos de infecção bucal por *Candida* tiveram os títulos séricos de 64, 8 e 8 e negatividade na saliva. A pesquisa pela I.I. das classes G, M, A, D e E das imunoglobulinas, nas amostras de soro e saliva com concomitância de positividade de Acs contra *C. albicans* A, revelou a concorrência das classes IgG, IgM, IgA e IgD no soro e na saliva, quando de sinais clínicos de candidíase bucal.

UNITERMOS: Candidíases; imunossupressão; imunofluorescência; anticorpos séricos e salivares.

INTRODUÇÃO

NORRIS & RAWSON²⁹ e WINNER³⁹, utilizando técnicas de aglutinação em tubo e em placa, respectivamente, demonstraram a presença de anticorpos (Acs) séricos contra *Candida albicans* em cerca de 80 a 90% de indivíduos normais.

LEHNER²², por técnica de imunofluorescência indireta (I.I.), verificou a presença desses Acs na saliva paralelamente ao soro, em indivíduos com ausência de *C. albicans* na saliva, em portadores de *Candida* na saliva e pacientes com candidíase bucal.

Apesar de controvérsia da literatura em relação à presença ou ausência dos Acs, circulantes nas candidíases e o pequeno significado das mesmas⁴⁰, LOPES-MARTINEZ²⁶ ressalta a importância destes Acs dirigidos contra *C. albicans*, determinadas por técnicas

entre as quais a I.I., no diagnóstico da infecção pelo fungo.

Pelo método da I.I. comprova-se a elevada incidência da candidíase sistêmica em indivíduos hospitalizados sob terapêutica com antibióticos, corticoesteróides e imunossupressores, condições estas mencionadas por LOPEZ-MARTINEZ²⁶ e também por outros autores^{7,11,17}

A infecção bucal por *C. albicans* em pacientes sob as condições do parágrafo anterior é relatada em vários trabalhos^{3,8,14,27,28}, somando-se o fato de que MARCUCCI²⁷, constatou a maior frequência do fungo na cavidade bucal de pacientes com pêfigo foliáceo e tratados com corticoesteróides.

BUDTZ-JÖRGENSEN⁴, admite que o aumento dos títulos dos Acs séricos, quando

* Departamento de Diagnóstico e Cirurgia — Faculdade de Odontologia — UNESP — 12.200 — São José dos Campos-SP.

da infecção bucal por *Candida*, deve ser devido à disseminação sistêmica do fungo.

Após padronizarmos a metodologia de investigação por I.I. dos Acs. no soro e na saliva contra *C. albicans*, investigamos os títulos dos mesmos em indivíduos sadios e portadores de sinais clínicos de candidíase bucal concomitante a várias enfermidades terapêuticas, procurando ainda verificar as classes das imunoglobulinas (Igs) envolvidas; objetivando, destarte, uma análise mais exata e imunologia sérica e salivar do organismo sob doenças consideradas como "auto-ímmunes" e na vigência de terapêutica específica.

MATERIAL E MÉTODOS

Na identificação pela técnica da I.I. dos Acs. dirigidos contra *C. albicans* no soro e na saliva, foi utilizado anti-soro de coelho resultante da imunização do mesmo com as frações gamaglobulínicas de soro humano e de "pool" tetraconcentrado de salivas humanas totais de pacientes sadios, frações estas separadas por precipitação com sulfato de amônia⁵. Após esquema de imunização,

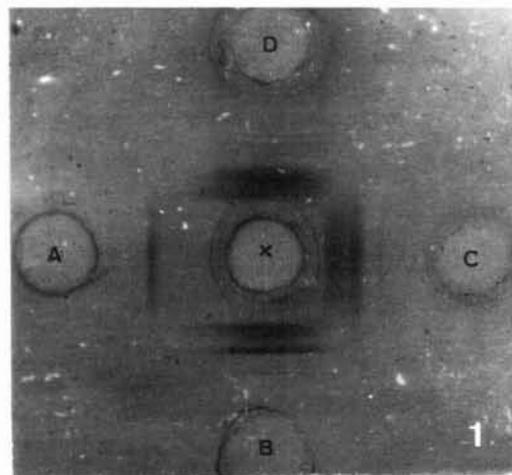


FIG. 1 — Fotografia de placa onde se processou a dupla difusão em agarose: X - Antisoro obtido em coelho. A - Fração gamaglobulínica obtida de saliva humana, B - Saliva humana total, C - Fração gamaglobulínica de soro humanos e D - Soro humano total.

do anti-soro induzido no coelho, foi separada a fração gamaglobulínica pelo método anterior, a qual, semelhante aos resultados de ELLISON *et alii*⁹ e LEACH *et alii*²¹, pelo teste de precipitação em placa, mostrou especificidade contra as gamaglobulinas contidas no soro e na saliva total de humanos (Fig. 1) e foi conjugada com isotiocianato de fluoresceína.

Amostras de saliva total no volume de 10,0 ml, obtida sem estímulo, e soro contido no volume de 10,0 ml de sangue foram colhidas de quatro grupo de indivíduos:

- 1.º Grupo: 20 indivíduos adultos, sãos, voluntários, 7 do sexo masculino, e 13 do sexo feminino, não apresentando sinais clínicos de candidíase bucal.
- 2.º Grupo: 20 indivíduos adultos, voluntários de enfermarias hospitalares, com diagnóstico que não de doenças tidas como "auto-ímmunes" e terapêuticas várias sem concorrências de corticosteróides ou imunossupressores, 8 do sexo masculino e 12 do sexo feminino, todos apresentando sinais clínicos de candidíase bucal.
- 3.º Grupo: 30 pacientes adultos, voluntários de enfermarias hospitalares, com diagnóstico de "doenças auto-ímmunes" e terapêutica imunossupressora, 3 do sexo masculino e 27 do sexo feminino, salientando-se o fato que 10 destes apresentavam sinais clínicos de candidíase bucal.
- 4.º Grupo: 3 indivíduos adultos, voluntários, acometidos por "doenças auto-ímmunes", isentos de terapêutica, todos do sexo feminino e sem sinais clínicos de infecção bucal por *Candida*.

Lâminas para microscopia foram preparadas com extensões de *Candida albicans* A, fixadas pelo calor e delimitadas em 14 compartimentos, empregando-se esmalte para unhas. Após o que, soro e saliva, em dilui-

ções progressivas de 1:1 a 1:4096, foram incubadas, individualmente, sobre os referidos compartimentos durante 60 minutos, à 37°C, em câmara úmida.

Terminada a incubação descrita no parágrafo anterior, as referidas lâminas eram lavadas em solução salina tamponada, para depois receberem o antissor de coelho conjugado, e prosseguia-se nova incubação nos parâmetros da primeira.

Os títulos dos anticorpos presentes no soro e na saliva foram dados pelas diluições máximas nas quais a fluorescência era nítida em relação à morfologia do fungo (Figs. 2 e 3). As amostras de soro e de saliva, que mostraram concomitância de positividade foram pesquisadas, também pela I.I., frente a antissoros classe específicos* contra as classes G,M,A,D e E das imunoglobulinas.

RESULTADOS

Nos indivíduos do 1.º grupo as amostras de soro, todas positivas, variaram o título entre 4 e 32; enquanto as amostras de saliva, com exceção de um único caso com título 1, todas mostraram-se negativas.

Nos pacientes portadores de candidíase bucal diagnosticada clinicamente, as amostras de soro, todas positivas, revelaram títulos entre 32 e 2048. Quanto as amostras de saliva, todas mostraram positividade com títulos entre 1 e 16.

Nos pacientes com doenças rotuladas como “auto-ímmunes” e submetidas à terapêutica imunossupressora, as amostras de soro revelaram positividade constante, variando os títulos de 32 a 2048. Em 20 casos as amostras de saliva revelaram positividade (títulos de 1 a 8), estando nelas relacionadas 9 pacientes com sinais clínicos de candidíase bucal; porém nas 10 amostras negativas estava inserido um paciente com os sinais clínicos de micose.

Nos 3 pacientes de 4.º grupo as amostras de soro foram positivas com títulos de 64, 8 e 8, enquanto que para as amostras de saliva

não foi revelado um único caso de positividade.

A pesquisa com os antissoros classe específica revelou positividade para as classes G,M, A e D das imunoglobulinas, quer no grupo de pacientes com os sinais clínicos da infecção sem o acometimento de doença “auto-ímmune” ou terapia imunossupressora, quer para o grupo de pacientes acometidos por doenças “auto-ímmune” na concomitância da terapêutica imunossupressora. Nenhum dos experimentos revelou presença de IgE.

DISCUSSÃO

LEHNER^{22,23} destacou, em seus trabalhos, que em pacientes com infecção bucal por *C. albicans* os Acs contra o fungo apresentavam títulos acima de 512 no soro e 8 na saliva.

LILIENTHALL²⁵ e WILLIAMSON^{36,37} demonstraram que as variações do número de colônias de *C. albicans*, na saliva de indivíduos sem a infecção, era notada nas diferentes horas do dia, como pela manhã, após refeições e escovações; podendo ainda a presença ser negatizada quando a saliva era colhida por dias seguidos.

ROSEBURY³¹ define como “anfibiose” (termo entre a simbiose e antibiose) ao equilíbrio biológico que se estabelece entre o hospedeiro e os microrganismos que este alberga, criando condições de saprofitismo para determinados germes como a *Candida*. FONSECA¹⁰ ressalta que os fatores de ordem sistêmica ou local, bem como a associação de ambos, causando modificações no hospedeiro ou na flora favorecem o parasitismo ocasional da *Candida* redundando infecção dita endógena.

Como substrato antigênico foi utilizada *Candida albicans* do sorotipo A devido a maior virulência da espécie³⁸, relacionada com a capacidade de transformação miceliária nos tecidos¹³ e pelas características antigênicas do sorotipo que englobam as do sorotipo B^{15,32}.

* Behringwerk A G, Marburg, West Germany.

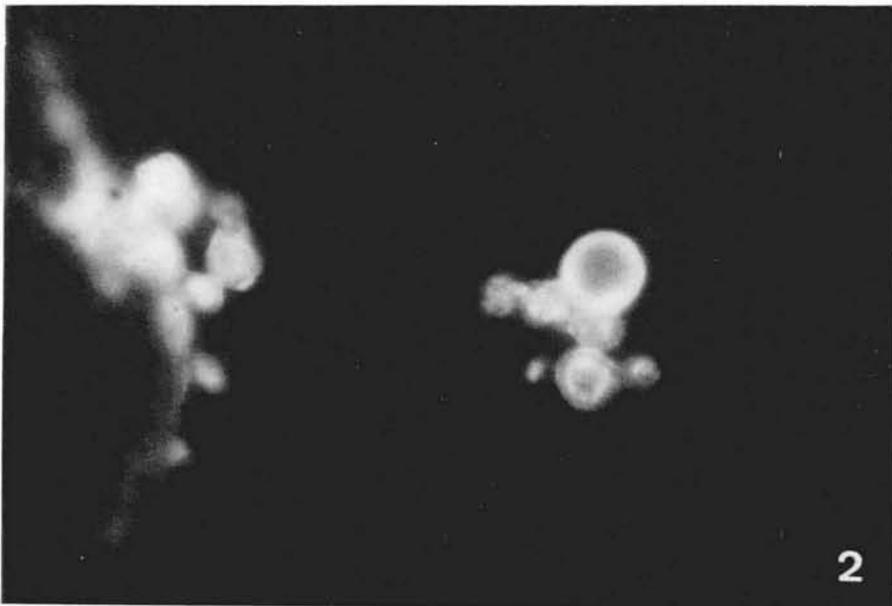


FIG. 2 — Fotomicrografia em aumento de 800x mostrando padrão positivo, notar a morfologia definida da *Candida albicans* dada pela homogeneidade de fluorescência mais intensa na membrana.

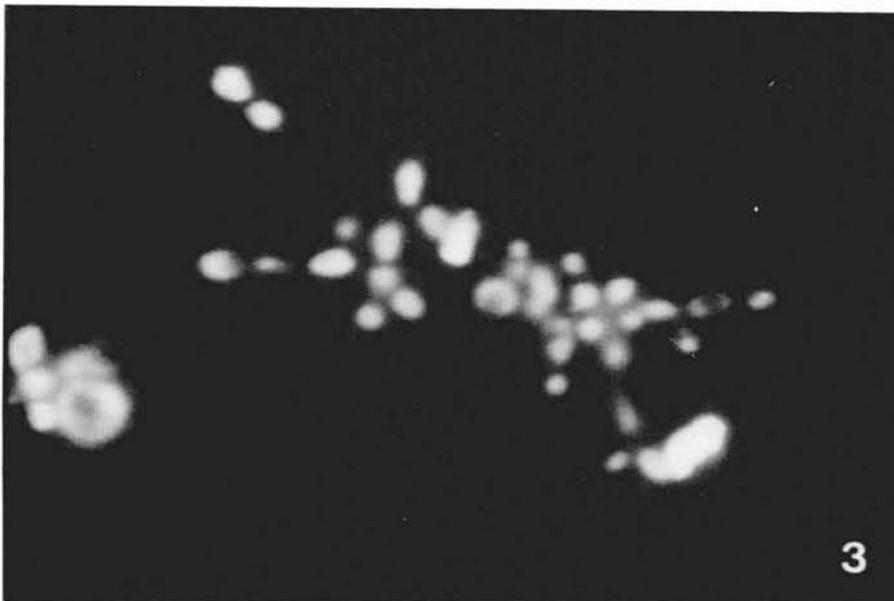


FIG. 3 — Fotomicrografia em aumento de 800x mostrando o padrão negativo caracterizado pela perda total da morfologia da *Candida albicans*, da qual aparecem apenas resquícios fluorescentes sem expressão.

Os Acs séricos contra *C. albicans*, presentes em indivíduos sem sinais clínicos de infecção e também relatados por LEHNER^{22, 23}, pareceu-nos advindo da característica de comensalismo transitório do fungo na cavidade bucal e genitálias, o qual, quando presente, estimularia células imunocompetentes provocando o aparecimento dos anticorpos circulantes, fato admitido por BUDTZ-JÖRGENSEN⁴.

Apesar de KRAUS¹⁸ KRAUS & KONNO¹⁹ presumirem que os Acs presentes na saliva proviessem do soro, KRAUS & SIRISINHA²⁰ e CLAMAN *et alii*⁶ não conseguiram demonstrar o aumento específico das classes das Igs no soro e na saliva.

HURLIMANN¹⁶ admite que as Igs, presentes na saliva, podem ter três origens: 1) plasmática, 2) sintetizadas nos plasmócitos do interstício glandular e 3) ambas as origens anteriores; sendo da responsabilidade do componente de secreção, ou peça de transporte, as transferências específicas da IgA e IgM. Fato confirmado por BRANDTZAEG², quando o autor verifica quantidades apreciáveis de IgG no interstício glandular e em plasmócitos próximos das glândulas salivares e estando esta Ig em baixa concentração na saliva total.

Frente às considerações anteriores e aos resultados obtidos nos dois primeiros grupos do experimento, fica patente a afirmação de LEHNER²⁴ quanto ao grande valor atribuído à I.I., utilizando-se soro e saliva, no diagnóstico das alterações bucais atribuídas à *Candida*.

Analisando os resultados do terceiro grupo, questiona-se o comentário de RIPON³⁰ afirmando que usualmente não estão presentes Acs. circulantes contra *Candida*, quando pacientes são submetidos a tratamento onde concorram imunodepressores ou corticoesteróides; fazendo válida a conclusão de THONARD³⁴ que estes Acs decorrem de populações de células imunocompetentes resistentes aos imunossuppressores, principalmente esteróides, presentes próximas à infecção. FUNDENBERGER *et alii*¹² relaciona esta resistência à menor quantidade

de de receptores aos esteróides presentes na membrana de determinados linfócitos.

No caso, do único indivíduo do terceiro grupo, que apesar dos sinais clínicos de candidíase bucal não se detectam Acs na saliva, podemos atribuir o evento, ao efeito imunossupressor ou considerarmos as semelhanças clínicas das infecções bucais produzidas por *Candida* e por *Lactobacilos*³⁵.

Apesar de BRANDTZAEG¹, por método de dupla difusão, não ter detectado IgD e IgE em saliva parotídea, nós, com a utilização de saliva total e técnica de I.I. verificamos a presença da IgD na saliva de pacientes acometidos por candidíase bucal, semelhante aos resultados de TERRANOVA *et alii*³³ quando da pesquisa das Igs salivares, por imunodifusão radial, em pacientes com processos infecciosos de origem odontogênica.

CONCLUSÕES

A infecção bucal por *Candida* é acompanhada de títulos séricos apreciáveis de Acs específicos; a infecção bucal por *Candida* é acompanhada de Acs específicos salivares em títulos baixos; em indivíduos sem sinais clínicos de infecção bucal por *Candida* podem ser detectados Acs contra o fungo em títulos baixos no sangue; não há relação entre os títulos séricos e os títulos salivares das Acs contra *Candida* na vigência de infecção; a utilização da técnica de I.I. mostra-se de importância para o diagnóstico das candidíases bucais; pacientes com doenças autoimunes e imunodeprimidos, que apresentam candidíase bucal, não mostram diferenças entre os títulos séricos e salivares dos Acs específicos, quando comparados aos pacientes acometidos de candidíase bucal sem portarem doenças autoimunes ou estarem sob imunossupressão; os títulos séricos dos Acs anti *Candida* dos indivíduos são assemelham-se aos dos pacientes com "doença autoimune" na vigência ou ausência de terapêutica específica quando os mesmos não apresentam sinais clínicos de candidíase bucal; pela técnica da I.I. pode-se apreciar a presença das classes G, M, A e D das Igs no soro e na saliva, quando de infecção bucal por *Candida*.

CABRAL, L.A.G. — Verification by indirect immunofluorescence of the presence of antibodies in human serum and human saliva against *Candida albicans*. *Rev. Odont. UNESP, São Paulo*, 12(1/2):53-59, 1983.

ABSTRACT: Serum and saliva of 20 healthy persons and of 20 patients with various diseases, not "autoimmune diseases", and showing buccal signals of candidiasis were investigated by indirect immunofluorescence (I.I.) as for the presence of antibodies (Abs) against *Candida albicans* A. The seric titles of healthy persons had a variation between 4 and 64 and only had presence of that Abs in saliva, with a title of 1; in the patients with buccal signals of candidiasis the seric titles, also positives, floated from 32 to 2048 and in saliva the positiveness was constant with titles of 1 to 16. In a third group, constituted of 30 patients with "autoimmune diseases" and submitted to immunosuppressive treatment, the seric titles were between 32 to 2048, while in saliva, 1 to 8. Three patients with "autoimmune diseases" without any treatment and presenting clinical signals of *Candida* infection, showed seric titles of 64, 8 and 8, and Abs were not detected in saliva. The investigation by I.I. of G, M, A, D, and E of the immunoglobulins classes, in the samples of serum and saliva, which presented concomitance of positivity of Abs against *C. albicans* A, showed the concurrence of the IgG, IgM, IgA and IgD in serum and saliva, in the presence of buccal signals of candidiasis.

KEY-WORDS: *Candidiasis; immunosuppression; immunofluorescence seric and salivary antibodies.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRANDTZAEG, P. — Human secretory immunoglobulins: II — salivary secretions from individuals with selectively excessively or defective synthesis of serum immunoglobulins. *Clin. exp. Immunol.*, 8:69-85, 1971.
2. BRANDTZAEG, P. — Mucosal and glandular distribution of immunoglobulin components: immunohistochemistry with a cold ethanol — fixation technique. *Immunology*, 26: 1101-14, 1974.
3. BUDTZ-JÖRGENSEN, E. — Predisposing conditions for *Candida* — induced denture stomatitis. *J. dent. Res.*, 82:167-73, 1974.
4. BUDTZ-JÖRGENSEN, E. — Clinical aspects of *Candida* infection in denture wearers. *J. am. dent. Ass.*, 69:474-9, 1978.
5. CALABRESI, P.; EDWARDS, E.A. & SCHILLING, R.F. — Fluorescent antiglobulin studies in leukopenic and related disorders. *J. clin. Invest.*, 38:2091-9, 1959.
6. CLAMAN, N.H.; MERRIL, D.A. & HARTLEY, T.F. — Salivary immunoglobulins: normal adults values and dissociation between serum and salivary levels. *J. Allerg.*, 40:151-9, 1967.
7. CRAIG, J.M. & FARBER, S. — The development of disseminated visceral mycosis during therapy for acute leukemia. *Am. J. Pathol.*, 29:601, 1953.
8. DONLON, W.C. — Immunology in dentistry. *J. am. dent. Ass.*, 100:220-31, 1980.
9. ELLISON, S.A.; MASHIMO, P.A. & MANDEL, I.D. — Immunochemical studies of human saliva: the demonstration of serum proteins in whole and parotida saliva. *J. dent. Res.*, 39:892-8, 1960.
10. FONSECA, J.B. — Candidiase: aspectos de interesse odontológico. In: LACAZ, C.S. — *Candidiase*. São Paulo — EPU — EDUSP, 1980. p. 130-46.
11. FRENKEL, J.K. — Role of corticosteroids as predisposing factors in fungal diseases. *Lab. Invest.*, 11:1192-208, 1962.
12. FUNDENBERGER, H.H.; STITES, D.P.; CALDWELL, J.L. & WELLS, J.V. — *Basic & clinical immunology*. 2 ed., Los Altos, Lange, 1978. p. 310-2.
13. GOLDSTEIN, E.; GRICCO, M.H.; FINKEL, G. & LOURIA, D.B. — Studies on the pathogenesis of experimental *Candida parapsilosis* and *Candida guilliermondii* infections in mice. *J. infec. Dis.*, 115:293-302, 1965.
14. GREENBERGER, M.S. & COHEN, G. — Oral infection in immunosuppressed renal transplant patients. *Oral Surg.*, 43:875-85, 1977.
15. HASENCLEVER, H.F. & MITCHELL, W.O. — Antigenic studies of *Candida*: I — observation of two antigenic groups in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.*, 82:570-3, 1961.
16. HURLIMANN, J. — Immunoglobulin synthesis and transport by human salivary glands. *Curr. top. Pathol.*, 55:69-108, 1971.
17. KEYES, J.D. & MAGEE, W.E. — Fungal diseases in general hospital; a study of 88 patients. *Am. J. clin. Pathol.*, 26:1235-63, 1956.
18. KRAUS, F.W. & KONNO, J. — Antibodies in saliva. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 106: 311-29, 1963.
19. KRAUS, F.W. & KONNO, J. — The salivary secretion of antibody. *Ala. J. med. Sci.*, 2: 15-21, 1965.

20. KRAUS, F.W. & SIRISINHA, S. — Gamma globulin in saliva. *Arch. oral Biol.*, 7: 221-33, 1962.
21. LEACH, L.B.; WYSHAK, G.K. & WEISBERGER, D. — Human saliva: its antigenic composition. *J. dent. Res.*, 42:568-74, 1963.
22. LEHNER, T. — Immunofluorescent investigation of *Candida albicans* antibodies in human saliva. *Arch. oral Biol.*, 10: 975-80, 1965.
23. LEHNER, T. — Immunofluorescent study of *Candida albicans* in candidiasis, carriers and controls. *J. Pathol. Bacteriol.*, 91: 97-104, 1966.
24. LEHNER, T. — Oral candidosis. *Dent. practit.*, 17: 209-16, 1967.
25. LILIENTHALL, B. — Studies of the flora of the mouth: III - yeast - like organism; some observations on their incidence in the mouth. *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.*, 28: 279-86, 1950.
26. LOPEZ-MARTINEZ, R. — Características imunológicas en candidosis. *Prensa med. Mex.*, 39: 468-71, 1974.
27. MARCUCCI, G. — *Pênfego foliáceo: aspectos estomatológicos; estudo clínico, micológico, citológico, histológico e histoquímico*. São Paulo, Universidade de São Paulo, 1972. (Tese - Doutorado).
28. MOSKOW, B.S.; CRIKELAIR, G.F. & EHEATON, E.A. — Severe oral infection associated with prolonged steroid therapy, report of a case. *Oral Surg.*, 34: 590-602, 1972.
29. NORRIS, R.F. & RAWSON, A.J. — Occurrence of serum agglutinins for *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* in a hospital population. *Am. J. clin. Pathol.*, 17: 813-9, 1947.
30. RIPPON, J.W. — *Medical mycology*. Philadelphia, Saunders, 1974. p. 175-204.
31. ROSEBURY, T. — *Microorganisms indigenous to man*. New York, MacGraw-Hill, 1962. p. 1-8.
32. SUMMERS, D.F.; GROLLMAN, A.P. & HASENCLEVER, H.F. — Polysaccharide antigens of *Candida* cell wall. *J. Immunol.*, 92: 491-9, 1964.
33. TERRANOVA, F.; GENOVESE, C. & CORDASCO, G. — Le classi immunoglobuliniche salivari in alcune affezioni del cavo orale. *Minerva Stomatol.*, 25:9-11, 1976.
34. THONARD, J.C. — Host defense mechanism in the oral mucosa. *Oral Surg.*, 42: 234-7, 1976.
35. TYLDESLEY, W.R.; ROTTER, E. & SELLS, R.A. — Oral lesions in renal transplant patients. *J. oral. Pathol.*, 8: 53-9, 1979.
36. WILLIAMSON, J.J. — Diurnal variation of *Candida albicans* count in saliva. *Aust. dent. J.*, 17: 54-60, 1972.
37. WILLIAMSON, J.J. — A study of extent of variation in daily counts of *Candida albicans* in saliva. *Aust. dent. J.*, 17: 106-9, 1972.
38. WINNER, H.I. — The epidemiology of candidosis. In: ALDOORY, Y. — *The epidemiology of human mycotic diseases*. Springfield, C.C. Thomas, 1975. p. 152-7.
39. WINNER, H.I. — A study of *Candida albicans* agglutinins in human sera. *J. Hyg., Cambridge*, 53: 509-12, 1955.
40. WINNER, H.I. & HURLEY, R. — *Candida albicans*. London, Churchill, 1964. p. 44-52.

Recebido para publicação em 5.4.83.