



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**VACINA CONTRA A CÁRIE DENTÁRIA: PERSPETIVAS E
PREOCUPAÇÕES. UMA OPÇÃO POSSÍVEL?**

Trabalho submetido por
João Carlos Ribeiro Delgado
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Setembro de 2014



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

VACINA CONTRA A CÁRIE: PERSPETIVAS E PREOCUPAÇÕES. UMA OPÇÃO POSSÍVEL?

Trabalho submetido por
João Carlos Ribeiro Delgado
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Maria Guilhermina Martins Moutinho

e coorientado por
Prof. Doutora Armanda Amorim

Setembro de 2014

Dedicatória

Aos meus pais e avós

Aos meus amigos

E a todos aqueles que

“foram expulsos das academias por praticarem & publicarem odes loucas e
obscenas nas janelas do cérebro”

Allen Ginsberg, O Uivo

Agradecimentos

Ao terminar esta grande etapa da minha vida quero deixar a todos que comigo partilharam as vicissitudes e alegrias próprias das atividades desenvolvidas quotidianamente, o meu profundo reconhecimento.

Um especial agradecimento ao Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, a faculdade que me abriu as portas para o futuro.

À minha orientadora da tese, a Prof. Doutora Maria Guilhermina Martins Moutinho, quero manifestar o meu agradecimento, fica aqui expressa a minha admiração pela sua tenacidade e empenho na orientação científica do trabalho aqui presente. O apoio e compreensão que me dispensou foram determinantes para a realização deste trabalho.

À minha coorientadora da tese, a Prof. Doutora Armada Amorim, o meu sincero e profundo reconhecimento pelo contributo dado à realização deste trabalho. A confiança, atenção e o incentivo que sempre me dispensou foram essenciais para a realização deste trabalho.

A todos os professores, do Mestrado Integrado em Medicina Dentária, que contribuíram para a minha formação académica os meus agradecimentos.

A todos os que trabalham ou trabalharam no Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, o meu reconhecimento pela coragem e perseverança em manter viva esta instituição tão importante em Portugal.

Aos meus pais, os meus alicerces, a minha base, um obrigado “até ao infinito e mais além” pelo amor incondicional com que sempre posso contar.

Ao meu avô, companheiro e confidente o meu eterno obrigado.

Uma palavra especial de carinho para a minha colega e companheira Margarida e manifestar a satisfação por ter podido contar sempre com a sua calorosa amizade.

Por fim, gostaria de agradecer aos meus amigos e colegas que de algum modo partilharam a sua beleza comigo, nestes anos de vida e de curso.

Resumo

A cárie dentária é uma doença infecciosa e transmissível, que afeta o ser humano em todo o mundo, independentemente da raça, sexo, idade ou condição social. *Streptococcus mutans* é considerado como o principal agente etiológico da cárie dentária em humanos.

Produtos de ligação como polímeros da glucose (glucano) e proteínas (glucosiltransferases e adesinas) são fatores de virulência de *Streptococcus mutans* candidatos para uma vacina contra a cárie dentária. Estes fatores de virulência, quando na presença de sacarose da dieta alimentar facilitam a adesão e a acumulação desta bactéria no biofilme oral, desencadeando a desmineralização dos tecidos dentários. A produção de uma vacina contendo antígenos intatos ou péptidos a partir dos fatores de virulência ou uma combinação de antígenos, pode ser uma forma eficaz de controle da cárie.

As pesquisas efetuadas para produzir uma vacina segura e eficaz, têm sido facilitadas pelos progressos na imunologia das mucosas, biologia molecular e engenharia genética, incluindo o desenvolvimento de sofisticados sistemas de distribuição de antígeno e adjuvantes que estimulam a indução da resposta de IgA salivar.

Nas últimas décadas, novas abordagens conduziram ao desenvolvimento de vários tipos de vacina, através de diferentes vias de imunização, com o objetivo de induzir altos níveis de anticorpos salivares que possam persistir por períodos prolongados.

As diferentes abordagens de imunização ativa demonstraram sucesso em modelos animais e em ensaios clínicos humanos, embora mais ensaios clínicos sejam necessários para avaliar a segurança e eficácia dessas vacinas.

As crianças representam a população-alvo primária para a vacina, para as quais a imunização com um ano de vida pode estabelecer imunidade efetiva contra tentativas de colonização por *Streptococcus mutans*.

Apesar do caminho da vacina contra a cárie ser promissor, não está livre de desafios e a eliminação desta doença através da vacinação torna-se uma opção atrativa.

Palavras-chave: Cárie dentária; Vacina contra a cárie; *Streptococcus mutans*; IgA salivar

Abstract

Dental caries is an infectious and transmissible disease that affects humans worldwide, without relation with race, gender, age or social status. *Streptococcus mutans* is considered the main etiological agent of dental caries in humans.

Binding products such as polymers of glucose (glucan) and proteins (glucosyltransferases and adhesins) are virulence factors of *Streptococcus mutans* vaccine candidates against caries. These virulence factors, in the presence of dietary sucrose, facilitate the adhesion and accumulation of this bacteria in oral biofilm, developing dental tissue demineralization. The production of a vaccine containing intact antigens or peptides from the virulence factors or an antigens combination could be an effective way to control dental caries.

The research carried out to produce a safe and effective vaccine has been facilitated by the progress in mucosal immunology, molecular biology and genetic engineering, including the development of sophisticated delivery systems of antigen and adjuvants to stimulate the response induction of salivary IgA.

In recent decades, new approaches have led to the development of various types of vaccine, through different routes of immunization, with the aim of inducing high levels of salivary antibodies and to persist for long periods.

The different approaches of active immunization have shown success in animal models and in human clinical trials, although more clinical trials are needed to evaluate the safety and efficacy of these vaccines.

Children are the primary target population for the vaccine, for which immunization with one year of life may provide effective immunity against attempts at colonization by *Streptococcus mutans*.

Despite the path of vaccine against caries seems to be promising, it is not free of challenges and the caries elimination through vaccination becomes an attractive option.

Key-words: Dental caries; Vaccine against caries; *Streptococcus mutans*; Salivary IgA

Índice Geral

Índice de Figuras	8
Índice de Tabelas	9
Lista de Siglas e Abreviaturas	10
Introdução	11
Desenvolvimento	14
CAPÍTULO 1: CÁRIE DENTÁRIA	14
1.1. Definição e conceito atual	14
1.2. Uma doença infecciosa	15
1.3. Epidemiologia	18
1.4. Etiologia	20
1.4.1. Bactérias orais	21
1.4.1.1. Estreptococos do grupo <i>mutans</i>	22
1.4.2. Dieta	24
1.4.3. Hospedeiro suscetível	25
1.4.3.1. Saliva	26
1.4.3.2. Dente	27
1.5. Manifestação clínica da cárie dentária	28
1.6. Patogênese molecular da cárie dentária	29
1.7. Fatores de virulência de <i>S. mutans</i>	32
1.7.1. Adesinas	33
1.7.2. Glucosiltransferases	33
1.7.3. Proteínas de ligação a glucanos	35
1.8 – Diagnóstico	36
CAPÍTULO 2: IMUNOLOGIA DA CAVIDADE ORAL	37
2.1. Ontogenia da resposta imunológica da cavidade oral	37
2.1.1. Imunoglobulinas	40
2.2. Sistema imune mucoso comum	42
2.3. Resposta imune do hospedeiro	44
CAPÍTULO 3: IMUNIZAÇÃO CONTRA A CÁRIE DENTÁRIA	48
3.1. Imunização ativa - Vacina contra a cárie dentária	48
3.1.1. Mecanismo de ação	49

3.1.2. Tipos de vacinas	49
3.1.2.1. Vacinas de subunidades	50
3.1.2.1.1. Vacinas de péptidos sintéticos	50
3.1.2.1.2. Vacinas polissacarídicas	52
3.1.2.1.3. Vacinas conjugadas	53
3.1.2.2. Outras vacinas	53
3.1.2.2.1. Vacinas recombinantes/vetores de expressão atenuada	53
3.1.2.2.2. Vacinas anti-idiotípicas	54
3.1.2.2.3. Vacinas de ADN	55
3.1.3. Vias de administração da vacina	56
3.1.3.1. Vias de imunização através das mucosas	56
3.1.3.1.1. Via oral	57
3.1.3.1.2. Via intranasal	58
3.1.3.1.3. Via das amígdalas	59
3.1.3.1.4. Via das glândulas salivares <i>minor</i>	60
3.1.3.1.5. Via retal	61
3.1.3.2. Via gengivo-salivar	62
3.1.3.3. Sistémica	62
3.1.4. Adjuvantes e sistemas de distribuição	63
3.1.4.1. Enterotoxinas – <i>Vibrio cholerae</i> e <i>Escherichia coli</i>	65
3.1.4.2. Microcápsulas e micropartículas	66
3.1.4.3. Lipossomas	66
3.1.4.4. <i>Salmonella</i>	67
3.1.4.5. Outros adjuvantes	68
3.2. Outra abordagem de imunização - Imunização passiva	68
3.3. População-alvo para a vacina e período de imunização	72
3.4. Riscos relativos ao uso de vacinas contra a cárie	74
3.5. Modelos animais e humanos de ensaio da vacina contra a cárie e as suas limitações	76
3.6. Perspetivas e preocupações da vacina contra a cárie	78
Conclusão	81
Bibliografia	84

Índice de Figuras

Figura 1 – “Janela de infecção”	16
Figura 2 – Diagrama de Keys	20
Figura 3 – Progressão da desmineralização dentária em função do tempo	28
Figura 4 a, b, c – Fases da patogénese molecular da cárie dentária	29
Figura 5 – Representação das glucosiltransferases	34
Figura 6 – Sistema imune mucoso comum	43

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Serotipos dos estreptococos do grupo <i>mutans</i>	22
Tabela 2 – Fatores de virulência encontrados em <i>S. mutans</i>	32

Lista de Siglas e Abreviaturas

ADN – Ácido desoxirribonucleico
APC – Células apresentadoras de antígenos
Ag – Antígeno
Ag I/II – Antígeno I/II
CD4⁺ – Linfócitos T auxiliares
CD8⁺ – Linfócitos T citotóxicos
E. coli – *Escherichia coli*
EGM – Estreptococos do grupo *mutans*
FliC – Proteína recombinante flagelina derivada da *Salmonella*
FTF – Frutosiltransferase
GALT – Tecido linfoide associado ao intestino
GBP – Proteína de ligação a glucano
GBP A – Proteína A de ligação a glucano
GBP B – Proteína B de ligação a glucano
GBP C – Proteína C de ligação a glucano
GBP D – Proteína D de ligação a glucano
GLU = GB – Domínio de ligação a glucano
GTF – Glucosiltransferase
GTF-B – Glucosiltransferase B; análoga à GTF-I
GTF-C – Glucosiltransferase C; análoga à GTF-SI
GTF-D – Glucosiltransferase D; análoga à GTF-S
GTF-I – Glucosiltransferase I; análoga à GTF-B
GTF-S – Glucosiltransferase S; análoga à GTF-D
GTF-SI – Glucosiltransferase B; análoga à GTF-C
Ig – Imunoglobulina
IgA - imunoglobulina A
IgA1 - imunoglobulina A subclasse1
IgA2 - imunoglobulina A subclasse2
IgG – Imunoglobulina G
IgM - imunoglobulina M
IgY – Imunoglobulina Y; Anticorpo Yolk
KDa – Kilodalton
LB – Linfócitos B
LT – Linfócitos T
MALT – Tecido linfoide associado às mucosas
NALT – Tecido linfoide associado à mucosa nasal
MHC – Complexo *Major* de Histocompatibilidade
OMS – Organização Mundial de Saúde
PEC – Polissacáridos extracelulares
PIC – Polissacáridos intracelulares
PLGA – Poli (lactido-coglicolido)
SBR – Região de ligação salivar da Ag I/II de *S. mutans*
sIgA – Imunoglobulina A secretora
S. – *Streptococcus*
S. mutans – *Streptococcus mutans*
SpaA – adesina de *S. sobrinus*
TC – Toxina da cólera

Introdução

A cárie dentária é uma das doenças mais predominantes a nível mundial, que atinge o ser humano (Sala & García, 2013), nos países desenvolvidos, em desenvolvimento e subdesenvolvidos (Gambhir *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2013), sem relação com a raça, sexo, idade ou condição social (Melo *et al.*, 2008; Areias *et al.*, 2010). É uma doença infecciosa de origem bacteriana e transmissível, que se converte numa doença epidémica nos países industrializados devido principalmente à ingestão de alimentos ricos em açúcar (Arosa *et al.*, 2012). Sendo considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um problema *major* de Saúde Oral na maioria dos países industrializados (Li *et al.*, 2014), pelo que se exigem abordagens eficazes para impedir a cárie dentária (Silva *et al.*, 2013).

Devido ao desenvolvimento tecnológico, a cárie dentária não se manifesta de uma forma tão rápida e agressiva como há algumas décadas. Ainda assim, nas crianças continua a ser cinco vezes mais vulgar do que a asma e sete vezes mais do que a febre dos fenos. A cárie dentária continua a ser um grave problema que afeta em particular grupos populacionais muito jovens, muito idosos, economicamente desfavorecidos, doentes crónicos ou institucionalizados (Gambhir *et al.*, 2012; Setia *et al.*, 2012).

Estudos da OMS mostram haver um aumento no predomínio e gravidade da cárie nos últimos cinquenta anos (Sentila *et al.*, 2013).

A cárie é uma doença ubiqüitária, com grandes variações geográficas, que afeta negativamente a saúde geral do indivíduo (Melo *et al.*, 2008; Areias *et al.*, 2010), com consequências sócio-económicas, devido ao custo do tratamento, pelos danos causados localmente e gerais e pelo absentismo que promove no trabalho e na escola (Areias *et al.*, 2010).

Os planos de prevenção da cárie que se encontram atualmente estabelecidos podem ser muito eficazes e incluem a educação em saúde oral, o controlo químico e mecânico do biofilme oral, o uso de fluoretos e aplicação de selantes. Porém, obstáculos económicos, comportamentais e culturais na utilização destes planos, têm contribuído para a manutenção a nível global da prevalência da cárie dentária (Gambhir *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2013).

O principal objetivo de saúde pública é a prevenção e o controlo da doença, sendo o derradeiro objetivo a erradicação da doença (Shivakumar *et al.*, 2009), pelo que a nível mundial são necessárias ações mais eficazes sobre a cárie dentária (Taubman & Nash, 2006). Deste modo, têm vindo a ser efetuadas pesquisas no desenvolvimento de uma vacina contra a cárie que seja eficaz na prevenção da cárie dentária (Gambhir *et al.*, 2012).

A vacina contra a cárie pode constituir um precioso auxiliar na prevenção desta doença em algumas sociedades ou uma ação *major* de Saúde Pública noutras sociedades (Nogueira *et al.*, 2008; Negrini *et al.*, 2009).

A cárie dentária é uma doença multifatorial, que combina variáveis individuais como a anatomia da cavidade oral, a resistência dentária, a composição da saliva, o fluxo crevicular e a dieta alimentar, tão importantes como a formação do biofilme oral e os microrganismos que provocam a doença (Pereira *et al.*, 2010). É uma doença caracterizada pela desmineralização da porção inorgânica e destruição da substância orgânica do dente, que conduz habitualmente à cavitação (Sumit, 2012; Shanmugam *et al.*, 2013), desenvolve-se quer nas coroas, quer nas raízes dos dentes (Gambhir *et al.*, 2012; Sumit, 2012) e constitui o principal motivo de perda de dentes (Taubman & Nash, 2006; Areias *et al.*, 2010).

Streptococcus mutans (*S. mutans*), uma bactéria acidúrica e acidogénica, é considerado o microrganismo mais relevante associado com a cárie (Shivakumar *et al.*, 2009; Gambhir *et al.*, 2012; Smith, 2012; Sumit, 2012; Silva *et al.*, 2013).

A atenção tem sido centrada neste microrganismo, pelo facto de existir uma sólida correlação com a cárie nos estudos epidemiológicos de crianças e adultos, a reduzida expressão na ausência da doença, a sua propriedade demonstrada *in vitro* de se desenvolver em condições de baixos valores de pH e a sua capacidade de causar cáries em modelos animais (Lamont *et al.*, 2006). Outra propriedade importante desta bactéria é a sua capacidade de adesão e acumulação nas superfícies dentárias através de diferentes fatores de virulência associados à superfície celular (Nogueira *et al.*, 2008; Negrini *et al.*, 2009).

Deste modo, *S. mutans* tem sido o foco de atenção de inúmeros investigadores para aumentar a imunidade natural através de vacinas específicas contra a cárie (Motta *et al.*, 2006), promovendo a indução de níveis elevados de anticorpos salivares que

possam perdurar durante períodos de tempo alargados e para estabelecer memória imunitária (Gambhir *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2013).

Os rápidos progressos na área da biologia e genética molecular perspetivam avanços promissores no campo da preparação de novas vacinas (Pereira *et al.*, 2010). Estas pesquisas permitiram a identificação dos mais efetivos antigénios de *S. mutans* a serem incluídos nas vacinas, os vários tipos de vacinas, assim como as melhores vias de administração, com capacidade de reduzir a colonização e em consequência, reduzir o número de lesões de cárie (Pinto *et al.*, 2005).

A vacina contra a cárie possui um amplo e promissor campo de pesquisa para prevenir e erradicar a cárie (Kaur *et al.*, 2014). Inúmeros ensaios experimentais estão a ser realizados para desenvolver uma vacina contra a cárie dentária, com prometedores avanços que podem permitir a sua futura produção (Silva *et al.*, 2013).

São necessários mais ensaios clínicos que validem a transposição dos resultados para os humanos (Silva *et al.*, 2013) e avaliem a segurança dessas vacinas em humanos para comprovar a eliminação dos riscos potenciais (Gambhir *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2013).

O presente trabalho pretende fazer uma revisão dos aspetos associados com a cárie dentária, destacar o potencial de proteção da vacina contra a cárie e avaliar os progressos no seu desenvolvimento, tendo em consideração a sua constituição, vias de administração utilizadas, modelos animais e humanos de estudo, mecanismo de ação, segurança e eficácia, bem como as perspetivas e preocupações.

CAPÍTULO 1: CÁRIE DENTÁRIA

1.1. Definição e conceito atual

A cárie dentária é um termo que identifica o processo de cárie, assim como as lesões de cárie, em qualquer fase do seu desenvolvimento, que acontecem como consequência do processo (Kidd, 2011; Sala & García, 2013).

A cárie dentária é uma doença progressiva, iniciada pela atividade microbiana na superfície do dente onde se verifica a sua desmineralização, com destruição do esmalte, dentina e cimento, por ação de ácidos orgânicos formados a partir da fermentação de hidratos de carbono da dieta alimentar (Fejerskov & Kidd, 2008; Pereira *et al.*, 2010; Hoshino *et al.*, 2012; Nishimura *et al.*, 2012).

A cárie dentária é uma doença crónica de progressão lenta (Fejerskov & Kidd, 2008), constituindo um processo contínuo com fases distintas que variam de alterações subclínicas a nível molecular na superfície do esmalte (Sala & García, 2013) até à destruição do dente. Raramente é uma doença auto limitante (Taubman & Nash, 2006; Fejerskov & Kidd, 2008; Takahashi & Nyvad, 2008).

O processo de cárie é um fenómeno natural e omnipresente (Takahashi & Nyvad, 2008; Kidd, 2011), que coloca em risco todos os indivíduos com dentes, desde o nascimento até à morte, dado que o metabolismo microbiano no biofilme é inerente à existência dos dentes (Kidd, 2011).

A partir da erupção do primeiro dente na cavidade oral, em qualquer momento podem começar a manifestar-se os primeiros sinais da doença de cárie dentária. Devido ao seu carácter infeccioso, após se ter estabelecido, a cárie dentária pode atravessar as três dentições (decídua, mista, permanente), transmitindo-se na cavidade oral de dente para dente (Melo *et al.*, 2008).

Na fase inicial, a cárie dentária é reversível e pode ser travada em qualquer fase do seu desenvolvimento, mesmo quando haja uma destruição parcial do esmalte ou da dentina (cavitação), desde que seja possível executar um eficiente controlo do biofilme oral (Sala & García, 2013).

Segundo Kidd (2011), de acordo com a visão contemporânea, a definição da cárie pode ser resumida como um processo natural ubiqüitário no biofilme que se desenvolve ao longo do tempo; o início e desenvolvimento da lesão de cárie é o resultado da atividade do biofilme e pode ser controlado; todas as idades são suscetíveis à cárie, constituindo a causa principal de perda de dentes.

1.2. Uma doença infecciosa

Durante vários séculos, devido a ensaios realizados por Van Leeuwenhoek em 1676, manteve-se a suposição de que os microrganismos desempenhavam uma atividade fundamental no desenvolvimento da cárie dentária (Bradshaw & Lynch, 2013).

Miller apresentou em 1890, na teoria Químico-Parasitária, a hipótese do aparecimento da lesão de cárie ser o resultado da dissolução do fosfato de cálcio do esmalte dentário por ácidos, os quais teriam origem a partir da conversão dos hidratos de carbono da dieta pelas bactérias orais (Leites *et al.*, 2006; Marsh *et al.*, 2009; Bradshaw & Lynch, 2013).

Em 1924, Clark isolou pela primeira vez *S. mutans*, a partir de uma lesão de cárie (Motta *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2010; Chamorro-Jiménez *et al.*, 2013) e só passados 40 anos Loesche demonstrou que *S. mutans* seria o principal agente etiológico da cárie dentária (Motta *et al.*, 2006; Islam *et al.*, 2007; Marsh *et al.*, 2009).

Só após a 2ª Grande Guerra Mundial, quando foi demonstrado que os antibióticos podiam prevenir a cárie, se confirmou a importância dos microrganismos na produção de cárie (Bradshaw & Lynch, 2013). McClure e Hewitt, em 1946, verificaram que em ratos medicados com penicilina e submetidos a dieta cariogénica, as cáries foram inibidas, confirmando o papel decisivo das bactérias orais na produção de lesões de cárie dentária (Leites *et al.*, 2006).

Ensaos realizados por Keys em 1960 confirmaram as propriedades infecciosas e contagiosas da cárie.

Em 1960, Keys e Fitzgerald verificaram que hamsters não infetados também desenvolviam cárie dentária, após serem inoculados com biofilme de hamsters infetados com estreptococos.

Dados bioquímicos, serológicos e morfológicos, mostraram que os estreptococos

isolados em humanos eram análogos aos estreptococos que produziram a cárie em animais, indicando assim que estes causariam também a cárie em humanos (Leites *et al.*, 2006).

Os estreptococos do grupo *mutans* (EGM) necessitam da superfície dos dentes para colonizarem de forma permanente a cavidade oral, porém, pesquisas efetuadas indicam que podem ser encontrados na cavidade oral antes da erupção dos dentes (Smith & Mattos-Graner, 2008). Wan *et al.* mostraram que mais de 30% das crianças pré-dentadas estavam infetadas com *S. mutans* aos 3 meses e mais de 60% aos 6 meses de idade (Law *et al.*, 2007).

Foi demonstrado que as crianças ficam permanentemente colonizadas com EGM no período compreendido entre o meio do segundo ano e o final do terceiro ano de vida, em condições normais de dieta e do ambiente oral (Smith, 2003; Okada *et al.*, 2005; Negrini *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2013), sendo de 26 meses, a idade média de aquisição inicial dos estreptococos orais pelas crianças (Figura 1) (Law *et al.*, 2007).

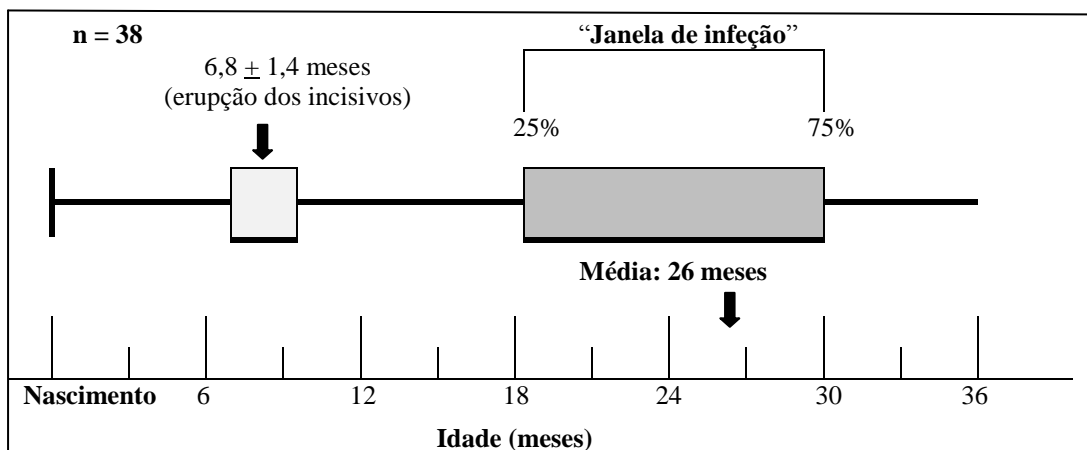


Figura 1 – “Janela de infecção” (Adaptado de Rosa *et al.*, 2005)

Caufield *et al.* (1993) designam este período como a “janela de infecção”, durante o qual o número de *S. mutans* aumenta de 25% para 75% (Javed *et al.*, 2012).

A “janela de infecção” pode ser antecipada em termos de idade, se o ambiente da cavidade oral for propício à colonização por *S. mutans*, como seja, elevado índice de infecção da progenitora associado com alto teor de sacarose da dieta (Smith, 2003; Smith & Mattos-Graner, 2008).

A redução do risco de colonização por *S. mutans* após a “janela de infecção” primária, pode ser o resultado da consolidação de uma microflora oral competitiva após a completa erupção dos dentes e da maturação do anticorpo imunoglobulina A (IgA) como resposta aos antigénios de *S. mutans* (Alves *et al.*, 2009).

Porém, podem aparecer diversas “janelas de infecção”, correspondentes à erupção dos incisivos e molares decíduos, e à erupção dos primeiros molares permanentes, se a colonização por EGM coincidir com a erupção dos dentes (Law *et al.*, 2007). Contudo, estudos longitudinais levados a cabo por Wan *et al.*, e Law e Seow, mostraram haver um aumento de colonização por EGM com o aumento da idade das crianças sem qualquer “janela de infecção” (Law *et al.*, 2007).

A infecção por *S. mutans* pode ser feita por transmissão vertical e/ou por transmissão horizontal (Law *et al.*, 2007; Alves *et al.*, 2009; Javed *et al.*, 2012; Pieralisse *et al.*, 2013).

Face às alterações orgânicas inerentes à gravidez, o período de gestação constitui um fator acrescido de risco de cárie, pelo que a frequência da transmissão vertical por mães grávidas é mais comum (Javed *et al.*, 2012).

As crianças, cujas progenitoras apresentam elevado número de *S. mutans* na saliva, possuem maior risco de serem infetadas mais cedo e de desenvolverem cáries em relação às crianças que são infetadas mais tarde por *S. mutans*. Existe uma significativa diminuição de colonização por *S. mutans* nas crianças, quando há uma redução do teor de *S. mutans* nas mães, sendo que a possibilidade de infecção na criança é bastante mais elevada quando o teor salivar de *S. mutans* da mãe ultrapassar 10^5 UFC (unidades formadoras de colónias) / ml de saliva (Leites *et al.*, 2006; Noce *et al.*, 2008).

Técnicas usando bacteriocinas, plasmídeos e impressão digital de ácido desoxirribonucleico (ADN), permitiram associar como origem primordial da aquisição de *S. mutans* na criança, a transmissão vertical materna, constituindo a saliva a principal via dessa transmissão (Smith, 2002, 2003; Okada *et al.*, 2005; Rosa *et al.*, 2005).

A fidelidade da infecção inicial por *S. mutans* é mais elevada nos pares mãe-filha (88%) que nos pares mãe-filho (53%), indicando que os hábitos sociais podem ser

diferentes entre estes pares (Rosa *et al.*, 2005).

Apesar da influência materna, as crianças não infetadas até aos 3 anos de idade, podem permanecer durante alguns anos sem infeção ou com pouca expressão de colonização, pelo menos até que ocorram novas condições propícias à colonização, como seja o caso da erupção da dentição permanente (Caufield *et al.*, 1993; Smith, 2003). Deste modo, a cárie dentária pode ser prevenida a longo prazo se, por exemplo, através de imunização, for impedida no início da infância a colonização por EGM (Smith, 2003).

A transmissão horizontal de *S. mutans* é mais usual em irmãos, crianças da mesma sala de aula ou infantários, sendo as principais vias de transmissão a saliva contaminada, a expectoração e o sangue (Javed *et al.*, 2012).

O estudo realizado por Doméjean *et al.* em 2010, é o primeiro que confirma a transmissão horizontal em jardim-de-infância, entre crianças jovens com 5-6 anos não aparentadas.

1.3. Epidemiologia

A cárie é encarada sob o ponto de vista histórico, como uma doença dos países de alto rendimento, apresentando baixa prevalência nos países de baixo rendimento.

A dieta é considerada a causa mais evidente, devido à elevada ingestão de hidratos de carbono e outros alimentos processados nos países de alto rendimento, e pelo consumo de caça e agricultura de subsistência nos países pobres (Fejerskov & Kidd, 2008).

A frequência de cárie dentária era muito baixa no homem de Neandertal, nos primitivos do Neolítico, nos ingleses da Idade do Ferro, no Imperio Romano e na Idade Média, pelo facto de a dieta ser pobre em açúcares e dos alimentos exigirem uma mastigação e salivação elevada (Sala & García, 2013).

Durante séculos, o principal açúcar disponível foi o mel e o açúcar da cana-de-açúcar, originário da Índia era muito caro. Com a Revolução Industrial, aumentou a produção e distribuição de açúcar e farinhas refinadas, conduzindo a um rápido aumento da cárie dentária (Sala & García, 2013).

No final do século XIX, em grande parte dos países economicamente desenvolvidos, a cárie dentária já constituía uma doença epidémica de elevadas proporções (Fejerskov & Kidd, 2008).

A cárie dentária constituiu uma das doenças mais predominantes que afeta os indivíduos em todo o mundo, nos países desenvolvidos, em desenvolvimento e subdesenvolvidos (Sala & García, 2013), independentemente da raça, sexo, idade ou condição social (Melo *et al.*, 2008; Areias *et al.*, 2010). No mundo moderno tem atingido taxas epidémicas (Gambhir *et al.*, 2012).

Dado que a cárie dentária é uma doença cumulativa, as previsões apontam para que 60 a 90% das crianças em idade escolar e a grande maioria dos adultos, sejam afetados pela cárie dentária (Melo *et al.*, 2008).

Segundo a OMS, a cárie dentária constitui um problema *major* na Saúde Oral (Li *et al.*, 2014), dado o seu elevado predomínio a nível mundial e em especial nas populações desprotegidas e socialmente marginalizadas (Taubman & Nash, 2006), como sejam as de baixo nível socioeconómico, minorias, os “sem-abrigo”, migrantes e crianças incapacitadas (Zero *et al.*, 2009).

A diminuição a nível mundial da cárie dentária nas populações, foi um dado geralmente aceite no decurso das últimas décadas (Bagramian *et al.*, 2009). Porém, novos dados mostram um significativo aumento da cárie dentária em crianças e adultos (Melo *et al.*, 2008; Bagramian *et al.*, 2009). De acordo com a pesquisa realizada pela OMS, a cárie dentária tem aumentado em preponderância e gravidade nas últimas cinco décadas (Sentila *et al.*, 2013).

O predomínio da cárie em Portugal, tal como acontece a nível mundial, não é uniforme e apresenta diferenças entre cada região. Este facto está relacionado com a educação para a saúde, os hábitos alimentares e o grau de implementação dos programas de saúde oral. Portugal é tido como um país de cárie moderada, com indicadores aos 12 anos (índice de dentes cariados, perdidos e obturados, CPO = 2,95) de acordo com os valores preconizados pela OMS para a Europa (Areias *et al.*, 2010).

Os planos europeus e os objetivos preconizados pela OMS para a saúde oral até 2020, preveem que pelo menos 80% das crianças com 6 anos não tenham cáries e aos

12 anos o CPOD (número de dentes cariados, perdidos e obturados por criança) não seja superior a 1,5 (Pereira *et al.*, 2010).

1.4. Etiologia

O conceito atual sobre a etiologia da cárie dentária compreende fatores locais e fatores relativos ao indivíduo e à comunidade (Sala & García, 2013).

De acordo com o esquema clássico de Keys (Figura 2), a cárie dentária é uma consequência da inter-relação de três fatores primários, a microflora oral cariogénica, hospedeiro suscetível e substrato (dieta), os quais interagem ao longo do tempo para que se efetive a progressão da cárie (Melo *et al.*, 2008; Sala & García, 2013, Singh *et al.*, 2013).

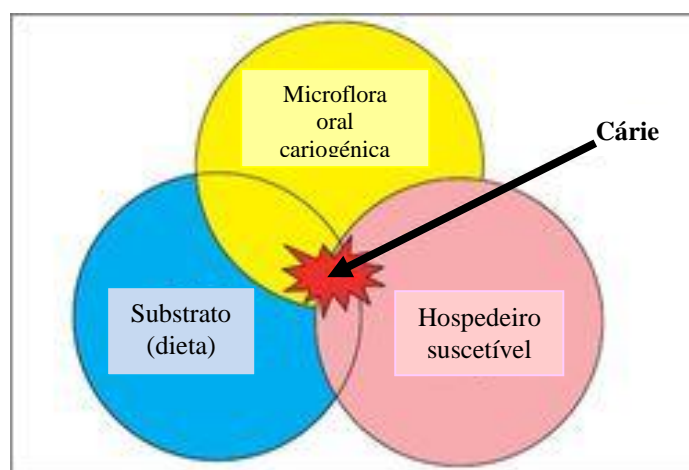


Figura 2 – Diagrama de Keys (Adaptado de Melo *et al.*, 2008)

O biofilme oral é o principal fator etiológico da cárie, havendo apenas progressão desta na superfície do dente coberta com a placa dentária (Sala & García, 2013).

Os fatores etiológicos secundários, como sejam a presença de flúor na cavidade oral, a higiene oral, o nível socioeconómico e a predisposição genética, influenciam os fatores primários e podem modular a atividade da cárie, interferindo na instalação e desenvolvimento da cárie dentária. As interações que se estabelecem entre os fatores etiológicos primários e secundários vão motivar o aumento ou diminuição da resistência

do hospedeiro, a cariogenicidade do substrato e o potencial cariogénico da microflora oral (Melo *et al.*, 2008).

1.4.1. Bactérias orais

Para a cárie dentária se desenvolver é essencial que na fase inicial as bactérias orais formem um biofilme oral na superfície dos dentes (Fejerskov & Kidd, 2008). Porém, a existência do biofilme não conduz obrigatoriamente à cárie, dado que as bactérias orais são necessárias mas não são condição suficiente para produzir a doença (Fejerskov & Kidd, 2008; Sala & García, 2013).

Nyvad *et al.* (2013) desenvolveram o novo conceito de biofilme oral sugerido por Buchen em 2010, em que este é encarado como sendo um único organismo. Assim, o biofilme, apesar de ser um conjunto de diferentes microrganismos, comporta-se como se fosse uma única espécie e atua como um superorganismo (Kutsch, 2013).

O biofilme pode ser constituído por mais de 700 espécies bacterianas (Nishimura *et al.*, 2012) com várias propriedades fisiológicas (Parisotto *et al.*, 2011). Pesquisas efetuadas sobre o biofilme, permitiram identificar até à presente data, 40 espécies bacterianas com função relevante no desenvolvimento da cárie (Islam *et al.*, 2007; Kutsch, 2013).

A cárie ocorre de alterações na proporcionalidade relativa do conteúdo da microflora residente. Cada fase do processo de cárie pode manifestar uma microflora diferente e pode também exibir alterações inter-individuais na sua composição (Marsh *et al.*, 2009).

A hipótese da placa ecológica, apresentada por Marsh em 1994 e completada em 2010, é aceite como a melhor explicação da etiologia da cárie (Charone *et al.*, 2012; Sala & García, 2013) e encara a cárie como o corolário de variações do equilíbrio da microflora do biofilme oral, provocada por alterações nas condições ambientais locais. Esta hipótese releva a relação dinâmica que existe entre a microflora oral e o hospedeiro, pelo que é tido em consideração a importância das alterações em fatores determinantes do hospedeiro na composição do biofilme (Marsh *et al.*, 2009).

As alterações microbianas correspondem ao aumento de bactérias acidogénicas, como os EGM e outros estreptococos não mutans, e na diminuição das espécies que

consomem lactato, o que leva à diminuição da produção de substâncias alcalinas (Sala & García, 2013).

Poucas bactérias orais possuem a capacidade de resistir em meio ácido durante períodos de tempo prolongados. Os EGM e os lactobacilos são espécies acidogénicas e acidúricas, que se mantêm viáveis em meio com baixo valor de pH e são capazes de continuar a metabolizar e a multiplicar-se (Marsh *et al.*, 2009).

Inúmeros microrganismos podem ser isolados das lesões de cárie, *S. mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum* e *Actinomyces viscosus* são as principais bactérias cariogénicas associadas com o início e o desenvolvimento de cárie (Gambhir *et al.*, 2012).

1.4.1.1. Estreptococos do grupo *mutans*

Os EGM habitualmente isolados de lesões de cárie são considerados os microrganismos mais patogénicos no estabelecimento e progressão da cárie dentária (Islam *et al.*, 2007; Parisotto *et al.*, 2011), são muito acidogénicos e acidúricos e promovem a formação de cáries em animais com dieta rica em sacarose.

A capacidade de aderência e acumulação na superfície dos dentes do hospedeiro é o fator de virulência mais importante dos EGM na colonização e desmineralização dos tecidos dentários (Parisotto *et al.*, 2011).

OS EGM incluem sete espécies: *S. mutans*, *Streptococcus (S.) sobrinus*, *S. cricetus*, *S. rattus*, *S. ferus*, *S. macacae* e *S. downei* (Leites *et al.*, 2006; Smith & Mattos-Graner, 2008; Chamorro-Jiménez *et al.*, 2013). Podem ser distinguidos com base na serologia, encontrando-se descritos nove grupos serológicos (*a – k*), o último dos quais muito associado com endocardite bacteriana (Tabela 1) (Chamorro-Jiménez *et al.*, 2013).

Tabela 1 – Serotipos dos estreptococos do grupo *mutans* (Adaptado de Chamorro-Jiménez *et al.*, 2013)

EGM	Cariogénico		Serotipo(s)
	Animais	Humanos	
<i>S. mutans</i>	+	+	<i>c, e, f, k</i>
<i>S. sobrinus</i>	+	+	<i>d, g</i>
<i>S. cricetus</i>	+	-	<i>a</i>
<i>S. rattus</i>	+	-	<i>b</i>
<i>S. ferus</i>	-	-	<i>c</i>
<i>S. macacae</i>	?	-	<i>c</i>
<i>S. downei</i>	+	-	<i>h</i>

As duas espécies mais isoladas de amostras dos tecidos dentários são: *S. mutans* e *S. sobrinus* (Islam *et al.*, 2007), as quais foram exclusivamente isoladas de lesões de cáries em humanos (Smith & Mattos-Graner, 2008). As outras espécies são encontradas em animais e se presentes em humanos não parecem ter elevado potencial cariogénico (Leites *et al.*, 2006).

S. mutans pode apresentar os serotipos *c*, *e*, *f*, *k* (Nakano *et al.*, 2004; Abranches *et al.*, 2011) e *S. sobrinus*, os serotipos *d*, *g* (Lamont *et al.*, 2006). O tipo serológico mais associado à doença em humanos é o serotipo *c*, seguindo-se o serotipo *d* (Arosa *et al.*, 2012).

S. mutans é a espécie predominante e tem sido apontado como sendo o principal agente patogénico da cárie dentária (Nogueira *et al.*, 2008; Negrini *et al.*, 2009; Doméjean *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2010; Abranches *et al.*, 2011; Peterson *et al.*, 2011; Arosa *et al.*, 2012; Hoshino *et al.*, 2012; Bradshaw & Lynch, 2013; Shanmugam *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014).

Estudos clínicos sugerem que a associação entre *S. mutans* e a cárie não é um dado absoluto. Estudos exibem regiões cariogénicas em que nenhum *S. mutans* foi isolado e por outro lado, também é comum que elevado número de *S. mutans* seja encontrado numa aparente ausência de desmineralização dentária (Marsh *et al.*, 2009).

A ausência de *S. mutans* é normalmente um indicador mais forte de baixo risco de cárie, do que a presença de *S. mutans* ser um indicador de elevado risco de cárie dentária (Marsh *et al.*, 2009).

S. mutans é um coco gram-positivo do grupo Viridans, anaeróbio facultativo, não hemolítico (Leites *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2010; Arosa *et al.*, 2012), capaz de metabolizar uma grande variedade de açúcares (sacarose, lactose, galactose, etc.) decompondo-os em monómeros (glucose, frutose) (Peterson *et al.*, 2011).

A colonização irreversível da boca só ocorre na presença de sacarose e não na presença de monossacáridos como a frutose ou glucose (Lamont *et al.*, 2006).

Para Arosa (2012) e Pereira (2010), *S. mutans* preenche os postulados de Koch, como agente etiológico da cárie dentária, dado que:

— se encontra no biofilme dos dentes cariados, não sendo usualmente isolado dos

tecidos dentárias na ausência de cárie;

- provoca a cárie em animais criados e mantidos num ambiente livre de germes;
- pode ser isolado a partir de cáries e cultivado em culturas puras;
- nos indivíduos portadores de cárie existe um aumento significativo de anticorpos específicos para *S. mutans*.

Além da cárie dentária, *S. mutans* é ainda frequentemente associado à patologia extra oral endocardite bacteriana (Kutsch, 2013).

S. mutans em determinadas circunstâncias, como procedimentos dentários, infeções orais, higiene dentária e alimentação, pode aceder à circulação sanguínea e causar uma bacteriémia transitória (Parahitiyawa *et al.*, 2009), que na maioria dos casos não tem consequências graves. No entanto, pode adaptar-se ao meio ambiente, resistir às defesas imunitárias e colonizar o coração, causando endocardite bacteriana (Bedran *et al.*, 2013), infeção que envolve as válvulas cardíacas nativas ou protéticas, o septo ventricular em caso de defeito, ou outras estruturas intracardíacas (Kasper *et al.*, 2006). A endocardite bacteriana é uma doença sistémica grave e frequentemente fatal, em que indivíduos com malformações congénitas cardíacas, com válvulas aórticas protéticas ou com sistema imunitário comprometido são mais suscetíveis ao desenvolvimento desta doença (Bedran *et al.*, 2013).

1.4.2. Dieta

Segundo Sala e García (2013), a dieta constitui um dos fatores etiológicos primários da cárie e está associada com a ingestão dos hidratos de carbono fermentáveis, tendo-se de ter em conta alguns condicionantes, tais como:

- Padrão de ingestão, incluindo a frequência de alimentação;
- Horário de ingestão, sendo mais cariogénica quando há ingestão entre as refeições ou antes de deitar;
- Consistência e capacidade de retenção,
- Presença de fatores protetores, como cálcio, fosfatos e fluoretos;
- Quantidade e tipo de hidratos de carbono.

As pesquisas de cárie efetuadas por Vepeholm associam diretamente a

quantidade e frequência do consumo de sacarose com a cárie dentária (Bradshaw & Lynch 2013). Atualmente, a importância desta relação é mais reduzida devido ao uso dos fluoretos, sobretudo em pastas de dentes (Sala & García, 2013).

Os hidratos de carbono simples, como a sacarose, são mais cariogênicos que os complexos, como o amido, porque estes últimos são pouco solúveis nos fluidos orais e têm uma baixa percentagem de difusão no biofilme, pelo que a maior parte do amido é eliminado da cavidade oral antes de ser hidrolisado pela amilase salivar no dissacarídeo maltose, substrato metabolizável pelas bactérias do biofilme (Anderson & Domenik, 2010).

A propriedade cariogénica do amido é polémica. As pesquisas evidenciam que alimentos ricos em amido provocam uma diminuição de pH menos acentuada que com a sacarose (Bradshaw & Lynch, 2013). Porém, alimentos contendo amido altamente processado têm potencial para serem cariogénicos, particularmente quando combinado com açúcares, pela sua capacidade de aumentar o tempo de retenção da comida na superfície dos dentes (Zero *et al.*, 2009).

Pesquisas efetuadas em populações menos sujeitas a uma dieta ocidentalizada, rica em sacarose, revelam a existência de um baixo nível de cárie. A dieta dos países em desenvolvimento caracteriza-se por conter níveis mais baixos de sacarose e grande quantidade de amido. Este facto, aliado à reduzida ingestão de alimentos entre refeições, leva a que o biofilme se desenvolva com menos glucano e com uma arquitetura alterada, originando um baixo potencial cariogénico (Marsh *et al.*, 2009).

Confirmou-se que quando os açúcares da dieta são restringidos, como verificado no racionamento durante a 2ª Grande Guerra Mundial, a cárie dentária nas populações diminuiu acentuadamente (Bradshaw & Lynch, 2013).

1.4.3. Hospedeiro suscetível

Os fatores etiológicos associados ao hospedeiro contribuem para a suscetibilidade pessoal à cárie dentária, resistência à cárie ou ambas (Zero *et al.*, 2009) e devem ter em consideração a saliva e os tecidos dentários suscetíveis à dissolução pelos

ácidos (Melo *et al.*, 2008).

A suscetibilidade dos indivíduos à cárie dentária é afetada por fatores intrínsecos como o flúor, composição e capacidade tampão da saliva, aspetos hereditários e imunológicos, e por fatores extrínsecos relativos ao meio sociocultural dos indivíduos (Anderson & Domenik, 2010).

1.4.3.1 Saliva

A saliva desempenha um papel importante na saúde dos tecidos moles e duros da cavidade oral (Zero *et al.*, 2009), assim como no controlo da formação do biofilme e na patogénese da cárie dentária (Lamont *et al.*, 2006).

A escassez de saliva (hipossalivação) e a sua acentuada redução (xerostomia) são fortes indícios de aumento do risco de cárie (Zero *et al.*, 2009; Sala & García, 2013). Muitos medicamentos, algumas doenças e radioterapia na região das glândulas salivares, podem reduzir o fluxo salivar e conduzir à perda da capacidade tampão da saliva, ao predomínio de microrganismos cariogénicos produtores de ácidos e ao aumento e acumulação da cárie dentária (Kidd, 2011)

O fluxo salivar e a sua composição são fatores relevantes que alteram o processo da cárie. A ação protetora da saliva assenta principalmente na capacidade de neutralizar os ácidos produzidos pelas bactérias, na eliminação dos alimentos cariogénicos da cavidade oral e em promover a remineralização dos dentes (Fontana *et al.*, 2010; Sala & García, 2013).

Quanto maior for o fluxo salivar, maior a disponibilidade de componentes orgânicos e inorgânicos. Dos componentes inorgânicos destacam-se o cálcio, fosfatos, fluoretos, ácido carbónico/carbonato de hidrogénio e dihidrogenofosfato / hidrogenofosfato (Anderson & Domenik, 2010).

A saliva forma uma película na superfície dos dentes e no biofilme, que ajuda a manter o equilíbrio existente entre a desmineralização e a remineralização do dente.

As moléculas da película salivar possuem grande afinidade para as superfícies dentárias e controlam este processo de homeostasia por inibição da precipitação dos sais de fosfato de cálcio da solução, permitindo assim a manutenção do cálcio e do fosfato

num estado supersaturado na saliva (Lamont *et al.*, 2006).

A saliva promove a aglutinação dos EGM e aumenta a remoção bacteriana através dos seus componentes antimicrobianos que intervêm na adesão e colonização dos EGM na superfície dos dentes. Destes componentes antimicrobianos destacam-se as aglutininas, incluindo mucinas, glicoproteínas, fibronectina, lisozimas e imunoglobulina A secretora (sIgA).

As proteases e galactósidos da saliva evitam a adesão de *S. mutans*, pela destruição dos antigénios proteicos de superfície desta bactéria (Law *et al.*, 2007).

1.4.3.2. Dente

O dente é o órgão do hospedeiro onde se desenvolve a cárie, sendo vários os fatores associados a este processo: constituição e estrutura, maturação pós-eruptiva do esmalte, localização e morfologia (Sala & García, 2013).

Quando da erupção, o esmalte é constituído por 95% de material inorgânico e os restantes 5%, por água e matriz orgânica (Fejerskov & Kidd, 2008).

O esmalte é principalmente formado por cristais de hidroxiapatite; alguns destes cristais podem ser trocados por fluorapatite, que apresenta uma estrutura mais estável e com menor solubilidade em condições ácidas (Anderson & Domenik, 2010; González, 2010; Sala & García, 2013).

Do ponto de vista ultra estrutural, o grau de solubilidade do esmalte em meio ácido pode ser afetado pelo tamanho, forma e proximidade dos cristais (Fontana *et al.*, 2010). Deste modo, quanto maior for a compactação dos cristais, menor será o espaço para a difusão das partículas de água e consequentemente, será menor a capacidade de dissolução do esmalte (Anderson & Domenik, 2010; Sala & García, 2013).

Pela sua porosidade, o esmalte passa por um processo de maturação pós-eruptiva, no decurso do qual os iões minerais e iões fluoreto do meio oral vão difundir-se para a superfície do esmalte (Fejerskov & Kidd, 2008). Como resultado deste processo que ocorre durante aproximadamente dois anos após a erupção, o esmalte adquire maior resistência à desmineralização, (Melo *et al.*, 2008).

O cimento das superfícies radiculares sofre um processo de maturação semelhante ao do esmalte (Sala & García, 2013).

1.5. Manifestação clínica da cárie dentária

A manifestação clínica da cárie dentária é consequência da acumulação de inúmeros acontecimentos de desmineralização e remineralização (Melo *et al.*, 2008) que têm lugar em qualquer superfície de um dente onde o biofilme oral, também designado placa bacteriana ou placa dentária, acumulou e amadureceu (Fejerskov & Kidd, 2008; Sala & García, 2013). Esses locais incluem fossas, sulcos e fissuras nas superfícies oclusais, particularmente durante a erupção, superfícies proximais cervicais ao ponto/área de contacto e ao longo da margem gengival (Fejerskov & Kidd, 2008).

A cárie atinge as superfícies coronárias e os tecidos que a constituem, esmalte e dentina, e também as superfícies radiculares (Sala & García, 2013).

O predomínio da cárie é superior nas superfícies oclusais do primeiro e segundo molares, mais reduzida na superfície lingual dos dentes mandibulares e de risco médio nas superfícies proximais (Marsh *et al.*, 2009).

A expressão das lesões de cárie pode variar de alterações apenas visíveis a nível ultra estrutural até à total destruição do dente (Figura 3).

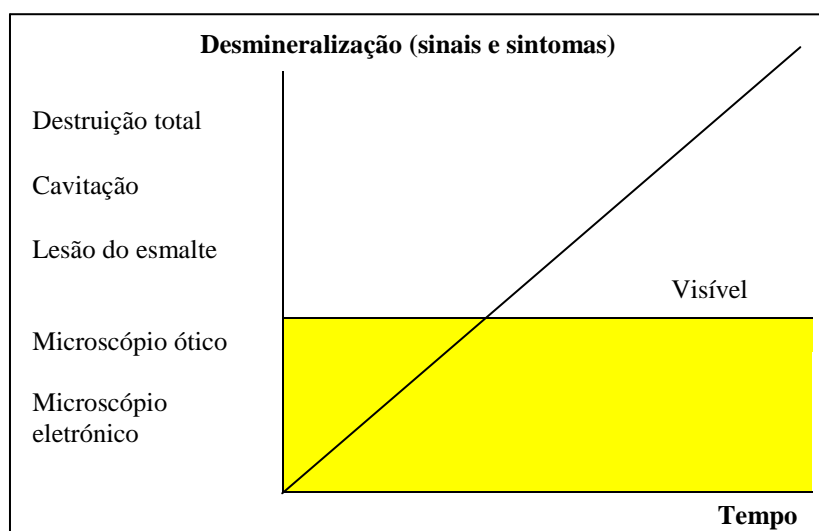


Figura 3 – Progressão da desmineralização dentária em função do tempo (Adaptado de Fejerskov & Kidd, 2008)

O primeiro indício visível são as lesões de mancha branca (*white spot*) do esmalte (Marsh *et al.*, 2009; Kidd, 2010), que são consequência da desmineralização subsuperficial da área afetada (Melo *et al.*, 2008; Sala & García, 2013) e a manifestação

do aumento da porosidade do esmalte, as quais com o decurso do tempo poderão mudar para cor castanha e mesmo quase preta (Fejerskov & Kidd, 2008).

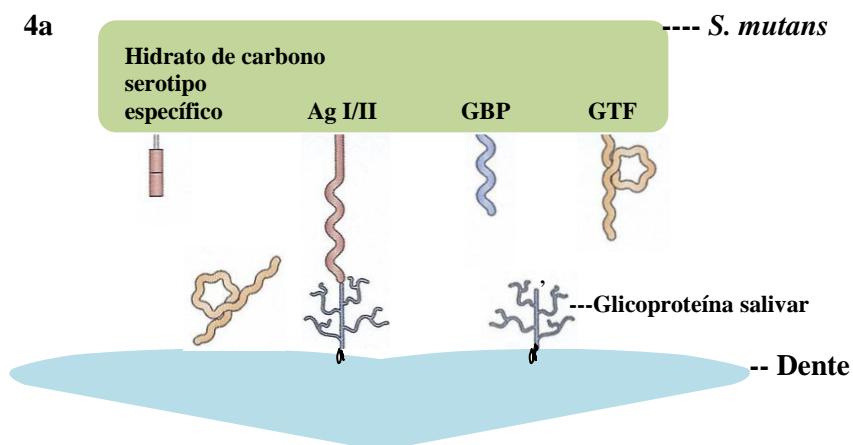
Atingido o esmalte, as cáries podem progredir através da dentina e alastrar-se à polpa (Marsh et al., 2009).

A progressão das lesões de cárie compreende um conjunto de processos dinâmicos, alternando fases de progressão com fases de inativação/regressão (Takahashi & Nyvad, 2008).

Quando as condições de desenvolvimento da cárie se mantêm sem alterações, assiste-se à irreversibilidade da perda de tecido e consequente formação de cavidades (Sala & García, 2013).

1.6. Patogénese molecular da cárie dentária

A patogénese molecular da cárie dentária associada ao EGM pode ser encarada como um processo que se desenvolve em 3 fases, cada uma das quais dispõe de alvos que possibilitam a atuação a nível imunitário (Kaur et al., 2013; Singh et al., 2013). A primeira fase consiste na adesão inicial dos microrganismos à película dentária (Figura 4a), que se processa por intervenção de uma adesina do EGM. A segunda fase consiste na fase de acumulação e depende da presença de sacarose, de glucosiltransferases (GTFs) e proteínas de ligação a glucano (GBPs) de EGM (Figura 4b). Na terceira fase (Figura 4c), ocorre a desmineralização dos tecidos dentários pelos metabolitos do biofilme oral (Taubman & Nash, 2006).



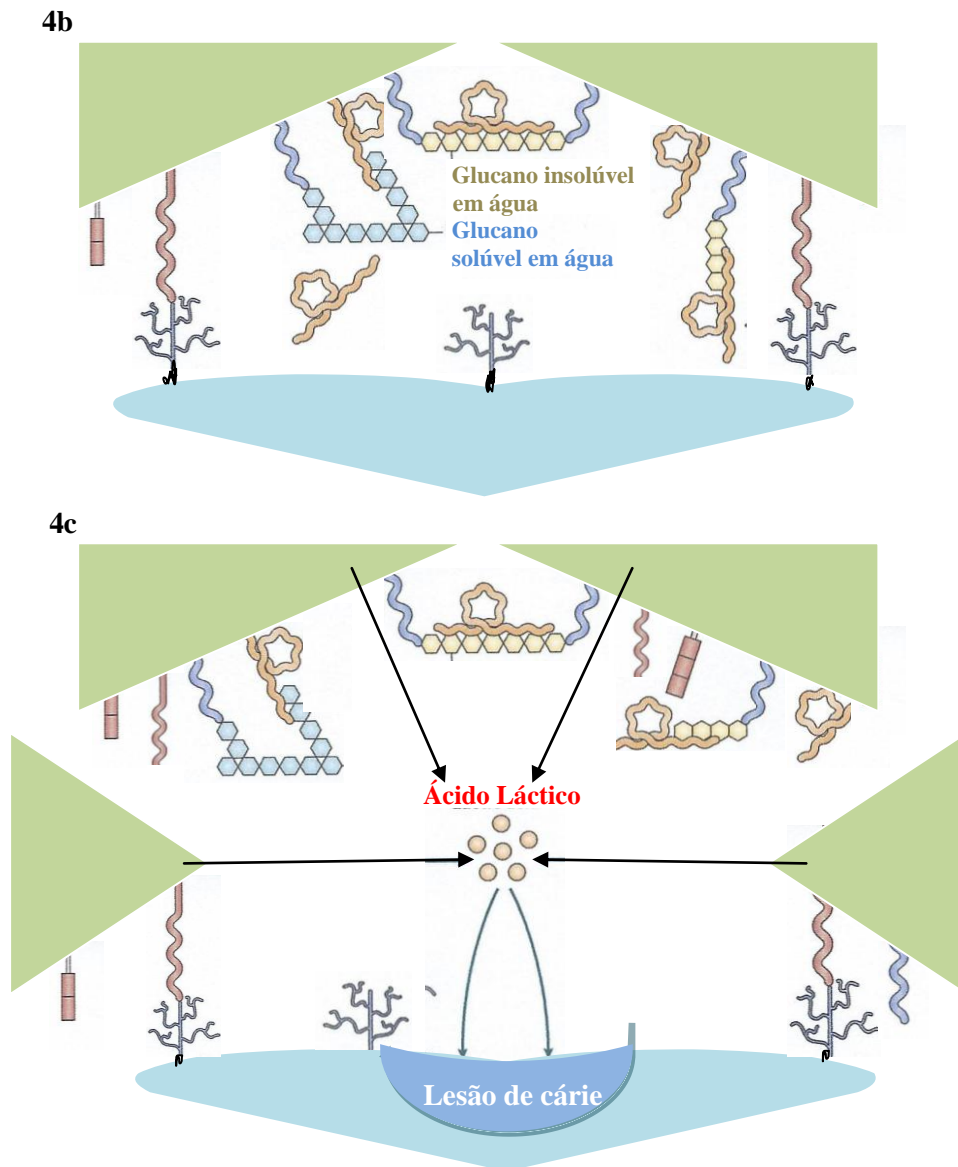


Figura 4 – Fases da patogénese molecular da cárie dentária (4a – 1ª fase; 4b – 2ª fase; 4c – 3ª fase)
(Adaptado de Taubman & Nash, 2006)

Os estreptococos acidogénicos necessitam de superfícies duras, como as que são disponibilizadas pelos dentes, para que ocorra a colonização sustentada e acumulação dos microrganismos (Smith, 2002, 2003; Singh *et al.*, 2013).

O esmalte do dente encontra-se recoberto por uma película, designada por película adquirida, que se forma através da adsorção seletiva de constituintes da saliva (Arosa *et al.*, 2012).

A película adquirida contém um elevado teor de glicoproteínas salivares, que vão ajudar a efetivar a adesão bacteriana, inicialmente cocos e bacilos gram-positivos, em especial *Streptococcus* e *Actinomyces* sp.. A progressão da acumulação bacteriana e o desenvolvimento do biofilme geram condições para que ocorra a multiplicação de

uma microflora anaeróbia, o que vai corresponder a um acréscimo da variedade dos microrganismos existentes no biofilme (Pereira *et al.*, 2010).

A adesão bacteriana inicial ao dente ocorre através da interação de proteínas bacterianas específicas com lectinas da película que cobre a superfície do dente (Shanmugam *et al.*, 2013). Esta propriedade das proteínas é característica de uma família de adesinas de estreptococos, referidas como antigénio I/II (Ag I/II) em *S. mutans* (Singh *et al.*, 2013).

A acumulação de *S. mutans* na superfície do dente está associada com a síntese de polímeros de glucose, derivados da cisão da sacarose em glucose e frutose. *S. mutans* produz a GTF, que catalisa a síntese de glucanos solúveis em água e glucanos insolúveis em água (Arosa *et al.*, 2012), os quais promovem a agregação dos estreptococos entre si e à película dentária (Pereira *et al.*, 2010).

Por intermédio da interação com GBPs associadas à superfície celular, os polímeros de glucose vão permitir a agregação de *S. mutans* a outros estreptococos orais (*S. mutans*, *S. sanguis*) e *Actinomyces viscosus* (Nogueira *et al.*, 2008).

A terceira e última fase da patogénese molecular da cárie é o resultado da atividade metabólica da microflora acumulada de EGM e provavelmente de outros microrganismos associados ao biofilme. Nesta acumulação bacteriana na superfície do dente, os EGM são os maiores produtores de ácido láctico (Smith, 2002, 2003; Singh *et al.*, 2013).

Em acentuadas e prolongadas condições de acidez, mais bactérias acidúricas vão tornar-se dominantes, incluindo não só *S. mutans*, mas também outros microrganismos que não pertencem aos EGM (Nyvad *et al.*, 2013).

A diminuição do valor do pH na interface, entre a superfície do dente e o biofilme oral, pode levar à desmineralização dos tecidos dentários, em que o cálcio e o fosfato são libertados para o meio externo pelos minerais dissolvidos quando o ácido se difunde através do esmalte permeável (Melo *et al.*, 2008).

Perante a falta de capacidade de tamponamento para evitar a dissolução dos tecidos dentários, a cárie dentária vai continuar a desenvolver-se (Smith, 2002, 2003; Singh *et al.*, 2013).

1.7. Fatores de virulência de *S. mutans*

Os fatores de virulência de *S. mutans* são componentes antigénicos candidatos a alvo das vacinas, ou seja, os vários componentes de natureza proteica intervenientes na patogénese molecular de *S. mutans*, podem induzir imunidade protetora (Gambhir *et al.*, 2012). Nesse sentido, estes componentes podem ser empregues na preparação de vacinas contra a cárie (Shivakumar *et al.*, 2009; Sumit, 2012; Silva *et al.*, 2013).

Na fase salivar e antes da colonização, os microrganismos podem ser eliminados da cavidade oral através da agregação modulada por anticorpos (Gambhir *et al.*, 2012).

Numa fase posterior, os anticorpos podem também bloquear os recetores necessários para que se efetue a colonização (por exemplo, adesinas), impedir a acumulação (por exemplo, domínios de ligação a glucano de GTF e GBP) ou inativar a atividade das GTFs que produzem os glucanos (Kaur *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2013).

S. mutans contém diversas moléculas de superfície (Tabela 2).

Tabela 2 – Fatores de virulência encontrados em *S. mutans* (Adaptado de Chamorro-Jiménez *et al.*, 2013)

Moléculas de superfície	Função
Antigénios polissacáridos específicos de cada um dos serotipos	Resistência à fagocitose e morte por leucócitos polimorfonucleares
Ácido lipoteicoico	Pode interagir com componentes do hospedeiro com carga negativa através de iões cálcio ou hidrogénio ou por ligações hidrofóbicas
Glucosiltransferases (GTFs)	Convertem a sacarose da dieta em polímeros de glucose, glucanos, que atuam no processo de adesão e como fonte nutricional (polissacáridos extracelulares)
Frutosiltransferases (FTFs)	Sintetizam frutanos a partir da sacarose que atuam como locais de ligação para a acumulação bacteriana
Proteínas de ligação a glucano (GBPs)	GBP A, GBP B, GBP C e GBP D; atuam na associação com a superfície da célula e no meio extracelular
Antigénio A	Proteína antigénica de 29 KDa. O antigénio A e o antigénio III são considerados a mesma proteína
Antigénio C	Proteína antigénica de 70 KDa
Antigénio D	Proteína antigénica de 13 KDa
Antigénio I/II	Proteína fibrilar de 185 KDa implicada na adesão inicial à película salivar que cobre a superfície dos dentes
Antigénio III	Proteína antigénica de 39 KDa codificada pelo gene <i>waPa</i>

Nos últimos anos, o foco da atenção dos alvos da vacina contra a cárie têm sido os seguintes antigénios proteicos: as adesinas antigénio I/II, as GTFs e as GBPs (Nogueira *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2013; Yan, 2013).

1.7.1. Adesinas

As adesinas dos dois principais agentes da cárie dentária, são: *S. mutans* – Ag I/II, também designada PAC ou P1; *S. sobrinus* – SpaA ou PAg (Kaur *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2013).

Há uma analogia na sequência, em aproximadamente 66%, entre o Ag I/II de *S. mutans* e o SpaA de *S. sobrinus*, mas, apesar da analogia, as adesinas de *S. mutans* e de *S. sobrinus* ligam-se a diferentes componentes na película salivar (Singh *et al.*, 2013).

O Ag I/II foi descrito por Russel e Lehner em 1978 (Singh *et al.*, 2013). É uma proteína de estrutura fibrilar da superfície de *S. mutans* que atua como adesina, permitindo a sua adesão à película salivar (Pinto *et al.*, 2005). Esta proteína contém uma região de repetição rica em alanina no terceiro terminal N e uma região de repetição rica em prolina no centro da molécula (Shivakumar *et al.*, 2009). Estas regiões de repetição têm sido relacionadas com a sua atividade como adesina (Shanmugam *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2013).

A imunização ativa com Ag I/II intato, imunização passiva com anticorpo monoclonal ou anticorpo transgênico para o domínio de ligação salivar, pode conferir proteção contra a cárie dentária causada por *S. mutans*, em roedores, primatas ou seres humanos, através da inibição pelo anticorpo à colonização inicial ou pela mediação do anticorpo na aglutinação e eliminação das bactérias com adesina na saliva (Shanmugam *et al.*, 2013).

1.7.2. Glucosiltransferases

As GTFs são enzimas extracelulares que transformam a sacarose da dieta em glucanos, polímeros da glucose, solúveis e insolúveis em água, com importante atividade na acumulação de *S. mutans* na superfície dos dentes (Pinto *et al.*, 2005). As GTFs para além de sintetizarem polissacáridos extracelulares (PEC), também sintetizam polissacáridos intracelulares (PIC) a partir da sacarose da dieta (Silva *et al.*, 2013).

S. mutans sintetiza três GTFs, que são codificadas por três genes, gtf B, gtf C e gtf D. Cada GTF caracteriza-se pelo tipo de solubilidade em água do glucano que produzem: (i) a GTF-I (GTF B), de 162 KDa, produz glucano insolúvel em água,

denominado mutano; (ii) a GTF-S (GTF D), de 155 KDa, produz glucano solúvel em água; (iii) a GTF-SI (GTF C), de 149 KDa, produz uma mistura de glucanos solúveis e insolúveis em água (Pinto *et al.*, 2005; Shivakumar *et al.*, 2009; Chamorro-Jiménez *et al.*, 2013; Krzysciak *et al.*, 2013).

As GTFs que sintetizam glucanos insolúveis em água (*S. mutans* – GTF B e GTF C), relativamente às GTFs que sintetizam glucanos solúveis em água (GTF D), têm sido diretamente relacionados com a sua patogenicidade (Smith, 2003; Singh *et al.*, 2013).

Todas as GTFs possuem como estruturas importantes, o domínio terminal N, como o sítio catalítico para a sacarose (SB ou CAT), que fixa e hidrolisa a sacarose e o domínio do terminal C, associado à ligação a glucanos (GLU ou GB) e conseqüentemente à agregação bacteriana (Figura 5) (Pinto *et al.*, 2005). Estes domínios são acessíveis à ligação com anticorpo (Chamorro-Jiménez *et al.*, 2013).

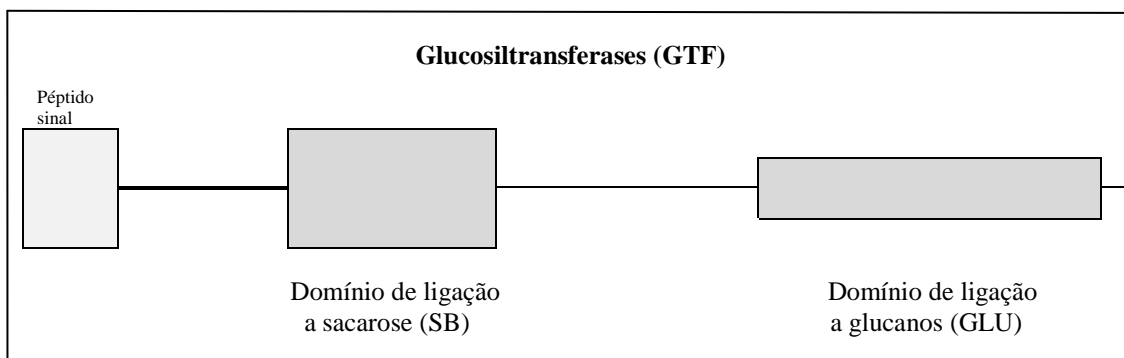


Figura 5 – Representação das glucosiltransferases (Adaptado de Chamorro-Jiménez *et al.*, 2013)

S. mutans que perderam a capacidade de produzir glucanos através de mutações naturais ou induzidas nos genes *gtf* que codificam as GTFs, não provocam uma doença de cárie relevante em modelos animais (Kaur *et al.*, 2013).

As vacinas assentes em GTF parecem abranger a inibição funcional do catalisador e/ou a atividade de ligação ao glucano. Esta hipótese baseia-se no facto de se produzirem respostas imunitárias aumentadas em comparação com a imunização, quer com o péptido por si só, quer na proteção contra a cárie dentária, quando se procede a co-imunização com péptidos derivados de GTF das regiões catalítica e de ligação a glucano (Taubman & Nash, 2006).

Deste modo, pode concluir-se que as GTFs também são uma possibilidade

importante como antigénio nas vacinas contra a cárie (Pinto *et al.*, 2005).

1.7.3. Proteínas de ligação a glucanos

Embora vários produtos de EGM com atividades catalíticas possam ligar-se a glucanos, como as GTFs, existe um grupo de proteínas sintetizado por EGM, denominado como proteína de ligação a glucano, que parece participar especificamente como recetores de glucano (Taubman & Nash, 2006).

S. mutans produz pelo menos 4 proteínas não enzimáticas de ligação a glucanos, designadas GBP A, GBP B, GBP C e GBP D, com diferentes: afinidades ao glucano, estrutura e propriedades imunológicas (Nogueira *et al.*, 2008; Krzysciak *et al.*, 2013). Estas proteínas podem ser secretadas (GBP A, GBP B, GBP D) ou permanecer ligadas de forma covalente à parede celular (GBP C) (Nogueira *et al.*, 2008).

As GBPs têm a aptidão para se ligar a um α 1-6 glucano, apesar de terem potencial para poder estabelecer outras ligações a glucano (Kaur *et al.*, 2013).

A proteína GBP A tem um peso molecular de 59,0 KDa (Gambhir *et al.*, 2012). É uma proteína muito hidrofóbica e pode ser secretada livremente no meio extracelular ou em associação com a superfície celular, e contém sequências de aminoácidos análogas às existentes na GTF-I de *S. downei* e GTF-I e GTF-SI de *S. mutans* (Pinto *et al.*, 2005).

A proteína GBP B de *S. mutans* tem um peso molecular de 41,3 KDa. A sua sequência de aminoácidos não está relacionada com as sequências de GTFs ou outras GBPs de *S. mutans*. O terceiro terminal N tem várias regiões imunitárias dominantes, o que explica a aparente expressiva imunogenicidade desta proteína em humanos e animais (Smith, 2002; Singh *et al.*, 2013). Só a GBP B tem mostrado induzir uma resposta imunitária protetora a cáries dentárias experimentais (Sumit, 2012; Yan, 2013).

A proteína GBP C de *S. mutans* tem um peso molecular de 63,5 KDa (Gambhir *et al.*, 2012). É responsável pela adesão dependente de glucanos em *S. mutans*. Shimazaki *et al.* verificaram que a baixa expressão desta proteína é decisiva para que ocorra a colonização da superfície dentária por *S. mutans*, dado que elevado teor da GBP C fomenta a agregação entre *S. mutans* antes da adesão ao biofilme oral (Pinto *et al.*, 2005).

As GBPs ou as suas frações estruturais têm sido largamente usadas na pesquisa de vacinas contra a cárie, com resultados muito satisfatórios em modelos animais (Pinto *et al.*, 2005).

1.8. Diagnóstico

O diagnóstico da cárie pode ser encarado como um processo intelectual, antes da determinação das alternativas mais apropriadas de tratamento (Chu *et al.*, 2013).

Reconhecendo o conceito atual da cárie dentária, torna-se imprescindível aceitar a existência de lesões sem cavitação para o diagnóstico precoce da cárie (Melo *et al.*, 2008).

O critério clássico da OMS, que diagnostica as cáries quando a doença atinge um estágio de cavitação, deu lugar a novos critérios de diagnóstico de lesões incipientes e sem cavitação, sem colocar em causa o valor e a confiança do diagnóstico (Sala & García, 2013).

Este novo entendimento da cárie permite a utilização de tratamentos que providenciem a remineralização de lesões sem cavitação e a manutenção da estrutura dentária, função e estética (Chu *et al.*, 2013; Pretty & Ellwood, 2013). De acordo com esta nova visão é primordial a monitorização pormenorizada do processo da cárie e a capacidade de deteção e quantificação das pequenas alterações de remineralização na lesão de cárie (Pretty & Ellwood, 2013).

O diagnóstico precoce da cárie é fundamental (Manton, 2013). Assenta no tratamento da doença e não do dente, e no pressuposto de que não existem indivíduos imunes à cárie dentária. A deteção precoce da cárie permite atuar e reverter o processo, fomentando a remineralização e sem necessidade de perder os dentes (Melo *et al.*, 2008).

O objetivo final do diagnóstico da cárie dentária é facultar a seleção do procedimento terapêutico mais adequado para obtenção dos melhores resultados para o paciente. Entre os métodos utilizados evidenciam-se o diagnóstico visual e tátil. Existem métodos adicionais, desde os mais clássicos, como a radiografia e a transiluminação com fibra ótica, e os mais recentes, como sejam a resistência elétrica à transmissão ou métodos assentes nas trocas de fluorescência do tecido desmineralizado (Sala & García, 2013).

CAPÍTULO 2: IMUNOLOGIA DA CAVIDADE ORAL

2.1. Ontogenia da resposta imunológica da cavidade oral

As crianças nascem com a cavidade oral estéril (Negrini *et al.*, 2009; Chamorro-Jiménez *et al.*, 2013) e em apenas algumas horas é colonizada por inúmeros microrganismos (Pereira *et al.*, 2010).

Os principais componentes da microflora oral inicial são o *S. salivaris* e o *S. mitis*, ambos colonizam a criança pouco tempo após o seu nascimento (Negrini *et al.*, 2009).

A diversidade de microrganismos da cavidade oral aumenta acentuadamente após o nascimento, apresentando espécies comensais patogênicas com potencial cariogênico, das quais se destaca *S. mutans* (Nogueira *et al.*, 2011).

A colonização da mucosa oral vai depender da saúde oral materna durante a gestação, da existência de aleitamento materno, do controle dos agentes patogênicos ambientais e da imunização ativa com *S. mutans* (Pereira *et al.*, 2010).

A interação existente entre os microrganismos patogênicos e o sistema imunitário rege-se por um equilíbrio delicado. As defesas do hospedeiro são variadas, mas devido a condicionantes externos, por vezes não são suficientes para impedir o estabelecimento e o desenvolvimento da doença (Pereira *et al.*, 2010).

A integridade da mucosa oral e a sua resistência à colonização é determinante para a manutenção da saúde oral, em que os mecanismos e fatores imunológicos (componentes humorais e celulares) transmitidos pela saliva e fluido crevicular, desempenham um papel crucial (Arosa *et al.*, 2012).

As superfícies mucosas estão em contato com o meio externo e encontram-se expostas a uma grande variedade de antigénios (Ag), a secreção de anticorpos pelo sistema imune mucoso constitui a principal defesa contra esses antigénios (Campos *et al.*, 2011), a qual ocorre pela grande quantidade de plasmócitos situados em torno das glândulas exócrinas e das mucosas secretoras, que secretam aproximadamente 70% dos anticorpos do organismo (Campos *et al.*, 2011).

O sistema imunitário da mucosa oral constitui a primeira linha de defesa na

resposta imune adaptativa, inclui linfócitos distribuídos no trato gastrointestinal, respiratório, geniturinário e glândulas associadas às mucosas (mamárias, salivares e lacrimais). A competência do sistema imunitário na ativação das defesas face a agentes infecciosos durante o desenvolvimento da microflora indígena, pode ter consequências relevantes na defesa do hospedeiro (Nogueira *et al.*, 2011).

O principal anticorpo presente nas secreções é a sIgA. Esta imunoglobulina (Ig) tem a capacidade de resistir a ambientes adversos, como o trato digestivo e respiratório (Yan, 2013), e encontra-se na saliva, colostro, secreções intestinais, fluidos bronco-alveolares, urina, lágrimas e outros fluídos que lubrifiquem as mucosas. O facto de se encontrar nas secreções, torna-a muito importante na imunidade local das mucosas (Campos *et al.*, 2011).

Em menor proporção encontram-se as IgA, IgG e IgM séricas, que atingem a cavidade oral através do fluido crevicular (Setia *et al.*, 2012; Chamorro-Jiménez *et al.*, 2013).

As reações imunológicas a nível sistémico são encontradas no sangue e através do fluido crevicular vão manifestar-se ao nível dos dentes e da gengiva (Arosa *et al.*, 2012).

Apesar dos níveis salivares de IgA no nascimento serem baixos, este sistema é funcional em recém-nascidos, os bebés rapidamente desenvolvem anticorpos IgA salivares, em simultâneo com o estabelecimento da microflora oral (Smith, 2003; Charone *et al.*, 2012; Yan, 2013). Os níveis de sIgA aumentam progressivamente com a idade e com a maturação do sistema imunitário (Nogueira *et al.*, 2011), aumentando rapidamente nos três primeiros meses de vida e depois de uma forma mais lenta (Arosa *et al.*, 2012).

A IgA salivar começa a ser segregada pelas quatro a oito semanas de vida, mas ainda sem estrutura de sIgA. Por volta dos dois a três meses, como resposta à colonização bacteriana do trato respiratório e digestivo, observa-se um pico de IgA, já dimérica e com componente secretor que parece corresponder a uma resposta imunológica do sistema secretor (Smith, 2003; Arosa *et al.*, 2012).

A sIgA que se encontra na saliva não tem origem na IgA sérica (via fluido crevicular), sendo produzida localmente pelos plasmócitos das glândulas salivares, os

quais também produzem as cadeias J que permitem a sua constituição dimérica, condição fundamental para que forme um complexo com o componente secretor dos ácidos salivares onde ocorre a sua associação à IgA dimérica (Arosa *et al.*, 2012).

A concentração de sIgA aproxima-se da dos adultos por volta de um a dois anos de idade (Taubman & Nash, 2006).

A IgG salivar só aparece “*depois do nascimento (a maior parte de origem materna). Desaparece, pouco depois do nascimento, para voltar a reaparecer no momento da erupção dentária (IgG de origem sérica, oriunda sobretudo do fluido crevicular)*” (Arosa *et al.*, 2012; p. 525).

A IgG presente em pequena quantidade na saliva reflete a imunidade sistêmica, dado que vem do plasma sanguíneo (Nogueira *et al.*, 2011).

A IgM está ausente na saliva no nascimento e raramente é encontrada na saliva de crianças e adultos (Nogueira *et al.*, 2011).

Os níveis totais de sIgA têm sido considerados como indicador do grau de maturidade do sistema imune mucoso em crianças. A diminuição transitória nos níveis de IgA na saliva, foram associadas a uma maior suscetibilidade a infecções do trato gastrointestinal, o que reforça a relevância da maturação do sistema imune mucoso na suscetibilidade a infecções (Nogueira *et al.*, 2011).

Os mecanismos de defesa do recém-nascido, relativamente à imunologia da cavidade oral, são essencialmente de origem materna, quer no útero (passagem transplacentária de IgG), quer na fase de amamentação (IgA, lactoferrina, lactoperoxidase e ácidos gordos) (Arosa *et al.*, 2012).

O recém-nascido amamentado recebe imunoglobulinas maternas, maioritariamente na forma de sIgA, que é abundante no colostro (cerca de 20 mg/ml) e menor no leite (1 mg/ml) (Kaur *et al.*, 2013).

O leite materno também apresenta IgM e IgG em concentrações relativamente baixas, as quais são segregadas no colostro e leite e têm tal como a IgG transferida por via placentária, especificidade para os agentes patogénicos com os quais a mãe contactou (Arosa *et al.*, 2012).

A sIgA não é absorvida pela circulação e induz imunização passiva, limitada particularmente ao trato oro-gastrointestinal e possivelmente ao trato respiratório superior (Kaur *et al.*, 2013).

Assim é compreensível que os recém-nascidos amamentados com leite materno, ao contrário dos alimentados com fórmulas adaptadas, sejam menos suscetíveis às infeções, nomeadamente à cárie dentária (Pereira *et al.*, 2010), para além de desenvolverem mais precocemente o seu sistema secretor imunitário (Arosa *et al.*, 2012).

O leite materno é também rico em células fagocitárias, polimorfonucleares e macrófagos, com capacidade para fagocitar microrganismos extracelulares, modulando o estabelecimento da microflora oral. O colostro também apresenta macrófagos, que regulam a imunidade inata e adquirida, cumprindo na totalidade as principais funções do sistema imunitário: especificidade, diversidade e memória. Deste modo, o leite materno funciona como um suplemento imunitário (Pereira *et al.*, 2010).

O sistema imune mucoso da criança responde aos microrganismos existentes na cavidade oral, sendo encontrados por volta dos cinco anos, anticorpos específicos para o *S. mutans* e *S. salivaris* (Arosa *et al.*, 2012).

O estado nutricional, aleitamento materno, tempo de gestação, exposição a antigénios, fatores genéticos e deficiência no sistema imunitário inato e adaptativo, são fatores que influenciam o desenvolvimento de uma resposta imune da mucosa eficaz e podem aumentar a suscetibilidade a agentes infecciosos (Nogueira *et al.*, 2011).

2.1.1. Imunoglobulinas

As imunoglobulinas podem apresentar-se sob duas formas, a membrana e a solúvel, a primeira tem função primordial na identificação do antígeno pelos linfócitos B e a segunda, designada de anticorpo, modula as respostas humorais (Arosa *et al.*, 2012).

As Ig têm uma estrutura básica, composta de duas cadeias pesadas e duas cadeias leves. O isotipo da Ig é determinado pelo tipo de cadeia pesada da imunoglobulina (Kasper *et al.*, 2006).

Os principais anticorpos presentes no sangue, na linfa e no líquido dos tecidos conectivos, são os isotipos IgG, IgA e IgM (Chamorro-Jiménez *et al.*, 2013).

A IgG é o isotipo *major* do soro (75%) (Setia *et al.*, 2012) e apresenta quatro subclasses: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (Chamorro-Jiménez *et al.*, 2013).

Os anticorpos IgG inibem a adesão de *S. mutans*, neutralizando as enzimas e os fatores de virulência de *S. mutans*. A IgG presente no fluido crevicular promove a fagocitose e eliminação de *S. mutans* e de outros microrganismos orais através da opsonização e consequente fagocitose e/ou ativação do complemento (Law *et al.*, 2007).

A IgM corresponde a 5-10% das Ig no soro. É a primeira Ig sintetizada e é a Ig produzida numa resposta primária a um antigénio (Chamorro-Jiménez *et al.*, 2013).

A IgM tem um importante papel como Ig secretora (Chamorro-Jiménez *et al.*, 2013). As IgM, que podem aglutinar *S. mutans* e ativar o sistema do complemento, são fundamentais nos primeiros dias da resposta imune primária (Law *et al.*, 2007).

A IgA é a segunda classe de Ig mais abundante no soro (10-13%). A IgA ocorre sob duas formas. A IgA do soro é um monômero, enquanto a IgA encontrada nas secreções ocorre na forma dimérica e designa-se por IgA secretora (Shanmugam *et al.*, 2013).

A IgA apresenta duas subclasses, IgA1 e IgA2, em que a relação proporcional na saliva é de 3:2, estabelecida ainda na infância. Estruturalmente diferem pela existência de um aminoácido na cadeia pesada da IgA1, facto que lhe permite ser mais flexível na interação com os epítomos. Na saliva, IgA1 atua de forma preponderante sobre os antigénios proteicos e hidratos de carbono e a IgA2 atua sobre os antigénios lipídicos (ácidos lipoproteicos e lipopolissacarídeos) (Campos *et al.*, 2011).

A IgA1, ao contrário da IgA2, é suscetível à proteólise pela enzima protease IgA1, produzida por quase todos os microrganismos patogénicos da mucosa (Motta *et al.*, 2006).

Das funções da sIgA, destacam-se o aumento da atividade de lactoferrina, peroxidase e lisozima, a neutralização de vírus e toxinas e a eliminação de antigénios da saliva (Parisotto *et al.*, 2011).

A sIgA limita a ligação das bactérias às células da mucosa oral, diminuindo a carga superficial negativa e as propriedades hidrofóbicas da bactéria, levando assim à redução da interação da bactéria com recetores das células do hospedeiro (Campos *et*

al., 2011).

A sIgA afeta a acumulação do biofilme, dependente de sacarose, inibindo a produção de glucanos através da inativação da GTF. Tem também, a capacidade de inibir a produção de ácidos e outras atividades metabólicas (Chamorro-Jiménez *et al.*, 2013).

Deste modo, as atividades da sIgA podem interferir na colonização do ambiente oral por *S. mutans* (Parisotto *et al.*, 2011).

A sIgA apresenta maior resistência às enzimas proteolíticas que as IgA, IgG e IgM séricas, pelo que está melhor adaptada à cavidade oral e a outras membranas mucosas (Chamorro-Jiménez *et al.*, 2013).

2.2. Sistema imune mucoso comum

O sistema imune mucoso, normalmente descrito pela sigla MALT (tecido linfoide associado às mucosas), representa um sistema imunológico altamente compartimentado que pode funcionar independentemente do sistema imune sistémico (Cesta, 2006; Janeway *et al.*, 2007).

Constitui a maior parte do nosso sistema imunitário e abrange no ser humano adulto a proteção de uma área de cerca de 400 m² de superfícies mucosas (Michalek & Childers, 2001).

A evidência de um sistema imune mucoso comum nos humanos é indireta. Inúmeras pesquisas mostram que a exposição de antígenos ao MALT pode induzir respostas imunológicas não apenas na região de indução, mas também em locais distantes dessa região (Shivakumar *et al.*, 2009; Sumit, 2012; Gambhir *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2013; Kaur *et al.*, 2014). Este sistema atua através da ampliação da resposta imunitária produzida (Childers *et al.*, 2002).

O MALT pode ser funcionalmente dividido em locais indutores e efetores. Nos seres humanos os locais indutores compreendem essencialmente as estruturas linfoides localizadas nas placas de Peyer, apêndice e gânglios linfáticos do trato intestinal, constituindo o GALT (tecido linfoide associado ao intestino), e as estruturas linfoides localizadas nos anéis de Waldeyer, amígdalas nasofaríngeas e palatinas, constituindo o NALT (tecido linfoide associado à mucosa nasal) (Childers *et al.*, 2002; Pinto *et al.*, 2005). As glândulas exócrinas, como a lacrimal e salivar, a lâmina própria e

epitélio do trato gastrointestinal, lâmina própria do trato respiratório superior e geniturinário, constituem os locais efetores (Rich *et al.*, 2013).

O MALT distingue-se dos tecidos linfoides sistêmicos através de duas características principais. Em primeiro lugar, a existência de células epiteliais especializadas (células M) que cobrem os tecidos do MALT, nas criptas dos anéis de Waldeyer (NALT) e sobre as placas de Peyer (GALT). Em segundo lugar, o MALT contém regiões organizadas que incluem uma área subepitelial, zonas de células B com centros germinativos contendo células B comprometidas com IgA e regiões adjacentes de células T com células apresentadoras de antígenos (APC) (William, 2008).

Apesar de se encontrarem distantes do ponto de vista anatômico, o GALT e o NALT estão funcionalmente interligados e após a sua estimulação aumentam os níveis de sIgA em todas as secreções, incluindo a saliva (Pinto *et al.*, 2005), que vai contatar com *S. mutans* na superfície do esmalte (Figura 6).

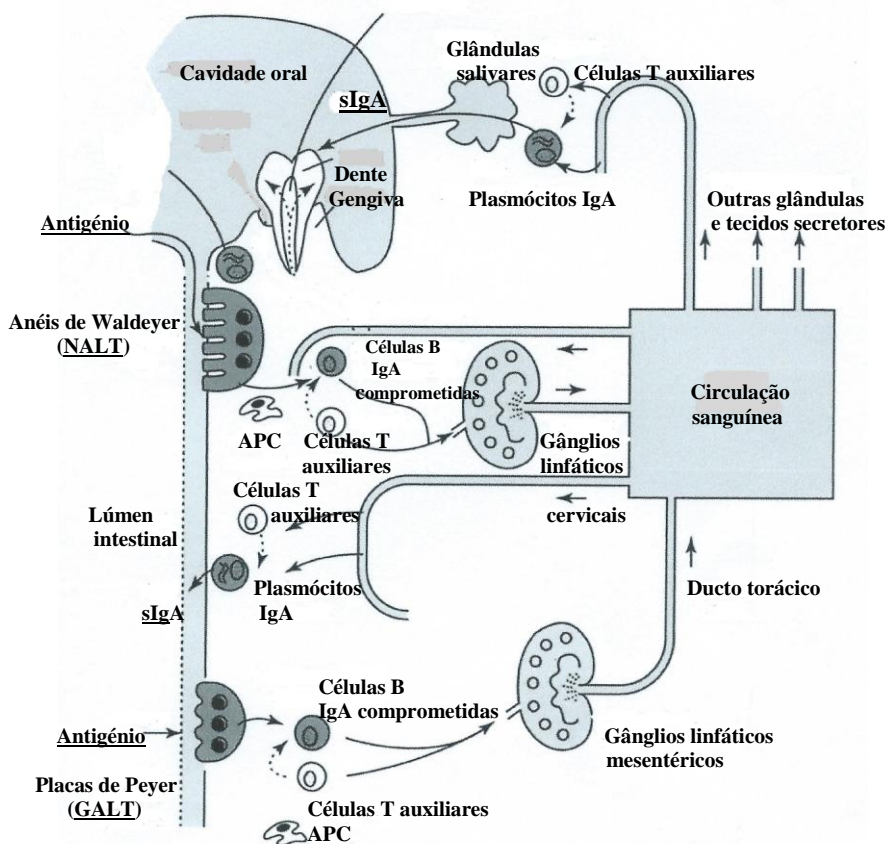


Figura 6 - Sistema imune mucoso comum (Adaptado de Russell *et al.*, 1999)

A estimulação de locais indutores (GALT e NALT) com antígeno, resulta no aparecimento em vários locais efetores remotos, incluindo as glândulas salivares, e conseqüentemente na cavidade oral, de sIgA

com especificidade para o antígeno encontrado no GALT ou NALT.

As células M capturam os antígenos e transferem-nos para as APCs subjacentes que os apresentam às células T auxiliares. As células T auxiliares estimulam as células B a diferenciarem-se nas células precursoras da IgA secretora. Células B e T estimuladas migram através dos gânglios linfáticos drenantes, entram na circulação sanguínea e atingem vários locais efetores (Russell *et al.*, 1999), entre os quais as glândulas salivares, onde a IgA termina a sua maturação unindo-se ao componente secretor sendo libertada sob a forma de sIgA (Russell *et al.*, 1999; Michalek & Childers, 2001).

2.3. Resposta imune do hospedeiro

O sistema imunitário humano evoluiu durante milhões de anos para desenvolver complexos mecanismos de defesa (Kasper *et al.*, 2006), mediados pelas primeiras reações de imunidade inata e a subsequente resposta imunitária adaptativa (Chamorro-Jiménez *et al.*, 2013), que atuam de forma sinérgica (Pereira *et al.*, 2010), destinados a proteger o ser humano contra os microrganismos e os seus fatores de virulência (Kasper *et al.*, 2006).

A imunidade inata é a proteção natural e não específica contra os diferentes agentes patogénicos, sendo constituída por barreiras físicas e químicas, por células fagocitárias, pelas proteínas do sistema de complemento e por proteínas denominadas citocinas (Campos *et al.*, 2011; Chamorro-Jiménez *et al.*, 2013).

Os mecanismos primários protegem os indivíduos saudáveis contra microrganismos produtores de cáries e não dependem do número de exposições ao antígeno, nem diferenciam o tipo de substâncias estranhas (Chamorro-Jiménez *et al.*, 2013).

A imunidade adquirida, também chamada de adaptativa, pode ser adquirida de modo ativo ou passivo (Shanmugam *et al.*, 2013).

No caso da imunidade celular, os seus componentes são as APC e linfócitos T (LT); na imunidade humoral são os linfócitos B (LB).

De um modo geral, a imunidade humoral desempenha uma atividade importante

na defesa do hospedeiro contra as infecções produzidas por agentes patogénicos extracelulares, como *S. mutans*, e a imunidade celular contribui para eliminar os agentes patogénicos intracelulares, como vírus, algumas bactérias e parasitas (Chamorro-Jiménez *et al.*, 2013).

A imunidade adquirida caracteriza-se por respostas específicas a um antígeno estranho, patogénico ou não. Após o contato inicial com determinado antígeno (preparação imunológica), a exposição posterior ao mesmo antígeno induz uma resposta imunitária mais rápida e mais forte (memória imunológica) (Kasper *et al.*, 2006).

Relativamente às respostas mediadas por células, *S. mutans* pode estimular os linfócitos humanos (LT e LB) a desenvolver e libertar citocinas que vão atuar sobre o processo inflamatório e na reatividade imunitária local. Este efeito pode ser aumentado pela acumulação do biofilme.

Verificou-se que a incidência de cárie será tanto menor, quanto mais elevado for o índice de resposta linfo-proliferativa e o título de anticorpos anti-*S. mutans* (Arosa *et al.*, 2012).

Muitos dos antígenos presentes no biofilme são T-dependentes, o que vai implicar o seu processamento pelas APC (macrófagos e células dendríticas) e a sua apresentação através das moléculas da classe I ou II, do complexo *major* de histocompatibilidade (MHC), aos linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) e linfócitos T auxiliares (CD4⁺) (Pereira *et al.*, 2010).

Os linfócitos T CD4⁺ são particularmente estimulados pelo *S. mutans* e estão envolvidos na ajuda aos linfócitos B para produzirem anticorpos.

Animais deficientes em linfócitos T, animais atímicos, têm mais cárie depois de infetados com *S. mutans* (Arosa *et al.*, 2012).

O sistema do complemento desencadeia e mantém a reação inflamatória, através das frações C3a e C5a, que vão aumentar a permeabilidade vascular (Pereira *et al.*, 2010). A fração C3b e os anticorpos séricos IgG anti-*S. mutans* são opsoninas fortes, com origem no fluido crevicular, que podem opsonizar *S. mutans* facilitando e tornando a fagocitose pelas células polimorfonucleares e macrófagos mais eficaz, conduzindo à sua destruição.

Deste modo, a opsonização, a fagocitose e consequente destruição bacteriana pelos leucócitos ou macrófagos, podem representar um papel primordial na proteção contra a progressão da colonização pelo *S. mutans* (Arosa *et al.*, 2012).

Outra via de imunidade celular reside no facto de *S. mutans* ser deglutido (Motta *et al.*, 2006) e permitir uma resposta imunitária associada ao tecido linfoide intestinal (placas de Peyer) (Pereira *et al.*, 2010). Estas células sensibilizadas viajam pela circulação sanguínea e pela linfa até às mucosas, incluindo o revestimento do trato gastrointestinal, respiratório, geniturinário, glândulas mamárias, lacrimais e salivares (Motta *et al.*, 2006), contribuindo para a produção de anticorpos sIgA específicos para *S. mutans* deglutidos, encontrados na saliva e outros fluidos (Pereira *et al.*, 2010).

Verificou-se que o aumento da concentração de anticorpos sIgA anti-*S. mutans* presentes na saliva, não acompanha a progressão da cárie, estando associado com o número de cáries estabelecidas, o que está de acordo com a fraca memória imunitária da imunidade secretora (Pereira *et al.*, 2010).

Apesar da importância da sIgA, não é possível estabelecer uma relação quantitativa significativa entre o título de anticorpos IgA e o desenvolvimento da cárie dentária. Os anticorpos salivares exercem especialmente uma função protetora e funcionam como um índice da frequência e extensão da colonização por *S. mutans* (Arosa *et al.*, 2012).

A ocorrência de cárie é superior em indivíduos com défice de sIgA (imunodeficiência primária). Porém, verifica-se frequentemente nestes indivíduos uma secreção compensatória de IgM salivar.

No entanto, uma pesquisa recente mostrou uma diferença estatisticamente considerável no número de cáries na dentição decídua, mas não na permanente em crianças com baixo teor de sIgA, e estas crianças encontram-se em maior risco para o desenvolvimento da cárie (Pereira *et al.*, 2010).

Quando a cárie se estabelece existe um aumento da concentração de anticorpos séricos, os quais se vão manter no soro durante meses ou anos.

O teor de IgA anti-*S. mutans* é tão variável que não permite tirar conclusões categóricas. Pelo contrário, os anticorpos IgG, provenientes do fluido crevicular, podem atingir elevada concentração na saliva, indicando que níveis elevados de IgG estão relacionados com baixos índices de cárie, especialmente em jovens adultos (Arosa *et al.*, 2012).

Apesar de na maioria das situações o ser humano dispor da capacidade para

exibir uma resposta imunitária celular e humoral a *S. mutans*, se a cárie é exposta à sua normal evolução, essas respostas imunitárias são normalmente insuficientes (Arosa *et al.*, 2012).

CAPÍTULO 3: IMUNIZAÇÃO CONTRA A CÁRIE DENTÁRIA

3.1. Imunização ativa – Vacina contra a cárie dentária

A imunização ativa é o processo pelo qual se estimula o sistema imunológico através do uso de vacinas, a produzir anticorpos específicos, contudo sem que os sintomas da doença sejam induzidos (Miranda *et al.*, 2001).

Tendo em consideração a natureza pandémica da cárie e as suas implicações na saúde e na economia, não é surpreendente que o desenvolvimento de uma vacina contra a cárie tenha atraído um interesse tão elevado (Pinto *et al.*, 2005).

De todos os processos que potencialmente podem controlar e inibir a ação bacteriana na cavidade oral, a vacina é o método mais específico (Motta *et al.*, 2006; Charone *et al.*, 2012).

As vacinas são particularmente adequadas para planos de saúde pública, particularmente em ambientes onde não sejam prestados regularmente os cuidados de saúde (Smith, 2003; Gambhir *et al.*, 2012).

Estamos agora na sétima década de pesquisa sobre vacinas destinadas a prevenir ou a deter a cárie dentária.

Na década de 1940, os *Lactobacillus* estavam entre os principais alvos bacterianos (Smith, 2012). A imunização contra *Lactobacillus* não originou proteção adequada contra a cárie, uma vez que estes microrganismos são mais uma consequência do que a causa da iniciação da cárie e só se encontram presentes em lesões profundas da cárie dentária (Krithika *et al.*, 2004a)

A era moderna da terapia com vacinas começou com Bowen no final da década de 1960 (Smith, 2003) e o foco da atenção estava centrado nos EGM (*S. mutans* e *S. sobrinus*), dada a sua associação repetida com a cárie dentária, particularmente na primeira infância (Smith, 2012).

Os acentuados progressos na produção de modelos de vacina contra a cárie dentária são o resultado de muitas investigações genéticas e moleculares orientadas para *S. mutans* e ao mecanismo da resposta imune do hospedeiro. Estas pesquisas têm permitido evidenciar os melhores antigénios estreptocócicos para a vacina, assim como

as melhores vias de administração, com competência para diminuir a colonização bacteriana e conseqüentemente o número de lesões de cárie (Pinto *et al.*, 2005).

3.1.1. Mecanismo de ação

As pesquisas efetuadas mostram a utilização de dois principais mecanismos imunitários para conferir proteção contra a cárie. Um dos mecanismos utiliza a saliva e atua sobre o domínio salivar. O outro mecanismo envolve o fluido crevicular gengival e atua sobre o domínio gengival (Kaur *et al.*, 2013).

A saliva contém aproximadamente 1-3% da concentração de Igs, sendo como referido anteriormente que a maioria é a sIgA e que contém ainda as IgA, IgG e IgM provenientes do fluido crevicular gengival (Shivakumar *et al.*, 2009).

O mecanismo que utiliza o fluido crevicular gengival para exercer ação na superfície do dente e conferir proteção imune contra a cárie, envolve todos os componentes humorais e celulares do sistema imunitário sistêmico (Gambhir *et al.*, 2012; Kaur *et al.*, 2013).

3.1.2. Tipos de vacinas

Existem três grandes grupos de vacinas:

I – Vacinas vivas, que utilizam microrganismos vivos, mas atenuados;

II – Vacinas inativas que podem ser:

- Vacinas inteiras que utilizam microrganismos inativados por processos químicos ou físicos;
- Vacinas de subunidades:
 - Vacinas de péptidos sintéticos;
 - Vacinas polissacarídicas;
 - Vacinas conjugadas;

III – Outras vacinas:

- Vacinas recombinantes;
- Vacinas anti-idiotípicas;
- Vacinas de ADN.

Estudos iniciais sobre vacinas contra a cárie dentária usaram células vivas

(atenuadas) de EGM como agentes imunogénicos. Apesar de se ter obtido proteção contra a cárie dentária com estas vacinas, verificou-se a possibilidade de poderem induzir reações cruzadas com o tecido cardíaco humano (Koga *et al.*, 2002; Marsh *et al.*, 2009). Assim, o foco de interesse desenvolveu-se sobretudo sobre as vacinas de subunidades, recombinantes, anti-idiotípicas e de ADN.

3.1.2.1. Vacinas de subunidades

Para um indivíduo estar protegido contra um agente infeccioso, não é necessário que ele produza anticorpos contra todos os epítomos antigénicos do microrganismo. A utilização de uma ou duas proteínas vitais para conferir proteção imunológica é suficiente para produzir uma vacina de subunidades, em que a resposta imunitária é induzida por um ou mais determinantes antigénicos isolados existentes nas vacinas (Miranda *et al.*, 2001).

As vacinas de subunidades podem conter elementos estruturais da família das adesinas, como o Ag I/II, das GTFs e das GBP B (Kaur, 2013; Singh 2013); são muito seguras pois não apresentam o ADN do agente patogénico (Miranda *et al.*, 2001).

Pesquisas recentes têm tentado otimizar as respostas imunitárias para os epítomos funcionais associados com a ligação salivar, processos catalíticos ou atividades de ligação a glucano, utilizando vacinas de subunidades que contêm cópias únicas ou múltiplas destes domínios (Smith, 2002; Singh *et al.*, 2013).

As vacinas de subunidades múltiplas podem ser constituídas por múltiplos epítomos que têm como objetivo atuar em diferentes funções do mesmo componente (por exemplo, atividade catalítica e atividade de ligação a glucano das GTFs) ou em funções de diferentes componentes (por exemplo, ligações salivares de Ag I/II e atividade catalítica das GTFs).

Verificou-se que a conjugação de péptidos funcionais associados a outras proteínas de vacinas (por exemplo, toxoide do tétano), aumentaria a imunidade do péptido e a abrangência da vacina (Smith, 2002; Kaur *et al.*, 2013).

3.1.2.1.1. Vacinas de péptidos sintéticos

O princípio de atuação das vacinas de péptidos sintéticos assenta no facto de

uma pequena porção antigénica, conhecida como epítopo, poder ser suficiente para conferir a proteção que se pretende, conduzindo à produção de anticorpos no fluido crevicular e também na saliva (Sumit, 2012). O desafio na produção das vacinas de péptidos sintéticos é o estabelecimento da sequência correta dos aminoácidos, a conformação e a forma final do péptido (Miranda *et al.*, 2001).

Diversos determinantes podem ser controlados na produção de vacinas sintéticas, o que justifica a sua preferência relativamente à proteína aparentada. Deste modo, a vacina pode, por exemplo, do ponto de vista teórico, incluir epítomos que induzam respostas de proteção imunitária específicas e omitir epítomos que induzam respostas supressivas (Kaur *et al.*, 2013).

A utilização de vacinas de péptidos sintéticos, bem como as várias abordagens de imunização passiva, de que se fala mais à frente, são estratégias que visam eliminar a possibilidade de formação de anticorpos que reajam com o tecido cardíaco (Kaur *et al.*, 2013).

Um péptido sintético ideal pode ser obtido com elevado grau de pureza e a custo reduzido. Deste modo foram preparados vários péptidos sintéticos para serem utilizados em vacinas contra a cárie, com base em clonagens de genes de *S. mutans*, nomeadamente com o Ag I/II (Arosa *et al.*, 2012).

A adesina Ag I/II de *S. mutans* contém múltiplos epítomos funcionais que são suficientemente imunogénicos para serem tidos em conta nas vacinas contra a cárie dentária (Smith, 2002; Singh *et al.*, 2013).

Como anteriormente referido, pelo menos duas regiões do Ag I/II estão associadas com a adesão de *S. mutans*.

Em 1991, Takahashi *et al.*, demonstraram que a imunização subcutânea com um péptido sintético obtido a partir da região rica em alanina (resíduos 301-319: AgI/II-A) do Ag I/II, promoveu um nível sérico mais elevado de anticorpos IgG reativos ao Ag I/II, comparativamente com a imunização com um péptido sintético obtido a partir da região rica em prolina (resíduos 601-629) do Ag I/II (Smith, 2002).

Em 1992, Lehner *et al.* verificaram que um anticorpo monoclonal originado a partir da pré-imunização com Ag I/II intato, interagiu com a região rica em prolina do Ag I/II e impediu a formação de cáries experimentais (Smith, 2002).

Recetores de LB e LT foram encontrados associados com o componente proteico (3,8 KDa) do antigénio de *S. mutans*. A aplicação na mucosa gengival de macacos, de péptidos sintéticos com sequências imunitárias dominantes do antigénio 3,8 KDa de *S. mutans*, induziu a formação de anticorpos sIgA e IgG que impediram a colonização por *S. mutans* (Smith, 2002; Singh *et al.*, 2013).

O reconhecimento nas GTFs de resíduos/domínios funcionais relevantes, conduziu à preparação de várias vacinas de péptidos sintéticos.

Preparações com anticorpos monoclonais ou policlonais orientados para um dos vários terminais N das GTFs, cada um com diferentes resíduos com funções catalíticas, conduziram à inibição da atividade das GTFs.

Vacinas de péptidos sintéticos também foram produzidas a partir de sequências repetidas no terceiro terminal C da GTF, que estão relacionadas com a ligação a glucano (Smith, 2002; Singh *et al.*, 2013).

Estas pesquisas apontam para que a proteção imunitária pode ser alcançada por imunização com péptidos distintos associados a diversos fatores de virulência.

A combinação de epítomos de adesinas e GTFs e o aumento da resposta imune utilizando sequências adicionais (como por exemplo, subunidades da toxina da cólera), pode em teoria aumentar e provavelmente ampliar o efeito de proteção imunitária das vacinas de subunidades (Smith, 2002; Singh *et al.*, 2013).

3.1.2.1.2. Vacinas polissacarídicas

Os polissacáridos serotipo específicos têm sido testados como antigénios candidatos a vacinas (Pinto *et al.*, 2005).

Apesar dos estudos realizados por Wallengren, Hamberg e Ericson mostrarem que os antigénios polissacarídicos específicos de cada um dos serotipos desempenham um papel importante na resistência à fagocitose e consequente morte pelos polimorfonucleares humanos (Pinto *et al.*, 2005), há um consenso geral e evidências de que estes antigénios apresentam fraca imunogenicidade (Koga *et al.*, 2002; Pinto *et al.*, 2005).

As vacinas polissacarídicas conferem imunidade independente das células T e os polissacáridos estimulam a produção de anticorpos, sobretudo IgM (Lett *et al.*, 1994),

mas não a produção de células de memória, tornando o reforço ineficaz .

Estas vacinas são ineficazes em crianças com menos de dois anos de idade, possivelmente devido à imaturidade do seu sistema imunitário (Janeway *et al.*, 2007).

3.1.2.1.3. Vacinas conjugadas

No final da década de 80, foi descoberto que as limitações com as vacinas polissacarídicas poderiam ser ultrapassadas através de um processo designado por conjugação (Janeway *et al.*, 2007). Assim, outra estratégia que pode interferir a vários níveis da patogénese molecular dos EGM é a conjugação química de polissacáridos bacterianos com proteínas (Smith, 2002; Gambhir *et al.*, 2012; Kaur *et al.*, 2013; Shanmugam *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2013).

Além da importância da inclusão de vários alvos de atuação na vacina, a conjugação do polissacárido com a proteína aumenta a imunogenicidade ao transformar um “antigénio T – independente” em “antigénio T – dependente”, o que conduz à produção de anticorpos e de células de memória (Smith, 2002; Kaur *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2013).

Em 1994, Lett *et al.* aplicaram este conceito, conjugando um polissacárido do serotipo *f* “célula T – independente” com um péptido da proteína de ligação salivar de *S. mutans*, que originou um aumento significativo da resposta imune anti-polissacárido.

A inoculação por intubação gástrica dos conjugados associados a lipossomas induziu a produção de sIgA específica, quer para o péptido, quer para o polissacárido (Smith, 2002; Singh *et al.*, 2013).

Dado que a infeção inicial por *S. mutans* ocorre numa idade inferior a 2 anos, altura em que as crianças são incapazes de elaborar respostas relevantes anti-polissacáridos, as vacinas conjugadas serão particularmente importantes se mostrarem capacidade de aumentar significativamente o nível de proteção imunitário relativamente ao que é atingido com as vacinas à base de proteínas (Smith, 2002).

3.1.2.2. Outras vacinas

3.1.2.2.1. Vacinas recombinantes/vetores de expressão atenuada

Estratégias recombinantes visam a expressão de extensas regiões dos domínios

antigénicos funcionais pelos péptidos sintéticos (Gambhir *et al.*, 2012; Shanmugam *et al.*, 2013).

As estirpes de *Salmonella* são um vetor atenuado eficiente da vacina (Gambhir *et al.*, 2012). Estas bactérias contêm plasmídeos que expressam péptidos recombinantes e podem dirigir a vacina ao tecido linfoide indutor, despoletando a resposta imunitária das mucosas.

A fusão de genes de sequências importantes do ponto de vista funcional, ligados a uma sequência adjuvante da mucosa, pode resultar em proteínas quiméricas com capacidade para aumentar as respostas imunitárias a epítomos funcionais (Smith, 2002; Singh *et al.*, 2013).

Várias destas estratégias tiveram sucesso na indução de respostas imunitárias protetoras para cáries dentárias experimentais em ratos ou murganhos através de proteínas quiméricas ou vetores que expressam, quer epítomos de adesina, quer os epítomos de GTF (Kaur *et al.*, 2013).

O recetor de ligação salivar 42-KDa (SBR) do Ag I/II de *S. mutans* geneticamente ligado com as subunidades A2 e B da toxina da cólera (SBR-TCA2/B), produzem uma proteína quimérica que administrada por via intranasal reduz as cáries dentárias nos ratos Fischer com *S. mutans* UA130 (Shanmugam *et al.*, 2013).

Proteínas quiméricas, em que pequenas sequências de regiões catalíticas funcionais de GTF B (domínios de ligação à sacarose), foram combinadas com a toxina da cólera (TC) ou a subunidade B da TC e expressas em *Escherichia coli* (*E. coli*) HB101, resultou em respostas imunitárias que podem provocar a inibição de 50% da atividade de GTF B (Smith, 2002).

3.1.2.2.2. Vacinas anti-idiotípicas

A ideia básica das vacinas anti-idiotípicas é a de utilizar no lugar do antigénio, um anticorpo que reproduz a morfologia do antigénio e com este induzir imunidade. Para produzir uma vacina deste tipo, o primeiro passo é obter um anticorpo contra o antigénio. Este anticorpo, denominado anticorpo idiótípico, é injetado num animal que

responde produzindo anticorpos contra ele, os anticorpos anti-idiotípicos. Estes últimos anticorpos podem atuar como vacina dado que contêm um determinante antigénico semelhante ao do antígeno original (López *et al.*, 2004).

O sistema imunitário não consegue distinguir entre um idiotípico e uma vacina anti-idiotípica. O anti-idiotípico comporta-se como um antígeno contendo o epítopo original, porque eles podem partilhar uma sequência homóloga de aminoácidos com o epítopo imunogénico. Este facto é particularmente importante para imunogénios pobres, como são os hidratos de carbono. Deste modo, o anti-idiotípico pode ser usado como antígeno substituto para induzir imunidade específica, para substituir antígenos que não são seguros ou são tóxicos ou para induzir imunidade anti-hidrato de carbono (Kaur *et al.*, 2013).

Esta abordagem tem a vantagem de não ter o risco de provocar doença cardiovascular ou renal devido a reação cruzada, pelo facto de não utilizar antígenos *S. mutans* na vacina (Motta *et al.*, 2006).

3.1.2.2.3. Vacinas de ADN

As vacinas de ADN são constituídas por um plasmídeo bacteriano que expressa o gene do antígeno de interesse nas células do hospedeiro (Kaur *et al.*, 2013).

As vacinas de ADN têm muitas vantagens em relação às vacinas tradicionais:

- Fáceis de preparar e de administrar;
- Apresentam inúmeras possibilidades para alterações e aperfeiçoamentos;
- Aptidão para promover respostas imunitárias eficazes (Silva *et al.*, 2013).
- São seguras e mais estáveis na aplicação e na armazenagem;
- Estimulam ao mesmo tempo LT e LB (Yang *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2013).
- Propriedades antigénicas mais fortes, com aptidão para promover respostas humorais e celulares;
- Potencial de produção de uma vacina polivalente contra diversos agentes patogénicos (Sun *et al.*, 2009; Kaur *et al.*, 2013).
- Estabilidade e persistente expressão dos Ags na sua configuração nativa (Sun *et*

al., 2009; Yang *et al.*, 2009; Kaur *et al.*, 2013, Silva *et al.*, 2013).

Pesquisadores do Instituto de Virologia de Wuhan, China, desenvolveram uma vacina de ADN, conhecida como pGJA-P/VAX, que mostrou resultados promissores na prevenção da cárie dentária. Esta vacina de ADN de fusão codifica dois domínios antigénicos importantes, Ag I/II e GLU de *S. mutans* (Sun *et al.*, 2009; Gambhir *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2013).

Esta vacina induziu rapidez e aumento da resposta de anticorpos específicos no soro e saliva em coelhos, comparativamente com a vacina não-fusão de ADN, que é considerada um agente imunogénico relativamente fraco (Sun *et al.*, 2009; Gambhir *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2013).

A vacina pGJA-P/VAX mostrou vantagens ao induzir em simultâneo sIgA anti-Ag I/II e anti-GLU, conduzindo à inibição da formação do biofilme, na fase de adesão e acumulação, respetivamente (Yang *et al.*, 2009).

Apesar do sucesso assinalável, a extrapolação da pesquisa laboratorial para os ensaios clínicos, necessita de mais ensaios (Silva *et al.*, 2013). Embora seja considerada segura, novas pesquisas têm sido efetuadas devido a ainda não ter sido completamente descartada, a possibilidade do ADN induzido poder causar danos genéticos no hospedeiro (Krithika *et al.*, 2004b).

Deve ser tida em consideração a necessidade de grandes quantidades (miligramas, gramas) de vacina de ADN, o que obrigará a uma produção à escala industrial que irá aumentar o custo da vacina (Silva *et al.*, 2013).

3.1.3. Vias de administração da vacina

Diversas experiências têm sido realizadas com o objetivo de induzir a formação de anticorpos anti-*S. mutans*, utilizando diferentes vias de administração (Pereira *et al.*, 2010). Estas pesquisas assentam sobretudo em duas abordagens, a indução de sIgA e de anticorpos séricos, que alcançam o biofilme oral através do sulco gengival (Miranda *et al.*, 2001).

3.1.3.1. Vias de imunização através das mucosas

Dado que os dentes e o biofilme oral estão banhados com saliva contendo

anticorpos, muitos ensaios têm sido realizados para induzir imunidade por via das mucosas (Smith, 2003).

As vacinas contra a cárie dentária aplicadas através das mucosas são geralmente escolhidas para induzir a secreção de sIgA na saliva, dado que esta Ig constitui o principal componente imunitário das secreções das glândulas salivares *major* e *minor*.

Inúmeras pesquisas mostraram que a exposição de antígenos ao MALT pode induzir a formação de sIgA em secreções externas de glândulas que não foram diretamente estimuladas com antígeno, facto que, como já foi abordado anteriormente, originou um novo conceito conhecido como “sistema imune mucoso comum” (Michalek & Childers, 1990; Shivakumar *et al.*, 2009; Sumit, 2012; Gambhir *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2013; Kaur *et al.*, 2014).

Assim, várias vias das mucosas foram usadas para induzir uma resposta imunitária contra os antígenos da vacina contra a cárie (Russell *et al.*, 2004).

3.1.3.1.1. Via oral

A via oral é uma das vias de administração mais importantes (Sumit, 2012).

Diversas pesquisas foram baseadas na indução da imunidade por via oral no GALT, para estimular respostas de proteção de anticorpos IgA salivar.

Nestas experiências, a aplicação do antígeno foi efetuada por alimentação oral, intubação gástrica, em cápsulas ou lipossomas contendo a vacina (Smith, 2002; Shivakumar *et al.*, 2009; Gambhir *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2013; Kaur *et al.*, 2014).

A via oral não é uma via de imunização ideal, porque a passagem através do ácido gástrico reduz o estímulo efetivo do antígeno (Smith & Mattos-Graner, 2008) e porque os locais indutores são relativamente distantes do local efetor. Contudo, as pesquisas efetuadas com a via oral determinaram que a imunidade induzida, foi por si só, suficiente para modificar o curso da infeção por *S. mutans* e a doença de cárie, quer em modelos animais como em seres humanos (Smith, 2002; Shivakumar *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2013; Kaur *et al.*, 2014).

A utilização de vacinas inativas inteiras (contendo bactérias mortas) mostraram ser mais efetivas na imunização oral do que fragmentos de antígenos bacterianos na indução de respostas imunitárias salivares, pelo facto das placas de Peyer serem mais

eficientes na captação e no processamento de células bacterianas. Por outro lado, as vacinas inativas fracionadas (vacinas de subunidades) contendo fragmentos de antígenos em determinados adjuvantes solúveis, induzem a nível oral, níveis locais de sIgA, maiores do que a administração de bactérias inteiras mortas (Motta *et al.*, 2006)

A imunização oral de macacos com células inteiras de *S. mutans* (inativadas) não induziu quantidades significativas de sIgA e não teve impacto na redução da incidência de cárie dentária. Mesmo após uma segunda imunização, o aumento de sIgA foi pouco acentuado e de curta duração (Arosa *et al.*, 2012).

Experiências de ingestão, em humanos, de *S. mutans* em cápsulas de gelatina, levaram a um aumento de sIgA na saliva, embora por um pequeno intervalo de tempo (Shivakumar *et al.*, 2009; Kaur *et al.*, 2014).

A memória imunitária, como resposta à estimulação oral, é bastante limitada e coloca em causa a eficácia desta via de imunização (Pereira *et al.*, 2010; Arosa *et al.*, 2012; Kaur *et al.*, 2014).

A indução ativa do MALT através da imunização oral, promove a produção de sIgA específica para todas as secreções, incluindo a saliva e não desenvolve resposta por anticorpos séricos o que minimiza os danos a outros tecidos do organismo. A imunização sistémica por injeção intramuscular ou subcutânea apenas induz anticorpos séricos, que podem atingir a superfície dentária, via exsudado, através do fluido crevicular (Motta *et al.*, 2006; Charone *et al.*, 2012).

3.1.3.1.2. Via intranasal

Muitas das pesquisas têm como objetivo a via nasal para aproveitar as características indutivas do NALT (Smith, 2003).

A instilação intranasal do antígeno que tem como alvo o NALT, tem sido usada, na indução de imunidade a muitos antígenos bacterianos, incluindo os que estão associados à colonização e acumulação de EGM.

Pode ser induzida imunidade protetora em ratos após infeção destes com EGM cariogénicos, por via intranasal com muitos antígenos de *S. mutans* ou domínios funcionais associados a esses componentes. A proteção imunitária pode ser comprovada

com Ag I/II de *S. mutans*, com SBR do Ag I/II, uma sequência 19-mer no interior da SBR, o domínio de ligação ao glucano de GTF-B de *S. mutans*, GBP B de *S. mutans* e preparações de fímbrias de *S. mutans*, com antigénio isolado ou em combinação com adjuvantes da mucosa (Smith, 2002; Smith & Mattos-Graner, 2008; Shivakumar *et al.*, 2009; Gambhir *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2013; Kaur *et al.*, 2014).

Childers *et al.*, efetuaram imunização nasal em cinco mulheres voluntárias, utilizando GTF como antigénio em duas aplicações com intervalo de sete dias. Foi observado aumento de IgA1 e IgA2 salivares anti-GTF, além do aumento de IgA e IgM no soro. Não se observou aumento da IgG. Segundo os autores, estes resultados demonstraram, pela primeira vez, evidência da eficácia do uso da vacina pela via nasal (Miranda *et al.*, 2001).

A utilização da via nasal em humanos é ainda reforçada por sucessos recentes com uma vacina contra a gripe administrada por via nasal (Smith, 2003).

Segundo Pinto (2005), apesar da via de imunização oral com vacinas de ADN recombinante e indução do GALT, exibir resultados satisfatórios na contenção da cárie dentária em animais, a via intranasal e das amígdalas (a seguir referida) têm vantagens adicionais:

- Maior local indutivo da resposta imune da mucosa, resultado da compartimentação das estruturas linfoides do NALT, o que reduz a competição e a ação proteolítica sobre o imunogénio administrado; deste modo, podem ser administradas doses mais baixas do antigénio;
- Promovem quer a imunidade sistémica, quer a imunidade secretora;
- Administração mais simples.

3.3.1.3. Via das Amígdalas

O tecido das amígdalas tem os elementos necessários para a indução da resposta imunitária de sIgA, mas as respostas características da IgG são as dominantes neste tecido.

No entanto, as amígdalas palatinas e em particular as nasofaríngeas, têm sido apontadas como fornecedoras de células precursoras nas mucosas efetas, como as glândulas salivares (Gambhir *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2013; Kaur *et al.*, 2014).

A administração consecutiva de antígenos nas amígdalas, pode conduzir à indução de células produtoras de anticorpos IgA em ambas as glândulas salivares, *major* e *minor*, do coelho (Sumit, 2012; Gambhir *et al.*, 2012; Shanmugam *et al.*, 2013; Kaur *et al.*, 2014).

Apesar de cientistas japoneses terem observado proteção pré-clínica em coelhos após aplicação nas amígdalas de EGM e, demonstrado que esta via de imunização era mais eficaz que a via intranasal, Childers *et al.* mostraram que os humanos respondem melhor à imunização por via nasal que pelas amígdalas (Smith, 2003).

Quando o antígeno, na forma solúvel ou incorporado em lipossomas foi administrado por aplicação tópica nas amígdalas, foi induzida proteção específica sIgA para o antígeno. No entanto, estudos em populações de jovens adultos mostraram efeitos de curta duração sobre EGM, o que indica que a imunização desta população não afetaria a microflora a longo prazo (isto é, durante mais de 42 dias). Deste modo, a via das amígdalas para a vacina contra a cárie não é apropriada para os adultos (Taubman & Nash, 2006).

3.1.3.1.4. Via das glândulas salivares *minor*

Os lábios, as bochechas e o palato mole são as principais localizações das glândulas salivares *minor*, que têm sido apontadas como vias a considerar para a indução de respostas imunitárias da mucosa salivar, devido os seus curtos e amplos ductos secretores que facilitam o acesso retrógrado de bactérias e seus produtos, e pelo facto dos agregados de tecido linfático serem frequentemente encontrados associados a esses ductos (Smith, 2002, 2003; Shivakumar *et al.*, 2009; Gambhir *et al.*, 2012; Kaur *et al.*, 2014).

Ensaio clínico realizado por Smith *et al.*, em que GTF de *S. sobrinus* foi aplicado por via tópica sobre os lábios inferiores de adultos (entre 18 e 42 anos), mostraram proporções significativamente mais baixas de *S. mutans* indígena e do total da flora estreptocócica na saliva durante um período de seis semanas, após uma profilaxia dentária, em comparação com o grupo placebo, indicando que esta via de imunização pode ser uma via alternativa para a distribuição da vacina contra a cárie (Smith, 2002, 2003; Nogueira *et al.*, 2008; Shivakumar *et al.*, 2009, Gambhir *et al.*, 2012; Kaur *et al.*, 2014).

Foi ensaiada em macacos, a imunização direta da glândula salivar parótida, através da aplicação repetida de uma vacina nos ductos salivares, o que originou elevados níveis de sIgA, mas apresentou a desvantagem da função da glândula ter ficado alterada (Kaur *et al.*, 2014).

Esta via, bem como a via intranasal, é significativamente melhor que a imunização pela via das amígdalas (Motta *et al.*, 2006).

3.1.3.1.5. Via retal

As mucosas mais distantes também têm sido pesquisadas pelo seu potencial de indução de resposta imunitária.

A região colo-retal é apontada como um local da mucosa para indução de respostas imunitárias em seres humanos, devido ao facto deste local ter a mais elevada concentração de folículos linfoides do trato intestinal inferior.

Estudos indicaram que esta via também pode ser utilizada para induzir respostas de IgA salivar aos antigénios de *S. mutans*, como a GTF.

Deste modo, é previsível a utilização de vacinas em supositórios como alternativa para crianças, em que doenças respiratórias impeçam a sua aplicação por via intranasal (Smith, 2002; Gambhir *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2013; Kaur *et al.*, 2014).

Segundo Smith (2010), persistem algumas dúvidas quanto à capacidade, das vacinas a serem aplicadas nas mucosas, de induzirem respostas suficientemente vigorosas ou de duração suficiente para bloquear a colonização de estreptococos cariogénicos. Torna-se necessário um maior número de ensaios e que a pesquisa atual de adjuvantes mais eficazes para estas vacinas beneficie as abordagens a estabelecer no desenvolvimento da vacina contra a cárie.

A imunização das mucosas é vantajosa em relação à imunização sistémica (Krithika *et al.*, 2004a).

3.1.3.2. Via gengivo-salivar

Esta via tem sido explorada com o objetivo de suprimir potenciais efeitos secundários da imunização sistémica, pretendendo fixar a resposta imunitária na cavidade oral (Arosa *et al.*, 2012; Kaur *et al.*, 2014) e tem a vantagem de não ser invasiva (aplicação tópica) (Arosa *et al.*, 2012).

No sulco crevicular encontram-se neutrófilos, que ali chegam por quimiotaxia, e em menor quantidade, células mononucleares (linfócitos T, B e macrófagos). Deste modo, a gengiva poderá ser uma região com capacidade para responder a nível imunológico à indução local (Arosa *et al.*, 2012).

Experiências utilizando esta via originaram um aumento de anticorpos sIgA e de IgG de origem crevicular, que eram o provável motivo de uma menor colonização por *S. mutans* (Arosa *et al.*, 2012).

Pesquisas de imunização direta, por escovagem com *S. mutans* vivos na gengiva de macacos, não promoveram a formação de anticorpos nem impediu a progressão de cáries (Shivakumar *et al.*, 2009; Sumit, 2012; Gambhir *et al.*, 2012; Kaur *et al.*, 2014).

A condição necessária para se obter êxito com a imunização gengival foi a utilização de antígenos de *S. mutans* com baixo peso molecular (3,8 KDa). A diferença entre os resultados obtidos com a utilização do antígeno de 185 KDa e do antígeno de 3,8 KDa, foi atribuído à maior capacidade do péptido de 3,8 KDa em atravessar o epitélio crevicular, dado que a permeabilidade do epitélio oral está associada com a dimensão da molécula (Arosa *et al.*, 2012; Kaur *et al.*, 2014).

O péptido sintético obtido a partir da sequência de aminoácidos do péptido de 3,8 KDa apresenta um tamanho ainda menor (17 ou 21 resíduos de aminoácidos) e a sua administração na gengiva induz formação de IgG de origem crevicular e de sIgA, quer para o péptido, como também para o antígeno nativo 3,8 KDa de *S. mutans* (Kaur *et al.*, 2014).

3.1.3.3. Via sistémica

A imunização sistémica utiliza principalmente a via subcutânea, a via parenteral

clássica de imunização, com o objetivo de obter uma resposta imunitária sistémica, induzindo principalmente a formação de IgG e em menor quantidade, a IgA e IgM (Miranda *et al.*, 2001). Estes anticorpos atingem o fluido da cavidade oral onde podem funcionar em ambos os domínios, gengival e salivar dos dentes (Kaur *et al.*, 2014).

Evidência pré-clínica da eficácia desta via de imunização foi fornecida na década de 1970 pelo grupo liderado por Lehner (Smith, 2003).

Como agentes imunizantes foram utilizados bactérias intatas, paredes celulares e o antígeno 185 KDa de *S. mutans*. De um modo geral, a imunização reduz o número de cáries de 60-80% (Pereira *et al.*, 2010; Shivakumar *et al.*, 2009; Arosa *et al.*, 2012; Gambhir *et al.*, 2012; Kaur *et al.*, 2014). Esta redução acentuada da cárie está relacionada com a redução do número de *S. mutans*, com o aumento dos níveis de anticorpos IgG, IgA e IgM, com o atraso da hipersensibilidade e com a síntese de linfócitos (Kaur *et al.*, 2014).

O fluido crevicular desempenha um papel ativo na resposta imunitária à imunização subcutânea, servindo de veículo para que os componentes sistémicos celulares e humorais cheguem até à gengiva, onde vários eventos vão ocorrer, levando à opsonização, fagocitose e destruição de *S. mutans* pelos leucócitos, assim como à diminuição da adesão bacteriana na superfície do dente e consequente redução da cárie dentária (Arosa *et al.*, 2012).

A utilização da imunização por via parentérica tem originado alguma apreensão relativa à segurança da vacina. O risco associado mais relevante foi que a administração intravenosa ou subcutânea de *S. mutans* em coelhos, originava anticorpos com reação cruzada com antígenos do músculo cardíaco (Arosa *et al.*, 2012; Charone *et al.*, 2012).

No entanto, estes efeitos indesejáveis têm sido suprimidos com o desenvolvimento de novos conceitos de vacinas (Miranda *et al.*, 2001).

3.1.4. Adjuvantes e sistemas de distribuição

A aplicação na mucosa de antígenos de proteínas solúveis ou de péptidos isolados, raramente resulta em respostas sustentadas na produção de sIgA. Deste modo,

tem existido inúmeras pesquisas para desenvolver imunomoduladores (adjuvantes) e sistemas de distribuição que melhorem as respostas das mucosas, e assim as respostas das vacinas contra a cárie (Smith, 2003; Negrini *et al.*, 2009; Gambhir *et al.*, 2012).

Em 1925, Ramon concebeu o termo adjuvante, que são agentes incluídos em preparações de vacinas com o objetivo de aumentar a eficácia imunológica dos antígenos das vacinas (Plotkin *et al.*, 2004), de várias formas, incluindo a formação do complexo antígeno-adjuvante que funciona como depósito para que o antígeno possa ser libertado progressivamente; atração química de moléculas imunes para o local de administração do antígeno; segmentação ou entrega de APC e imunomodulação direta ou indireta (Morrow *et al.*, 2012).

Os adjuvantes conferem importantes benefícios, entre os quais se incluem a indução de maior amplitude da resposta do anticorpo para abranger a diversidade patogénica, a indução de uma potente resposta funcional do anticorpo para garantir a morte ou neutralização do agente patogénico e a indução mais efetiva da resposta dos linfócitos T para matar direta ou indiretamente os agentes patogénicos.

Os adjuvantes também podem ser usados para se obterem efeitos mais práticos, como a redução da dose de antígeno e a superação da concorrência antigénica nas vacinas combinadas (Morrow *et al.*, 2012).

Segundo Krithika (2004 b), os adjuvantes que têm sido testados há já um longo período de tempo, são:

- Adjuvante incompleto de Freund;
- Adjuvante completo de Freund;
- Partículas de sílica, sulfato de berílio;
- Endotoxinas.

Dos adjuvantes e sistemas de distribuição que têm sido usados nas recentes pesquisas da vacina contra a cárie destacam-se as enterotoxinas de *Vibrio cholerae* e de *E. coli*, microcápsulas e micropartículas, lipossomas, estirpes não virulentas de *Salmonella*, monofosforil-lípido A, oligodeoxinucleótidos, bupivacaína e quitosano.

3.1.4.1. Enterotoxinas – *Vibrio cholerae* e *Escherichia coli*

A conjugação de antígeno de EGM com proteínas transportadoras como a TC produzida por *Vibrio cholerae* ou enterotoxinas termolábeis de *E. coli*, pode aumentar de forma acentuada a resposta imune sistêmica e da mucosa (Smith, 2012), quer por via intragástrica ou por via intranasal (Shivakumar *et al.*, 2009; Gambhir *et al.*, 2012; Smith, 2012; Sumit, 2012; Kaur *et al.*, 2013).

A TC é frequentemente usada para aumentar a imunidade da mucosa a uma variedade de agentes patogênicos bacterianos e virais em sistemas animais (Smith, 2002; Shivakumar *et al.*, 2009; Sumit, 2012; Kaur *et al.*, 2013).

A TC é uma toxina bacteriana com uma subunidade A tóxica e uma subunidade B não tóxica (Smith, 2002), o que impede o seu uso em vacinas humanas na sua forma nativa (Smith, 2012).

Para reduzir ou eliminar a sua toxicidade e assim ser possível a sua utilização como adjuvante, procede-se à remoção da subunidade A do complexo da TC (Smith, 2002; Kaur *et al.*, 2013). A ligação da proteína com a unidade não tóxica da TC é eficaz na supressão da colonização de *S. mutans* (Gambhir *et al.*, 2012; Sumit, 2012).

Outras pesquisas têm sido efetuadas para modificar a TC, dado que o aumento da resposta imunitária com a subunidade não tóxica da TC (TC B) foi acentuadamente menor do que a conseguida com a TC, e uma vez que em alguns sistemas foi necessária a presença de uma pequena quantidade de TC intacta para reforçar a resposta imunitária (Smith, 2002).

Há ainda que ter em conta que mutantes geneticamente modificados de *E. coli* têm sido associados a problemas neurológicos, após a sua utilização com a vacina contra a gripe inativada administrada por via nasal, provavelmente devido a uma função de ligação das enterotoxinas lábeis ao calor a gangliósidos neuronais. No entanto, as pesquisas continuam a identificar subcomponentes seguros que mantêm as características imunomoduladoras e que podem ser utilizadas por via intranasal (Smith, 2012).

3.1.4.2. Microcápsulas e micropartículas

Para melhorar as respostas imunitárias da mucosa têm sido utilizadas em pesquisas, combinações de antigénio em ou sobre microcápsulas ou micropartículas feitas de poli (lactido-coglicolido) (PLGA) ou lipossomas (referidos a seguir) (Smith & Mattos-Graner, 2008).

As microcápsulas, micropartículas ou lipossomas também podem ser utilizados com o intuito de impedir a destruição proteolítica dos antigénios no estômago, possibilitando que os antigénios administrados por via oral atinjam o GALT (Plotkin *et al.*, 2004).

As microcápsulas e micropartículas foram usadas como sistemas de entrega local do antigénio devido: (i) à sua aptidão em controlar a taxa de libertação do antigénio; (ii) poderem inibir mecanismos de eliminação de anticorpos; (iii) e por serem degradados lentamente sem induzir uma resposta inflamatória do organismo (Shivakumar *et al.*, 2009; Gambhir *et al.*, 2012; Sumit, 2012).

A desnaturação pode ser acentuadamente diminuída por técnicas que incorporam o antigénio nas micropartículas numa fase aquosa.

A imunização por via intranasal de micropartículas GTF-PLGA incorporadas em meio aquoso que continha 1% de gelatina como bioadesivo, promoveu a formação de resposta imunitária a nível salivar de longa duração (Smith, 2002; Kaur *et al.*, 2013).

Micropartículas de amido também podem ser usadas para aumentar a resposta da mucosa aos antigénios solúveis (Smith, 2003; Kaur *et al.*, 2013).

3.1.4.3. Lipossomas

Os lipossomas são vesículas fechadas com uma membrana de dupla camada fosfolipídica (Gambhir *et al.*, 2012). Os antigénios lipossolúveis podem ser incorporados na membrana lipídica e os antigénios hidrossolúveis podem ser incluídos no interior do lipossoma (Krithika *et al.*, 2004b). Para além de conterem, também entregam drogas e antigénios, e têm sido utilizados para aumentar a resposta imune da mucosa para hidratos de carbono e GTF de EGM (Shivakumar *et al.*, 2009; Sumit, 2012; Kaur *et al.*, 2013).

Os lipossomas são utilizados para melhorar a resposta imune da mucosa, por

facilitar a sua captação pelas células M e entregar o antígeno a tecidos linfoides (Shivakumar *et al.*, 2009; Sumit, 2012; Kaur *et al.*, 2013).

Alguns pesquisadores avaliaram a eficiência do sistema de distribuição com lipossomas desidratados na indução de resposta imune a antígenos de EGM. Participaram neste estudo, adultos entre 21 e 38 anos com historial de cárie dentária, que ingeriram cápsulas 30 minutos antes do pequeno-almoço. A formação de sIgA aumentou em 77% e não houve resposta de IgG e IgM (Charone *et al.*, 2012).

3.1.4.4. *Salmonella*

Estirpes não virulentas de *Salmonella* são um vetor de vacina eficaz (Shivakumar *et al.*, 2009; Sumit, 2012).

A resposta imune da mucosa intestinal inicia-se pela captura de antígenos a partir do lúmen intestinal por células epiteliais especializadas (células M) que se sobrepõem ao tecido linfóide da mucosa. As células M passam o seu conteúdo para o tecido linfóide subjacente, o que vai resultar em anticorpos sIgA nas secreções.

Uma vez que as bactérias do género *Salmonella* colonizam naturalmente as células M, estes microrganismos foram utilizados como replicantes do sistema de distribuição de antígeno para o qual se pretende a resposta da mucosa (Smith, 2003).

Conceções de vacinas contendo vetores de expressão atenuada de *Salmonella*, após administração intragástrica ou intranasal, podem induzir imunidade protetora para a cárie (Smith & Mattos-Graner, 2008).

Estirpes atenuadas de *Salmonella* também podem ser utilizadas como veículo para vacinas de ADN, em cujo sistema não vão expressar o antígeno codificado, mas transportar a mensagem genética que irá transfetar as células de defesa do hospedeiro (Almeida *et al.*, 2002).

Shi *et al.*, pesquisaram a utilização da proteína recombinante flagelina, derivada de *Salmonella* (FliC) como um adjuvante para a administração de uma vacina de ADN contra a cárie (pGJA-P/VAX) por via intranasal. A proteína flagelina é um ligando do recetor do tipo 5 e como potente imunoativador é um eficiente adjuvante em muitas vacinas.

A análise dos estudos de Shi mostrou que a vacina pGJA-P/VAX usada com FliC aumentou os níveis de anticorpos IgG séricos e IgA salivar para o fragmento Ag I/II, quando comparada com a vacina de ADN sem FliC, e mostrou também uma acentuada diminuição da colonização de *S. mutans* em ratos (Shi *et al.*, 2012).

3.1.4.5. Outros adjuvantes

Outros métodos para aumentar as respostas da mucosa estão a ser pesquisados para o uso na vacina contra a cárie dentária.

Monofosforil-lípido A administrado a ratinhos, por via intranasal, numa formulação aquosa com GTF solúvel ou incluído em lipossomas que continham GTF, promoveu a indução de um maior nível de respostas primárias e secundárias de sIgA que as obtidas só com o complexo GTF-lipossomas (Smith, 2002; Kaur *et al.*, 2013).

Oligodeoxinucleótidos, são sequências curtas de ADN contendo dinucleótidos citosina e guanina não metilados (Plotkin *et al.*, 2004), que induzem a produção de LB e a ativação de macrófagos. A sua administração por via intranasal ou oral com toxoide tetânico, aumentou o nível de respostas de sIgA murina em muitas das secreções das mucosas, entre as quais a saliva (Smith, 2002; Kaur *et al.*, 2013).

Fan *et al.* têm obtido bons resultados utilizando bupivacaína e quitosano como adjuvantes em vacinas de ADN contra a cárie, administradas por via intranasal (Smith, 2012).

3.2. Outra abordagem de imunização - Imunização passiva

Lehner *et al.*, demonstraram que o anticorpo não precisa de ser produzido ativamente pelo hospedeiro e que a proteção poderia ser atingida pela administração passiva de anticorpos (Smith, 2003). Assim, a imunização passiva é uma abordagem alternativa no combate da cárie (Smith & Mattos-Graner, 2008), na qual a utilização de anticorpos exógenos previamente formados, oferece a vantagem de não induzir uma resposta imunológica sistémica, minimizando os potenciais efeitos secundários associados com a imunização ativa (Negrini *et al.*, 2009; Gambhir *et al.*, 2012; Setia *et*

al., 2012; Silva *et al.*, 2013), de ser mais funcional e permitir a obtenção de resultados satisfatórios (Pinto *et al.*, 2005).

No entanto, não havendo qualquer resposta ativa pelo hospedeiro, não há indução de memória imunológica e os anticorpos administrados podem permanecer na boca durante apenas algumas horas ou até 3 dias no biofilme (Gambhir *et al.*, 2012), pelo que necessita de aplicações repetidas (Shivakumar *et al.*, 2009; Setia *et al.*, 2012; Kaur *et al.*, 2014).

Várias abordagens foram ensaiadas na administração passiva de anticorpos com efeito sobre *S. mutans*.

A imunização passiva, usando a transferência de anticorpos do leite específicos para *S. mutans*, da mãe para o lactente, foi ensaiada em modelos animais e mostrou ser protetora contra a cárie (Taubman & Nash, 2006; Negrini *et al.*, 2009).

Ensaio de imunização passiva sistêmica realizados em macacos *Rhesus*, através de injeção de IgG anti-*S. mutans*, mostraram um efeito protetor contra a cárie, tendo-se encontrado anticorpos marcados com radioisótopos no fluido crevicular, 30 minutos após a administração intravenosa (Smith & Mattos-Graner, 2008; Arosa *et al.*, 2012).

A imunização passiva local, com anticorpos monoclonais IgG de origem murina e específicos para o Ag I/II de *S. mutans*, por instilação direta na gengiva de macacos, demonstrou que impedia ou reduzia acentuadamente o aparecimento de cárie (Smith, 2003; Arosa *et al.*, 2012).

Este ensaio também foi realizado em humanos e os resultados foram idênticos (Arosa *et al.*, 2012).

Nestes ensaios, a aplicação tópica de curta duração com os anticorpos monoclonais foi realizada após tratamento prévio com clorhexidina o que permitiu que se originasse uma aparente alteração a longo prazo (cerca de 2 anos), dado que o anticorpo bloqueia um importante epítipo de adesina durante a reedificação do biofilme oral, depois do tratamento com a clorhexidina ter colocado os estreptococos *mutans* nativos numa desvantagem competitiva insuperável para que a recolonização ocorra (Smith, 2002, 2003).

Nas experiências realizadas com humanos foram também utilizados anticorpos

monoclonais murinos, específicos contra GTF de *S. mutans* (Pereira *et al.*, 2010).

A utilização dos anticorpos monoclonais nos ensaios deparou-se com alguns obstáculos, como o rápido desenvolvimento de anticorpos neutralizantes, devido à sua origem murina. Esta situação conduziu a ensaios com utilização de anticorpos monoclonais “humanizados” preparados por engenharia genética, o que implicou a utilização de uma tecnologia complexa e dispendiosa, contrária aos critérios práticos de preparações para utilização massiva (Arosa *et al.*, 2012).

Efeito a longo prazo foi também observado após aplicação de sIgA e IgG de plantas transgénicas (Sumit, 2012) de *Nicotiana tabacum* (Gambhir *et al.*, 2012).

Os anticorpos de plantas transgénicas apresentam inúmeras vantagens, particularmente a possibilidade de eliminação de reações cruzadas com o anticorpo e a capacidade de produzir esses anticorpos à escala agrícola (Motta *et al.*, 2006).

Estes anticorpos mostraram ser funcionais contra *S. mutans* e com capacidade de aglutinação das células (Setia *et al.*, 2012).

Ensaio clínico humano realizado por Julian Ma *et al.*, mostraram que com o tratamento prévio com clorhexidina e aplicação passiva do anticorpo, os humanos permaneceram sem EGM durante quatro meses ou mais (Smith, 2002, 2003; Taubman & Nash, 2006; Negrini *et al.*, 2009).

A preparação imunológica, contendo estes anticorpos, é incolor e insípida, podendo ser aplicada sobre os dentes (Gambhir *et al.*, 2012; Kaur *et al.*, 2014) ou aplicada em moldeiras (Smith, 2010). E de acordo com Sumit (2012), Kaur (2014) e Shivakumar (2009), apresenta ainda as seguintes vantagens:

- O material genético pode ser facilmente alterado;
- É possível manipular a estrutura destes anticorpos, mantendo a especificidade do anticorpo e modificando a região constante para se adaptar às condições humanas, evitando deste modo as reações cruzadas;
- Por ser pouco dispendiosa é possível a produção em larga escala.

Outro método assenta na utilização do leite e soro do leite de bovino.

A imunização sistémica de vacas com vacina usando *S. mutans* inteiro, origina anticorpos policlonais IgG, no leite e no soro do leite (Shivakumar *et al.*, 2009; Setia *et al.*, 2012; Kaur *et al.*, 2014). Ensaio utilizando este leite ou soro imune na dieta de

ratos, conduziu à redução da cárie (Shivakumar *et al.*, 2009; Kaur *et al.*, 2014;).

Experiência realizada em humanos com bochechos contendo leite de bovino com anticorpos anti-*S. mutans*, conduziu a uma fraca diminuição e de curta duração no número de estreptococos na saliva e no biofilme oral (Smith, 2002; Gambhir *et al.*, 2012; Sumit, 2012).

Os anticorpos presentes na gema de ovo de galinha também têm sido usados como meio de imunização passiva (Setia *et al.*, 2012).

É aceite que as gemas dos ovos das galinhas imunizadas são uma excelente fonte de anticorpos policlonais. A utilização de galinhas com este propósito apresenta a vantagem de poderem ser produzidas grandes quantidades de anticorpos, quando comparadas com os mamíferos, o que minimiza o número de animais necessários.

Estes anticorpos podem ser usados no desenvolvimento de preparações para bochechos, contendo anticorpos específicos e agentes estabilizadores que reduzem o número de *S. mutans* no biofilme oral e saliva pela formação de um complexo antígeno-anticorpo neutralizando assim o desenvolvimento do biofilme oral (Sentila *et al.*, 2013).

O novo conceito de utilização de anticorpos da gema de ovo de galinha foi introduzido por Hamada *et al.* em 1991 (Shivakumar *et al.*, 2009; Kaur *et al.*, 2014) que avaliaram *in vivo* e *in vitro*, o resultado da administração de anticorpos policlonais provenientes da gema de ovo de galinha, formados como resposta contra células inteiras de *S. mutans*, GTF secretada ou GTF associada a células de *S. mutans*.

A análise *in vivo* da imunização passiva (aditivo dietético) em ratos com IgY (anticorpo Yolk) anti-GTF associado com células inteiras, provocou uma redução acentuada da acumulação do biofilme oral (redução de 46,4%), em comparação com o grupo controlo (Nogueira *et al.*, 2008).

Em 1997, Hatta *et al.*, realizaram estudos em humanos utilizando uma preparação para bochechos contendo anticorpos com origem na gema de ovo de galinhas imunizadas com *S. mutans* cultivados em meio contendo sacarose. Verificou-se uma tendência de redução dos níveis de estreptococos no biofilme. Estes resultados suportam a efetividade da IgY do ovo com especificidade para *S. mutans* (Miranda *et al.*, 2001).

Em 2001, Smith *et al.*, estudaram a interferência da administração passiva de

anticorpos IgY anti-GBP B em ratos infetados com *S. mutans*. Houve uma acentuada redução do número de *S. mutans* nos molares e também nos índices de cárie dentária nos animais imunizados, os quais foram 50% menores quando comparados com animais não imunizados (Nogueira *et al.*, 2008).

A imunização passiva apresenta diversas vantagens. Uma já anteriormente referida é a eliminação dos riscos que são inerentes a qualquer procedimento de imunização ativa. Pode ser utilizada em pacientes com o sistema imunitário comprometido, mas a necessidade de fornecimento contínuo de anticorpos para manter a proteção contra a cárie durante um tempo prolongado, constitui ainda um grande desafio. Apesar das novas tecnologias de engenharia de anticorpos e produção de anticorpos em animais e plantas, permitirem ter custos mais reduzidos tornando possível a sua incorporação em produtos de uso diário, como antisépticos orais e dentífricos, a eficácia a longo prazo da imunização passiva ainda não foi demonstrada de modo conclusivo e irrefutável (Gambhir *et al.*, 2012).

3.3. População-alvo para a vacina e período de imunização

Os ensaios clínicos em humanos foram realizados maioritariamente em jovens adultos (18-23 anos), não sendo esta a população-alvo de escolha, em particular pelo facto de os jovens adultos já estarem infetados com EGM, principalmente por *S. mutans* (Taubman & Nash, 2006).

A idade mais adequada para ser efetuada a imunização deve ter em conta a ontogenia do sistema imunitário secretor, bem como a idade do hospedeiro na colonização inicial por EGM (Kaur *et al.*, 2014). Dado que a progressão da cárie dentária é lenta e pode ocorrer em qualquer altura da vida, a proteção imunitária tem de ser duradoura (Charone *et al.*, 2012; Gambhir *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2013).

A abordagem tradicional de vacinação mostra que a imunização deve ocorrer antes da infeção (Gambhir *et al.*, 2012). A colonização oral por EGM ocorre principalmente durante a “janela de infeção” após a erupção dos dentes decíduos, mas, tal como visto anteriormente existem outras oportunidades posteriores para nova

colonização por estas bactérias (Charone *et al.*, 2012).

Antes da erupção dos primeiros dentes decíduos, as crianças já têm capacidade de produzir resposta imune através de sIgA na saliva, pelo que, para as crianças sob risco normal para a infeção, um programa de imunização contra a cárie deveria iniciar-se antes da “janela de infeção”, (Smith, 2002; Pinto *et al.*, 2005; Kaur *et al.*, 2014).

Sendo controversa a idade para o início do programa de imunização, autores como Pinto (2005), referem que deve ser por volta dos 6 meses. Outros autores como Negrini (2009), Gambir (2013), Shanmugan (2013) e Kaur (2014), referem que deve ser por volta dos 12 meses.

A vacina contra a cárie poderia ser administrada ao mesmo tempo que outras vacinas, como a vacina contra a difteria e o tétano (Shanmugam *et al.*, 2013).

Os EGM são transmitidos primariamente pelas mães às crianças, pelo que as mães recentes são uma possibilidade de imunização ativa ou passiva para reduzir o nível de infeção de EGM, e deste modo, diminuir a probabilidade e extensão da transmissão aos seus filhos (Pinto *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2013; Kaur *et al.*, 2014). Bem como, para induzir anticorpos anti-EGM no leite materno, tornando o ato de amamentar um mecanismo de imunização passiva anti-EGM (Pinto *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2013). Porém, esta estratégia não teria um impacto relevante, pelo menos nas sociedades ocidentais onde a amamentação termina normalmente muito antes da “janela de infeção” para os EGM (Singh *et al.*, 2013).

É de realçar que a ação sinérgica dos efeitos da vacina sobre as primeiras bactérias colonizadoras dos dentes, iria resultar numa diminuição acentuada de *S. mutans*, tanto pelo efeito dos anticorpos, como pela competição entre as bactérias. Este efeito ocorreria provavelmente, entre a administração da vacina e a erupção dos dentes permanentes, altura em que a “janela de infeção” estaria mais uma vez “aberta”, o que tornaria viável o reforço da vacina (Pinto *et al.*, 2005).

Segundo Charone (2012) e Singh (2013), existem algumas considerações a ter em linha de conta relativamente à vacinação da população-alvo:

- Vacinação ou imunização passiva de mães recentes para diminuir a probabilidade de transmissão aos seus bebés;
- Imunização de bebés ou crianças pequenas para fornecer proteção imunitária

antes da “janela de infeção”;

— Vacinação de reforço pode ser necessária para evitar recolonização.

Para Pinto (2005), a cárie em determinados grupos populacionais é muito elevada, pelo que deveria ser instituído um programa vacinal contra a cárie para estes grupos:

- Indivíduos com incapacidade funcionais, mentais, emocionais ou físicas;
- Indivíduos com deficiência de desenvolvimento do esmalte;
- Indivíduos com xerostomia por causas variadas;
- Adultos de meia-idade onde existe maior risco de exposição radicular;
- Populações residentes em áreas onde a cobertura preventiva seja reduzida.

3.4. Riscos relativos ao uso de vacinas contra a cárie

Todas as vacinas parecem comportar riscos (Shivakumar *et al.*, 2009; Kaur *et al.*, 2014). Foi comprovado que o uso de células bacterianas inteiras pode originar reações cruzadas com tecidos normais do hospedeiro (Krithika *et al.*, 2004a; Pinto *et al.*, 2005; Shivakumar *et al.*, 2009; Kaur *et al.*, 2014).

Alguns estudos descrevem a possibilidade de reação cruzada de *S. mutans* com antígenos do miocárdio humano, pelo que são necessárias novas pesquisas para a obtenção de antígenos bacterianos que estejam ausentes do tecido cardíaco (Pereira *et al.*, 2010).

Os trabalhos de Leão, reforçaram a hipótese de existência de mimetismo antigénico entre o tecido cardíaco e *S. mutans*. Foi demonstrado em camundongos hiperimunizados com *S. mutans*, o aumento dos níveis séricos de anticorpos reativos com extratos do coração e miosina cardíaca (Leão *et al.*, 2000).

Pesquisas que utilizaram anti-soros de coelhos imunizados com células inteiras de *S. mutans* e com uma proteína de elevado peso molecular, mostraram reação cruzada com os tecidos do coração humano (Gambhir *et al.*, 2012; Sumit, 2012; Kaur *et al.*, 2014).

Na membrana celular de *S. mutans* e *S.ratti* foram encontrados polipéptidos de 62-67 KDa, com reação cruzada com o tecido do coração humano e miosina dos

músculos do coelho (Shivakumar et al., 2009; Gambhir et al., 2012).

Wu e Russell (1990) efetuaram pesquisas sobre as reações cruzadas entre o *S. mutans* e os tecidos do coração humano, imunizando ratos com Ag I/II purificado de *S. mutans* e verificaram que o Ag I/II não é responsável pela indução da formação de anticorpos com reação cruzada. Estes estudos permitiram concluir que os anticorpos com reatividade cruzada correspondem a antígenos da membrana celular da bactéria e não ao Ag I/II (Arosa et al., 2012) ou que a reação cruzada poderia ser devido a uma estimulação não específica do sistema imunitário (Pereira et al., 2010).

Os resultados de pesquisas com GTF do *S. mutans* sobre a reatividade cruzada, também foram negativos (Koga et al., 2002).

Pesquisas mais recentes mostraram que a porção do terminal C do Ag I/II contém um epítopo com reação cruzada com a IgG humana, pelo que devido ao seu risco potencial, este epítopo deve ser eliminado da vacina contra a cárie (Kaur et al., 2014).

Os resultados das pesquisas realizadas comprovam que o material a ser utilizado numa vacina contra a cárie têm de estar livre de conteúdo que induza anticorpos com reação cruzada com o tecido do hospedeiro (Lamont et al., 2006).

A imunização por via parentérica tem originado outra inquietação, a qual está associada com a inflamação. Embora a inflamação nos tecidos seja uma consequência natural da reação mediada pela IgG, quando ocorre em tecidos mucosos pode conduzir a um aumento da permeabilidade aos antígenos, pelo que poderia comprometer a segurança da barreira natural da gengiva face aos antígenos do biofilme oral (Miranda et al., 2001).

Para serem evitadas estas reações cruzadas, técnicas de genética e biologia molecular têm sido utilizadas na purificação e síntese peptídica de subunidades estreptocócicas relacionadas com a colonização bacteriana na superfície dentária (Krithika et al., 2004a; Pinto et al., 2005). As vacinas de subunidades possibilitam a eliminação de regiões que possam induzir especificidades indesejadas dos anticorpos, podendo ser preparadas para incluir domínios de ligação salivar, mas não incluírem sequências com potencial para induzir a formação de anticorpos com respostas indesejadas (Smith, 2002).

Outras abordagens que não apresentam o risco de provocar doença cardiovascular ou renal, são a utilização de anticorpos anti-idiotípicos por não utilizarem antigénios verdadeiros de *S. mutans* na vacina, bem como a imunização passiva (Motta *et al.*, 2006).

3.5. Modelos animais e humanos de ensaio da vacina contra a cárie e as suas limitações

Do ponto de vista anatómico, a dentição de roedores é menos semelhante à dentição humana do que a dentição de primatas não humanos. Porém, a composição das três dentições é parecida, assim, tanto os roedores como os primatas não humanos, constituem excelentes modelos para o estudo da cárie (Taubman & Nash, 2006).

Os roedores, apesar de terem uma morfologia dentária e um padrão de cárie diferente da dos humanos e não serem colonizados por *S. mutans*, são os animais mais vulgarmente usados como modelos animais (Silva *et al.*, 2013), por apresentarem as vantagens de: (i) serem baratos; (ii) fáceis de manter; (iii) desenvolverem cáries quando infetados com *S. mutans* e alimentados com uma dieta rica em hidratos de carbono (Lamont *et al.*, 2006; Shivakumar *et al.*, 2009); (iiii) poderem constituir grupos experimentais grandes; (iiiii) permitirem obter um diagnóstico exato de cárie através de exame da superfície do dente (Shivakumar *et al.*, 2009).

Diversas condicionantes relevantes devem ser consideradas na utilização dos roedores em modelos animais. Estas considerações incluem o momento da infeção, a dieta e como esta é fornecida aos animais, bem como a microflora indígena do animal. Em condições ideais, em menos de 4 semanas podem ser detetadas amplas lesões de cárie (Lamont *et al.*, 2006).

Embora sejam utilizados componentes patogénicos de *S. mutans* de origem humana, algumas características do modelo animal experimental, como a alteração da microflora oral, o elevado teor de sacarose na dieta, grandes doses infecciosas e o comportamento coprofágico dos roedores, têm de ser tidas em consideração no momento da avaliação da transposição das abordagens executadas, para os seres humanos (Smith, 2010).

Apesar dos êxitos alcançados, os modelos animais com roedores apresentam limitações na transferência dos resultados obtidos para seres humanos, sendo de

particular relevância a curta duração dos ensaios quando se compara com o tempo de desenvolvimento da cárie em seres humanos (Charone *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2013). Por isso, utilizaram-se primatas para alcançar os resultados obtidos com os roedores (Gambhir *et al.*, 2012).

Bown foi quem reportou o primeiro ensaio com êxito na imunização de macacos contra a cárie, ensaios em que foram injetadas células inteiras de *S. mutans* em *Macaca fascicularis* (Shivakumar *et al.*, 2009).

Uma das vantagens que os macacos apresentam é a analogia na fisiologia, na organização da dentição e no padrão de colonização, com o ser humano. A desvantagem está associada ao grande porte, ao elevado custo de manutenção e ao reduzido número de animais disponíveis, factos que levaram a uma acentuada diminuição da sua utilização (Lamont *et al.*, 2006) e ao pequeno tamanho dos grupos experimentais (Silva *et al.*, 2013) que se traduz num reduzido valor estatístico (Lamont *et al.*, 2006).

Dado que a maioria dos ensaios são efetuados em animais, isto dificulta a transferência e a previsão dos resultados em humanos (Pinto *et al.*, 2005). Assim, independentemente dos mecanismos utilizados para conferir proteção imunitária contra a cárie, o desenvolvimento das vacinas está dependente da realização de ensaios clínicos em humanos, para que se possa determinar se os resultados obtidos de experiências animais podem ser transpostos para os humanos.

Estes ensaios clínicos têm como objetivos estabelecer se a resposta imunitária pode ser obtida com segurança em humanos e se fornece os níveis desejados de proteção contra a cárie, particularmente nos grupos etários suscetíveis (Singh *et al.*, 2013).

Apesar de serem imprescindíveis os ensaios em humanos, existem inúmeros obstáculos bioéticos que levam a que os ensaios sejam conduzidos em voluntários adultos, com uma microflora oral já estabelecida e, deste modo, difícil de ser eliminada. Este facto vai resultar numa subestimação dos resultados obtidos relativamente à imunização da cárie em crianças, a principal população-alvo do programa de vacinação contra a cárie (Pinto *et al.*, 2005).

3.6. Perspetivas e preocupações da vacina contra a cárie dentária

Segundo Smith (2002) e Kaur (2013), uma vacina ideal contra a cárie para uso humano, deve obedecer às seguintes características:

- Conferir a mais ampla cobertura para impedir a infeção por todos os EGM cariogénicos;
- Funcionar em simultâneo para populações de baixo e alto risco;
- A imunidade que confere deve manter-se nos períodos críticos de infeção primários e secundários;
- Poder ser administrada por várias vias, mantendo a eficácia;
- Poder ser administrada com ou como parte de outras imunizações;
- Poder ser administrada por indivíduos com pouca formação;
- Poder fornecer imunidade secundária a outros indivíduos que não foram imunizados;
- Ser barata.

A questão que deve ser respondida é se podemos ou devemos esperar que todas estas características estejam incluídas na vacina contra a cárie.

Aceitando que cada estratégia desenvolvida de vacina contra a cárie pode conferir um nível de proteção aceitável, é necessário ter em consideração a população-alvo e as circunstâncias a que a vacina se destina.

Deste modo, as características relativas aos componentes da vacina, o tipo e a via administração, o custo de fabrico e de pessoal para a administração da vacina, assim como realidades locais da vacina, indicam que mais que uma abordagem da vacina pode ser considerada a ideal para uso humano (Smith, 2002).

Mantêm-se elevadas as perspetivas para o desenvolvimento de uma vacina contra a cárie, com a utilização de novas tecnologias para aumentar os níveis da resposta imune protetora pelo hospedeiro e melhores métodos de aplicação para intercepar infeções na sua fase inicial ou em desenvolvimento, causadas por EGM cariogénicos (Smith, 2010).

Os progressos alcançados na pesquisa da vacina contra a cárie irão conduzir ao aparecimento num futuro próximo de uma potente vacina para a eliminação da cárie dentária (Krithika *et al.*, 2004 b), orientada para os principais componentes de

colonização por EGM, aperfeiçoada por adjuvantes seguros e eficazes e veículos de entrega otimizados (Smith, 2012).

Atualmente, as abordagens das vacinas contra a cárie estão direcionadas para o microrganismo *S. mutans*, mas o desenvolvimento de uma vacina conjugada direcionada para todas as bactérias orais cariogénicas, pode trazer benefícios para a completa erradicação da doença (Krithika *et al.*, 2004b).

Apesar de extensa evidência experimental que comprova a eficácia das vacinas, ainda não existe nenhuma vacina contra a cárie para uso humano. Este facto deve-se em parte, a um desinteresse das empresas comerciais para investir no desenvolvimento da vacina. Apesar da débil situação económica global não ser propícia a investimentos, o lucro a longo prazo deve ser considerável, dada a extensão da doença (Smith, 2010).

A cárie dentária tem um custo socioeconómico elevado, pelo que o custo da vacina contra a cárie não deve ser avaliado isoladamente, devendo ter em conta os custos das medidas preventivas e dos tratamentos curativos (Motta *et al.*, 2006).

É aceitável que a imunização não tenha uma eficácia absoluta. Contudo, uma eficácia tão baixa como 50%, pode ter um resultado positivo no nível da cárie e no custo social e económico que está associado à doença (Russell *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2013).

Uma preocupação das entidades responsáveis pela aprovação da vacina pediátrica tem a ver com o facto de se acrescentar uma vacina para uma doença que normalmente não coloca risco de vida, na já longa lista de vacinas pediátricas (Smith, 2010).

Smith (2010) considera “*este raciocínio um pouco paroquial*” (p. 2) e que pode ser influenciado pelo menor número de cáries que existe numa fração da sociedade que tem um bom acompanhamento médico. Porém, pesquisas internacionais mostram o contrário para a maioria das crianças carentes em todo o mundo (Smith, 2010).

Uma preocupação que se coloca, quando se efetuam as pesquisas sobre os processos de imunização para a cárie dentária, é que a imunização vai interferir num ecossistema oral complexo, podendo haver erradicação ou redução do número de estirpes de *mutans* cariogénicos, facultando o desenvolvimento de estirpes que se mantinham ocultas em equilíbrio com *S. mutans*, as quais podem mostrar potencial

cariogénico tanto ou mais virulento do que o de *S. mutans* ou ainda criar problemas mais graves que os da cárie (Miranda *et al.*, 2001). No entanto, segundo Smith (2010) existem evidências de longo prazo obtidas a partir de estudos longitudinais e transversais realizados na Suécia, que mostram que os indivíduos com níveis baixos ou não detetáveis de EGM no início de vida, têm uma melhor saúde oral à medida que crescem. Por outro lado, o número e diversidade de espécies de estreptococos que colonizam o biofilme oral antes da acumulação de EGM, aponta para que pelo menos uma dessas espécies comensais iria competir com o alvo da vacina de *S. mutans*, com estes nichos a aparecerem durante a erupção dos dentes.

As propostas de introdução de novas vacinas contra doenças em seres humanos têm sempre obstáculos do ponto de vista ético e político-económico. Na vacina contra a cárie, uma questão importante que se coloca é o fator risco-benefício, pois existem pesquisas que comprovam a existência de reações cruzadas com o tecido cardíaco (Motta *et al.*, 2006).

Algumas lacunas têm de ser satisfeitas com o recurso a mais pesquisas, destacando-se a já referida potencialidade de existência de reações cruzadas dos anticorpos com o tecido do coração humano, o tempo de permanência na cavidade oral da concentração mínima da vacina com capacidade de ação antibacteriana, a altura ideal para a administração da vacina bem como a via de administração (Silva *et al.*, 2013).

É fundamental a realização de ensaios clínicos que comprovem e extrapolem os resultados de ensaios em animais aos seres humanos. Estes ensaios devem confirmar as respostas imunes apropriadas em seres humanos, particularmente em grupos suscetíveis à cárie dentária como as crianças e, se essas respostas produzem os níveis de proteção desejáveis (Russell *et al.*, 2004; Charone *et al.*, 2012; Kaur *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2013).

Apesar de todas as preocupações, os pesquisadores têm uma obrigação ética relacionada com o benefício para continuarem a desenvolver uma vacina contra a cárie, ou seja, têm a obrigação de beneficiar a saúde oral da sociedade e isto é apoiado pela obrigação ética de promover a justiça social (Taubman & Nash, 2006).

Conclusão

A importância da cárie dentária assenta, entre outros motivos, no facto de ser uma das doenças mais predominantes que afeta o ser humano e apesar da grande variedade de medidas preventivas, continua a ser a infeção mais comum.

A cárie dentária resulta da relação entre a microflora oral cariogénica, o hospedeiro suscetível e a dieta, cuja interação ao longo do tempo permitem o desenvolvimento da cárie.

A cárie dentária pode ser transmitida por via vertical e/ou horizontal, sendo *S. mutans* considerado o seu principal agente etiológico. *S. mutans* dispõe de diversos fatores de virulência associados à superfície celular (como Ag I/II, GTF, GBP), e devido às suas propriedades de adesão e acumulação, produção de ácidos e resistência em condições de baixos valores de pH no biofilme oral, pode levar à desmineralização dos tecidos dentários.

Apesar de na maioria das situações, o ser humano ter capacidade para exibir uma adequada resposta imunitária celular e humoral face a *S. mutans*, sem uma atuação terapêutica apropriada essas respostas imunitárias são normalmente insuficientes.

As crianças com menos capacidade de acesso a cuidados de saúde oral são as mais vulneráveis e as que têm maior prevalência de cárie dentária.

Dificuldades económicas e obstáculos comportamentais e culturais, tornam muito improvável atingir os milhões de crianças suscetíveis através dos atuais métodos de prevenção da saúde oral, como a fluoretação da água, aplicação tópica de flúor, escovagem e uso do fio dentário, selantes dentários e a redução de ingestão de hidratos de carbono fermentáveis provenientes da dieta.

As vacinas são particularmente adequadas para aplicações de Saúde Pública em ambientes em que não se preste assistência médica regular.

A aplicação clínica da vacina não tem como objetivo substituir as medidas em uso na prevenção e no combate à cárie, devendo constituir um complemento para reforçar a capacidade de erradicação da cárie dentária.

Apesar do caminho no desenvolvimento da vacina contra a cárie não estar livre de desafios e obstáculos, as perspetivas são promissoras e a eliminação da doença

através da vacinação é uma opção que tem atraído a aplicação de diversas abordagens na pesquisa de vacinas, estando a maioria delas ainda na fase de experimentação laboratorial ou investigação clínica.

Os consideráveis progressos atingidos na pesquisa de modelos de vacina contra a cárie resultam das investigações genéticas e moleculares direcionadas para *S. mutans* e ao mecanismo da resposta imunitária do hospedeiro. Estas pesquisas permitiram identificar os antígenos de *S. mutans* mais adequados para a vacina, assim como os melhores tipos de vacinas e vias de administração para diminuir a colonização bacteriana e previsivelmente o número de lesões de cárie.

Vários componentes proteicos que intervêm na patogénese molecular de *S. mutans* podem induzir imunidade protetora e podem ser utilizados na preparação de vacinas contra a cárie, pelo que, o foco da atenção tem sido direcionado para os antígenos proteicos da superfície celular; as adesinas (Ag I/II), as glucosiltransferases (GTF) e as proteínas de ligação a glucano (GBP).

Pesquisas recentes, utilizando vacinas com antígenos intatos ou péptidos a partir do Ag I/II, GTF ou GBP ou uma combinação de antígenos, podem promover a proteção contra a cárie induzida experimentalmente.

Nas últimas décadas, as novas estratégias conduziram ao desenvolvimento de vários tipos de vacinas que incluem vacinas de subunidades, vacinas recombinantes, vacinas anti-idiotípicas e vacinas de ADN.

Inúmeras abordagens de vacinação e de imunização passiva têm sido utilizadas, através de diferentes vias de administração, para promover a indução de respostas imunitárias de proteção, tendo demonstrado sucesso em modelos animais e em ensaios clínicos humanos.

Qualquer que seja o mecanismo utilizado para conferir proteção imunitária contra a cárie, o desenvolvimento da vacina vai sempre depender da realização de ensaios clínicos para confirmar se os resultados obtidos de experiências em modelos animais podem ser transpostos para os humanos e confirmar se a resposta imunitária pode ser induzida com segurança em humanos, particularmente nos grupos de idade suscetível, bem como se esta resposta oferece os níveis desejados de proteção.

No desenvolvimento das vacinas, alguns aspetos ainda têm de ser clarificados com mais pesquisas, destacando-se a possibilidade de reações cruzadas dos anticorpos

com o tecido do coração humano, o tempo de permanência na boca da concentração mínima da vacina com capacidade de ação antibacteriana, o tempo ideal para a administração da vacina e a via de administração.

A eficácia da vacina contra a cárie pode estar diretamente relacionada com o momento da vacinação e com a redução dos fatores de risco ambientais, pelo que, por exemplo, um plano de vacinação a adotar pode ser a imunização no início da infância, antes da aquisição permanente de *S. mutans*.

Atualmente, ainda não existe uma vacina contra a cárie para uso humano, em parte devido à recessão económica global que condiciona as empresas em investir nesta área. No entanto, a extensa evidência experimental que comprova a eficácia das vacinas e a extensão da doença indicam que os proveitos financeiros a longo prazo poderão ser aliciantes, esperando-se por isso uma alteração de atitude das empresas.

A vacina contra a cárie oferece um campo promissor para a prevenção e a erradicação da cárie dentária.

Mantêm-se elevadas as perspectivas para o desenvolvimento de uma vacina contra a cárie, com a utilização de novas tecnologias para aumentar os níveis da resposta imune protetora pelo hospedeiro e melhores métodos de aplicação para intercepar infeções na sua fase inicial ou em desenvolvimento, causadas por EGM cariogénicos, pelo que se pode prever que a breve prazo surja uma vacina contra a cárie orientada para os principais fatores de colonização por EGM, aperfeiçoada por adjuvantes seguros e eficazes e veículos de entrega otimizados.

Embora os obstáculos científicos e económicos precisem de ser clarificados para se obter uma vacina, depositam-se grandes esperanças porque, aliado ao avanço biotecnológico e aos benefícios potenciais, existe o desejo de melhoria da qualidade de vida para o ser humano. Assim, deve-se continuar a incentivar as pesquisas na obtenção de uma vacina contra a cárie, eficaz e segura.

Bibliografia

- Abranches, J., Miller, J. H., Martinez, A. R., Simpson-haidaris, P. J., Burne, R. A., & Lemos, J. A. (2011). The collagen-binding protein cnm is required for *Streptococcus mutans* adherence to and intracellular invasion of human coronary artery endothelial cells. *Infection and Immunity*, 79(6), 2277-2284. doi: 10.1128/IAI.00767-10
- Almeida, M. E., Massis, L. M., & Ferreira, L. C. (2002, Março/Abril). *Salmonella* vacinais. Uma estratégia promissora para o desenvolvimento de vacinas orais multivalentes. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 25, 22-26. Disponível em <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio25/salmonella>
- Alves, A. C., Nogueira, R. D., Stipp, R. N., Pampolini, F., Moraes, A. B., Gonçalves, R. B., . . . Mattos-Graner, R. O. (2009, Abril). Prospective study of potential sources of *Streptococcus mutans* transmission in nursery school children. *Journal of Medical Microbiology*, 58, 476-481. doi: 10.1099/jmm.0.005777-0
- Anderson, H., & Domenik, Z. (2010, Julho). The caries environment: saliva, pellicle, diet, and hard tissue ultrastructure. *Dental Clinics of North America*, 54(3), 455-467. doi: 10.1016/j.cden.2010.03.008
- Areias, C., Macho, V., Raggio, D., Melo, P., Guimarães, H., Andrade, C., & Pinto, G. (2010). Cárie precoce da infância-o estado de arte. *Acta Pediátrica Portuguesa*, 41(5), 217-21. Disponível em <http://actapediatrica.spp.pt/article/view/4327/3222>
- Arosa, F. A., Cardoso, E. M., & Pacheco, F. C. (2012). *Fundamentos de imunologia* (2^a ed.). Lisboa: Lidel. pp. 57-561.
- Bagramian, R. A., Garcia-Godoy, F., & Volpe, A. R. (2009, Fevereiro). The global increase in dental caries. A pending public health crisis. *American Journal of Dentistry*, 21(1), 3-8. Disponível em <http://amjdent.com/Archive/2009/Bagramian%20-%20February%202009>
- Bedran, T. B., Azelmat, J., Spolidorio, D. P., & Grenier, D. (2013). Fibrinogen-induced *Streptococcus mutans* biofilm formation and adherence to endothelial cells. *BioMed Research International*, 1-8. doi: 10.1155/2013/431465
- Bradshaw, D. J., & Lynch, R. J. (2013, Dezembro). Diet and the microbial aetiology of dental caries: new paradigms. *International Dental Journal*, 63(2), 64-72. doi: 10.1111/idj.12082

- Campos, M. J., Ferreira, A. P., & Vitral, R. W. (2011). O papel da imunoglobulina A secretora no mecanismo de defesa da mucosa bucal. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica integrada, João Pessoa, 11*(1), 139-143.
doi: 10.4034/PBOCI.2011.111.22
- Caufield, P. W., Cutter, G. R., & Dasanayake, A. P. (1993, Janeiro). Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *Journal of Dental Research, 72*(1), 37-45. doi: 10.1177/00220345930720010501
- Cesta, M. F. (2006, Agosto). Normal structure, function, and histology of mucosa-associated lymphoid tissue. *Toxicologic Pathology, 34*, 599-608.
doi: 10.1080/01926230600865531
- Chamorro-Jiménez, A. L., Ospina-Cataño, A., Arango-Rincón, J. C., & Martínez-Delgado, C. M. (2013). Effect of secretory IgA on the adherence of *Streptococcus mutans* on human teeth. *Revista CES Odontología, 26*(2), 76-106. Disponível em <http://www.scielo.org.co/pdf/ceso/v26n2/v26n2a08>
- Charone, S., Cardoso, C. A., & Groisman, S. (2012). Vacina anticárie: o estado da arte. *PerioNews, 6*(1), 89-93. Disponível em http://www.researchgate.net/publication/258201192_Vacina_anticie_o_estado_da_arte_Anti-caries_vaccine_the_state_of_the_art
- Childers, N. K., Tong, G., Li, F., Dasanayake, A. P., Kirk, K., & Michalek, S. M. (2002, Janeiro). Humans immunized with *Streptococcus mutans* antigens by mucosal routes. *Journal of Dental Research, 81*(1), 48-52.
doi: 10.1177/154405910208100111
- Chu, C. H., Chau, A. M., & Lo, E. C. (2013). Current and future research in diagnostic criteria and evaluation of caries detection methods. *Oral Health & Preventive Dentistry, 11*(2), 181-189. doi: 10.3290/j.ohpd.a29365
- Doméjean, S., Zhan, L., DenBesten, P. K., Stamper, J., Boyce, W. T., & Featherstone, J. D. (2010, Janeiro). Horizontal transmission of mutans streptococci in children. *Journal of Dental Research, 89*(1), 51-55. doi: 10.1177/0022034509353400
- Ellwodd, R. P., Goma, J., & Pretty, I. A. (2012, Setembro). Caries clinical trial methods for the assessment of oral care products in the 21st century. *Advances in Dental Research, 24*(2), 32-35. doi: 10.1177/0022034512449464
- Fejerskov, O., & Kidd, E. (2008). *Dental Caries: The disease and its clinical management* (2ª ed.). Oxford, Reino Unido: Blackwell Munksgaard. pp. 4-141.
- Fontana, M., Young, A., Wolff, S., Pitts, N., & Longbottom, C. (2010, Julho). Defining

- dental caries for 2010 and beyond. *Dental Clinics of North America*, 54(3), 423-440.
doi: 10.1016/j.cden.2010.03.007
- Gambhir, R. S., Singh, S., Singh, G., Singh, R., Nanda, T., & Kakar, H. (2012). Vaccine against dental caries-an urgent need. *Journal of Vaccines & Vaccination*, 3(2).
doi: 10.4172/2157-7560.1000136
- González, C. (2010, Julho). The chemistry of caries: remineralization and demineralization- events with direct clinical relevance. *Dental Clinics of North America*, 54(3), 469-476. doi: 10.1016/j.cden.2010.03.004
- Hoshino, T., Fujiwara, T., & Kawabata, S. (2012, Julho). Evolution of cariogenic character in *Streptococcus mutans*: horizontal transmission of glycosyl hydrolase family 70 genes. *Scientific Reports*, 2(518), 1-7. doi: 10.1038/srep00518
- Huang, L., Xu, Q.-a., Liu, C., Fan, M.-w., & Li, Y.-h. (2013, Fevereiro). Anti-caries DNA vaccine-induced secretory immunoglobulin A antibodies inhibit formation of *Streptococcus mutans* biofilms in vitro. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34, 239-246. doi: 10.1038/aps.2012.145
- Islam, B., Khan, S. N., & Khan, A. U. (2007, Novembro). Dental caries: from infection to prevention. *Medical Science Monitor*, 13(11), RA196-203. Disponível em <http://www.medscimonit.com/download/index/idArt/512939>
- Janeway Jr., C. A., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. (2007). *Imunobiologia. O sistema imune na saúde e na doença* (6ª ed.). Inglaterra: Artmed. pp. 33, 112-113, 319, 367-368, 432-433, 446-447, 455, 643-651, 696-697.
- Javed, M., Chaudhry, S., Butt, S., Ijaz, S., Asad, R., Awais, F., & Khan, A. A. (2012, Dezembro). Transmission of *Streptococcus mutans* from mother to child. *Pakistan Oral & Dental Journal*, 32(3), 493-496.
Disponível em http://www.podj.com.pk/Dec_2012/p-28
- Kasper, D. L., Fauci, A. S., Longo, D. L., Braunwald, E., Hauser, S. L., & Jameson, J. L. (2006). *Harrison - Medicina interna* (16ª ed.). EUA: McGraw-Hill. pp. 2001-2034.
- Kaur, A., Gupta, N., & Sharma, S. (2013, Dezembro). Immunology of dental caries and caries vaccine-Part I. *International Journal of Pharmacy and Biomedical Sciences*, 4(4), 131-136.
Disponível em <http://www.pharmainterscience.com/Docs/IJPBS-2013-04-99>
- Kaur, A., Gupta, N., & Sharma, S. (2014, Fevereiro). Immunology of dental caries and

- caries vaccine-Part II. *International Journal of Pharmacy and Biomedical Sciences*, 5(1), 03-08.
- Disponível em <http://www.pharmainterscience.com/Docs/IJPBS-2014-05-101>
- Kidd, E. (2011, Dezembro). The implications of the new paradigm of dental caries. *Journal of Dentistry*, 39(2), S3-S8. doi: 10.1016/j.jdent.2011.11.004
- Koga, T., Oho, T., Shimazaki, Y., & Nakano, Y. (2002, Maio). Immunization against dental caries. *Vaccine*, 20(16), 2027-2044. doi: 10.1016/S0264-410X(02)00047-6
- Krithika, A. C., Kandaswamy, D., & Krishna, V. G. (2004 a). Caries vaccine-I. Today's myth! *Journal of the Indian Association of Public Health Dentistry*, 2004(4), 21-25. Disponível em <http://www.rootcanalcentre.com/Dr-Gopikrishna/NATIONAL-PUBLICATIONS/JPublicHealthDentistry-2004-CARIES-VACCINE-I>
- Krithika, A. C., Kandaswamy, D., & Krishna, V. G. (2004 b). Caries vaccine-II. Tomorrow's reality? *Journal of the Indian Association of Public Health Dentistry*, 2004(4), 26-29. Disponível em <http://www.rootcanalcentre.com/Dr-Gopikrishna/NATIONAL-PUBLICATIONS/JPublicHealthDentistry-2004-Caries-Vaccine-II>
- Krzysciak, W., Pluskwa, K. K., Jurczak, A., & Koscielniak, D. (2013). The pathogenicity of the *Streptococcus* genus. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 32, 1361-1376. doi: 10.1007/s10096-013-1914-9
- Kutsch, V. K. (10 de Dezembro de 2013). Dental caries: An updated medical model of risk assessment. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 1-6. doi: 10.1016/j.prosdent.2013.07.014
- Lamont, R. J., Burne, R. A., Lantz, M. S., & LeBlanc, D. J. (2006). *Oral microbiology and immunology*. Washington, D.C., EUA: ASM Press. pp. 53-252.
- Law, V., Scow, W. K., & Townsend, G. (2007, Junho). Factors influencing oral colonization of mutans streptococci in young children. *Australian Dental Journal*, 52(2), 93-100. doi: 10.1111/j.1834-7819.2007.tb00471.x
- Leão, M. V., Brandão, A. A., Moraes, E., Shimizu, M. T., & Unterkircher, C. S. (2000, Outubro/Dezembro). Detecção de anticorpo anticorção em camundongos Balb/c imunizados com *Streptococcus mutans*. *Pesquisa Odontológica Brasileira*, 14(4), 319-326. doi: 10.1590/S1517-74912000000400003
- Leites, A. C., Pinto, M. B., & Sousa, E. R. (2006). Aspectos microbiológicos da cárie dental. *Salusvita*, 25(2), 239-252. Disponível em

- http://www.usc.br/biblioteca/salusvita/salusvita_v25_n2_2006_art_09
- Lett, E., Gangloff, S., Zimmermann, M., Wachsmann, D., & Klein, J.-P. (1994, Março). Immunogenicity of polysaccharides conjugated to peptides containing T- and B-cell epitopes. *Infection and Immunity*, 62(3), 785-792. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC186184/>
- Li, L., Nan, J., Li, D., Brostromer, E., Wang, Z., Liu, C., . . . Su, X.-D. (2014, Setembro). Structural genomics studies of human caries pathogen *Streptococcus mutans*. *Journal of Structural and Functional Genomics*, 15(3), 91-99. doi: 10.1007/s10969-014-9172-3
- López, M., Mallorquín, P., Pardo, R., & Vega, M. (2004, Setembro). Vacunas humanas de nueva generación. Silva Enríquez (ed.): Genoma España, 9-32. Disponível em http://www.uned.es/091279/ingenieria_genetica/PDFs/vacunas
- Manton, D. J. (2013, Junho). Diagnosis of the early carious lesion. *Australian Dental Journal*, 58(1), 35-39. doi: 10.1111/adj.12048
- Marsh, P. D., Martin, M. V., Lewis, M. A., & Williams, D. W. (2009). *Oral microbiology* (5ª ed.). Reino Unido: Churchill Livingstone/Elsevier. pp. 103-145.
- Melo, P., Azevedo, Á., & Henriques, M. (2008). Cárie dentária - a doença antes da cavidade. *Acta Pediátrica Portuguesa*, 39(6), 253-9. Disponível em <http://actapediatrica.spp.pt/article/viewFile/4616/3453>
- Michalek, S. M., & Childers, N. K. (1990, Janeiro). Development and outlook for a caries vaccine. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 1(1), 37-54. doi:10.1177/10454411900010010401
- Michalek, S. M., Katz, J., & Childers, N. K. (2001, Fevereiro). A vaccine against dental caries: an overview. *BioDrugs*, 15(8), 501-508. doi: 10.2165/00063030-200115080-00002
- Miranda, J. L., Andrade, E. S., Souza, G. F., Alves, R. D., Almeida, D., & Pinto, L. P. (2001, Janeiro/Abril). Vacinação: uma opção preventiva contra a cárie dental aprimorada pelos conhecimentos da imunologia e da biotecnologia. *PGR. Pós-Graduação em Revista. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos*, 4(1), 67-76. Disponível em <http://ojs.fosjc.unesp.br/index.php/cob/article/viewFile/109/71>
- Morrow, w. J., Schmidt, C. S., Sheikh, N. A., & Davies, D. H. (2012). *Vaccinology: principles and practice*. EUA: Blackwell Publishing. pp. 3-357.
- Motta, L. J., Guedes, C. C., Reda, S. H., Bussadori, S. K., Fernandes, K. S., & Martins,

- M. D. (2006). Vacinas anticárie: uma revisão do estágio atual. *ConScientiae Saúde*, 5, 97-107. Disponível em http://www.uninove.br/PDFs/Publicacoes/conscientiae_saude/csaude_v5/cnsv5_3k32.pdf
- Nakano, K., Nomura, R., Nakagawa, I., Hamada, S., & Ooshima, T. (2004, Janeiro). Demonstration of *Streptococcus mutans* with a cell wall polysaccharide específico to a new serotype, k, in the human oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(1), 198-202. doi: 10.1128/JCM.42.1.198-202.2004
- Negrini, T. C., Duque, C., Hofling, J. F., & Gonçalves, R. B. (2009, Março). Fundamental mechanisms of immune response to oral bacteria and the main perspectives of a vaccine against dental caries: a brief review. *Revista Odontologia Ciência*, 24(2), 198-204. Disponível em <http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/fo/article/view/4696/3989>
- Nishimura, J., Saito, T., Yoneyama, H., Bai, L. L., Okumura, K., & Isogai, E. (2012, Setembro). Biofilm formation by *Streptococcus mutans* and related bacteria. *Advances in Microbiology*, 2 (3), 208-215. doi: 10.4236/aim.2012.23025
- Noce, E., Rubira, C. M., Rosa, O. P., Silva, S. M., & Bretz, W. A. (2008, Janeiro). Aquisição de estreptococos mutans e desenvolvimento de cárie dental em primogênitos. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*, 8(2), 239-244. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3183577/>
- Nogueira, R. D., Borges, M. C., Talarico, M. L., Ferriani, V. P., & Mattos-Graner, R. O. (2008). Vacinas anticárie - desafios. *Revista do Instituto de Ciências da Saúde*, 26(4), 463-466. Disponível em <http://files.bvs.br/upload/S/0104-1894/2008/v26n4/a1747.pdf>
- Nogueira, R. D., Borges, M. C., Sesso, M. L., & Ferriani, V. P. (2011, Maio/Junho). Ontogenia da resposta imune de mucosas e colonização por micro-organismos orais. *Pediatria Moderna*, 47(3), 90-97. Disponível em http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=4774
- Nyvad, B., Crielaard, W., Mira, A., Takahashi, N., & Beighton, D. (2013). Dental caries from a molecular microbiological perspective. *Caries Research*, 47, 89-102. doi: 10.1159/000345367
- Okada, M., Soda, Y., Hayashi, F., Doi, T., Suzuki, J., Miura, K., & Kozai, K. (2005, Julho). Longitudinal study of dental caries incidence associated with

- Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in pre-school children. *Journal of Medical Microbiology*, 54, 661-665. doi:10.1099/jmm.0.46069-0
- Parahitiyawa, N. B., Jin, L. J., Leung, W. K., Yam, W. C., & Samaranayake, L. P. (2009, Abril). Microbiology of odontogenic bacteremia: beyond endocarditis. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1), 46-64. doi: 10.1128/CMR.00011-09
- Parisotto, T. M., King, W. F., Duque, C., Mattos-Graner, R. O., Steiner-Oliveira, C., Nobre-dos-Santos, M., & Smith, D. J. (2011, Setembro). Immunological and microbiologic changes during caries development in young children. *Caries Research*, 45, 377-385. doi: 10.1159/000330230
- Pereira, A. G., Neves, A. M., & Trindade, A. C. (2010). Imunologia da cárie dentária. *Acta Médica Portuguesa*, 23(4), 663-668. Disponível em <http://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/viewFile/689/367>
- Peterson, S. N., Snesrud, E., Schork, N. J., & Bretz, W. A. (2011, Agosto). Dental caries pathogenicity: a genomic and metagenomic perspective. *Journal of Dental Research*, 61(1), 11-22. doi: 10.1111/j.1875-595X.2011.00025.x.
- Pieralise, F. J., Maciel, S. M., Andrade, F. B., Garcia, J. E., & Poli-Frederico, R. C. (Abril/Junho de 2013). Detection of *Streptococcus mutans* of the SpaP gene and dental caries in mother/child pairs. *RGO - Revista Gaúcha de Odontologia*, 61(2), 205-211. Disponível em <http://www.revistargo.com.br/viewarticle.php?id=2871>
- Pinto, L. P., Queiroz, L. M., Nonaka, C. F., & Nascimento, G. J. (Julho de 2005). Aspectos imunológicos da cárie dentária. *Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre*, 46(1), 19-22. Disponível em <http://seer.ufrgs.br/RevistadaFaculdadeOdontologia/article/viewFile/7605/9699>
- Plotkin, S. A., Orenstein, W. A., & Offit, P. A. (2004). *Vaccines* (4ª ed.). Philadelphia, EUA: Saunders. pp. 61-78.
- Pretty, I. A., & Ellwood, R. P. (2013, Agosto). The caries continuum: opportunities to detect, treat and monitor the re-mineralization of early caries lesions. *Journal of Dentistry*, 41(2), S12-S21. doi: 10.1016/j.jdent.2010.04.003
- Rich, R. R., Fleisher, T. A., Shearer, W. T., Schroeder Jr., H. W., Frew, A. J., & Weyand, C. M. (2013). *Clinical Immunology: Principles and Practice* (4ª ed.). EUA: Elsevier. pp. 239-251.
- Rosa, R. T., Gonçalves, R. B., & Rosa, E. A. (Abril/Junho de 2005). Transmissibilidade de estreptococos cariogênicos: uma atualização conceitual. *Revista de Clínica e*

- Pesquisa Odontológica*, 1(4), 27-36. Disponível em
<http://www2.pucpr.br/reol/pb/index.php/aor?dd1=4&dd99=view&dd98=pb>
- Russell, M. W., Hajishengallis, G., Childers, N. K., & Michalek, S. M. (1999). Secretary immunity in defense against cariogenic mutans streptococci. *Caries Research*, 33, 4-15. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9831775>
- Russell, M. W., Childers, N. K., Michalek, S. M., Smith, D. J., & Taubman, M. A. (2004). A caries vaccine? the state of the science of immunization against dental caries. *Caries Research*, 38, 230-235. doi:10.1159/000077759
- Sala, E. C., & García, P. B. (2013). *Odontología preventiva y comunitaria* (4ª ed.). Espanha: Elsevier. pp. 65-129.
- Selwitz, R. H., Ismail, A. I., & Pitts, N. B. (2007). Dental caries. *Lancet*, 369, 51-59. doi:10.1016/S0140-6736(07)60031-2
- Sentila, R., Karthika, S., Michael, A., & Gandhimathi, A. (2013, Junho). Protection against dental carries by passive immunization with hen egg yolk antibody using cell associated glucosyltransferase of *Streptococcus mutans*. *Journal of Medical Microbiology & Diagnosis*, 2(3), 1-5. doi: 10.4172/2161-0703.1000125
- Setia, S., Gambhir, R. S., & Kapoor, V. (2012). Immunology in prevention of dental caries. *Universal Research Journal of Dentistry*, 2(2), 58-63. doi: 10.4103/2249-9725.114218
- Shanmugam, K. T., Masthan, K. M., Balachander, N., Sudha, J., & Sarangarajan, R. (2013, Junho). Dental caries vaccine - a possible option? *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 7(6), 1250-1253. doi: 10.7860/JCDR/2013/5246.3053
- Shi, W., Li, Y. H., Liu, F., Yang, J. Y., Zhou, D. H., Chen, Y. Q., . . . Yan, H. M. (2012). Flagellin enhances saliva IgA response and protection of anti-caries DNA vaccine. *Journal of Dental Research*, 91(3), 249-254. doi: 10.1177/002203451142428
- Shivakumar, K. M., Vidya, S. K., & Chandu, G. N. (2009). Dental caries vaccine. *Indian Journal of Dental Research*, 20(1), 99-106. Disponível em <http://www.ijdr.in/text.asp?2009/20/1/99/49066>
- Silva, A. C., Silva, D. R., Silva, I. G., Oliveira, P. A., Agripino, G. G., & Marinho, S. A. (2013). Caries vaccine: current reality or remote future? In *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education* (Vol. 3). A. Méndez-Vilas (ed.). Badajoz, Espanha: Formatex research center. pp. 1548-1552.
- Singh, V., Bhaskar, D. J., R., Chandan, A.R., & Punia, H. (2013, Setembro/Outubro).

- Caries vaccine: a review. *Heal Talk-a Journal of Clinical Dentistry*, 6(1), 20-23.
Disponível em
<http://www.healtalkht.com/PDF/Page%2020-23%20Dr%20Vikas%20Singh-Caries%20Vaccine-A%20Review.pdf>
- Smith, D. J. (2002, Julho). Dental caries vaccines: prospects and concerns. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 13(4), 335-349.
doi: 10.1177/154411130201300404
- Smith, D. J. (2003, Outubro). Caries vaccines for the twenty-first century. *Journal of Dental Education*, 67(10), 1130-1139. Disponível em
<http://www.jdentaled.org/content/67/10/1130.long>
- Smith, D. J. (2010, Janeiro). Dental caries vaccines: prospects and concerns. *Expert Review of Vaccines*, 9(1), 1-3. doi: 10.1586/erv.09.143
- Smith, D. J. (2012, Março). Prospects in caries vaccine development. *Journal of Dental Research*, 91(3), 225-226. doi: 10.1177/0022034511425928
- Smith, D. J., & Mattos-Graner, R. O. (2008). Secretory immunity following mutans streptococcal infection or immunization. *Microbiology and Immunology*, 319, 131-156. doi: 10.1007/978-3-540-73900-5_6
- Sumit, D. (2012, Dezembro). Vaccine for tooth decay: An upcoming mode of caries prevention!!! *Indian Journal of Medicine and Healthcare*, 1(8), 214-218.
Disponível em
<http://ijmh.informaticspublishing.com/index.php/ijmh/article/view/31785>
- Sun, J., Yang, X., Xu, Q.-A., Bian, Z., Chen, Z., & Fan, M. (2009, Dezembro). Protective efficacy of two new anti-caries DNA vaccines. *Vaccine*, 27(52), 7459-7466. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.05.007
- Takahashi, N., & Nyvad, B. (2008). Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Research*, 42, 409-418. doi: 10.1159/000159604.
- Taubman, M. A., & Nash, D. A. (2006, Julho). The scientific and public-health imperative for a vaccine against dental caries. *Nature Reviews Immunology*, 6, 555-563. doi: 10.1038/nri1857
- William, E. P. (2008). *Fundamental Immunology* (6^a ed.). EUA: Lippincott William & Wilkins. pp. 983-1030.
- Wu, H., & Russell, M. W. (1990, Novembro). Immunological cross-reactivity between *Streptococcus mutans* and human heart tissue examined by cross-immunization experiments. *Infection and Immunity*, 58(11), 3545-3552. Disponível em

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC313695/>

- Yan, H. (2013, Maio). Salivary IgA enhancement strategy for development of a nasal-spray anti-caries mucosal vaccine. *Science China Life Sciences*, 56(5), 406-413. doi: 10.1007/s11427-013-4473-5
- Yang, Y.-p., Li, Y.-h., Zhang, A.-h., Bi, L., & Fan, M.-w. (2009, Novembro). Good manufacturing practices production and analysis of a DNA vaccine against dental caries. *Acta Pharmacologica Sinica*, 30, 1513-1521. doi: 10.1038/aps.2009.152.
- Zero, D. T., Fontana, M., Martinez-Mier, E. A., Ferreira-Zandoná, A., Ando, M., González-Cabezas, C., & Bayne, S. (2009, Setembro). The biology, prevention, diagnosis and treatment of dental caries. *JADA (Journal of the American Dental Association)*, 140(9), 25S-34S. doi: 10.14219/jada.archive.2009.0355