

Vacina da Cárie Dentária

Diana Maximino Castro

**Vacina da Cárie Dentária**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2012



Vacina da Cárie Dentária

Diana Maximino Castro

## **Cárie e vacinação**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2012

Vacina da Cárie Dentária

Diana Maximino Castro

## **Cárie e vacinação**

“Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para  
obtenção do grau de Mestrado Integrado em Medicina Dentária”

---

## **Resumo**

A cárie dentária preenche os critérios de uma das doenças infecciosas mais comuns da humanidade e esta natureza deve-se à infecção por microorganismos cariogénicos específicos. O *S. mutans* é considerado o agente etiológico primário da cárie dentária, devido à sua capacidade em aderir e acumular nas superfícies dentárias. Actualmente, o tratamento da doença consiste na simples remoção do tecido desmineralizado e na reconstrução do mesmo, sendo apenas paliativo. O entendimento dos principais mecanismos de virulência bacterianos é essencial, com o objectivo de que estes possam ser utilizados em estudos focados na formulação de uma vacina que possa levar ao bloqueio bacteriano cariogénico, impedindo o aparecimento da cárie.

No presente trabalho é realizada uma revisão dos diversos estudos de prevenção da cárie através da imunização activa; são abordados os vários antigénios usados para estimular a resposta imunológica do hospedeiro, as suas formas de administração e as experiências já realizadas quer no modelo animal, quer no modelo humano.

Após análise dos variados artigos, conclui-se que uma vacina anti-cárie apesar de eficaz poderá não representar uma opção relativamente vantajosa, uma vez que estamos perante uma patologia de origem multifactorial. A relação custo-benefício tem que ser considerada assim como uma dieta correcta e a boa higiene oral.

## **Abstract**

Dental caries fulfills the criteria of one of the most common infectious diseases of mankind. This nature is due to infection by specific microorganisms cariogenic. *S. mutans* is considered the primary etiological agent of dental caries due to its ability to adhere to tooth surfaces and accumulate. Currently, treatment of this disease is the simple removal of tissue reconstruction, and demineralized thereof, only palliative. The understanding of the main mechanisms of bacterial virulence is essential, in order that they can be used in studies focused on the development of a vaccine that can lead to the blockage of the cariogenic bacteria, preventing the appearance of tooth decay.

In this work, a review of several studies of caries prevention by active immunization; examines the various antigens used to stimulate the host immune responses, its forms of administration and the experiments already performed either in the animal model, both in human model.

Upon examination of various articles, it is concluded that vaccine anti-caries effective although it may not represent a relatively advantageous option, since this is a disease of multifactorial origin. The cost-benefit ratio has to be considered as well as a proper diet and good oral hygiene.

**Dedicatórias**

Aos meus pais.

## **AGRADECIMENTOS**

É com muita satisfação que expresso aqui o mais profundo agradecimento a todos aqueles que tornaram a realização deste trabalho possível.

A Professora Doutora Joana Domingues, minha orientadora, pela competência científica e acompanhamento do trabalho, pela generosidade revelada, bem como pelas críticas, correcções e sugestões relevantes feitas durante a sua orientação.

A Professora Doutora Sandra Soares, minha co-orientadora, pela competência científica e discussão de ideias, bem como pelos seus preciosos conselhos durante a sua orientação.

Ao meu pai, Amadeu Augusto de Castro, pela constante alegria e apoio nos momentos mais difíceis.

A minha mãe, Isabel Grandão Maximino de Castro, que mostrou todo o seu amor, motivação, compreensão e força, com que sempre me acompanhou.

Ambos inculcaram em mim a alegria de viver, fizeram tudo o melhor possível e mantiveram sempre o objectivo de realizarem os meus sonhos.

A minha binómia durante o curso e para a vida, Cátia Gonçalves Ferreira da Silva, pelas pausas entre um parágrafo e outro que me deram coragem para continuar juntamente com alegria, companhia e amizade.

Ao meu amigo Miguel Magalhães Ferreira, que acompanhou todo o meu percurso académico, incentivando-me sempre mesmo quando estava mais desanimada.

A minha ex-colega de casa e sempre amiga, Tânia Marisa dos Santos, que esteve carinhosamente presente.

# Índice

<b>Índice de Figuras.....</b>	<b>xii</b>
<b>Siglas e Abreviaturas .....</b>	<b>xiii</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>DESENVOLVIMENTO .....</b>	<b>3</b>
I Cárie Dentária.....	3
1. Definição.....	3
II Fisiopatologia da Cárie .....	4
2.1. Formação de cáries no esmalte.....	5
2.2. Formação de cáries na dentina .....	7
2.3. Cavitação .....	8
2.4. Remineralização .....	8
III Factores Etiológicos .....	8
3.1. Hospedeiro susceptível .....	10
3.1.1. Saliva .....	10
3.1.1.1. Película aderida/adquirida .....	12
3.1.2. Dente.....	14
3.2. Dieta .....	15
3.3. Bactérias .....	17
3.3.1. <i>Streptococcus mutans</i> .....	18
3.4. Factores de Protecção da cárie dentária .....	19
IV Epidemiologia.....	19
V Cárie Dentária, abordagens terapêuticas e preventivas .....	20
5.1. Flúor .....	21
5.2. Gluconato de Clorexidina - CHX.....	22
5.2.1. Cuidados de Saúde Oral.....	24
VI Bactérias e Cárie Dentária .....	25
6.1 Factores de virulência do <i>Streptococcus mutans</i> e do <i>Streptococcus sobrinus</i> .....	26

## Vacina da Cárie Dentária

6.1.1 Adesão .....	26
6.1.1.1 Adesinas .....	26
6.1.1.2 GTFs .....	27
6.1.1.2.1 Glucanos .....	28
6.1.1.3 GBPs .....	29
6.1.2 Tolerância ácida .....	30
VII- Vacina da Cárie Dentária .....	31
7.1 Mecanismo de Acção .....	31
7.1.1 Produção de IgA salivar e IgG circulante .....	32
7.1.2 Resposta imunitária da mucosa oral .....	34
7.1.3 Janela de infecção .....	37
7.2 Antígenos candidatos .....	38
7.2.1 Fragmentos .....	38
7.2.1.1 Adesinas .....	39
7.2.1.2 GTFs .....	40
7.2.1.3 GBPs .....	41
7.2.2 Péptidos recombinantes .....	41
7.2.2.1 Enolase .....	42
7.2.3 DNA .....	44
7.3 Adjuvantes .....	45
7.3.1 Toxina da cólera .....	45
7.3.2 Outros .....	46
7.4 Vias de administração .....	46
7.4.1 Oral .....	47
7.4.1.1 Intranasal .....	48
7.4.1.2 Gengivo-salivar .....	48
7.4.2 Sistémica .....	49
7.4.3 Outras .....	51

7.4.3.1 Rectal e Amígdalas .....	51
7.5 Modelo Animal Experimental .....	51
7.5.1 Ratos .....	51
7.5.2 Primatas não humanos .....	52
7.5.3 Limitações do modelo animal .....	52
7.6 Reactividade Cruzada .....	53
7.7 Populações-alvo e Período de imunização .....	55
7.8 Perspectivas futuras .....	56
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>60</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Diagrama de Keys, citado por Melo <i>et al.</i> , 2008 .....	9
---	---

## **Siglas e Abreviaturas**

**Ag I / II** – Adesinas denominadas antígenos I / II ou Pac ou P1.

**Ag III** – Antígeno III ou antígeno A ou proteína WapA.

**APC** – Célula apresentadora de antígeno.

**C3b** - Fracção do sistema de complemento.

**C5b-C9** – Fracção final do sistema de complemento.

**Ca<sup>2+</sup>** - Cálcio.

**CAT** – Domínio catalítico.

**CHX** – Gluconato de clorexidina.

**CPOD** – Índice do número de dentes cariados, perdidos e obturado.

**CS** – Componente secretório.

**CT** – Tóxina da cólera.

**DEJ** – Junção Amelodentinária.

**DGS** – Direcção Geral de Saúde.

**F<sup>-</sup>** - Fluoreto.

**GALT** – “Gut-Associated Lymphoid Tissue”.

**GBPs** – “Glucan-Binding Proteins”.

**GLU** – Glucano.

*gtf* – Gene que codifica as GTFs.

**GTFs** – Glucosiltransferases.

**H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** - Ácido carbónico.

**H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>** - Di-hidrogenofosfato.

**H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>** -Hidrogenofosfato.

**HAp** – Hidroxiapatite.

**HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>** - Carbonato de hidrogénio.

**IgA** – Imunoglobulina A.

**IgG** – Imunoglobulina G.

**IgM** – Imunoglobulina M.

**IL-1** – Interleucina 1.

**NALT** – “Nasal-Associated Lymphoid Tissue”.

**OMS** – Organização Mundial de Saúde.

*pac* – gene que codifica a proteína Pac.

**Pcia-P** – Plasmídeo de DNA (região A-P do gene Pac).

**pGLUA-P** – Plasmídeo de DNA Pcia-P (modificado na região GLU).

**PO<sub>4</sub><sup>-</sup>** - Fosfato.

**PRP** – Glicoproteínas ricas em prolina.

**rEnolase** – Enolase recombinante.

**rPac** – Recombinante da proteína Pac.

**s-IgA** – Imunoglobulina A secretória.

**Spa-A / Pag** – Antígeno proteico de *S. sobrinus*.

**wapA** – Gene que codifica a proteína WapA.

## Introdução

A cárie dentária é encarada pela sociedade como uma doença comum do ser humano. Para os profissionais de saúde, a cárie dentária é um grave problema comunitário em que a presença de determinados factores de risco retiram o indivíduo da homeostasia e colocam em risco a sua saúde oral e a qualidade de vida (Smith, 2002; Melo *et al.*, 2008).

A cárie dentária é a doença mais prevalente do mundo que afecta, de modo geral, todo o indivíduo independentemente da sua idade, raça, género ou condição social (Pereira *et al.*, 2010; Melo *et al.*, 2008).

Considerando a sua natureza pandémica não é surpresa que o desenvolvimento de uma vacina contra a mesma tenha atraído tanto interesse de estudiosos e pesquisadores no mundo inteiro (Pinto *et al.*, 2005).

Apesar dos esforços de pesquisas laboratorial e clínica, dos materiais e das diversas áreas da medicina dentária, nenhum deles é eficaz o suficiente para eliminar a doença (Fontana *et al.*, 2010).

O tema escolhido refere o esforço das pesquisas por parte de estudos imunológicos e biomoleculares com o objectivo extinguir (ou, pelo menos, possibilitar alguma forma de intervenção imunológica preventiva) a doença dentária que até então é conhecida como insuperável e invencível (Pereira *et al.*, 2010).

No final da década 40 do século passado, a cárie dentária foi considerada uma doença infecciosa e transmissível, na década seguinte foram identificados os principais microorganismos responsáveis pela doença, os *Streptococcus* e os *Lactobacilos*. Na década de 80, foram identificados os mecanismos imunológicos da doença, e a partir daí, avanços significativos consideraram o impacto e o interesse na produção de uma vacina contra a cárie dentária, como medida de Saúde Pública (Pereira *et al.*, 2010).

O *S. mutans*, considerado o principal agente etiológico da cárie, tem despertado grande interesse de muitos pesquisadores em aumentar a imunidade à cárie por meio de vacinas (Bayona *et al.*, 1990).

Numa primeira parte, o presente trabalho propõe a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos que levam à cárie dentária, fundamental para uma melhor prevenção e intervenção atempada e eficaz.

De seguida, propõe uma revisão crítica de aspectos imunológicos relacionados à cárie dentária, destacando o estágio actual de desenvolvimento da vacina, considerando os seus mecanismos de acção e resposta imune do hospedeiro, a sua constituição, vias de administração, modelos experimentais, nível de eficácia e de riscos, população-alvo e perspectivas futuras. Tendo em conta a prevalência desta doença ser tão elevada, parece de extrema relevância a elaboração desta revisão.

## **Materiais e métodos**

Foi realizada uma pesquisa na base de dados da *National Library of Medicine PUBMed-Medline*, utilizando-se os termos de pesquisa “dental caries”, “vaccine”, “IgA”, “immunization”, “*Streptococcus mutans*”, “*Streptococcus sobrinus*”. A pesquisa foi feita sem qualquer tipo de restrição temporal.

Ao resultado da pesquisa foram aplicados os seguintes critérios de exclusão:

- Artigos que não estivessem escritos em inglês ou em português;
- Artigos que não iam de encontro ao assunto em questão.

Adicionalmente, foi incluída bibliografia de livros e revistas científicas que se encontravam na biblioteca da Universidade Fernando Pessoa e da Faculdade de Medicina Dentária do Porto. Foram também utilizados artigos que se encontravam descritos na bibliografia de alguns dos artigos que foram utilizados neste trabalho científico.

## DESENVOLVIMENTO

### I Cárie Dentária

#### 1. Definição

A cárie dentária é a destruição localizada de tecido dentário rígido com solução ácida de subprodutos de fermentação bacteriana de hidratos de carbono provenientes da dieta. Trata-se de uma doença crónica, infecciosa, complexa e de natureza multifactorial (Fontana *et al.*, 2010).

Apesar da definição de cárie associar-se à dissolução dos tecidos mineralizados do dente, isto é apenas uma face do processo carioso. Na verdade, o processo carioso apresenta uma dinâmica que, se desmineraliza o dente, também pode remineralizá-lo frente a condições específicas (Melo *et al.*, 2008; González, 2010).

O desenvolvimento da cárie ocorre, apenas, na presença de microorganismos na superfície dentária, contudo, a simples presença destes não é suficiente para a doença progredir. Factores como a higiene oral, hábitos alimentares, composição do próprio biofilme, composição e capacidade tampão da saliva, entre outros, influenciam o metabolismo das bactérias sobre os dentes (Anderson *et al.*, 2010).

Os dentes são colonizados por bactérias presentes no biofilme, cujo metabolismo provoca variações no pH. Caso a cavidade oral possua um valor de pH maior que 5,5, o dente ganhará  $\text{Ca}^{2+}$  (Cálcio) e  $\text{P}^+$  (Fósforo) do meio oral, processo conhecido como remineralização (favorecido pelos factores de protecção). Quando atinge um pH menor que 5,5 o dente perderá  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{P}^+$  para o meio oral. Esse fenómeno é chamado desmineralização (favorecido pelos factores de risco). Portanto, o processo carioso envolve naturalmente uma mudança no equilíbrio (Anderson *et al.*, 2010).

Os ácidos orgânicos presentes na placa bacteriana, provenientes do metabolismo bacteriano anaeróbio dos hidratos de carbono fermentáveis resultantes da dieta, levam a uma perda localizada de minerais (hidroxiapatite). Quando não tratada pode haver

progressão da doença e resultar na destruição dos tecidos duros do dente que, por sua vez, leva à infecção da polpa e tecidos de suporte, com graves sequelas (Anderson *et al.*, 2010).

A doença cárie não se instala a partir do momento em que há lesão visível clinicamente e sim muito antes disto. Assim, a actividade de cárie deve ser considerada elevada quando muitos factores cariogénicos estão presentes e em condições críticas. Desse modo, novas lesões cariosas podem ser realmente evitadas. Dentro dos novos conceitos de prevenção à doença cárie está o estabelecimento do prognóstico do aparecimento de “novas” lesões, associado ao risco do paciente desenvolver a doença (Adams, 1995).

## II Fisiopatologia da Cárie

Imediatamente após a erupção na cavidade oral, os dentes são colonizados por bactérias que criam condições que, em combinação com a saliva, modificam a composição das superfícies dos dentes, tornando-as mais resistentes à cárie dentária. Este processo tem sido chamado maturação do esmalte pós-eruptivo e é importante para o desenvolvimento da cárie dentária (Driessens *et al.*, 1985).

A superfície do esmalte pós-eruptivo é composta por grandes quantidades de água, carbonato de magnésio, entre outros elementos, e apresenta-se porosa. Depois de muitos períodos de desmineralização e remineralização, a composição química e a estrutura da superfície do esmalte torna-se mais amorfa; menos porosa; contém menos quantidade de água, carbonatos e magnésio, e tem maior quantidade de fluoreto e material orgânico (Driessens *et al.*, 1985).

Estas substituições na superfície do esmalte são benéficas para que a superfície do dente amadurecido apresente menor solubilidade e maior resistência aos desafios da cárie dentária. Espera-se que ocorra o mesmo processo de maturação nas superfícies expostas de raiz quando há exposição do cemento ou da dentina ao ambiente oral após recessão gengival. O cemento é perdido rapidamente como resultado de forças de desgaste, tal como, a escovagem. A dentina recente é altamente porosa e solúvel, quando exposta sofre desmineralização e ciclos de remineralização, criando assim uma superfície dentinária muito menos porosa contendo maior quantidade de minerais, particularmente

de cálcio, fosfato e flúor. Este aumento de tamanho do cristal e da concentração reduz significativamente a permeabilidade das superfícies das raízes, como acontece no esmalte (González, 2010).

Os cristais nas superfícies de esmalte e dentina / cimento abrangidos pelo biofilme são susceptíveis de continuarem a realizar trocas minerais mesmo quando cobertos por biofilme, pois este é capaz de criar condições de supersaturação ou de sub saturação relativamente aos cristais. A sub saturação ocorre principalmente em condições ácidas com a perda de fosfato que reagem com os iões de hidrogénio produzidos pela actividade metabólica dos biofilmes na presença de hidratos de carbono fermentáveis (Margolis *et al.*, 1993). Nestas condições, os minerais são libertos a partir de múltiplas fontes: saliva, bactérias, tártaro, e a superfície do dente em si. Após um período de tempo, a saturação no fluído da placa estabiliza e deixa de ocorrer perda mineral. Quando minerais suficientes (principalmente de cálcio e fosfato) estão disponíveis na solução que envolve o aumento dos níveis de cristal sua saturação retorna ao equilíbrio. Se o pH aumentar para um ponto que ocorram condições de supersaturação, nestas condições, a tendência da solução é a precipitação de minerais que permitam o retorno para condições de saturação (Margolis *et al.*, 1994). Durante o período de supersaturação, minerais podem remineralizar cristais de esmalte parcialmente desmineralizado. Portanto, embora o pH seja o determinante mais forte para o nível de saturação, levando a desmineralização ou remineralização sob condições clínicas, não é o único factor importante porque a saturação é significativamente afectada por outros factores, tais como a concentração de iões cálcio e fosfato e da força iónica total de fluído da placa. Este é clinicamente relevante, pois os pacientes com diminuição significativa no fluxo salivar apresentam dificuldade em fornecer minerais suficientes e exercer efeito tampão no fluído para manter os níveis de saturação adequados que contribuem para a integridade da superfície do dente (Anderson *et al.*, 2010).

## 2.1. Formação de cáries no esmalte

O esmalte é a maior superfície de risco para lesões de cárie e, portanto, tem recebido mais atenção (González, 2010).

Em condições cariogénicas, o aumento da resistência da superfície do dente não é suficiente para impedir a formação de uma lesão de cárie dentária. Quando a quantidade de minerais perdidos durante essas trocas é maior do que a quantidade de minerais adquiridos, devido a longos períodos de tempo, uma lesão de cárie começa a desenvolver-se na superfície do esmalte (González, 2010).

O aumento da rugosidade e da porosidade da superfície do dente permite o desenvolvimento de uma lesão subsuperficial, que é característica de lesões de cárie, que se distingue de outros tipos de desmineralização, tais como erosão dentária, que promove a perda de estrutura de esmalte (González, 2010).

Os cristais presentes no esmalte, quando expostos a condições de sub saturação, permitem que se desenvolva a lesão de cárie em dentina, sem rotura da superfície, e é, na maioria dos casos, livre de bactérias, porque as bactérias são de dimensões muito grandes para conseguirem penetrar os espaços de difusão de uma superfície aparentemente intacta. Superfícies mineralizadas são cobertas com material orgânico que restringe a troca iónica, limitando a taxa de desmineralização e remineralização, agindo como uma barreira de difusão para as trocas minerais. Além disso, é provável que se concentrem quantidades necessárias de iões de fluoreto nesses locais capazes de afectar significativamente os níveis de saturação. Portanto, a progressão da lesão não é apenas determinada pelo nível de sub saturação mas também pela capacidade dos iões se difundirem para dentro e para fora da lesão (Larsen *et al.*, 1989).

Grandes porções da lesão não cavitada podem ser remineralizadas caso o ciclo de saturação se desloque para condições favoráveis. É mais provável que ocorra em primeiro lugar a remineralização da superfície da lesão, levando ao bloqueio dos canais de comunicação que permitiram a desmineralização da subsuperfície da lesão. Esta dinâmica particular leva à formação de uma superfície remineralizada que é altamente resistente à desmineralização, formando uma lesão de subsuperfície parcialmente desmineralizada. Enquanto as condições de saturação nos biofilmes representativos dessas lesões não retrocederem à cariogenicidade, essas lesões não progridem (Iijima *et al.*, 1999).

A maioria das lesões de cárie desenvolve-se nas superfícies oclusais, mais especificamente na entrada de fissuras e fossas. Essas áreas são de maior risco de cárie por causa do seu acesso limitado salivar e tendência para acumular biofilme (González, 2010).

## 2.2. Formação de cáries na dentina

A dinâmica de desmineralização/remineralização na dentina é semelhante à do esmalte, mas com algumas características únicas. Os cristais dentinários são mais pequenos e mais reactivos do que no esmalte. A polpa reage aos estímulos intraorais mesmo quando o esmalte permanece intacto, por exemplo, em casos de trauma ou forças oclusais excessivas. O processo de cárie também provoca uma reacção pulpar que é expressa na mineralização do espaço intratubular, conhecida como esclerose dentinária. Durante as fases iniciais da formação da lesão, ocorre desmineralização da dentina intertubular e ocorre precipitação de alguns destes minerais nos lúmens dos túbulos dentinários na forma de cristais de hidroxiapatite, reduzindo a permeabilidade da dentina. Este processo é modulado pelo gradiente contínuo de fluído de pressão para o exterior proveniente da polpa dentária (Shellis, 1994).

A esclerose tubular, que se desenvolve antes da desmineralização do esmalte, caso abranja a junção amelodentinária (DEJ), é o primeiro sinal de reacção dentinária para o processo de cárie. Se a lesão continuar a progredir, a dentina peritubular, o local mais mineralizado, começa a desmineralizar, alargando a abertura dos túbulos dentinários e aumentando a deposição de dentina terciária em torno da polpa, protegendo-a contra danos. Tais processos ocorrem sem invasão directa de bactérias. Devido à sua capacidade de difusão facilmente ocorrem lesões, que progridem seguindo a direcção das hastes de esmalte e dos túbulos dentinários, que podem avançar para níveis significativos de desmineralização na dentina sem cavitação da superfície (Bjørndal *et al.*, 2001).

Nos casos em que apenas está presente uma pequena cavitação inicial dentinária, as condições estão criadas para o desenvolvimento rápido de uma lesão oculta (González, 2010).

### 2.3. Cavitação

A estrutura tridimensional de uma lesão não é capaz de suportar as tensões criadas por forças externas provenientes da mastigação e/ou da escovagem ocorrendo os colapsos de superfície, criando uma cavitação irreversível. A maioria das cavidades, especialmente nas fases iniciais, criam um ambiente protector para os biofilmes, criando um ambiente cariogénico. A difusão de ácidos a partir do biofilme continua através das vias de difusão anteriormente expandidas, e a espessura do biofilme reduz o potencial efeito remineralizante. Com a abertura das vias as bactérias são capazes de invadir profundamente os lúmens dentinários, aumentando a velocidade de progressão e a probabilidade de lesar a polpa. Após a invasão bacteriana, a destruição orgânica pode ser observada devido à acção proteolítica de enzimas bacterianas, principalmente, na matriz de colagénio, resultando num aumento do tamanho da cavidade e invasão de biofilme adicional (González, 2010; Fontana *et al.*, 2010).

### 2.4. Remineralização

A remineralização de lesões activas não cavitadas deve ser um resultado esperado de qualquer terapia da cárie (González, 2010).

Estudos clínicos demonstram que as lesões de cárie não cavitadas podem ser reparadas através do fornecimento de quantidades significativas de minerais a partir da saliva, em combinação com tratamentos ricos em flúor (González, 2010).

A remineralização necessita de cálcio e fosfato biodisponível e aumenta consideravelmente com a presença de fluoretos. O mecanismo de acção do fluoreto está intimamente ligado à sua capacidade remineralizadora, acelerando a maturação pós-eruptiva da estrutura do dente (Yamazaki, 2007).

## III Factores Etiológicos

Factores de risco de cárie são factores biológicos que contribuem para o nível de risco para o paciente ter novas lesões de cárie no futuro ou para o progresso de lesões

existentes. Estes, quando presentes e em condições críticas, contribuem para que a doença no dente se manifeste. Tais factores patológicos não somente dizem o que está fora de equilíbrio, mas também sugerem como o desequilíbrio pode ser corrigido (Young *et al.*, 2010).

O pesquisador Paul H. Keyes desenvolveu um diagrama (figura 1) que demonstra a natureza multifatorial da cárie. No seu diagrama observam-se três factores etiológicos que são essencialmente necessários para o desenvolvimento da doença - cárie dentária. Estes são denominados factores etiológicos primários, e são:

- (1) hospedeiro susceptível,
- (2) microbiota cariogénica,
- (3) substratos da dieta (Keys *cit. in* Melo *et al.*, 2008).

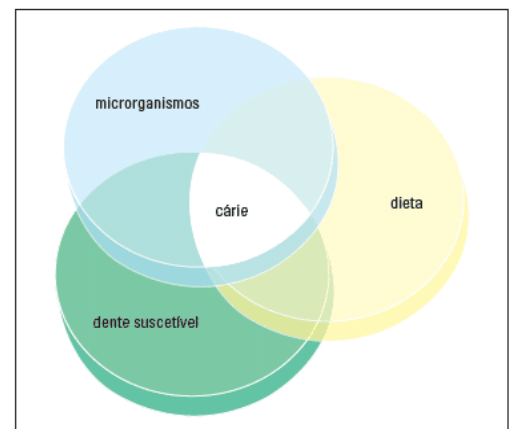


Figura 1: Diagrama de Keys , citado por Melo et al., 2008.

Uma vez que a cárie é resultado de um processo crónico em que os factores etiológicos primários necessitam de estar presentes e de interagir por um determinado período de tempo, Newbrun julgou conveniente acrescentar o “tempo” no diagrama de Keys, pois este é imprescindível para que ocorra a desmineralização progressiva do esmalte (Newbrun, 1983).

Os factores etiológicos secundários da cárie dentária são aqueles que, embora não essenciais para que a doença se inicie, podem favorecer a progressão e severidade da mesma, como por exemplo: higiene oral, fármacos, o estatuto socio-económico, a predisposição genética, doenças... Estes factores vão potenciar os factores etiológicos primários, assim, favorecem a proliferação e virulência da microbiota da placa bacteriana, aumentam a susceptibilidade do hospedeiro ou potencializam a cariogenicidade da dieta (Melo *et al.*, 2008).

### 3.1. Hospedeiro susceptível

No factor hospedeiro susceptível à cárie dentária é importante distinguir a susceptibilidade do indivíduo como um todo e a do próprio dente (Anderson *et al.*, 2010).

A susceptibilidade do indivíduo pode ser determinada por factores extrínsecos e intrínsecos. Os factores extrínsecos estão relacionados à estrutura sociocultural na qual o indivíduo está inserido. A susceptibilidade envolve essas diferenças culturais que interferem no comportamento do indivíduo com influência no controlo e na incidência da cárie dentária da sua população (Anderson *et al.*, 2010). Os factores intrínsecos (como o fluxo, composição e capacidade tampão da saliva, aspectos hereditários e imunológicos) indicam a susceptibilidade do dente à cárie, pois determinam a resposta mais importante do hospedeiro actuando contra a cárie (Larmas, 1992).

A susceptibilidade do dente à cárie dentária é determinada pelo grau de mineralização do esmalte, o que proporciona maior ou menor resistência à dissolução ácida, cuja mineralização também é influenciada por factores intrínsecos presentes aquando da formação do dente e os extrínsecos, que são factores ambientais e locais (Anderson *et al.*, 2010; Fontana *et al.*, 2010).

#### 3.1.1. Saliva

O processo de remineralização mediado pela saliva funciona como um sistema de defesa do organismo, reverte o processo de desmineralização, protegendo o esmalte (Fontana *et al.*, 2010).

A saliva é o principal veículo de solubilização e transporte de substâncias potencialmente prejudiciais, bem como de factores de protecção para o biofilme (Fontana *et al.*, 2010).

O fluxo e a composição salivar são bem reconhecidos como importantes factores do hospedeiro que modificam o processo da cárie dentária. O papel protector da saliva é

mediado pela sua capacidade para limpar substâncias alimentares cariogénicas da boca; diluir, neutralizar e ter efeito tampão contra os ácidos orgânicos formados por microorganismos do biofilme; reduzir a taxa de desmineralização e aumentar a remineralização fornecendo fosfato de cálcio e fluoreto na fase fluída do biofilme (Larmas, 1992).

Quanto maior for o fluxo salivar, maior será a disponibilidade de componentes orgânicos e inorgânicos de saliva. Os constituintes inorgânicos de interesse são: cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), fosfato ( $\text{PO}_4^-$ ), fluoreto ( $\text{F}^-$ ), ácido carbónico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) / carbonato de hidrogénio ( $\text{HCO}_3^-$ ) e di-hidrogenofosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) / hidrogenofosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) (Anderson *et al.*, 2010).

Estes iões estão associados com a manutenção da integridade dos dentes através da regulação dos processos de desmineralização / remineralização e a capacidade tampão da saliva. Embora os benefícios do fosfato de cálcio e do fluoreto terem sido bem estabelecidos, a influência da capacidade tampão salivar na prevenção de cáries não está bem definida e por vezes tem sido posta em causa. No entanto, tem sido relatado que a concentração de carbonato de hidrogénio, o componente principal de tampão da saliva, aumenta cerca de doze vezes quando não ocorre estimulação salivar. Portanto, a capacidade tampão salivar contribui na redução da desmineralização do esmalte, embora o seu efeito pode, por vezes, ser interrompido por determinados factores de risco (Fontana *et al.*, 2010).

A saliva forma uma película fina, película aderida, que interage com as substâncias presentes sobre os dentes e/ou superfícies da mucosa com a finalidade que estas sejam removidas da cavidade oral por deglutição (Anderson *et al.*, 2010).

Se o aumento de fluxo salivar é benéfico na prevenção de cáries, a perda de função salivar mostra ser prejudicial e pode ser associada com o desenvolvimento de lesões de cárie rampantes (Anderson *et al.*, 2010).

A fase orgânica da saliva contém agentes antimicrobianos, tais como a imunoglobulina A (IgA), lisozima, lactoferrina, e peroxidases que podem ser relacionadas com a cárie.

A lisozima tem uma acção bactericida por perturbar as paredes celulares bacterianas. A lactoferrina (liga de ferro), interfere com o crescimento bacteriano através de mecanismos ferro-dependentes e independentes. A lactoperoxidase pode oxidar bactérias, inibindo o metabolismo da glicose. Esta peroxidase protege glicoproteínas salivares da degradação bacteriana. A IgA pode reagir com *Streptococcus mutans* e, conseqüentemente, prevenir a cárie dentária (Lamont *et al.*, 2006).

A fase orgânica da saliva também é constituída por proteínas, tais como as estaterinas, glicoproteínas ricas em prolina (PRP), histatinas e cistatinas, têm uma elevada afinidade às superfícies de esmalte e estão envolvidas com a manutenção da integridade do dente, favorecendo um ambiente rico em iões fosfato e cálcio. Assim, pode-se concluir que o estado de supersaturação de tais proteínas salivares em relação ao dente favorece o processo de remineralização (Smith, 2002).

#### 3.1.1.1. Película aderida/adquirida

A película adquirida é uma fina camada acelular livre de bactérias que se deposita sobre os dentes, ocupando uma posição crítica entre a superfície do esmalte e biofilme dentário. A película é formada principalmente pelas proteínas salivares a partir de fontes diferentes, incluindo saliva, componentes bacterianos e/ou seus produtos, fluído crevicular gengival, alimentos e fluído do esmalte. Estes componentes orgânicos seleccionados apresentam uma elevada afinidade com a superfície do esmalte e rapidamente são adsorvidos à superfície do esmalte higienizada (após a escovagem com dentífrico, a dissolução química ou profilaxia). O processo de formação da película envolve dois passos. Inicialmente, há adsorção de proteínas para as regiões hidrofóbicas do dente por interacções electrostáticas, deixando as partes hidrofóbicas das moléculas da proteína expostas, permitindo que agregados proteicos possam adsorver a sítios descobertos na superfície do dente e também interagir com a camada de proteínas inicialmente formada (Anderson *et al.*, 2010).

Esta camada orgânica apresenta-se nas superfícies dentárias logo após alguns minutos de exposição ao ambiente oral. Também é detectável a actividade enzimática em fases iniciais da formação de película (Anderson *et al.*, 2010).

Se a película aderida continuar a progredir pode atingir a sua espessura total em duas horas. Este processo de maturação modifica as características da película como uma barreira de difusão para a condutividade iónica sobre a superfície do esmalte. A actividade da enzima transglutaminase promove uma remodelação estrutural da película adquirida durante o processo de maturação, que parece ser importante para a estabilização e origina uma película mais resistente ao ácido. Factores extraorais podem ainda modificar a formação da película. O uso regular de dentífrícios abrasivos, produtos de branqueamento, a ingestão de bebidas e alimentos ácidos e o desgaste dentário podem inibir a formação e a maturação da película. Tal acontecimento pode aumentar a susceptibilidade do esmalte à erosão dentária e modificar a susceptibilidade à cárie de uma superfície do dente (Anderson *et al.*, 2010; González, 2010).

De modo similar à saliva, a película aderida do esmalte é constituída por proteínas, como albumina, mucina, PRP ácidas e cistatinas que contribuem significativamente na protecção do esmalte contra a desmineralização induzida por ácidos. A película aderida pode actuar não só como uma barreira física, impedindo a difusão do ácido, mas também como um reservatório remineralizante de electrólitos ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{F}^-$ ) (Anderson *et al.*, 2010; Lamont *et al.*, 2006).

A espessura da película adquirida de esmalte é compreendida entre 0,1 e 1,0  $\mu\text{m}$ . Para além da protecção contra a desmineralização acídica, a película serve como um lubrificante que circula livremente entre os dentes, tecidos moles e outras estruturas (Anderson *et al.*, 2010).

Além disso, a película fornece uma base para o posterior desenvolvimento do biofilme dentário. As primeiras bactérias a colonizar a película aderida são provenientes da saliva. Assim sendo, estaterinas e PRP parecem ter papéis activos, devido aos seus receptores que permitem a adesão dos microorganismos às suas superfícies (Flemming *et al.*, 2010).

### 3.1.2. Dente

A susceptibilidade do hospedeiro envolve as seguintes características dentárias: a localização, a morfologia, a composição, a ultraestrutura e a idade pós-eruptiva do dente. O esmalte é composto principalmente por material inorgânico, na forma de hidroxiapatite (HAp), quimicamente representado por  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_2(\text{OH})_2$ , e por componentes orgânicos. Alguns dos iões HAp podem ser substituídos, o que afectará a estabilidade e solubilidade dos cristais que compõem esmalte face aos ácidos. Dependendo das substituições, o mineral final, que compõe o esmalte e a dentina, pode ser mais ou menos solúvel em ácidos do que a composição inicial (Anderson *et al.*, 2010; González, 2010).

Ultraestruturalmente, a solubilidade de um dente ao ácido pode ser afectada pelo tamanho do cristal, forma e a proximidade dos cristais. As diferenças de composição mineral irão determinar a estabilidade dos cristais que formam a estrutura do esmalte. Quanto mais estáveis forem os cristais, menos solúveis serão. A fluorapatite (substituição de  $\text{OH}^-$  por iões  $\text{F}^-$ ) é uma forma altamente estável, o que explica a sua baixa solubilidade. A substituição de iões  $\text{PO}_4^{3-}$  por carbonato, por outro lado, torna o esmalte menos estável, ou seja, mais susceptível à desmineralização (Fontana *et al.*, 2010).

Outros elementos presentes no fluído fisiológico, durante o desenvolvimento do esmalte, também podem ser incorporados no esmalte. Foram identificados no esmalte mais de 40 oligoelementos. Tais elementos vestigiais podem ser incorporados no esmalte de várias maneiras: trocas iónicas na camada de hidratação, que é a camada de água adjacente ao cristal; absorção directa sobre a superfície do cristal e substituição com componentes do cristal de tamanho e carga semelhante (ie.  $\text{F}^-$  para  $\text{OH}^-$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  para o  $\text{Ca}^{2+}$ , e  $\text{CO}_3^{2-}$  para  $\text{PO}_4^{3-}$ ) (Anderson *et al.*, 2010).

O esmalte tem as propriedades de um material microporoso. Os espaços preenchidos por água entre os cristais servem como canais de difusão em que os ácidos se podem difundir para atacar os cristais. Quanto mais próximos os cristais estiverem, menor o

espaço existente para a difusão de água, logo menor será a solubilidade do esmalte (Anderson *et al.*, 2010).

Outro aspecto a ser considerado é o ambiente dinâmico criado pela interação entre a superfície do esmalte e do biofilme. Após a erupção na cavidade oral, a superfície do esmalte é submetido a um processo de maturação. Tal processo envolve repetidos episódios de desmineralização e remineralização, que ao longo do tempo torna o esmalte mais resistente ao ácido. Por conseguinte, a susceptibilidade da superfície do esmalte à cárie dentária é maior imediatamente após a erupção e tende a diminuir com a idade, visto que as superfícies de esmalte continuam a reagir com o ambiente oral (Flemming *et al.*, 2010).

Em primeiro lugar, os ácidos provenientes do biofilme atacam o mais solúvel, apatite carbonatada, deixando a fase mineral, pois esta é menos solúvel. Ao longo do tempo, o esmalte parcialmente desmineralizado é remineralizado com apatite inferior em carbonato e superior em fluoreto, que é menos solúvel. Além disso, o material orgânico é depositado em espaços vazios criados pela desmineralização, que tem um papel protector (González, 2010).

A dentina é relativamente mais solúvel do que o esmalte, apresentando um valor de pH crítico de 6,2 a 6,7 que aumenta a susceptibilidade de lesão e progresso da cárie dentária (Anderson *et al.*, 2010).

### 3.2. Dieta

A cariogenicidade da dieta é determinada pela presença de hidratos de carbono, que posteriormente servirão de substrato a partir do qual os microorganismos da cavidade oral irão sintetizar polissacarídeos extracelulares com um importante papel na formação da placa bacteriana e, também, na produção de ácidos orgânicos que promovem a desmineralização do dente (Burt *et al.*, 1988).

Os hidratos de carbono podem ser simples ou complexos. Açúcares complexos (amido) são considerados menos cariogénicos porque os amidos não são facilmente solúveis nos

fluídos orais e têm uma taxa de difusão baixa no biofilme. Eles degradam-se, pela acção da amílase salivar, em maltose para que posteriormente bactérias do biofilme possam metabolizá-los, no entanto, a maior parte do amido é eliminado da cavidade oral antes de ser degradado. Açúcares simples (sacarose, glicose, frutose) são mais cariogénicos, sobretudo a sacarose, que representa um factor determinante da doença cárie dentária, pois é a principal fonte de açúcar na dieta (Anderson *et al.*, 2010).

As propriedades cariogénicas da sacarose podem ser explicadas por dois processos. Em primeiro lugar, a sacarose difunde-se livremente na placa dentária e rapidamente é metabolizada pelas bactérias, em que estas, por sua vez, produzem ácidos orgânicos em concentração suficiente para baixar o pH da placa dentária permitindo que ocorra desmineralização do esmalte. Num segundo passo, a sacarose está envolvida na síntese de glucanos extracelulares solúveis e insolúveis. As enzimas responsáveis pela síntese de glucanos extracelulares e frutanos (glucosiltransferases e frutosiltransferases, respectivamente) têm uma elevada afinidade para a sacarose. Embora o primeiro passo seja partilhado entre açúcares simples, o segundo relaciona-se especificamente com a sacarose (Anderson *et al.*, 2010).

A síntese de polissacarídeos extracelulares pode favorecer o acúmulo de *S. mutans* e outras bactérias cariogénicas no biofilme dentário. Isto decorre de uma alteração das propriedades de difusão de placa devido à presença de material insolúvel em água, ou seja, a matriz extracelular (glucano) sintetizada a partir de sacarose. A matriz extracelular permite uma maior penetração de hidratos de carbono para a camada mais profunda do biofilme adjacente à superfície dentária, o que, do ponto de vista lesão de cárie, é a única camada com valor (Smith, 2002).

A desmineralização que ocorre após a ingestão de qualquer dieta cariogénica dá-se durante um tempo determinado, até que a capacidade tampão e acção remineralizadora da saliva imobilize o processo, não resultando imediatamente numa lesão de cárie, mas numa simples desmineralização reversível (Melo *et al.*, 2008).

Não se pode negar o importante papel que os alimentos têm na etiologia da cárie dentária, sendo indispensável a necessidade da sua participação, mas como um factor participativo e não determinante (Anderson *et al.*, 2010).

A interacção dos três factores etiológicos primários mencionados anteriormente é sem dúvida inevitável. No entanto, essa interacção é determinante na formação da placa bacteriana e não da lesão cárie dentária e que ocorre mesmo em condições naturais (Melo *et al.*, 2008).

Se o intervalo de tempo de “controlo periódico” de placa (período de tempo entre um controlo de placa e outro) for insuficiente ou a ingestão de dieta cariogénica for mais frequente, podem surgir desmineralizações irreversíveis (Anderson *et al.*, 2010).

Assim, se o desequilíbrio continuar por mais tempo, devido a um “controlo periódico” com um intervalo de tempo maior ou por ausência de controlo e dieta cariogénica frequente, poderá ocorrer progressão chegando a nível clínico, com lesões de esmalte, apresentando sinais, determinando uma lesão de cárie dentária. Nesta etapa, deve-se considerar uma lesão de cárie incipiente, lesão de “mancha branca” (Anderson *et al.*, 2010; Melo *et al.*, 2008).

Dependendo da frequência de dieta cariogénica e do estabelecimento do controlo mecânico periódico de placa, que permita à saliva exercer o seu potencial remineralizador, mantendo o equilíbrio, o tempo para ocorrer uma lesão de cárie pode ser indeterminado (Anderson *et al.*, 2010).

Quanto maior a frequência de dieta cariogénica e maior o intervalo de tempo sem controlo de placa, maior a probabilidade de ocorrer cavitação do esmalte e de surgir uma lesão de cárie avançada (Anderson *et al.*, 2010).

### 3.3. Bactérias

A participação das bactérias produtoras de ácido é inquestionável para que se estabeleça a lesão de cárie. Em princípio, qualquer bactéria da cavidade oral tem a capacidade de

converter açúcares em ácidos, apresentando potencial cariogénico. Aqui, destacam-se o *Streptococcus sobrinus* pertencentes ao grupo Mutans e também o *Lactobacillus*. No entanto, os *Streptococcus mutans* são particularmente eficazes graças à sua capacidade de sobreviver e de produzir biofilmes no meio ácido que originam (Flemming *et al.*, 2010).

Sendo assim, deve-se considerar o microorganismo como o principal agente etiológico da cárie dentária, embora participativo na etiologia da cárie e não determinante, visto que a sua simples presença na cavidade oral nem sempre leva ao desenvolvimento da cárie. Estudos realizados mostraram que o *S. Mutans* foi encontrado não somente em populações com moderada ou alta prevalência de cárie, mas também em populações que têm baixa ou nenhuma experiência com a cárie dentária. Esta aparente discrepância pode ser explicada por factores de virulência da bactéria. (Flemming *et al.*, 2010)

Tal conjunto de factores de virulência proporciona a capacidade de se aderir e de colonizar o biofilme dentário, aumentando a sua proporção na placa bacteriana; além disso, produz e tolera grandes quantidades de ácidos (Nogueira *et al.*, 2008). Os principais factores de virulência do *S. mutans* são descritos no capítulo VI.

### 3.3.1. *Streptococcus mutans*

Após a descoberta por Clarke em 1924, o *S. mutans* permaneceu cerca de 35 anos praticamente ignorado, até que em 1960 foi “redescoberto” por Fitzgerald e Keyes. A partir daí a sua correlação com a doença cárie tem sido extensivamente estudada, indicando ser esta bactéria o principal agente etiológico da cárie dentária, pois é a espécie mais prevalente, com capacidade de iniciar a doença (Lamont *et al.*, 2006).

São bactérias Gram-positivas, do grupo Viridans, com morfologia de cocos, catálase-negativas. Pertencem ao grupo de Estreptococos do tipo *Mutans*, que inclui outras espécies como *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus rattis*, *Streptococcus cricetti*, *Streptococcus ferus*, *Streptococcus macacae*, *Streptococcus downei* e *Streptococcus orisratti*. Dentre estes, *S. sobrinus* contribui com a progressão das cáries iniciadas por *S. mutans* (Kohler *et al.*, 2003).

Os *S. mutans* são anaeróbios facultativos capazes de metabolizar uma grande variedade de açúcares, incluindo glicose, lactose, sacarose, trealose, maltose, manitol, sorbitol, rafinol e melobiose (Coykendall, 1989).

#### 3.4. Factores de Protecção da cárie dentária

Os factores de protecção são factores biológicos ou terapêuticos que podem compensar colectivamente o desafio patológico apresentado pelos referidos factores de risco de cárie. A intensidade dos factores de protecção é directamente proporcional à facilidade de se conseguir manter o paciente em equilíbrio, bem como a de inverter o processo de cárie (Fontana *et al.*, 2010).

A seguinte lista refere exemplos de alguns factores que são conhecidos por serem altamente protectores.

- Saliva e selantes;
- Antibacterianos;
- Fluoretos;
- Hábitos da dieta saudáveis.

Qualquer um destes factores de protecção pode contribuir para manter o paciente "em equilíbrio" e para aumentar a remineralização, que é o processo de reparação natural da lesão precoce de cárie dentária (Young *et al.*, 2010).

## **IV Epidemiologia**

De todas as doenças orais, a cárie é a mais frequente em todos os grupos etários bem como a principal causa de perda de peças dentárias. Para a quantificação da doença cárie dentária pode-se utilizar o índice CPOD que regista o número de dentes cariados, perdidos e obturados observados num determinado momento, reportando assim a história da doença da pessoa observada, ou seja, da sua experiência de cárie (Areias *et al.*, 2010).

Estima-se que a cárie dentária afecte 60-90% das crianças em idade escolar e a maior parte dos adultos, uma vez que é uma doença cumulativa. Face a estes dados, e de acordo com o relatório da OMS de 2003, a cárie dentária continua a ser um grave problema de saúde pública na maior parte dos países industrializados (Petersen *et al.*, 2004).

Também segundo dados da OMS, no ano 2000, 68% dos 184 países analisados apresentava, um índice CPOD inferior a 3 aos 12 anos de idade (Petersen *et al.*, 2004).

Os dados disponíveis apontam para a existência de níveis de doença entre a população portuguesa estando colocados entre países com moderada prevalência da doença (Melo *et al.*, 2008).

“Segundo o Programa Nacional de Promoção da Saúde Oral, publicado no Diário da República no dia 05 de Janeiro de 2005, em Portugal ... o número de dentes cariados, perdidos e obturados por criança (índice CPOD) aos 12 anos de idade é de 2,95, e a percentagem de crianças livres de cárie dentária aos 6 anos é de 33%.

Tais valores são compatíveis com os divulgados pela OMS, para a região Europeia (CPOD =3).

O mesmo programa identifica a meta a atingir definida pela OMS (...no ano 2020, pelo menos 80% das crianças com 6 anos estejam livres de cárie e, aos 12 anos o CPOD não ultrapasse o valor de 1,5) e estabelece como estratégias a promoção da saúde oral, no contexto familiar e escolar, a prevenção das doenças orais, o diagnóstico precoce e o tratamento adequado. A Direcção Nacional de Saúde, em Fevereiro de 2008, divulgou dados onde se avalia os resultados desta intervenção na população: 49% das crianças de seis anos tinham cárie dentária e o índice CPOD aos 12 anos era de 1,48.” (Diário da República; DGS *cit. in* Pereira *et al.*, 2010)

## **V Cárie Dentária, abordagens terapêuticas e preventivas**

O somatório dos elementos anamnese, exame clínico, exames complementares, além do raciocínio, leva a um diagnóstico completo. O diagnóstico precoce é de extrema importância dentro da responsabilidade profissional, superada apenas pela responsabilidade preventiva, que deve ser o primeiro objectivo da Medicina Dentária.

Um método de diagnóstico ideal deve ser confiável, capaz de detectar lesões iniciais de cárie, diferenciar as lesões reversíveis das irreversíveis e permitir que a informação obtida seja documentada (Filestone *et al.*, 1998).

Ao ser planeado o tratamento da cárie dentária, o médico dentista deverá saber qual a decisão mais apropriada: tentar impedir a progressão da lesão, proceder à sua remoção e, de seguida, restaurar a cavidade ou extrair o dente. Caso seja escolhida a abordagem restauradora, então deverá ser realizada uma análise quanto à extensão do procedimento operatório e o tempo que será necessário. Seja qual for o tratamento escolhido deverá considerar-se se este constitui a maneira mais apropriada de controlar a doença, daí a importância de determinar a presença de factores de risco que possam favorecer o estabelecimento e a progressão da cárie (Melo *et al.*, 2008; Twetman, 2010).

Desde o desenvolvimento de produtos de higiene oral de acção mecânica (escovas e fios) e química (pastas e colutórios) até à aplicação de métodos de prevenção populacional (fluoretação da água e do sal), os métodos preventivos sempre visaram um único propósito: a placa bacteriana (Twetman, 2010).

### 5.1. Flúor

“A evidência científica tem demonstrado que as mudanças observadas no padrão da doença cárie dentária ocorrem pela implementação de programas preventivos e terapêuticos de âmbito comunitário e por estratégias de acção específicas, dirigidas a grupos de risco, com criteriosa utilização dos fluoretos.

O flúor é o elemento mais electronegativo da tabela periódica, e raramente existe isolado sendo, por isso, habitualmente referido como fluoreto. Na natureza encontra-se sob a forma de um ião ( $F^-$ ), em associação com o cálcio, fósforo, alumínio e certos silicatos” (Diegues, 2003).

“O flúor tem uma grande afinidade com a apatite presente no organismo, com a qual cria ligações fortes, que não são irreversíveis. Este facto deve-se à facilidade com que os radicais hidroxilos da hidroxiapatite, são substituídos pelos iões flúor, formando fluorapatite. No entanto, a apatite normal do ser humano, presente no osso e dente, mesmo em condições ideais de presença de flúor, nunca se aproxima da composição da fluorapatite pura.

Quando o flúor é ingerido, passa pela cavidade oral, daí resultando a deposição de uma determinada quantidade nos tecidos e líquidos aí existentes. A mucosa jugal, as gengivas, a placa bacteriana, os dentes e a saliva vão beneficiar imediatamente de um aporte directo de flúor, que pode permitir que a sua disponibilidade na cavidade oral se prolongue por períodos mais longos. É um facto que a presença de flúor no meio oral, independentemente da sua fonte, resulta numa acção preventiva e terapêutica extremamente importante.

Considera-se actualmente que os benefícios dos fluoretos resultam basicamente da sua acção tópica sobre a superfície do dente, enquanto a sua acção sistémica (pré-eruptiva) é muito menos importante. A acção preventiva e terapêutica dos fluoretos é conseguida predominantemente pela sua acção tópica, quer nas crianças quer nos adultos, através de três mecanismos diferentes, responsáveis pela: inibição do processo de desmineralização, potenciação do processo de remineralização e inibição da acção da placa bacteriana.

Com base na evidência científica, a estratégia de utilização dos fluoretos em saúde oral foi redefinida, tendo em conta que a sua acção preventiva é predominantemente pós-eruptiva e tópica, e a sua acção tóxica, com repercussões a nível dentário, é pré-eruptiva e sistémica“ (AFSPS, 2002).

“O flúor tem comprovada importância na redução da prevalência e gravidade da cárie devido aos seus efeitos inibidores do metabolismo bacteriano. A estratégia da sua utilização em saúde oral foi redefinida com base em novas evidências científicas. Actualmente, considera-se que a sua acção preventiva e terapêutica é tópica e pós-eruptiva e que, para se obter este efeito tópico, o dentífrico fluoretado constitui a opção consensual ” (DGS, 2000).

## 5.2. Gluconato de Clorexidina - CHX

A clorexidina é eficaz contra uma enorme variedade de organismos gram-negativos e gram-positivos, aeróbios, anaeróbios facultativos e leveduras, devido à sua acção bactericida (Twetman, 2010).

As suas características particulares capacitam a clorexidina de poder ser muito bem utilizada como agente anti-bacteriano, como a afinidade por *S. Mutans* e a substantividade, que é a capacidade da clorexidina adsorver às superfícies orais e depois ser libertada lentamente na sua forma activa. A clorexidina destaca-se como um anti-séptico relativamente seguro e altamente eficaz na redução de placa bacteriana (Emilson, 1994).

Encontra-se disponível em diversas formas como soluções para bochecho (concentrações de 0,12 a 0,2%), em géis (concentração de 1%) ou sob a forma de verniz (concentração de 10%) (Twetman, 2010).

A utilização de clorexidina em soluções de bochecho tem demonstrado efeito moderado no que diz respeito ao controlo de microbiota cariogénica (Emilson, 1994). O bochecho com CHX a 0,2% pode reduzir imediatamente a população bacteriana presente em placa bacteriana e saliva até 80% (Twetman, 2010). A aplicação de clorexidina sob a forma de verniz não demonstrou efeitos significativos na colonização dos dentes. Os melhores resultados são obtidos com o uso de clorexidina em gel. Aplicações de clorexidina em gel quatro vezes por ano, após profilaxia profissional, podem promover uma redução significativa na incidência de cárie em adultos (Emmilson, 1994).

Em crianças jovens já infectadas, é possível aplicar este gel através da sua escovagem duas vezes por dia durante catorze dias (Twetman *et al.*, 1999).

Estudos demonstram que a sua utilização de bochecho a longo prazo não parece conferir quaisquer alterações significativas na resistência bacteriana ou crescimento excessivo de organismos potencialmente oportunistas. O número de bactérias alvo em placa, tais como *Streptococcus mutans*, sempre retorna à linha de base dentro de semanas após a descontinuação do tratamento (Twetman, 2010).

O uso de clorexidina é indicado para pacientes com cáries rampantes, alta actividade de cárie e alto número de *S. mutans*, além de situações onde o fluxo salivar esteja reduzido. Porém, os efeitos colaterais, devido ao seu uso excessivo por longos períodos, são: pigmentação dos tecidos orais e das restaurações de resina composta, gosto amargo e alteração do paladar, assim como descamações e sensibilidade da mucosa oral, podem comprometer a pré-disposição do paciente a esse tipo de tratamento (Rimmer *et al.*, 1990).

### 5.2.1. Cuidados de Saúde Oral

“Do nascimento aos 3 anos de idade: Após a erupção do primeiro dente, a higienização deve começar a ser feita pelos pais, duas vezes por dia, utilizando uma gaze, uma dedeira ou uma escova macia, com um dentífrico fluoretado com 1000-1500 ppm (mg/l) de fluoreto, sendo uma das vezes, obrigatoriamente, após a última refeição. A quantidade de dentífrico a utilizar deve ser idêntica ao tamanho da unha do 5º dedo da mão, da própria criança (dedo mindinho). Nesta fase, pode permitir-se que, progressivamente, e sob vigilância, a criança comece a iniciar-se na escovagem dos dentes.

Não se recomenda qualquer tipo de suplemento sistémico com fluoretos.

Aos pais das crianças com menos de 3 anos deverá também ser fornecida informação sobre alimentação, factores de cariogenicidade e a importância de prevenir as cáries precoces da infância.

Dos 3 aos 6 anos: A escovagem dos dentes, com um dentífrico fluoretado com 1000-1500 ppm (mg/l) deve continuar a ser realizada ou supervisionada pelos pais, dependendo da destreza manual da criança, pelo menos duas vezes por dia, sendo uma delas, obrigatoriamente, antes de deitar. A quantidade de dentífrico a utilizar deve ser mínima, isto é, idêntica ao tamanho da unha do 5º dedo da mão da própria criança, tal como se disse anteriormente” (Nunes *et al.*, 2001).

“Não se recomenda qualquer tipo de suplemento sistémico com fluoretos, à excepção das crianças de alto risco à cárie dentária.

Por volta dos 6 anos começam a erupcionar os primeiros molares permanentes. Pela sua própria morfologia, imaturidade e dificuldade na remoção da placa bacteriana das suas fissuras e fossetas, estes dentes são mais vulneráveis à cárie. Por isso, exigem uma atenção particular durante a erupção e uma técnica específica de escovagem.

A partir dos 6 anos de idade: a escovagem dos dentes já deverá ser efectuada pela criança, utilizando um dentífrico fluoretado, idêntico ao usado pelos adultos, portanto, com um teor de fluoreto entre 1000 e 1500 ppm (mg/l), numa quantidade aproximada de um (1) centímetro.

A escovagem dentária deverá ser efectuada duas vezes por dia, sendo uma delas, obrigatoriamente, antes de deitar” (Romante, 2003).

“A partir do momento em que a criança apresenta um dente com uma lesão de cárie dentária, passa a exigir medidas preventivas e terapêuticas específicas. Após o tratamento da lesão de cárie essa criança é incluída num grupo que, do ponto de vista preventivo exigirá maior atenção e acompanhamento.

A protecção dos dentes, em crianças com alto risco à cárie dentária, consiste na execução de uma ou mais medidas:

- Aplicação de selantes de fissura;
- Suplemento de fluoretos: um (1) comprimido diário de 0,25 mg, que deve ser dissolvido lentamente na boca, à noite antes de deitar;
- Verniz de flúor ou de clorohexidina.

A estratégia preventiva e terapêutica do programa complementam-se com a avaliação do risco individual de cárie dentária. “

A avaliação é feita a partir da conjugação dos seguintes factores de risco: evidência clínica de doença, análise dos hábitos alimentares, controlo da placa bacteriana, nível socioeconómico da família e história clínica da criança” (SIGN, 2000).

## **VI Bactérias e Cárie Dentária**

Os factores de virulência podem ser definidos como as características que tornam um microorganismo patogénico. Assim, o estudo dos factores de virulência de bactérias cariogénicas tem contribuído para a compreensão dos mecanismos moleculares da patogenia da cárie. Somente conhecendo estes mecanismos é que poderemos definir estratégias para o controlo efectivo da cárie dentária. Os principais microorganismos relacionados com o desenvolvimento de lesões cariosas e, conseqüentemente, os mais pesquisados em relação à formulação de uma vacina anti-cárie são os *Streptococcus mutans* e os *Streptococcus sobrinus* (Pinto *et al.*, 2005).

O tropismo do *S. mutans* e do *S. sobrinus* pela superfície dentária relaciona-se com a presença de determinados componentes bacterianos, que, apesar de vulneráveis aos anticorpos salivares, tornam estas bactérias altamente cariogénicas (Hajishengallis *et al.*, 1999).

## 6.1 Factores de virulência do *Streptococcus mutans* e do *Streptococcus sobrinus*

É necessário salientar que além dos factores de virulência mencionados neste capítulo ainda há outros, mas apenas irão ser focados aqueles que realmente mostram ter importância para o desenvolvimento da vacina da cárie e que, até mesmo, já foram utilizados em estudos, que posteriormente serão referidos.

### 6.1.1 Adesão

#### 6.1.1.1 Adesinas

A infecção bacteriana inicia-se com a adesão da bactéria ao dente, processo este que resulta da interacção com adesinas específicas presentes na parede celular bacteriana (Smith, 2003).

As adesinas de superfície do *S. mutans* que mais se destacam são os antigénios I / II (AgI/II), proteína Pac ou P1, e o antigénio III (Ag III), também denominado de antigénio A ou proteína WapA (Koga *et al.*, 2002; Pinto *et al.*, 2005; Smith, 2002).

Os Ag I / II do *S. mutans* possuem, aproximadamente, 1600 resíduos de comprimento e contem domínios de repetição ricos em alanina, na região N-terminal, e em prolina, no centro, estando ambos os resíduos envolvidos na interacção com os componentes salivares (Crowley *et al.*, 1993 *cit.in* Smith 2002).

O Ag I/II possui uma estrutura fibrilar e reveste os *S. mutans*, permitindo a sua ligação à película salivar disposta sobre a superfície dentária (Wright *et al.*, 2002).

Koga e colaboradores destacam a associação da inactivação do gene *wapA* com a diminuição significativa da agregação de *S.mutans* e da ligação deste microorganismo às superfícies lisas, resultando, conseqüentemente, no impedimento da acumulação do biofilme bacteriano (Koga *et al.*, 2002).

O *S. sobrinus* possui uma superfície de elevado peso molecular da proteína Pag ou Spa-A, que, serologicamente, apresenta reacção cruzada com a Pac de *S. mutans* (Brandy *et al. cit. in* Koga *et al.* 2002).

Estudos experimentais *in vitro* revelam que estirpes de *S. mutans* deficientes em Pac não conseguem aderir ao dente na presença de saliva, em comparação com as estirpes normais; no que refere à hidrofobicidade celular das estirpes, estas também apresentam valores baixos. Estes resultados sugerem que a Pac participa na interacção hidrofóbica entre o *S. mutans* e a superfície dentária (Oho *et al.*, 1998).

Vários componentes salivares, tais como a imunoglobulina A secretória (sIgA), beta2-microglobulina, histidina rica em polipéptidos, glicoproteína, lisozima, lactoferrina, e glicoproteínas de elevada massa molecular, podem bloquear as adesinas de *S. mutans* e/ou induzir a sua aglutinação (Koga *et al.*, 2002).

#### 6.1.1.2 GTFs

Os *S. mutans* e os *S. sobrinus* produzem as glucosiltransferases (GTFs). As GTFs são enzimas extracelulares capazes de realizar a hidrólise dos hidratos de carbono (Arosa *et al.*, 2007).

Os *S. mutans* produzem três tipos de GTFs:

- GTF-I: Catalisa a síntese de glucanos insolúveis em água, também denominados de mutanos.
- GTF-SI: Catalisa a síntese de glucanos insolúveis em água e solúveis em água.
- GTF-S: Catalisa a síntese de glucanos solúveis em água, também chamados de dextranos (Luo, 1988, *cit. in* Shivakumar *et al.* 2009; Koga *et al.*, 2002).

Os genes que codificam GTF-I, GTF-SI, e GTF-S são chamados de *gtfB*, *gtfC*, e *gtfD*, respectivamente (Jespersgaard *et al.*, 1999 *cit. in* Pinto *et al.* 2005; Koga *et al.*, 2002).

Como estruturas importantes e peculiares a todos os tipos de GTFs, existe o domínio N-terminal, o sítio catalítico para sacarose, e o domínio C-terminal, envolvido na ligação aos glucanos e consequente agregação bacteriana e indução de cáries dentárias (Koga *et al.*, 2002).

Estudos revelam que todos os genes *gtf* são importantes para a formação de cárie em superfícies lisas e que aqueles que perderam a capacidade de sintetizar glucano, através de mutações naturais ou induzidas em genes *gtf*, não produzem doença significativa em modelos animais (Shivakumar *et al.*, 2009).

Munro *et al.*, a partir da inativação dos genes *gtfB* e *gtfC* de *S.mutans* mostraram uma enorme redução da virulência “Streptocócica” em ratos. Já a inativação do gene *gtfD*, não influenciou a redução da virulência (Munro *et al.*, 1993).

Igualmente o crescimento bacteriano na presença de anticorpos para GTF diminuiu significativamente a quantidade de biofilme em superfícies de vidro (Smith, 2003).

Os *S. sobrinus* produzem um glucano insolúvel em água devido à sua síntese de enzima GTT-I, e três glucanos solúveis em água devido à síntese de enzimas denominadas de GTF-SS (Luo, 1988, *cit. in* Shivakumar *et al.* 2009). O gene *gtfI* codifica GTF-I e os genes *gtfS* e *gtfT* codificam duas enzimas GTF-S (Koga *et al.*, 2002).

Além disso, importa salientar que os *S. sobrinus* possuem dextranases para hidrolisar os glucanos (Ureña, 2000).

#### 6.1.1.2.1 Glucanos

Como referido anteriormente, as bactérias secretam GTFs, as quais catalisam a cisão da sacarose em glicose e frutose e, além disso, polimerizam as moléculas de glicose em glucanos (Arosa *et al.*, 2007).

Os glucanos servem principalmente como um adesivo para suportar a ligação de *S. mutans*, e de outros *Streptococcus* orais, aos dentes (Lamont *et al.*, 2006). A interação dos glucanos com os domínios celulares dos GTFs e dos GBPs (“glucan-binding proteins”) causam a acumulação extensa do *S. mutans* no biofilme dentário (Smith, 2002).

Os glucanos produzidos por *S. mutans* não podem ser digeridos pelas enzimas de quaisquer organismos conhecidos ou pela amilase salivar, portanto, quando presentes na cavidade oral, os glucanos devem ser removidos por forças mecânicas (Lamont *et al.*, 2006).

#### 6.1.1.3 GBPs

A capacidade que as bactérias possuem para se ligar a glucanos é mediada por proteínas presentes na parede bacteriana com propriedades de associação ao glucano. Tais proteínas “glucan-binding” foram identificadas em *S. mutans* e em *S. sobrinus* (Smith *et al.*, 1998, *cit. in* Smith 2002).

Os *S. mutans* sintetizam quatro proteínas extracelulares não-enzimáticas ligantes de glucanos (Gbps), denominadas GbpA, GbpB, GbpC e GbpD. Tais proteínas possibilitam também a agregação do *S. mutans* a outros *Streptococcus* orais. As Gbps podem ser secretadas, estar associadas às superfícies celulares (GbpA, GbpB e GbpD) ou estar ligadas covalentemente à parede celular (GbpC) apresentando diferentes afinidades para polissacarídeos (Nogueira *et al.*, 2008).

A proteína GbpA, é altamente hidrofóbica, e apresenta sequências de aminoácidos homólogas às presentes na GTF-I e GTF-SI de *S. mutans* (Koga *et al.*, 2002). A GbpA tem uma maior afinidade para o glucano solúvel em água do que para o glucano insolúvel em água (Krithika, 2004, *cit. in* Shivakumar *et al.* 2009).

Somente a proteína GbpB de *S. mutans* parece, sistematicamente, apresentar propriedades imunogénicas e protectoras contra a cárie dentária o que ressalta o seu potencial como um alvo no desenvolvimento das vacinas. (Mattos *et al.*, 2001).

A GbpC é responsável pela adesão, dependente de dextranos, em *S. mutans*, encontrando-se ancorada à superfície da parede celular bacteriana através de uma transpeptidase, denominada sortase (Smith *et al.*, 2003 *cit. in* Pinto *et al.* 2005). Níveis altos deste composto proteico promovem a auto-agregação destes microorganismos antes da sua adesão ao biofilme dentário (Pinto *et al.*, 2005).

Estudos realizados por Hazlett *et al.* mostram que a inativação do gene *gbpA* de *S. mutans* aumenta a virulência em ratos, e também promove o acúmulo *in vivo* de microorganismos nos quais *gtfB* e *gtfC* foram recombinados para reduzir a virulência, ou seja, a síntese de glucanos insolúveis. Em experiências posteriores estas alterações na virulência serviram de hipótese a testar num modelo *in vitro* de biofilme, o qual concluiu que realmente o gene *gbpA* contribui para o desenvolvimento da placa bacteriana, influenciando a patogenicidade do *Streptococcus* (Hazlett *et al.*, 1999).

#### 6.1.2 Tolerância ácida

A aciduricidade é a capacidade de tolerar e proliferar, ou seja, de sobreviver em meios com pHs ácidos e desempenha um dos principais mecanismos de sobrevivência bacteriana. A acidificação do biofilme, decorrente da fermentação de diversos hidratos de carbono, inibe o crescimento de diversos microorganismos comensais competidores da placa bacteriana, como por exemplo o *S. sanguinis*, o que favorece o crescimento de *S. mutans*. Esta tolerância a ácidos ocorre principalmente porque *S. mutans* apresenta uma bomba transportadora de prótons H<sup>+</sup> na sua membrana celular (Burne, 1998).

O *S. mutans* geralmente funciona melhor com valores de pH ácido de cerca de 6, mas pode realizar a glicólise, ou seja, catabolizar açúcares, mesmo para valores de pH ligeiramente abaixo de 4, contudo não pode usar o ATP produzido para o crescimento, neste valor de pH (Lamont *et al.*, 2006).

Os *S. sobrinus* revelam ser extremamente tolerantes aos ambientes ácidos mas esta tolerância não parece relacionar-se com qualquer actividade da bomba transportadora de prótons (Nascimento *et al.*, 2004).

## VII- Vacina da Cárie Dentária

### 7.1 Mecanismo de Acção

De acordo com Park (*cit. in Shivakumar et al.*, 2009), “Vacinas são um preparado imunobiológico concebido para produzir uma protecção específica contra uma determinada doença, uma vez que estimulam a produção de anticorpos de protecção e de outros mecanismos imunitários. As vacinas são preparadas a partir de organismos vivos geralmente modificados, organismos inactivados ou mortos, extractos de fracções celulares, ou de toxinas, ou uma combinação das mesmas”, porém sem induzir os sintomas das doenças (Miranda *et al.*, 2001).

A função de uma vacina é realizar profilaxia imunológica activa pois estimula a resposta imune protegendo os indivíduos imunizados por este processo de riscos decorrentes das infecções naturais. As vacinas induzem protecção contra doenças infecciosas através da indução de células ou outros mecanismos imunes efectores (como anticorpos) e de células de memória. A imunidade contra doenças infecciosas pode ser obtida através da imunização passiva ou activa (Arosa *et al.*, 2007).

A imunização passiva é feita através da administração para um receptor não imune de anticorpos ou células T previamente sensibilizadas provenientes de um dador imune, contudo, não induz memória imunológica conferindo uma protecção temporária. Pelo contrário, a imunização activa, induzida pela exposição natural a um patogénio ou pela vacinação, gera memória imune e é assim mais duradoura e eficaz (Arosa *et al.*, 2007).

A imunização activa é a forma de imunização mais aplicada nos estudos de combate à cárie, já que resulta na formação de anticorpos específicos que podem ser identificados no sangue ou, no caso específico de uma vacina contra a cárie, na saliva e no fluído crevicular (Hajishengallis *et al.*, 1999).

As duas grandes famílias celulares que conferem tal especificidade nas respostas imunológicas, uma vez estimuladas, são os linfócitos B, produzidos e maturados na medula óssea, e os linfócitos T, assim designados pelo facto de a sua maturação ocorrer

no timo. Após activados, os linfócitos B e T aumentam de tamanho e sofrem diferenciação para o antígeno específico que os activou (Arosa *et al.*, 2007).

Um antígeno pode ser um polissacárido, lípido, proteína, ou mesmo um ácido nucleico, e estes podem ser mais ou menos imunogénicos (Kindt *et al.*, 2007)

#### 7.1.1 Produção de IgA salivar e IgG circulante

As imunoglobulinas (Ig) são proteínas que podem existir numa forma membranar, onde têm um papel fundamental no reconhecimento do antígeno pelos plasmócitos (linfócitos B diferenciados), ou numa forma solúvel (também denominada anticorpo) responsável pelas respostas humorais (Arosa *et al.*, 2007).

A saliva contém aproximadamente 1-3% da concentração de imunoglobulinas, e é constituída por IgG, IgM e, principalmente, IgA (Newman, 1988 *cit. in* Shivakumar *et al.* 2009).

A maior parte da IgA salivar é segregada pelos plasmócitos associados ao tecido glandular, apresentando-se como IgA dimérica. São muito reduzidas as quantidades de IgG (1,4 mg/dia) e IgM (0,2mg/dia) produzidas nas glândulas salivares. Esta secreção de imunoglobulinas, particularmente IgA (cerca de 100mg/dia), é fundamental na prevenção de infecções da própria glândula salivar; actua na primeira linha de defesa contra agentes patogénicos que entram no organismo pelas mucosas, assegurando, assim, a continuidade da sua função de produção salivar, essencial para a manutenção da saúde oral (Arosa *et al.*, 2007).

O sistema imune mucoso funciona como um sistema “ampliador” da resposta imune, e é composto por estruturas linfóides localizadas nas placas de Peyer, apêndice e gânglios linfáticos do tracto intestinal, formando o GALT (“gut-associated lymphoid tissue”), e nos anéis de Waldeyer e amígdalas nasofaríngeas e palatinas, que constituem o NALT (“nasal-associated lymphoid tissue”) (Childers, 2002).

Tanto as células linfóides do GALT como as do NALT são responsáveis pela maior produção de IgA específica (Smith *et al.*, 1996). Por meio da corrente sanguínea, essas células, deslocam-se e estabelecem-se na lâmina própria dos tecidos mucosos e tecidos glandulares, como as glândulas exócrinas mamárias, lacrimais e salivares (Montgomery *et al.*, 1998). Nas glândulas exócrinas a IgA termina a sua maturação e antes de ser liberta une-se ao componente secretório (CS) convertendo-se em IgA secretória (s-IgA) (Smith *et al.*, 1996).

Apesar de estarem anatomicamente distantes, o GALT e o NALT, encontram-se funcionalmente interligados pois, após estimulados, aumentam os níveis de s-IgA nas secreções exócrinas como um todo (Koga *et al.*, 2002).

A s-IgA é o principal componente imunológico de secreções das glândulas salivares maiores e menores e, por isso, é considerado o mediador primário da imunidade adaptativa no meio salivar (Smith, 2003). A s-IgA é uma molécula hidrofílica, carregada negativamente e bastante glicosilada e, como tal, pode envolver microrganismos que sejam hidrofílicos (Arosa *et al.*, 2007). Além disso, tem acesso directo à superfície do dente, podendo impedir a adesão bacteriana à superfície do esmalte ou prevenir a formação de dextranos, inibindo assim a actividade das GTFs (Lehner, 1992).

A s-IgA inibe também a aderência de microrganismos à mucosa epitelial, evitando a penetração de patogénios bacterianos exógenos nas portas naturais de entrada do organismo humano, as mucosas (Arosa *et al.*, 2007).

Revela ainda competências para aglutinar micróbios e interferir com a mobilidade bacteriana. Outro mecanismo de acção é a sua capacidade de interferir com proteínas bacterianas tais como enzimas e toxinas, neutralizando a sua acção, sendo também capaz de neutralizar patogénios intracelulares, como por exemplo, vírus (Arosa *et al.*, 2007).

As aplicações preferenciais da vacina, nas mucosas, dizem respeito à indução de anticorpos s-IgA no compartimento salivar. Muitos investigadores têm demonstrado que

a exposição de um antígeno a um tecido linfóide no intestino, na mucosa nasal, brônquica, ou rectal pode desencadear respostas imunes. Isto deu origem à noção de um "sistema imunológico da mucosa comum" (Russell *et al.*, 1999).

A IgG é o subtipo da imunoglobulina mais abundante no soro (cerca de 75% das imunoglobulinas totais), onde apresenta uma enorme estabilidade, e um período de semi-vida de cerca de 3 semanas. Funcionalmente, as IgG de elevada afinidade para o antígeno são responsáveis pela resposta imunológica humoral, com capacidade de opsonização, neutralização e activação do sistema de complemento. Os anticorpos IgG séricos podem atingir elevadas concentrações salivares, via fluído crevicular gengival, por onde acontece igualmente o aporte de células fagocitárias e proteínas do complemento que impedem a colonização bacteriana. O aumento de IgG específica anti-*S. mutans* no fluído sulcular juntamente com a fracção C3b do sistema de complemento impedem a progressão dessa mesma colonização (Arosa *et al.*, 2007).

A verificação da existência de um sistema imune mucoso comum sugere a possibilidade de prevenção da cárie por meio da indução de s-IgA específica contra os *Streptococcus* cariogénicos (Russel *et al.*, 1999).

#### 7.1.2 Resposta imunitária da mucosa oral

As interacções contínuas das superfícies mucosas com o seu ambiente, interacções estas que embora sejam indispensáveis podem ser fatais, desenvolveram uma série de mecanismos de protecção à invasão microbiana. Os mecanismos de resposta imune podem ser distinguidos por imunidade inata ou natural e imunidade adquirida ou adaptativa, que operam de forma sinérgica (Tlaskalova-Hogenova *et al.*, 2005).

Com o objectivo de lidar com a elevada e altamente variável carga antigénica, células residentes estão envolvidas no processo de captação, e apresentação de antígenos e produção de anticorpos; as células de defesa estão estrategicamente distribuídas nos tecidos da mucosa associados às glândulas exócrinas (Tlaskalova-Hogenova *et al.*, 2005).

A saliva é transportada através do ducto da glândula parótida para o interior da cavidade oral. Tal glândula utiliza mecanismos de defesa pois apresenta granulócitos, linfócitos T e macrófagos distribuídos na sua lâmina própria. A IgA é produzida por células plasmáticas na camada do tecido conjuntivo subepitelial e é, posteriormente, integrada no produto de secreção. A secreção constante da glândula parótida, juntamente com o sistema de protecção ductal celular e bioquímico, influencia directamente na protecção contra infecções ascendentes, desde o ducto parotídeo até à própria glândula salivar, e permite o fluxo salivar (Kutta *et al.*, 2006).

A defesa imune específica do hospedeiro contra as bactérias na cavidade oral é proporcionada, como já referido, pelas imunoglobulinas presentes na saliva, especialmente s-IgA, que são geradas pelo sistema imune da mucosa oral (Michalek *et al.*, 2001).

Diversas etapas que envolvem a patogénese molecular da cárie dentária são susceptíveis de desencadear intervenção imune (Smith, 2002). O conhecimento do potencial imunológico das mucosas pode fornecer dados importantes no desenvolvimento de vacinas para o controlo da cárie dentária (Nogueira *et al.*, 2008).

Os macrófagos e as células dendríticas localizados abaixo do epitélio na lâmina própria são as primeiras células do sistema inato a interagir com os microorganismos. A sua importante função está relacionada com a protecção do hospedeiro contra patógenos estranhos e na regulação da resposta a bactérias comensais. Os macrófagos são células fagocíticas capazes de destruir as bactérias por vários mecanismos, alguns dos quais fazem parte da imunidade inata, tais como macropinocitose fagocitose e endocitose, enquanto outros requerem a presença de anticorpos específicos contra a bactéria, imunidade adquirida específica (Arosa *et al.*, 2007). Algumas espécies de *Streptococcus* parecem ser destruídas por fagocitose e por macropinocitose (Delwing *et al.*, 2002).

Os macrófagos, que podem também servir como células apresentadoras de antígeno (APC), células dendríticas e as células B são responsáveis pela captação, processamento e apresentação de antígenos aos linfócitos T. Estes participam também na indução da

imunidade adquirida estimulando a formação do anticorpo específico de resposta (Delwing *et al.*, 2002).

No fluido sulcular e no estroma conjuntivo gengival, os linfócitos T auxiliares (CD4+), estimulados pelos antígenos presentes no biofilme, activam os linfócitos B a diferenciarem-se em plasmócitos, células que produzem anticorpos. Como mecanismo de defesa, as células anteriormente referidas, produzem inúmeras citocinas. Tais moléculas actuam sinergicamente, estimulando a reacção inflamatória, sobretudo pela acção da Interleucina 1 (IL-1) (Arosa *et al.*, 2007).

As bactérias da cavidade oral podem activar o sistema do complemento pela via alternativa, e este, também, tem um leque alargado de intervenção na resposta imunitária, pois desencadeia e mantém a reacção inflamatória em todos os processos de resistência à infecção bacteriana (opsonização, fagocitose e lise). A presença da fracção C3b tem uma importância decisiva em alguns dos efeitos biológicos do complemento, principalmente na opsonização, e como consequência, facilita a ocorrência da imunoaderência aos macrófagos e a fagocitose. O complexo final de activação do sistema de complemento (C5b-C9) representa um processo de formação de poros na membrana celular que determinam, assim, a lise osmótica da célula-alvo (Arosa *et al.*, 2010).

São necessárias apenas algumas horas, após o nascimento, para que a cavidade oral do recém-nascido fique colonizada por inúmeros microorganismos, nomeadamente, *Lactobacilos*, *S. salivarius*, *Veillonella alcalescens* e *Candida albicans*. Com o crescimento, a flora oral altera-se e após a erupção dentária ocorre a colonização por *S. sanguis* e *S. mutans* (Pereira *et al.*, 2010).

A nutrição e a especificidade imunológica de cada indivíduo são factores importantes para o desenvolvimento da flora oral. A colonização da mucosa oral depende da saúde oral materna durante a gravidez, do controlo dos agentes patogénicos e da existência de aleitamento, uma vez que o leite materno funciona como um verdadeiro suplemento imunológico (Field, 2005).

O leite materno é abundante em linfócitos, macrófagos, neutrófilos e citocinas que, são capazes de regular a colonização microbiana na cavidade oral, nomeadamente os macrófagos, pois estes, enquanto APCs, cumprem na totalidade as funções essenciais do sistema imunitário: especificidade, diversidade e memória (Field, 2005).

Importa ainda salientar que o leite humano contém uma grande variedade de proteínas, tais como, imunoglobulinas,  $\kappa$ -caseína, lisozima, lactoferrina,  $\alpha$ -lactalbumina, e lactoperoxidase, que proporcionam actividades biológicas que vão desde efeitos antimicrobianos a funções imunoestimulatórias (Lonnerdal, 2003).

De acordo com estudos realizados por Grosskurth (*cit. in* Isaacs 2005) que analisam a actividade protectora do leite materno, estes mostram a importância da IgA até mesmo no combate a infecções graves relatando que recém-nascidos amamentados com leite materno apresentam menor susceptibilidade a infecções, incluindo a cárie dentária.

### 7.1.3 Janela de infecção

A erupção dentária proporciona a possibilidade de ocorrer colonização oral por *S. mutans*, uma vez que a acumulação da espécie na cavidade oral depende de superfícies não descamativas. Portanto, a partir do momento em que a dentição decídua começa a erupcionar, por volta dos seis meses de idade, existem superfícies rígidas para se iniciar a formação do biofilme (Caufield *et al.*, 1993).

Estudos da história natural da aquisição “Streptocócica” oral por lactentes revelaram que, sob circunstâncias normais de dieta, as crianças tornam-se permanentemente colonizadas com *S. mutans* entre o meio do segundo ano e o final do terceiro ano de vida (Smith, 2003).

O investigador Caufield designou a este período, em que as crianças apresentam maior risco de tornarem-se permanentemente colonizadas com *S. mutans*, como a "janela de infectividade" (Caufield *et al.*, 1993).

A "janela" pode abrir ainda mais cedo se estiverem presentes níveis elevados de infecção por *S. mutans* maternos, uma vez que a fonte primária de infecção é materna, juntamente com a exposição à sacarose na dieta. Além disso, sabe-se que entre os doze e os vinte e quatro meses ocorre a erupção dos molares decíduos, os quais apresentam superfícies oclusais retentivas. Assim, e visto que neste período o sistema imunológico não tem maturidade suficiente para responder eficazmente, os dados sugerem que uma "janela de oportunidade da vacina" poderia existir entre os doze e os dezoito meses, para a maioria das populações (Smith, 2003).

Apesar da influência da dose materna, as crianças que não são colonizadas durante a janela de infectividade parecem não ficar infectadas por *S. mutans* durante vários anos, possivelmente até ocorrer novas oportunidades de colonização, após a erupção da dentição definitiva. Isto indica que a introdução de medidas preventivas como a vacinação para o controlo da cárie dentária, a longo prazo, são benéficas no impedimento da colonização por *S. mutans* durante a primeira infância (Caufield *et al.*, 1993).

## 7.2 Antigénios candidatos

O conhecimento adquirido até ao momento relata que a utilização de células bacterianas inteiras como vacinas pode originar reacções cruzadas com tecidos normais do hospedeiro. Assim, com o objectivo de evitar que tal ocorra, a genética e a biologia molecular têm se preocupado na criação de técnicas de realizar a purificação e a síntese peptídica em grandes quantidades de subunidades "Streptocóccicas", ou seja, de factores de virulência, importantes na colonização bacteriana à superfície dentária (Hajishengallis *et al.*, 1999). A estratégia usada visa a actuação específica dos anticorpos somente nos componentes estruturais ou enzimáticos bacterianos impedindo a sua adesão ao dente e posterior colonização (Pinto *et al.*, 2005).

### 7.2.1 Fragmentos

Os componentes bacterianos associados à superfície celular das bactérias mais amplamente estudados, e, por isso, sujeitos a experiências mais recentes, como

candidatos a vacinas são: as GTFs, a adesina antigénio I/II (Ag I/II) e as Gbps (Kuramitsu, 1993, *cit. in* Koga *et al.* 2002).

#### 7.2.1.1 Adesinas

De acordo com Takahashi *et al.* (*cit. in* Nogueira *et al.*, 2008) estes sintetizaram quatro peptídeos com base na sequência de aminoácidos do Ag I/II, e entre estes peptídeos, o resíduo 301-319 correspondente às regiões ricas em alanina. A imunização de ratos, com este fragmento peptídeo sintético (resíduo 301-319), concluiu que a colonização das superfícies dentárias por *S. mutans* é suprimida (Bowen, 1996, *cit. in* Shivakumar *et al.* 2009).

Estudos realizados por Michalek *et al.* (*cit. in* Nogueira *et al.* 2008) em ratos infectados oralmente com *S. mutans* e submetidos à imunização intranasal com AgI/II, apresentaram níveis de *S. mutans* significativamente menores na placa dentária e menor índice de cárie do que os ratos infectados, não imunizados.

Contudo, Rosan *et al.* mostraram a existência de evidências de que a inativação do gene *pac*, que codifica Ag I/II, não influencia o mecanismo de adesão de *S. mutans*. Tal pode ocorrer devido à ligação do gene *pac* a várias outras proteínas salivares, nomeadamente proteínas ricas em prolina (Rosan *et al.*, 1982).

Redman *et al.* usaram na sua estratégia de vacinação, o antigénio proteico Spa-A, pertencente ao *S. sobrinus*. Para testar a sua eficácia, recorreram à imunização oral em ratos, pois pretendia-se que estes fossem capazes de induzir respostas imunitárias protectoras contra a própria bactéria. Os resultados obtidos em comparação com os ratos do grupo controlo não imunizado foram os seguintes: aumento das respostas séricas anti-Spa-A e, quanto às respostas salivares, os anticorpos para Spa-A foram aumentando gradualmente com o tempo. Todos os ratos imunizados apresentaram os molares inferiores com menor número de bactérias “Streptocóccicas” e menos lesões de cárie do que o grupo controlo, provando que a produção de anticorpos específicos na mucosa oral contra *S. sobrinus* também confere protecção contra a cárie dentária (Redman *et al.*, 1995).

Hajishengallis *et al.* (*cit in.* Nogueira *et al.* 2008) investigaram o efeito da s-IgA humanos específicos ao Ag I/II sobre a aderência de *S. mutans*, constatando que estes anticorpos interferiram na adesão inicial de *S. mutans* à película aderida.

#### 7.2.1.2 GTFs

Uma vez que as GTFs das principais espécies do *Streptococcus* cariogénicas em humanos, *S. mutans* e *S. sobrinus*, têm características muito semelhantes, a imunização com a proteína GTF ou subunidades de uma espécie pode induzir uma medida de protecção para as outras espécies. Assim, a presença de anticorpos para GTF na cavidade oral, antes da infecção, pode influenciar insignificamente o aparecimento da doença, presumivelmente devido à interferência com uma ou mais das actividades funcionais da enzima (Smith, 2003).

Os estudos de imunização com vacinas GTF intactas em animais infectados com *S. mutans* obtiveram sucesso (Smith, 2003).

O efeito da administração oral de preparações de antígeno solúvel contendo GTFs em hamsters foi estudado por Smith e colaboradores. Tal imunização resultou na produção de anticorpos salivares e séricos, específicos para este antígeno, em comparação com o grupo controlo. Estes resultados sugerem que a administração de preparações de antígeno solúvel contendo GTFs fornecem protecção significativa contra a cárie (Smith *et al.*, 1979).

Noutro estudo realizado pelos autores acima referidos, foram testados com imunização de humanos adultos com GTF de *S. sobrinus*, os níveis de anticorpos orais anti-*S. mutans*. As amostras salivares do grupo imunizado apresentaram sempre níveis superiores de IgA específicos a GTF e os níveis de *S. mutans* foram sempre menores, em comparação com o grupo placebo. Desta forma é possível concluir que, mesmo em indivíduos previamente colonizados, é notório o efeito redutor dos níveis de infecção pela indução de anticorpos contra GTF (Smith *et al.*, 1987).

Os resultados de variadas experiências que utilizaram as GTFs, expressas tanto por *S. mutans* como por *S. sobrinus*, evidenciam que este grupo é um importante candidato a antigénio na vacina anti-cárie uma vez que alargam o efeito protector contra a doença (Pinto *et al.*, 2005; Smith, 2002).

#### 7.2.1.3 GBPs

A saliva de crianças contém anticorpos IgA para GbpB, indicando que a infecção inicial com *S. mutans* pode levar à indução de imunidade natural, também para esta proteína (Smith, 1990, *cit. in* Nogueira *et al.* 2003).

Smith *et al.* mostraram que 20 das 24 amostras de salivas de adultos testadas continham IgA reactivo contra GbpB, sugerindo que a GbpB está relacionada com a síntese de proteínas extracelulares por bactérias, mostrando imogenicidade, como já tinha sido anteriormente referido no cap. 6.1.1.3 (Smith *et al.*, 1994).

Estudos em ratos analisaram que a imunização com GbpB induz uma resposta imune, interferindo na acumulação de *S. mutans* e na redução do nível de cáries dentárias, conforme descrito mais à frente no cap. 7.4.2 (Smith *et al.*, 1996).

O potencial de protecção induzido pelas GBPs não se estende, no entanto, às espécies de *S. sobrinus* (Smith, 2002).

#### 7.2.2 Péptidos recombinantes

A utilização da tecnologia recombinante e da sequenciação do ADN permitiu obter péptidos com sequências de aminoácidos pré-definidas, seleccionando os determinantes imunogénicos ideais, capazes de induzir uma resposta imunológica eficaz, e eliminando os prejudiciais efeitos colaterais (Xu *et al.*, 2006, *cit. in* Pereira *et al.* 2009).

Taubman e colaboradores imunizaram ratos por via subcutânea perto das glândulas salivares com um péptido 21-mer sintético a partir do domínio CAT (ou catalítico) de *S.*

*downei* GTF-I, um péptido 22-mer do domínio GLU (ou de ligação de glucano) de GTF-I de *S. downei*, GTFs de *S. sobrinus* e GTFs de *S. mutans*. Os autores concluíram que a imunização de ratos com estes péptidos induz o aumento de IgG sérica e IgA salivar, inibindo a colonização oral e o processo cariioso por *S. sobrinus* e *S. mutans*. Além disso, demonstraram que a co-imunização com CAT e GLU aumentou a imunidade protectora contra *S. mutans* (Taubman *et al.*, 2000).

Noutro estudo realizado pelos autores anteriores, estes sintetizaram um di-epítotope (CAT-GLU) sintetizado de um domínio CAT de GTF de *S. sobrinus* e um domínio GLU de GTF de *S. downei*. A imunogenicidade deste di-epítotope foi comparada com CAT e GLU individuais em ratos, utilizando a via subcutânea. Os resultados demonstraram que o grupo com respostas significativamente superiores ocorreu naquele que recebeu imunização di-epitópica com o CAT-GLU, uma vez que originou níveis elevados de anticorpos IgG séricos e IgA salivares para GTFs de *S. sobrinus*, e também mostrou a proliferação de linfócitos T. Assim, concluíram que a imunização com o di-epítotope CAT-GLU tem efeitos protectores contra a cárie dentária induzida por *S. sobrinus* podendo ser um antigénio potencialmente importante para a construção da vacina anti-cárie (Taubman *et al.*, 2001).

#### 7.2.2.1 Enolase

Uma estratégia do *S. sobrinus* para sobreviver e colonizar o hospedeiro consiste na produção de uma proteína que suprime as respostas de anticorpos específicos; a enolase de *S. sobrinus* foi identificada como uma proteína imunomoduladora (Veiga-Malta *et al.*, 2004).

Num estudo utilizou-se a enolase recombinante (rEnolase), expressa em *Escherichia coli*, como antigénio para avaliar o seu efeito terapêutico. No dia dezoito após o nascimento os ratos foram desmamados da alimentação rica em sacarose e no dia dezanove e, durante os seguintes cinco dias consecutivos, foram infectados oralmente com *S. sobrinus*. Após os cinco dias e, novamente, três semanas mais tarde, foram imunizados oralmente com rEnolase. As análises de anticorpos realizadas aos trinta e aos noventa dias após a imunização, mostraram a indução do aumento dos níveis de

anticorpos IgA e IgG salivares específicos para rEnolase, em comparação com os ratos do grupo de controlo. Os níveis séricos de anticorpos IgG específicos para rEnolase entre ratos imunizados e ratos controlos, não apresentaram diferenças. No final da experiência, dia cento e vinte, observou-se que nos ratos imunizados com rEnolase ocorreu uma redução significativa das lesões cáries, induzidas por *S. sobrinus*, nos dentes molares tanto nas fossas e fissuras (diminuiu 45%) como nas superfícies proximais (diminuiu 71%), em conformidade com a diminuição na sua colonização; exames realizados em vários órgãos não detectaram danos histopatológicos. Assim, a vacinação com rEnolase parece não ter efeitos prejudiciais em ratos, mostrando-se um candidato promissor e seguro para testar em ensaios de vacinas contra a cárie dentária em humanos (Dinis *et al.*, 2009).

Noutro estudo recente investigou-se o efeito que a vacinação materna com rEnolase antes da gravidez tem na descendência, avaliando a resposta imune à infecção oral por *S. sobrinus* e a progressão cáries. Ratas foram imunizadas pelas vias intranasal e subcutânea com rEnolase em adjuvante e dez dias após a última administração, as fêmeas imunizadas foram cruzadas com um rato macho. Nas crias procedeu-se à avaliação das respostas orais imunes à infecção por *S. sobrinus* e à cárie dentária. Os resultados mostraram que as crias de mães imunizadas com rEnolase tinham concentrações mais elevadas de anticorpos específicos salivares de IgA e IgG contra rEnolase e os níveis de cárie, tanto a nível dos sulcos como a nível proximal, demonstraram ser inferiores. Assim, devido à observação da transferência placentária de anticorpos concluiu-se que a imunização materna com rEnolase antes da gravidez fornece à sua descendência proteção contra cáries dentárias induzidas por *S. sobrinus* (Dinis *et al.*, 2011).

Como homologia entre a enolase de *S. sobrinus* e de *S. mutans* é muito elevada (98%), prevê-se que os anticorpos anti-enolase produzidos contra uma espécie de *Streptococcus* deve reconhecer as outras espécies, reforçando o interesse em rEnolase como um antígeno candidato à vacina contra a cárie dentária (Veiga-Malta *et al.*, 2004).

### 7.2.3 DNA

Nos últimos anos, vários antígenos de superfície celular de *S. mutans* e os seus fragmentos recombinantes têm sido estudados como possíveis candidatos a vacinas de DNA anti-cárie (Li *et al.*, 2010).

Li e seus colaboradores usaram como vacina anti-cárie um plasmídeo de DNA Pcia-P, que codifica a região A-P do gene *pac* da proteína Pac (superfície celular de *S. mutans*) e a sua recombinante, rPac. Foi utilizada a via intranasal com o objectivo de explorar a eficácia das respostas imunes anti-cárie em ratos com a estratégia de imunização seguinte: um grupo foi vacinado em primeiro lugar com o plasmídeo Pcia-P e de seguida com o seu recombinante rPac, outro grupo com Pcia-P, e outro com rPac. Os resultados mostraram que a imunização intranasal com o Pcia-P e, de seguida com rPac estimulava óptimas respostas de anticorpos tanto a nível mucoso como sistémico; observou-se que o nível de anticorpos IgA salivares e IgG séricos aumentaram significativamente neste grupo em comparação com os restantes grupos; os grupos que apenas foram imunizados com Pcia-P ou rPac, embora também desenvolvessem respostas imunitárias, não demonstraram níveis de anticorpos tão elevados. Como consequência da produção de anticorpos, ocorreu uma redução significativa na lesão de cárie dentária. A estratégia de imunizar com Pcia-P e seguidamente com rPac foi surpreendente em todos os resultados imunológicos avaliados. Os autores sugeriram que a IgG pode ocorrer através dos seus locais de drenagem nódulos linfóides, tais como NALT (Li *et al.*, 2010).

Numa outra experiência foi construída através de recombinação e clonagem a região GLU pertencente à GTF, e da Pcia-P, que codifica duas regiões altamente conservadoras de PAC, conforme explicado no estudo anterior. Esta fusão originou a vacina de DNA pGLUA-P. De seguida, foram imunizados dois grupos de ratos: o primeiro grupo imunizado com injeção subcutânea de pGLUA-P e o segundo grupo imunizado com Pcia-P. Os autores observaram que no primeiro grupo ocorreram menos lesões de cárie comparativamente com o grupo imunizado com Pcia-P. Assim, o estudo concluiu sugerindo uma vacina de DNA multigénica relatando que esta pode ser mais

preventiva contra a cárie do que uma vacina de DNA que possua apenas um único gene (Guo *et al.*, 2004).

### 7.3 Adjuvantes

Na administração de vacinas muitas vezes são necessários componentes adicionais que potenciam a resposta imunológica e induzem de um número de anticorpos satisfatório, isto é, a ponto de conferir protecção (Smith, 2002).

#### 7.3.1 Toxina da cólera

A toxina da cólera (CT) é um adjuvante eficaz frequentemente utilizado para induzir imunidade da mucosa a uma maior diversidade de patogénios bacterianos e virais, em animais (Smith, 2002).

Estudos realizados por Porgador *et al.* mostraram que a utilização da CT associada a antigénios peptídicos por imunização intra-nasal pode estimular directamente células dendríticas (APCs), células da mucosa epitelial, e estimular macrófagos na produção de citocinas pró-inflamatórias; esta também facilita o transporte dos antigénios presentes na mucosa para as restantes partes sistémicas. Esta descoberta sugere que a CT aumenta a capacidade das células dendríticas no NALT, actuando localmente na mucosa (Porgador *et al.*, 1998).

A aplicação mucosa de proteínas antigénicas solúveis raramente resulta em elevados níveis de anticorpos IgA. No entanto, a adição de pequenas quantidades de CT, nomeadamente por via intranasal, mostra respostas imunológicas, bastante positivas, desencadeadas pelas mucosas orais (Smith, 2002).

Estudos utilizados com uma estirpe recombinante que expressa o Ag I / II de *S. mutans* combinado à subunidade B da toxina da cólera, têm demonstrado que a sua administração nasal, induz a produção de IgA salivar. Além disso, os dados indicaram uma redução, embora recuperável, na colonização por *S. mutans*, sugerindo que a abordagem tem potencial (Lamont *et al.*, 2006).

### 7.3.2 Outros

As microcápsulas e micropartículas antigénicas também têm sido utilizadas como sistemas de entrega local devido à sua capacidade de controlar mecanismos de captação antigénica pelos anticorpos e de degradação lenta do complexo antigénio-anticorpo, sem induzir uma resposta inflamatória (Challacombe *et al.*, 1992, *cit. in* Smith 2002).

Os lipossomas também são usados como adjuvantes com o objectivo de facilitarem a captação dos antigénios pelas células do tecido linfóide. Lipossomas são vesículas com uma membrana de bicamada fosfolipídica utilizadas para melhorar as respostas da mucosa contra as GTFs do *Streptococcus* (Tandon, 2001, *cit. in* Shivakumar *et al.* 2009).

As estirpes avirulentas de *Salmonella* também são um eficaz vector de vacina, para se combinarem como adjuvantes, sendo necessário para tal técnicas recombinantes (Tandon, 2001, *cit. in* Shyvakumar *et al.* 2009).

Estudos demonstram que apesar destas variadas moléculas actuarem como adjuvantes, aumentando o número de anticorpos, principalmente IgA, não melhoram a permanência do anticorpo IgA em circulação para antigénios de *Streptococcus*, o que constitui também um objectivo importante (Lamont *et al.*, 2006).

Os peptídeos sintetizados quimicamente também podem ser usados como adjuvante, tendo o potencial de poder evitar reacções de hipersensibilidade causada por antigénios derivados de animais ou seres humanos, resultando numa melhor resposta imune (Tandon, 2001, *cit. in* Shivakumar *et al.* 2009).

### 7.4 Vias de administração

Diversas experiências têm sido realizadas com o intuito de induzir, antes da erupção dentária, a formação de anticorpos anti-*Streptococcus*, utilizando diferentes vias de administração (Pereira *et al.*, 2010).

#### 7.4.1 Oral

A imunização oral foi realizada em muitos estudos de imunidade no GALT para obter uma resposta de anticorpos IgA salivares (Shivakumar *et al.*, 2009).

Estudos realizados em ratos, nos quais foram administrados através da alimentação oral, *S. Mutans* mortos em cápsulas, mostraram uma redução significativa da cárie, que revelou estar relacionada com um aumento do nível de anticorpos IgA salivares de anti-*S. mutans* (Michalek *et al.*, 1976, *cit. in* Smith 2002).

Estudos similares em macacos, não obtiveram valores significativos de IgA salivar. Quando a dose de administração do antígeno aumentou cerca de dez vezes, observou-se, então, o aumento da secreção de IgA, embora este fosse mínimo (Park, 2004, *cit. in* Shivakumar *et al.* 2009).

Relativamente às experiências da ingestão de cápsulas de gelatina contendo *S. mutans* em seres humanos, observou-se um aumento de anticorpos IgA salivares, embora num tempo limitado. A memória imunológica e a concentração de s-IgA é bastante diminuída, o que pode reduzir o valor da imunização oral (Bowen, 1976, *cit in* Shivakumar *et al.* 2009).

A imunização oral não mostrou ser a ideal, devido aos efeitos prejudiciais de acidez antigénica no estômago, à longa distância dos locais indutivos, e à reduzida produção de quantidades significativas de IgA, sendo, então, pouco eficaz na redução da incidência de cárie dentária (Pereira *et al.*, 2010; Smith, 2002).

Assim, embora esta via tenha uma estreita relação anatómica com a cavidade oral os resultados dos estudos em modelos animais e seres humanos implicam a exploração de outras vias de administração (Smith, 2003).

#### 7.4.1.1 Intranasal

A instalação intranasal do antígeno tem como alvo principal o NALT, utilizado para induzir imunidade contra antígenos bacterianos (Smith, 2002).

Childers *et al.* realizaram imunização, por via nasal, em cinco voluntários adultos do sexo feminino para avaliar a indução de IgA salivar, recorrendo a antígenos GTFs de *S. mutans*; a imunização foi efectuada através de duas aplicações, com sete dias de intervalo entre elas. Estes investigadores observaram aumento de IgA salivar anti-GTF e aumento de IgA e IgM séricos anti-GTF, concluindo a eficácia desta vacina pela via referida (Childers *et al.*, 1997).

A imunização nasal em humanos com antígenos GTF, ou GbpB de *S. mutans*, é também reforçada por sucessos recentes com uma vacina contra a gripe, aplicada também por esta via (Smith, 2003).

Continuamente, têm sido realizadas variadas investigações com o intuito de induzir imunidade protectora nas mucosas locais relacionadas anatomicamente com a cavidade oral (Brandtzaeg, 1997 *cit. in* Smith, 2002).

Zhu e colaboradores utilizaram a proteína codificada pelo gene WapA, adesina do *S. mutans*, em estudos em ratos, imunizados por via intra-nasal, testando a eficiência imunológica desta vacina. Concluíram que, a utilização desta proteína, resultou no aumento dos níveis de anticorpos IgA salivares e em anticorpos sistémicos IgG, após duas aplicações no intervalo de três semanas; estes anticorpos específicos produzidos inibiram a aderência sacarose-dependente do *S. mutans* ao dente, e a arquitectura do biofilme mostrou-se alterada (Zhu *et al.*, 2006).

#### 7.4.1.2 Gengivo-salivar

A imunização activa gengivo-salivar com antígenos isolados do *S. mutans* e do *S. sobrinus*, resultou num aumento de anticorpos IgA salivares, que podem inibir tanto os mecanismos sacarose-independentes como sacarose-dependentes de acumulação

bacteriana sobre as superfícies dentárias, de acordo com a opção antigénica escolhida (Russel *et al.*, 2004).

Num estudo efectuado por Smith e Taubman realizou-se aplicação local diária de GTF no lábio inferior de 23 indivíduos durante 5 dias. Os autores observaram um atraso no re-acúmulo de *S. mutans* associado ao aumento de anticorpos IgA na parótida de todos os indivíduos. Tais resultados indicam que a utilização desta via por aplicação labial de GTF influencia o ambiente salivar no que respeita à resposta imune para retardar a re-acumulação bacteriana após profilaxia dentária. Isto ocorre porque os tecidos salivares contêm os mecanismos de defesa necessários para a resposta imune ao antígeno que levam à expansão da população de células precursoras de IgA recircundantes (Taubman e Smith, *cit. in* Miranda *et al.* 2001).

#### 7.4.2 Sistémica

Estudos realizados em quarenta macacos, mantidos com uma dieta rica em sacarose, utilizando a imunização subcutânea com Ag I / II e adjuvante incompleto de Freund, constataram que ocorreu uma diminuição surpreendente da cárie dentária. Tal redução foi associada ao aumento de anticorpos IgG não apenas no soro, mas também no fluido crevicular gengival. Um pequeno aumento dos níveis de anticorpos IgA e IgM foi observado cerca de 8 semanas após a imunização, enquanto que o aumento de IgG ocorreu logo 4 semanas após imunização. Além disso, notou-se que tal redução da cárie dentária, incluiu tanto as superfícies lisas (58 a 61%), como as fissuras (70 a 72%), e uma menor colonização de *S. mutans* na placa bacteriana, quando comparados com os macacos controlo (Lehner *et al.*, 1981).

A imunização por via sub-cutânea, usando *S. mutans* com adjuvante incompleto de Freund, foi usada com sucesso em macacos. Esta via estimula a produção sérica de anticorpos IgG, IgM e IgA que aparecem mais tarde na cavidade oral através do fluido crevicular gengival. A injeção subcutânea de células intactas mortas de *S. mutans* com adjuvante incompleto de Freund ou hidróxido de alumínio demonstrou que os níveis de anticorpos IgG aumentam, os anticorpos IgM progressivamente diminuem e os anticorpos IgA aumentam lentamente. O desenvolvimento de anticorpos séricos IgG

tem lugar dentro de poucos meses após imunização, sem qualquer alteração no nível de anticorpos encontrados nos macacos não imunizados. A protecção contra a cárie dentária foi associada predominantemente com o aumento dos anticorpos IgG séricos (Lehner, 1992).

Smith e Taubman realizaram um estudo em roedores onde avaliaram a capacidade de resposta dos anticorpos induzidos pela imunização com GbpBs ou GTFs de *S. mutans* incorporados num adjuvante. Para tal, esses ratos foram infectados oralmente com *S. mutans* e receberam dieta rica de sacarose, sendo, posteriormente, injectados duas vezes, por via subcutânea, por GbpB ou GTF com nove dias de intervalo. Duas semanas após a segunda imunização, foi detectada a presença de níveis significativos de anticorpos IgA salivares e IgG séricos anti-GbpB ou anti-GTF. Os níveis de *S. mutans* nos molares dos ratos foram avaliados setenta e um dias após a infecção, sendo encontradas reduções significativas (redução de 72,7% e 47,5% respectivamente para GbpB e GTF), comparativamente com os ratos pertencentes ao grupo placebo infectado. Além disso, os autores concluíram que a imunidade protectora induzida tanto por GTFs como por GBPs resulta de anticorpos específicos para epítopes independentes visto que estes não têm uma relação antigénica estreita (Smith *et al.*, 1996).

Embora experiências em animais que utilizam a imunização por via parentérica tenham concluído consistentemente a diminuição significativa da cárie dentária, tanto em ratos como em macacos, mesmo assim, a utilização desta via tem gerado algumas preocupações no que respeita à segurança. Uma delas é a possibilidade de indução de respostas auto-ímmunes, outra é a inflamação que ocorrendo em tecidos mucosos, pode resultar em maior permeabilidade aos antigénios, facto que poderia comprometer a barreira natural da gengiva aos antigénios da placa (Thylstrup, 1995, *cit. in* Miranda *et al.* 2001).

### 7.4.3 Outras

#### 7.4.3.1 Rectal e Amígdalas

A imunização por via rectal, através do uso de supositórios, embora pouco estudada, poderá ser uma alternativa para as crianças com doenças respiratórias, pois estas são um impedimento à aplicação intranasal (Smith, 2002).

A imunização através das amígdalas, desempenha também um papel importante na defesa do hospedeiro contra a invasão de antigénios no sistema respiratório superior pois as células M presentes no tecido linfóide captam o antigénio, apresentando-o, posteriormente aos linfócitos T e estimulando a produção de IgA pelos linfócitos B. no entanto, esta via de imunização, embora mostre induzir respostas imunes satisfatórias precisa ser mais estudada (van Kempen *et al.*, 2000)

### 7.5 Modelo Animal Experimental

#### 7.5.1 Ratos

Ao longo das últimas quatro décadas, o rato tem sido o animal modelo de laboratório experimental mais usado, pois apresenta imensas vantagens. Os roedores são atraentes pois são consideravelmente fáceis de manter devido ao seu baixo custo e ao seu tamanho relativamente modesto, no entanto, a sua maior vantagem é que eles irão rapidamente desenvolver cárie, quando induzida por bactérias e em presença de uma dieta rica em carboidratos (Lamont *et al.*, 2006).

A capacidade de estabelecer grupos experimentais grandes e chegar a um diagnóstico preciso de cárie através de um exame da superfície do dente faz dos roedores uma boa escolha (Russell, 1987, *cit. in* Shivakumar *et al.* 2009).

A sua utilização envolve várias considerações importantes, incluindo o momento da infecção, a dieta e a forma como esta é apresentada aos animais, e a microbiota indígena

dos animais. Sob condições ótimas, extensas lesões de cárie podem ser encontradas em menos de quatro semanas (Lamont *et al.*, 2006).

#### 7.5.2 Primatas não humanos

Primatas não-humanos têm sido empregues em estudos de imunização, numa tentativa para superar as limitações dos modelos roedores, pois os primatas oferecem muitas vantagens devido à sua proximidade filogenética com os humanos (Lamont *et al.*, 2006).

O primeiro relato de sucesso da imunização de macacos contra a cárie foi por Bowen, nos anos setenta, que injetou células inteiras de *S. mutans* em *Macaca fascicularis* (Krithika, 2004, *cit. in* Shivakumar *et al.* 2009).

Primatas do velho mundo têm uma dentição primária e secundária comparável à dos seres humanos, e a composição de saliva, a microbiota oral, e o sistema imune são também bastante semelhantes. Além disso, e muito importante, os primatas não-humanos podem ser alimentados com uma dieta humana, rica em carboidratos fermentáveis. Quando infectados com *S. mutans*, embora estes não façam parte da sua microbiota oral, em estado selvagem, e alimentados com dietas ricas em sacarose, desenvolvem lesões de cárie que são indistinguíveis daquelas observadas em seres humanos (Lamont *et al.*, 2006).

#### 7.5.3 Limitações do modelo animal

Nos estudos realizados em roedores existem várias potenciais limitações e a primeira envolve a relação entre o *S. mutans* e a cavidade oral do hospedeiro roedor (Lamont *et al.*, 2006).

No roedor o *S. mutans* não é um habitante normal da sua microbiota oral, embora o *S. rattus*, uma espécie estreitamente relacionada, fosse isolado a partir de ratos selvagens. É evidente que um hospedeiro responde de forma diferente para as bactérias endógenas do que para as bactérias exógenas. Muitas das experiências foram realizadas em

roedores “livres de germes” que foram associados com o *S. mutans* e, assim, não possuíam uma microbiota oral intacta (Lamont *et al.*, 2006).

Segundo, os ratos tornam-se cada vez mais resistentes à cárie dentária, após vinte e quatro a vinte e seis dias de idade. Tipicamente, a imunização é iniciada ao desmame que ocorre em dezanove a vinte e um dias de idade, e os animais não são desafiados com a bactéria cariogénica até várias semanas mais tarde, quando os animais já são altamente resistentes à cárie dentária (Lamont *et al.*, 2006).

Em terceiro lugar, o desenho de estudos experimentais com roedores tem uniformemente falta de um grupo de animais que receberam um agente estabelecido cariostático, tal como o flúor, para servir como um controlo positivo em relação ao efeito da imunização (Lamont *et al.*, 2006).

O último ponto está relacionado com o tamanho do grupo, pois muitas vezes as experiências utilizadas são demasiado pequenas para fornecer poder estatístico (Lamont *et al.*, 2006).

Devido a estas limitações, vale a pena realçar que, é difícil determinar a significância de dados de roedores e de extrapolar os resultados desses estudos com o intuito de garantir um prognóstico eficaz em seres humanos (Pinto *et al.*, 2005).

A utilização de primatas não humanos também não é isenta de inconvenientes. Em primeiro lugar, são difíceis de obter e dispendiosos para manter, e o desenvolvimento da cárie dentária envolve de meses a anos. Portanto, a utilização de primatas tem sido limitada e, invariavelmente, o tamanho dos grupos tem sido pequeno e o poder estatístico em experiências realizadas também foi fraco (Lamont *et al.*, 2006).

## 7.6 Reactividade Cruzada

A reactividade cruzada do *S. mutans* ocorre devido à presença de antigénios bacterianos “Streptocóccicos” similares a antigénios do tecido cardíaco, ocorrendo uma estimulação inespecífica do sistema imune. O objectivo actual é o seguinte: encontrar antigénios

bacterianos ausentes do tecido cardíaco para eliminar assim um possível risco da vacina anti-cárie (Pereira *et al.*, 2010).

Ferretti usou anti-soros de coelhos imunizados com células inteiras de *S. mutans* e expôs a tecidos de coração humano. Os resultados obtidos concluíram que os antígenos de *S. mutans* reagiram intensamente com o tecido do coração, mostrando que a formulação de uma vacina contra a cárie dentária contendo como antígenos células inteiras de *S. mutans* deve ser cuidadosa (Ferretti *et al.*, 1980).

Devido ao potencial de células inteiras de *Streptococcus* para induzir anticorpos reactivos do coração, o desenvolvimento de uma vacina de subunidade para o controlo da cárie dentária tem sido alvo investigações intensas (Shivakumar *et al.*, 2009).

Wu e Russell investigaram se o Ag I / II era responsável pela indução desta reactividade cruzada. Os ratos imunizados com Ag I / II purificado de *S. mutans* não desenvolveram anticorpos que provocassem reactividade cruzada, sugerindo que não existe semelhança antigénica entre o tecido do coração e o Ag I / II (Wu *et al.*, 1990).

No entanto, mais recentemente pesquisas mostraram que a parte C-terminal de Ag I / II contém um epítotope, que apresenta reactividade cruzada com IgG humana, concluindo-se que este epítotope é potencialmente prejudicial e, por isso, deve ser excluído da vacina. A região da IgG humana com reactividade cruzada também está presente noutros *Streptococcus*, tais como *S. sobrinus* (Hajishengallis, 1999, *cit. in* Shivakumar *et al.* 2009).

Nas GTFs a reactividade cruzada também foi testada com o tecido do coração humano, obtendo-se resultados negativos (Choi, 1989, *cit. in* Koga, *et al.* 2002).

De facto, os dados afirmam que a vacina imunizante tem de estar livre de antígenos que provoquem reacção cruzada e a produção de anticorpos potencialmente prejudiciais ao tecido cardíaco (Lamont *et al.*, 2006).

### 7.7 Populações-alvo e Período de imunização

A melhor época para a utilização de vacinas ocorre antes da exposição do indivíduo ao agente infeccioso, ou seja, antes da abertura da “janela de infecção” (Pinto *et al.*, 2005).

O *S. mutans*, que infecta a cavidade oral da criança ao redor dos vinte e seis meses de idade, torna-se efectivamente residente quando ocorre a erupção (Pinto *et al.*, 2005). Então, para estabelecer uma imunidade efectiva contra as sucessivas tentativas de colonização pelo patogénio, a aplicação da vacina nas crianças deverá ocorrer, aproximadamente, no primeiro ano de idade (Koga *et al.*, 2002).

Outros autores defendem que a imunização deveria começar no início do segundo ano de vida, para as crianças que apresentam um risco normal de infecção, uma vez que antes da erupção dos primeiros dentes decíduos, as crianças já são capazes de produzir resposta imune através de s-IgA na saliva (Smith, 2002).

A principal origem infecciosa por *S. mutans* é maternal. Assim, caso a mãe fosse previamente imunizada a microbiota “Streptococcica” reduziria, o que iria prevenir também a infecção das crianças. A imunização materna activa através da via intranasal aumentaria os níveis de s-IgA na saliva e noutras secreções, como o leite materno, devido ao sistema imune mucoso comum. Tal tornaria a amamentação um mecanismo viável de reforço por imunização passiva anti-“Streptococcica” (Russell *et al.*, 1990 *cit. in* Pinto *et al.* 2005).

Apesar da diminuição significativa do número de casos observados nos últimos anos em muitas populações, devido aos avanços das medidas profiláticas, é particularmente preocupante que em determinados grupos populacionais ainda se encontrem milhões de crianças em risco de desenvolver cáries extensas, e talvez, especialmente para estes grupos, deveria ser instituída a vacina (Pinto *et al.*, 2005; Smith, 2002).

“A prevenção da doença cariiosa deve começar no ventre materno e manter-se durante toda a infância e adolescência, com recurso a profissionais de saúde capazes de promover a educação para a saúde oral,

para a alimentação saudável e para o tratamento da placa bacteriana e das cáries dentárias de forma atempada” (Pereira *et al.*, 2010).

A população-alvo seria composta pelas seguintes pessoas: crianças entre os dois e os quatro anos; indivíduos com inabilidades funcionais, mentais, emocionais e físicas; indivíduos com defeitos de desenvolvimento do esmalte; com xerostomia; adultos de meia idade com risco de exposição radicular e população residente em áreas onde as medidas preventivas orais sejam baixas ou inexistentes (Hajishengallis *et al.*, 1999 *cit. in* Pinto *et al.* 2005).

### 7.8 Perspectivas futuras

Um dos princípios do desenvolvimento de uma vacina é que a doença deve ser suficientemente grave para justificar a vacinação. Visto que a cárie dentária não é uma doença letal e possui uma etiologia multifactorial, em combinação com inúmeras dificuldades bioéticas, torna-se complicado garantir a segurança e eficácia de uma vacina. Todos estes factores aliados à dificuldade de encontrar voluntários adultos para realizar estudos em humanos, complica ainda mais a produção da vacina. Isto resulta numa subestimação dos resultados relativamente à imunização da cárie em crianças pequenas, a principal população, uma vez que encontram-se com alto risco de desenvolver a doença. (Pinto *et al.*, 2005; Lamont *et al.*, 2006).

Diversos estudos experimentais em animais demonstram que a indução de anticorpos contra Ag I/II, GTFs e GBPs, são capazes de conferir uma resposta imunitária protectora contra a cárie dentária interferindo com o efeito cariogénico e acúmulo de *S. mutans*, reduzindo o número de lesões cariosas, mesmo sob alta exposição à sacarose (Jespersgaard *et al.*, 1999).

Apesar dos avanços nos estudos relativos ao desenvolvimento de uma vacina anti-cárie, nomeadamente, no uso da imunização activa com vacinas de subunidades de *S. mutans*, vale a pena realçar que, apesar da sua eficácia, a maioria destes trabalhos foi realizada em animais, o que dificulta a prognóstico dos resultados sobre a sua eficácia em seres humanos (Pinto *et al.*, 2005).

Outros estudos precisam ser elaborados para avaliar e melhorar significativamente a longevidade da memória de IgA e a capacidade dos anticorpos para reduzir a incidência de cárie a um grau muito maior do que tem sido visto até o momento. Além disso, é importante analisar o desenvolvimento do sistema imunológico desde o nascimento até à colonização bacteriana oral para se analisar a influência da colonização e ontogenia do sistema imune de mucosas (Nogueira *et al.*, 2008).

Quanto ao interesse da indústria farmacêutica, esta não justifica a produção da vacina devido aos pequenos lucros previstos, quando comparados com o risco de efeitos colaterais, devido às experiências que mostram reacção cruzada com o tecido cardíaco, e possíveis posteriores acções legais (Pinto *et al.*, 2005; Lamont *et al.*, 2006; Smith, 2003).

Além disso, a correcta escovagem e o uso de fio dentário diários, a aplicação de selantes, flúor e antimicrobianos em várias formas, têm a capacidade de controlar eficazmente a doença (Lamont *et al.*, 2006; Shivakumar *et al.*, 2009).

Por outro lado, o custo da vacina contra as doenças orais não deve ser julgado isoladamente, mas sim deve ser comparado aos gastos com as medidas preventivas e tratamentos dentários, pois estes fazem com que doença seja bastante dispendiosa e muitas vezes colocam em risco a saúde com encargos financeiros para os indivíduos menos capazes de suportar tais custos (Lamont *et al.*, 2006).

É importante salientar que todos os avanços alcançados pelas técnicas biomoleculares e de engenharia genética, não têm o objectivo de substituir as medidas eficazes já estabelecidas no combate ao processo cariioso; pelo contrário, somam-se a elas (Miranda *et al.*, 2001).

O estabelecimento futuro de uma vacina eficaz contra a cárie dentária terá que enfrentar vários desafios. No entanto, o impacto desta na saúde oral de crianças do século XXI seria enorme, especialmente em grupos cuja posição económica ou cultural representam um maior risco de cárie (Smith, 2003).

## CONCLUSÃO

Embora a cárie dentária não seja uma doença com risco de vida, era óptimo o desenvolvimento para a realização de um meio livre de riscos e eficaz para prevenir a cárie dentária em humanos.

Recentes avanços na investigação da imunização activa incluindo identificação de epítopes, adjuvantes e formas de administração eficazes, aparecem como promissores na busca de uma anti-cárie eficaz.

Quando se procuram mecanismos preventivos para a cárie dentária não se pode esquecer que vai intervir-se num ecossistema oral complexo e que suprimindo as estirpes de *mutans* tal pode resultar na facilidade de outras proliferarem com um potencial cariogénico igual ou ainda mais virulento.

Amplios programas de saúde pública integram abordagens de prevenção tais como a limpeza dentária profissional, aconselhamento dietético, utilização tópica ou sistémica de flúor, selantes de fissuras podem ainda evitar a doença cárie dentária em muitas crianças do mundo. Se fosse possível conciliar os métodos de prevenção da cárie com as vacinas, tal iria contribuir para um valioso controlo da doença.

Por outro lado, a Dentística Restauradora moderna envolvendo o tratamento das sequelas da cárie dentária adoptou novas técnicas de diagnóstico que minimizam os riscos, explorando materiais adesivos que expandiram os horizontes dos procedimentos restauradores. Isto, somado ao maior conhecimento sobre o processo carioso e a sua evolução, conduz a caminhos mais conservadores na manutenção da saúde oral do paciente.

Também, relativamente à dieta é importante ter em mente que a sua relação com a cárie dentária sofreu uma mudança histórica e epidemiológica; antes de 1970 é relatada uma enorme disponibilidade de hidratos de carbono refinados claramente associada a uma maior prevalência da doença cariosa. Trinta anos depois, observa-se uma redução na prevalência de cárie em adolescentes, adultos e idosos, contudo, um pequeno mas

significativo aumento da cárie nos dentes primários de crianças. Uma vez que foi substituído o consumo da sacarose pelo da frutose.

Os médicos dentistas devem fornecer orientação individual aos pacientes sobre mudanças na dieta. Isso inclui a avaliação dos hábitos alimentares do paciente, com análises dos padrões de açúcar de exposição e tipo de alimentos. Essa informação pode ser obtida através de entrevistas recolha. Aconselhamento dietético deve-se focar não somente na redução dos riscos associados ao açúcar, mas também ao fornecimento de recomendações alternativas mais saudáveis.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, A. (1995). Caries risk assessment, *Chronicle*, 58 (1), pp. 10-13.

Agence Francaise de Sécurité des Produits de Santé. (2002). Mise au point sur le flúor et la prevention de la carie dentaire.

Anderson, H. e Domenik, Z. (2010). The Caries Environment: Saliva, Pellicle, Diet, and Hard Tissue Ultrastructure, *Dent. Clin. N. Am.*, 54 (3), pp. 453-462.

Areias, C., Macho, V., Raggio, D., Melo, P., Guimarães, A. e Pinto, G. (2010). Cárie precoce da infância – o estado da arte, *Soc. Port. Pediatr*, 41 (5), pp. 217-221.

Arosa, F., Elsa, C. e Pacheco, F. (2007). *Fundamentos de Imunologia*. Lisboa, Lidel.

Bayona, G., López, V. e Gómez, A. (1990). Prevention of caries with lactobacillus (final results of a clinical trial on dental caries with killed lactobacillus given orally). *Pract. Odontol.*, 11 (7), pp: 37-39.

Bjørndal, L e Mjör, A. (2001). Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 4: dental caries-characteristics of lesions and pulp reactions, *Quintessence Int.*, 32 (9), pp: 717-736.

Burne, R. (1998). Oral streptococci... products of their environment. *J. Dent. Res.*, 77 (3), pp. 445-452.

Burt, A., Eklund, S., Morgan, K., Larkin, F., Guire, K., Brown, L. e Weintraub, A. (1988). The effects of sugars intake and frequency of ingestion on dental caries increment in a three-year longitudinal study, *J. Dent. Res.*, 67 (11), pp. 1422-1429.

Caufield, P., Cutter, G. e Dasanayake A. (1993). Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity, *J Dent. Res*, 72 (1), pp. 37-45.

Childers, K. (2002). Humans Immunized with Streptococcus mutans Antigens by Mucosal Routes, *J. Dent. Res.*, 81 (1), pp. 48-52.

Childers, K., Tong, G. e Michalek, S. (1997). Nasal Immunization of humans with dehydrated liposomes containing Streptococcus mutans antigen, *Oral microbiol and Immunol.*, 12 (6), pp. 3329-3335.

Coykendall, A. (1989). Classification and identification of the viridians streptococci, *Clin. Microbiol. Rev.*, 2 (3), pp. 315-328.

Delwing, A., Bailey, E., Gibbs, D. e Robinson, J. (2002). The route of bacterial uptake by macrophages influences the repertoire of epitopes presented to CD4 T cells, *Eur. J. Immunol.*, 32 (12), pp. 3714-3719.

Diegues, P. (2003). Linhas de Orientação associadas à presença de flúor nas águas de abastecimento.

Dinis, M., Tavares, D., Veiga-Malta, I., Fonseca, A., Andrade, E., Trigo, G., Ribeiro, A., Videira, A., Cabrita, A. e Ferreira, P. (2009). Oral Therapeutic Vaccination with *Streptococcus sobrinus* Recombinant Enolase Confers Protection against Dental Caries in Rats, *J. Infect. Dis.*, 199 (1), pp. 116-123.

Dinis, M., Trigo, G., Chaves, N., Fonseca, A., Ribeiro, A., Tavares, D., Cabrita, A. e Ferreira, P. (2011). rEnolase maternal immunization confers caries protection on offspring, *J Dent Res.*, 90 (30), pp. 325-330.

Direcção-Geral da Saúde. [Em linha]. Disponível em <<http://www.dgs.pt/default.aspx?cn=60766101>>. [Consultado em 12/04/2012]

Driessens, F., Heijligers, H., Borggreven J. e Wöltgens J. (1985). Posteruptive maturation of tooth enamel studied with the electron microprobe, *Caries Res.*, 19 (5) pp: 390-395.

Emmilson, C. (1994). Potential efficacy of clorhexidine against mutans streptococci and humans dental caries, *J. Dent. Res.*, 73 (3), pp: 682-691

Ferretti, J., Shea, C. e Humphrey, W. (1980). Cross-reactivity of *Streptococcus mutans* antigens and human heart tissue, *Infect Immun.*, 30 (1), pp. 69-63.

Field, C. (2005). The immunological Components of Human Milk and Their effect on Immune Development in Infants, *J. Nutrition.*, 135 (1), pp. 1-4.

Filestone, A., Sema, D., Heaven, J. e Weems, R. (1998) The effect of a knowledge-based, image analysis and clinical decision support system on observer performance in the diagnosis of approximal caries from radiographic images, *Caries Res*, 32 (2), pp: 127-134.

Flemming, H. e Wingender, J. (2010). The biofilm matrix, *National Rev. Microbiol.*, 8(9), pp. 623-633.

Fontana, M., Young, A., Wolff, S., Pitts N. e Longbottom, C. (2010). Defining Dental Caries for 2010 and Beyond, *Dent. Clin. N. Am.*, 54 (3), p.423-440.

González, C. (2010). The Chemistry of Caries: Remineralization and Demineralization – Events with Direct Clinical Relevance, *Dent. Clin. N. Am.*, 54 (3), pp.469-476.

Guo, J., Jia, R., Fan, M., Bian, Z., Chen, Z e Peng, B. (2004). Construction and immunogenic characterization of a fusion anti-caries DNA vaccine against PAc and glucosyltransferase I of *Streptococcus mutans*. *Res J Dent.*, 83 (3), pp: 266-270.

Hajishengallis, G. e Michalek, S. (1999). Current Status of a Mucosal Vaccine Against Dental Caries, *Oral Microbiol. Immunol.*, 14 (1), pp. 1-20.

Hazlett, K., Mazurkiewicz, J. e Banas, J. (1999). Inactivation of the gbpA gene of *Streptococcus mutans* alters structural and functional aspects of plaque biofilm which are compensated by recombination of the gtfB and gtfC genes, *Infect Immun.*, 67 (8), pp. 3909- 3914.

Iijima, Y., Takagi, O., Ruben, J., e Arends, J. (1999). In vitro remineralization of in vivo and in vitro formed enamel lesions, *Caries Res.*, 33 (3), pp. 206-213.

Issacs, C. (2005). Human Milk Inactivates Pathogens Individually, Additively and Synergistically, *The American Society for Nutritional Sciences*, 135, pp. 1286-1288.

Jespersgaard, C., Hajishengallis, G., Greenway, T., Smith, D., Russell, M. e Michalek, S. (1999). Functional and Immunogenic Charaterization of Two Clone Regions of *Streptococcus Mutans* Glucosyltransferase I, *Infect. Immun.*, 67 (2), pp. 810-816.

Kindt, T., Goldsby, R., Osborne, B. e Kuby J. (2007). *Immunology*. United Kigdom. Freeman and Company.

Koga, T., Oho, T., Shimazaki, Y., e Nakano, Y. (2002). Immunization against dental caries, *Vaccine*, 20 (16), pp. 2027-2044.

Kohler, B., Lundberg, B., Birkhed, D. e Papapanou, P. (2003). Longitudinal study of intrafamilial mutans streptococci ribotypes, *Eur. J. Oral Sci.*, 111 (5), pp: 383-389.

Kutta, H., May, J., Munscher, A. e Paulsen, F. (2006). Antimicrobial defence mechanisms of the human parotid duct, *J Anat.*, 208 (5), pp. 609-619.

Lamont, R., Leblanc, D., Lantz, M. e Burne, R. (2006). *Oral Microbiology and Immunology*. Washington, ASM Press.

Larmas, M. (1992). Saliva and dental caries: diagnostic tests for normal dental practice, *Int. Dent. J.*, 16 (2), pp. 199-208.

Larsen, M. e Fejerskov, O. (1989). Chemical and structural challenges in remineralization of dental enamel lesions, *Scand. J. Dent. Res.*, 97 (4), pp. 285-296.

Lehner, T. (1992). Immunology of dental caries. Immunology of oral disease. 3<sup>rd</sup> ed. Blackwell scientific publications.

Lehner, T., Russell M., Caldwell, J. e Smith, R. (1981). Immunization with purified protein antigens from *Streptococcus mutans* against dental caries in rhesus monkeys, *Infect. Immun.*, 34 (2), pp. 407-415.

Li, Y., Huang, S., Du, M., Bian, Z., Chen, Z. e Fan, M. (2010). Immunogenic characterization and protection against *Streptococcus mutans* infection induced by intranasal DNA prime-protein boost immunization, *Vaccine.*, 28 (32), pp. 5370-5376.

Lonnerdal, B. (2003). Nutritional and physiologic significance of human milk protein, *Am. J. Clin. Nutr.*, 77 (6), pp. 1537S-1543S.

Margolis, H. e Moreno, E. (1994). Composition and cariogenic potential of dental plaque fluid, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 5 (1), pp. 1-25

Margolis, H., Zhang, Y., Houte, J. e Moreno, E. (1993). Effect of sucrose concentration on the cariogenic potential of pooled plaque fluid from caries-free and caries positive individuals, *Caries Res.*, 27 (6), pp. 467-473.

Mattos R., Jin, S., King, W., Chen, T., Smith, D. e Duncan, M. (2001). Cloning of the *Streptococcus mutans* gene encoding Glucan binding protein B and analysis of genetic diversity and protein production in clinical isolates, *Infect. Immun.*, 69 (11), pp. 6931-6941.

Melo, P., Azevedo, A. e Henriques, M. (2008). Cárie Dentária – a doença antes da cavidade, *Soc. Port. Pediatr*, 39 (6), pp. 253-258.

Michalek, S., Katz, J. e Childres, N. (2001). A vaccine against dental caries: an overview, *Biodrugs.*, 15 (8), pp. 501-508.

Miranda, J., Andrade, E., Souza, G., Alves, R., Almeida, D. e Pinto, L. (2001). Vacinação: uma opção preventiva contra a cárie dental aprimorada pelos conhecimentos da imunologia e da biotecnologia, *Pós-Grad Rev Fac Odontol.*, 4 (1), pp. 67-76.

Montgomery, P. e Rafferty, D. (1998). Induction of secretory and serum antibody responses following oral administration of antigen with bioadhesive degradable starch microparticules, *Oral Microbiol Immunol.*, 13 (3), pp. 139-49.

Munro, G., Evans, P., Todryk, S., Buckett, P., Kelly, C. e Lehner, T. (1993). A Protein Fragment of Streptococcal Cell Surface Antigen I/II which Prevents Adhesion of *Streptococcus mutans*, *Infect. Immun.*, 61 (11), pp. 4590-4598.

Nascimento, M., Lemos, J., Abranches, J., Gonçalves, R. e Burne, R. (2004). Adaptative acid tolerance response of *Streptococcus sobrinus*, *J. Bacteriol.*, 186 (19), pp. 6383-6390.

Newbrun, E. (1983). *Cariology*. Williams & Wilkins. 2nd ed. Baltimore.

Nogueira, R., Borges, M., Talarico, M., Ferriani, V. e Mattos-Graner, R. (2008). Anticaries vaccine – challenges, *Rev Inst Ciênc Saúde.*, 26 (4), pp. 463-466.

Nunes, e., Breda, J. (2001). *Manual para uma alimentação saudável em Jardins-de-infância*. Lisboa.

Oho, T., Yu, H., Yamashita, Y. e Koga, T. (1998). Binding of salivary glycoprotein-secretory immunoglobulin A complex to the surface protein antigen of *Streptococcus mutans*, *Infect Immun.*, 66 (1), pp. 115-21.

Pereira, A., Neves, A. e Trindade A. (2010). Immunology of dental caries, *Acta Med. Port.*, 23 (4), pp. 663-667.

Petersen, P. e Lennon, M. (2004). Effective use of fluorides for the prevention of dental caries in the 21 st century: the WHO approach, *Community Dent. Oral Epidemiol.*, 32 (5), pp. 319-321.

Pinto, L., Queiroz, L., Nonaka, C. e Nascimento, G. (2005). Aspectos imunológicos da cárie dentária, *R. Fac. Odonto*, 46 (1), pp. 19-22.

Porgador, A., Staats, H., Itoh, Y. e Kelsall, B. (1998). Intranasal immunization with cytotoxic T-lymphocyte epitope peptide and mucosal adjuvant cholera toxin: selective augmentation of peptide-presenting dendritic cells in nasal mucosa-associated lymphoid tissue, *Infect Immun.*, 66 (12), pp. 5876-5881.

Redman, T., Harmon, C., Lallone, R. e Michalek, S. (1995). Oral immunization with recombinant *Salmonella typhimurium* expressing surface protein antigen A of *Streptococcus sobrinus*: dose response and induction of protective humoral responses in rats, *Infect immun.*, 63 (5), pp. 2004-2011.

Rimmer, P. e Pitts, N. (1990). Temporary elective tooth separation as a diagnostic aid in general dental practice, *Br. Dent. J.*, 169 (3-4), pp. 87-92.

Rompante, P. (2003). Fundamentos para a alteração do Programa de Saúde Oral da Direcção-Geral da Saúde.

Rosan, B., Malamud, D., Appelbaum, B. e Golub, E. (1982). Characteristic differences between saliva-dependent aggregation and adhesion of streptococci, *Infect Immun.*, 35 (1), pp. 86–90.

Russell, M., Childers, K., Michalek, S., Smith, D. e Taubman, M. (2004). A Caries Vaccine? The state of the science of immunization against dental caries, *Caries Res.*, 38 (3), pp. 230-235.

Russell, W., Hajishengallis, G., Childers, K. e Michalek S. (1999). Secretory Immunity in defense against cariogenic Mutans streptococci, *Caries Res.*, 33 (1), pp.4-15.

Scottish Intercollegiate Guidelines Network. Preventing Dental Caries in children at High Caries Risk: A National Clinical Guideline.

Shellis, R. (1994). Effects of a supersaturated pulpal fluid on the formation of caries-like lesions on the roots of human teeth, *Caries Res.*, 28 (1), pp. 14-20.

Shivakumar, K., Vidya, S. e Chandu, G. (2009). Dental caries vaccine, *Indian J Dent Res.*, 20 (1), pp. 99-106.

Smith, D. (2002). Dental caries vaccines: Prospects e concerns, *Crit Rev Oral Biol Med.*, 13 (4), pp. 335-349.

Smith, D. (2003). Caries Vaccines for the Twenty-First Century, *Journal of Dental Education*, 67 (10), pp. 1130-1139.

Smith, D. e Taubman, M. (1996). Experimental immunization of rats with a Streptococcus mutans 59-kilodalton glucan-binding protein protects against dental caries, *Infect Immun.*, 64 (8), pp. 3069-3073.

Smith, D., Akita, H., King, W. e Taubman, M. (1994). Purification and Antigenicity of a Novel Glucan-Binding Protein of *Streptococcus mutans*, *Infect Immun.*, 62 (6), pp. 2545-2552.

Smith, D., Lam, A., Barnes, L., King, W., Peacock, Z., Wise, D., Trantolo D. e Taubman, M. (2003). Remote Glucosyltransferase-Microparticule Vaccine Delivery Induces Protective Immunity in the Oral Cavity, *Oral microbial. Immunol.*, 18(4), pp. 240-248.

Smith, D., Taubman, M. e Ebersole, J. (1979). Effect of oral administration of glucosyltransferase antigens on experimental dental caries, *Infect. Immun.*, 26 (1), pp. 82-89.

Smith, D., Taubman, M. e Ebersole, J. (1987). Ontogeny and senescence of salivary immunity, *J. Dent. Res.*, 66 (2), pp. 451-456.

Taubman, M., Holmberg, C. e Smith, D. (2001). Diepitopic construct of functionally and epitopically complementary peptides enhances immunogenicity, reactivity with glucosyltransferase, and protection from dental caries, *Infect. Immun.*, 69 (7), pp. 4210-4216.

Taubman, M., Smith, D., Holmberg, C. e Eastcott, J. (2000). Coimmunization with complementary glucosyltransferase peptides results in enhanced immunogenicity and protection against dental caries, *Infect. Immun.*, 68 (5), pp. 2698-2703.

Taskalova-Hogenova, H., Tuckova, L., Mestecky, J., Kolinska, J., Rossmann, P., Stepankova, R., Kozakova, H., Hudcovic, T., Hrnecir, T., Frolova, L. e Kverka, M. (2005). Interaction of mucosal microbiota with the innate immune system, *Scand. J. Immunol.*, 62 (1), pp. 106-113.

Twetman, S. (2010). Treatment Protocols: Nonfluoride Management of Caries Disease Process and Available Diagnostics, *Dent. Clin. N. Am.*, 54 (3), pp. 527-537.

Twetman, S. e Grindefjord, M. (1999). Mutans streptococci suppression by chlorhexidine gel in toddlers, *Am. J Dent.*, 12 (2), pp: 89-91.

Ureña, J. (2000). *Microbiologia Oral*. México, McGRAW-Hill Interamericana.

van Kempen, M., Rijkers G. e Van Cauwenberge, P. (2000). The immune response in adenoids and tonsils, *Int Arch Allergy Immunol.*, 122 (1), pp: 8-19.

Veiga-Malta, I., Duarte, M., Dinis, M., Tavares, D., Videira, A. e Ferreira, P. (2004). Enolase from *Streptococcus sobrinus* is an immunosuppressive protein, *Cell Microbiol.*, 6 (1), pp: 79-88.

Wright, W., Thelwell, C., Svensson, B. e Russell, R. (2002). Inhibition of Catalytic and Glucan-Binding Activities of a Streptococcal GTF Forming Insoluble Glucans, *Caries Res.*, 36 (5), pp. 353-359.

Wu, H. e Russell, M. (1990). Immunological cross-reactivity between *Streptococcus mutans* and human heart tissue examined by cross-immunization experiments, *Infect Immun.*, 58 (11), pp. 3545-52.

Yamazaki, H., Litman, A. e Margolis, C. (2007). Effect of fluoride on artificial caries lesion progression and repair in human enamel: regulation of mineral deposition and dissolution under in vivo-like conditions, *Arch. Oral. Biol.*, 52 (2), pp. 110-120.

Yang, Y., Li, Y., Zhang, A., Bi, L. e Fan, M. (2009). Good Manufacturing Practices production and analysis of a DNA vaccine against dental caries, *Acta Pharmacol Sin.*, 30 (11), pp: 1513-1521.

Young, D. e Featherstone, J. (2010). Implementing Caries Risk Assessment and Clinical Interventions, *Dent. Clin. N. Am.*, 54 (3), p.469-476.

Zhu, L. Kreth, J., Cruz, S., Gimzewski, J. e Shi, W. (2006). Functional characterization of cell-wall-associated protein WapA in *Streptococcus mutans*, *Microbiology.*, 152 (8), pp. 2395-2404.