

Joana Gouveia dos Santos

Vacinas Anticárie

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde
Porto, 2013

Joana Gouveia dos Santos

Vacinas Anticárie

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde
Porto, 2013

Joana Gouveia dos Santos

Vacinas Anticárie

Joana Gouveia dos Santos

“Projeto de Graduação apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.”

Resumo

A cárie dentária é uma das doenças infecciosas mais comum no homem. Um dos principais microrganismos causadores desta doença é o *Streptococcus mutans* caracterizado pelos seus diversos mecanismos de virulência.

Fatores do hospedeiro como consumo elevado de hidratos de carbono e higiene oral deficiente produzem condições ideais na cavidade oral, fundamentais para o desenvolvimento dos mecanismos de patogenezidade de *Streptococcus mutans*.

Ao longo dos anos, inúmeras foram as tentativas para reduzir a prevalência e incidência da cárie. Entre elas encontram-se estratégias como redução do consumo de hidratos de carbono na dieta, utilização de substituintes dos açúcares, introdução de agentes bacteriostáticos e bacteriocidas em produtos de higiene oral e na água de consumo, como o flúor, a clorexidina, entre outros.

Com o progresso das ciências e das tecnologias surgiu o desejo de criar algo que erradicasse por completo a cárie dentária. Grandes autores da investigação estudaram afincadamente o processo de desenvolvimento da cárie, os mecanismos de virulência de *Streptococcus mutans*, a genética e a biologia molecular inerente a esses processos. Após conhecimento da base do processo cariioso, desenvolveram numerosas experiências em animais a fim de encontrarem uma vacina anticárie que poderá ser eficaz no homem sem compromisso da sua segurança.

Abstract

Dental caries is one of the most common infectious diseases of mankind. One of the major causative microorganisms of this disease is *Streptococcus mutans* characterized by their different virulence mechanisms.

Host factors such as high consumption of carbohydrates and poor oral hygiene produce ideal conditions in the oral cavity, fundamental for the development of the mechanisms of pathogenicity of *Streptococcus mutans*.

Over the years numerous attempts have been made to reduce the prevalence and incidence of caries. Among these are strategies to reduce the consumption of carbohydrates in the diet, the use of sugar substitutes, the introduction of bacteriocides and bacteriostatic agents in oral hygiene products and drinking water, such as fluoride and chlorhexidine, among others.

With the progress of science and technology came the desire to create something that would extinguish dental caries. Great authors of the research studied the development process of the dental carie, the mechanisms of virulence of *Streptococcus mutans*, genetics and molecular biology inherent in these processes. After knowing the whole process of the disease, numerous experiments were developed on animals in order to find a vaccine that could be effective in man without compromising its security.

Dedicatória

Dedico esta monografia à minha mãe pela paciência e compreensão que me transmitiu em momentos de dúvida, incerteza e ansiedade. Pelo apoio e confiança que sempre me deu.

Agradecimentos

Com o terminar desta grande etapa não poderia deixar de agradecer às minhas orientadoras, Professora Doutora Maria João Coelho e Professora Doutora Cristina Pina, que tanto apoio, paciência e dedicação demonstraram durante estes longos meses. Um sincero obrigado pela incessantes dicas, sugestões, e correções pois sem elas mais difícil teria sido este trabalho.

Índice:

I. Introdução.....	11
II. A cárie.....	12
1. Definição de cárie dentária.....	12
2. Epidemiologia.....	13
3. Classificação.....	13
4. Histopatologia da cárie.....	14
5. Fisiologia da cárie.....	15
6. Teorias da etiologia da cárie.....	16
i. Teoria Parasitária	16
ii. Teoria Acidogénica.....	17
iii. Teoria Proteólítica.....	17
iv. Teoria da Proteólise – Quelação.....	17
7. Microrganismos e cariogenicidade.....	18
i. <i>Streptococcus</i>	18
a. <i>Streptococcus mutans</i>	18
b. <i>Streptococcus sanguis</i>	19
c. <i>Streptococcus salivarius</i>	19
d. <i>Streptococcus milleri</i>	19
ii. <i>Lactobacillus spp.</i>	19
iii. <i>Actinomyces spp.</i>	20
iv. <i>Vellonella spp.</i>	20
8. Bioquímica da placa bacteriana.....	21
9. Formação da placa bacteriana.....	22
10. Fatores do hospedeiro.....	24
i. Anatomia dos dentes.....	25
ii. Componentes salivares ativos.....	25
iii. Componentes salivares passivos.....	26
iv. Dieta e nutrição.....	27
11. Controlo e prevenção da cárie.....	30
i. Remoção mecânica da placa.....	30
ii. Flúor e fosfatos.....	31
iii. Outros agentes anticáries.....	33

a.	Clorexidina e cloreto de cetilpiridínio.....	33
b.	Extrato de sanguinária.....	35
c.	Dodecilsulfato de sódio (SDS)	35
d.	Triclosan.....	35
e.	Antibióticos clássicos.....	36
f.	Bacteriocinas.....	37
iv.	Formas de controlo na dieta.....	37
12.	Vacinas anticárie	38
i.	Adesinas.....	39
ii.	Glucosiltransferases (GTFs)	41
iii.	Proteínas de ligação ao glucano (GBPs)	42
iv.	Vacinas de subunidade.....	44
a.	Péptidos sintéticos.....	44
b.	Vacinas recombinantes e vetores de expressão atenuados.....	46
v.	Vacinas conjugadas.....	46
vi.	Vias de administração de vacinas anticárie.....	47
vii.	Adjuvantes.....	48
a.	Toxina da cólera/ enterotoxinas termo-lábeis da <i>E. coli</i>	48
b.	Microcápsulas e micropartículas.....	49
c.	Lipossomas.....	50
viii.	Imunização Passiva.....	50
III.	Conclusão.....	52
IV.	Bibliografia.....	53

I. Introdução

A cárie dentária tem sido alvo de grande interesse por parte de investigadores de todo o mundo. Com o objetivo de resolver este problema têm-se desenvolvido vários estudos imunológicos e biomoleculares com base na dinâmica do processo carioso (Motta *et al.*, 2006).

Embora se pense o contrário, o facto é que esta patologia já existe desde a era dos dinossauros, tendo sido encontrada em diversos fósseis de animais, como por exemplo de peixes existentes há cerca de 280 milhões de anos, de dinossauros herbívoros de há 70 milhões de anos, de répteis, macacos, pré hominídeos de há 54 milhões de anos e ainda em mamíferos de há 25 milhões de anos. Parece ainda ter estado presente no *Homo sapiens* há mais de um milhão de anos. Vários registos de arte rupestre da era antes de Cristo, relatam a presença de cárie dentária como “vermes”. Hipócrates (460-377 a.C.) sugere que a própria alimentação influencia o aparecimento da cárie dentária. Por sua vez Aristóteles (384-322 a.C.) indicou que a natureza doce e macia dos figos apodrecia os dentes e provocava cárie. Anos mais tarde a cárie é considerada uma verminose por Guy de Cabuliac (1300-1368). Em 1683, por observação microscópica, Antony Van Leeuwenhoek descreve a presença de “pequenos microrganismos extraídos de um dente comprometido” e alerta ainda para o facto de o mesmo provocar dor e desconforto no dente. Cerca de 150 anos mais tarde, Erdl descreve que à superfície dos dentes se visualizava a presença de parasitas filamentosos, mas é Miller (1853-1907) que, com base nas suas investigações, descobre que a cárie é resultado da produção de ácidos na boca por ação de microrganismos lá existentes (Jorge, 1995).

Atualmente, sabe-se que a cárie é uma doença infecciosa provocada pela placa bacteriana existente à superfície dos dentes. Os microrganismos que constituem esta “placa” são os responsáveis pela produção de ácidos, como produto resultante do seu metabolismo, que destroem o dente (Motta *et al.*, 2006). Considera-se ainda que o aparecimento de cáries está inerente à interação de três fatores sendo eles: os hábitos alimentares do hospedeiro, a sua flora bucal comensal e ainda os seus hábitos higiénicos (Jorge, 1995).

Com o progresso da ciência e da tecnologia criaram-se materiais específicos, desenvolveram-se técnicas de restauração dentária, novos produtos de higiene bucal, etc. No entanto a verdadeira ambição de muitos investigadores é encontrar uma forma preventiva da cárie. Nesse sentido vários estudos têm sido realizados de modo a encontrar uma forma de imunização contra a cárie. Atualmente estão disponíveis três possibilidades, sendo elas: a indução do sistema imunitário comum da mucosa, a indução do sistema imunológico sistémico e por fim a imunização passiva com aplicação tópica de anticorpos na superfície do dente (Balakrishnan et al., 2000).

Presentemente a produção de vacinas anticárie é uma realidade muito distante, primeiramente porque não se trata de uma doença mortal e por outro lado porque é maior o número de pessoas que não a têm (Motta *et al.*, 2006).

II. A Cárie

1. Definição de cárie dentária

A cárie dentária é uma doença infecciosa, de origem endógena e de carácter multifatorial. É caracterizada pela destruição localizada dos tecidos duros do dente por ação da microbiota naturalmente existente na boca do ser humano (Samaranayake, 1996).

A flora comensal da boca utiliza preferencialmente como substrato os hidratos de carbono ingeridos pelo homem. Como resultado do metabolismo destes açúcares são produzidos ácidos que provocam então a desmineralização do esmalte e, posteriormente, da dentina (Samaranayake, 1996).

A desmineralização do dente significa a perda de cristais de hidroxiapatite e consequentemente a perda de integridade estrutural do dente. A natureza bacteriana da doença pode evoluir para uma infeção crónica do dente da qual resulta a perda do suporte ósseo alveolar e consequentemente do próprio dente (Wolinsky, 1997).

Os conhecimentos atuais suportam que o aparecimento da cárie dentária depende da interação simultânea de três fatores, sendo eles:

- hospedeiro, estrutura do esmalte e composição salivar;
- placa bacteriana;
- dieta (Jorge, 1995).

2. Epidemiologia

A cárie dentária é uma das doenças mais comuns no homem e existe em todo o mundo. No entanto, a sua prevalência e gravidade variam de população para população consoante a disponibilidade de açúcar (Samaranayake, 1996).

A industrialização foi um dos acontecimentos históricos que permitiu o aumento da disponibilidade de açúcar e por conseguinte um maior consumo do mesmo pela população. Durante o século XIX e até meados do século XX, verificou-se um crescente aumento de cárie no mundo ocidental. A partir de 1980, verificou-se uma diminuição significativa da doença nos países desenvolvidos. Contudo, nos países em desenvolvimento, cuja prevalência da doença era diminuta, começou a verificar-se o aumento da mesma uma vez que o consumo de hidratos de carbono através da dieta surge como principal fonte de energia (Jorge, 1995).

3. Classificação

A cárie dentária pode ser classificada segundo o local lesionado:

- Cáries de fissuras ou sulcos/ cáries de oclusão – existentes em molares e pré-molares;
- Cáries da superfície lisa – existentes na superfície dos dentes abaixo do ponto de contacto;
- Cáries da superfície radicular – existentes no cimento e/ou dentina quando a raiz do dente se encontra exposta;
- Cáries recorrentes – associadas à restauração dentária (Samaranayake, 1996).

4. Histopatologia da cárie

Macroscopicamente a existência de cáries à superfície dos dentes é caracterizada pela presença de uma área mais esbranquiçada sobre o esmalte. Microscopicamente as lesões de esmalte, provocadas pela cárie dentária, estão divididas em quatro zonas distintas, sendo elas:

- a zona mais interna que apresenta cerca de 1,2% de perda de minerais que, por sua vez, confere ao dente uma aparência translúcida;
- uma zona mais escura, situada acima da zona mais interna, com cerca de 6% de desmineralização;
- o corpo da lesão com aproximadamente 24% de perda de minerais, facilmente identificado através do exame macroscópico com recurso a meios mecânicos, pela presença de uma cavidade;
- a camada superficial, aparentemente intacta mas cuja presença de fissuras sobre a mesma comprova a sua relativa desmineralização (Wolinsky, 1997).

Como já referido anteriormente, a perda de minerais do dente está diretamente relacionada com o metabolismo de hidratos de carbono ingeridos na alimentação, pela flora bacteriana existente à superfície do dente, do qual resulta a produção de ácidos (Wolinsky, 1997).

O ácido láctico complexa com o cálcio existente nos cristais de hidroxiapatite à superfície do dente, causando a sua desmineralização (Balakrishnan, 2000). À medida que a hidroxiapatite dissolvida aumenta vão-se desenvolvendo mais cavidades à superfície e na matriz do esmalte, provocando inevitavelmente o seu enfraquecimento. A destruição progressiva do esmalte constitui um mecanismo propício ao acesso das bactérias às camadas mais profundas do dente (Wolinsky, 1997).

As cáries iniciais de esmalte são asséticas e resultam apenas da ação dos ácidos produzidos sobre a hidroxiapatite. Por esse motivo apresentam uma elevada taxa de remineralização. Contudo, assim que as bactérias alcançam a dentina, rapidamente se espalham em toda a largura e comprimento da junção dentina-esmalte, uma vez que

nesta junção encontram um meio celular que lhes permite o fácil movimento e desenvolvimento (Wolinsky, 1997).

As lesões da dentina podem ser divididas em várias zonas, sendo elas:

- a. Zona de necrose bacteriana, mais superficial;
- b. Área de invasão bacteriana;
- c. Corpo da lesão ou área de desmineralização;
- d. Zona de esclerose dentinária;
- e. Zona de degeneração gorda;
- f. Zona mais interna constituída por odontoblastos retraídos (Wolinsky, 1997).

5. Fisiologia da cárie

Os primeiros relatos de cárie dentária datam de há alguns milhões de anos e encontram-se gravados nalgumas relíquias históricas como: pinturas rupestres, placas de argila, ossos de oráculo, e escritos antigos do tempo de Cristo (Jorge, 1995). Embora observada desde os primeiros anos de vida humana, a base científica do processo cariioso só se conheceu em 1890 quando o Dr. Miller afirmou que esta doença era causada por ação de ácidos orgânicos sobre o dente. Durante a sua investigação, demonstrou que da associação da saliva com hidratos de carbono, ocorre a formação de ácidos e que estes causam a dissolução do dente. Após a sua descoberta, Miller formulou a base da teoria placa – hospedeiro – substrato que revela que a diminuição de pH na boca, característica da produção de ácidos pelas bactérias da saliva, quando em contacto com açúcares, leva à inevitável decomposição do esmalte (Wolinsky, 1997).

O esmalte é a estrutura mais mineralizada de todo o corpo humano e tem uma taxa de calcificação equivalente a 95%. Destes 95%, o mineral predominante é a hidroxiapatite que pertence à família dos sais de fosfatos de cálcio. Ainda que extremamente mineralizado e duro, a superfície do esmalte é, de facto, muito porosa o que lhe confere algum grau de permeabilidade para iões como sódio, potássio, magnésio e flúor (Wolinsky, 1997).

Atualmente sabe-se que a solubilidade da hidroxiapatite depende de fatores como força iónica do solvente, pH e temperatura do meio. Deste modo qualquer

alteração destes parâmetros pode implicar a solubilização da hidroxiapatite. Na boca, a saliva é muito concentrada em cálcio e fosfato o que favorece o estado cristalino do esmalte e por sua vez a manutenção do dente. No entanto, a cavidade oral é, como muitas outras partes do corpo, um local onde ocorrem algumas reações, resultantes da ingestão de alimentos e da troca iônica, e por isso as suas propriedades químicas não se mantêm constantes ao longo do dia. Isto significa que o dente se encontra em constante estado de mineralização e desmineralização. Em condições fisiológicas (pH a 6,8), a solubilidade da hidroxiapatite é muito pequena mas quando o pH desce para 5,5, a solubilidade deste cristal aumenta de tal modo que a integridade do dente é afetada (Wolinsky, 1997).

6. Teorias da etiologia da cárie

i. Teoria quimioparasitária

Após várias investigações de teor laboratorial Miller demonstrou que:

- ao incubar misturas de saliva com hidratos de carbono, ocorre a formação de ácido láctico;
- nas lesões cariosas predomina um pH ácido;
- o ácido causador de cárie é produzido por mais de trinta espécies de bactérias existentes a nível da boca;
- os microrganismos que alcançam a dentina cariada podem ser do tipo filamentosos, bacilos longos ou curtos, e cocos;
- alguns alimentos como pão e açúcar, quando misturados com saliva e colocados à temperatura de 37° C, podem desmineralizar a coroa do dente por completo (Jorge, 1995).

Tendo em conta todas estas descobertas, em 1890, Miller propôs a teoria quimioparasitária como ponto de origem para a cárie dentária. Esta teoria afirma que a formação de cáries resulta da produção de ácidos e da digestão de proteínas pelas bactérias existentes na boca e que a lesão cariosa ocorre em duas etapas, sendo elas a descalcificação dos tecidos duros e posteriormente a dissolução dos tecidos moles (Jorge, 1995).

ii. Teoria acidogénica

Esta teoria propõe que a descalcificação do esmalte resulta da presença de ácidos produzidos por bactérias da flora comensal da boca. Tem por base alguns estudos experimentais:

- a produção de ácidos pela placa bacteriana leva à diminuição do pH da boca para menos de 5,5;
- o valor de pH é mais baixo, ou seja mais ácido, no local onde se encontra a cárie dentária em relação aos tecidos mais próximos;
- a presença de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* está relacionada com o aparecimento de cáries, uma vez que ambos são capazes de produzir ácidos quando em contacto com hidratos de carbono ingeridos na alimentação;
- em ratos *germ-free* observou-se que as bactérias da boca produtoras de ácido mas sem capacidade proteolítica, podem originar a cárie dentária (Wolinsky, 1997).

iii. Teoria proteolítica

Não muito aceite atualmente, esta teoria afirma que as enzimas proteolíticas da placa bacteriana atuam sobre a porção orgânica do esmalte levando à sua dissolução e posterior destruição (Wolinsky, 1997).

iv. Teoria da proteólise – quelação

Embora muito pouco evidenciada cientificamente, esta teoria afirma que a desmineralização do esmalte ocorre devido à presença de agentes quelantes, como o lactato, que se associam aos iões de cálcio livres. Deste modo, uma vez que a concentração de cálcio é menor, o equilíbrio da reação calcificação↔desmineralização dá-se no sentido de desmineralização e a dissolução dos cristais de esmalte ocorre sem necessitar de pH ácido (Wolinsky, 1997).

7. Microrganismos e cariogenicidade

Os microrganismos que formam a placa dentária constituem um pré-requisito para o desenvolvimento de cáries dentárias (Samaranayake, 1996). Várias investigações realizadas em laboratório demonstraram que a cárie dentária ocorre apenas na presença de microrganismos. Recorrendo a técnicas *in vivo* observou-se que:

- em animais *germ-free* a cárie apenas se desenvolve na presença de bactérias;
- as bactérias da boca provocam a desmineralização do esmalte (Wolinsky, 1997).

No que respeita a técnicas *in vitro* verificou-se, através de estudos histológicos, a presença de bactérias orais no interior do esmalte e da dentina com lesão cariiosa (Wolinsky, 1997).

A complexidade do processo carioso não permite determinar todas as características dos microrganismos da boca responsáveis pela sua virulência. Contudo é possível referir alguns fatores que determinam o potencial cariogénico dos diversos microrganismos:

- mecanismos de aderência à cavidade bucal;
- capacidade de produzir ácido;
- capacidade de permanecer em meio ácido;
- metabolização de polissacarídeos intra e extracelulares (Jorge, 1995).

i. Streptococcus

a. *Streptococcus mutans*

São cocos imóveis Gram-positivo, anaeróbios e catalase-negativos, frequentemente encontrados em lesões cariosas de superfície lisa. (Wolinsky, 1997). Após vários estudos, em 1924, Clarke aponta este microrganismo como agente etiológico primário para este tipo de cárie. A sua denominação, *S. mutans*, deve-se ao facto de, apesar de serem cocos, apresentarem uma forma mais oval do que esférica (Jorge, 1995).

O potencial cariogénico deste microrganismo resulta da sua capacidade para:

- fermentar açúcares produzindo grandes quantidades de energia e ácido láctico, responsável pela dissolução do esmalte;
- atingir um pH de 3,4 num período de 18 a 24h e manter o crescimento microbiano em meio ácido durante longos períodos de tempo;
- sintetizar moléculas de dextrano, que permitem a adesão das diversas bactérias à superfície do dente;
- produzir polissacarídeos intracelulares como substrato de reserva para quando os níveis de hidratos de carbono, provenientes da dieta do indivíduo, forem baixos (Jorge, 1995).

b. Streptococcus sanguis

Encontram-se predominantemente em cáries de sulcos ou fissuras. Assim como *S. mutans*, são bactérias produtoras de ácido através do metabolismo de açúcares como glicose, trealose e sacarose. *S. sanguis* coloniza dentes e língua (Jorge, 1995).

c. Streptococcus salivarius

Apresentam um potencial cariogénico baixo pela produção de ácido e por vezes de dextrano. São fermentadores da glicose, sacarose, maltose, rafinose e esporadicamente de trealose e lactose. Encontram-se principalmente sobre a placa bacteriana, na garganta e na nasofaringe (Jorge, 1995).

d. Streptococcus milleri

Colonizam a superfície dos dentes e os sulcos gengivais (Jorge, 1995).

ii. *Lactobacillus spp.*

Encontram-se sob a forma de bacilos Gram-positivo, sendo anaeróbios aerotolerantes. Contudo apresentam um desenvolvimento mais rápido em condições de microaerofilia (Jorge, 1995). Estes microrganismos podem então realizar tanto o metabolismo oxidativo como o fermentativo dependendo das condições ambientais em

que se encontram. Uma das principais características deste grupo de bactérias é a sua capacidade de produção de ácido láctico e de desenvolvimento e sobrevivência no meio acidófilo criado por si (Wolinsky, 1997).

Dentro das várias espécies de *Lactobacillus*, as mais encontradas na boca são *L. casei* na placa bacteriana e dentina cariada, *L. fermentum* e *L. acidophilus* na saliva (Jorge, 1995).

A função do *Lactobacillus* no processo cariioso não está ainda bem definida. No entanto alguns estudos bacteriológicos permitiram concluir que:

- se encontram em maior número nas superfícies de esmalte, na placa bacteriana e na saliva imediatamente antes do aparecimento da cárie;
- em indivíduos com predisposição para o aparecimento de cáries a sua contagem aumenta na saliva;
- uma maior ingestão de hidratos de carbono aumenta significativamente o desenvolvimento destas bactérias na saliva e a atividade da cárie (Jorge, 1995).

iii. *Actinomyces spp.*

Estas bactérias são bacilos Gram-positivo de tamanho variável. As espécies encontradas na microbiota bucal podem ser anaeróbias obrigatórias, *A. israeli*, e aeróbias ou anaeróbias facultativas como *A. viscosus*, *A. naeslundii* e *A. odontolyticus* (Jorge, 1995).

São microrganismos fermentadores da glicose e conseqüentemente produtores de ácido láctico. São ainda bons formadores de placa bacteriana (Jorge, 1995).

Actinomyces spp. está associado ao desenvolvimento de cáries da superfície radicular. No entanto apesar da sua predominância na maioria das amostras retiradas das lesões da superfície radicular, alguns estudos relataram a presença simultânea de *S. mutans* e *Lactobacillus* nessas lesões. Adicionalmente, os locais de onde *S. mutans* e *Lactobacillus* foram isolados apresentavam um maior risco de desenvolvimento de cáries da superfície radicular (Samaranayake, 1996).

iv. *Vellonella spp.*

Vellonella é um grupo de cocos anaeróbios Gram-negativo encontrado em grande número em amostras isoladas de placa subgengival. Uma vez que necessita de lactato para se desenvolver mas não tem capacidade de metabolizar hidratos de carbono da dieta normal, usa produtos de metabolismo de outros microrganismos e converte-os em ácidos orgânicos fracos e menos cariogênicos. Deste modo, é possível afirmar que estas bactérias exercem um efeito protetor em cáries dentárias (Samaranayake, 1996).

8. Bioquímica da placa bacteriana

As bactérias que formam a placa dentária têm a capacidade de fermentar seletivamente alguns hidratos de carbono, ingeridos na dieta do indivíduo, convertê-los em ácidos orgânicos, capazes de dissolver o esmalte, e em dextranos insolúveis e pegajosos, capazes de fixar a placa ao dente e de continuar a fornecer-lhes substrato durante longos períodos de tempo (Wolinsky, 1997).

Tal como todos os organismos vivos, as bactérias necessitam de energia para a sua manutenção, crescimento e realização das suas funções vitais. Para o efeito utilizam a via glicolítica para a síntese de moléculas de energia. Este processo bioquímico inicia-se quando moléculas de glicose estão presentes no meio e são quebradas em duas moléculas de lactato pela ação do complexo enzimático das bactérias. A produção de ácidos orgânicos, como o ácido láctico, é a característica fundamental para o desenvolvimento da cárie dental, ou seja, para a degradação da hidroxiapatite. No entanto, para o desenvolvimento e manutenção da placa dentária sobre a superfície do dente, uma outra característica essencial é a capacidade de produção de polissacarídeos extracelulares que fixam a placa ao dente impedindo a sua fácil remoção pela saliva, alimentos, mastigação, etc (Wolinsky, 1997).

A produção dos polissacarídeos pelas bactérias é possível através de enzimas denominadas de transferases que transformam dissacarídeos como a sacarose em polissacarídeos de cadeia longa. Exemplos disso são a síntese de glucanos a partir de unidades de glucose e levanos a partir de moléculas de frutose. Os glucanos e levanos

podem ser encontrados na cavidade oral na forma solúvel e insolúvel apresentando duas funções distintas:

- polissacarídeos insolúveis têm como função permitir a agregação da placa bacteriana como uma espécie de massa e permitir a sua fixação e aderência ao dente;
- polissacarídeos solúveis funcionam como substrato de reserva quando os hidratos de carbono provenientes da dieta do indivíduo são escassos (Wolinsky, 1997; Banas e Vickerman, 2003).

O processo de síntese de polissacarídeos consiste em:

- ligação das transferases à membrana e a moléculas de sacarose;
- quebra da ligação diemiacetal entre a glicose e a frutose, componentes da sacarose, e libertação de grandes quantidades de energia;
- transferência e ligação da molécula de glicose para outra molécula de glicose previamente ligada à membrana (primer);
- adição sequencial de moléculas de glicose e formação do glucano de cadeia longa (Wolinsky, 1997).

9. Formação da placa bacteriana

A formação da placa bacteriana caracteriza-se pela forte aderência e vasta colonização das bactérias na superfície dentária. Trata-se, no entanto, de um processo seletivo uma vez que, dada a grande variedade de espécies que fazem parte da flora normal da boca, apenas um grupo de bactérias, com determinadas características, é responsável pela colonização da cavidade oral, o *S. mutans*. A seletividade deste processo resulta, em princípio, da afinidade que só algumas espécies apresentam com constituintes salivares específicos como por exemplo, proteínas altamente carregadas e glicoproteínas. Estas por sua vez, por meio de interações eletrostáticas, adsorvem-se rapidamente à superfície do esmalte formando um biofilme (Wolinsky, 1997; Motta *et al.*, 2006).

Foi Newbrun que descreveu as três fases de desenvolvimento da placa dentária sendo que: a primeira consiste na colonização inicial, a segunda envolve adesão à

superfície do dente e rápido crescimento bacteriano e a terceira baseia-se na alteração das condições do meio e desmineralização dentária (Wolinsky, 1997; Motta *et al.*, 2006).

Relativamente à primeira etapa, a colonização inicial, é única e exclusivamente realizada pelos *Streptococcus spp.* e apresenta um período de duração de duas horas. A associação destes microrganismos orais à película de proteínas e glicoproteínas que revestem os dentes é atualmente suportada por duas teorias:

1. proposta em 1979 por Rolla. Sugere que a ligação entre a flora bucal e a película dentária dá-se por meio de interações eletrostáticas entre a parede celular negativa das bactérias e os iões de cálcio, carregados positivamente, complexados na superfície do dente. Apesar de suportada por alguns estudos, esta teoria não consegue explicar o facto de algumas bactérias orais, sem parede celular e carga negativa na sua superfície, aderirem de igual modo ao esmalte;
2. sugerida por Gibbons em 1977. Afirma que a adsorção entre as diferentes estirpes de bactérias e a superfície do esmalte ocorre através de interações do tipo lectina, que envolvem recetores específicos presentes à superfície da parede bacteriana e as glicoproteínas do biofilme dentário (Wolinsky, 1997).

Os recetores bacterianos, intervenientes na interação placa-biofilme, são proteínas da superfície celular, descritas por Russell e Lehner como adesinas e referidas frequentemente como antigénio I/II nos *S. mutans* (Nogueira *et al.*, 2008; Pinto *et al.*, 2005). Por meio de ligação ácida as adesinas interagem com as glicoproteínas do tipo mucina encontradas no biofilme salivar, que reveste a superfície dentária (Smith, 2003).

Durante um período de doze a catorze horas dão-se, à superfície dos dentes, os processos de aderência secundária que têm como objetivo final uma colonização e adesão bacteriana bem definida. Os processos de aderência secundária envolvem, como referido anteriormente, a presença de um substrato, açúcares ingeridos na alimentação, e a partir do mesmo a produção de polissacarídeos extracelulares solúveis e insolúveis, glucanos e levanos, que atuam como uma cola biológica fixando a placa bacteriana ao dente (Wolinsky, 1997; Banas e Vickerman, 2003).

Os polímeros de glucose sintetizados fornecem a estrutura base para a agregação de *Streptococcus* através da sua interação com proteínas de ligação a glucanos existentes nas bactérias, as GBPs – glucan-binding proteins (Smith, 2003; Nogueira *et al.*, 2008).

A produção dos polissacarídeos é realizada na presença de um único substrato, a sacarose, e com recurso a várias glucosiltransferases. Estudos vieram ainda revelar que espécies de bactérias incapazes de sintetizar glucanos insolúveis em água possuem uma menor habilidade para aderir à superfície do dente e induzem uma menor incidência de cárie. Deste modo foi possível afirmar que a síntese de polissacarídeos insolúveis é um fator de virulência determinante (Balakrishnan, 2000).

O crescimento da placa bacteriana encontra-se limitado pela mastigação sendo mais acentuado nas áreas cervicais e interproximais dos dentes. Por consequência, estas são de facto as zonas com maior incidência de cárie dentária. Entre dois a três dias mais tarde, o ambiente interno da placa bacteriana torna-se mais anaeróbio sendo propício ao desenvolvimento de outro tipo de bactérias. Adicionalmente ao aumento da placa bacteriana, observa-se também o aumento da sua massa gelatinosa sobre o esmalte (Wolinsky, 1997).

10. Fatores do hospedeiro

A formação da cárie dentária e a sua progressão através do esmalte é um processo moroso que está dependente de alguns fatores inerentes ao hospedeiro. Dentro destes fatores encontramos dois grupos, os que favorecem a formação e o crescimento da cárie dentária e os que impedem a mesma (Wolinsky, 1997).

Os principais fatores do hospedeiro são a estrutura do esmalte e a composição e a taxa de fluxo salivar (Samaranayake, 1996). A anatomia dos dentes, a composição da película, a presença de imunoglobulinas e, ainda, a dieta do hospedeiro são exemplos de outros fatores que interferem com o processo de formação da cárie (Wolinsky, 1997).

i. Anatomia dos dentes

Trata-se de um fator intrínseco do hospedeiro que pertence ao grupo dos fatores que favorecem o aparecimento de cárie dentária. A presença de sulcos e fissuras profundas nos diversos tipos de dentes e o contacto interproximal dos mesmos são os locais prediletos para o desenvolvimento da placa bacteriana, uma vez que são pontos de difícil acesso (Wolinsky, 1997).

ii. Componentes salivares ativos

Um outro fator que influencia diretamente a formação de cárie é a composição salivar e a sua taxa de fluxo. A lavagem mecânica da saliva é um mecanismo muito eficaz na remoção de restos de alimentos e de microrganismos soltos na cavidade oral (Samaranayake, 1996).

Vários estudos demonstram que esta secreção é composta por substâncias químicas ativas e passivas que atuam como defesa primária contra a cárie. Esses mesmos estudos evidenciam ainda que uma vez cessada a produção de saliva, ocorre o aparecimento da cárie (Wolinsky, 1997).

No que respeita aos componentes salivares ativos, estes funcionam como antibióticos podendo assumir uma função bactericida ou bacteriostática contra a flora normal. Quimicamente tratam-se de enzimas antimicrobianas salivares. Atualmente estão identificadas e caracterizadas três enzimas salivares sendo elas: lisozima; lactoferrina; lactoperoxidase (Wolinsky, 1997).

A lisozima encontra-se principalmente na saliva da parótida sendo eficaz contra bactérias Gram-positivo. Inicialmente pensava-se que promovia a desorganização da parede celular com consequente lise da célula bacteriana no entanto, alguns estudos posteriores vieram a demonstrar que não era de todo eficaz (Wolinsky, 1997).

A lactoferrina atua como agente complexante do ferro, essencial ao crescimento bacteriano. Trata-se de uma enzima que apresenta na sua composição moléculas de enxofre, o qual se liga ao ferro diminuindo a disponibilidade do mesmo para as

bactérias. Deste modo não existe no meio ferro livre para assegurar o crescimento bacteriano (Wolinsky, 1997).

Por sua vez, a lactoperoxidase atua por destabilização do sistema metabólico das bactérias. Na presença de peróxido de hidrogénio e iões tiocianato, a enzima catalisa a formação de iões hipotiocianato, cuja afinidade para o grupo sulfidril das proteínas leva à sua desnaturação e ao desarranjo do sistema enzimático bacteriano (Wolinsky, 1997).

iii. Componentes salivares passivos

Neste grupo encontram-se reunidos fatores como tampões salivares, proteínas da película e ainda imunoglobulinas (Wolinsky, 1997).

Uma das principais características da saliva na defesa do hospedeiro é a sua elevada capacidade tampão que neutraliza ácidos produzidos pela placa bacteriana na superfície dentária (Samaranayake, 1996).

De facto a saliva possui na sua composição dois sistemas tampão capazes de neutralizar os ácidos orgânicos fortes, produzidos pelas bactérias após fermentação dos açúcares ingeridos na dieta. Um deles e o mais eficaz é o bicarbonato-carbonato já que tem a capacidade de tamponar rapidamente um meio ácido a um valor de pH de aproximadamente 6,1, impedindo assim a desmineralização do esmalte. O fosfato é o segundo sistema tampão presente na saliva. No entanto algumas investigações consideram o tampão bicarbonato-carbonato mais eficaz, uma vez que:

- a sua constante de dissociação é eficaz na faixa de produção dos ácidos da placa bacteriana;
- reage rapidamente com os ácidos pela perda de CO₂;
- à medida que o fluxo salivar aumenta, o tampão bicarbonato aumenta mas o tampão fosfato diminui (Wolinsky, 1997).

Uma outra característica da saliva na defesa contra a placa bacteriana é a presença de proteínas na película. Sabe-se que a superfície de esmalte é mais resistente aos ácidos orgânicos que a camada mineral, mais interna. No entanto, por meio de estudos *in vitro* e *in vivo*, acredita-se que a película que reveste a superfície de

hidroxiapatite lhe confere uma maior estabilidade e resistência contra os ácidos (Wolinsky, 1997).

A saliva, tal como muitas outras secreções glandulares, possui na sua composição imunoglobulinas. Estas são proteínas que atacam corpos estranhos ao indivíduo, participando diretamente na defesa do organismo. A imunoglobulina salivar mais importante da cavidade oral é a IgA secretora (Smith, 2003). Esta é constituída por dois monómeros de IgA ligados por uma proteína secretora, que lhe facilita o movimento na saliva e lhe confere resistência contra as enzimas proteolíticas da boca. Pensa-se que as IgA atuam contra as bactérias como aglutininas específicas, isto é, formam aglomerados de bactérias impedindo a sua adesão à superfície oral (Wolinsky, 1997).

iv. Dieta e nutrição

Dieta e nutrição são dois conceitos que, embora semelhantes, aparecem neste tema complexo com dois significados distintos. A nutrição é o processo pelo qual os alimentos são processados e metabolizados no organismo, e assume um papel fundamental na fase de formação e desenvolvimento dos dentes. Um exemplo disso é a incorporação de fluoretos na alimentação cuja absorção sistémica resulta numa maior resistência à cárie. Outros compostos que, quando incorporados e absorvidos sistemicamente, parecem ter também um efeito similar ao dos fluoretos são o cálcio e o fósforo, muito embora os estudos realizados se mostrem ainda inconclusivos (Wolinsky, 1997). Relativamente ao seu efeito local a concentração de cálcio e fósforo na saliva mostra ser de extrema importância na remineralização de lesões de manchas brancas (Samaranayake, 1996).

Por outro lado, entende-se por dieta o simples consumo de alimentos. Esta, em oposição ao conceito de nutrição, apresenta efeitos locais ou seja na cavidade oral (Wolinsky, 1997).

Muitos estudos foram realizados ao longo de vários anos, por diversos investigadores, no sentido de demonstrar que a prevalência e incidência de cárie

dentária encontra-se diretamente relacionada com o consumo de açúcares na dieta (Samaranayake, 1996).

O primeiro estudo realizado decorreu em 1940 por Stephan no qual efetuou lavagens da cavidade oral com açúcar num período de dois a três minutos. O resultado observado foi a diminuição abrupta de pH da placa de 6,8 para 5,0. Observou ainda que esse decréscimo de pH dura vinte minutos e que é necessário cerca de quarenta minutos para atingir novamente o pH normal. Posteriormente, foi realizado um estudo similar no qual se efetuava múltiplas lavagens da cavidade oral com sacarose. Com um número de exposições à sacarose maior observou-se um efeito aditivo sobre a produção de ácidos pela placa bacteriana. Experiências realizadas em roedores, com o objetivo de medir a cariogenicidade dos vários alimentos e bebidas, provaram que existe de facto uma correlação e uma proporcionalidade direta entre o consumo de sacarose e a incidência de cárie (Wolinsky, 1997).

Valores de pH inferiores a 5 são fatores críticos para a desmineralização do esmalte. No caso de exposição frequente a açúcares da dieta, a taxa de desmineralização dentária irá exceder a taxa de remineralização e a formação de cárie ocorrerá. Por outro lado se a exposição à sacarose é limitada a taxa de remineralização dos dentes é superior à taxa de desmineralização e a formação de cárie é impedida (Balakrishnan, 2000).

O investigador Vipeholm estudou, em pacientes institucionalizados na Suécia, os efeitos da frequência e o tipo de hidratos de carbono sobre a cárie. Veio a concluir que um maior consumo de alimentos contendo sacarose aumenta significativamente a ocorrência de cárie (Wolinsky, 1997).

Uma outra investigação, praticada em crianças de um orfanato, baseada na restrição de açúcares na dieta, mostrou uma queda de 10% da atividade cariogénica quando comparada com crianças cuja dieta não sofreu alterações. Observou-se ainda que após a saída dessas crianças do orfanato e a cessação da dieta restrita os seus índices de CPOD, dentes permanentes cariados, obturados ou perdidos, aproximaram-se dos da população normal (Wolinsky, 1997).

No caso de indivíduos com intolerância hereditária à frutose, verificou-se que existe uma redução de 90% na prevalência de cárie quando comparada com indivíduos normais. Esta intolerância à frutose advém de uma diminuição da atividade da frutose-1-fosfato-aldolase, enzima responsável pela degradação da frutose. Sendo a capacidade de metabolização da frutose menor, tem de haver uma redução do consumo de alimentos contendo açúcares. Após todos os estudos realizados, concluiu-se que o tipo e a quantidade de exposições a hidratos de carbono influenciam diretamente quer a incidência quer a prevalência de cárie dentária (Wolinsky, 1997).

Embora exista um papel negativo dos hidratos de carbono da dieta sobre a cárie, existem compostos ingeridos na alimentação que parecem apresentar atividade anticariogénica. Um desses compostos é o fosfato que, quando inserido na dieta de animais leva a uma redução no índice de cárie. Sabe-se ainda que os efeitos anticariogénicos do fosfato são locais uma vez que:

- como referido anteriormente, o fosfato é um dos sistemas tampão encontrado na saliva e portanto tem a capacidade de neutralizar ácidos produzidos pelas bactérias;
- rompe ligações das proteínas, da película à superfície do dente, impedindo desta forma a adesão da placa bacteriana;
- o aumento da concentração de iões fosfato muda o equilíbrio da reação de dissociação da hidroxiapatite, favorecendo a formação do mineral na presença de ácidos (Wolinsky, 1997).

Os lípidos são outro composto com propriedades anticárie. Em modelos animais e estudos *in vitro* a adição de ácidos gordos de cadeia média e dos seus sais apresentaram uma redução da cárie (Wolinsky, 1997).

Gibbons e Dankers em 1981, Wolinsky e Sote em 1984 e ainda Staat e seus colaboradores em 1978 demonstraram que alguns extratos de plantas atuam como aglutininas bacterianas específicas, favorecendo a formação da placa com a sua atividade tipo lectina. Wolinsky e Sote demonstraram ainda que compostos polifenólicos como os taninos são de facto aglutininas bacterianas muito eficazes (Wolinsky, 1997).

Outros elementos da dieta que podem influenciar a formação da cárie são elementos como o bário, o molibdênio, estrôncio, vanádio e selênio. A permeabilidade do esmalte a estes iões pode alterar a sua constituição superficial e, por consequência, causar alterações na película (Wolinsky, 1997).

11. Controlo e prevenção da cárie

Tendo em conta o conhecimento atual sobre a etiologia da cárie dentária e os métodos de controlo e prevenção da mesma, seria de esperar que esta doença estivesse praticamente extinta nos países desenvolvidos. No entanto, ela continua presente em grande parte da população (Wolinsky, 1997).

Apesar dos inúmeros compostos propostos, ao longo dos anos, como agentes antibacterianos, ainda não existe nada no mercado que reduza significativamente os níveis de bactérias e o incremento de cárie (Featherstone e Doméjean, 2012).

Atualmente as abordagens mais usadas para controlo e prevenção da cárie recorrem principalmente a técnicas físicas ou mecânicas e a agentes quimioterápicos, sendo elas: remoção mecânica da placa; utilização de produtos com flúor; agentes bactericidas; xilitol (Samaranayake, 1996; Anusavice, 2005).

i. Remoção mecânica da placa

Axelsson *et al* mostraram que a cárie dentária pode ser prevenida através da escovagem regular dos dentes e do uso de fio dentário. No entanto a maioria dos estudos demonstra que a remoção de microrganismos de fissuras, superfícies interproximais dos dentes e sulcos é difícil quando apenas métodos mecânicos são aplicados. Para um controlo efetivo da cárie dentária, estes métodos devem ser associados à utilização de produtos contendo flúor ou outros agentes quimioterápicos (Samaranayake, 1996; Balakrishnan, 2000).

ii. Flúor e fosfatos

O aumento da resistência dentária ao desenvolvimento de cárie pode ser alcançado através do flúor. Acredita-se que a utilização de pastas dentífricas contendo flúor e outros ativos orais é a principal causa para a diminuição significativa da incidência de cárie nos países desenvolvidos. A administração de flúor pode ser efetuada sistemicamente, por meio de comprimidos, por aplicação tópica, através de pastas dentífricas ou colutórios, e ainda pelos médicos dentistas sob a forma de géis, soluções e vernizes. Em algumas partes do mundo, o flúor é também adicionado à água de consumo. Na cavidade oral o flúor liga-se aos cristais de hidroxiapatite formando fluorapatite que é mais estável, menos solúvel, mais resistente à desmineralização e estimula ainda a remineralização dentária (Samaranayake, 1996; Balakrishnan, 2000).

A função do flúor na remineralização do esmalte deve-se em grande parte à sua afinidade para o cálcio, com o qual forma um sal insolúvel, denominado fluoreto de cálcio. Este, em situações de desmineralização dentária, atua como reserva libertando o flúor que irá reagir com a desidroxiapatite e formar novamente fluorapatite. Adicionalmente aos seus efeitos químicos, o flúor apresenta também atividade antibacteriana, inibindo a enzima enolase presente nos *Streptococcus mutans* responsável pela metabolização de açúcares (Wolinsky, 1997).

No caso de administração excessiva de flúor pode ocorrer fluorose, sintoma de intoxicação na qual ocorre descoloração dos dentes e aparecimento de manchas esbranquiçadas. Alguns estudos demonstraram que a exposição contínua pode levar ao desenvolvimento de resistência ao flúor pelos *Streptococcus mutans*. No entanto sabe-se que as bactérias resistentes ao flúor não são cariogênicas uma vez que não produzem ácido suficiente para causar desmineralização do esmalte (Balakrishnan, 2000).

Os fosfatos têm sido usados como aditivos alimentares na prevenção da cárie dentária. Estudos relataram que a adição de trimetafosfato de sódio a chicletes e de fosfato de cálcio e sacarose na dieta previne a cárie. Em geral, fosfatos inorgânicos promovem a remineralização e quando presentes em grandes concentrações impedem a ativação da lactato desidrogenase diminuindo assim a produção de ácido (Balakrishnan, 2000).

Vários estudos foram realizados para suportar as teorias existentes. Um deles baseou-se na utilização de pastas dentífricas com cerca de 0,243% de fluoreto de sódio e 0,3% de triclosan em adultos. O resultado observado foi uma descida de 12,2% na incidência de cárie ao fim de um ano e uma descida de 16,6% ao fim de dois anos. Esta redução da cárie ao fim de dois anos foi significativamente maior comparativamente a uma análise na qual se usou uma pasta dentífrica semelhante sem a presença de triclosan. Este composto é um agente antibacteriano de largo espectro com actividade bacteriostática contra bactérias Gram-positivo e Gram-negativo (Anusavice, 2005).

Em 2001 o CDC (Centers for Disease Control and Prevention) sugeriu, com base nos seus estudos, que a exposição diária a pequenas quantidades de flúor reduz efetivamente o risco de cárie dentária em todas as faixas etárias. Recomendou ainda o consumo de água com um nível ótimo de flúor e a escovagem dos dentes duas vezes por dia com uma pasta dentífrica contendo flúor (Anusavice, 2005).

A revisão e avaliação da literatura científica, de 1966 a abril de 2003, levada a cabo por Twetman *et al.*, sobre o efeito preventivo das pastas dentífricas com flúor e a realização simultânea de estudos tiveram os seguintes resultados:

- 24,9% de efeito preventivo de cárie com utilização diária de pastas dentífricas com flúor em comparação com placebo;
- pastas dentífricas contendo 1,500 ppm de flúor demonstraram um efeito preventivo superior equivalente a 9,7%, quando comparadas com pastas dentífricas contendo 1,000ppm de flúor;
- a escovagem dos dentes quando supervisionada apresenta uma maior redução da incidência de cárie (Anusavice, 2005).

Em 2010, Nordstrom and Birkhed destacaram a necessidade de utilização de concentrações de flúor mais elevadas em indivíduos com alto risco de desenvolvimento de cáries. Um ensaio clínico, realizado durante dois anos em adolescentes, mostrou o efeito preventivo superior de um dentífrico com 5,000 ppm de flúor comparativamente a um dentífrico com 1,450 ppm (Featherstone e Doméjean, 2012).

iii. Outros agentes anticáries

Com a evolução da ciência e da tecnologia surgiram outros agentes químicos com atividade contra a cárie. Esses agentes possuem ação antibacteriana pela redução da formação da placa na cavidade oral (Wolinsky, 1997).

Idealmente, estes agentes quimioterápicos não deveriam apresentar as seguintes características:

- serem tóxicos ou alergênicos;
- provocarem manchas nos dentes;
- serem absorvidos através da mucosa oral ou gastrointestinal;
- perturbarem o equilíbrio da flora normal da boca permitindo o desenvolvimento de infecções oportunistas ou o desenvolvimento de resistências (Balakrishnan, 2000).

Os agentes quimioterápicos aplicados para eliminação de *Streptococcus mutans* incluem antibióticos clássicos como:

- agentes catiónicos como a clorexidina e o cloreto de cetilpiridínio;
- compostos derivados de plantas como o extrato de sanguinária;
- antibióticos clássicos;
- iões metálicos como cobre e zinco;
- agentes aniônicos como dodecilsulfato de sódio;
- agentes não iônicos como o triclosan.

Estes agentes são geralmente cedidos em pastas dentífricas ou colutórios mas podem também ser aplicados na forma de gel ou verniz (Balakrishnan, 2000).

a. Clorexidina e cloreto de cetilpiridínio

A clorexidina é um composto aromático derivado da bisguanida com excelentes propriedades bactericidas contra bactérias Gram-negativo e Gram-positivo. A sua atividade é maior contra *Streptococcus mutans* do que contra *S. sanguis* e *Lactobacillus* (Samaranayake, 1996; Balakrishnan, 2000).

Uma vez que a clorexidina é carregada positivamente, ela apresenta afinidade com várias superfícies como a hidroxiapatite, as mucosas, a película do esmalte e a superfície bacteriana carregada negativamente. Quando este composto químico se liga à superfície bacteriana provoca a ruptura da membrana celular, extravasamento do material citoplasmático, precipitação do conteúdo celular e morte celular. A adesão da clorexidina à película do esmalte e a sua libertação lenta funcionam como reserva e são responsáveis pelo prolongamento do seu efeito inibitório (Wolinsky, 1997).

Adicionalmente a clorexidina inibe enzimas metabólicas chave, como a glucosiltransferase e a fosfoenolpiruvato fosfotrasferase, e quando combinada com flúor ou iões metálicos, como o zinco, apresenta atividade bactericida aumentada. Quando a sua concentração na superfície oral é baixa, a clorexidina apresenta atividade bacteriostática (Balakrishnan, 2000). A sua utilização pode provocar alguns efeitos laterais como descoloração dos dentes e alteração do palato (Samaranayake, 1996; Wolinsky, 1997).

Relativamente aos ensaios de efetividade da clorexidina, Tenovuo *et al.* desenvolveu um estudo em dois grupos de mães com níveis de *Streptococcus mutans* superiores a 10^5 CFU/mL. No grupo 1, submeteu-as a um tratamento com 1% de clorexidina e 0,2% de fluoreto de sódio duas vezes por ano durante três anos. O grupo 2, grupo controlo, não recebeu nenhum tratamento. Como resultado observou que a primeira dentição dos descendentes do grupo 1, desde o primeiro ano de vida aos quatro anos, apresentava menor colonização por *Streptococcus mutans* e menos lesões que a descendência do grupo 2. Das cento e cinquenta e uma crianças estudadas 16%, 42% e 54% foram colonizadas por *Streptococcus mutans* aos dois, três e quatro anos, respetivamente. 28% das crianças colonizadas por *Streptococcus mutans* desenvolveram cárie aos quatro anos. Os resultados deste estudo sugerem que a redução materna de *Streptococcus mutans* pode atrasar ou até mesmo impedir, na descendência, a colonização da primeira dentição por *S. mutans* e, ainda, diminuir a incidência e a prevalência de cárie (Anusavice, 2005).

O cloreto de cetilpiridínio é um composto de amónio quaternário com atividade antibacteriana similar à da clorexidina. No entanto, após a sua adsorção às superfícies

orais, apresenta uma taxa de libertação mais rápida que, conseqüentemente, lhe confere uma menor duração dos seus efeitos (Balakrishnan, 2000).

b. Extrato de sanguinária

O extrato de sanguinária é uma preparação de ervas obtida através da planta *Sanguinária canadensis* por meio de extração alcoólica. O efeito inibitório desta preparação é inferior ao da clorexidina uma vez que as ligações que efetua com as superfícies são de tal maneira fortes que impedem a sua libertação e por conseqüência diminuem a sua biodisponibilidade. A atividade bactericida do extrato de sanguinária deve-se à sua interferência com a síntese da parede celular bacteriana (Balakrishnan, 2000).

c. Dodecilsulfato de sódio (SDS)

O dodecilsulfato de sódio (SDS) é um detergente muito comum nas pastas dentífricas. Apresenta atividade antibacteriana contra uma grande variedade de bactérias incluindo *S. mutans*. O SDS atua contra o desenvolvimento da placa dentária, competindo com as bactérias carregadas negativamente e proteínas da película pelos locais de ligação. A concentrações baixas pode inibir a atividade da *S. mutans* glucosiltransferase (Balakrishnan, 2000).

d. Triclosan

O triclosan é um composto fenólico com atividade antibacteriana de largo espetro. A atividade deste agente resulta da sua interferência com a função da membrana celular das bactérias (Balakrishnan, 2000).

O listerine é outro composto fenólico usado, à escala mundial, como colutório. O seu efeito bactericida é inferior ao da clorexidina. Apresenta como desvantagens um sabor desagradável e uma sensação de ardor (Balakrishnan, 2000).

e. Antibióticos clássicos

Muitos investigadores exploraram a possível utilização de antibióticos tradicionais na prevenção da cárie dentária. Os pioneiros deste estudo foram McClure e Hewitt mostrando, em 1946, que após a administração de penicilina em alimentos ou na água de consumo, a incidência de cárie e o número de *Lactobacillus* em ratos diminuiu. Posteriormente, em 1947, Zander e Bibby relataram que cinco em cada sete hamsters Golden Syrian cujos dentes foram escovados com pastas dentífricas contendo penicilina se encontravam isentos de cáries (Balakrishnan, 2000).

Em estudos humanos, Løe *et al.*, em 1967, observaram que colutórios com tetraciclina, vancomicina e polimixina reduziam a formação de placa bacteriana. Dentro destes três antibióticos, o que apresentou uma maior percentagem de redução foram os colutórios de tetraciclina. Da administração de vancomicina observou-se uma inibição de bactérias Gram-positivo ao contrário da polimixina que provocou inibição de bactérias Gram-negativo (Balakrishnan, 2000). Num ensaio clínico aleatório vinte e cinco crianças, entre os nove e os quinze anos de idade, foram tratadas com um gel contendo 15% de vancomicina e vinte e quatro estudantes de higiene dentária foram tratados com pasta contendo 1% de vancomicina. O tratamento foi efetuado duas vezes ao dia durante cinco dias, contra um grupo controlo para cada uma das análises. Ambos os grupos experimentais revelaram uma diminuição dos níveis de bactérias e uma supressão temporária da prevalência de *S. mutans* comparativamente aos grupos controlo (Balakrishnan, 2000; Caufield *et al.*, 2001).

Em 1969 Lobene *et al.* relataram que a administração de 250mg de eritromicina em suspensão, quatro vezes ao dia durante sete dias, diminuía a formação de placa até 35%. Em 1977 Loesche *et al.* mostraram que a aplicação duas vezes ao dia de canamicina durante uma semana reduzia o número de *S. sanguis* e *S. mutans*. Descobriram ainda que a aplicação de gel contendo canamicina, antes e depois da colocação de restaurações dentárias reduzia significativamente os níveis de *S. mutans* nas fissuras em cerca de cinco vezes relativamente a um grupo controlo (Balakrishnan, 2000; Caufield *et al.*, 2001).

Todos os estudos referidos demonstraram que o uso preventivo dos antibióticos tradicionais pode prevenir a cárie dentária contudo, são considerados contra-indicados uma vez que provocam o desequilíbrio da flora normal da boca, promovem o desenvolvimento de resistências e de infecções oportunistas graves que podem levar à morte (Balakrishnan, 2000; Caufield *et al.*, 2001).

f. Bacteriocinas

Trata-se de proteínas produzidas por uma grande variedade de bactérias Gram-negativo e Gram-positivo. São libertadas extracelularmente podendo matar as bactérias que as produziram, interferir com a sua atividade metabólica, replicação e viabilidade. Possuem atividade direta contra *S. mutans* constituindo assim um potencial mecanismo na prevenção da cárie dentária. Existem muitas vantagens na utilização de bacteriocinas anti-*mutans* como agentes anticáries uma vez que parecem não apresentar toxicidade, descoloração dentária ou paladar desagradável (Balakrishnan, 2000).

iv. Formas de controlo na dieta

Uma outra forma de controlo e prevenção da cárie é a utilização de substituintes da sacarose. A restrição de açúcar na dieta reduz efetivamente a produção de ácido e de polissacarídeos de cadeia longa. Xilitol, sorbitol, sacarina e aspartamo têm sido usados como substituintes de açúcares em chicletes, doces, rebuçados, produtos de higiene oral e produtos farmacêuticos, com o objetivo de reduzir a ocorrência de cárie (Balakrishnan, 2000).

O xilitol é um açúcar de cinco carbonos cujo nível de doçura é equivalente ao da sacarose mas, ao contrário do mesmo, não é fermentado pelo *Streptococcus mutans* (Balakrishnan, 2000).

Um estudo realizado por Mäkinen *et al.* relata a diminuição significativa de cárie em crianças após lhes ser dado, cinco vezes ao dia, pastilha elástica contendo xilitol. Isokangas *et al.* desenvolveu um estudo com dois grupos de mães com elevada concentração salivar de *Streptococcus mutans*. Ao primeiro grupo cedeu-lhes regularmente chicletes de xilitol enquanto que o segundo grupo recebeu um tratamento

com flúor ou clorexidina. De seguida avaliou a dentição dos descendentes de cada grupo de mães. Da sua investigação obteve como resultado uma redução, estatisticamente significativa, da colonização por *Streptococcus mutans* nos descendentes das mães xilitol. Observou ainda que no grupo xilitol as cáries de dentina, aos cinco anos, reduziram cerca de 70% comparativamente ao grupo flúor ou clorexidina. Os investigadores concluíram assim que o consumo maternal de pastilhas de xilitol pode evitar o aparecimento de cárie dentária nos seus descendentes, por impedimento da transmissão de mãe para filho de *Streptococcus mutans* (Anusavice, 2005).

Relativamente ao sorbitol, trata-se de um substituinte dos açúcares da dieta com seis carbonos cujo nível de doçura é 50% inferior ao da sacarose ou do xilitol. No entanto é um composto mais barato que pode ser usado em associação ao xilitol. Embora seja fermentado por microrganismos, nomeadamente *Streptococcus mutans*, apresenta uma taxa de produção de ácido significativamente inferior relativamente aos açúcares da dieta como a sacarose, a frutose, e a glucose (Balakrishnan, 2000).

Um outro substituinte, muito conhecido pela população, é a sacarina. Ela é trezentas vezes mais doce que a sacarose contudo apresenta um sabor amargo quando utilizada em concentrações superiores a 0,1%. A sacarina impede o desenvolvimento dos *Streptococcus mutans* por inibição competitiva da lactato desidrogenase (Balakrishnan, 2000).

O aspartamo é um dipéptido de ácido aspártico e fenilalanina duzentas vezes mais doce que a sacarina, usado frequentemente em refrigerantes sem açúcar e pastilhas elásticas. Pensa-se que tem como função inibir o metabolismo dos *Streptococcus mutans* (Balakrishnan, 2000).

12. Vacinas anticárie

O conceito de vacinação contra a cárie dentária existe, aproximadamente, desde a descoberta desta doença (Russel *et al.*, 2004). As vacinas têm mostrado um sucesso espantoso contra as mais diversas doenças infecciosas e a sua aplicação na prevenção da cárie parece lógica e oportuna. Muitos investigadores têm reunido algumas abordagens

para o desenvolvimento de vacinas anticárie quer por via oral, sistêmica ou imunização passiva (Balakrishnan, 2000).

Muitas das fases patogénicas da cárie dentária são passíveis de intervenção imunológica. Sendo o *Streptococcus mutans* o principal microrganismo responsável pelo desenvolvimento de cárie (Pinto *et al.*, 2005; Motta *et al.*, 2006; Mattos-Graner *et al.*, 2006) a maior parte do esforço experimental para a criação de vacinas anticárie centrou-se nos vários componentes que tornam possível a adesão e formação da placa, o desenvolvimento e a manutenção da cárie (Smith, 2002). Os métodos desenvolvidos para a formulação de vacinas foram:

- eliminação de microrganismos da cavidade oral por agregação mediada por anticorpos, durante a fase salivar, antes da colonização;
- bloqueio dos receptores necessários para a colonização (por exemplo, adesinas), acumulação (por exemplo, proteínas de ligação ao glucano GBPs) e inativação de enzimas (por exemplo, glucosiltransferases, GTF responsáveis pela síntese de glucanos), com recurso a anticorpos;
- modificação de funções metabólicas importantes;
- otimização da atividade antibacteriana do anticorpo salivar IgA por sinergismo com a lactoferrina ou mucina (Smith, 2002).

i. Adesinas

O processo de desenvolvimento de vacinas está dividido em duas fases sendo elas: a identificação de antígenos específicos de *Streptococcus*, contra os quais é possível induzir uma resposta imunitária e a aplicação de um tratamento imunológico capaz de manter níveis de anticorpos salivares adequados (Anusavice. 2005).

Como referido anteriormente, as adesinas são proteínas de superfície ou parede celular de *Streptococcus* responsáveis pela ligação de *Streptococcus mutans* entre si e à superfície do esmalte. Atualmente são conhecidas duas adesinas de *S. mutans* denominadas de antígeno III e antígeno I/II (Pinto *et al.*, 2005).

O antígeno III, também designado por antígeno A ou proteína WapA, e o antígeno I/II, também denominado de PAc ou P1 em *S. mutans* e SpaA em *S. sobrinus*, são considerados excelentes candidatos à produção de vacinas uma vez que estão presentes na parede celular de *Streptococcus* e permitem a formação de aglomerados da bactéria e a sua adesão ao esmalte. Deste modo, pensa-se que impedindo a ativação dos genes que codificam estas proteínas, ocorre uma diminuição da produção e expressão das mesmas e, por consequência, uma diminuição da adesão de *S. mutans* e da acumulação da placa bacteriana (Smith, 2002; Pinto *et al.*, 2005; Nogueira *et al.*, 2008).

Várias evidências *in vitro* e *in vivo*, com abordagens à imunização passiva e ativa, indicam que a utilização de anticorpos específicos contra as adesinas de *S. mutans* pode interferir com a fase de adesão e colonização bacteriana e consequentemente com a formação de cárie (Smith, 2003).

Lehner *et al.*, em 1981 e 1985, realizaram um estudo em macacos que receberam uma dieta cariogénica, contendo 15% de sacarose, e foram submetidos a um tratamento imunológico com anticorpos específicos para Ag I/II. Os resultados observados foram uma diminuição na incidência de cárie dentária dos macacos imunizados comparativamente a um grupo controlo não imunizado (Russel *et al.*, 2004; Nogueira *et al.*, 2008). No ano de 1991 Takahashi *et al.* partindo da sequência de aminoácidos do antígeno I/II, sintetizaram péptidos com os resíduos 301-319 correspondentes às regiões ricas em alanina da proteína PAc. Posteriormente imunizaram ratinhos com esses péptidos e observaram a supressão da colonização dentária por *S. mutans*. Hajishengallis *et al.* em 1992 direcionaram anticorpos específicos, a IgA secretora, contra o antígeno I/II e observaram a cessação da adesão inicial de *S. mutans* ao biofilme que reveste os dentes (Smith, 2002; Nogueira *et al.*, 2008).

Apesar dos resultados obtidos pela imunização com antígenos em ratos, ratinhos e macacos se mostrarem promissores, apenas alguns estudos com vacinas anticárie foram realizados em humanos (Anusavice, 2005). Para além disso, é difícil prever a aplicabilidade destas vacinas em humanos a partir de modelos animais uma vez que a duração dos estudos experimentais é inferior ao período de desenvolvimento da cárie em humanos (Russel, 2004).

ii. Glucosiltransferases – GTFs

As GTFs são enzimas extracelulares de *Streptococcus* responsáveis pela síntese de polissacarídeos de elevado peso molecular a partir de moléculas de sacarose. Para o efeito, rompem a ligação entre os monómeros glucose e frutose, de várias moléculas de sacarose, e promovem a ligação consecutiva de monómeros glucose iniciando assim o processo de formação do glucano (Smith, 2003; Banas e Vickerman, 2003). Os glucanos sintetizados podem ser solúveis ou insolúveis em água e permitem a agregação de bactérias entre si e a sua acumulação à superfície do dente, sendo por isso designados como colas biológicas (Banas e Vickerman, 2003; Pinto *et al.*, 2005).

Dependendo da solubilidade em água do glucano que produzem foi possível identificar três tipos de GTFs: as GTF-I que sintetizam glucanos insolúveis, as GTF-SI que sintetizam glucanos solúveis e insolúveis e as GTF-S que sintetizam glucanos solúveis (Banas e Vickerman, 2003; Pinto *et al.*, 2005). Os genes que sintetizam as diferentes glucotransferases são: o gene *gtfB* que codifica a GTF-I, o gene *gtfC* responsável pela expressão da GTF-SI e o gene *gtfD* que codifica a GTF-S (Smith, 2002; Banas e Vickerman, 2003; Pinto *et al.*, 2005).

Estudos relataram que *S. mutans* que perderam a capacidade de produção de glucanos, quer por mutação natural ou induzida nos genes GTF, não provocavam uma taxa significativa de doença em animais. (Smith, 2003). Ensaio clínico realizado em humanos adultos permitiram tirar algumas conclusões sobre os níveis de colonização bucal por *S. mutans*. O grupo 1, submetido a imunização contra as GTF de *S. sobrinus*, apresentou níveis de IgA específicos mais elevados que o grupo placebo e níveis de *S. mutans* significativamente menores. A indução de anticorpos contra as GTF representa assim um importante candidato à formulação de vacinas anticárie uma vez que apresenta efeitos redutores nos níveis de infeção por *S. mutans* (Nogueira *et al.*, 2008).

Em 1991 Hamada *et al.* investigaram os efeitos, *in vitro* e *in vivo*, da administração de anticorpos contra *S. mutans*, GTFs livres ou GTFs associadas a *S. mutans*. *In vitro*, a análise mostrou que os anticorpos IgY anti- *S. mutans* e IgY anti-GTF associada a células inibiam a aderência do *S. mutans* à superfície de vidro em 97 e

92% respectivamente. A análise *in vivo*, realizada em ratos com recurso a administração oral de anticorpos IgY contra Gtf associada a *S. mutans*, apresentou uma diminuição significativa do desenvolvimento de placa bacteriana, 46,4% em relação aos ratos não imunizados (Nogueira *et al.*, 2008).

A indução de mutações nos genes *gtfB* e *gtfC* em *S. mutans* mostrou-se eficaz na redução da virulência por *Streptococcus* comparativamente à inativação do gene *gtfD* cujos efeitos foram nulos (Pinto *et al.*, 2005).

Outra propriedade relevante das GTFs é a existência de dois locais de ligação na sequência aminoacídica destas enzimas. Um deles é o N-terminal e o outro é o C-terminal. O N-terminal é responsável pela catálise da sacarose enquanto que o terminal C promove a formação/ligação dos glucanos. Em 1999 Jesperscard *et al.* aplicou anticorpos contra os terminais N e C das GTF-I, em coelhos, e observou uma inibição significativa da produção de glucanos insolúveis em água. Constatou ainda que as reações de quebra da sacarose diminuíram 22% e as de ligação dos glucanos cerca de 75% (Smith, 2002; Pinto *et al.*, 2005).

Konishi *et al.*, também no ano de 1999, mostrou que o potencial da região C é evidenciada quando ocorrem deleções de aminoácidos nesta região, uma vez que a capacidade de ligação dos glucanos deixa de existir ou apresenta menor taxa de síntese de glucanos (Smith, 2002).

iii. Proteínas de ligação ao glucano (Gbps)

As Gbps são proteínas existentes à superfície de *S. mutans* que têm como função promover a ligação dos glucanos ao *Streptococcus* (Smith, 2002; Smith, 2003; Banas e Vickerman, 2003). Atualmente, conhecem-se pelo menos quatro Gbps sintetizadas pelo *S. mutans*: GbpA, GbpB, GbpC e GbpD (Smith, 2003; Pinto *et al.*, 2005; Mattos-Graner *et al.*, 2006).

Das quatro Gbps identificadas apenas a proteína de ligação B mostrou indução de resposta imunitária contra cáries experimentais. Em 1996 Smith e Taubman relataram que a proteção contra a cárie pode ser alcançada através de imunização

subcutânea com GbpB ou Gtf de *S. mutans* por aplicação na mucosa nasal. Curiosamente, a análise, em crianças, de saliva contendo anticorpos IgA contra as GbpB indicou que uma infecção por *S. mutans* pode induzir uma resposta imune contra esta proteína. (Smith, 2002; Smith, 2003; Nogueira *et al.*, 2008; Mattos-Graner *et al.*, 2006). Ainda no mesmo ano, os dois cientistas levaram a cabo uma investigação similar em ratos com o objetivo de avaliar capacidade de indução de produção de anticorpos IgA através da imunização com GbpB ou GTFs. A investigação consistiu em três etapas:

- administração de injeções subcutâneas de GbpB ou GTF;
- deteção da presença de anticorpos IgA anti-GbpB ou anti-Gtf, salivares ou séricos;
- aplicação oral de *S. mutans* e dieta contendo 56% de sacarose durante 71 dias.

Os dados deste estudo revelaram uma redução de *S. mutans* em cerca de 72,7 e 47,9% após a imunização com GbpB ou GTF, respectivamente. Observou-se ainda que o número de lesões cáries nas superfícies dos dentes foi cerca de duas vezes menor nos ratos imunizados (Nogueira *et al.*, 2008).

Métodos bioinformáticos de identificação de regiões moleculares de interesse, como as regiões responsáveis por esta imunogenicidade, permitiram a produção de uma vacina de subunidade contra GbpB com eficácia em estudos pré-clínicos. No entanto, ao contrário do que acontece com as glucosiltransferases, a proteção induzida por vacinas GbpB de *S. mutans* não se verifica em *S. sobrinus* (Smith, 2003).

Estudos preliminares mostraram que a GbpA parece ter uma atividade imunogénica menor que a GbpB e que a inativação do gene que codifica esta proteína aumenta não só a virulência por *S. mutans* em modelos animais, como permite a acumulação desses microrganismos sobre o biofilme dentário (Smith, 2003; Pinto *et al.*, 2005).

Em 2001 Shimazaki *et al.* revelaram que a baixa expressão do gene que codifica a GbpC permite a colonização da superfície dentária por *S. mutans* e que quando presente a níveis elevados promove a auto-agregação bacteriana em detrimento da ligação ao biofilme dentário (Pinto *et al.*, 2005).

iv. Vacinas de subunidade

A utilização de células bacterianas inteiras para a produção de vacinas anticárie pode desencadear reações cruzadas com os tecidos do hospedeiro. A fim de evitar efeitos laterais indesejados, as várias técnicas de genética e biologia molecular têm sido aplicadas na síntese e purificação de epítomos de *Streptococcus* relacionados com a colonização e a aderência bacteriana à superfície dentária (Pinto *et al.*, 2005).

Estudos recentes têm tentado otimizar respostas imunitárias através da formulação de vacinas de subunidade com cópias de epítomos, determinantes antigénicos, associados aos processos de virulência de *Streptococcus* como a ligação salivar, os processos catalíticos e/ou processos de ligação aos glucanos. Vacinas de subunidade multivalentes podem apresentar múltiplos epítomos contra as várias funções de um componente, como por exemplo epítomos contra a região catalítica e a região de síntese de glucano das glucosiltransferases, ou contra funções de vários componentes, como por exemplo adesão salivar do AgI/II e atividade catalítica das GTFs (Smith, 2002).

A formulação de vacinas por este método permite assim eliminar regiões que podem induzir respostas imunitárias indesejadas (Pinto *et al.*, 2005).

a. Péptidos sintéticos

Como anteriormente indicado, pelo menos duas regiões do Ag I/II estão relacionadas com a adesão do *S. mutans* ao biofilme salivar. Em 1992 Lehner *et al.* observou, experimentalmente, que um anticorpo monoclonal, derivado de uma pré-imunização com Ag I/II intacto, reagiu com a região rica em prolina do Ag I/II e inibiu ainda a formação de cárie. Em 1991 Takahashi *et al.* mostrou que a imunização subcutânea com um péptido, sintetizado a partir da região rica em alanina (resíduos 301-319) do Ag I/II de *S. mutans*, resultava na indução, em larga escala, de anticorpos IgG reativos contra Ag I/II comparativamente à imunização com um péptido derivado da região prolina (Smith, 2002).

Epítomos de células B e T foram encontrados associados ao componente proteico 3,8-kDa do antígeno de *S. mutans*. A aplicação de péptidos sintéticos constituídos por

sequências 3,8-kDa do antígeno de *S. mutans*, na mucosa de macacos, resultou na formação de anticorpos IgA salivares e IgG gengivais. Métodos de aplicação tópica de anticorpos antipeptídeos previnem, desta forma, a colonização dos dentes por *S. mutans* (Smith, 2002).

A identificação de resíduos ou regiões nas glucosiltransferases com funções relevantes também levou ao desenho de vacinas de peptídeos sintéticos. Preparações de anticorpos monoclonais e policlonais direcionados para o terminal N, responsável pela catálise de sacarose, das GTFs, mostraram inibição da atividade das enzimas. Epítopos das células B são ainda encontrados nestes peptídeos sintéticos e induzem atividade imunológica contra cáries experimentais (Smith, 2002).

Peptídeos sintéticos construídos também a partir do terminal C das GTFs mostraram atividade associada à iniciação de formação e ligação dos glucanos. Os peptídeos sintéticos dessa região de ligação dos glucanos exibem epítopos de células B e C indutoras de anticorpos, que podem inibir a atividade enzimática das GTFs e induzir respostas imunitárias em ratos (Smith, 2002).

Em 2001 Taubman *et al.* mostrou que formulações com os epítopos da região C e N, apresentam um efeito protetor reforçado, já que o anticorpo contém atividade contra dois alvos funcionais, região N e C, e o peptídeo da região C apresenta ainda epítopos das células T como resposta imunitária acrescida aos epítopos das células B presentes nos dois peptídeos (Smith, 2002).

Estes estudos sugerem que esta imunização pode ser feita recorrendo a epítopos associados aos diversos fatores de virulência. A combinação de epítopos de adesinas e glucosiltransferases numa só formulação pode aumentar o efeito preventivo das vacinas de subunidade (Smith, 2002).

b. Vacinas recombinantes e vetores de expressão atenuados

A tecnologia recombinante tem sido estudada de forma a poder expressar, em péptidos sintéticos, porções maiores de regiões funcionais. A fusão de genes, com sequências funcionalmente relevantes, pode resultar na formação de proteínas quiméricas capazes de aumentar respostas imunológicas. A expressão de péptidos recombinantes em plasmídeos de vetores atenuados, como a *Salmonella*, podem direcionar vacinas para o tecido linfóide para induzir respostas na mucosa. Muitas destas abordagens mostraram indução de respostas imunitárias eficazes contra a cárie dentária em ratos e ratinhos (Smith, 2002).

Em 1999, Jespersgaard e os seus colaboradores imunizaram ratinhos com *E. coli* recombinante ou com uma proteína quimérica, por via intranasal. No vetor *E. coli* produziram a expressão de um péptido com o resíduo 290 da região de formação dos glucanos das GTFs, enquanto que na proteína quimérica associaram essa sequência à tioredoxina. De ambas as análises observaram efeitos protetores sobre a infecção por *S. mutans* e o desenvolvimento de cárie (Smith, 2002).

Proteínas quiméricas, com a região catalítica ativa das GTFs, associadas à subunidade B da toxina da cólera e expressas em *E. coli*, deram origem a respostas imunológicas que podem inibir 50% da atividade da GtfB. Em 1997 Yu *et al.* desenharam uma proteína de fusão que continha o resíduo 281 da região rica em alanina do Ag I/II de *S. mutans* e o resíduo 392 da região de formação dos glucanos da GTF-I. A proteína recombinante expressa em *E. coli* induziu a libertação de anticorpos IgG em coelhos e vacas podendo inibir a adesão de *S. mutans* ao biofilme que reveste a hidroxiapatite e a síntese de glucano pela GTF (Smith, 2002).

v. Vacinas conjugadas

A conjugação de mais do que uma característica da infecção por *S. mutans* constitui outro meio para a possível obtenção de uma vacina eficaz contra a cárie. A combinação de proteínas ou péptidos com polissacarídeos aumenta a imunogenicidade das células T (Smith, 2002).

Lett e os seus colaboradores, em 1994, acoplaram um péptido sintético, sintetizado a partir do resíduo 14 de uma adesina, a um polissacarídeo do serogrupo f de *S. mutans* por ligação covalente. A injeção subcutânea do conjugado induziu a libertação sistémica de anticorpos IgM e IgG contra o péptido e o polissacarídeo (Smith, 2002).

Taubman *et al.* em 1998 e 1999 relataram que a conjugação de toxina tetânica ou de GTF de *S. sobrinus* a glucanos solúveis em água aumentava os níveis de anticorpos IgG séricos e IgA salivares contra os mesmos (Smith, 2002).

vi. Vias de administração de vacinas anticárie

A aplicação de vacinas anticárie na mucosa da cavidade oral são geralmente preferíveis para que ocorra indução de anticorpos IgA secretores já que constituem o maior componente imunitário das secreções glandulares incluindo assim a glândula salivar (Smith, 2002; Motta *et al.*, 2006).

Muitos investigadores mostraram que a exposição de antigénio à mucosa que está associada ao tecido linfóide pode dar origem a respostas imunológicas não só no local de indução como também nas mais diversas localizações desse tecido. As estruturas linfóides podem ser encontradas no trato gastrointestinal, no apêndice e nas placas de Peyer, sendo por isso designadas de GALT (gut associated lymphoid tissue) e, ainda, nos anéis de Waldeyer e nas tonsilas nasofaringeanas sendo por isso denominados NALT (nasal associated lymphoid tissue). Consequentemente, diversas mucosas têm sido usadas para induzir respostas imunológicas para a cárie dentária (Smith, 2002; Pinto *et al.*, 2005; Motta *et al.*, 2006).

As células linfóides do GALT e do NALT são as maiores produtoras de IgA específicas contra antigénios. Após a síntese de IgA, estes anticorpos são transportados na circulação sanguínea e na linfa para as várias mucosas incluindo glândulas exócrinas existentes no organismo, como a glândula mamária, salivar e lacrimal. Quando estimulados os GALT e os NALT induzem a produção de grandes quantidades de IgA secretora em todas as secreções exócrinas. Por este motivo muitas investigações têm atraído as atenções para a indução de uma resposta imune através do GALT e do NALT,

sendo a via oral/gástrica e a via nasal/tonsilar as mais usadas (Pinto *et al.*, 2005; Motta *et al.*, 2006).

Muitos estudos basearam-se na imunização por via oral por estimulação do GALT para induzir anticorpos IgA salivares. No entanto a via intranasal e tonsilar apresenta características mais vantajosas à sua utilização sendo elas:

- induz resposta imune a nível sistémico e secretor;
- não necessita de doses elevadas de antigénio para induzir resposta imunológica;
- administração mais fácil;
- produz uma resposta imune maior que qualquer outra via uma vez que as estruturas linfóides do NALT se encontram compartimentalizadas diminuindo assim a competição e a atividade proteolítica sobre o antigénio administrado (Smith, 2002; Pinto *et al.*, 2005).

vii. Adjuvantes

Na maioria das vezes a distribuição do antigénio necessita de adjuvantes de forma a potenciar a resposta imune e produzir, para o efeito, anticorpos em número suficiente (Smith, 2002).

a. Toxina da cólera/ enterotoxinas termo-lábeis da *E. coli*

A toxina da cólera (CT) é um poderoso imunoadjuvante frequentemente usado para aumentar a indução da imunidade da mucosa contra os mais diversos patogénios. Trata-se de uma toxina bacteriana constituída por uma subunidade A, tóxica, e B, não tóxica (Smith, 2002).

A aplicação individual do péptido na mucosa raramente resulta na produção elevada, ou pelo menos suficiente, de IgA. Contudo, a adição de pequenas quantidades de CT ou de enterotoxinas termo-lábeis de *E. coli* (LT) aos antigénios ou péptidos sintéticos de antigénios de *S. mutans*, administrados por via gástrica ou intranasal, podem aumentar significativamente as respostas imunológicas na mucosa. Uma forma de eliminar ou reduzir a toxicidade da CT, mantendo as suas capacidades de adjuvante,

é remover a subunidade A. A imunização da mucosa através da conjugação química ou fusão genética do antigénio ou das regiões funcionais, responsáveis pela virulência de *S. mutans*, com a subunidade B da CT produziu uma resposta imunológica contra o respetivo complexo (Smith, 2002; Motta *et al.*, 2006).

Uma vez que a resposta imunitária induzida pelo complexo CT-B é significativamente menor que a resposta produzida pela subunidade A da CT e que nalguns sistemas é necessário a presença pequenas quantidades de CT intacta, algumas alternativas tem sido estudadas de forma aumentar a resposta da CT evitando os seus efeitos de toxicidade. Em 1995, Hajishengallis *et al.* substituíram a subunidade tóxica da CT, a A1 (porção do terminal N) pelo resíduo 42- kDa do AgI/II da região de formação/ligação do glucano (SBR) criando assim uma proteína quimérica composta por SBR associada ao terminal C da subunidade A2 não tóxica e à subunidade B, da CT, melhorando assim as capacidades adjuvantes da CT. Estudos similares foram realizados substituindo a subunidade A1 tóxica da LT por SBR. A proteína quimérica produzida pôde ser expressa em *E. coli* e em *Salmonella typhimurium* atenuada e induziu respostas imunológicas em ratos quando administrada via gástrica ou intranasal (Smith, 2002).

b. Microcápsulas e micropartículas

A associação de antigénios dentro ou à superfície de partículas é uma outra tentativa para melhorar e aumentar as respostas imunológicas. Microesferas e microcápsulas PLGA têm sido usadas como sistemas de distribuição local devido à sua capacidade de:

- controlar a velocidade de libertação;
- escapar dos mecanismos de eliminação de anticorpos preexistentes;
- degradarem-se lentamente sem estimular uma resposta inflamatória contra o polímero de que é composto.

Imunização oral ou tópica de microcápsulas PLGA contendo o antigénio no seu interior podem aumentar as respostas sobre a mucosa (Smith, 2002; Motta *et al.*, 2006). Contudo os solventes orgânicos necessários à formulação do sistema pode também diminuir a atividade biológica do antigénio. Esta desnaturação pode ser reduzida através

da formulação do antígeno numa fase aquosa e incorporação no interior de micropartículas (Smith, 2002).

Em 2000, Smith *et al.* incorporou GTF numa solução aquosa e adicionou-lhe 1% de gelatina como composto bioadesivo. De seguida colocou a mistura em micropartículas PLGA e procedeu à imunização intranasal com o complexo. Desta análise observou respostas imunológicas de longa duração a nível salivar (Smith, 2002).

c. Lipossomas

Trata-se de vesículas, constituídas por uma membrana fosfolipídica, cujo objetivo no organismo é transportar fármacos, antígenos, entre outros (Smith, 2002).

Em 1996 e em 1999, Childers *et al.* observou que a imunização gástrica de ratos através de vacinas de lipossomas com GTF, após infeção por *S. mutans*, diminuiu a cárie dentária (Smith, 2002).

Estudos clínicos relataram que a imunização intranasal com lipossomas de GTF ou só com GTF aumentava até cinco vezes mais o número de anticorpos IgA locais (ou seja nasais) e salivares contra a GTF. No entanto, a lavagem nasal com anticorpos IgA1 mostrou uma resposta maior com o complexo lipossoma-GTF relativamente à proteína sozinha (Smith, 2002; Motta *et al.*, 2006).

viii. Imunização Passiva

A administração passiva de anticorpos tem também sido analisada como vacina anticárie. Estudos relataram que leite de vacas imunizadas e gemas de ovo contendo, ambos, anticorpos contra *S. mutans* levaram à diminuição da placa dentária e das lesões cáries (Smith, 2002; Motta *et al.*, 2006).

Ma *et al.*, em 1990 e 1998, observaram efeitos a longo prazo após aplicação tópica de anticorpos monoclonais IgG de ratos e anticorpos IgA/G secretores de plantas transgénicas, com especificidade contra o Ag I/II. Nesta experiência após tratamento dos dentes com clorexidina, os anticorpos foram aplicados topicamente durante três

semanas. A colonização por *S. mutans* não ocorreu nos dois anos a seguir ao tratamento com anticorpos monoclonais e nos quatro meses a seguir ao tratamento com anticorpos transgênicos. Em contraste os dentes de indivíduos tratados com anticorpos não específicos sofreram recolonização por *S. mutans* após 82 e 58 dias, respectivamente (Smith, 2002; Motta *et al.*, 2006).

III. Conclusão

Apesar das numerosas tentativas em busca de hipóteses para vacinas anticárie e dos resultados promissores obtidos, é necessário referir que a maioria dos estudos foram realizados em modelo animal. Desta forma, a resposta a essas vacinas em humanos ainda não é totalmente conhecida e a possibilidade de desencadear reações cruzadas com outros órgãos do corpo humano é posta em questão (Smith, 2002; Nogueira *et al.*, 2008).

Pelo motivo referido, por se tratar de uma doença infecciosa sem risco de morte e devido ao facto de haver muito mais crianças sem cáries, as vacinas anticárie são hoje em dia uma realidade distante (Motta *et al.*, 2006).

Muitos são os obstáculos que permanecem contra a formulação de vacinas anticárie. O seu elevado custo, o fator risco/benefício, a aceitação pelos médicos dentistas e pelo público, os aspetos éticos e político-económicos são alguns exemplos (Motta *et al.*, 2006).

IV. Bibliografia

Anusavice, K. J., (2005). Present and Future Approaches for the Control of Caries. *Journal of Dental Education*, 69. [Em linha]. Disponível em <<http://www.jdentaled.org/content/69/5/538.short>>. [Consultado em 21/08/2013].

Balakrishnan, M., *et al.* (2000). Dental caries is a preventable infectious disease. *Australian Dental Journal*, 45, pp. 235-245.

Banas, J.A., Vickerman, M.M. (2003). GLUCAN-BINDING PROTEINS OF THE ORAL STREPTOCOCCI. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 14(2). [Em linha]. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12764072>>. [Consultado em 14/07/2013].

Caufield, P. W., *et al.* (2001). The Antimicrobial Approach to Caries Management. *Journal of Dental Education*, 65. [Em linha]. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11699982>>. [Consultado em 21/08/2013].

Featherstone, J. D., Doméjean, S. (2012). The Role of Remineralizing and Anticaries Agents in Caries Management. *Advances in dental research*, 24(2). [Em linha]. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22899675>>. [Consultado em 21/08/2013].

Jorge, A. O. C. (1995). Microbiologia de cárie dentária. *In*: Jorge, A. O. C. (Ed.). *Microbiologia Bucal*. Vila Mariana, Livraria Santos Editora, pp. 50-64.

Mattos-Graner, R. O., *et al.* (2006). Functional Analysis of Glucan Binding Protein B from *Streptococcus mutans*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 11. [Em linha]. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1482924/>>. [Consultado em 14/07/2013].

Motta, L. J., *et al.* (2006). Vacinas anticárie: uma revisão do estágio atual. *Revista Conscientiae Saúde*, 5. [Em linha]. Disponível em <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=92900513>>. [Consultado em 15/11/2011].

Nogueira, R. D., *et al.* (2008). Vacinas anticárie – desafios. *Revista do Instituto de Ciências da Saúde*, 26(4). [Em linha]. Disponível em <<http://files.bvs.br/upload/S/0104-1894/2008/v26n4/a1747.pdf>>. [Consultado em 06/06/2013].

Pinto, L. P., *et al.* (2005). Aspectos imunológicos da cárie dentária. *Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre*, 46. . [Em linha]. Disponível em <<http://seer.ufrgs.br/RevistadaFaculdadeOdontologia/article/view/7605>>. [Consultado em 06/06/2013].

Russell, M. W., *et al.* (2004). A Caries Vaccine? The state of the Science of Immunization against Dental Caries. *Caries Research*, 38. [Em linha]. Disponível em <<http://www.karger.com/Article/FullText/77759>>. [Consultado em 06/06/2013].

Samaranayake, L. P. (1996). Microbiology of Dental Caries. *In: Samaranayake, L. P. (Ed.). Essential Microbiology for Dentistry*. Londres, Churchill Livingstone, pp. 275-281.

Smith, D. J. (2002). Dental Caries Vaccines: Prospects and Concerns. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 13. [Em linha]. Disponível em <<http://cro.sagepub.com/content/13/4/335.full>>. [Consultado em 06/06/2013].

Smith, D. J. (2003). Caries vaccines for the twenty-first century. *Journal of Dental Education*. [Em linha]. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14587678>>. [Consultado em 06/06/2013].

Wolinsky, L. E. (1997). Cárie e Cariologia. *In: Nisengard, R.J., Newman, M.G. (Ed.). Microbiologia Oral e Imunologia*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, pp. 293-298.