

Vacinas anticárie – desafios

Anticaries vaccine – challenges

Ruchele Dias Nogueira*
Mariana Castro Loureiro Borges**
Maria Lúcia Sesso Talarico***
Virginia Paes Leme Ferriani****
Renata de Oliveira Mattos-Graner*****

Resumo

A análise do sistema imune de mucosas através da IgA secretória (IgAS) na saliva contra *Streptococcus mutans* (SM), principal agente etiológico da cárie dentária em humanos, representa uma importante ferramenta para a busca de uma vacina anticárie. *Streptococcus mutans* (SM) pode se estabelecer e se acumular no biofilme dentário devido à presença de diversos antígenos (Ags) de virulência associados às suas superfícies. As proteínas ligantes de glucano (Gbp), as glucosiltransferase (Gtf) e as adesinas (Ag I/II) representam os Ags mais estudados e a análise funcional destas proteínas é fundamental para a compreensão dos mecanismos moleculares de virulência de SM e conseqüentemente para o desenvolvimento de estratégias de controle de infecção por este microrganismo. A elaboração de vacina anticárie baseada nestes Ags de SM vem demonstrando ser uma forma eficaz de controle de SM, pois são capazes de estimular o sistema imune de mucosas a produzir anticorpos IgA contra estes Ags. Desta maneira, a busca de uma vacina anticárie representa um desafio promissor e alternativo para o controle da cárie dentária.

Palavras-chave: Cárie dentária/prevenção & controle; Mucosa bucal/imunologia

Abstract

The analyses of the immune response of anti-Streptococcus mutans (SM) antibody represent an important instrument for searching an anticaries vaccine. Streptococcus mutans (SM) can establish and accumulate on the dental biofilm due to presence of several virulence antigens associated with the microorganism surface. The glucan binding proteins (Gbp), glucosyltransferases (Gtfs) and adhesins (Ag I/II) are the most studied antigens. The functional analyses of those virulence proteins is necessary to understand the molecular virulence mechanisms of SM and, consequently, to develop strategies to control the infection by this microorganism. The elaboration of anticaries vaccines based on this Ags of SM was demonstrated to be an efficient mechanism of SM control because it is capable to stimulate the mucosal immune system to produce IgA antibodies against SM Ags. In this way, the exploration of anticaries vaccine represents a promising and an alternative challenge for the control of the dental caries.

Key words: Dental caries/prevention & control; Mouth mucosa/immunology

Introdução

Streptococcus mutans (SM), principais patógenos da cárie dentária, apresentam um conjunto de fatores de virulência que os tornam capazes de se aderir e se acumular no biofilme dentário na presença de sacarose, desencadeando a desmineralização dos tecidos dentários, uma vez que estes microrganismos toleram e produzem grandes quantidades de ácidos, a partir do seu metabolismo. Três grupos de antígenos (Ags) associados à superfície celular destes microrganismos têm sido amplamente estudados, pois participam do processo de aderência e acúmulo de SM no biofilme dentário. Estes incluem a adesina

antígeno I/II (Ag I/II), as glucosiltransferases (Gtfs) e as proteínas ligantes de glucano (Gbp de *Glucan-binding protein*). O conhecimento do potencial imunológico de mucosas, principalmente da IgA secretória (IgAS) presente na saliva em crianças e sua relação com a susceptibilidade de infecção podem fornecer dados importantes para o desenvolvimento de vacinas para o controle da cárie dentária. Inúmeras formas de elaboração de vacinas anticárie vêm sendo desenvolvidas com Ag I/II, Gtf e Gbps em ratos e macacos, através de imunizações sistêmicas, mucosas ou passivas. Em humanos, imunizações das mucosas oral e nasal de adultos e crianças com Gtf demonstraram aumento dos níveis salivares de IgA e IgA1.

* Pós-doutoranda em Pediatria, Departamento de Puericultura e Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP-USP). E-mail: ruchele_nogueira@yahoo.com.br

** Residente em Pediatria, Departamento de Puericultura e Pediatria da FMRP-USP.

*** Técnica do Laboratório de Pediatria, Setor de Imunologia Pediátrica, Departamento de Puericultura e Pediatria da FMRP-USP.

**** Professora Doutora do Departamento de Puericultura e Pediatria da FMRP-USP.

***** Professora Doutora do Departamento de Diagnóstico Oral, Disciplina de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

Assim, os diversos estudos envolvendo a elaboração para uma vacina anticárie parecem promissores.

Revisão da literatura

Streptococcus mutans representam o principal agente etiológico da cárie dentária em humanos. A fase inicial de colonização é dependente da interação específica entre SM e proteínas/glicoproteínas de origem salivar e microbiana adsorvidas às superfícies dentárias (película adquirida do esmalte dentário). Esta ligação inicial à película adquirida envolve interações específicas com adesinas microbianas. Diversas adesinas bacterianas foram identificadas em diversas espécies de estreptococos da placa dentária. Entre elas, está uma família de proteínas denominadas de antígeno I/II (Ag I/II), primeiramente descrita por Russell e Lehner¹⁴ (1978). Outro importante mecanismo de patogenicidade do SM é a desmineralização do esmalte dentário, pelo ácido láctico produzido no seu metabolismo fermentativo²⁷. No entanto, para que haja produção de ácido suficiente para sustentar a desmineralização progressiva do esmalte, há necessidade de aumento da proporção de SM no biofilme dentário, a qual é favorecida pela alta tolerância destas espécies a baixo pH²⁹.

Streptococcus mutans é capaz de se acumular no biofilme através da síntese e interação com uma matriz de extracelular de glucanos insolúveis¹⁹. Este processo de acúmulo é iniciado pela atividade de glucosiltransferases (Gtf) secretadas por SM^{22,26}. As Gtfs sintetizam várias formas de glucanos extracelulares de alto peso molecular, a partir da sacarose. Estes polímeros de glucanos, por sua vez, possibilitam a agregação de SM a outros estreptococos orais, aparentemente através da interação com proteínas ligantes de glucanos associadas à superfície celular. Quatro Gbps foram identificadas para a espécie SM, GbpA, GbpB, GbpC e GbpD^{16-17,25}. Estas proteínas podem ser secretadas ou associadas às superfícies celulares (GbpA, GbpB e GbpD) ou ligadas covalentemente à parede celular (GbpC) e apresentam diferentes afinidades a polissacarídeos¹.

Discussão

Os primeiros estudos indicando que a indução da produção de IgAS contra Ags de SM poderiam conferir proteção contra a cárie dentária foram realizados na década de 70. Os avanços no entendimento dos mecanismos moleculares de patogenicidade de SM têm favorecido o desenvolvimento de diversas estratégias para o controle da infecção por estes microrganismos^{12,15,18}. Diversos estudos em modelos animais, demonstraram que a indução de anticorpos contra Ags de superfície de SM envolvidos na virulência (Agl/II, Gtfs e GbpB) foi capaz de conferir proteção contra a cárie dentária, sob alta exposição à sacarose (cerca de 55% de sacarose na dieta)^{4,26}. Smith *et al.*¹⁹ (1990) observaram que salivas de crianças americanas frequentemente continham IgA reativo para a GbpB, indicando que a infecção inicial por SM poderia levar a uma resposta imune natural a esta proteína^{13,19}. Posteriormente, a análise da resposta imune natural a SM, em

crianças com até 2 anos de idade, revelou que a maioria dos anticorpos salivares IgA era específica a Ags de SM importantes na sua colonização e acúmulo, incluindo-se o AgI/II e Gtfs^{13,19,24}. Em algumas crianças, os anticorpos específicos a Ags de SM puderam ser detectados antes mesmo da detecção deste microrganismo na cavidade bucal^{13,19}.

Vários estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que anticorpos específicos para Ag I/II do SM ou SpaA do *S. sobrinus* puderam interferir na adesão/colonização bacteriana e no desenvolvimento da cárie dentária. Lehner *et al.*⁸ (1981) analisaram os efeitos imunogênicos e protetores contra a cárie dentária da imunização com Ag I/II, em 40 macacos que recebiam uma dieta cariogênica (15% de sacarose na dieta). Os resultados mostraram que houve uma significativa redução nos índices de cárie dentária dos macacos imunizados, quando comparados àqueles não imunizados. A imunização passiva local, com anticorpos monoclonais Ag I/II-específicos em humanos, demonstrou reduções nos níveis de infecção bucal por SM em adultos, quando comparados com indivíduos não imunizados^{5,9,28}. Takahashi *et al.*²⁸ (1991) sintetizaram quatro peptídeos com base na seqüência de aminoácidos do PAc (ou Ag I/II), entre estes peptídeos, PAc (resíduo 301-319) que correspondia às regiões ricas em alanina. A imunização de camundongos, com este peptídeo, mostrou uma diminuição na colonização por SM nas superfícies dentárias destes animais. Hajishengallis *et al.*² (1992) investigaram o efeito da IgAS humanos específicos a Ag I/II sobre a aderência de SM; os autores constataram que estes anticorpos puderam interferir na adesão inicial de SM à película de saliva que recobre os dentes. Posteriormente, estudos em ratos, infectados oralmente com SM e submetidos à imunização intranasal com AgI/II, apresentaram níveis de SM significativamente menores na placa dentária e menores índices de cárie do que ratos infectados e não imunizados¹¹. Entretanto, o mecanismo protetor de imunização com AgI/II não é conhecido e há evidências de que a inativação do gene *pac* (que codifica AgI/II) não produz redução na virulência de cepa de SM em modelo de animais⁷.

As glucosiltransferases são os antígenos mais bem caracterizados em SM^{6,11}. Smith *et al.*²¹ (1979) analisaram a administração oral de glucosiltransferases em hamsters, verificando a produção de anticorpos salivares e séricos, específicos a estes antígenos. O efeito da imunização com Gtf de *Streptococcus sobrinus* sobre os níveis bucais de SM foram testados em humanos adultos. Após a primeira imunização, as amostras salivares do grupo imunizado apresentaram níveis superiores de IgA do que nos pacientes do grupo placebo. Entre a primeira e a segunda imunização, os níveis de IgA específicos a Gtf foram maiores no grupo imunizado e os níveis de SM foram sempre menores nas amostras do grupo vacinado²². Assim, a indução de anticorpos contra Gtf apresenta efeito redutor dos níveis de infecção, mesmo em indivíduos previamente colonizados por esta espécie.

Aplicação tópica de Gtf de *S. sobrinus* foi administrada sobre a mucosa do lábio inferior de adultos (entre 18 e 42 anos de idade), a fim de verificar a eficiência desta via de

administração antigênica e seu efeito no re-acúmulo de SM nos dentes após profilaxia dentária. Estes pacientes foram divididos em dois grupos: imunizado e placebo. Os indivíduos selecionados tinham níveis similares de infecção por SM e anticorpos IgA anti-Gtf. Os grupos foram então submetidos à profilaxia dentária imediatamente antes da aplicação tópica do Ag de Gtf ou placebo. A aplicação tópica da Gtf promoveu um aumento significativo de IgA anti-Gtf no grupo imunizado em relação ao grupo placebo, e as proporções de SM foram sempre significativamente menores no grupo imunizado, do que no placebo¹⁹.

A imunização passiva também demonstrou o efeito protetor de anticorpos anti-Gtf no desenvolvimento da cárie dentária. Hamada *et al.*³ (1991) analisaram *in vitro* e *in vivo* o efeito da administração de anticorpos policlonais, proveniente de ovo de galinha, formados contra células inteiras de SM, Gtf secretada (livre de células de SM) ou Gtf associada a células de SM. A análise *in vitro* revelou que os anticorpos IgY anti-células de SM e IgY anti-Gtf associada a células inibiam a aderência das células de SM à superfície de vidro em 97 e 92% respectivamente. A análise *in vivo*, da imunização passiva (administração oral) em ratos com anticorpos IgY contra Gtf associada com células inteiras, apresentou o melhor resultado, pois promoveu uma redução significativa do acúmulo de placa dentária (redução de 46,4% em relação aos ratos não imunizados).

Embora várias proteínas ligantes de glucano (Gbps) tenham sido descritas¹, somente a GbpB de SM²⁵ pareceu apresentar propriedades imunogênicas e protetoras contra a cárie dentária. Diversas características desta proteína ressaltam seu potencial como um alvo no desenvolvimento de vacinas. A GbpB é produzida por todas as cepas laboratoriais ou clínicas testadas até o momento¹⁰. Mais de 80 isolados clínicos de SM testados em imunoenaios com anticorpos GbpB-específicos apresentaram níveis detectáveis de GbpB em fluidos de cultura e em extratos celulares¹⁰. Smith *et al.*²⁵ (1994) mostraram que 20 das 24 salivas de adultos testadas, em ensaios ELISA, continham IgA reativo contra a GbpB. Neste mesmo estudo, em ensaios western blot com salivas humanas, GbpA mostrou pouca ou nenhuma reação com anticorpos IgA. Estes resultados sugeriram que a GbpB é mais imunogênica em humanos do que a GbpA.

Smith e Taubman²⁰ (1996) avaliaram a habilidade de induzir a produção de anticorpos IgA através da imunização com GbpB ou Gtf de SM em ratos. Para isto, estes ratos receberam injeções subcutâneas de GbpB ou Gtf e, depois de detectado a presença de anticorpos (salivares ou séricos) IgA anti-GbpB ou anti-Gtf, estes ratos foram infectados oralmente com SM e receberam dieta contendo 56% de sacarose durante 71 dias. Os níveis de SM nos

molares dos ratos, após terem sido imunizados com GbpB ou Gtf, foram menores (redução de 72,7 e 47,9% respectivamente para GbpB e Gtf) do que dos ratos não imunizados. O número de lesões cariosas nas superfícies dos molares foi aproximadamente duas vezes menor nos animais imunizados, quando comparados com os ratos não imunizados.

Tyler e Cole³⁰ (1999) analisaram o efeito da imunização com Ags de SM em quatro chipanzés fêmeas, durante a gestação, nas concentrações de IgAS no leite materno. Os dados deste estudo mostraram que três destes animais apresentavam IgA1S específico para a GbpB (proteína de 59 kDa), dois apresentaram SIgA1 contra Gtf e nenhum apresentou anticorpos para GbpA (74 kDa) e todos tinham anticorpos específicos para Ag I/II.

Smith *et al.*²³ (2001) estudaram a influência da administração passiva de anticorpos IgY (proveniente do ovo de galinhas imunizadas com GbpB) anti-GbpB em ratos infectados com SM. Houve uma diminuição significativa nos níveis de SM nos molares e também nos índices de cárie dentária nos animais imunizados, os quais foram 50% menores, quando comparados aos animais não imunizados. Assim, a administração oral de IgY anti-GbpB pôde interferir na colonização por SM, sob condições de alta exposição à sacarose e conseqüentemente, interferir no desenvolvimento da cárie dentária.

Conclusão

As inúmeras tentativas de controle da cárie dentária através da elaboração de uma vacina anticárie baseada nos antígenos de virulência de SM mostram-se promissoras, pois os níveis deste microrganismo e o número de cáries parecem diminuir com a imunização. O perfeito entendimento do sistema imune de mucosas, em especial a produção de anticorpos IgAS específico a Ags de virulência de SM representam os novos desafios já que estudos em crianças entre 5 a 13 meses de idade¹³ demonstram que IgAS específico a GbpB pode estar relacionado a modulação da infecção pelo SM. Outros estudos precisam ser elaborados para se analisar o desenvolvimento do sistema imunológico desde o nascimento até a colonização por microrganismos orais para se analisar a influência da colonização e ontogenia do sistema imune de mucosas.

Agradecimento

À Fundação de Amparo a Pesquisa pelo apoio financeiro do presente projeto (Proc. nºs 02/07156-1, 04/07435-8, 07/50807-7 e 07/57346-5).

Referências

1. Banas JA, Vickerman MM. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003;14(2):89-99.
2. Hajishengallis G, Nikolova E, Russell MW. Inhibition of *Streptococcus mutans* adherence to saliva-coated hydroxyapatite by human secretory immunoglobulin A (S-IgA) antibodies to cell surface protein antigen I/II: reversal by IgA1 protease cleavage. *Infect Immun*. 1992;60(12):5057-64.
3. Hamada S, Horikoshi T, Minami T, Kawabata S, Hiraoka J, Fujiwara T *et al*. Oral passive immunization against dental caries in rats by use of hen egg yolk antibodies specific for cell-associated glucosyltransferase of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun*. 1991;59(11): 161-7.
4. Jespersgaard C, Hajishengallis G, Huang Y, Russell MW, Smith DJ, Michalek SM. Protective immunity against *Streptococcus mutans* infection in mice after intranasal immunization with the glucan-binding region of *S. mutans* glucosyltransferase. *Infect Immun*. 1999;67(12):6543-9.
5. Katz J, Harmon CC, Buckner GP, Richardson GJ, Russell MW, Michalek SM. Protective salivary immunoglobulin A responses against *Streptococcus mutans* infection after intranasal immunization with *S. mutans* antigen I/II coupled to the B subunit of cholera toxin. *Infect Immun*. 1993;61(5):1964-71.
6. Koga T, Oho T, Shimazaki Y, Nakano Y. Immunization against dental caries. *Vaccine*. 2002;20(16):2027-44.
7. Koga T, Okahashi N, Takahashi I, Kanamoto T, Asakawa H, Iwaki M. Surface hydrophobicity, adherence and aggregation of cell surface protein antigen mutants of *Streptococcus mutans* serotype c. *Infect Immun*. 1990;58(2):289-96.
8. Lehner T, Russell MW, Caldwell J, Smith R. Immunization with purified protein antigens from *Streptococcus mutans* against dental caries in rhesus monkeys. *Infect Immun*. 1981;34(2):407-15.
9. Ma JK, Hikmat BY, Wycoff K, Vine ND, Chargelegue D, Yu L *et al*. Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nat Med*. 1998;4(5):601-6.
10. Mattos-Graner RO, Jin S, King WF, Chen T, Smith DJ, Duncan MJ. Cloning of the *Streptococcus mutans* gene encoding Glucan binding protein B and analysis of genetic diversity and protein production in clinical isolates. *Infect Immun*. 2001;69(11):6931-41.
11. Michalek SM, Katz J, Childers NK. A vaccine against dental caries: an overview. *Biodrugs*. 2001;15(8):501-8.
12. Michalek SM, McGhee JR, Mestecky J, Arnold RR, Bozzo L. Ingestion of *Streptococcus mutans* induces secretory immunoglobulin A and caries immunity. *Science*. 1976;192(4245):1238-40.
13. Nogueira RD, Alves AC, Napimoga MH, Smith DJ, Mattos-Graner RO. Characterization of salivary immunoglobulin A responses in children heavily exposed to the oral bacterium *Streptococcus mutans*: influence of specific antigen recognition in infection. *Infect Immun*. 2005;73(9):5675-84.
14. Russell MW, Lehner T. Characterization of antigens extracted from cells and culture fluids of *Streptococcus mutans* serotype c. *Arch Oral Biol*. 1978;23(1):7-15.
15. Russell MW, Childers NK, Michalek SM, Smith DJ, Taubman MA. A Caries Vaccine? The state of the science of immunization against dental caries. *Caries Res*. 2004;38(3):230-5.
16. Sato Y, Yamamoto Y, Kizaki H. Cloning and sequence analysis of the *gbpc* gene encoding a novel glucan-binding protein of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun*. 1997;65(2):668-75.
17. Shah DS, Russell RR. A novel glucan-binding protein with lipase activity from the oral pathogen *Streptococcus mutans*. *Microbiology*. 2004;150(6): 1947-56.
18. Smith DJ. Dental caries vaccines: prospects and concerns. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(4):335-49.
19. Smith DJ, Taubman MA. Effect of local deposition of antigen on salivary immune responses and reaccumulation of *mutans streptococci*. *J Clin Immunol*. 1990;10(5):273-81.
20. Smith DJ, Taubman MA. Experimental immunization of rats with a *Streptococcus mutans* 59-kilodalton glucan-binding protein protects against dental caries. *Infect Immun*. 1996;64(8):3069-73.
21. Smith DJ, Taubman MA, Ebersole JL. Effect of oral administration of glucosyltransferase antigens on experimental dental caries. *Infect Immun*. 1979;26(1):82-9.
22. Smith DJ, Taubman MA, Ebersole JL. Ontogeny and senescence of salivary immunity. *J Dent Res*. 1987;66(2):451-6.
23. Smith DJ, King WF, Godiska R. Passive transfer of immunoglobulin Y antibody to *Streptococcus mutans* glucan binding protein B can confer protection against experimental dental caries. *Infect Immun*. 2001; 69(5):3135-42.
24. Smith DJ, King WF, Akita H, Taubman MA. Association of salivary immunoglobulin A antibody and initial *mutans streptococcal* infection. *Oral Microbiol Immunol*. 1998;13(5):278-85.
25. Smith DJ, Akita H, King WF, Taubman MA. Purification and antigenicity of a novel glucan-binding protein of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun*. 1994;62(6):2545-52.
26. Smith DJ, Shoushtari B, Heschel RL, King WF, Taubman MA. Immunogenicity and protective immunity induced by synthetic peptides associated with a catalytic subdomain of *mutans* group streptococcal glucosyltransferase. *Infect Immun*. 1997;65(11):4424-30.
27. Stephan RM. Intra-oral hydrogen-ion concentration associated with dental caries activity. *J Dent Res*. 1944;23:257-66.
28. Takahashi I, Okahashi N, Matsushita K, Tokuda M, Kanamoto T, Munkata E *et al*. Immunogenicity and protective effect against oral colonization by *Streptococcus mutans* of synthetic peptides of a streptococcal surface protein antigen. *J Immunol*. 1991;146 (1):332-6.
29. Tenuta LM, Lima JE, Cardoso CL, Tabchoury CP, Cury JA. Effect of plaque accumulation and salivary factors on enamel demineralization and plaque composition *in situ*. *Pesqui Odontol Bras*. 2003;17(4):326-31.
30. Tyler BM, Cole MF. Characterization of the mucosal immune response in breast milk after peroral immunization of chimpanzees (*Pan troglodytes*) with *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol*. 1999;44(10):871-83.

Recebido em 11/7/2007

Aceito em 15/9/2007