

E_R_R_A_T_A

Pág. vii - ítem 4.6.

Onde se lê "Streprococcus", leia-se "Streptococcus"

Pág. 7 - 12.^a linha

Onde se lê "do estreptococos", leia-se "dos estreptococos"

Pág. 7 - 16.^a linha

Onde se lê "cariogência", leia-se "cariogênica"

Pág. 11 - 25.^a linha

Onde se lê "espécie deimal", leia-se "espécie de animal"

Pág. 12 - 5.^a linha

Onde se lê "anticorpor", leia-se "anticorpos"

Pág. 15 - 22.^a linha

Onde se lê "Know", leia-se "Knok"

Pág. 19 - 4.^a linha

Onde se lê "roral", leia-se "oral"

Pág. 60 - 9.^a linha

Onde se lê "cãrie", leia-se "cãries"

Pág. 60 - 16.^a linha

Onde se lê "algutinação", leia-se "aglutinação"

CLEUTON CÂNDIDO LANDRE

**PREVENÇÃO DA CÁRIE DENTAL ATRAVÉS DA IMUNIZAÇÃO
COM *STREPTOCOCCUS MUTANS*: ESTUDO EXPERIMENTAL EM
RATOS**

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da
Universidade Estadual de Campi-
nas, para obtenção do Grau de
Mestre em Odontologia, Área de
Microbiologia e Imunologia.

PIRACICABA
1982

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Tonya, minha esposa

Adriana e Fabiana, minhas filhas

pelo amor, compreensão, incentivo e carinho
que ao longo destes anos souberam tornar es
ta caminhada calma e feliz

OFEREÇO ESTE TRABALHO

Pedro Landre
María José Braga Landre

Meus pais, pessoas simples e honestas, pelos ensinamentos dos bons princípios, pela manutenção de um lar cristão, em reconhecimento pelo muito que me fizeram;

Cleusa
Cleuber e Angélica
Cléo e Gilka

Meus irmãos, pelo apoio moral e sempre terem me incentivado;

DEDICO-LHES ESTE TRABALHO

VI

AO PROF. DR. LOURENÇO BOZZO, EXEMPLO DE AMOR A PESQUISA, MEU ORIENTADOR E AMIGO, A QUEM DEVO ESTES ENSINAMENTOS, ATRAVÉS DE SUA VALIOSA ASSISTÊNCIA, DEDICAÇÃO, COMPREENSÃO, INTERESSE, SEGURANÇA, ESTÍMULO E FACILIDADES COLOCADAS A NOSSA DISPOSIÇÃO DURANTE TODA A REALIZAÇÃO DESTE TRABALHO,

*O meu respeito
A minha gratidão*

+

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Neder, DD. Diretor da
Faculdade de Odontologia de Piracicaba;

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Ferraz Corrêa, Coorde-
nador do Curso de Pós-Graduação ao Nível de Mes-
trado em Biologia e Patologia Buco-Dental;

Pela oportunidade oferecida, possibilitando-me
uma ampliação de conhecimentos e uma base segu-
ra na minha vida universitária, sempre acredi-
tando em nossas possibilidades, nos dando a-
poio e principalmente amizade,

AS MINHAS HOMENAGENS

A G R A D E C I M E N T O S

- À Faculdade de Odontologia de Piracicaba - F.O.P. - da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP - pelo curso de Pós-graduação;
- À Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas - E.F.O.A. - pela indicação de meu nome para a realização do Curso de Pós-graduação;
- Ao Plano Institucional de Capacitação de Docentes - P.I.C.D., pelo apoio oferecido na realização desta pesquisa;
- Ao DD. Diretor da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas, Prof. Dr. Vínio Barbosa Tamburini, pelo estímulo dedicado a minha pessoa;
- Aos Prof.^s Dr.^s Nilo Bernardes da Silva , Eduardo Araújo dos Santos , Hélio de Souza e Maciro Manoel Pereira , pelo apoio científico no início de minha carreira no magistério e incentivo durante o Curso de Pós-Graduação;
- Aos Colegas, Professores e Funcionários do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas, pela amizade e convivência;
- Aos Professores e Funcionários da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da UNICAMP, pela orientação segura e esclarecedora no decorrer do curso, pela maneira hospitaleira e amigável com que me receberam, integrando-me perfeitamente na filosofia de trabalho desta casa;

- Aos Colegas do Curso de Pós-Graduação, em especial ao Mauro Braga, Selmo de Ávila Lima e Olavo Bilac de Castilho, pelo companheirismo, amizade e solidariedade;
- Ao Sr. Antonio Kerches de Campos, Técnico de Laboratório da disciplina de Patologia, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela eficiente colaboração;
- À Prof.^a Dr.^a Sônia Vieira, pela valiosa orientação dos estudos estatísticos;
- À Sr.^a Ivany do Carmo Guidolin Gerola, pela revisão bibliográfica;
- Aos Prof.^s Dr.^s Pedro Bertolini, Alcides Guimarães e Jaime Aparecido Cury, pela colaboração através de estímulos e conselhos;
- À Maria Aparecida Nalin e Sueli Duarte de Oliveira Soliani, pela amizade e dedicação demonstradas;
- À Maria Helena Vasconcelos Peron, pelos serviços de datilografia, em rascunho.
- E à todos que, contribuíram sobremaneira para a realização deste trabalho.

S U M Á R I O

	Pág.
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO II - REVISÃO DA LITERATURA	5
CAPÍTULO III - PROPOSIÇÃO	18
CAPÍTULO IV - MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1 - Amostragem	21
4.2 - Experimento	21
4.3 - Contagem de Cáries	26
4.4 - Dieta Alimentar	27
4.5 - Colheita, Cultura, Isolamento e Identificação dos Microrganismos Usados Como Imunogeno	29
4.6 - Meios Utilizados na Diluição e Cultura de <i>Streptococcus mutans</i>	32
4.7 - Preparo de Vacina	36
4.8 - Exames Hematológicos	39
CAPÍTULO V - RESULTADOS	40
5.1 - Contagem de Cáries	41
5.2 - Análise Estatística	46
5.3 - Exame Hematológico	47
5.4 - Peso dos Animais	49
5.5 - Aspectos Macroscópicos das Cáries nos Diferentes Grupos	50

	Pág.
CAPÍTULO VI - DISCUSSÃO	55
6.1 - Índices de Cáries	56
6.2 - Exame Hematológico	62
6.3 - Peso dos Animais	63
CAPÍTULO VII - CONCLUSÕES	65
CAPÍTULO VIII - SUMMARY	67
CAPÍTULO IX - RESUMO	70
CAPÍTULO X - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

CAPITULO 1 - INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

A cárie dental é uma doença crônica, multifatorial, localizada, progressiva, que envolve fundamentalmente três fatores: o dente, a microflora bucal e o substrato, ou dieta. É uma lesão que se inicia pela desmineralização da superfície externa do dente, devido a ácidos orgânicos produzidos localmente por bactérias que fermentam depósitos de carboidratos da dieta.

Embora existam ainda algumas divergências sobre como e quais microrganismos que produzem lesões cariosas, não se pode mais contestar ou discordar da imprescindível participação do microrganismo na formação da cárie.

Numerosos estudos realizados, em diferentes modelos experimentais, nestas duas últimas décadas, claramente demonstraram que a cárie dental é uma doença infecciosa, transmissível e de origem bacteriana. No homem, contudo, não se conseguiu ainda, uma demonstração evidente, direta, da cariogenicidade de qualquer microrganismo; o que existe é uma considerável evidência indireta, de natureza epidemiológica, de uma forte e ampla associação do *Streptococcus mutans* da placa com a incidência e prevalência da cárie.

Qualquer programa de controle da cárie que envolva segmentos significativos da população, deve ser primariamente, orientado para a sua prevenção. E neste aspecto, algumas medidas têm sido estudadas e aplicadas, em primeiro lu-

gar, no sentido de se aumentar a resistência da estrutura dental, por exemplo, pelo uso de cálcio e de fluor; em segundo lugar, através da restrição de dietas ricas em carboidratos, e em terceiro lugar, através de tentativas de controle da microflora bucal pelo uso de agentes antibacterianos.

Os trabalhos sobre a patogenicidade da cárie, implicando o *Streptococcus mutans* como seu principal agente etiológico e o sucesso considerável obtido através da imunização do controle de algumas infecções bacterianas, como a difteria, a cólera, o tétano e a coqueluche, geraram um renovado interesse nas possibilidades de se conseguir uma imunização contra a cárie dental.

Embora os mecanismos imunológicos estejam sendo muito estudados com relação à cárie, nós estamos ainda num estágio muito inicial de um campo de grandes promessas e de muita confusão.

Nos últimos anos tem-se procurado conhecer melhor a multiplicidade de fatores que operam na cavidade bucal e que estejam relacionados com a imunidade contra a cárie. E as pesquisas têm demonstrado que as imunoglobulinas produzidas tanto localmente como sistemicamente podem desempenhar importantes papéis na prevenção da cárie.

Entretanto, a extrapolação de resultados obtidos em animais gnotobióticos, para o ser humano, envolve algumas diferenças fundamentais, como a possibilidade de intera -

ção nos diferentes eventos imunológicos, de uma ampla variedade de microrganismos, mais comuns ao homem que a outros animais.

A utilização de ratos convencionais, com uma microbiota bucal variada, num experimento dessa natureza poderia oferecer importantes subsídios a uma melhor compreensão dos eventos implicados.

CAPITULO II - REVISÃO DA LITERATURA

2 - REVISÃO DA LITERATURA

Vários experimentos envolvendo diferentes tipos de animais de laboratório e de seres humanos, têm sugerido que a cárie dental resulta de uma interação dente-bactéria-dieta, aos quais se acrescentou um quarto fator, tempo (Newbrun, 1978).

Uma complexa flora bacteriana bucal, atuando sobre carboidratos da dieta gera fatores que se contrapõem a outro conjunto de fatores próprios de cada hospedeiro, que engloba fundamentalmente o seu sistema imunológico (Veld e cols., 1978).

Conseqüentemente, o início e desenvolvimento da cárie dental devem ser determinados por esta relação hospedeiro-parasita. Uma multiplicidade de fatores, alguns mais, outros menos conhecidos devem operar em ambos os lados desta relação.

Segundo Brandtzaeg (1976), a resistência do hospedeiro depende de mecanismo efetores complexos que são, em parte, inatos e não específicos e, em parte, adquiridos e específicos. E estes últimos são resultantes da imunidade celular e humoral.

Desde os clássicos trabalhos de Fitzgerald e Keyes, (1960) e de Keyes (1960) estabelecendo a cárie como uma doença infecciosa e transmissível, implicando o *Streptococcus mutans* como seu principal agente etiológico, renovaram-se

as esperanças de uma imunização contra a cárie dental.

De acordo com Bahn e cols. (1976), a viabilidade da imunização contra a cárie dental se assenta em dois importantes critérios: (1) precisa haver uma redução das cáries em um modelo experimental animal ; e (2) imunoglobulinas devem ser produzidas após a imunização, que irão interferir com a atividade cariogênica dos estreptococos orais. Esta inibição da atividade estreptocócica é indicada por uma redução da agregação microbiana, ou da adesão da placa bacteriana à superfície dental, ou ainda por redução da formação de placa. Não é suficiente mostrar a presença física do anticorpo contra a parede celular do estreptococo ou antígenos superficiais, porque estes antígenos, embora importantes em mostrar a presença da bactéria, podem não necessariamente produzir ou estimular a formação de anticorpos que irão inibir a atividade cariogênica dos estreptococos orais. Os anticorpos precisam funcionar para inibir a cariogênese.

Scully e Lehner (1979) apresentaram duas hipóteses pelos quais os mecanismos imunológicos podem conferir proteção contra a cárie dental. Um mecanismo sugere que a IgA salivar previne a aderência de *Streptococcus mutans* à superfície dental. Outra hipótese alternativa, é que os anticorpos séricos, da classe IgG, podem penetrar no fluido do sulco gengival e proteger, por opsonização dos estreptococos, facilitando a sua fagocitose e destruição pelos fagócitos do

sulco gengival, ou pela inibição da aderência bacteriana à superfície dental. Estas duas hipóteses não são necessariamente exclusivas e um mecanismo está mais relacionado com a secreção salivar, enquanto o outro com o fluido do sulco gengival.

Bratthall e Petterson (1976) acreditam que a pesquisa de um antígeno específico do *Streptococcus mutans* tem uma especial importância, pois os anticorpos contra tais antígenos podem ser usados para rápida e sensível identificação da bactéria. Além disso, se uma defesa contra o *Streptococcus mutans* é para se basear na imunização, a detecção de antígenos específicos pode ser de muito valor. Teoricamente, estes antígenos podem evocar anticorpos protetores que tenham o mais alto nível de seletividade. O acesso de anticorpos às bactérias na superfície dental, pode ser mais ou menos difícil de explicar (Bowen e cols., 1975).

Streptococcus mutans, que em primeira instância estão associados com a etiologia da cárie de esmalte, colonizam as superfícies dos dentes relativamente devagar e crescem de modo estacionário. Esses micróbios são mais encontrados nas principais áreas de risco de cárie - faces interproximais de molares e pré-molares e nas fissuras oclusais não restauradas de molares.

Keene e cols. (1976) demonstraram que jovens sob o uso de fio dental, duas vezes ao dia, por quatro dias,

reduziram o número de *Streptococcus mutans* nas faces interproximais. Se fluoreto estanhoso a 10% é usado em conjunto com o fio dental, o efeito é maior. Isto seria mais uma razão para se usar pasta de dente com fluor na limpeza interproximal.

J. van Houte e cols. (1976), estudando o papel da colonização de *Streptococcus mutans* em ratos convencionais, observou que a variação da sacarose da dieta, de 1 a 56% , facilitava uma maior colonização que os outros carboidratos, embora uma satisfatória colonização tivesse sido também obtida em ausência de sacarose na dieta. Outros dados sugerem que as células de *Streptococcus mutans* têm uma certa afinidade para o dente, em ausência de sacarose, que pode ser de significância ecológica, e que a afinidade da bactéria é importante, mesmo para a colonização de fissuras.

A prevenção da cárie está baseada em tentativas, procurando:

- 1 - Aumentar a resistência do hospedeiro, através de terapias à base de fluor, de selantes oclusais e de imunização;
- 2 - Baixar o número de microrganismos em contacto com o dente, através do controle de placa;
- 3 - Modificar o substrato através de uma seleção de alimentos não cariogênicos;
- 4 - Reduzir o tempo que o substrato permanece na boca, limitando a frequência de ingestão (Newbrun, 1978).

A imunização usando como vacina células inteiras de *Streptococcus mutans* tem mostrado exercer um efeito protetor contra a cárie dental induzida pelos *Streptococcus mutans* em ratos e em macacos (Bowen, 1969 ; Michalek e cols., 1976).

Muitos antígenos de *Streptococcus mutans* têm sido implicados como importantes na aderência, e anticorpos a um ou mais desses antígenos podem muito bem reduzir o estabelecimento do *Streptococcus mutans* na cavidade oral e então, as subsequentes cáries dentais podem ser reduzidas (Genco e cols., 1976). Estes antígenos incluem a Glicosiltransferase, antígenos da superfície celular que funcionam como pontos de ligação da Glicosiltransferase e de Glucanos na superfície celular. Em 1976, Genco e cols., através de imunização com vacinas de células totais de *Streptococcus mutans*, induziram a formação de anticorpos que inibiam a implantação de *Streptococcus mutans* nas superfícies dentais e conseqüentemente o desenvolvimento de cáries. Para melhor entender os mecanismos pelos quais a vacinação previne a implantação do *Streptococcus mutans* e a cárie dental, foi isolado um Glucano associado à célula do microrganismo e injetado em coelhos e macacos. Foi então modificada a retenção dos determinantes antigênicos através de processos de purificação.

Dos diversos fatores que podem influenciar o crescimento de espécies bacterianas na boca, o açúcar da die-

ta desempenha um papel fundamental, no caso do *Streptococcus mutans*. Entretanto, a maneira altamente localizada pela qual o *Streptococcus mutans* coloniza a superfície dental no homem indica que a nível local, fatores outros, além do açúcar da dieta, devem desempenhar um papel importante na regulação da distribuição intra-oral de *Streptococcus mutans* (Ruangsri e Ørstavik, 1977).

Fitzgerald e cols., (1977) compararam a cariogenicidade de cepas de *Streptococcus mutans* isolados de indivíduos adultos-cárie-ativos (DMF = 10) e indivíduos cárie-resistente (DMF = 0). Inocularam estes estreptococos isolados em hamsters mantendo-os em dieta cariogênica. As contagens de cáries realizadas depois de seis semanas, mostraram que não havia diferença na virulência desses microrganismos, que pudessem ser relacionadas com as condições de cáries dos indivíduos estudados.

A imunogenicidade dos componentes de superfície de bactérias pode ser de importância, em termos de identificação das bactérias, e pelas possíveis reações imunológicas no hospedeiro. É evidente que a caracterização de qualquer sororo com respeito a sua especificidade e classe de anticorpos, mostrando esta especificidade, é essencial para consistentes investigações sorológicas. Também precisa ser enfatizado que um particular regime de injeção, da mesma preparação imunogênica na mesma espécie deimal não irá sempre produzir a mesma resposta imune (Wicken e Knox, 1976).

A proteção contra a cárie dental por mecanismos imunológicos poderia ser obtida através de duas vias principais: pela saliva e pelo fluído do sulco gengival. Os anticorpos IgA secretores afetam o domínio salivar, enquanto que o fluído do sulco, contendo anticorpo IgG, complemento e leucócitos polimorfonucleares entre outros componentes do sangue, afetam o domínio gengival. Não existem contudo evidências a favor de um ou de outro mecanismo, como o mais importante na proteção contra a cárie dental, sendo que ambos os mecanismos podem atuar simultaneamente (Lehner, 1980).

As imunoglobulinas humorais encontradas em secreções exócrinas desempenham um importante papel na proteção de superfícies mucosas contra microrganismos patogênicos. A sensibilização oral de animais gnotobióticos induziu uma resposta inicial de IgG aos lipopolissacarídeos da *Escherichia coli* seguida pelo aparecimento de IgA, à qual, subsequentemente se tornou o anticorpo predominante na saliva (Ebersole e cols., 1975).

Em uma série de macacos imunizados com *Streptococcus mutans* (serotipo c) a taxa de desenvolvimento e incidência de cáries de superfície livre e de fissuras foi reduzida significativamente. A redução da cárie, foi outra vez correlacionada com anticorpos séricos, sugerindo que a proteção pode ser mediada pelo soro, via fluído sulcular (Lehner e cols. 1975).

A maioria das infecções e imunizações naturais causadas por antígenos microbianos e alimentares são encontrados através das membranas mucosas e dos tratos respiratório e gastrointestinal. Desde que os anticorpos secretores podem estar envolvidos na prevenção de muitas doenças infecciosas, o meio mais vantajoso de imunização pode ser encontrado através do estudo dos mecanismos regulatórios que determinam a distribuição das células produtoras de imunoglobulina dentro de um órgão, a classe de imunoglobulina produzida e a forma final do anticorpo secretado (Mestecky e cols., 1978).

O papel dos sistemas humorais, locais e gerais, na proteção contra a cárie dental tem sido cuidadosamente avaliado em diferentes modelos animais. A superfície dental tem características especiais no sentido em que ela é exposta, tanto ao sistema imune secretor, representado pela saliva, como pelo sistema humoral geral (sistêmico), através dos anticorpos do fluído do sulco gengival que se presume seja derivado do soro. Teoricamente, um ou ambos os sistemas devem desempenhar algum papel na proteção contra a cárie dental (Challacombe, 1980).

Em geral, os níveis de imunoglobulinas no soro e nas secreções, em macacos, são comparáveis aos níveis encontrados em seres humanos, e a principal imunoglobulina no soro e no líquido amniótico de humanos é a IgG, e a relação IgG/IgA é maior que a unidade, enquanto que nas secreções a IgA é

a imunoglobulina dominante e a relação IgG / IgA é menor que a unidade (Cole e Bowen, 1976). Cada vez tem sido mais salientada a importância da IgA secretora, particularmente devido a sua provável participação na imunização contra a cárie dental.

Segundo Mestecky (1976), as células precursoras daquelas secretoras de IgA se tornam expostas e programadas a um dado antígeno nos tecidos linfóides associados ao trato gastrointestinal e trato respiratório.

Experimentos em modelos animais têm demonstrado que além de *Streptococcus mutans* também o *Lactobacillus*, *S. faecalis* e *S. sanguis* podem provocar cáries, embora o *mutans* seja muito mais virulento, produzindo cáries muito mais extensas e em tempo muito menor. Por isto, é racional que se proponha que qualquer processo de interferência com o *Streptococcus mutans* através de vacinação poderá reduzir marcadamente o desenvolvimento de cáries no homem.

Os experimentos realizados por McGhee e cols., (1975) e por Michalek e cols., (1976) utilizando ratos gnotobióticos e suspensão aquosa de *Streptococcus mutans* como agente imunizante, conseguiram um aumento de IgA na saliva, e paralelamente, uma significativa redução no número de cáries dos animais imunizados. Os ratos gnotobióticos constituem um excelente modelo experimental por permitir um rigoroso controle da dieta e de monoinfecção, com uma única espécie de bactéria cariogênica, sem envolvimento de antígenos de qualquer outro microrganismo.

Legler e cols. (1980), estudando as condições orais e sistêmicas de 55 indivíduos imunodeficientes observaram que os índices de placas não diferiam entre os pacientes normais e aqueles com a resposta imunológica alterada, mas que os índices de gengivite e de cáries eram muito maiores no grupo imunodeficiente. A análise das cáries pelo índice DMFS, entre pacientes imunodeficientes e pacientes controle demonstrou: deficiência de IgA / controle, um índice DMFS = 22,63/16,75 ; deficiências variadas de imunoglobulina / controle, índice DMFS = 29,63/19,53 ; e agamaglobulinemia / controle, índice DMFS = 36,67/20,60 demonstrando claramente que pacientes com imunodeficiência apresentam maior número de cáries ativas que indivíduos controle.

Polissacarídeos da parede celular de bactérias Gram-positivas há muito tempo são conhecidos como os principais imunógenos bacterianos. O reconhecimento de ácidos teicoicos como imunógenos é mais recente.

O termo "imunogênico" é preferido quando está indicando uma substância que tem a capacidade de induzir uma resposta imunológica, enquanto que, o antigo termo "antigênico" está mais relacionado à sua reatividade e especificidade em uma reação sorológica (Wicken e Know, 1976).

A presença de anticorpos específicos contra determinados tipos de microrganismos tem sido detectada na saliva humana por diferentes autores (Mestecky e cols., 1978 ; E-

vans e cols., 1975 ; Everhart e cols., 1972 e 1973).

Considerando que a IgA é a mais importante imunoglobulina encontrada na saliva, e que os anticorpos dessa classe de imunoglobulina poderiam ser os mais efetivos contra os microrganismos cariogênicos, as tentativas de imunizar contra a cárie dental têm sido dirigidas neste sentido. É sabido que a IgA da saliva ou IgA secretora difere da IgA do soro, por conter um glicopeptídeo adicional, denominado componente secretor (CS). Fundamentados em trabalhos desenvolvidos na Universidade de Alabama, Michalek e cols. (1976) e Mestecky e cols. (1978) observaram que a maioria das infecções e imunizações naturais causadas por antígenos microbianos eram encontrados através das membranas mucosas do trato gastrointestinal e respiratório. Utilizando ratos gnotobióticos, estes autores induziram uma resposta imune específica em secreções como a saliva, leite e lágrima, através da administração oral de antígenos bacterianos, sugerindo que o tecido linfóide do trato intestinal provê uma fonte de precursores de células formadoras de IgA para uma resposta imune comum das mucosas. A extrapolação desses resultados para um modelo experimental convencional, seja macaco, rato ou homem, estaria sempre sujeita a indagações.

Pelo exposto, verifica-se que não são recentes as tentativas para se provocar uma redução do número de cáries através de imunização, e que diferentes imunógenos, através de

diferentes vias, em diferentes animais têm sido tentados nos últimos anos.

Os trabalhos realizados em ratos gnotobióticos têm demonstrado uma correlação entre a presença de anticorpos salivares anti-*Streptococcus mutans* e uma redução das cáries causadas por estes microrganismos. Estes trabalhos sugerem que o anticorpo IgA é o anticorpo importante na prevenção da cárie e que a imunização que induz primariamente um aumento de IgA na saliva deve conferir um grau maior de redução do número de cáries.

Desta revisão fica claro, portanto, que a introdução do imunógeno pela via oral, pode determinar resultados muito mais satisfatórios na prevenção da cárie dental, uma vez que aumenta significativamente a produção de IgA - secretora na saliva, ao contrário de outras vias de introdução do antígeno, que resultam em aumento de anticorpos séricos. Daí a presente proposição.

CAPITULO III - PROPOSIÇÃO

3 - PROPOSIÇÃO

Fundamentados nestas observações, o presente trabalho tem por objetivo verificar, em ratos convencionais, os efeitos da imunização contra a cárie dental, pela administração oral de *Streptococcus mutans*, obtidos de cárie dental de seres humanos.

A avaliação dos resultados será feita pela comparação do número de cáries presentes nos grupos experimentais e controles.

CAPITULO IV - MATERIAIS E MÉTODOS

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Amostragem

Para desenvolver este experimento, foram utilizados quatro grupos de ratos convencionais (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar).

Aos 21 dias de vida, cerca de cem filhotes foram desmamados, separados das mães e divididos aleatoriamente em quatro grupos de 25 animais, os quais formavam amostras relativamente homogêneas constituindo os grupos A , B , C e D.

Dois grupos (C e D) serviram de controle, enquanto os outros dois (A e B) serviram como grupos experimentais para imunização e infecção.

4.2 - Experimento

Os diferentes grupos, experimentais e controles, receberam os seguintes tratamentos, mostrados na Tabela 1 e descritos a seguir.

TABELA 1 - Identificação e sequência dos procedimentos nos diferentes grupos de ratos imunizados e não imunizados contra a cárie dental

Grupo	Do dia 21 ao dia 120	Dia 45	Dia 120	Avaliações
"A"	Dieta cariogênica (10% de sacarose) Água destilada contendo 10^9 <i>S. mutans</i> / ml (vacina)	Infectado com <i>S. mutans</i> vivos	Sacrificado	Índice de cárie Exame hematológico Peso dos animais
"B"	Dieta cariogênica (10% de sacarose) Água destilada	Infectado com <i>S. mutans</i> vivos	Sacrificado	Índice de cárie Exame hematológico Peso dos animais
"C"	Dieta cariogênica (10% de sacarose) Água destilada	Não infectado	Sacrificado	Índice de cárie Exame hematológico Peso dos animais
"D"	Reação normal (sem sacarose) Água destilada	Não infectado	Sacrificado	Índice de cárie Exame hematológico Peso dos animais

4.2.1 - Grupo "A"

- Aos 21 dias de vida, os animais foram desm^umados, separados das mães, pesados, passando a se alimentar com Dieta Cariogênica, contendo 10% de sacarose. (Como fonte de sacarose, foi usado açúcar refinado). Ao mesmo tempo, foi iniciada a imunização (vacinação) desses animais, através de uma suspensão de *Streptococcus mutans*, serotipo c, mortos pelo Formol a 4%, adicionada à água de beber, numa concentraçãõ de aproximadamente 10^9 bactérias por ml. Esta vacina foi preparada a partir de placas bacterianas obtidas de dentes hu^umanos cariados, tendo sido administrada aos ratos do dia 21 a^utê o dia 120.

- Aos 45 dias de vida, os animais desse grupo foram infectados com uma cepa viva do mesmo *Streptococcus mu^utans*, serotipo c, transferida com um cotonete, do caldo de cultura denso, diretamente sobre os molares superiores e infe^uriores dos ratos. Esta operação foi feita pela manhã e à tar^ude. Após 72 horas, foi feita uma reinfecção com a mesma cepa bacteriana, obedecendo o mesmo processo.

- Aos 120 dias, foi feita colheita de sangue periférico para contagem diferencial de leucócitos. Os ani^umais foram então sacrificados, suas mandíbulas e maxilas reti^uradas e colocadas em formol a 10%, por 24 horas. Em segui^uda, foram descarnadas, lavadas, secadas e submetidas a exames

em Microscópio Estereoscópico, para contagem de cáries. As unidades de cáries foram anotadas, segundo o método sugerido por Keyes (1958).

4.2.2 - Grupo "B"

- Aos 21 dias de vida os animais foram desmamados, separados das mães, pesados, passando a se alimentar com dieta cariogênica contendo 10% de sacarose. (Como fonte de sacarose foi usado açúcar refinado). Os animais deste grupo beberam água destilada durante todo o período de experiência.

- Aos 45 dias de vida, os animais foram infectados com a mesma cepa viva de *Streptococcus mutans*, serotipo "c", utilizada no grupo A, esfregando-se um cotonete embebido em caldo de cultura denso, diretamente sobre os molares inferiores e superiores dos ratos. Esta operação foi feita pela manhã e à tarde. Após 72 horas, foi feita uma reinfeção com a mesma cepa bacteriana obedecendo o mesmo processo.

- Aos 120 dias de vida, foi feita colheita de sangue periférico para contagem diferencial de leucócitos. Os animais foram então sacrificados, suas mandíbulas e maxilas retiradas e colocadas em Formol a 10% por 24 horas. Em seguida, foram descarnadas, lavadas, secadas e submetidas a exames

em Microscópio Estereoscópico, para contagem de cáries. As unidades de cáries foram anotadas, segundo o método de Keyes (1958).

4.2.3 - Grupo "C"

- Aos 21 dias de vida, os animais foram desmamados e separados das mães, pesados, passando a se alimentar com uma dieta cariogênica contendo 10% de sacarose. (Como fonte de sacarose, foi usado o açúcar refinado). Os animais deste grupo controle beberam água destilada durante todo o período de experiência.

- Aos 120 dias de vida, foi feita colheita de sangue periférico para contagem diferencial de leucócitos. Os animais foram sacrificados, suas mandíbulas e maxilas retiradas e colocadas em Formol a 10%, por 24 horas. Em seguida foram descarnadas, lavadas, secadas e submetidas a exames em Microscópio Estereoscópico, para contagem de cáries. As unidades de cáries foram anotadas, segundo o método sugerido por Keyes (1958).

4.2.4 - Grupo "D"

Os animais deste grupo controle também foram desmamados aos 21 dias de vida, separados das mães e pesados.

Estes animais receberam alimentação com ração normal(*) e beberam água destilada durante todo o período de experiência.

- Aos 120 dias de vida, foi feita a colheita de sangue periférico para contagem diferencial de leucócitos. Os animais foram sacrificados, suas mandíbulas e maxilas retiradas e colocadas em Formol a 10% , por 24 horas. Em seguida foram descarnadas, lavadas, secadas e submetidas a exames em Microscópio Estereoscópico para a contagem de cáries. As unidades de cáries foram anotadas, segundo o método sugerido por Keyes (1958).

4.3 - Contagem de Cáries

A contagem de cáries foi feita seguindo basicamente a metodologia sugerida por Keyes (1958).

Imediatamente após o sacrifício, as mandíbulas dos ratos foram removidas e fixadas em formol, a 10% , pH 7,0, por 24 horas.

As hemi-mandíbulas foram então separadas em esquerda e direita, cuidadosamente descarnadas, lavadas e secadas. Numa ficha especial (páginas 44 e 45) , foram anotadas as superfícies dentais cariadas.

(*) (Ração CERES - Piracicaba, SP.

Primeiramente foram marcadas as cáries das superfícies bucal, morsal e lingual. A seguir, estas hemimandíbulas foram seccionadas num plano sagital-mesiodistal, com auxílio de um disco de carborundum adaptado a uma peça de mão, de alta rotação.

Procedeu-se então a contagem das cáries de sulco e das superfícies proximais.

As marcações gráficas foram então transformadas em unidades, valores ou índices, segundo o método sugerido por Keyes (1958), tabuladas e submetidas a tratamento estatístico.

4.4 - Dieta Alimentar

Os animais de cada gaiola recebiam diariamente duas medidas de ração para ratos (ração Ceres) com a seguinte composição:

Componentes:

Milho moído, farelo de soja tostada, de girasol, de trigo, de farinha de peixe, de carne, de ossos, de ostras, carbonato de cálcio, bentonita. Esta ração não continha qualquer tipo de antibiótico.

Níveis de garantia:

Umidade (máxima)	12%
Proteína bruta (mínima)	23%

Extrato etéreo (mínimo)	4,50%
Matéria fibrosa (máxima)	6,00%
Matéria mineral	7,50%
Cálcio (Ca)	1,70%
Fósforo (P)	0,80%
Energia produtiva (Cal/kg)	1,770
Energia metabolizável (Cal/kg)	2,400

Enriquecimento por quilo:

Vitamina A-6	700 U.I.
Vitamina D-3	1.350 U.I.
Vitamina E	20 mg
Vitamina B-1	1 mg
Riboflavina	3 mg
Vitamina B-12	15 mg
Ácido Pantotênico	4 mg
Ácido Nicotínico	15 mg
Colina	250 mg
Anti-oxidante	125 mg
Cobalto	0,23 mg
Iodo	0,32 mg
Cobre	12,20 mg
Manganês	24,30 mg

Observação:

Esta ração foi moída em forma de farelo (para evitar a auto-limpeza dos dentes) e acrescida de 10% de sacarose (açúcar refinado "União"). Os animais dos quatro grupos foram criados nas mesmas condições de ambiente e assepsia. Suas gaiolas eram raspadas duas vezes por semana, desinfetadas e depois forradas com serragem de madeira.

4.5 - Colheita, Cultura, Isolamento e Identificação dos Microrganismos Usados como Imunógenos

4.5.1 - Colheita do material da placa dental

A colheita do material de placa dental humana foi feita usando-se uma colher de dentina, previamente confeccionada para obter-se aproximadamente 1 mg de placa. A amostra foi obtida por raspagem do terço mediano das faces vestibulares dos molares superiores de pacientes da Clínica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

Tomando-se os cuidados necessários de assepsia o material obtido das placas dentárias era depositado em frascos de vidro contendo pêrolas de vidro e tendo como diluente 10 ml de solução fisiológica a 0,85% com 0,05% de extrato de levedura. A homogeneização se fazia por agitação manual durante cinco minutos aproximadamente. A seguir, processava-se a diluição em série decimal, com pipetas de 1,0 ml até a concentração final de 10^{-7} . Aliquotas de 0,1 ml dessa diluição foram semeadas em placa de Petri contendo o meio de cultura Agar-Mitis-Salivarius com 20% de sacarose e 0,1% de Telurito de Potássio. Nela, espalhava-se de maneira homogênea o material com uma alça de Drigalski.

A incubação foi feita em jarra tipo Gas-Pack, em microaerofilia, onde se colocava um pedaço de vela acesa para consumir o oxigênio presente. A temperatura de estufa foi

ajustada a 37°C e a incubação se realizou por 48 - 72 horas. As placas foram em seguida examinadas em Microscópio Estereoscópico com um aumento de oito vezes.

As colônias características de *Streptococcus mutans*, após exame bacterioscópico pelo Gram, foram transferidas para tubos de ensaio contendo o meio de Tioglicolato (Meio de Brewer) com pequena quantidade (0,1%) de Carbonato de cálcio, que servia de meio para estocagem das mesmas.

4.5.2 - Caracterização das colônias de *Streptococcus mutans* isoladas

Inicialmente, fazia-se a identificação bacterioscópica, confirmando a morfologia observada no isolamento; a seguir transferia-se o material para os meios de reações bioquímicas.

Na identificação morfológica, as colônias de *Streptococcus mutans* no meio de Agar Mitis-Salivarius, se mostraram finamente granulares, de aspecto rugoso semelhante a pequenas mórulas, tamanho intermediário entre 0,5 a 1,0 mm de diâmetro, altamente convexas com os bordos irregulares. A coloração na luz refletida era de um cinza claro azulado e opacas. Com frequência, as colônias apresentavam uma gotícula cintilante de polissacarídeo no seu topo; entretanto, em algumas delas, somente os primeiros caracteres foram observados, ocorrendo às vezes, na parte central da colônia uma leve depressão.

Para identificação bioquímica os microrganismos foram repicados para o meio básico C.T.A. (Cystina Trypticase Agar) tendo o Vermelho Fenol como indicador de pH, adicionados dos seguintes carboidratos na concentração final de 1%: Manitol, Sorbitol, Rafinose e Melibiose. O pH era ajustado a 7,3. Esses meios eram esterilizados em autoclave a 118°C por 20 minutos, processando-se o seu resfriamento em temperatura ambiente, para que se efetuasse a repicagem.

Com alça de platina, do tubo contendo a cultura em estoque (meio de tioglicolato) retiravam-se duas a três alçadas, repicando-as para os tubos com C.T.A. mais os carboidratos acima citados.

As leituras foram feitas após incubação em microaerofilia em estufa regulada a 37°C pelo tempo de 48 a 72 horas.

Para a prova de produção de amônia a partir de hidrólise da arginina, foi utilizada a técnica preconizada por Niven e cols. (1942).

Seguiu-se a mesma sequência de procedimentos usados nos repiques para as provas de fermentação dos carboidratos. Após 48 - 72 horas de incubação em microaerofilia, em estufa regulada a 37°C, foi adicionado diretamente no meio, 0,1 ml do reagente de Nessler. O aparecimento de cor amarelo-laranja (cor de tijolo) indica a presença de amônia na cultura.

A confirmação da espécie *mutans* foi feita através da série de reações bioquímicas segundo o esquema que segue:

Esquema bioquímico para diferenciação dos 05 serotipos de *Streptococcus mutans* de acordo com Shklair e Keene, (1974)

Testes bioquímicos	Serotipos				
	a	b	c	d	e
Manitol	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+
Rafinose	+	+	+	-	+
Melibiose	+	+	+	-	-
Arginina	-	+	-	-	-
Manitol com 2 U. bacitracina	-	+	+	+	+

4.5.3 - Meios utilizados na diluição e cultura de *Streptococcus mutans*

Foram utilizados para diluição e cultura de *S. mutans*, os seguintes meios:

- a) Solução fisiológica a 0,85% com extrato de levedura
- | | |
|-------------------------------------|------------|
| Cloreto de sódio (Carlo Erba) | 8,5 g |
| Extrato de levedura (Difco) | 0,5 g |
| Água destilada | 1.000,0 ml |

Ajustar o pH 7,2 a 7,4

Esterilizar em autoclave, a 121°C por 15 minutos.

b) Agar Mitis Salivarius com 20% de sacarose

Trypticase (B.B.L.)	10,0 g
Polipeptona (B.B.L.)	10,0 g
K ₂ HPO ₄ (Merck)	4,0 g
Sacarose (Difco)	200,0 g
Glicose (Merck)	1,0 g
Cristal Violeta (Merck)	0,0008 g
Azul de Trypan (Harleco)	0,075 g
Agar-Agar (Difco nº 3)	20,0 g
Água Destilada	1.000 ml

Ajustar o pH 7,2 a 7,4

Esterilizar em autoclave a 121°C , por 15 minutos

Resfriar a 50°C aproximadamente e adicionar assepticamente 0,1 ml de uma solução de Telurito de Potássio a 1% (esteril). Não reaquecer o meio após a adição do Telurito de Potássio. Distribuir em placas de Petri, estéreis.

c) Meio de Tioglicolato (Meio de Brewer)

Extrato de levedura (Difco)	5,0 g
Dextrose (Merck)	5,5 g
Cloreto de sódio (Carlo Erba)	2,5 g
Tioglicolato de sódio (Oxoid)	0,5 g
Tryptona (Difco)	15,0 g
L-Cistina hidrocloreto (Merck)	0,5 g
Rezasurina (Difco)	0,001 g
Água destilada	1.000 ml

Ajustar o pH 7,0 a 7,2

Distribuir em tubos de ensaio (150 x 10 mm) contendo no seu interior 0,1 g de Carbonato de Cálcio (CaCO_3). Fechar a boca do tubo com algodão adsorvente e parafinar, após esterilização em autoclave a 121°C, por 15 minutos.

d) C.T.A. (Cystina Trypticase Agar)

(Meio básico para fermentação de carboidratos)

Cystina (Merck)	0,5 g
Trypticase (B.B.L.)	20,0 g
Cloreto de sódio (Carlo Erba)	5,0 g
Sulfito de Sódio (Merck)	0,017 g
Vermelho de Fenol	0,017 g
Agar-Agar (Difco nº 3)	2,5 g
Água Destilada	1.000 ml

Ajustar o pH 7,2 a 7,4

Esterilizar em autoclave a 118°C, por 20 minutos

Foi empregado o mesmo meio básico para todas as provas de fermentação dos seguintes carboidratos:

Manitol (Carlo Erba)
Sorbitol (Merck)
Melibiose (Merck)
Rafinose (Merck)

Para todos os açúcares, a concentração final foi de 1%.

e) Caldo para verificar a hidrólise da arginina (Niven e cols., 1942)

Extrato de levedura (Difco)	5,0 g
Glicose (Merck)	0,5 g
L-Arginina (Merck)	3,0 g
Tryptona (Difco)	5,0 g

K_2HPO_4 (Merck)	2,0 g
Água Destilada	1.000 ml

Dissolver os componentes, distribuir cerca de 3 ml em tubos de ensaio (150 x 10 mm).

Ajustar o pH 7,2 - 7,4.

Esterilizar a 121°C , por 15 minutos.

f) Reativo de Nessler

Dissolver 50,0 g de KI (Iodeto de Potássio) em cerca de 35,0 ml de Água Destilada. Adicionar gota a gota de uma solução de $HgCl_2$ (Cloroeto de Mercúrio), até que persista leve precipitado.

Juntar 400,0 ml de uma solução de 50% de KOH (Hidróxido de Potássio). (Dissolver a potassa, deixar em repouso até clarear, decantar).

Completar o volume total a um litro de água destilada, deixar repousar uma semana. Decantar. Conservar em frasco escuro com tampa esmerilhada (Bier, 1975).

g) Agar trypticase soja com 1% de glicose

Trypticase (B.B.L.)	15,0 g
Soja Peptona (Oxoid)	5,0 g
Cloroeto de Sódio (Carlo Erba)	5,0 g
Glicose (Merck)	10,0 g
Agar-Agar (Difco nº 3)	20,0 g
Água destilada	1.000 mg

Aquecer para dissolver completamente, os elementos que compõem o meio.

Ajustar o pH 7,2 a 7,4.

Esterilizar em autoclave a 121°C , por 15 minutos.

Resfriar a aproximadamente 50°C e adicionar assepticamente 5% de sangue humano desfibrinado.

Homogeneizar. Distribuir em placas de Petri ou garrafas de Roux, estêreis.

4.6 - Preparo da Vacina

Cepas de *Streptococcus mutans*, serotipo c, obtidas por raspagem de placas dentais do terço mediano das faces vestibulares cariadas de molares superiores do homem, isolados em A.M.S. (Agar Mitis-Salivarius), foram enriquecidas em Tioglicolato e cultivadas nos meios A.M.S. com 20% de sacarose e em Agar Trypticase Soja em 1% de Glicose (Merck), e 5% de sangue humano desfibrinado.

Após a confirmação da espécie *mutans*, feita através de uma série de reações bioquímicas, cepas deste microrganismo foram conservadas em tubos contendo o meio de Tioglicolato, cujos tubos tinham os opérculos de algodão parafinados. O repique para a conservação da cepa bacteriana era realizado de sete em sete dias, obedecendo as condições de cultura exigidas. Garrafas de Roux, contendo cerca de 30,0 ml do meio Agar Trypticase Soja com 1% de Glicose e de 5% de sangue humano desfibrinado, foram semeadas com amostra de *Streptococcus mutans*, serotipo c e incubadas em estufa a 37°C por 48 - 72 horas, em microaerofilia, em jarras tipo Gas-Pack, contendo em seu interior uma chama de vela acesa até consumo de O₂ existente (disponível).

Após confirmação morfológica, através de exames bacterioscópicos em esfregaços corados pelo método de Grã^m, o material (microrganismo) crescido em cada frasco foi morto pela adição de 3 ml de uma solução de formol a 4% , e deixados em contato, em geladeira a 4°C , por uma noite.

Em seguida, os microrganismos foram ressuspensos em cerca de 20,0 ml de soro fisiológico estéril, em condições assépticas.

A suspensão resultante foi centrifugada a 3.500 rpm durante 30 minutos e o sedimento lavado por três vezes com solução fisiológica estéril, sendo em seguida ressuspensa em 10 ml desta mesma solução. Estava assim preparado o imunôgeno. Para estabelecer a concentração a ser usada, diversos passos foram seguidos. Partindo da premissa de que a concentração de uma vacina é geralmente da ordem de 1 bilhão ($10^9 = 1.000.000.000$) de germes por ml , procurou-se concentrar o imunôgeno, num valor próximo a este.

Foi retirado 1,0 ml da suspensão bacteriana obtida, transferida para tubo de ensaio e comparado com o tubo padrão (tubo nº 4 , da Escala de MacFarland). O princípio deste método consiste em comparar a opacidade da suspensão microbiana com uma escala de suspensão de sulfato de bário de opacidade crescente.

Com uma pipeta graduada, foi o material diluído, adicionando progressivamente solução fisiológica, até

igualar com a opacidade do tubo padrão escolhido, anotando-se a que volume esta suspensão microbiana foi convertida.

4.6.1 - Cálculo da Quantidade e Concentração da Vacina a Preparar

O número "N" de "ml" da suspensão microbiana densa a diluir é dado pela fórmula:

$$N = \frac{\text{Número de ml de vacina a preparar} \times \text{Concentração desejada}}{\text{Concentração da suspensão a diluir}}$$

Por hipótese, 1,0 ml da suspensão microbiana densa foi diluída e transformada a um volume de 8,0 ml para que sua opacidade se tornasse igual ao tubo nº 4 (tubo tomado como padrão) da Escala de Mac-Farland e que corresponde a uma concentração de bactérias igual a 1.200 (em milhões por ml) (Bier, 1975), indica que a suspensão microbiana densa ti nha uma concentração de bactérias igual:

$$1.200.000.000 \times 8 = 9.600.000.000 \text{ por ml}$$

Se se deseja preparar por exemplo, partindo desta suspensão microbiana densa, 200,0 ml de vacina, temos:

$$\frac{200 \times 1.000.000.000}{9.600.000.000} = \frac{2.000}{96} = 20,83$$

Então, a 20,83 ml da suspensão microbiana densa se adicionarã, pois, 179,17 ml de solução fisiológica esteril, para obter os 200,0 ml de vacina contendo 1 bilhão de germes por ml. (10^9 microrganismos por ml).

4.7 - Exames Hematológicos

Nos animais dos grupos A , B , C e D foram efetuados exames hematológicos no 120º dia do experimento.

Foi feita a coleta de sangue periférico e realizado uma contagem diferencial de glóbulos brancos.

Foram escolhidos ao acaso, quatro animais de cada grupo, num total de 16 (dezesseis).

CAPITULO V - RESULTADOS

5 - RESULTADOS

Os resultados do experimento, basicamente envolvem três aspectos de interesse à proposição inicial: os índices de cáries dentais, a variação da contagem diferencial dos leucócitos e a variação do peso dos animais, nos diferentes grupos.

Em decorrência de problemas naturais durante o desenvolvimento da presente pesquisa, os grupos experimentais (A, B, C e D) foram reduzidos de 25 para 16 animais, em cada grupo.

Os resultados observados no dia 120, para cada um dos aspectos avaliados, em cada grupo estão expressos de modo resumido nas Tabelas II e III.

5.1 - Contagem de Cáries

Os índices de cárie, obtidos segundo o método de Keyes, nas hemi-mandíbulas esquerdas e direitas de cada animal, estão apresentados na Tabela II.

TABELA II - Índices de cárie obtidos nos diferentes grupos de ratos, e a média desses índices, em cada grupo de 16 animais

Grupo Número do animal	Vacinado	Infectado	Controle C	Controle D
	DC + VAC + INF "A"	DC + INF "B"	DC "C"	DN "D"
01	12	39	17	11
02	15	117	26	14
03	18	16	11	12
04	17	63	20	04
05	07	24	10	09
06	27	50	24	23
07	19	44	38	32
08	19	24	32	10
09	12	12	14	21
10	35	56	18	23
11	22	41	15	12
12	12	53	13	26
13	05	41	27	18
14	21	55	21	11
15	14	72	13	01
16	11	30	17	17
Índice total	266	737	316	244
Índice médio	16,62	46,06	19,75	15,25

DC = dieta cariogênica

VAC = vacina

DN = dieta normal

INF = infecção

A simples observação da Tabela II , nos permite notar uma variação grande entre os diferentes animais. Por exemplo, o animal 02 do grupo "B" mostra um índice de cárie de 117 unidades, enquanto o animal número 04 do grupo "D" apresenta um índice de apenas quatro unidades de cárie.

Em razão dessas discrepâncias numéricas, optou-se pela utilização das raízes quadradas desses índices, no tratamento estatístico.

Na Tabela II, ao lado do total dos índices de cáries encontrados, estão os índices médios de cárie de cada grupo.

Para facilitar a compreensão do experimento, assim como, para mostrar mais claramente como foram obtidos estes índices de cáries, segundo o método de Keyes (1958), os sistemas de anotações das características das cáries estão mostrados às páginas 44 e 45.

Este modelo, recomendado pelo "National Caries Program" e utilizados por quase todos "Institutes of Dental Research", dos Estados Unidos, identificado como NHI - 789 , (Rev. 8 - 65) , além de prático, uniformisa os índices, permitindo comparações entre resultados de diferentes experimentos em ratos.

O formulário ou sistema foi utilizado na sua forma original, preservando-se todos os detalhes e indicações feitos, em inglês, pelo "National Institute of Health".

EXPERIMENTAL DENTAL CARIES IN RATS

_____ Rat No. _____

Maxillary Totals					
	Lesions	E	D _S	D _M	D _X
Buc-Ling					
Morsal					
Sulcal					
Proximal					

Maxillary Molars

Number with caries:

E	D _S	D _M	Left				Right			E	D _S	D _M
Buccal						BUCCAL				Buccal		
			E D _S D _M D _X	E D _S D _M D _X	E D _S D _M D _X		E D _S D _M D _X	E D _S D _M D _X	E D _S D _M D _X			
Morsal						MORSAL				Morsal		
			E D _S D _M D _X	E D _S D _M D _X	E D _S D _M D _X		E D _S D _M D _X	E D _S D _M D _X	E D _S D _M D _X			
Lingual						LINGUAL				Lingual		
			E D _S D _M D _X	E D _S D _M D _X	E D _S D _M D _X		E D _S D _M D _X	E D _S D _M D _X	E D _S D _M D _X			
Sulcal						SULCAL				Sulcal		
			E D _S D _M D _X	E D _S D _M D _X	E D _S D _M D _X		E D _S D _M D _X	E D _S D _M D _X	E D _S D _M D _X			
Proximal						PRXIMAL				Proximal		
			E D _S D _M D _X	E D _S D _M D _X	E D _S D _M D _X		E D _S D _M D _X	E D _S D _M D _X	E D _S D _M D _X			

Regimen _____

Rat. No. _____

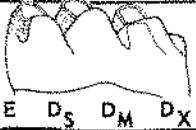
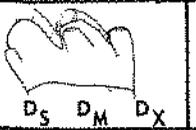
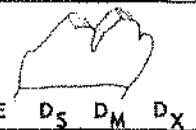
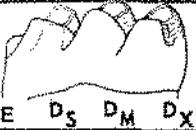
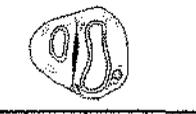
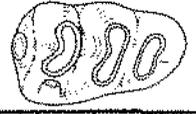
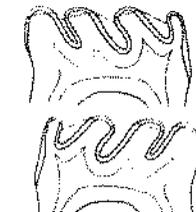
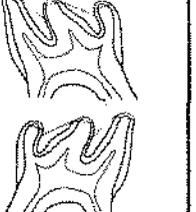
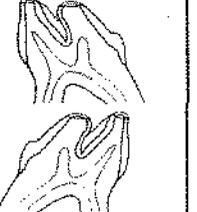
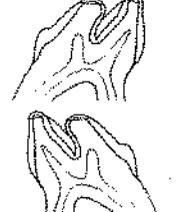
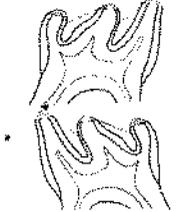
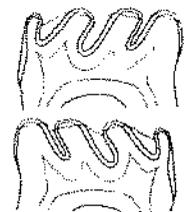
Cage No. _____

Mandibular Totals

	Lesions	E	D _S	D _M	D _X
Buc-Ling					
Morsal					
Sulcal					
Proximal					

Mandibular Molars

Number with caries:

E	D _S	D _M	Left				Right			E	D _S	D _M
Buccal						BUCCAL				Buccal		
			E D _S D _M D _X	E D _S D _M D _X	E D _S D _M D _X		E D _S D _M D _X	E D _S D _M D _X	E D _S D _M D _X			
Morsal						MORSAL				Morsal		
Lingual						LINGUAL				Lingual		
Sulcal						SULCAL				Sulcal		
Proximal						PRXIMAL				Proximal		

5.2 - Análise Estatística

Para verificar se, em média, existe diferença nos índices de cárie de animais submetidos a diferentes tratamentos, foi feita uma análise de variância, com um único critério de classificação.

Como os dados se referem a contagem, para esta análise, usou-se como variável a raiz quadrada dos dados originais.

Os resultados da análise de variância estão apresentados na Tabela III

TABELA III - Análise de variância para a raiz quadrada dos dados apresentados na Tabela II

Causas de Variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Grupos	03	80	26,666	17,028
Resíduo	60	94	1,566	
Total	63	174		

Em resumo, o valor F, apresentado na Tabela III é significativo ao nível de 5%. Utilizou-se então o teste "t" de Tukey para a comparação de médias, duas a duas. Ao nível

de 5%, o valor da diferença mínima significativa (DMS), dada por esse teste, é 1,17.

Com base nesse valor pode-se afirmar que os animais submetidos ao tratamento B, apresentam índice de cárie, em média, superior aos dos animais submetidos ao tratamento C. Também se pode inferir que os animais do grupo A, têm, em média, índice de cárie significativamente menor do que os animais do grupo B.

5.3 - Exame Hematológico

A contagem diferencial de leucócitos dos animais pertencentes aos grupos A, B, C e D foi realizada no 120º dia do experimento.

Depois de uma pequena incisão na cauda de quatro ratos de cada grupo, escolhidos ao acaso, foram preparados três esfregaços para cada animal.

As lâminas coradas pelo método de May Grunwald Giemsa, conduziram os resultados apresentados na Tabela IV.

TABELA IV - Média e desvio padrão da média, relativos à contagem diferencial de leucócitos dos animais dos Grupos A , B , C e D , em esfregaços de sangue periférico, corados pelo método de May-Grunwald-Giemsa

Grupos	Leucócitos			
	Neutrófilos	Linfócitos	Eosinófilos	Monócitos
"A"				
Vacinado				
Infectado	13,00 ± 0,94	84,40 ± 1,02	0,50 ± 0,15	2,16 ± 0,24
D. cariog.				
"B"				
Não vacinado				
Infectado	19,16 ± 1,38	77,90 ± 1,53	0,66 ± 0,18	2,08 ± 0,37
D. cariog.				
"C"				
Não vacinado				
Não infectado	18,30 ± 0,88	77,80 ± 1,20	0,66 ± 0,14	2,41 ± 0,41
D. cariog.				
"D"				
Dieta Normal	25,08 ± 2,05	71,90 ± 2,20	0,58 ± 0,23	2,41 ± 0,25

D. cariog. = Dieta cariogênica

5.4 - Peso dos Animais

Os animais selecionados para o experimento (100 ratos), aos 21 dias de vida apresentavam peso médio de 36 gramas. Separados em quatro grupos e submetidos a tratamentos diferentes, os ratos apresentaram ao final do experimento os pesos que constam na Tabela V. Os dados apresentados no dia 120 correspondem às médias dos pesos em gramas de oito animais de cada sexo para cada grupo.

TABELA V - Peso médio dos ratos, segundo o grupo e o sexo, no início e no final do experimento

Grupo	Sexo	Dia 21	Dia 120	Média do ganho de peso do grupo
A	Macho	33,96	263,53	198,03
	Fêmea	33,96	200,46	
B	Macho	37,65	269,05	197,20
	Fêmea	37,65	200,66	
C	Macho	37,56	302,50	213,69
	Fêmea	37,56	200,00	
D	Macho	36,39	280,85	207,60
	Fêmea	36,39	207,14	

5.5 - Aspectos Macroscópicos das Cáries nos Diferentes Grupos

O padrão de desenvolvimento, conforme se pode verificar pelos índices individuais de cada rato, variou bastante. Tomando por exemplo, na Tabela II, o rato de número 4 do grupo A , número 3 do grupo B , número 1 do grupo C e número 16 do grupo D , teremos praticamente em todos eles, um mesmo índice de cárie, com aspectos morfológicos, localização e extensão semelhantes. As Figuras 1 , 2 , 3 e 4 , ilustram de maneira clara alguns desses aspectos. Evidentemente são apenas exemplos de cada grupo.



FIGURA 1 - Aspecto macroscópico da hemi-mandíbula, lado esquerdo, de um rato do grupo A, imunizado e infectado com *Streptococcus mutans*. Aparecem da esquerda para a direita, o 1º, 2º, 3º molares. O exame criterioso das regiões bucal, morsal, lingual, proximal e do sulco, mostrou neste grupo, pelo método de Keyes, um baixo índice de cáries (Média de 16,62 para o grupo A).

Aumento aproximado: 20 vezes.



FIGURA 2 - Aspecto macroscópico dos molares inferiores de um rato do grupo B (não imunizado e infectado). Pode-se observar uma acentuada destruição da coroa dental por cáries. O índice médio de cárie neste grupo B foi de 46,06.

Aumento aproximado: 30 vezes

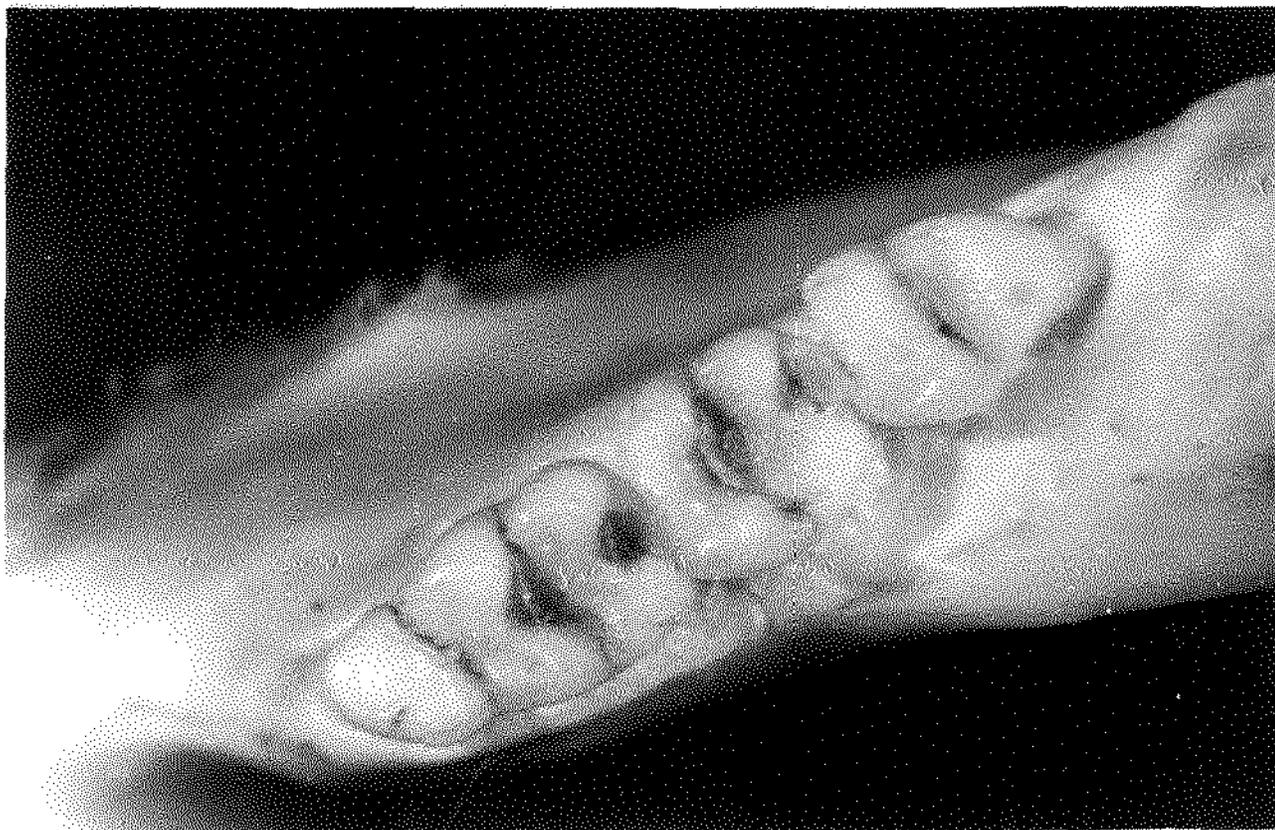


FIGURA 3 - Aspecto macroscópico mostrando detalhes das lesões cariosas desenvolvidas nos molares inferiores de um rato do grupo C, alimentado com dieta cariogênica. O índice médio de cáries neste grupo, segundo o método de Keyes foi de 19,75.
Aumento aproximado: 20 vezes.



FIGURA 4 - Aspectos macroscópicos de uma hemi-mandíbula de um rato do grupo D (controle). O índice médio de cáries neste grupo controle foi de 15,25. Aumento aproximado: 20 vezes.

CAPITULO VI - DISCUSSÃO

6 - DISCUSSÃO

6.1 - Índice de Cáries

A análise criteriosa dos resultados obtidos na presente pesquisa, na qual, quatro grupos de ratos foram submetidos a diferentes tratamentos, durante 120 dias mostra alguns dados interessantes.

Primeiramente, a observação das médias constantes das colunas A e B da Tabela II, nos dá uma relação numérica de 16,62 para 46,06. Considerando que ambos os grupos (A e B) foram submetidos a um mesmo tipo de alimentação, e que dentro do maior rigor científico, a única variável foi a imunização recebida pelo grupo A, a partir do 21º dia de vida, é lógico que se suponha que as diferenças nos índices de cáries, resultem dessa variável (imunização). Ainda pelos dados exibidos na Tabela III e pelo resultado da análise de variância, pode-se inferir que os índices de cáries dos ratos do grupo B (não vacinados) é significativamente maior que os ratos do grupo A (vacinados). Isto significa que a indução de uma resposta imunológica, pela introdução do imunógeno na água que os animais bebiam, utilizando como tal, as células inteiras mortas, de uma cepa cariogênica de *Streptococcus mutans* deve ter sido a razão dessa variação. Desde que os resultados foram obtidos procurando-se seguir estritamente os critérios quase que universalmente aceitos, preconizados por Keyes (1958) e recomendados pe

lo "National Institute of Dental Research", dos Estados Unidos, a sua significância a nível de 5% , permite alguns tipos de comparação com trabalhos similares.

Michalek e cols. (1976), realizaram um estudo semelhante, usando ratos gnotobióticos. Apesar do tempo do experimento ter sido menor, apenas 90 dias, e de se utilizar uma cepa de microrganismos altamente cariogênica (mutante C 211 do *Streptococcus mutans* 6715) , em ratos gnotobióticos, a relação dos índices de cáries entre os grupos imunizados e não imunizados foi de 52,3 / 99,0 (47% de redução). Na presente pes - quisa, usando ratos convencionais, por um período de tempo maior (120 dias) e utilizando uma cepa de *Streptococcus mutans*, sero tipo c , obtida de dentes humanos cariados, a relação dos índices de cáries entre os grupos imunizados e não imunizados foi de 16,62 / 46,06 (64% de redução).

Embora os resultados possam ser comparáveis, a diferença entre os índices poderia ser atribuídos ao fato de serem usados ratos gnotobióticos num experimento e convencio - nais em outro e nas diferenças inerentes aos imunógenos usados. De qualquer forma, o fato significativo foi que a imunização de terminou uma variação nos resultados, independente do tipo de rato e da cepa de *Streptococcus mutans* usado, o que poderia permitir inferências sobre este método de imunização. Em números absolutos, conforme se pode observar pela Tabela II, existe um índice de cárie de 266 para o grupo vacinado contra 737 do gru

po não vacinado, o que dá uma diferença de 471 unidades do Índice de cárie entre os grupos A e B. Já em 1968, Kennedy e cols., haviam observado que o soro de indivíduos sem cáries con tinha aumentados níveis de anticorpos de três tipos de estreptococos associados a cárie, em comparação com o soro de individuos possuidores de muitas cáries.

Os resultados sugeriam que ambos os grupos tinham sido expostos a organismos cariogênicos e que as cáries tinham desenvolvido em um grupo, apesar dos anticorpos no sangue.

Embora os anticorpos séricos provavelmente desempenham algum papel no desenvolvimento da cárie, parece claro que alguns outros fatores possam estar envolvidos, tais como, a estruturação do esmalte ou a composição da saliva.

McGhee e cols., em 1976, estudando o efeito de imunizações ativas e passivas ao *Streptococcus mutans*, em ratos mal-nutridos, observou que IgG anti-*Streptococcus mutans* era passivamente transferido aos filhotes pelas mães, através do leite. Outra possível fonte de anticorpos na cavidade bucal é, certamente o sulco gengival. Lehner e cols., em 1975, sugeriram que a constante transudação de anticorpos séricos através do fluido sulcular é um importante fator na prevenção de cáries dentais em macacos rhesus.

A análise estatística, utilizando o teste "t" de Tukey para a comparação de médias, duas a duas, (Tabela III)

mostra que, indubitavelmente, a imunização dirigida contra os *Streptococcus mutans* pode proteger contra a cárie. E este resultado vem confirmar trabalhos similares realizados em diferentes modelos experimentais, por Bowen e cols., 1975 ; Lehner e cols., 1975 ; Evans e cols., 1975 ; Gaffar e cols., 1971 ; Taubman e Smith, 1974 ; McGhee e cols., 1975 ; Michalek e cols., 1976 ; Krasse e Jordan, 1977.

Observando ainda os números absolutos das cáries dos grupos C e D , apresentados na Tabela II , pode-se notar as diferenças entre a dieta cariogênica e dieta não cariogênica. A adição de 10% de sacarose na dieta do grupo C , determinou um aumento de 72 cáries (29,5%) , isto é, 316 unidades de cárie contra 244 no grupo com dieta normal, sem sacarose.

Quando se compara o índice de cárie (737) do grupo B (infectado e tratado com dieta cariogênica) com o índice (316) do grupo C (somente dieta cariogênica, mas sem infecção), observa-se que a inoculação de *Streptococcus mutans* , serotipo c , produziu no grupo B , uma marcada intensificação no desenvolvimento das cáries (421 unidades ou 57%) em relação ao grupo C.

Limitando-se a discussão aos resultados desses dois grupos B e C , o que se pode inferir é que o grupo C , poderia apresentar já uma certa imunidade aos estreptococos normalmente existentes em sua boca. A ocorrência de anticorpos séricos e salivares contra microrganismos normalmente encontra -

dos na boca tem sido frequentemente detectada não só em animais experimentais, como também em humanos. Por outro lado, a inoculação de uma cepa cariogênica de *Streptococcus mutans*, diferente daquelas indígenas, normalmente encontradas nestes ratos, poderia justificar esta diferença de 421 unidades de cáries (57%).

A relativa proximidade dos valores encontrados no grupo A, 266 unidades de cáries e do grupo C, com 316 unidades de cárie poderia sugerir que a imunização do grupo A, tenha de alguma forma interferido com a colonização da cepa cariogênica inoculada, justificando então, esta diferença de apenas 50 unidades de cáries, contra a diferença de 421 entre os grupos B e C.

Segundo Krasse e Jordan (1977), a aplicação tópicamente de uma vacina estreptocócica diretamente na cavidade oral de roedores induziu um aumento no título de algutinação na saliva de alguns animais imunizados, implicando numa reduzida colonização, provavelmente por ação de anticorpos IgA. Anteriormente, Michalek e cols., em 1976, já haviam comprovado a eficiência dessa imunização pela via oral.

Na presente pesquisa, a redução do número de cáries encontrada no grupo A (vacinado) em relação ao grupo B (não vacinado) poderia também resultar da ação da imunoglobulina IgA da saliva.

Embora não se tenha elementos concretos para tal afirmação, uma vez que as dosagens de imunoglobulinas não foram realizadas nesta pesquisa, existem evidências indiretas para se supor que a IgA da saliva esteja implicada. Primeiramente, porque a produção de IgA secretora em ratos, através de imunização parenteral, por injeção de *Streptococcus mutans*, já tem sido detectada há algum tempo por Taubman (1973), Taubman e Smith (1974), McGhee e cols. (1975), Michalek e cols. (1976) e Krasse e Jordan (1977). Em segundo lugar, este trabalho procurou repetir em ratos convencionais, o que fora feito em ratos gnotobióticos (Michalek e cols., 1976), obtendo-se resultados muito semelhantes quanto à redução dos índices de cárie. Naquele trabalho, as dosagens de imunoglobulinas no soro e na saliva dos diferentes grupos de ratos mostrou claramente, uma produção aumentada de IgA secretora, no grupo vacinado, suportando a afirmação de que a redução do número de cáries esteja de alguma forma relacionada a este tipo de imunoglobulina. Além do que, os títulos de aglutinação dessa imunoglobulina mostraram a especificidade dos anticorpos aos *Streptococcus mutans* cariogênicos, com os quais os ratos foram imunizados e infectados.

Também já foram demonstradas na saliva de parturida humana, reações de IgA-secretora com diferentes tipos de estreptococos, indicando que a colonização da boca por estreptococos orais indígenas pode levar à produção de anticorpos específicos (Krasse e Jordan, 1977).

Outro aspecto importante é que existe uma forte tendência em se aceitar, por evidências indiretas, de inúmeros trabalhos, o fato de que os anticorpos do tipo IgA - secretor podem inibir a aderência bacteriana e formação de placa.

Considerando que os esquemas de imunizações e de infecções usados nos ratos convencionais da presente pesquisa foram os mesmos usados em ratos gnotobióticos por Michalek e cols. (1976), e que as reduções dos índices de cáries induzidas pela imunização nas duas pesquisas são semelhantes, pode-se inferir que os mecanismos prováveis, implicados na redução das cáries, sejam os mesmos propostos para aquele trabalho, ou seja, através da IgA - secretora.

6.2 - Exame Hematológico

Os exames hematológicos foram realizados, para verificar, entre outras coisas, se a imunização por um período relativamente longo determinaria variações significantes no número de leucócitos (Tabela IV).

Utilizando-se como controles, os grupos C e D, pode-se observar que o processo de imunização determinou no grupo A ao final do experimento, uma redução do número de neutrófilos e aumento de linfócitos.

Embora não se tenha estabelecido matematicamente a significância dessa variação, ela se enquadra dentro do

esperado.

Evidentemente, no processo de imunização, um dos principais componentes celulares implicados, sem dúvida alguma é o linfócito. Tem sido postulado (Mestecky, 1978) que os antígenos, quando ingeridos, penetram através das vesículas pinocitóticas do epitélio que reveste as placas de Peyer do intestino e estimulam clones de linfócitos, nesses tecidos linfóides. Estes linfócitos estimulados e certamente aumentados de número, deixam estas placas de Peyer e entram na circulação, de terminando esta ligeira linfocitose.

Embora não se tenha ainda, feito um acompanhamento preciso destas etapas, existem probabilidades de que esta seja a explicação mais plausível para este aumento de linfócitos no sangue periférico dos animais vacinados. As pequenas diferenças constatadas entre os grupos B, C e D, não parecem guardar relação com os tratamentos realizados, conforme se observa na Tabela IV. Eosinófilos e Monócitos permanecem constantes nos quatro grupos.

6.3 - Peso dos Animais

Como parte do cronograma de pesquisa, a avaliação do desenvolvimento dos ratos sob diferentes tratamentos, a través do controle de peso desses animais poderia fornecer informações de interesse sobre o processo de imunização.

Em cada grupo, os machos foram separados das fêmeas e os dados mostrados na Tabela V, indicam que as variações de ganho de peso não foram grandes, nem entre os grupos, nem entre os animais de cada grupo (observação pessoal).

Poder-se-ia argumentar que nem a adição de 10% de açúcar à ração, nem a ingestão do imunógeno, e nem mesmo o elevado índice de cárie do grupo B (Tabela II) interferiram de maneira marcante no peso dos animais.

7 - CONCLUSÕES

Fundamentados nos resultados obtidos nesta pesquisa e à luz da discussão desses achados, pode-se concluir que:

- a - A imunização de ratos convencionais com *Streptococcus mutans* colocado na água que estes animais bebiam, promoveu uma significativa redução no índice de cárie.
- b - O grupo A , de ratos vacinados e infectados, apresentou uma discreta linfocitose, em relação aos demais grupos.
- c - O processo de imunização, assim como os demais tratamentos aplicados aos diferentes grupos não determinaram variações sensíveis no peso dos animais.
- d - O elevado índice de cárie do grupo B , mostrou que a infecção dos ratos com uma cepa cariogênica de *Streptococcus mutans* , serotipo c , obtida de dentes humanos cariados, foi realmente efetiva.

CAPITULO VIII - SUMMARY

8 - SUMMARY

Immunization (by using as immunogen entire cells of *Streptococcus mutans*) has showed to develop an inhibition effect against dental caries induced by *Streptococcus mutans*, in rats, and monkeys.

A lot of antigens has been involved as important agents concerning to the adherence of dental plaque to the tooth.

In this study, samples of dental plaque was obtained scrapping the mesial third of the buccal surfaces of human decayed upper molars. A cariogenic strain of *Streptococcus mutans*, serotype c, was isolated and used as immunogen (vaccine).

Four groups of rats (*Rattus norvegicus albinus*) aged about 20 days, were weaned and selected randomly. The group A was immunized and infected, while the group B was only infected. Group C was neither immunized nor infected. These three groups (A, B and C) were fed with cariogenic diet containing 10% of sucrose. The fourth group of rats (group D) was fed with normal diet.

Four 120 days-aged rats from each group were separated, and peripheric blood was collected, to determine the leukocytes differential counting. According to hematologic examinations, the group A animals showed a moderate lymphocytosis when related to the animals from the other groups.

The variations of body weight were not significant, and one can establish that neither the addition of 10% of sugar to the food, nor the ingestion of immunogen and the great number of caries of group B showed marked influence in the weight of the animals.

Later these procedures, all the animals were sacrificed, and the upper and lower maxillas were removed, in order to count the number of dental caries. The results showed a significant reduction of caries in the group A (Immunized) animals, when compared to the animals from the other groups that were fed with cariogenic diet. The B group, infected but not immunized showed a caries index equal to 737 unites, while the A group, infected and immunized had a index of 266 unites, that shows a significant variation. The addition of 10% sucrose in the diet of group C rats (316 unites of caries) had result in an increase of 72 caries, when compared to the rats from D group (244 unites), that were fed with normal food.

As showed through the results of these experiments, not only in gnotobiotic rats, but also in common rats, which have a complex buccal flora and another factors, the ingestion of antigenic substances (anti-*Streptococcus mutans* vaccinia) seems to prevent considerably the caries incidence.

CAPITULO IX - RESUMO

9 - RESUMO

A imunização, usando-se como vacina (imunógeno) células inteiras de *Streptococcus mutans*, mortos, tem mostrado exercer um efeito protetor contra a cárie dental induzida por este microrganismo, em ratos e macacos.

Muitos antígenos tem sido implicados como importantes na aderência da placa ao dente.

No presente trabalho, obteve-se a amostra de placa bacteriana, raspando o terço mediano das faces vestibulares dos molares superiores cariados de humanos, isolando-se uma cepa cariogênica de *Streptococcus mutans*, serotipo c, que foi utilizada como vacina (imunógeno).

Quatro grupos de ratos convencionais (*Rattus norvegicus albinus*), de 20 dias de idade, foram desmamados, separados aleatoriamente e usados no experimento. O grupo A foi vacinado (imunizado) e infectado, enquanto que o grupo B foi somente infectado. O grupo C não foi imunizado, nem infectado. Estes três grupos (A, B e C) foram alimentados com dieta cariogênica, contendo 10% de sacarose. O quarto grupo de ratos (grupo D) foi alimentado com ração normal.

Aos 120 dias de vida, colheu-se sangue periférico de quatro animais de cada grupo para a contagem diferencial de leucócitos. Ao exame hematológico, os animais do grupo A apresentaram uma discreta linfocitose em relação aos animais dos outros grupos, enquadrando-se dentro do esperado.

As variações do ganho de peso não foram significantes, nem entre os quatro grupos, nem entre os animais de cada grupo, podendo-se argumentar que nem a adição de 10% de sacarose à ração, nem a ingestão do imunógeno e nem mesmo, o elevado índice de cárie do grupo B interferiram de maneira marcante no peso dos animais.

Em seguida, todos os animais foram sacrificados e removidos os maxilares e mandíbulas para a contagem de cáries. Os resultados mostraram uma significativa redução do número de cáries nos animais do grupo A (que foram vacinados), em comparação com os animais dos demais grupos que comeram dieta cariogênica. O grupo B, infectado e não vacinado apresentou um índice de cáries igual a 737 unidades, enquanto que o grupo A, infectado e vacinado teve um índice de 266 unidades, mostrando uma variação significativa. A adição de 10% de sacarose na dieta dos animais do grupo C (316 unidades de cáries) resultou num aumento de 72 cáries contra os animais do grupo D (244 unidades) alimentados com dieta normal, sem sacarose.

Pelo que ficou exposto, não são em ratos gnotobióticos, mas também em ratos convencionais, com uma complexa flora bacteriana bucal, além de outros fatores, também a ingestão de substâncias antigênicas (vacina anti-*Streptococcus mutans*), parece prevenir de maneira considerável, a incidência de cárie dental.

CAPITULO X - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

10 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAHN, A. N. ; CUMMINGS, S. G. and HAYASHI, J. A. Inhibition of glucan and levan synthesis and neuramidase activity of oral Streptococci by monkey antiserums. J. Dent. Res., 55: 134-138, 1976
- BIER, O. Bacteriologia e Imunologia. 16^a ed. São Paulo, Melhoramentos. Ed. U.S.P., p. 786-787, 1975.
- BOWEN, W. H. A vaccine against dental caries: a pilot experiment with monkeys (*Macaca irus*). Br. Dent. J., 126: 159-160, 1969.
- ; COHEN, B. ; COLE, M. F. and COLMAN, G. Immunisation against dental caries. Br. Dent. J., p. 45-48, 1975.
- BRANDTZAEG, P. Synthesis and secretion of secretory immunoglobulins: with special reference to dental diseases. J. Dent. Res., 55: 102-114, 1976.
- BRATTHAL, D. and PETTERSSON, B. M. Common and unique antigens of *Streptococcus mutans*. J. Dent. Res., 55: 60-64, 1976.
- CHALLACOMBE, S. J. Passage of serum immunoglobulins into the oral cavity, in Lehner, T. and Cimasoni, G. (eds). The Borderland between caries and Periodontal Diseases II. Academic Press, London, p. 51-67, 1980.

- COLE, M. F. and BOWEN, W. H. Immunoglobulins A , G and M in serum and in some secretions of monkeys (*Macaca fascicularis* syn *irus*). Infection and Immunity, 13(5): 1354-1359, 1976.
- EBERSOLE, J. L. ; MOLINARI, J. A. and PLATT, D. Sequential appearance of salivary antibodies after oral immunization of axenic mice. Infection and Immunity, 12(2): 353-359, 1975.
- EVANS, R. T. ; EMMINGS, F. G. and GENCO, R. J. Prevention of *Streptococcus mutans* infection of tooth surfaces by salivary antibody in *irus* monkeys. Infect. Immunol., 12: 293, 1975.
- EVERHART, D. E. ; GRIGSBY, W. R. and CARTER JR., W. H. Evaluation of dental caries experience and salivary immunoglobulins in whole saliva. J. Dent. Res., 51: 1487-1491 , 1972.
- _____ ; _____ and _____. Human dental caries related to age, sex, race and certain salivary properties. J. Dent. Res., 52: 242, 1973.
- FITZGERALD, R. J. and KEYES, P. H. Demonstration of the etiologic role of Streptococci in experimental caries in hamsters. J. Am. Dent. Assoc., 61: 9-19, 1960.
- FITZGERALD, D. B. ; STEVENS, R. ; FITZGERALD, R. J. and MANDEL, I. D. Comparative cariogenicity of *Streptococcus mutans* strains isolated from caries active and caries resistant adults. J. Dent. Res., 56(8): 894, 1977.

- GAFFAR, A. ; MARCUSSEN, H. W. ; SCHLISSEL, H. J. and VOLPE, A. R. Effects of specific immunization with an enzyme on experimental dental caries in hamsters. J. Dent. Res., 49: 140, 1971.
- GENCO, R. J. ; EMMINGS, F. G. ; EVANS, R. T. and APICELLA, M. Purification, characterization and immunogenicity of cell associated glucan from *Streptococcus mutans*. J. Dent. Res., 55: 115-120, 1976.
- KEENE, H. J. ; SHKLAIR, I. L. and HOERMAN, K. G. Partial elimination of *Streptococcus mutans* from selected tooth surface following restoration of carious lesions and snf 2 prophylaxis. J. Amer. Dent. Ass., 93: 328, 1976.
- KENNEDY, A. E. ; SHKLAIR, I. L. ; HAYASHI, J. A. and BAHN, A. N. Antibodies to cariogenic Streptococci in humans. Arch. Oral Biol., 13: 1275-1278, 1968.
- KEYES, P. H. Dental caries in the molar teeth of rats. II. A method for diagnosing and scoring several types of lesions simultaneously. J. Dent. Res., 37(6): 1088-1099, 1958.
- _____. The infections and transmissible nature of experimental dental caries-findings and implications. Arch. Oral Biol., 1: 304-320, 1960.
- KRASSE, B. and JORDAN, H. V. Effect of orally applied vaccines on oral colonization by *Streptococcus mutans* in rodents. Arch. Oral Biol., 22: 479-484, 1977.

- LEGLLER, D. W. ; MCGHEE, J. R. ; MESTECKY, J. ; ARNOLD, R. R. and CALSSON, J. Systemic and oral health status of immune deficient subjects. I.A.D.R. Abstracts., p. 895, 1980.
- LEHNER, T. The role of serum salivary antibodies in protection against dental caries, in Lehner, T. and Cimasoni, G. (eds.). The Borderland between caries and Periodontal Diseases. II. Academic Press, London, p. 193-214, 1980.
- ; CHALLACOMBE, S. J. and CALDWELL, J. An immunological investigation into the prevention of caries in deciduous teeth of rhesus monkeys. Arch. Oral Biol., 20: 305-310, 1975.
- MCGHEE, J. R. ; MICHALEK, S. M. and GHANTA, V. K. Rat immunoglobulins in serum and secretions: purification of rat IgM , IgA and IgG and their quantitation in serum, colostrum , milk and saliva. Immunochemistry, 12: 817-823, 1975.
- MESTECKY, J. Introduction to the structural and cellular aspects of the secretory IgA system. J. Dent. Res., 55: 98-101, 1976.
- ; MCGHEE, J. R. ; KULHAVY, R. ; MICHALEK, S. M. ; CRAGO, S. and ARNOLD, R. R. Synthesis of IgA and the induction of local immunity, in Peeters, H. (ed.): Proteins of the Biological fluids - Pergamon Press. New York , p. 811-818, 1978.
- MICHALEK, S. M. ; MCGHEE, J. R. ; MESTECKY, J. ; ARNOLD, R. R. and BOZZO, L. Ingestion of *Streptococcus mutans* induces secretory immunoglobulin A and caries immunity. Science, 192: 1238-1240, 1976.

- MICHALEK, S. M. ; MCGHEE, J. R. ; NAVIA, J. M. and NARKATES, A. J. Effective immunity to dental caries: protection of malnourished rats by local injection of *Streptococcus mutans*. Infection and Immunity, 13(3): 782-789, 1976.
- NEWBRUN, E. Cariology. Willians and Wilkens Co (eds). Baltimore, p. 15 and 257, 1978.
- NIVEN Jr., C. F. ; SMILEY, K. L. and SHERMAN, I. M. The hydrolysis of arginine by Streptococci. J. Bact., 43: 651-660, 1942.
- RUANGSRI, P. and ØRSTAVIK, D. Effect of the acquired pellicle and of dental plaque on the implantation of *Streptococcus mutans* on tooth surfaces in man. Caries Research, 11: 204-210, 1977.
- SCULLY, C. M. and LEHNER, T. Opsonization, phagocytosis and killing of *Streptococcus mutans* by polymorphonuclear leukocytes, rhesus monkey (*Macaca mulatta*). Arch. Oral Biol., 24: 307-312, 1979.
- TAUBMAN, M. A. Role of immunization in dental disease, in Mergenhagen, S. and Scherp, H. (eds): Comparative Immunology of the oral cavity. Washington, D. C. U. S. Government Printing Office, pp. 138-158, 1973.
- and SMITH, D. J. Effects of local immunization with *Streptococcus mutans* on induction of salivary immunoglobulin A antibody and experimental dental caries in rats. Infect Immun., 9: 1079-1091, 1974.

Van HOUTE, J. ; UPESLACIS, V. N. ; JORDAN, H. V. ; SKOBE, Z. and GREEN, D. B. Role of sucrose in colonization of *Streptococcus mutans* in conventional sprague-dawley rats. J. Dent. Res., 55: 202-215, 1976.

VELD, J. H. ; BANNET, D. ; HELDERMAN, W. P. ; CAMARGO, P. S. and BACKER-DIRKS, O. Antibodies against *Streptococcus mutans* and glycosyltransferases in caries-free and caries-active military recruits, in McGhee, J. R. ; Mestecky, J. and Babb, J. L. (eds): Secretory Immunity and Infection. New York. Plenum Publishing Corporation, pp. 369-381, 1978.

WICKEN, A. J. and KNOX, K. W. Immunogenicity of cell wall and plasma membrane components of some oral lactic acid bacteria. J. Dent. Res., 55: 34-41, 1976.