



FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

**ESTRATÉGIAS DE VACINAÇÃO CONTRA A CÁRIE DENTÁRIA
VACCINATION STRATEGIES AGAINST TOOTH DECAY**

Bianca Adriana Da Silva Alves

Orientador: Professor Doutor Pedro de Sousa Gomes

Porto, 2021

ESTRATÉGIAS DE VACINAÇÃO CONTRA A CÁRIE DENTÁRIA
VACCINATION STRATEGIES AGAINST TOOTH DECAY

Tese de Mestrado especialmente elaborada para obtenção de aprovação final
no Curso de **Mestrado Integrado em Medicina Dentária**

Autor: Bianca Adriana Da Silva Alves

Estudante de Mestrado em FMDUP - Mestrado Integrado em Medicina Dentária

Email: biancalves26@live.com.pt

Orientador

Professor Doutor Pedro de Sousa Gomes

Professor Associado

Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

“Ah, que ninguém me dê piedosas intenções!
Ninguém me peça definições!
Ninguém me diga: “vem por aqui”!
A minha vida é um vendaval que se soltou.
É uma onda que se alevantou.
É um átomo a mais que se animou...
Não sei por onde vou,
Não sei para onde vou,
--- Sei que não vou por aí. “

- José Régio

Agradecimentos

Aos meus pais, Adriano Martins Alves e Cármen Paula Ribeiro da Silva, que todos os dias me ensinam o valor do amor, do esforço e da dedicação. Obrigada por nunca desistirem de lutar por mim mesmo quando o maior sacrifício era vosso. A vós devo-vos o mundo, obrigada por preencherem a minha vida. Espero um dia tornar-me metade da pessoa que vocês são.

Ao meu irmão, Sérgio da Silva Alves, por todas as alegrias e orgulho que me proporciona, pelas discussões e, por me fazer voltar a ser criança quando está por perto. Obrigada por todo o esforço que fizeste para que pudesse completar esta etapa da minha vida. Serás o meu 'petit' para sempre.

À minha família, que esteve sempre a meu lado para amenizar a minha saudade com gestos e palavras. Que sempre me apoiou e encorajou. Sem vocês, isto também não seria possível.

À minha sombra, Bruna Pontes Nogueira, pelos nossos 20 anos de amizade e por todo o apoio e felicidade que me dá. És um exemplo para mim, obrigada por caminhares a meu lado. Serei eternamente agradecida por teres colocado no meu caminho os pequenos pedaços de ti que hoje também chamo de família.

Ao meu orientador, Pedro de Sousa Gomes, por todo o apoio na construção deste trabalho, pela paciência, dedicação e auxílio que me prestou durante estes últimos meses. E principalmente, pela autonomia e confiança que em mim depositou.

Às amigas e amigos que encontrei na faculdade, á minha binómia que me acompanhou durante estes anos, e que nunca esquecerei, obrigada por todos os momentos que tornaram este percurso especial e memorável.

A todos os que cruzaram no meu caminho, mas principalmente, aos que permaneceram, obrigada do fundo do meu coração.

Resumo

A cárie dentária permanece como uma das doenças infecciosas que mais afeta o ser humano, atingindo proporções epidêmicas. Esta doença é considerada uma das causas primárias da perda precoce das estruturas dentárias e da diminuição da qualidade de vida da população, tornando-se, assim, um problema de saúde pública mundial.

Streptococcus mutans (*S. mutans*) é considerado o principal agente etiológico da cárie dentária, sendo o microrganismo mais frequentemente isolado das lesões, e caracterizado por distintos fatores de virulência – como diferentes proteínas de adesão às estruturas dentárias – que permitem a sua associação ao estado de doença.

A descoberta da função da IgA-secretada (IgA-s) específica para o *S. mutans* - uma imunoglobulina produzida pelo sistema imunológico - como um fator salivar protetor contra a cárie dentária, permitiu considerar a imunização como uma nova abordagem terapêutica que visa a proteção do indivíduo contra a cárie dentária.

No processo de imunização foram testados vários antigénios provenientes de *S. mutans*, dos quais se destacam: Ag I/II, uma proteína de superfície que se comporta como uma proteína de adesão e permite a adesão primária do microrganismo às estruturas dentárias; as glicosiltransferases (GTFs), que atuam no processo de acumulação de *S. mutans* através da produção de glucanos; e as proteínas de ligação ao glucano (*glucan binding proteins* – GBPs), proteínas que efetuam a ligação aos glucanos produzidos pelas GTFs.

Várias abordagens foram testadas tanto quanto ao tipo de vacina, como às vias de administração, tipo de imunização, período de administração e população-alvo, por forma à obtenção do melhor resultado.

Apesar da investigação desenvolvida nas últimas décadas ainda não existe nenhuma estratégia terapêutica disponível e comercializada contra a cárie dentária. Para tal acontecer será necessário efetuar mais estudos clínicos, validando a efetividade e a biossegurança das estratégias desenvolvidas, aumentando a duração da sua eficácia, em particular na população-alvo a que se destina.

O presente trabalho procura descrever e rever criticamente os conceitos mais importantes na investigação das vacinas contra a cárie dentária, e a sua aplicação clínica.

Material e Métodos:

A pesquisa bibliográfica foi realizada na base de dados PubMed e Web of Science, com a seguinte combinação de palavras-chave: *Streptococcus mutans*, tooth decay, anti-caries vaccine, passive immunization, active immunization, S-IgA.

Os filtros utilizados permitiram a seleção de artigos de investigação, estabelecendo-se um limite temporal de 1968 a 2021. Selecionaram-se os textos em Português e em Inglês, juntamente com a análise do resumo, e, de acordo com a sua relevância sobre o tema. Excluíram-se artigos que incluíssem associação a outras patologias, por exemplo, a periodontite. Foram incluídos artigos que se encontravam descritos na bibliografia de alguns dos artigos que foram utilizados no presente trabalho científico.

Palavra-chave: *Streptococcus mutans*, cárie dentária, vacina anti-cárie, imunização passiva, imunização ativa e IgA-s.

Abstract

The dental caries remains one of the infectious diseases that most affects human, reaching epidemic proportions.

This disease is considered one of the primary causes of early loss of dental structures and decreased quality of life of population, thus, becoming a global epidemic public health problem.

Streptococcus mutans (*S. mutans*) is considered the principal etiological agent of dental caries, being the most frequently isolated microorganism from lesions and characterized by different virulence functions - such as different proteins of adhering to dental structures - which allows your association to the state of disease.

The discovery of the function of secreted-IgA (IgA-s) specific to *S. mutans* - an immunoglobulin produced by the immunity system - such as a protective salivary factor against dental caries allowed to consider immunization as a new therapeutic approach aimed at protecting the individual against dental caries.

In the immunization process, several antigens from *S. mutans* were tested, which Ag I/II, a surface protein that behaves like a protein-aiding that allows the primary accession of the microorganism to dental structures; glycosyltransferases (GTF's), which act in the process of accumulations of *S. mutans*, through the production of glucans and (glucan-binding proteins - GBPs), proteins that made the connection to the glucans produced by GTBs.

Several approaches have been tested, both of the type of vaccine, as the rules of administration, type of immunization, period of administration and target population, in order to obtain the best result.

Despite the research developed in recent decades, there is still no therapeutic strategy available and marketed against dental caries.

For this to happen, it will be necessary to carry out clinical studies, validating the effectiveness and biosafety of the strategies developed, increasing the

duration of their effectiveness, particularly in the target population for which it is intended.

The present work searches to describe and review critically the most important concepts in the investigation of vaccines against dental caries and their clinical applications.

Materials and Methods:

The bibliographic research was carried out in PubMed and Web Science, with the following combination of keywords: *Streptococcus mutans*, tooth decay, anti-caries vaccine, passive immunization, active immunization, S-IgA.

The filters used allowed the selection of research articles, establishing a time from 1968 to 2001. The texts were selected in Portuguese and English, together with the analysis of abstracts and according to their relevance on the subject. Articles that included association with other pathologies, such as periodontitis, were excluded. There were included articles that were described in the bibliography of some of the articles that were used in the present scientific work.

Keywords: *Streptococcus mutans*, dental caries, anti-caries vaccine, passive immunization, active immunization and IgA-s.

| | |
|---|--------|
| Índice | |
| Resumo..... | VI |
| Abstract..... | IX |
| 1. Introdução..... | - 14 - |
| 2. Cárie Dentária..... | - 18 - |
| 2.1 Tratamento atual da cárie dentária | - 20 - |
| 3. Mutans streptococcus..... | - 23 - |
| 3.1. <i>Streptococcus mutans</i> - <i>S. mutans</i> | - 23 - |
| 4. Sistema Imunológico..... | - 27 - |
| 4.1. Saliva..... | - 27 - |
| 4.2. Imunoglobulinas..... | - 28 - |
| 4.3. Sistema imunológico das mucosas..... | - 30 - |
| 5. Vacina anti-cárie..... | - 33 - |
| 5.1. Imunização ativa..... | - 34 - |
| 5.2. Antígenos..... | - 35 - |
| 5.2.1. Ag I/II, PAc ou P1..... | - 35 - |
| 5.2.2. GTFs – Glicosiltransferases..... | - 35 - |
| 5.2.3. GBPs – proteínas de ligação a glucanos..... | - 36 - |
| 6. Tipo de vacina..... | - 37 - |
| 6.1. Vacinas de subunidade..... | - 37 - |
| 6.1.1. Vacinas de péptidos sintéticos..... | - 38 - |
| 6.1.2. Vacinas polisacarídicas..... | - 38 - |
| 6.1.3. Vacinas conjugadas..... | - 38 - |
| 6.2. Vacinas recombinantes e vetores de expressão atenuada..... | - 39 - |
| 6.3. Vacinas de ADN..... | - 39 - |
| 7. Vias de administração:..... | - 39 - |
| 8. Adjuvantes e sistemas de distribuição..... | - 40 - |
| 9. População-alvo e período de imunização..... | - 41 - |
| 10. Imunização passiva..... | - 42 - |
| 11. Conclusão..... | - 44 - |
| 12. Referências..... | - 46 - |
| 13. Anexo I..... | - 52 - |
| 14. Anexo II..... | - 57 - |

Índice de Tabelas

Tabela I: Vacinas de imunização ativa ou passiva testadas em humanos - 52 -

Lista de Siglas e Abreviaturas

Ag I/II - Adesinas denominadas antígenos I/II ou Pac ou P1.

APC - Célula apresentadora de antígeno.

CAT - Domínio catalítico.

GALT - “Gut-Associated Lymphoid Tissue”.

GBPs - “Glucan-Binding Proteins”.

GLU - Glucano.

gtf - Gene que codifica as GTFs.

GTFs - Glicosiltransferases.

IgA - Imunoglobulina A.

IgA-s - Imunoglobulina A secretada.

IgG - Imunoglobulina G.

IgM - Imunoglobulina M.

NALT - “Nasal-Associated Lymphoid Tissue”.

S. mutans - *Streptococcus mutans*.

1. Introdução

A par do avanço do conhecimento acerca da saúde oral e da valorização da cavidade oral e das suas estruturas para o estado de saúde sistémico, verificou-se uma redução drástica no número de pessoas desdentadas. Os dentes são, pois, estruturas duras e calcificadas constituídas por elementos químicos, maioritariamente cálcio e fósforo. A componente mineral é rica em formas de fosfato de cálcio e hidroxiapatite, carbonatada ou fluoretada, sendo esta última a mais resistente. É precisamente nesta estrutura que ocorrem as trocas iónicas que podem alterar a estrutura cristalina, tornando-a menos suscetível a doenças como a cárie dentária. Considerando ainda que os dentes permanecem mais tempo em função na cavidade oral, será de considerar que os mesmo se encontram durante mais tempo sujeitos a agressões físicas, químicas e mecânicas, o que por sua vez pode aumentar a suscetibilidade a distintas patologias, como a cárie dentária - podendo observar-se um acréscimo de cáries radiculares nos mais idosos, mas também um aumento das cáries coronais, nos mais jovens ^{22, 27}.

A cárie dentária permanece como uma das doenças infecciosas que mais afeta o ser humano, atingindo proporções epidémicas, tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento e subdesenvolvidos. Esta doença é ainda considerada uma das causas primárias da perda precoce das estruturas dentárias e da diminuição da qualidade de vida da população com as suas sequelas, tornando-se assim, um problema de saúde pública mundial, uma vez que apenas cerca de 30% da população visita o seu dentista regularmente. Esta doença afeta, entre 60 a 90% de crianças em idade escolar e quase a totalidade dos adultos ^{5, 21, 23, 27}.

A cárie dentária desenvolve-se, num processo patológico, que envolve a destruição local dos tecidos dentários mineralizados pelos produtos metabólicos de microrganismos orais. Clarke observou pela primeira vez os *streptococcus* orais, tendo Keyes mais tarde, em 1960, associado o carácter infeccioso e de transmissibilidade desta doença. No mesmo ano, Landmark, por sua vez,

estabeleceu que os mutans *streptococcus* seriam os agentes etiológicos primários no estabelecimento e desenvolvimento desta doença, podendo depreender-se que as duas espécies mais frequentemente isoladas de amostras dentárias são o *streptococcus mutans* (*S. mutans*) e o *streptococcus sobrinus*. Subsequentemente, considerou-se o *S. mutans* como o principal agente etiológico da cárie dentária, que para além de ser o microrganismo mais isolado destas lesões, possui ainda proteínas de superfície que permitem a adesão primária às estruturas dentárias. Todavia, estes microrganismos não são os únicos com capacidade de iniciarem e desenvolverem a doença de cárie dentária, dado que outros microrganismos podem estar envolvidos nos processos cariosos, como é o caso dos lactobacilos. Porém, o *S. mutans* é o principal responsável pela colonização da cavidade oral assim que surgem os primeiros dentes, encontrando-se presente durante todas as fases do processo carioso, e permanecendo na cavidade oral durante todo o processo, mesmo com as condições adversas que caracterizam o microambiente do desenvolvimento da doença, tendo em conta que *S. mutans* possui propriedades acidúricas e acidogénicas 12, 18, 33.

Para que existam condições propícias ao desenvolvimento de um processo carioso, é necessário estabelecer um desequilíbrio do biofilme oral - disbiose, no qual os microrganismos que possuem uma vantagem seletiva sobre outros, *S. mutans*, por exemplo, permanecem na cavidade oral com a capacidade de produção de ácidos orgânicos que provocam a dissolução dos tecidos mineralizados, esmalte e dentina 4, 8.

Presentemente, as medidas implementadas no controlo desta doença passam pela implementação de medidas preventivas, como o controlo químico e mecânico da placa, o uso de fluoretos, a aplicação de selantes de fossas e fissuras, e o controlo da dieta. Estas medidas permitem uma prevenção temporária, comprovadamente eficaz, contudo carecem de uma eficácia significativa e sustentada a longo prazo.

Aquando do aparecimento das primeiras lesões cariosas, o único tratamento possível assenta na remoção da estrutura cariada e no restauro do dente em questão sendo, no entanto, esta medida limitada a uma eficácia

individual do dente afetado, pretendendo apenas reduzir a morbidade associada à doença naquele dente, não garantindo que o mesmo não seja atingido novamente por esta doença ou que apresente uma recidiva de cárie 4, 5, 15.

Quando se debate acerca da temática das diferentes abordagens terapêuticas de doenças orais, é obrigatório considerar a ação do sistema imunológico, em particular os mecanismos específicos que ocorrem ao nível da mucosa oral. Alguns dos mediadores imunológicos atingem o microambiente oral através das glândulas salivares *major* e *minor*, e das suas respectivas secreções. A saliva é assim responsável pelo transporte de diferentes substâncias, como os minerais – utilizados nas trocas iônicas que conferem proteção às estruturas dentárias, e distintas moléculas com atividade na proteção imunológica da cavidade oral. Entre estas merece destaque a imunoglobulina A secretada (IgA-s), que é considerado o principal mecanismo efetor da imunidade adaptativa no microambiente oral. Este anticorpo encontra-se ausente aquando do nascimento, mas é transmitido pela mãe ao bebé através da amamentação, podendo surgir, da mesma forma, aquando da erupção dos primeiros dentes decíduos, como a 1ª linha de defesa imunológica contra a cárie dentária. Dado que a IgA-s nos confere proteção contra a cárie dentária, seria interessante, como abordagem terapêutica, elevar a quantidade desta imunoglobulina na cavidade oral, de modo a aumentar a proteção individual 5, 7, 12, 27.

É neste contexto que têm sido desenvolvidas novas abordagens terapêuticas, que visam a indução da resposta imunológica do hospedeiro, através da imunização, passiva ou ativa, contra o principal microrganismo associado à cárie dentária - *S. mutans*. A imunização deve ser segura e eficaz quando interferimos com os mecanismos moleculares deste microrganismo. Os antígenos de virulência do *S. mutans* são o alvo principal para as diferentes estratégias de vacinação, nomeadamente as adesinas fibrilares de superfície (Ag I/II ou Pac ou P1), as glucosiltransferases (GTFs) e as proteínas de ligação ao glucano (GBPs).

Estas proteínas desencadeiam a resposta do sistema imunológico do hospedeiro, com a formação de anticorpos específicos que visam bloquear a

função particular de cada fator de virulência. Com esta imunização procura-se o aumento significativo de anticorpos IgA-s específicos para os fatores de virulência de *S. mutans*, a fim de minorar a prevalência e patogenicidade destes microrganismos. Outra grande preocupação assiste em tornar a imunização o mais eficaz possível, procurando criar um ambiente oral rico em fatores de proteção contra os diversos agentes virulentos, diminuindo assim a propensão para o desenvolvimento da carie dentária 1, 8, 12, 16.

A busca contínua por uma vacina anticárie torna-se crucial, não só para as gerações futuras, mas para todas as pessoas que poderão ser infetadas pela doença em questão. A maior permanência dos dentes na cavidade oral torna a saúde oral mais suscetível a novas lesões ou recidivas. O aumento da predisposição à cárie dentária por síndromes, como a síndrome da boca seca, ou por indivíduos submetidos a tratamentos radiológicos como procedimento de tratamento para doenças como o cancro da cabeça e pescoço, ou que se encontram em tratamento farmacológico com distintos medicamentos, torna a busca por esta terapia ainda mais importante no controlo da doença 18.

O presente trabalho procura descrever e rever criticamente os conceitos mais importantes na investigação das vacinas contra a cárie dentária, e de uma possível diminuição da sua incidência e da morbilidade, associadas à sua aplicação clínica.

2. Cárie Dentária

A cárie dentária define-se como uma doença crónica, complexa, infecciosa e multifatorial, sendo esta uma das doenças mais comuns no ser humano, que afeta entre 60% a 90% das crianças em idade escolar e a grande maioria dos adultos. Sendo frequente em todos os grupos etários é uma das principais causas da perda das estruturas dentárias 1, 5, 15.

Embora a doença supracitada não represente uma ameaça à vida humana, desta resultam consequências como o desconforto físico e psicológico, o qual causa impacto no quotidiano e bem-estar dos indivíduos. Da mesma forma, a cárie dentária é responsável por diversas alterações físicas/fisiológicas, das quais se destacam a dor, dificuldades em mastigar os alimentos e dificuldades na fala, para além de eventuais complicações estéticas e psicológicas 1.

A cárie dentária resulta de um processo cariioso que ocorre quando existe um distúrbio na homeostasia da cavidade oral, originando, dessa forma, a dissolução dos tecidos mineralizados dentários, o esmalte, a dentina e o cimento. A cavidade oral encontra-se repleta de espécies bacterianas que se organizam num biofilme estruturado que, em condições normais, modula o crescimento das espécies e impede a entrada de novos colonizadores. Todavia, podem existir desequilíbrios e, algumas dessas bactérias, principalmente o *Streptococcus mutans*, portador de características acidogénicas e acidúricas, ganham algum tipo de vantagem seletiva sobre outras, provocando um crescimento exponencial destas bactérias, que em excesso são prejudiciais à homeostasia da cavidade oral.

Estas bactérias possuem a capacidade de produzir compostos ácidos orgânicos, como o ácido láctico, que provoca a diminuição do pH da cavidade oral, ou seja, acidifica o meio. Contudo, estas bactérias sobrevivem em pH de valores muito baixos, não esquecendo que a desmineralização do esmalte e dentina ocorre quando o pH tem valores inferiores a 5,5. Esta condição afeta,

igualmente, a diversidade do biofilme que, devido ao aumento da acidificação vai eliminando algumas bactérias comensais da microbiota oral. Caso estas condições não sejam revertidas cria-se, desta forma, uma oportunidade para o aparecimento de lesões cariosas 1, 4, 8, 18, 22, 23.

A etiologia da cárie dentária é multifatorial. Keyes reconheceu que a cárie dentária resulta da interação entre a microbiota, dieta e suscetibilidade do hospedeiro, ou seja, a cavidade oral apresenta bactérias com potencial cariogénico, mas, para que ocorra doença, é necessário que estas bactérias possuam à sua disposição um substrato adequado para o seu crescimento. Este substrato será a nossa dieta, registando-se um aumento da incidência de lesões da cárie em dietas com elevado consumo de açúcares refinados - dietas cariogénicas. Um outro fator que interfere no aparecimento da doença cárie é a suscetibilidade do hospedeiro, o dente - que pode ser diretamente influenciado pela sua composição, morfologia, posição ou, indiretamente, quando falamos da saliva e das suas características como a composição, pH, capacidade tampão, fluxo salivar, viscosidade e a presença de agentes antibacterianos.

Porém, verificou-se ainda a influência doutros fatores, como o tempo, uma vez que o processo carioso é lento e progressivo, ou, a influência genética para predisposição ou resistência à cárie dentária conferida ao indivíduo. Existem ainda outros fatores que influenciam a predisposição para a cárie dentária, sendo o estatuto socioeconómico em que o cidadão se encontra inserido, um fator de elevada importância, não obstante que em países desenvolvidos a incidência de cárie dentária tenha vindo a aumentar, os países subdesenvolvidos continuam a ser os mais afetados com a ocorrência de lesões cariosas. Tendo em conta que estes últimos não dispõem de acesso adequado a tratamentos restauradores tornando a cárie dentária um importante problema de saúde pública 1, 2, 16, 20, 30.

S. mutans e *Streptococcus sobrinus*, do grupo *mutans streptococcus* apresentam-se como os microrganismos mais cariogénicos na microbiota oral e os que mais estão implicados na doença cárie. Estes microrganismos fermentam os hidratos de carbono da dieta, um dos mecanismos essenciais para que ocorra o processo de desmineralização que origina os primeiros sinais de cárie na cavidade oral. As lesões iniciais são designadas lesões de mancha branca e,

nesta fase do processo carioso, a lesão pode ainda ser revertida através da biodisponibilização de flúor na cavidade oral. No caso desta lesão não ser devidamente tratada e, enquanto decorrer a acidificação da cavidade oral, a desmineralização continua a ocorrer, o que levará à progressão do estado da doença, podendo surgir cavitações, inflamação da polpa e dos tecidos periapicais e em última estância a perda dentária 18, 22.

2.1 Tratamento atual da cárie dentária

As medidas terapêuticas atualmente usadas para a abordagem da cárie dentária apresentam apenas um caráter preventivo ou restaurador, por forma a diminuir as sequelas provocadas pela doença. A prevenção da cárie pode ocorrer por via de diferentes abordagens, das quais, o combate de espécies cariogénicas presentes na cavidade oral, a modificação da dieta cariogénica e o aumento da resistência do hospedeiro à cárie 22, 27.

A saúde oral inicia-se através da higiene oral efetuada pelo próprio indivíduo, essencial ao controlo das espécies cariogénicas. Contudo, o próprio fluxo salivar é capaz de reduzir a microbiota cariogénica presente na cavidade oral, para além de neutralizar os ácidos produzidos por estas bactérias e promover a remineralização dentária. A maior parte desta remoção é feita mecanicamente pela escovagem e uso do fio/fita dentária, removendo, assim, os depósitos de placa não calcificados. Esta remoção depende exclusivamente do próprio indivíduo, estando comprovado que previne e diminui o aparecimento de lesões de cárie.

Todavia, estas medidas apresentam uma eficácia temporária e os métodos mais efetivos não são os que dependem dos próprios indivíduos. Ainda assim, pode-se controlar estes microrganismos através do uso de soluções antibacterianas como a clorhexidina e, embora seja eficaz momentaneamente, após algumas horas verifica-se a reconstituição do biofilme. Para além de que, o uso de clorhexidina não é recomendado durante longos períodos de tempo, em resultado dos potenciais efeitos nocivos no ser humano. Adicionalmente, diversos estudos desenvolvidos na área comprovam que o uso adicional de outros agentes farmacológicos, como os antimicrobianos, não se justifica,

apresentando um reduzido custo/benefício, dado que não se trata de uma doença que ameaça a vida 18, 22, 23, 27.

O controle do consumo dos hidratos de carbono na dieta reduz os níveis de bactérias cariogénicas, tendo em conta que a sacarose, conhecida comumente como açúcar, é extremamente importante nos processos de adesão e produção de ácidos. Neste contexto existem ainda outros fatores que aumentam a predisposição, como o tipo de alimento ingerido, a frequência de ingestão e a consistência que o alimento apresenta. Hábitos alimentares com alimentos ricos em açúcares refinados, compostos por uma consistência viscosa e ingeridos entre refeições são altamente cariogénicos.

De forma a contrariar esta ação da sacarose é possível referir a utilização do xilitol, um substituto da sacarose, que não é fermentado por *S. mutans* e que demonstra ser uma boa opção como substituto, já que promove a remineralização dentária por não permitir uma redução significativa do pH do microambiente. Por outro lado, considera-se igualmente, o sorbitol como um substituto que, apesar de fermentado pelos *S. mutans*, origina uma menor produção de ácidos em comparação com outros açúcares 9, 22.

Dado que se objetiva aumentar a resistência das estruturas dentárias ao ataque ácido dos microrganismos, os agentes químicos com maior efetividade são os que englobam fluoretos. O flúor, para além de conferir proteção contra os ácidos orgânicos dos microrganismos é capaz de promover a remineralização dentária e inibir o metabolismo de *S. mutans*. Assim que exista biodisponibilidade oral de flúor, este liga-se aos cristais de hidroxiapatite e origina a formação de fluorapatite, aumentando a resistência da estrutura dentária. Dá-se preferência à aplicação tópica e pós-eruptiva do flúor para que seja possível usufruir da sua máxima ação terapêutica e preventiva, tendo em conta que o seu consumo sistémico pode provocar efeitos adversos diversificados.

O flúor, quando consumido sistemicamente e em dosagens excessivas pode acumular-se nos tecidos cerebrais afetando a memória e aprendizagem, em tecidos ósseos causando fluorose óssea e tecidos moles causando toxicidade metabólica estrutural e funcional dos órgãos como miocárdio, fígado, rim, testículos e ovários. Há ainda uma redução potencial da capacidade

cognitiva e disfunções da glândula tiroide. Por estas razões, este agente químico foi incorporado nas pastas dentífricas e noutros produtos utilizados para higienização oral, existindo, nesse sentido, uma descida acentuada na incidência da cárie dentária sem efeitos nocivos ao ser humano. O flúor pode ainda ser administrado no consultório dentário, através de gel ou verniz de elevadas concentrações, no entanto, nem todos os indivíduos conseguem ter acesso a estes serviços. De modo a minimizar esta desigualdade implementou-se o consumo de águas fluoretadas, o qual comprovou ser eficaz clinicamente e economicamente.

Apesar da sua eficácia, a possibilidade de negligência quando se administra flúor através do consumo de água a todos os indivíduos sem um controlo individual dos seus níveis de flúor é ainda tema de discussão, uma vez que a administração de doses excessivas pode ser prejudicial ao ser humano 18, 22, 27, 30, 38.

Ainda que bastante efetivo em diferentes superfícies do dente, a efetividade do flúor permanece limitada quando se trata das fossas e fissuras. O desenvolvimento da técnica de condicionamento ácido tornou possível o selamento destes locais. Os selantes de fossas e fissuras são recomendados essencialmente durante o processo de maturação dentária, mas podem ser usados noutras situações como em casos que a higienização do local seja difícil devido a sulcos muito profundos. No entanto, para a aplicação desta medida é necessária uma visita ao médico dentista, ao qual novamente nem todos tem acesso 22, 27.

Apesar do constante alerta acerca da importância da saúde oral e dos inúmeros métodos preventivos associados a esta, como o controlo químico e mecânico da placa bacteriana, a substituição dos açúcares da dieta e agentes quimioproliféricos e antibióticos, estes métodos dependem do indivíduo e apenas nos conferem proteção temporária e não a longo prazo. Em acréscimo, estes não se encontram acessíveis a todos devido às diferenças socioculturais e económicas presentes na sociedade 4, 5.

3. Mutans streptococcus

Mutans streptococcus define-se como um grupo de bactérias, algumas colonizadoras frequentes do microambiente oral, que possuem em comum propriedades que lhes conferem capacidade de indução de cárie.

Este grupo divide-se em 7 espécies, dos quais: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus rattii*, *Streptococcus criceti*, *Streptococcus downei*, *Streptococcus ferus*, e *Streptococcus macacae*, podendo distinguir-se pelo seu serotipo. Das 7 espécies supracitadas, *S. mutans* e *Streptococcus sobrinus* são os mais frequentemente encontrados em humanos, sendo que *S. mutans* é a espécie mais frequentemente isolada da cavidade oral e é considerado o principal agente etiológico da cárie dentária 7, 15, 22, 33.

3.1. *Streptococcus mutans* - *S. mutans*

Os *S. mutans* apresentam-se como cocos gram-positivos, anaeróbios facultativos, dado que podem sobreviver em qualquer zona da cavidade oral sendo capazes de metabolizar uma grande variedade de açúcares e álcoois de açúcar, como a glicose, sacarose, lactose, manitol, sorbitol, entre outros.

Estas bactérias são membros da microbiota oral primitiva, no entanto, podem tornar-se virulentas e cariogénicas, encontrando-se ainda associadas, potencialmente, a outras doenças, no caso em que se verifique a sua entrada e distribuição pela corrente sanguínea, provocando eventualmente patologias como a endocardite, risco aumentado de hemorragia cerebral grave seguido de AVC, colite ulcerosa e doença hepática gordurosa não alcoólica, o que aumenta a importância de controlar os níveis desta bactéria na cavidade oral 10, 17, 18.

Em 1924, Clarke isolou pela primeira vez o *S. mutans* de uma lesão cárie e fez a sua associação à doença. Porém, esta descoberta levantou várias questões que a fizeram permanecer esquecida durante cerca de 40 anos. Foi novamente considerada, aquando da descoberta da associação entre *S. mutans*

e a patogénese da cárie dentária, juntamente com a sua natureza infecciosa e transmissível 7, 8.

No nascimento, a cavidade oral encontra-se isenta de espécies microbianas, no entanto, começa imediatamente a ser colonizada ao ser exposta a microrganismos como por ex. *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus mitis*. Uma das primeiras fontes de transmissão da infeção por *S. mutans*, que ocorre inicialmente, é maternal, onde se verifica uma relação entre os altos níveis de *S. mutans* que a mãe apresenta e a probabilidade da criança poder ser infetada. A colonização por *S. mutans* surge, normalmente, com a erupção dentária por volta dos 4 aos 8 meses de idade.

Quando os dentes surgem na cavidade oral passam a ser locais de colonização para estas bactérias. Será, por isso, possível depreender que quanto mais cedo as crianças tiverem dentes presentes na cavidade oral mais precocemente podem ser colonizadas por *S. mutans* e, por essa razão, maior será a probabilidades de sofrerem de cárie precoce de infância. Nestas crianças, as medidas preventivas tornam-se imprescindíveis 6, 8, 9, 12, 18.

Por norma a colonização inicial e permanente por *S. mutans* durante um período estimado de tempo é apelidada de “janela de infetividade”, que ocorre entre os 18 e os 36 meses de idade. Por outras palavras, durante esta idade as crianças encontram-se mais propensas à colonização por estas bactérias e aos seus efeitos nocivos, até porque dependem dos pais para efetuarem a higienização da sua cavidade oral.

Durante este período, que ocorre entre a erupção dos primeiros dentes e o fim desta janela de infeção verifica-se a existência de um período crítico, onde as medidas preventivas têm o seu auge de eficácia. Apesar de ser necessária a presença dos dentes para que ocorra esta infeção, apenas a presença do dente não é suficiente para que ocorra a doença. Caso a criança durante este período de infeção não seja colonizada por *S. mutans* é muito provável que não seja colonizada pelo menos até a altura da erupção da dentição permanente. Esta janela de infeção baseia-se na média de idades em que surge o contacto, contudo, a presença de outros fatores, como a influência materna na colonização

por *S. mutans* ou o consumo de níveis altos açúcares, podem alterar os valores desta janela 6, 8, 12.

S. mutans é possuidor de várias propriedades que o tornam predominante na placa dentária e capaz de induzir processos cariosos. O mecanismo de indução de cárie dentária inicia-se através da ligação de uma adesina fibrilar de superfície, PAc, e um recetor independente da sacarose à película dentária, podendo esta ligação ser reversível.

Numa segunda fase, dependente da sacarose e com uma ligação muito forte e irreversível, temos por meio de glicosiltransferases secretadas e associadas a células GTF na produção de glucanos solúveis e insolúveis em água, sintetizados por *S. mutans* na presença da sacarose exógena. São várias as GTFs envolvidas na formação dos glucanos, sendo que alguns dos glucanos permanecem ligados ao GTF quando se ligam ao dente. O glucano pode ainda fazer outra ligação com uma proteína de superfície de *S. mutans* denominada GBP, uma proteína de ligação ao glucano 12, 18, 22, 33.

Depois do *S. mutans* se instalar sobre a superfície dentária e através da metabolização dos açúcares da dieta, ocorre a desmineralização do dente pelos produtos metabólicos produzidos. Destes produtos, o que é secretado em maior quantidade é o ácido láctico, proveniente da metabolização da sacarose. Este é um dos ácidos que apresenta maior poder de desmineralização, porém, existem outros ácidos secretados em menor quantidade, com uma menor ação de desmineralização, que derivam, por norma, do metabolismo da lactose e glucose por exemplo.

A presença destes ácidos na cavidade oral provoca uma diminuição do pH e, caso a situação não seja revertida, esta diminuição acentua-se, promovendo a desmineralização continuada. É igualmente importante salientar que é normal que se verifique uma descida acentuada nos valores de pH após a exposição a açúcares, no entanto, é fundamental alcançar uma rápida subida do pH para promover a remineralização, minorando qualquer perda da estrutura dentária. Este processo pode ser controlado pela escovagem dos dentes após a ingestão de alimentos cariogénicos ou pela disponibilização de flúor na cavidade oral 1, 18, 22, 33.

O que torna o *S. mutans* uma bactéria tão importante no processo cárie são as suas características acidogênicas, como mencionado no parágrafo anterior, e acidúricas, isto é, para além da produção de ácidos através da metabolização dos constituintes da dieta, que originam a subsequente desmineralização derivada da brusca descida de pH, os *S. mutans* são ainda capazes de sobreviver, crescer e proliferar neste ambiente ácido, podendo algumas estirpes crescer com valores de pH inferiores a 4 ^{8, 10, 22}.

O *S. mutans* é ainda possuidor de outros mecanismos de virulência, como a produção de polissacarídeos intracelulares (PCI) e de endodextranases. Os PCI assemelham-se ao glicogénio e são produzidos quando não existem hidratos de carbono disponíveis para o SM metabolizar. Estes garantem a contínua produção e libertação de ácidos por este microrganismo. As endodextranases, por sua vez, são produzidas para assegurar a permanência de *S. mutans* na cavidade oral, estas clivam as ligações que os *Streptococcus sanguis* e os *Streptococcus mitis* criam, conseguindo assim promover, de forma competitiva, uma ocupação do seu lugar ^{6, 22}.

4. Sistema Imunológico

4.1. Saliva

Os microrganismos cariogénicos fazem parte da microbiota oral e, em certas condições ambientais, podem provocar doença. A saliva apresenta grande importância no que respeita ao controlo da cárie e do desenvolvimento da microbiota patogénica, apresentando-se como o meio de transporte para vários componentes com atividade protetora da cavidade oral, encontrando-se componentes orgânicos e inorgânicos ^{11, 20}.

As respostas adaptativas do hospedeiro despoletadas por infeções de origem microbiana vão expressar-se na saliva e no fluido crevicular gengival, através de proteínas específicas contra os agentes etiogénicos das referidas infeções. No entanto, do mesmo modo que a saliva funciona como um meio de transporte para estas proteínas defensoras, também funciona como um meio de transmissão de doença, através, por exemplo, da ingestão de comida contaminada com saliva - que é comum entre mães e bebés, aquando da prova da temperatura da comida. Este contacto pode promover a infeção do bebé antecipadamente, predispondo-o à doença cárie ^{13, 22}.

No que concerne à proteção, os componentes orgânicos da saliva englobam proteínas que fazem parte de mecanismos antibacterianos não específicos, de forma direta, como as peroxidases, as lisozimas, as lactoferrinas e as histatinas. Da mesma forma, também as proteínas como as mucinas ou a IgA-secretada contribuem com a função de agregação ou aglomeração, impedindo as bactérias de aderirem ao dente. Pode igualmente considerar-se um outro grupo de proteínas que, através do aumento dos níveis de cálcio e de fosfato no microambiente, aumentam a proteção contra as modificações de pH, conferindo, assim, proteção contra ambientes ácidos, propícios à formação de cárie ²⁷.

Desde o nascimento e até que ocorra a exposição aos patógenos, a maior parte da proteção que é recebida advém da transferência de componentes protetores através da via placentária de anticorpos IgG, e da IgA-secretada presente no leite materno, bem como de fatores não específicos como as peroxidases, lactoferrinas e lisozimas. Os anticorpos salivares não estão presentes no nascimento, mas surgem com a exposição do bebê a microrganismos, durante os primeiros meses de vida. Ao longo do tempo e mediante a exposição a microrganismos patogênicos, encontra-se na saliva anticorpos IgA-s de ocorrência natural contra as bactérias orais, nomeadamente o *S. mutans*.

Esses anticorpos conseguem ligar-se às bactérias orais, inibindo a sua adesão à superfície dentária. A principal imunoglobulina na saliva é do tipo IgA1 (aproximadamente 60%), sendo de notar a presença também de IgA2 em menores quantidades. Existem ainda, em menor prevalência, imunoglobulinas do tipo IgG e IgM provenientes do plasma por via do fluido crevicular gengival. Os anticorpos asseguram especificidade para antígenos da microbiota oral, incluindo *S. mutans*. Estimulando o tecido linfóide local ou os locais indutivos centrais do sistema imunológico das mucosas podemos adquirir respostas IgA-s induzidas na saliva 6, 20, 27.

Caso existam alterações no fluxo salivar no indivíduo, quer por uma diminuição acentuada (xerostomia) ou escassez de saliva (hipossalivação), ambos representam um risco elevado para o desenvolvimento de cárie. Tratamentos radioterapêuticos na região das glândulas salivares, determinadas doenças ou síndromes, bem como um grande número de medicamentos, alteram as propriedades salivares, tornando o biofilme oral mais restrito a microrganismos cariogênicos devido à falta da proteção proveniente da saliva 20, 27.

4.2. Imunoglobulinas

A IgA-s é um dos produtos específicos do sistema imunológico das mucosas e a sua função principal assenta na interferência com os processos de

adesão/ invasão dos microrganismos patogénicos na cavidade oral, e no controlo da colonização da microbiota comensal, prevenindo danos adicionais e mantendo a integridade da mucosa. A IgA-s é a imunoglobulina predominante nas secreções mucosas apresentando uma concentração salivar de 0.2– 0.3 mg/ml, na saliva não estimulada. A unidade básica de IgA apresenta uma estrutura geral comum com outras imunoglobulinas, sendo esta composta por duas cadeias pesadas e duas cadeias leves, cuja apresentação varia. Por um lado, no soro, a IgA apresenta-se em forma de monómero, enquanto que nas secreções apresenta-se, sobretudo de forma dimérica. Esta pode ainda ser dividida em duas subclasses, a IgA1 e a IgA2 que se apresentam numa relação de 3:2 na saliva. A IgA1 apresenta um carácter mais flexível na medida em que apresenta um aminoácido diferente na sua cadeia pesada, contudo, esta é mais suscetível a proteólise pela maior parte dos microrganismos da mucosa.

É igualmente importante referir que a IgA-s, presente na saliva, apresenta um componente secretor que as torna mais complexas que as imunoglobulinas séricas - apresentam maior resistência à proteólise, o que permite a sua função no ambiente lítico da cavidade oral 7, 13, 12.

A associação IgA-s e a atividade anti-cárie no ser humano ainda não é bem conhecida, porém, o aumento da IgA-s específica para *S. mutans* parece diminuir a incidência da doença. A IgA-s possui vários mecanismos de ação anti-cárie, seja através do bloqueio da colonização e acumulação de *S. mutans* à superfície dentária, quer por processos dependentes, ou por processos independentes da sacarose; e/ou através da inibição das atividades metabólicas dos microrganismos, como a produção de ácidos.

Apesar da exposição natural a antigénios presentes nas mucosas induzir a produção específica de IgA-s, esta produção natural pode não ser suficiente para conferir a proteção necessária ao hospedeiro. Nesse sentido, o contínuo estudo sobre os fatores imunológicos específicos que medeiam a defesa do hospedeiro nas superfícies da mucosa garantiu, no início da década de 1970, o conhecimento sobre a possibilidade de prevenir a cárie dentária, através da indução de anticorpos IgA-s salivares contra a bactéria mais associada a esta doença 5, 7, 12.

Existem, igualmente, outras imunoglobulinas capazes de interferir no progresso da cárie, como a IgG e IgM séricas, no entanto, estas imunoglobulinas encontram-se apenas presentes em concentrações significativas no fluido crevicular, e por isso a sua atuação restringe-se à área do dente que é banhada por este fluido. Este é um processo importante aquando da erupção dentária e a partir do instante em que surgem processos infecciosos e inflamatórios.

A IgG é a imunoglobulina mais prevalente no soro, sendo responsável pela inibição da adesão de *S. mutans* e apresentando capacidade de inibir enzimas e neutralizar os fatores de virulência dos microrganismos orais através de processos de opsonização – favorecendo a fagocitose e/ou ativação do complemento. A IgM, por sua vez, assume-se como a imunoglobulina que é secretada logo após o surgimento do antigénio - assumindo uma resposta primária que necessita de ser dada pelo hospedeiro. Esta é fundamental até se alcançar uma resposta imunológica mais específica. A IgM é capaz de aglutinar os microrganismos e ativar o sistema de complemento 7, 15.

4.3. Sistema imunológico das mucosas

O sistema imunológico engloba uma componente sistémica e uma componente associada às mucosas, que podem funcionar separadamente. O sistema associado às mucosas, que engloba os tecidos conhecidos como MALT - *mucosal associated lymphoid tissues* - é responsável pela proteção de todas as superfícies mucosas, a que corresponde uma área de cerca de 400 m². As mucosas, por seu turno, representam a interface com o meio exterior e, por isso estão sujeitas à exposição de antigénios provenientes de alimentos, ar, ambiente, entre outros.

O sistema imunológico da mucosa fornece a principal e primeira linha de defesa ao ser humano contra a maioria dos agentes patogénicos por meio da indução de respostas baseadas em IgA-s. O sistema imunológico das mucosas, no que lhe respeita, atua ampliando a resposta imunológica sistémica que foi gerada e consiste numa via de comunicação cruzada de tecidos linfóides onde existem lugares indutores e lugares efetores na proteção de defesas do hospedeiro contra patogénios. O NALT (tecido linfóide associado à mucosa

nasal) e o GALT (tecido linfoide associado à mucosa intestinal) constituem, pois, exemplos de locais indutores. O NALT é constituído pelas estruturas linfoides localizadas nos anéis de Waldeyer, amígdalas nasofaríngeas (adenóides) e palatinas. Em contrapartida, o GALT é constituído pelas suas estruturas linfoides localizadas nas placas de Peyer, apêndice e gânglios linfáticos do trato intestinal. Nestes locais encontram-se células apresentadoras de antígeno (APC), plasmócitos, linfócitos T e B, e células dendríticas e epiteliais, que garantem a apresentação do antígeno e a produção da respetiva resposta imunológica.

As glândulas lacrimais, mamárias e salivares, a lâmina própria do epitélio do trato gastrointestinal, a lâmina própria do trato respiratório superior e geniturinário, constituem exemplos dos locais efetores. Do ponto de vista celular, a principal característica que diferencia o sistema imunológico sistémico do sistema imunológico das mucosas, reside na presença de células epiteliais especializadas, apelidadas de células M, que estão presentes tanto no GALT (placas de Peyer) como no NALT (criptas dos anéis de Waldeyer). O sistema imunológico das mucosas distingue-se, da mesma forma, pela presença de centros germinativos onde se encontra uma grande quantidade de células B específicas para a IgA, com regiões adjacentes repletas de linfócitos T e APCs

5, 6, 7, 21, 33.

No epitélio especializado dos locais indutores do sistema imunológico das mucosas, as células M captam os antígenos e transferem-nos para as APCs adjacentes que o apresentam as células T. As células T auxiliares assumem o papel de estimular as células B a diferenciarem-se em células B precursoras de IgA. Estas células atingem os locais efetores através do sangue, onde ocorre a sua maturação, com a associação da IgA ao componente secretor, sendo o seu produto final a IgA-s.

No entanto, parece existir uma compartimentalização deste sistema, descoberta através de estudos de estimulação de produção de IgA, ao qual, a estimulação de locais indutores não resulta numa uniforme distribuição dos anticorpos pelos locais efetores. Embora o GALT e o NALT sejam distanciados entre si em termos anatómicos, estes 2 locais estão funcionalmente ligados quando se verifica a estimulação da IgA e, são eles que induzem melhores

resultados na indução de IgA-secretada na cavidade oral. Em alternativa, a estimulação via nasal produz respostas mais satisfatórias de indução de IgA tanto na saliva como no sangue. Na via oral também se confirma a indução de produção de IgA, no entanto, em menor quantidade, devido eventualmente à compartimentalização do sistema, pela presença de enzimas proteolíticas e devido a uma maior competição antigénica. Assim, a via nasal é a mais eficaz quando se objetiva maiores quantidades de IgA ^{5, 29}.

5. Vacina anti-cárie

As vacinas traduzem-se em meios eficazes no controlo de doenças infecciosas, aumentando a resposta protetora do hospedeiro contra os agentes patogénicos. Geralmente apresentam-se como estratégias preventivas de elevada valorização custo-benefício, e alcançam grande parte da população. O conceito de vacinação contra a cárie dentária existe desde a descoberta da sua etiologia e da identificação da imunoglobulina IgA-s. A vacina tem como objetivo aumentar os níveis de IgA-s na saliva, expandindo assim os níveis de proteção contra microrganismos cariogénicos como *S. mutans* e prevenindo a sua colonização inicial, sem interferir com a microbiota oral existente ^{5, 16}.

A intervenção imunológica pode criar suscetibilidades em várias fases dos mecanismos moleculares da patogénese da cárie. Antes da colonização, ainda na fase salivar, os microrganismos podem ser eliminados da cavidade oral através da agregação mediada por anticorpos. Os anticorpos podem interferir em processos de colonização e acumulação do microrganismo, bloqueando os recetores necessários a este processo, ou ainda inativando os processos enzimáticos e metabólicos do microrganismo.

A imunidade contra doenças infecciosas pode ser atingida usando a imunização passiva e ativa, no entanto é necessário controlar outros fatores como, encontrar a via de administração apropriada, o público-alvo e sobretudo garantir a indução de uma resposta eficaz sem gerar efeitos indesejados. Uma das preocupações inerentes à vacinação consiste em assegurar que, na ausência de *S. Mutans*, outro microrganismo mais cariogénico não ocupe o seu lugar. Tal situação seria improvável, sem embargo, o grande objetivo subsiste em direcionar a vacinação para interferir com os processos inerentes à atividade funcional do *S. mutans* e ao desenvolvimento da cárie dentária, e não na eliminação deste microrganismo na microbiota oral ^{5, 6, 12, 13}.

A baixa imunogenicidade da vacina e as respostas imunes insatisfatórias que se fazem sentir com uma produção baixa e/ou transitória de anticorpos, são algumas das limitações encontradas que substanciam a inexistência de uma

vacina no mercado. Assim, a busca por uma vacina anti-cárie, efetiva e funcional, continua ainda nos dias de hoje 6, 17.

5.1. Imunização ativa

A imunização ativa induz uma resposta do sistema imunológico, na produção de anticorpos capazes de reconhecer e combater microrganismos causadores de doenças. A imunidade específica é induzida através da administração do antígeno, uma estrutura biológica desconhecida que despoleta a formação de anticorpos, os fatores de proteção, pelos linfócitos presentes.

A grande vantagem associada à imunização ativa encontra-se na indução de memória imunológica. Assim, sempre que existir reconhecimento de tais microrganismos, o sistema imunológico já possui informação para o desenvolvimento de uma resposta mais rápida e eficaz, tornando este tipo de imunização mais efetiva e duradoura 5, 30.

Após o reconhecimento de *S. mutans* como o microrganismo cariogénico dominante, e do conhecimento das suas interações com a resposta imunológica, várias tentativas foram testadas. Inicialmente optou-se por utilizar o *S. mutans* íntegro, a fim de obter proteção contra a cárie dentária, tendo-se comprovado a obtenção de benefícios mínimos e alguns efeitos secundários indesejados.

Esta não seria uma solução viável, como especulado, uma vez que se iria obter uma resposta contra vários epítomos presentes no *S. mutans*, o que poderia vir a ser prejudicial para o indivíduo. Assim sendo, vários fatores de virulência para este microrganismo ou fragmentos desses fatores foram sugeridos, na qual se destacaram, com melhores e respostas mais intensas, os componentes antigénicos proteicos como Ag I/II, as GTFs e os GBP. Apenas conhecendo bem estes fatores de virulência é que será possível definir estratégias para o seu controlo e diminuição da doença cárie. No entanto, continua a ser necessário continuar a exploração deste tipo de imunização e as várias formas de o conseguir, de modo a aumentar o tempo de proteção após a imunização e, dessa forma, aumentar a capacidade de proteção do hospedeiro 1, 5, 7, 12, 27, 30.

5.2. Antigénios

5.2.1. Ag I/II, PAc ou P1

Em 1978, Russel e Lehner caracterizaram pela primeira vez o Ag I/II, também denominado de PAc ou P1, como sendo uma proteína de estrutura fibrilar da superfície de *S. mutans*, que atua enquanto proteína de adesão e permite a ligação do microrganismo à película salivar que cobre a superfície dentária, de forma essencial para a sua colonização.

A região de repetição rica em prolina no centro da molécula e a região de repetição rica em alanina no N terminal são de particular interesse nesta proteína, tendo em conta que estas regiões conferem a sua efetividade na adesão 1, 3, 12, 15, 39.

Apesar de inicialmente ser usado toda a estrutura de Ag I/II como imunogénio, Takahashi et al. optaram por testar a imunização fazendo uso de apenas uma parte desta proteína, sintetizando péptidos a partir de sequências de aminoácidos da região rica em alanina, a qual se observou igualmente a supressão da colonização por *S. mutans* em ratos, tendo sido possível demonstrar que poderão existir epítomos de Ag I/II suficiente imunogénicos para a produção de uma vacina de péptidos contra a cárie dentária 3, 5, 8, 12, 40.

A imunização ativa com Ag I/II despoleta a resposta imunológica no indivíduo, que desenvolve anticorpos específicos que são capazes de inibir a colonização inicial por *S. mutans* ou através da aglutinação mediada pelo anticorpo e posterior eliminação dos microrganismos possuidores destas proteínas de adesão, diminuindo conseqüentemente a formação da cárie dentária 8, 12, 40.

5.2.2. GTFs – Glicosiltransferases

As GTFs atuam no processo de acumulação dos *S. mutans* nas superfícies dentárias, uma fase essencial no desenvolvimento de placa bacteriana nas superfícies dentárias. As GTFs definem-se como enzimas

extracelulares sintetizadas por *S. mutans* que, na presença de sacarose, transformam-na em glucanos e polímeros da glucose, solúveis e insolúveis em água. Para além da produção de polissacáridos extracelulares, estas são ainda capazes de produzir polissacáridos intracelulares, também na presença da sacarose 7, 12, 41.

O *S. mutans* possui 3 formas de GTFs, na qual as diferenças se identificam nas diferentes solubilidades dos produtos de reação. A GTF-I (GTF-B) origina a formação de um glucano insolúvel em água, a GTF-SI (GTF-C) origina um glucano insolúvel e um glucano solúvel em água, e por fim, a GTF-S (GTF-D) induz a produção de um glucano solúvel em água. Os três genes que codificam os 3 tipos de GTFs envolvem o *gtf B*, *gtf C* e *gtf D*, respetivamente, sendo de realçar que a patogenicidade do microrganismo se encontra diretamente relacionada com a síntese de glucanos insolúveis em água – por ação da GTF-B e GTF-C 7, 12, 15, 42, 43, 44.

As GTFs possuem estruturas comuns, que se revelam de extrema importância pela possibilidade de ligação a um anticorpo. Dessas estruturas destaca-se o domínio N terminal, um local possuidor de uma atividade catalítica para a sacarose - (CAT ou SB) - responsável pela fixação e hidrólise da sacarose e o domínio do C terminal, responsável pela ligação a glucanos - (GB ou GLU) - que posteriormente levam à agregação bacteriana 12, 15, 42.

Os anticorpos produzidos para os locais anteriormente mencionados inibem a atividade enzimática e a síntese de glucanos insolúveis em água, o que por sua vez reduz a acumulação de *S. mutans* nas superfícies dentárias e consequentemente, a incidência de cárie 1, 5, 15.

5.2.3. GBPs – proteínas de ligação a glucanos

A capacidade dos *S. mutans* se ligarem aos glucanos produzidos pelas GTFs é lhes conferida, pelo menos em parte, pelas proteínas de ligação ao glucano, as GBPs presentes na superfície destes microrganismos. A interação

entre o glucano, as GTFs e as GBPs favorecem a adesão e extensa acumulação de *S. mutans* no biofilme oral 8, 12.

O *S. mutans* encontra-se associado a pelo menos 4 GBPs : Gbp-A, Gbp-B, Gbp-C e Gbp-D. Estas proteínas podem ser secretadas ou associadas às superfícies celulares (Gbp-A, Gbp-B e Gbp-D) ou ligadas covalentemente à parede celular (Gbp-C) e apresentam diferentes afinidades a polissacarídeos 45.

As GBPs de *S. mutans* ou fragmentos constituintes das GBPs, tem sido alvo de estudo na pesquisa de uma vacina contra a cárie dentária, contudo, apenas a resposta imunológica a GBP-B mostrou ser capaz de induzir uma resposta protetora e imunogénica 12, 42.

6. Tipo de vacina

A administração de vacinas que contém microrganismos inteiros apresenta um risco acrescido para o desenvolvimento de reações cruzadas com outros microrganismos e com os tecidos do hospedeiro, sendo espectável o surgimento de efeitos secundários indesejáveis 42.

De forma a conferir proteção ao individuo não é necessária a produção de anticorpos contra todos os epítomos de *S. mutans*, visto que a produção de anticorpos contra epítomos inerentes ao metabolismo do microrganismo ou contra os intervenientes nas suas atividades será suficiente para conferir proteção ao indivíduo 46.

6.1. Vacinas de subunidade

As vacinas de subunidade utilizam, na sua formulação, proteínas vitais para o microrganismo, para o qual a resposta obtida é induzida por cópias de epítomos, determinantes antigénicos, associados aos processos de virulência de

S. mutans, como a ligação salivar e os processos catalíticos e/ou processos de ligação aos glucanos.

Estas vacinas podem ainda apresentar-se como multivalentes, as quais apresentam múltiplos epítomos contra as várias funções de um componente, o qual têm por objetivo atuar em diferentes funções do mesmo componente (por exemplo a atividade catalítica e atividade de ligação a glucano das GTFs) ou em funções de diferentes componentes (por exemplo, ligações salivares de Ag I/II e atividade catalítica das GTFs) ^{12, 16}.

6.1.1. Vacinas de péptidos sintéticos

Nestas vacinas são utilizados epítomos sintéticos, em pequenas porções antigénicas, que deverão ser suficientes para conferir a proteção, induzindo a produção de anticorpos tanto na saliva como no fluido crevicular. Em termos de segurança, o uso de péptidos sintéticos nas vacinas é preferível, quando comparado com a proteína integral, uma vez que existe um maior controlo dos péptidos produzidos ¹².

6.1.2. Vacinas polisacarídicas

As vacinas polissacarídicas utilizam antigénios polissacarídicos específicos para cada serotipo de *S. mutans*. No entanto, estas vacinas não conferem memória imunológica, apresentando, por essa razão, fraca imunogenicidade e, em crianças de idade inferior a dois anos são ineficazes ⁴².

6.1.3. Vacinas conjugadas

Por forma a tornar a imunização mais eficaz testou-se a hipótese de conjugar quimicamente polissacarídeos bacterianos com péptidos e assim, interferir com vários mecanismos da patogénese molecular de *S. mutans*. Dessa observação foi possível verificar que a sua conjugação aumenta a imunogenicidade tornando os antigénios T-dependentes, o que resulta na produção de anticorpos e memória imunológica ¹².

6.2. Vacinas recombinantes e vetores de expressão atenuada

As estratégias de vacinação que usam a tecnologia recombinante visam modular a expressão de péptidos, enfatizando as porções de regiões funcionais, podendo elevar, nesse sentido, a resposta imunológica. A integração de péptidos recombinantes em plasmídeos de vetores atenuados, como a *Salmonella*, tendem a direcionar a ativação do tecido linfoide indutor e conseqüentemente aumentar a resposta imunológica ¹².

6.3. Vacinas de ADN

As vacinas de ADN são constituídas por um plasmídeo bacteriano que expressa o gene do antigénio de interesse, nas células do hospedeiro. Este tipo de vacinas possui inúmeras vantagens, incluindo a facilidade na sua preparação e administração, a capacidade de induzir respostas imunes efetivas, apresentando, por essa razão, inúmeras possibilidades de alterações e aperfeiçoamentos potenciais de produção de uma vacina polivalente.

Estas abordagens são capazes de estimular linfócitos B e linfócitos T, uma vez que possuem estabilidade e fortes propriedades antigénicas que promovem respostas humorais e celulares ^{12, 21, 41, 48}.

Este tipo de abordagem imunológica, apesar de considerada segura, necessita de mais investigação e de ensaios clínicos que descartem a possibilidade do ADN induzido provocar danos genéticos no hospedeiro ⁴¹.

Para uma melhor compreensão das diferentes abordagens de imunização ativa testadas em humanos, consultar a tabela I que se encontra no Anexo I.

7. Vias de administração:

Em 1970 Lehner mostrou evidências de imunização contra a cárie dentária por via parentérica. Esta via de administração origina principalmente a produção de imunoglobulinas do tipo IgG e, em menor quantidade, de IgA e IgM e traz consigo dúvidas em relação à biossegurança, no surgimento de anticorpos com reações cruzadas 44.

Após a descoberta do sistema imunológico das mucosas, conforme referido anteriormente, e da existência de locais indutores e efetores capazes de produzirem grandes quantidades de IgA, vários locais mucosos que constituem este sistema foram testados, nomeadamente a via retal, a via das glândulas salivares *minor*, a via oral e a via das amígdalas, constando-se o especial destaque para a via intranasal 5.

O NALT e o GALT são assim os maiores locais indutores/produtores de IgA. A via oral foi das primeiras vias a ser testadas, com a estimulação do GALT, um dos maiores produtores de IgA, porém esta via apresenta desvantagens que se exteriorizariam na redução da eficácia da vacina, sustentada pela presença do ácido estomacal 5, 12.

Nessa lógica de pensamento, a administração via nasal é preferível, apresentando várias vantagens em comparação com as outras vias testadas das quais se destacam a fácil administração da vacina por gotas ou spray, a indução da imunidade das mucosas, mas também da imunidade sistêmica, produzindo uma resposta imune maior que qualquer abordagem por outra via. Adicionalmente, não necessita de doses elevadas de antigénio visto verificar-se uma menor atividade proteolítica e degradativa neste local 5, 7, 15.

8. Adjuvantes e sistemas de distribuição

Na busca de respostas imunológicas mais sustentadas e eficazes introduziram-se adjuvantes imunomoduladores e sistemas de distribuição, às vacinas contra a cárie dentária. São vários os benefícios associados ao uso de adjuvantes, como a redução da dose de antigénio e a superação da concorrência

antigénica nas vacinas combinadas, bem como a indução de uma potente resposta funcional do anticorpo ou a indução mais efetiva da resposta dos linfócitos T, aumentando conseqüentemente a eficácia da vacina 12, 27, 44.

Nos últimos anos, deu-se especial atenção à toxina da cólera/enterotoxinas termolábeis da *E. coli* e ao uso de microcápsulas, micropartículas e lipossomas, verificando-se que todas são seguras na sua administração, para além de melhorarem substancialmente os resultados obtidos após a vacinação 12, 27, 33.

9. População-alvo e período de imunização

Os ensaios clínicos efetuados para testar as vacinas contra a cárie têm sido efetuados em jovens adultos, todavia, esta faixa etária não corresponde à população-alvo de escolha, dado que, nesta fase os indivíduos já se encontram colonizados por *S. mutans*.

Com base na análise da história natural da colonização oral de crianças pequenas com *Streptococcus*, e da ontogénese, na resposta imune salivar, a população-alvo apropriada para uma vacina contra cárie dentária seriam os bebés entre os 6 e os 12 meses de idade, correspondendo ao período precedente à infeção por estes microrganismos.

As crianças apresentam capacidade de produzir uma resposta imune, através de IgA-s na saliva, mesmo antes da erupção dos primeiros dentes decíduos, pelo que, para as crianças sob risco normal de infeção, um programa de imunização contra a cárie deveria iniciar-se antes da “janela de infeção” 8, 12, 40, 42.

É de realçar que a ação sinérgica dos efeitos da vacina sobre as primeiras bactérias colonizadoras dos dentes pretende induzir uma diminuição acentuada de *S. mutans*, tanto pelo efeito dos anticorpos, como pela competição entre as bactérias. A vacina poderia necessitar de um reforço na altura de erupção dos dentes permanentes tendo em conta que a “janela de infeção” estaria uma vez mais “aberta” durante este período 8, 12, 42.

Pode considerar-se que existem grupos de risco que poderiam necessitar igualmente de uma vacina contra a cárie, obtendo assim um benefício acrescido caso fossem vacinados. Seria o caso de vacinar, ativa ou passivamente, mães recentes, por forma a diminuir a probabilidade de transmissão dos microrganismos cariogénicos ao bebé; vacinar indivíduos com incapacidades funcionais, mentais, emocionais ou físicas, indivíduos com deficiências salivares ou deficiências no desenvolvimento do esmalte; adultos que apresentam recessões e conseqüentemente exposição radicular ou populações que não dispõem de acesso à tratamentos adequados de medicina dentária ou que apresentem condições reduzidas ⁴².

10. Imunização passiva

Uma das formas mais seguras de induzir a proteção imunológica consiste na imunização passiva. Este procedimento baseia-se na administração de anticorpos previamente formados diretamente sobre o dente. Idealmente, os anticorpos ligam-se especificamente a *S. mutans* e interferem com a sua habilidade de adesão ao dente, prevenindo a colonização destes microrganismos na cavidade oral e conseqüentemente, a cárie dentária. Este tipo de imunização não requer o envolvimento do sistema imunológico do recetor, o que diminui potenciais efeitos adversos e fornece a possibilidade de ser administrada, inclusive, em pacientes com o sistema imunitário comprometido ^{1, 13, 15}.

Todos os anticorpos produzidos para este tipo de imunização são idênticos e têm a mesma especificidade para o antigénio. A produção de um anticorpo envolve 2 fases: a identificação de um plasmócito que produza o anticorpo desejado e, posteriormente, promover a clonagem dessa mesma célula de forma a obter várias células idênticas com capacidade de efetuar a produção do mesmo anticorpo. Esta apresenta-se como uma técnica fácil de obter e controlar anticorpos puros e altamente reprodutíveis, no entanto, pode tornar-se dispendiosa devido às grandes quantidades de anticorpos necessários para administração terapêutica. Uma das desvantagens associada a este tipo de imunização assenta no não envolvimento do sistema imunológico do hospedeiro,

não induzindo memória imunológica. Por essa razão apenas se obteria uma proteção temporária enquanto estes anticorpos estiverem presentes na cavidade oral, uma tarefa complicada na presença constante de saliva e outros mecanismos de *turnover*, o que implica aplicações repetidas desta terapia 1, 4, 13.

Este tipo de imunização com a aplicação de anticorpos pode ser uma opção viável tanto pelo seu custo mais reduzido ou pela sua maior abrangência, pois seria mais fácil atingir grande parte da população através da incorporação de anticorpos específicos para a cárie em produtos de uso diário como dentífricos orais, colutórios, obtendo assim uma exposição contínua a fatores protetores contra a cárie que impedem a aderência de *S. mutans* à estrutura dentária 5, 6, 13.

Para uma melhor compreensão das diferentes abordagens de imunização passiva testadas em humanos, consultar a tabela I que se encontra no Anexo I.

11. Conclusão

A necessidade de uma vacina contra a cárie dentária permanece emergente nos dias de hoje. O aumento da prevalência e incidência da doença, as condições precárias que teimam agravar-se na sociedade e a procura pelo aumento da qualidade de vida do indivíduo são alguns dos motivos que visam a obrigatoriedade de aumentar os fatores de proteção contra a cárie dentária. É evidente que o surgimento de uma vacina não tornaria todas as outras medidas preventivas desta doença redundantes, no entanto, seria uma mais valia associar a estas medidas a possibilidade de imunização contra os agentes cariogênicos mais relevantes.

Para que tal aconteça é necessário efetuar mais ensaios clínicos em adultos, de modo a avaliar a segurança da vacina e, posteriormente, efetuar a avaliação em crianças, que representam a verdadeira população-alvo desta abordagem terapêutica. Será, igualmente, importante avaliar a necessidade de estabelecer um padrão de comparação de resultados das vacinas, de forma a que todos os estudos efetuados possam ser comparáveis, seja por avaliação/quantificação das quantidades de IgA-s produzida após imunização, seja pela avaliação das quantidades de microrganismos cariogênicos presentes após a administração da vacina.

Apesar da identificação de vários antigénios potencialmente relevantes no desenvolvimento de abordagens de imunização, a busca contínua, sendo que cada vez se procuram antigénios com potencial de induzir respostas imunológicas mais potentes e direcionadas aos microrganismos patogénicos, nomeadamente o *S. mutans*, para que não haja interferência com os tecidos do hospedeiro. Os padrões ideais para uma vacina contra a cárie dentária mantêm-se, devendo assim apresentar as seguintes características:

- A vacina deve ser completamente segura, não devendo produzir efeitos adversos.
- Deve ser de administração simples e possível de ser administrada numa idade precoce, idealmente a partir dos 9 meses de vida.

- Deve garantir a produção efetiva de anticorpos específicos contra os microrganismos cariogênicos.
- Deve induzir, de preferência, a produção de IgA-s nas secreções mucosas, em detrimento de respostas elevadas de IgG no soro.
- Os anticorpos devem ser capazes de inibir a adesão de *S. mutans* ao dente ³⁰.

12. Referências

1. Patel M. Dental caries vaccine: are we there yet? Vol. 70, Letters in Applied Microbiology. Blackwell Publishing Ltd; 2020. p. 2–12.
2. Yang H, Yan Z, Zhang Z, Realivazquez A, Ma B, Liu Y. Anti caries vaccine based on clinical cold-adapted influenza vaccine: A promising alternative for scientific and public-health protection against dental caries. Medical Hypotheses. 2019 May 1;126:42–5.
3. Cao X xi, Fan J, Chen J, Li Y hong, Fan M wen. Immunogenicity and prediction of epitopic region of antigen Ag I/II and glucosyltransferase from Streptococcus mutans. Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical Science. 2016 Jun 1;36(3):416–21.
4. Alam MK, Zheng L, Liu R, Papagerakis S, Papagerakis P, Geyer CR. Synthetic antigen- binding fragments (Fabs) against S. Mutans and S. Sobrinus inhibit caries formation. Scientific Reports. 2018 Dec 1;8(1).
5. Yan HM. Salivary IgA enhancement strategy for development of a nasal-spray anti-caries mucosal vaccine. Vol. 56, Science China Life Sciences. Science in China Press; 2013. p. 406–13.
6. Michalek SM, Katz J, Childers NK. A Vaccine against Dental Caries An Overview. Vol. 15, BioDrugs. 2001.
7. Hajishengallis G, Michalek SM. Current status of a mucosal vaccine against dental caries. Vol. 14, Oral Microbiology and Immunology. 1999. p. 1–20.
8. Taubman MA, Nash DA. Scientific and public-health imperative for a vaccine against dental caries. Nature Review. 2006 Jul. p. 555-62.
9. Grindefjord M, Dahllof G, Wikner S, Hojer B, Modeer T. Prevalence of mutans streptococci in one-year-old children. Vol. 6, Oral Microbiol Immunol. 1991.
10. Li L, Nan J, Li D, Brostromer E, Wang Z, Liu C, et al. Structural genomics studies of human caries pathogen Streptococcus mutans. Journal of structural and functional genomics. 2014 Sep 1;15(3):91–9.

11. Chen L, Zhu J, Li Y, Lu J, Gao L, Xu H, et al. Enhanced Nasal Mucosal Delivery and Immunogenicity of Anti-Caries DNA Vaccine through Incorporation of Anionic Liposomes in Chitosan/DNA Complexes. *PLoS ONE*. 2013 Aug 20;8(8).
12. Smith DJ. Dental caries vaccines: Prospects and concerns. Vol. 13, *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. Intern. and American Associations for Dental Research; 2002. p. 335–49.
13. Julian K-C, Ma. Caries vaccine: A growing prospect. *Dental Update* 1999 Nov, 26: 374-380
14. Sun Y, Shi W, Yang JY, Zhou DH, Chen YQ, Zhang Y, et al. Flagellin-PAc fusion protein is a high-efficacy anti-caries mucosal vaccine. *Journal of Dental Research*. 2012 Oct;91(10):941–7.
15. Koga T, Oho T, Shimazaki Y, Nakano Y. Immunization against dental caries [Internet]. Vol. 20, *Vaccine*. 2002. Available from: <http://www.genome.ou.edu/smutans.html>
16. Smith DJ. Editorial: Dental caries vaccines: Prospects and concerns. Vol. 9, *Expert Review of Vaccines*. 2010. p. 1–3.
17. St. Michael F, Yang Q, Cairns C, Vinogradov E, Fleming P, Hayes AC, et al. Investigating the candidacy of the serotype specific rhamnan polysaccharide based glycoconjugates to prevent disease caused by the dental pathogen *Streptococcus mutans*. *Glycoconjugate Journal*. 2018 Feb 1;35(1):53–64.
18. Islam B, Khan SN, Khan AU. Dental caries: From infection to prevention [Internet]. Available from: <http://www.medscimonit.com/abstract/index/idArt/512939>
19. Fejerskov O. Changing paradigms in concepts on dental caries: Consequences for oral health care. In: *Caries Research*. 2004. p. 182–91.
20. Scully C. Dental caries: progress in microbiology and immunology. Vol. 3, *Journal of Infection*. 1981.
21. Zhang F, Li YH, Fan MW, Jia R, Xu QA, Guo JH, et al. Enhanced efficacy of CTLA-4 fusion anti-caries DNA vaccines in gnotobiotic hamsters. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2007 Aug;28(8):1236–42.

22. Balakrishnan M, Simmonds RS, Tagg JR. Dental caries is a preventable infectious disease. Vol. 45, Australian Dental Journal. 2000.
23. Bowen WH. Dental Caries*. Review Article Archives of Disease in Childhood. 1972.
24. Ferretti JJ, Shea C, Humphrey MW. Cross-Reactivity of Streptococcus mutans Antigens and Human Heart Tissue. Vol. 30, INFECTION AND IMMUNITY. 1980.
25. Carlos Victor Canettieri A, Yamasiro Kretchetoff F, Yumi Koga Ito C, Moreira D, José Condino Fajarra F, Schmidt Unterkircher C. Production of monoclonal antibodies against Streptococcus mutans antigens Produção de anticorpos monoclonais contra antígenos de Streptococcus mutans. Vol. 20, Braz Oral Res. 2006.
26. Kelly CG, Todryk S, Kendal HL, Munro GH, Lehner T. T-Cell, Adhesion, and B-Cell Epitopes of the Cell Surface Streptococcus mutans Protein Antigen I/II. Vol. 63, INFECTION AND IMMUNITY. 1995.
27. Mandel ID. Caries Prevention: Current Strategies, New Directions. Journal of the American Dental Association. 1996;127(10):1477–88. 32.
28. 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. Infection and Immunity. 2005 Sep;73(9):5675–84.
29. Childers1' NK, Tong G, Lil F, Dasanayake AP, Kirk K, Michalek SM. RESEARCH REPORTS Clinical Humans Immunized with Streptococcus mutans. 2002
30. Smith GE. THE CONTROL OF DENTAL CARIES: CAN VACCINES PREVENT CAVITIES? Vol. 63, The Science of the Total Environment. 1987.
31. Senpuku H, Miyauchi T, Hanada N, Nisizawa T. An Antigenic Peptide Inducing Cross-Reacting Antibodies Inhibiting the Interaction of Streptococcus mutans PAc with Human Salivary Components. Vol. 63, INFECTION AND IMMUNITY. 1995.
32. Oli MW, McArthur WP, Brady LJ. A whole cell BIAcore assay to evaluate P1-mediated adherence of Streptococcus mutans to human salivary agglutinin and inhibition by specific antibodies. Journal of Microbiological Methods. 2006 Jun;65(3):503–11.

33. Childers\ NK, Ztiang\ SS, Tvlichaiek' SM, Childers NK. Oral immunization of humans with dehydrated liposomes containing Streptococcus mutans glucosyltransferase induces salivary immunoglobulin antibody responses. Oral Microbiol Immunol. 1994;9:46–53.
34. 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. Vol. 59, INFECTION AND IMMUNITY. 1991.
35. K-c JM, Hunjan M, Smith R, Kelly C, Lehner T. An Investigation into the Mechanism of Protection by Local Passive Immunization with Monoclonal Antibodies against Streptococcus mutans. Vol. 58, INFECTION AND IMMUNITY. 1990.
36. Shimazaki Y, Mitoma M, Oho T, Nakano Y, Yamashita Y, Okano K, et al. Passive immunization with milk produced from an immunized cow prevents oral recolonization by Streptococcus mutans. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 2001;8(6):1136–9.
37. Loimaranta V, Laine M, Soderling E, et al. Effects of bovine immune and non-immune whey preparations on the composition and pH response of human dental plaque. Eur J Oral Sci 1999; 107: 244-250.
38. Domingos PA dos S, Ricci-Donato HA, Russi AKFD. Riscos do uso do flúor sistêmico - revisão de literatura. Journal of Research in Dentistry. 2018 Jul 23;6(4):86.
39. Hiremath SS, Das M, Musareth A, Arora P. Dental Caries Vaccine: A Review [Internet]. Vol. 3, International Journal of Oral Health and Medical Research. Available from: www.ijohmr.com
40. Shanmugam KT, Masthan KMK, Balachander N, Jimson S, Sarangarajan R. Dental caries vaccine- A possible option? Vol. 7, Journal of Clinical and Diagnostic Research. 2013. p. 1250–3.
41. Silva D, Gomes Agripino G, Aparecida Marinho S, B Silva AC, Silva DR, Silva IG, et al. Caries vaccine: current reality or remote future? [Internet]. 2013. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/301500692>
42. Pinto LP, Queiroz LMG, Nonaka CFW, Nascimento GJF. Aspectos imunológicos da cárie dentária. R.Fac.Odonto, Porto Alegre. 2005 Jun. Vol.46,1: 19-22.

43. Krzyściak W, Pluskwa KK, Jurczak A, Kościelniak D. The pathogenicity of the Streptococcus genus. Vol. 32, European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Springer Verlag; 2013. p. 1361–76.
44. Smith DJ. Caries Vaccines for the Twenty-First Century. Journal of Dental Education. 2003 Oct;67(10):1130–9.
45. Dias Nogueira R, Castro Loureiro Borges M, Lúcia Sesso Talarico M, Paes Leme Ferriani V, de Oliveira Mattos-Graner R. Vacinas anticárie-desafios Anticaries vaccine-challenges. Vol. 26, Rev Inst Ciênc Saúde. 2008.
46. Luiz J, Miranda DE, Emanuel, De S, Andrade S, Gleicy ;, et al. Vacinação: uma opção preventiva contra a cárie dental aprimorada pelos conhecimentos da imunologia e da biotecnologia. 2001.
47. Yang YP, Li YH, Zhang AH, Bi L, Fan MW. Good Manufacturing Practices production and analysis of a DNA vaccine against dental caries. Acta Pharmacologica Sinica. 2009 Nov;30(11):1513–21.
48. Sun J, Yang X, Xu QA, Bian Z, Chen Z, Fan M. Protective efficacy of two new anti-carries DNA vaccines. Vaccine. 2009 Dec 9;27(52):7459–66.
49. estecky J, Mcghee JR, Arnold RR, Michalek SX, Prince SJ, Babb JL. Selective Induction of an Immune Response in Human External Secretions by Ingestion of Bacterial Antigen. 1978.
50. Gahnberg L, Krasse BO. Salivary Immunoglobulin A Antibodies and Recovery from Challenge of Streptococcus mutans After Oral Administration of Streptococcus mutans Vaccine in Humans. Vol. 39, INFECTION AND IMMUNITY. 1983.
51. Cole MF, Emilson C-G, Hsu SD, Li S-H, Bowent WH. Effect of Peroral Immunization of Humans with Streptococcus mutans on Induction of Salivary and Serum Antibodies and Inhibition of Experimental Infection. Vol. 46, INFECTION AND IMMUNITY. 1984.
52. Gregory' RL, Filler2 SJ. Protective Secretory Immunoglobulin A Antibodies in Humans following Oral Immunization with Streptococcus mutans. Vol. 55, INFECTION AND IMMUNITY. 1987.

53. Smith DJ, Taubman MA. Oral Immunization of Humans with Streptococcus sobrinus Glucosyltransferase. Vol. 55, INFECTION AND IMMUNITY. 1987.
54. Smith DJ, Taubman MA. Effect of Local Deposition of Antigen on Salivary Immune Responses and Reaccumulation of Mutans Streptococci. Vol. 10, Journal of Clinical Immunology. 1990.
55. Childers NK, Tong G, Michalek SM, Childers NK. Nasal immunization of humans with dehydrated liposomes containing Streptococcus mutans antigen. Oral Microbiol Immunol. 1997;12:329–35.
56. Childers NK, Tong G, Mitchell S, Kirk K, Russell MW, Michalek SM. A Controlled Clinical Study of the Effect of Nasal Immunization with a Streptococcus mutans Antigen Alone or Incorporated into Liposomes on Induction of Immune Responses. Vol. 67, INFECTION AND IMMUNITY. 1999.
57. Li F, Michalek SM, Dasanayake AP, Li Y, Kirk K, Childers NK. Intranasal immunization of humans with Streptococcus mutans antigens. Oral Microbiol Immunol. 2003; 18: 271-277.
58. Julian K-C, MA, Ban YH, Keith W, et al. Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. Nature Medicine. 1998 May. Vol. 4: 5: 601-606

13. Anexo I

Tabela 1: Tabela I: Vacinas de imunização ativa ou passiva testadas em humanos

| Antigénio | Amostra | Via de administração e dosagem | Eficácia | Referências |
|----------------------------------|---------|---|--|-------------|
| <i>S. mutans</i> mortos inteiros | 4 | Via oral; Administração de cápsulas durante 14 dias | Período de estudo de 3 meses, verificando-se aumento da IgA-s durante a administração do tratamento; após este período verificou-se o seu declínio. Sem registo de anticorpos séricos. | 49 |
| <i>S. mutans</i> mortos inteiros | 11 | Bochecho e ingestão; 4 aplicações durante 35 dias | Período de estudo de 53 dias: sem aumento da IgA-s mas com redução dos níveis de <i>S. mutans</i> . | 50 |
| <i>S. mutans</i> mortos inteiros | 8 | 1 aplicação oral e ingestão durante 3 dias | Período de estudo de 360 dias: sem aumento da IgA-s mas com redução dos níveis de <i>S. mutans</i> . | 51 |

| | | | | |
|--|----|---|---|----|
| S. <i>Mutans</i> mortos inteiros | 6 | Via oral, administração de cápsulas durante 10 dias | Período de estudo de 180 dias: aumento da IgA-s e redução dos níveis de <i>S. mutans</i> na saliva e na placa. | 52 |
| GTF (<i>Streptococcus Sobrinus</i>) | 25 | Via oral, administração de 18 cápsulas durante 3 meses | Período de estudo de 42 dias: aumento da IgA anti-GTF na secreção parotídea | 53 |
| GTF (<i>Streptococcus Sobrinus</i>) | 23 | Aplicação tópica no lábio inferior diariamente durante 5 dias | Período de estudo de 6 semanas: sem efeito na produção de IgA anti-GTF mas com redução na recolonização. | 54 |
| GTF desidratado em lipossomas (<i>S. mutans</i>) | 7 | Via oral, ingestão por 3 dias consecutivos e repetição após 28 dias | Período de estudo de 8 semanas: aumento de IgA1, IgA2 e anti-GTF. Não se verificou aumento na produção de IgG ou IgM. | 33 |

| | | | | |
|---|----|---|---|----|
| GTF em bruto em lipossomas (<i>S. mutans</i>) | 5 | Via nasal, 2 imunizações com 7 dias de intervalo | Período de estudo de 6 semanas: aumento de IgA1 anti-GTF nas secreções nasais, e nas secreções salivares em menor quantidade. A nível sérico houve aumento da IgM e da IgA anti-GTF | 55 |
| C-GTF (<i>S. mutans</i>) | 21 | Via nasal, grupo previamente imunizado, 2 administrações durante 7 dias | Período de estudo de 28 dias: aumento da IgA nas secreções nasais e aumento da produção de IgG e IgA anti-C-GTF no sangue. | 56 |
| E-GTF (<i>S. mutans</i>) | 21 | 2 imunizações com spray nasal com 1 semana de intervalo | Período de estudo de 3 meses: aumento de anti-E-GTF na saliva e na região nasal. | 29 |
| E-GTF solúvel em lipossomas | 12 | Intranasal com 2 aplicações em 7 dias | Período de estudo de 3 meses: aumento da IgA-s anti-E-GTF. Aumento da IgA nas secreções nasais. Aumento da IgG sérica. | 57 |

| | | | | |
|--------------------------------|----|--|--|----|
| E-GTF | 26 | via intranasal e tonsilar, 2 imunizações em 7 dias | Período de estudo de 3 meses: aumento da IgA anti-GTF sérica e nas mucosas, nos dois locais de administração. Aumento da IgA anti-E-GTF nas secreções nasais e no sangue, com a administração via nasal. | 58 |
| Ag I/II e gtfB | 94 | Não especificado | Período de estudo não especificado. Sem diferenças na IgA total, na IgA-s anti-Ag I/II e anti-GLU nas crianças, com ou sem cáries. | 3 |
| Anticorpos monoclonais Ag I/II | 15 | Via oral, 6 aplicações em 3 semanas | 2 anos de proteção contra a recolonização de <i>S. mutans</i> mas com colonização desses locais pelos microrganismos <i>Streptococcus sanguis</i> e <i>Veionella</i> . | 35 |

| | | | | |
|---|---|--|--|----|
| Anticorpos monoclonais Ag I/II | 6 | 6 aplicações orais após tratamento com clorhexidina | Redução da colonização por <i>S. mutans</i> por 3-5 meses. | 58 |
| Vacas imunizadas com PAc e o domínio GB de GTF-I | 4 | Bochecho oral com leite das vacas imunizadas, 2 vezes ao dia | Período de estudo de 14 dias onde se registou a redução da recolonização de <i>S. mutans</i> na saliva e na placa. | 36 |
| Produtos colostrais de vacas imunizadas contra <i>S. mutans</i> | 9 | Bochecho oral 3 vezes ao dia durante 3 dias | Redução do <i>S. mutans</i> na microbiota oral. | 37 |

14. Anexo II



Parecer do Orientador para entrega definitiva do trabalho apresentado

Informo que o Trabalho de Monografia desenvolvido pela Estudante Bianca Adriana da Silva Alves com o título: "Estratégias de vacinação contra a cárie dentária" / " Vaccination strategies against tooth decay", está de acordo com as regras estipuladas na FMDUP, foi por mim conferido e encontra-se em condições de ser apresentado em provas públicas.

Porto, 20 de maio de 2021

O orientador

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Pedro de Sousa Gomes", written over a horizontal line.

Pedro de Sousa Gomes

Professor Associado da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

DECLARAÇÃO
Monografia/Relatório de Estágio

Declaro que o presente trabalho, no âmbito da Monografia/Relatório de Estágio, integrado no MIMD, da FMDUP, é da minha autoria e todas as fontes foram devidamente referenciadas.

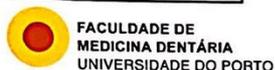
Porto, 20 de maio de 2021

A estudante

Bianca Adriana da Silva Alves

Bianca Adriana da Silva Alves

U. PORTO



FACULDADE DE
MEDICINA DENTÁRIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

DECLARAÇÃO

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

Monografia/Relatório de Estágio

Identificação do autor

Nome completo Bianca Adriana da Silva Alves
Nº. de identificação civil 1458425332x3 Nº. de estudante 201803501
Email institucional up201803501@up.pt
Email alternativo biancalves26@live.com.pt Tlf/Tlm 918671594
Faculdade/Instituto Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto.

Identificação da publicação

Dissertação de Mestrado Integrado (Monografia) Relatório de Estágio

Título completo

"Estratégias de vacinação contra a cárie dentária" /
"Vaccination strategies against tooth decay"

Orientador Pedro de Sousa Gomes

Coorientador _____

Palavras-chaves Vacina anti-cárie; Cárie dentária; Streptococcus mutans; imunização
passiva; imunização ativa; IgA-S

Autorizo a disponibilização imediata do texto integral no Repositório da U.Porto: (x)

Não autorizo a disponibilização imediata do texto integral no Repositório da U.Porto: _____ (x)

U. PORTO

 FACULDADE DE
MEDICINA DENTÁRIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

Autorizo a disponibilização do texto integral no Repositório da U.porto, com período de embargo, no prazo de:

6 Meses: ____; 12 Meses: ____; 18 Meses: ____; 24 Meses ____; 36 Meses ____; 120 Meses: ____.

Justificação para a não autorização imediata _____

Data 20 / 05 / 2021

Assinatura Bianca Adriana da Silva Alves