



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

VACINAÇÃO CONTRA A CÁRIE DENTÁRIA

Trabalho submetido por
Ana Margarida Ribeiro Brás
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

novembro de 2021



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

VACINAÇÃO CONTRA A CÁRIE DENTÁRIA

Trabalho submetido por
Ana Margarida Ribeiro Brás
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Dr. José Manuel Feliz

E coorientado por
Mestre Gonçalo Pereira

novembro de 2021

DEDICATÓRIA

*“Aqueles que passam por nós,
não vão sós,
não nos deixam sós.
Deixam um pouco de si,
levam um pouco de nós.”*

Antoine de Saint-Exupéry

Dedico este trabalho aos meus pais, ao meu irmão e aos meus avós. Por serem as minhas âncoras e por tudo o que me porporcionaram ao longo dos anos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. José Feliz, o meu reconhecimento pela disponibilidade e simpatia demonstrados desde o primeiro dia. Agradeço o voto de confiança e ter aceite trabalhar comigo, sempre com uma palavra otimista.

Ao meu coorientador Mestre Gonçalo Pereira, pelo profissionalismo e simpatia.

Ao Instituto Universitário Egas Moniz e a todos os professores que me auxiliaram ao longo destes cinco anos de percurso académico, pela transmissão de conhecimentos, que contribuíram para a minha formação educacional e profissional.

À Residência Universitária Egas Moniz, por ter sido a minha segunda casa durante os últimos 5 anos e a todos os seus colaboradores, sendo impossível dizer adeus a esta casa sem a sensação de saber que fui efetivamente feliz no tempo que lá passei.

Aos meus pais, o meu porto seguro e a quem devo tudo o que sou hoje, agradeço todo o apoio. Foram sempre um exemplo e um enorme motivo de orgulho, sem o vosso apoio incondicional, incentivo, encorajamento e total ajuda, estou certa que haveria sido bastante mais difícil. Espero que esta etapa possa retribuir de alguma forma tudo o que me têm proporcionado. A vocês o meu maior obrigada.

Ao meu irmão por me mostrar que devemos viver a vida ao máximo.

À Lara, minha primeira parceira de box, foi um orgulho crescer, trabalhar e aprender contigo. Acredito piamente que sem ti não seria a mesma coisa. Não poderia ter encontrado melhor parceria, obrigada por todo o companheirismo, apoio e por todos os momentos que ultra(passámos) acima de tudo juntas ao longo desta caminhada, levar-te-ei para sempre.

À Iryna, que mais tarde se viria a tornar também minha parceira de box, pela entreaajuda e pelos bons momentos que passámos.

À Paula e à Sara, estarei eternamente grata pela forma sempre disponível com que me “acolhem”.

Aos meus colegas, amigos e a todos os que me são importantes, Beatriz, Catarina, Francisco, Inês, Jéssica, Joyce, Luísa, Marina, Marta, Nadine, por me acompanharem ao longo destes admiráveis anos.

RESUMO

A saúde oral representa uma componente importantíssima da saúde em geral. A cárie dentária é uma doença multifatorial e ocupa um lugar de destaque entre as patologias infecciosas mais prevalentes, com impacto significativo em termos de morbilidade e custos associados ao tratamento. A pretensão de vacinação contra a cárie dentária remonta praticamente à época de descoberta da sua etiologia associada à colonização dos dentes por bactérias acidogénicas.

Desde o início da década de 40 do século XX, assiste-se a uma intensa investigação na área da Medicina Dentária com enfoque na descoberta de uma vacina contra a cárie dentária. As pesquisas têm geralmente concluído que o *Streptococcus mutans* é o principal microrganismo etiológico da lesão de cárie dentária. As estratégias de concretização de uma vacina eficaz contra a cárie têm-se dirigido à neutralização das propriedades cariogénicas desta bactéria. Ao mesmo tempo, mantém-se uma linha de investigação acérrima direcionada a uma maior e melhor compreensão do sistema imunológico e dos diversos fatores indutores de cárie dentária. Apesar de várias décadas de intensa investigação, a vacinação anticárie permanece indisponível. No entanto, o interesse e a relevância de concretização desta estratégia de prevenção é, cada vez mais, atual.

A presente revisão bibliográfica fundamenta-se precisamente no caráter promissor da vacinação no combate à cárie dentária. A árdua investigação nos últimos anos tem instigado expectativas altíssimas num desfecho de sucesso que há muito se julga para breve, desta forma pretende-se atualização de informação e aquisição de conhecimento no que diz respeito à imunização através da vacinação contra a cárie dentária.

PALAVRAS-CHAVE | Cárie dentária, imunoglobulina A salivar, vacinação, imunização.

ABSTRACT

Oral health represents a very important component of overall health. The dental caries is a multifactorial illness and occupies a prominent place among the more prevalent infectious pathologies, with significant impact in terms of morbidity and costs associated to the treatment. The pretension of vaccination against dental caries practically retraces to the time of discovery of its etiology associated with the settling of acidogenic bacteria on the teeth.

Since the beginning of the 40th decade of the 20th century, an intense inquiry in the area of Dental Medicine as been made with approach in the discovery of a vaccine against the dental caries. Research has generally concluded that *Streptococcus mutans* is the main etiological microorganism of dental caries lesions. Strategies to implement an effective vaccine against caries have been aimed at neutralizing the cariogenic properties of this bacterium. At the same time, a strong line of investigation is maintained, aimed at a greater and better understanding of the immune system and the various factors inducing tooth decay. Despite several decades of intense research, caries vaccination remains unavailable. However, the interest and relevance of implementing this prevention strategy is increasingly current.

This literature review is based precisely on the promising character of vaccination in combating tooth decay. The arduous research in recent years has instigated very high expectations for a successful outcome that has long been believed to be soon, thus, it is intended to update information and acquire knowledge regarding immunization through vaccination against tooth decay.

KEYWORDS | *Dental carie, salivary immunoglobulin A, vaccine, imunization.*

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	11
II. DESENVOLVIMENTO.....	13
1. Estrutura dentária e formação de placa bacteriana.....	13
2. Cárie dentária	16
2.1. Definição, manifestações clínicas, diagnóstico, prevenção e tratamento	17
2.2. Etiologia.....	21
2.3. Fisiopatologia	24
2.4. Fatores de risco	25
2.5. Microbioma oral e microrganismos cariogénicos.....	29
3. Sistema imunológico e a cavidade oral	33
3.1. Indução de anticorpos SIgA na saliva.....	36
3.2. Atividades biológicas de anticorpos SIgA	38
3.3 Ação dos anticorpos SIgA na defesa da cárie- resposta protetora.....	40
4. Vacinação/ Imunização contra a cárie dentária	41
4.1. Mecanismo de ação.....	45
4.2. Resposta imune	46
4.3. Determinantes antigénicos de <i>Streptococcus mutans</i>.....	47
4.3.1. Adesinas.....	49
4.3.2. Glucosiltransferases.....	50
4.3.3. Proteínas de ligação ao glucano.....	51
4.3.4. Dextranases	51
5. Imunização	52
5.1 Imunização ativa.....	53
5.1.1. Avanços na produção de vacina contra a cárie.....	53
5.1.1.1. Vacinas de subunidade.....	54

5.1.1.1.1. Vacinas de péptidos sintéticos	55
5.1.1.1.2. Vacinas conjugadas	56
5.1.1.2. Vacinas recombinantes	56
5.1.1.3. Vacinas de DNA	56
5.2. Imunização passiva	58
6. Vias de administração da vacina	61
6.1. Via Oral	61
6.2. Via Intranasal	62
6.3. Via Tonsilar	63
6.4. Via Glândulas salivares <i>minor</i>	63
6.5. Via Retal	64
6.6. Via Sistémica	64
6.7. Via gengivosalivar	65
7. Adjuvantes e sistemas de aplicação para a vacina contra a cárie	65
8. Tempo de imunização	68
9. Riscos associados à vacina anticárie	70
10. Perspetivas da vacinação anticárie: futuro	71
III. CONCLUSÃO	75
IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Anatomia dentária e placa dentária em desenvolvimento (Adaptado de Pitts et al., 2017).....	16
Figura 2- Fatores patológicos e protetores da cárie dentária (Adaptado de Pitts et al., 2017).....	17
Figura 3- Tríade de Keyes (Adaptado de Heijnsbroek et al., 2006).....	22
Figura 4- Modelo de Keyes modificado por Newbrun (Adaptado de Newbrun, 1983).22	
Figura 5- Mecanismos de defesa da cavidade oral (Aptado de Lamont et al., 2019). ..	35
Figura 6- Sistema imunológico da mucosa de uma perspectiva oral (Adaptado de Lamont et al.,2019).....	37
Figura 7- Indução de anticorpos IgA na cavidade oral (Adaptado de Lamont et al., 2019).....	38
Figura 8- Fatores imunes na interface placa/dente/gengiva (Adapatado de Giasuddin et al., 2017).....	45
Figura 9- Fatores de virulência dos <i>S. mutans</i> e antígenios alvo para o desenvolvimento de vacinas (Adaptado de Patel, 2019).	48
Figura 10- Determinantes antigénicos dos <i>S. mutans</i> (Adaptado de Lamont et al., 2019).....	48
Figura 11- Via sistémica (Adaptado de Abraham et al., 2018).....	65

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ag - Antígeno

Ag I/II - Antígeno I/II

APCs - Células apresentadoras de antígenos

DNA - Ácido desoxirribonucleico

E. coli - Escherichia coli

GALT - Tecido linfóide associado ao intestino

GBP - Proteína de ligação a glucano

GBP A - Proteína A de ligação a glucano

GBP B - Proteína B de ligação a glucano

GBP C - Proteína C de ligação a glucano

GBP D - Proteína D de ligação a glucano

GCF – Fluido crevicular do sulco gengival

GTF - Glucosiltransferase

GTF-B - Glucosiltransferase B; análoga à GTF-I

GTF-C - Glucosiltransferase C; análoga à GTF-SI

GTF-D - Glucosiltransferase D; análoga à GTF-S

GTF-I - Glucosiltransferase I; análoga à GTF-B

GTF-S - Glucosiltransferase S; análoga à GTF-D

GTF-SI - Glucosiltransferase B; análoga à GTF-C

IgA - imunoglobulina A

IgA1 - imunoglobulina A subclasse1

IgA2 - imunoglobulina A subclasse2

IgG - Imunoglobulina G

IgM - imunoglobulina M

MALT - Tecido linfóide associado às mucosas

NALT - Tecido linfóide associado à mucosa nasal

OMS - Organização Mundial de Saúde

PLGA - Poli (lactido-glicolico)

SIgA - Imunoglobulina A secretora

S. mutans - Streptococcus mutans

TC - Toxina da cólera

TLR - Tool-Like Receptors

I. INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença multifatorial e uma das doenças infecciosas orais mais prevalentes no ser humano (Chatterjee, 2018; Cherukuri et al., 2021). Representa uma infecção oportunista que resulta de uma infecção crônica, causada pela formação de biofilme na superfície dentária, cujo principal agente etiológico é o *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) (Kurita-Ochiai et al., 2020; Patel, 2019).

Nos últimos anos foram descritos múltiplos determinantes cruciais que influenciam o curso, aparecimento e progressão da doença, nomeadamente a interação de diversos fatores incluindo saliva, biofilme, dieta, anatomia, bem como fatores genéticos (capacidade do sistema imunitário desencadear uma resposta eficaz) que se conjugam com outros mais amplos ao nível individual e populacional associados a atitudes, estilo de vida, comportamentos exercidos, fatores culturais, educação e status socioeconómico dos indivíduos, que interagem com a etiologia da cárie dentária (Hummel et al., 2019; Mafla et al., 2018; Twetman, 2018).

A lesão de cárie dentária resulta de um processo contínuo e dinâmico que integra períodos alternados de desmineralização por ácidos orgânicos de origem microbiana e subsequentes períodos de remineralização por componentes salivares (e/ou agentes terapêuticos), sendo que o ambiente oral é desequilibrado para a desmineralização (Bao et al., 2015; Pitts et al., 2018).

A simbiose entre o microbioma e o hospedeiro é essencial para a manutenção da saúde oral. As patologias orais relacionadas com desequilíbrios entre os microrganismos e o hospedeiro são conhecidas como disbioses: sendo a cárie um exemplo desta. O fator que mais comumente modifica o ambiente oral é o consumo frequente de hidratos de carbono, que ocasiona a produção de ácido. O aumento da produção de ácido determina a seleção e o aumento de microrganismos produtores de ácido (acidogénicos), que, por sua vez, são tolerantes a ácidos (acidofílicos) e acidúricos (com capacidade de produzir ácido em condições ácidas) (Marsh, 2018).

O aprofundamento e consolidação de conhecimentos sobre a etiofisiopatologia da cárie sustentou a possibilidade do desenvolvimento de investigação no que concerne a estra-

tégias de imunização contra a cárie, assentes nomeadamente na indução de produção de níveis elevados de anticorpos salivares que possam persistir por períodos prolongados e sejam capazes de estabelecer imunidade imunológica contra a cárie (Arora et al., 2018).

A imunoterapia adquirida pela vacinação contra a cárie tem vindo a ser explorada. Esta solução terapêutica pode ser aplicada como medida de saúde pública especialmente para aqueles que não têm acesso ao sistema de saúde. Estas vacinas pretendem atuar contra bactérias cariogénicas tais como *S. mutans* e *Streptococcus sobrinus* (Patel, 2019). Estudos realizados em modelos experimentais animais referem que anticorpos salivares para *S. mutans* protegeram contra a formação de cárie (Gupta & Mankel, 2020).

Desta forma, a evidência avança no sentido da produção de uma vacina eficaz e segura aplicável ao uso humano, a fim de alcançar imunidade contra a cárie. A vacina contra a cárie está em desenvolvimento há vários anos e, apesar de inúmeros estudos realizados em animais, testes clínicos e pesquisas laboratoriais promissoras, ainda não existe nenhuma vacina comercialmente disponível devido às dificuldades inerentes (Arora et al., 2018; Gupta & Mankel, 2020; Patel, 2019).

O objetivo desta revisão prende-se com a necessidade de fornecer uma visão sobre os desafios da vacinação contra a cárie dentária e avaliar o progresso existente no seu desenvolvimento, destacando a etiologia da doença cárie, o mecanismo de ação, o tipo de administração bem como os riscos inerentes e as perspetivas da vacina contra a cárie.

II. DESENVOLVIMENTO

1. Estrutura dentária e formação de placa bacteriana

O dente trata-se de um sistema complexo constituído por tecidos especializados, tais como o esmalte, dentina, cimento e polpa e encontra-se dividido em duas partes, a coroa e a raiz (figura 1) (Lamont et al., 2019).

A superfície externa da coroa do dente é revestida por esmalte, substância mais dura do corpo, e por saliva (Pitts et al., 2017). O esmalte é um material organizado, formado principalmente por cristais de hidroxiapatite e alguns cristais de fluorapatite, que apresenta uma estrutura mais estável e com menor solubilidade em condições ácidas e recobre a dentina. A estabilidade dos cristais que formam a estrutura do esmalte é determinada pelas diferenças na sua composição mineral (Hara & Zero, 2010; Li et al., 2014; Opal et al., 2015; Sala & García, 2013; Yu et al., 2019).

A solubilidade do esmalte em meio ácido, tal como a sua resistência à cárie, pode ser afetada pelo tamanho, forma e proximidade dos cristais (Fontana et al., 2010). Os espaços entre cristais são ocupados por água e material orgânico, o que permite a difusão de ácidos e faz com que o esmalte tenha propriedades de um material microporoso. É neste espaço que se dão as reações de desmineralização e remineralização (Hara & Zero, 2010).

A hidroxiapatite, é o primeiro elemento que enfrenta a atividade do biofilme cariogénico, isto porque não apresenta uma estrutura cristalina altamente estável como é o caso da fluorapatite, explicando assim a sua solubilidade (Lamont et al., 2019). Quanto maior for a compactação dos cristais, menor será o espaço disponível para a difusão das partículas de água e consequentemente, menor será a capacidade de dissolução do esmalte (Hara & Zero, 2010; Sala & García, 2013).

O esmalte passa por um processo de maturação pós-eruptiva, que ocorre durante aproximadamente dois anos após a erupção do dente, sendo a suscetibilidade à cárie dentária na superfície do esmalte maior neste período, com tendência a diminuir com a idade. A

saliva promove a deposição de minerais adicionais ao esmalte. Este processo permite que o esmalte se torne menos poroso e logo mais resistente à desmineralização (Hara & Zero, 2010; Lamont et al., 2019; Marsh, 2010). As superfícies radiculares sofrem um processo de maturação semelhante ao referido processo de maturação do esmalte (Sala & García, 2013).

A dentina, encontra-se diretamente sob o esmalte, sustentando-o e apresenta alto teor de minerais, é produzida ao longo da vida, ao contrário do esmalte. A mesma contém múltiplos canais microscópicos compactados, denominados túbulos dentinários (Lamont et al., 2019).

A colonização bacteriana das superfícies dentárias tem início na adesão de microrganismos à película adquirida, o que proporciona uma superfície adequada à aderência de outros microrganismos (Cherukuri et al., 2021; Marsh, 2010).

Os dentes são recobertos por uma película adquirida, composta essencialmente por proteínas, mucinas, componentes ou produtos de origem bacteriana, fluido crevicular e glicoproteínas salivares à superfície do esmalte, ocupando uma posição entre o esmalte e o biofilme dentário. Estes componentes apresentam elevada afinidade pela superfície do esmalte, aderindo rapidamente à superfície dentária. Esta película apresenta componentes salivares que promovem a adesão de bactérias que irão dar origem à placa bacteriana (figura 1) (Hara & Zero, 2010; Sala & García, 2013; Vukosavljevic et al., 2014).

O biofilme deposita-se sobre o esmalte superficial e produz um microambiente protegido na superfície do dente, facilitando a ligação do microbioma oral aos dentes (Pitts et al., 2017). Este representa um ecossistema microbiano dinâmico que apresenta uma estrutura tridimensional e apresenta-se firmemente aderido a uma superfície não descamativa como é o caso da superfície dentária (Sala & García, 2013).

Quando a formação de biofilme oral ocorre na superfície dentária é chamado de placa bacteriana (Sala & García, 2013).

Segundo Harvey (2017), Marsh (2010) e Sala e García (2013), a formação de placa bacteriana encontra-se dividida nas seguintes etapas:

- Numa primeira etapa, dá-se a formação e deposição na superfície dentária da película adquirida;
- Quase simultaneamente à formação da película começam a chegar microrganismos, inicia-se uma etapa de transporte de bactérias seguido da sua adesão reversível à película adquirida;
- Posteriormente dá-se início à etapa na qual ocorre uma adesão irreversível de bactérias com consequente colonização primária. Durante esta fase, a placa adquirida apresenta um metabolismo predominantemente aeróbio, incluindo como colonizadores primários principalmente *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus mitis*, podendo também encontrar-se *Actinomyces spp.*;
- Em seguida dá-se a etapa da colonização secundária e terciária. Nesta etapa, uma vez aderidas, às bactérias da colonização primária, unem-se outras secundárias e a estas as terciárias, multiplicam-se por agregação e coagregação e formam colónias. O metabolismo dos colonizadores primários, anaeróbios facultativos, empobrece o ambiente de oxigénio, o que conjuntamente com os produtos metabólicos excretados pelos mesmos provoca alterações das condições ambientais existentes (acidificação), criando um ambiente mais propício às bactérias anaeróbias, como a maioria dos colonizadores secundários. Assim, ocorre a transição de um ambiente aeróbio para anaeróbio, levando consequentemente a uma alteração da composição do biofilme. Dentro dos colonizadores secundários e terciários, encontram-se espécies como a *Porphyromona spp.*, *Eubacterium* e *Fusobacterium nucleatum*. A *Fusobacterium nucleatum* é uma espécie bacteriana que serve de intermediário entre os colonizadores primários, secundários e os terciários.
- Em seguida, observa-se o processo de maturação da placa, à medida que ocorre este processo, gera-se uma matriz extracelular que se dispõe entre os microrganismos e serve como elemento nutricional e contribui para a consolidação da organização e estruturação do biofilme.

- Por fim, passado algum tempo, ocorre a etapa da mineralização na qual a placa madura, pode mineralizar-se e formar o tártaro.

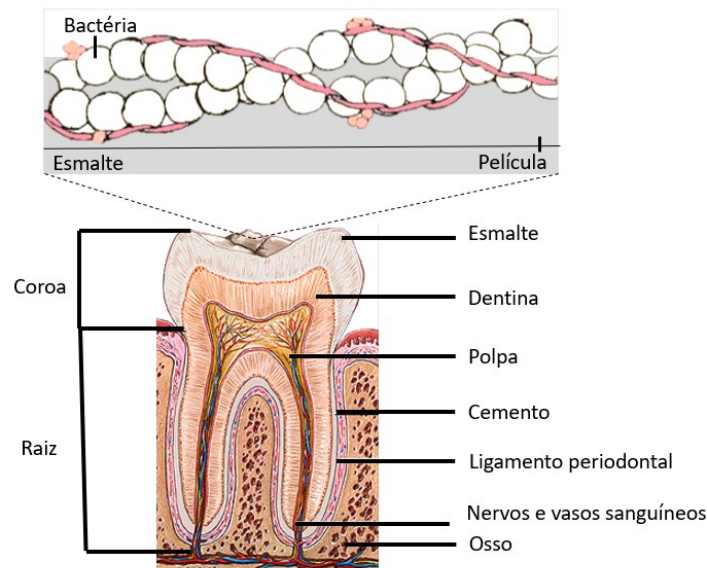


Figura 1- Anatomia dentária e placa dentária em desenvolvimento (Adaptado de Pitts et al., 2017).

2. Cárie dentária

A cárie dentária é, desde há várias décadas, uma das doenças infecciosas mais comuns em todo o mundo, sendo a sua prevalência elevada tanto em países desenvolvidos como em países em vias de desenvolvimento, distribuída de forma desigual entre a população de um mesmo país (Cherukuri et al., 2021; Hummel et al., 2019; Yang et al., 2019). A cárie dentária assume, geralmente, uma evolução lenta e pode ocorrer em qualquer momento da vida (Bao et al., 2015; Giasuddin et al., 2017; Marsh, 2018). Esta patologia resulta de uma infecção oportunista de etiologia bacteriana, muito embora reconhecida como multifatorial, decorrente da ação de agentes microbianos, mas também de fatores inerentes ao hospedeiro e a fatores ambientais (Patel, 2019; Shanmugam et al., 2013; Yadav & Prakash, 2017).

A cárie dentária representa a principal causa de dor oral e perda dentária cujo tratamento é bastante dispendioso (Luo et al., 2017; Patel, 2019). Assim, torna-se importante equilibrar os fatores patológicos e protetores que influenciam o início e a progressão da doença (Pitts et al., 2017).

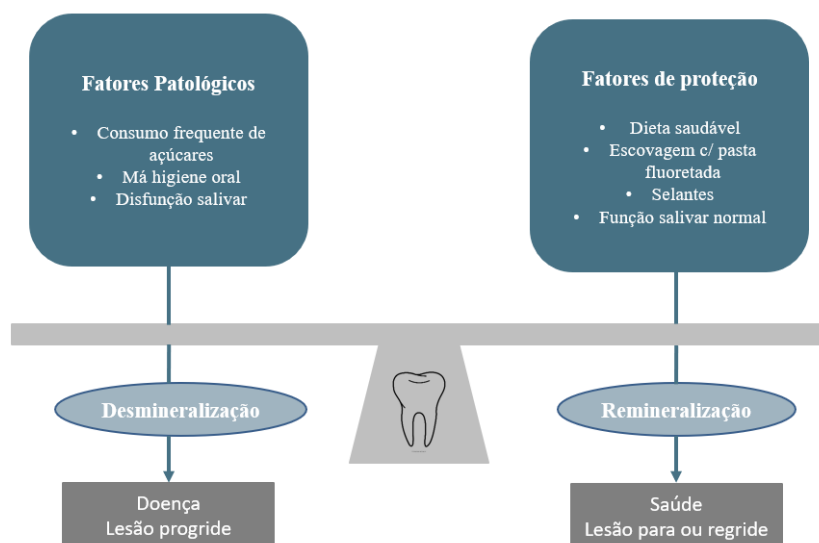


Figura 2- Fatores patológicos e protetores da cárie dentária (Adaptado de Pitts et al., 2017).

Atualmente, perante os avanços na compreensão da fisiopatologia da cárie dentária que beneficiam a procura de melhores estratégias de prevenção, considera-se que o pH crítico da cavidade oral, composição da saliva, fluído crevicular e dieta são fatores tão importantes como a placa bacteriana e os microrganismos agentes da doença. Se os fatores de risco forem bem controlados, o processo de cárie dentária pode ser evitado e/ou interrompido e revertido (remineralização) (figura 2) (Wong et al., 2017).

A abordagem tradicional de controlo da cárie dentária passa pela remoção da lesão seguido de restauração. A evolução tem passado por implementar abordagens mais conservadoras e focadas na possibilidade efetiva de prevenir a cárie dentária (Bao et al., 2015; Jalewa & Pandey, 2017).

2.1. Definição, manifestações clínicas, diagnóstico, prevenção e tratamento

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), cárie dentária define-se como um processo patológico pós-eruptivo, localizado, de origem externa que envolve amolecimento do tecido duro e prossegue para a formação de cavidade (Jalewa & Pandey, 2017).

A cárie dentária é uma doença progressiva, caracterizada pela destruição do tecido dentário em meio ácido, por ação microbiana na superfície do dente, que impele a desmineralização da porção inorgânica e destruição da substância orgânica do dente que, muitas vezes, culmina em cavitação dentária (Abraham et al., 2018; Bao et al., 2015; Yesh et al., 2018).

A desmineralização do tecido dentário ocorre por meio da interação entre bactérias produtoras de ácido, juntamente com subprodutos ácidos resultantes da fermentação bacteriana de hidratos de carbono (substrato que a bactéria pode metabolizar) e fatores do hospedeiro (que incluem dentes e saliva), num determinado período de tempo (Abraham et al., 2018; Mafla et al., 2018). As bactérias endógenas presentes no biofilme, produzem ácido lático e outros ácidos orgânicos como um subproduto do metabolismo dos hidratos de carbono fermentáveis. O ácido faz com que o valor do pH local diminua abaixo de um valor considerado crítico, resultando na desmineralização, onde ocorre difusão de cálcio e fosfato. Se a difusão de cálcio e fosfato persistir, acabará por dar-se a cavitação. A desmineralização pode ser revertida numa fase inicial por meio da absorção de cálcio, fosfato e flúor: o equilíbrio entre a remineralização e a desmineralização determina se a lesão de cárie dentária progride, pára, estabiliza ou reverte (figura 2) (Divya et al., 2020; Luo et al., 2017; Pitts et al., 2017).

Tal como referido anteriormente, a mineralização do esmalte está incompleta no momento da erupção do dente, sendo necessário um período adicional de cerca de dois anos de exposição à saliva para que o processo seja concluído. Durante este período, os dentes encontram-se mais suscetíveis à formação de cáries. Os dentes molares permanentes são caracterizados pela presença de fossas e fissuras, o que permite a acumulação de biofilme dentário. Além das superfícies oclusais, os sulcos nas superfícies vestibulares dos molares inferiores definitivos são áreas vulneráveis em que o processo de cárie dentária pode avançar rapidamente (Frencken, 2018; Philip et al., 2018; Tao et al., 2018).

As lesões iniciais de cárie dentária são assintomáticas, ao contrário de lesões mais avançadas que, habitualmente, se associam a aumento da sensibilidade dentária e dor. A deteção precoce é essencial, pois numa fase inicial o processo cariogénico pode ser interrompido. Já a cavitação ocorre pela progressão da doença (Braga et al., 2010).

O curso da doença progride de forma lenta a partir de sinais clínicos relativamente estáveis numa fase inicial, como *white spots*. Nesta fase, muitos indivíduos podem não estar cientes do significado desta manifestação como um indicador de atividade ou latência da doença sendo que com a progressão da cárie, vai existir um aumento de sinais e sintomas (dor) que acabam por ser mais facilmente reconhecidos pelos indivíduos (Mafla et al., 2018).

O diagnóstico das condições relacionadas com a lesão cáriosa, pode ser realizado por meio visual, tátil e dispositivos eletrónicos (Frencken, 2018). As radiografias podem ajudar a determinar a profundidade da lesão e a proximidade da polpa. Este exame complementar de diagnóstico é uma ótima ferramenta para a avaliação de lesões nas superfícies proximais dos dentes e nos dentes posteriores (Bowen, 2015; Pitts et al., 2017). A cárie para além de ser frequentemente diagnosticada através de radiografias, também o pode ser por meio de uma sonda (Bowen, 2015).

A cárie dentária é tratada com base na sua extensão, gravidade e estadio. Numa fase inicial, a remineralização é possível, e segue a implementação de medidas de tratamento preventivo (Gupta & Mankel, 2020).

As atuais estratégias de prevenção da cárie dentária, incluem: educação para a saúde oral; higiene oral diária (controlo químico e mecânico da placa bacteriana, através da escovagem dos dentes duas a três vezes por dia com pasta dentífrica fluoretada com pelo menos 1450 ppm de flúor e uso de fio dentário, dado que a cárie não progride sem a presença de bactérias na placa dentária); aplicação de flúor através de diversas formas, géis e vernizes (o flúor previne a cárie dentária ao inibir a desmineralização das estruturas cristalinas do dente e potencializar a sua remineralização); antimicrobianos; selantes de fossas e fissuras (fossas e fissuras são mais suscetíveis à cárie devido à sua anatomia que favorece a acumulação de placa, uma vez preenchidas essas irregularidades anatómicas do dente, a área torna-se morfológicamente menos suscetível); orientação dietética (restrição do consumo de açúcar); uso de xilitol e o aumento do acesso a cuidados médico dentários precoces têm sido consideradas medidas amplamente eficazes, estando entre as abordagens que tiveram impacto considerável na prevalência de cárie e representam uma mais valia para uma redução significativa no que diz respeito ao elevado custo dos tratamentos dentários (Cherukuri et al., 2021; Gupta & Mankel, 2020; Jalewa & Pandey, 2017; Philip et al., 2018; Surya et al., 2018; Young et al., 2015).

O uso diário de pasta dentífrica com flúor é o principal fator da redução geral da cárie dentária em todo o mundo nas últimas décadas (Divya et al., 2020).

Muitas destas abordagens podem ser amplamente eficazes, no entanto, fatores desfavoráveis de índole económica, barreiras comportamentais e culturais para a concretização destas estratégias (no que diz respeito ao seu uso) acabam por instigar a elevada prevalência de doença dentária a nível mundial. A par disto acresce-se o facto de o tratamento da lesão de cárie dentária implicar a remoção da parte cariada do dente seguido da sua restauração, que para além de se associar a um custo elevado, não impede a recidiva nem o desenvolvimento de cárie noutros dentes (Arora et al., 2018; Patel, 2019).

O desenvolvimento de vacinas contra a cárie dentária seria um grande avanço para a erradicação desta doença microbiológica (Gupta & Mankel, 2020). Com o intuito de se substituir as tradicionais abordagens de tratamento contra a cárie dentária que progrediram por um longo período de tempo, desde a fase extrativa, à fase restauradora comumente praticada, até à fase preventiva atualmente recomendada, têm sido idealizadas medidas para prevenir o aparecimento da mesma, entre as quais imunizar a população contra a doença através de uma vacina. Esta abordagem para a prevenção de cárie dentária não deve ser vista como algo que surge para concorrer com outras estratégias preventivas existentes. A imunização juntamente com a combinação de todas estas técnicas pode contribuir para uma redução ainda maior da prevalência da doença (Surya et al., 2018).

2.2. Etiologia

As doenças orais, particularmente a cárie dentária, têm uma etiologia complexa e inter-relacionada com fatores de risco comuns (Cherukuri et al., 2021; Wagner & Heinrich-Weltzien, 2017).

Os conceitos etiológicos da cárie dentária evoluíram ao longo dos anos, de serem considerados como uma doença iniciada por microrganismos inespecíficos, para serem considerados como uma doença infecciosa causada por bactérias específicas, até aos paradigmas atuais que enfatizam uma abordagem ecológica bacteriana mista como sendo responsável pelo início da lesão (Philip et al., 2018; Simón-Soro et al., 2014).

A etiologia da cárie dentária compreende fatores locais, biológicos, relativos ao indivíduo (histórico familiar) e à comunidade. É fundamental analisar causas que apresentem riscos associados à doença cárie assim como perceber sinais clínicos vitais para o domínio da doença (Maltz et al., 2016; Sala & García, 2013; Twetman, 2018).

Em 1890, Miller referiu, através da teoria quimioparasitária, o papel dos micróbios no desenvolvimento das lesões de cárie sugerindo que a ação combinada dos ácidos e dos microrganismos orais (bactérias) resultava na desmineralização dentária e, no final do século XIX, era comumente aceite que as patologias dentárias eram causadas pelo crescimento excessivo e inespecífico de bactérias na placa bacteriana. Em conformidade com esta hipótese de placa inespecífica, era a quantidade de placa existente que determinava os níveis de patogenicidade, desta forma, propunha-se a remoção mecânica do máximo de placa bacteriana por meio de escovagem e uso de fio dentário como melhor forma de prevenção da cárie dentária. A teoria de Miller apresentava lacunas no esclarecimento do fenómeno cariogénico, porém tornou-se de forma inevitável na espinha dorsal de estudos futuros na disciplina de cariologia (Divya et al., 2020; Philip et al., 2018).

Posteriormente, em meados do século XX, através das experiências realizadas por Keyes e Fitzgerald em modelos animais, existiu uma revolução sobre a conceção da etiologia da cárie dentária, evidenciando que a mesma se tratava de uma doença infecciosa e transmissível (Philip et al., 2018).

Em 1976, Loesche anunciou a hipótese da placa específica, subentendendo que a cárie dentária se tratava de uma infecção causada por bactérias específicas existentes na placa bacteriana (Philip et al., 2018).

A Tríade de Keyes (figura 3), descrita por um diagrama de Venn simples, representado por três círculos em interação, inclui a dieta, a placa bacteriana e o hospedeiro. A interseção dos três círculos representa a lesão de cárie dentária, tida por diversos anos como modelo explicativo do desenvolvimento de lesão cariogénica, foi modificada por Newbrun em 1983, tendo sido integrado no diagrama de Keyes um quarto círculo representando o tempo como fator etiológico (Divya et al., 2020; Lima, 2007). Esse diagrama foi designado por modelo de Keyes modificado (figura 4) (Costa et al., 2012).

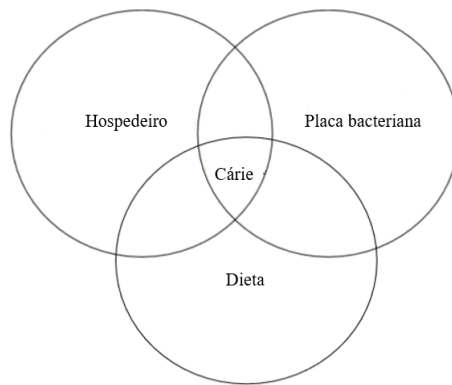


Figura 3- Tríade de Keyes (Adaptado de Heijnsbroek et al., 2006).

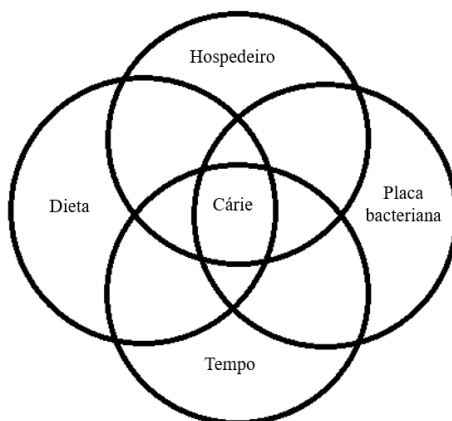


Figura 4- Modelo de Keyes modificado por Newbrun (Adaptado de Newbrun, 1983).

A grande maioria dos dados que sustentam a relação entre *S. mutans* e a cárie dentária considera-os associativos ao invés de causativos. Existem evidências que demonstram que os indivíduos que apresentam níveis elevados de *S. mutans* não desenvolvem necessariamente lesões de cárie, enquanto mesmo na ausência de *S. mutans*, pode verificar-se a existência de lesões (Philip et al., 2018).

As bactérias específicas apontadas como responsáveis pela cárie dentária, constituem parte da microflora nativa. Desta forma, ainda que a cárie seja induzida microbianamente, há que ter em conta que é causada por bactérias endógenas que constituem uma parte do microbioma residente, e não por bactérias exógenas específicas adquiridas exteriormente ao hospedeiro, tal como se verifica noutras doenças infecciosas (Conrads & About, 2018; Philip et al., 2018). De acordo com conceitos contemporâneos, a etiologia e patogénese da cárie dentária salientam uma abordagem ecológica bacteriana mista como sendo responsável pelo início e progressão da lesão. A cárie é agora considerada uma lesão mediada por biofilme em vez de se considerar uma doença infecciosa causada por um organismo específico (Philip et al., 2018).

Por isso, a cárie dentária pode ser considerada uma infeção endógena mediada por biofilme, ou seja, as lesões desenvolvem-se devido a uma mudança ecológica drástica no biofilme da flora microbiana da cavidade oral. Tal pode ocorrer, quando microrganismos acidogénicos da flora residente (biofilme) alcançam vantagem ecológica seletiva sobre outras espécies, perturbando o equilíbrio homeostático do biofilme, induzindo um desequilíbrio fisiológico entre a parte mineral do dente e o biofilme e, em última instância, alterando o equilíbrio para a desmineralização, iniciando assim, o processo da doença com formação de lesão (Bowen, 2015; Mosaddad et al., 2019; Philip et al., 2018).

De acordo com esta hipótese de placa ecológica, os fatores que desencadeiam um aumento no componente acidogénico do microbioma oral são condições ambientais locais, como exposição frequente de açúcar na dieta ou disfunção salivar (Philip et al., 2018).

Apenas perante a existência de substrato, ou seja, hidratos de carbono fermentáveis, é que os microrganismos cariogénicos conseguem produzir ácidos (Karad & Dhole, 2019).

2.3. Fisiopatologia

A fisiopatologia multifatorial da cárie dentária constitui uma interação complexa dependente do tempo entre bactérias acidogênicas como *S. mutans*, *Lactobacillus acidophilus* e substrato de carboidratos fermentáveis, juntamente com fatores do hospedeiro, incluindo a estrutura mecânica dos dentes bem como a sua constituição, quantidade e qualidade de saliva. A cárie dentária afeta tanto a porção coronal quanto a porção radicular dos dentes, em todas as faixas etárias e em todas as populações. A espécie de microrganismo causador mais prevalente e principal, de entre outros implicados na cárie dentária é o *S. mutans* (Chatterjee, 2018; Cherukuri et al., 2021).

A patogênese da cárie dentária foi estudada ao longo de várias décadas. O *S. mutans* e o *Streptococcus sobrinus* produzem glucanos extracelulares solúveis em água e insolúveis em água a partir da sacarose – condição necessária para a acumulação de bactérias na superfície dos dentes – por meio da ação combinada de glucosiltransferases (GTFs), que facilitam a formação de biofilme (Ghazal et al., 2018; Kurita-Ochiai et al., 2020; Yan, 2013).

A cárie dentária é uma doença causada por um grupo de microrganismos orais, compostos principalmente por *S. mutans*, sendo que o processo cariogênico ocorre em três fases: 1) Fixação das bactérias cariogênicas, mediada por adesinas dos *S. mutans*, à superfície do dente; 2) Acumulação de bactérias sob a forma de biofilme, dependendo da presença de sacarose, transferência de GTFs e proteínas de ligação ao glucano (GBPs) de *S. mutans*. Após a decomposição da sacarose em glicose e frutose, existe produção de glucanos pela GTF (enzima bacteriana) de *S. mutans*; 3) Os glucanos que foram produzidos interagem com GBPs e GTFs na superfície do *S. mutans*. Além disso, a colonização e multiplicação de bactérias, resultam na acumulação de biofilmes, levando à formação de placa bacteriana. Quando a acumulação de bactérias se dá em suficiente magnitude, juntamente com açúcares disponíveis, resulta na formação de ácido lático o que leva à dissolução da estrutura do esmalte (Cherukuri et al., 2021; Surya et al., 2018; Jalewa & Pandey, 2017).

2.4. Fatores de risco

Como anteriormente referido, a cárie dentária é uma doença intermediada por fatores patogénicos (exposição frequente a hidratos de carbono da dieta, baixo fluxo de saliva e um biofilme produtor de ácido capaz de fermentar carboidratos e produzir uma diminuição no pH) que podem causar lesões dentárias (Wong et al., 2017).

A sacarose é considerada o hidrato de carbono mais cariogénico. A formação da placa bacteriana depende da frequência e quantidade do consumo destes hidratos de carbono, o que determinará o risco de acometimento da cárie. A ingestão exacerbada de alimentos açucarados representa um fator de risco com consequências prejudiciais quer para a saúde geral quer para a saúde oral. Associados à falta de higiene oral resultará num desequilíbrio do curso de desmineralização e remineralização do esmalte dentário, que consequentemente, favorece a instalação das lesões de cárie (figura 1) (Giasuddin et al., 2017; Maltz et al., 2016; Wagner & Heinrich-Weltzien, 2017).

As bactérias produtoras de ácido expostas aos carboidratos fermentáveis da dieta produzem ácidos orgânicos de cadeia curta que são suficientemente pequenos para se difundirem na superfície do dente, causando dissolução da parte mineral do dente (desmineralização). A saliva pode ajudar a neutralizar esses ácidos bacterianos e fornecer cálcio e fosfato, para se difundir de volta para a superfície do dente (remineralização). O equilíbrio ou desequilíbrio entre estes fatores patogénicos e protetores determina se haverá uma desmineralização ou remineralização da parte mineral dos dentes (Marsh et al., 2015; Mosaddad et al., 2019; Wong et al., 2017).

A presença dos hidratos de carbono na cavidade oral funciona como um substrato para a sustentação bacteriana (Karad & Dhole, 2019; Marsh, 2018). O principal fator influenciador da estabilidade do pH no meio oral e promotor da disbiose é a ingestão de açúcar (Mafla et al., 2018; Twetman, 2018).

O fluxo salivar bem como a composição da saliva desempenham um papel importante na manutenção da saúde dos tecidos moles e duros da cavidade oral, dado que apresentem diversos fatores de defesa inatos ou adquiridos que contribuem para o controlo da adesão bacteriana e, por sua vez, na patogénese da cárie dentária (Carpenter, 2013;

Mosca & Chen, 2017; Opal et al., 2015). Existem bactérias cariogénicas que vivem na cavidade oral. Consequentemente, a saliva tem uma grande e forte influência na sua sobrevivência e crescimento (Mosaddad et al., 2019).

A saliva e as bactérias formam uma película que se vai aderir à superfície dos dentes, apoiando a manutenção do equilíbrio entre a desmineralização e remineralização dentária. As moléculas da película apresentam grande afinidade para as superfícies dentárias e controlam o processo de homeostasia por inibição da precipitação dos sais de fosfato de cálcio, permitindo assim a manutenção de um estado de supersaturação da saliva em cálcio e fosfato (Lamont et al., 2019; Marsh, 2018).

A saliva promove a aglutinação das bactérias e melhora a remoção bacteriana através dos seus componentes antimicrobianos, nomeadamente aglutininas, glicoproteínas, fibronectina, lisozimas e imunoglobulina A secretora (SIgA). As proteases e galactosidos da saliva evitam a adesão de *S. mutans*, pela destruição dos antígenos proteicos de superfície da bactéria (Lamont et al., 2019). A saliva apresenta outros componentes como a α -amilase, lactoferrina, fibronectina, imunoglobulinas (IgG, IgM), componentes do sistema complemento e mucinas (Sala & García, 2013).

A ação protetora da saliva assenta principalmente em 4 propriedades: 1) formação de película para proteção contínua contra o desgaste dentário (neutralizar os ácidos produzidos pelas bactérias); 2) inibição da desmineralização das superfícies dentárias expostas; 3) promoção da remineralização do esmalte dentário; 4) atividades antimicrobianas, incluindo prevenção da aderência de espécies cariogénicas no esmalte, agregação de microrganismos e eliminação da cavidade oral (facilita a remoção dos alimentos cariogénicos da cavidade oral e a secreção de péptidos antimicrobianos) (Fontana et al., 2010; Kubala et al., 2018; Sala & García, 2013; Wang et al., 2018).

Quanto maior for o fluxo salivar, maior a disponibilidade de componentes orgânicos (hidratos de carbono, lípidos, proteínas, glicoproteínas e péptidos) e inorgânicos salivares (cálcio, fosfato, flúor, ácido carbónico, carbonato de hidrogénio e dihidrogenofosfato), tidos como agentes promotores da saúde oral (Hara & Zero, 2010; Sala & García, 2013; Yadav & Prakash, 2017).

Estes iões e proteínas encontram-se relacionados com a manutenção da integridade do dente, contribuindo para a capacidade tampão da saliva (iões fase inorgânica) e apresentando elevada afinidade para as superfícies do esmalte mantendo um ambiente favorável de cálcio e fosfato (proteínas fase orgânica), regulando assim, os processos de desmineralização e remineralização envolvidos no desenvolvimento de cárie. A saliva, encontra-se sobressaturada de cálcio, fosfato e iões hidroxilo, desta forma, lesões incipientes de cáries podem ser remineralizadas. Por estes motivos, a xerostomia e, até mesmo, a hipossalivação são fatores de risco com forte contributo no processo fisiopatológico de cárie dentária (Hara & Zero, 2010; Sala & García, 2013; Yadav & Prakash, 2017).

A diminuição no fluxo salivar pode ser temporária ou permanente. Quando a quantidade é apenas moderadamente reduzida, as estruturas orais podem parecer normais. No entanto, a diminuição acentuada ou ausência de saliva, resulta num ambiente ácido favorável do desenvolvimento de lesão de cárie dentária (Marsh, 2018). Os indivíduos com fluxo salivar reduzido geralmente têm cárie dentária ativa, ou seja, a perda da capacidade de remoção de “microrganismos” pela saliva permite que a placa se expanda de forma facilitada. Ao contrário, os indivíduos com bom fluxo salivar encontram-se geralmente livres de cárie (Mosaddad et al., 2019).

As características da saliva – fluxo, diluição, capacidade tampão e de remineralização – são reconhecidas como importantes componentes no processo de regulação da atividade bacteriana e, de alguma forma, acabam por atuar na progressão e regressão da doença. O pH crítico, abaixo do qual ocorre dissolução do esmalte é considerado 5,5 (pH ácido). Normalmente, a saliva tem um pH de cerca de 7,2. A isto acresce-se o facto de quando o processo cariogénico atinge a dentina, a dissolução pode ocorrer mesmo num pH consideravelmente mais alto (Luo et al., 2017; Marsh, 2018; Opal et al., 2015).

A saliva pode neutralizar o pH ácido da placa bacteriana e eliminar os subprodutos do metabolismo dos microrganismos, dado que os ácidos são o principal produto do metabolismo bacteriano. O papel crucial da saliva tendo em conta a sua capacidade tampão é inativar o pH ácido da placa. Quando a taxa de fluxo salivar aumenta, existe uma mudança na sua composição e a concentração de sódio, cloro e bicarbonato aumenta, por outro lado, magnésio e fósforo diminuem. Os bicarbonatos expandem-se pela placa anulando a acidez. O aumento do pH da placa leva à regeneração do esmalte e da dentina (Mosaddad et al., 2019).

A identificação minuciosa dos fatores de risco e a definição das suas relações mútuas podem levar a um melhor entendimento do caráter da cárie nos pacientes e, por consequência, a uma melhor prevenção (Piekoszewska-Ziętek et al., 2017).

Fatores genéticos também podem ser responsáveis por mudanças ecológicas microbianas que levam a doenças. O genótipo de um indivíduo pode eventualmente impedir a existência de certas bactérias benéficas ou permitir que espécies patogénicas residam e contribuam para o seu microbioma único. A crítica à hipótese de placa ecológica bacteriana deve-se ao facto de não considerar a suscetibilidade genética do hospedeiro à cárie. Existem evidências que certos indivíduos e grupos populacionais são geneticamente mais suscetíveis à cárie dentária, implicando que fatores hereditários também devem ser tidos em consideração (Philip et al., 2018).

Em suma, o modelo atual de cárie dentária apresenta um quadro complexo de uma doença multifatorial, impulsionada pelo pH, cujo início e progressão são influenciados por múltiplos patogénios, efeitos sistémicos e componentes hereditários nas interações da dieta, comportamentais, ambientais, socioeconómicos e fatores de risco fisiológicos. O processo de cárie pode ser considerado um sistema modelo de simbiose dinâmica, onde em condições ambientais ditas normais, os microrganismos do biofilme vivem numa relação simbiótica com o hospedeiro, caracterizada por comensalismo e mutualismo. A natureza desta simbiose pode mudar sob mudanças nas condições ambientais locais com o mutualismo a tornar-se parasitismo, e essa adaptação dinâmica é o princípio básico que sublinha a compreensão atual dos processos de doenças endógenas, como a cárie (Philip et al., 2018).

2.5. Microbioma oral e microrganismos cariogênicos

A cavidade oral alberga um dos mais diversos microbiomas do corpo sendo colonizada desde o nascimento por uma ampla variedade de microrganismos. O microbioma oral compreende bactérias (grupo mais comum de microrganismos), leveduras, vírus, protozoários e fungos. A sua colonização ocorre sobretudo nas superfícies dos dentes, levando à formação de biofilme (Mosaddad et al., 2019).

Para que exista colonização das bactérias, as mesmas têm que se fixar a uma superfície. As características mecânicas, químicas e microbianas da superfície influenciam muito as espécies microbianas que se podem fixar, desta forma, recém-nascidos e bebés ao terem apenas superfícies moles na mucosa oral, não apresentam microrganismos que requerem ou têm mais afinidade por superfícies duras. Os colonizadores primários da mucosa oral neonatal têm origem na pele materna ou no trato geniturinário. À medida que ocorrem erupções dos dentes decíduos, também ocorrem mudanças na ingestão alimentar e nas práticas de higiene oral (Yu et al., 2019).

Nesta fase, são adicionados ao ecossistema, os microrganismos que podem colonizar as superfícies dos dentes. É também neste período que os fatores maternos de imunorregulação infantil e proteção de anticorpos diminuem, visto os anticorpos derivados da placenta serem eliminados e frequentemente a amamentação ser interrompida (Jalewa & Pandey, 2017).

A microbiota oral torna-se mais diversa, organizada e desenvolve-se em conjunto com o sistema imunológico do hospedeiro formando dependências recíprocas à medida que a dentição decídua dá lugar à dentição mista e posteriormente à definitiva (Yu et al., 2019).

O microbioma oral é único e dinâmico, isso deve-se em parte devido à conexão da cavidade oral com o ambiente externo (Mosaddad et al., 2019). A composição do microbioma oral difere de um sítio intraoral para outro, refletindo de certa forma, a resposta do hospedeiro e a capacidade imunológica em cada sítio. Reforçar que os organismos da cavidade oral serão diferentes entre os indivíduos, retratando a dieta, os horários de amostragem do dia e as localizações geográficas (Costalonga & Herzberg, 2014). O mesmo possui uma relação simbiótica ou mutualística com o hospedeiro, não só atuando

do como uma barreira para patógenos oportunistas, mas também realizando processos metabólicos que beneficiam o hospedeiro. Os microrganismos orais residentes beneficiam de um habitat quente e nutritivo fornecido pelo hospedeiro e, em troca, agem por forma a repelir microrganismos invasores, contribuem para as defesas do hospedeiro e envolvem-se em “reações” cruzadas com o hospedeiro para diminuir as respostas pró-inflamatórias potencialmente excessivas às bactérias comensais. A evolução das evidências contemporâneas, destaca cada vez mais os aspetos benéficos de um microbioma oral saudável (Pitts et al., 2017; Philip et al., 2018).

Relativamente à residência bacteriana na cavidade oral, existem dois tipos de superfícies, as faces duras dos dentes e os tecidos moles da mucosa oral. Ao definir as comunidades microbianas que precedem o estabelecimento da cárie, é fundamental definir a microbiota característica dentro de nichos ecológicos específicos. Os dentes, língua, palato duro e mole, fornecem condições enriquecedoras nas quais as colónias microbianas podem crescer. Em termos mais amplos, a cavidade oral abriga pelo menos cinco comunidades: os dentes; a saliva; as superfícies dorsal e lateral da língua; o sulco gengival e a bolsa periodontal; e as demais superfícies epiteliais da mucosa oral (Costalonga & Herzberg, 2014; Mosaddad et al., 2019).

No que concerne à microbiota nos dentes, importa realçar que as superfícies dentárias são vistas como um local de ancoragem estável para o desenvolvimento de biofilme a longo prazo. Como substrato para a formação de biofilme, as superfícies dos dentes são mais complexas do que o mineral hidroxiapatite do esmalte. O esmalte do dente em boca é revestido por uma película salivar, enquanto as raízes podem ser revestidas por uma mistura de proteínas salivares e séricas. Os biofilmes ricos em proteínas são os locais reais de adesão inicial dos colonizadores microbianos pioneiros. Conforme o biofilme amadurece, a comunidade vai-se tornando mais complexa. Durante a maturação, a mudança na arquitetura do biofilme da placa bacteriana reflete as forças de coagregação entre espécies. Realçar uma vez mais, que a comunidade microbiana da placa dentária que se forma no biofilme (supragengival; acima da linha da gengiva) difere da comunidade subgengival (abaixo da linha da gengiva), que se forma no biofilme proteico que reveste o cemento da raiz. À medida que o crescimento da comunidade se estende ao longo da raiz e se distancia do ambiente salivar, o biofilme contém menos saliva. O am-

biente torna-se mais anaeróbico e cada vez mais protegido de alimentos e alterações de pH e temperatura (Costalonga & Herzberg, 2014; Sala & García, 2013).

A utilização de técnicas moleculares permitiu o conhecimento sobre a composição e o funcionamento do microbioma oral em condições de saúde e de doença. As tecnologias de microbiologia molecular dão-nos a possibilidade de observar a composição microbiana em pessoas saudáveis e com cárie para a identificação de novas espécies de microrganismos patogénicos, a sua interação, habilidades sinérgicas e a reatividade cruzada desses fatores no processo de decomposição e desenvolvimento (Mosaddad et al., 2019).

O microbioma oral humano é um ambiente ecológico, único e diversificado onde foram identificadas aproximadamente 700-800 espécies bacterianas diferentes, o que torna a cavidade oral, o ambiente mais diverso do corpo microbiologicamente (Arweiler & Netuschil, 2016; Cherukuri et al., 2021; Mosaddad et al., 2019; Philip et al., 2018). Este conhecimento abrangente sobre a composição do microbioma oral pode ajudar os médicos dentistas a prever a possível doença no futuro e tomar medidas preventivas (Mosaddad et al., 2019).

Entre os variados microrganismos isolados das superfícies dentárias cariadas, a classe de bactérias anaeróbicas gram positivas, como *Lactobacillus acidophilus*, *S. mutans*, *Lactobacillus fermentum*, *Actinomyces viscosus* são os patogénios identificados, sendo a espécie *S. mutans* o organismo causador mais ubíquo (Abraham et al., 2018; Cherukuri et al., 2021).

A relação normalmente sinérgica entre o microbioma e o hospedeiro é dinâmica e pode ser perturbada por mudanças no estilo de vida ou alterações na biologia da cavidade oral (Pitts et al., 2017).

A acumulação progressiva de bactérias e o crescimento da placa bacteriana proporciona condições para o desenvolvimento de uma flora bacteriana anaeróbia, e por tal contribui para o aumento da diversidade dos microrganismos na placa bacteriana (Lamont et al., 2019).

O ácido láctico, produzido pelo *S. mutans*, favorece o crescimento da *Veillonella alcalescens*, que contribui para o desenvolvimento da placa (Mosaddad et al., 2019). O *S. mu-*

tans parece produzir essencialmente dextrano hidrossolúvel, o que explica a sua maior facilidade para formar placa bacteriana e, consequentemente, cárie dentária (Pereira et al., 2010). Por outro lado, alguns microrganismos produzem dextrano (a partir da metabolização da sacarose), que funciona como molécula de adesão das bactérias entre si, nomeadamente do *S. mutans*, *Streptococcus sanguis* e *Actinomyces viscosus*, com alta afinidade para as glicoproteínas salivares (Pacheco, 2007). Sendo certo que *S. mutans* é o principal agente etiológico desta doença, o *Streptococcus sobrinus* e o *Lactobacillus* também estão implicados nesta doença (Cherukuri et al., 2021; Gupta & Mankel, 2020; Yadav & Prakash, 2017).

De todas as bactérias cariogénicas (ou seja, bactérias capazes de colonizar, produzir ácidos e induzir cárie dentária), o *S. mutans* é o principal agente (Luo et al., 2017). O *S. mutans* trata-se de uma bactéria extracelular, anaeróbia facultativa, acidogénica, não hemolítica, capaz de produzir polissacáridos intracelulares e extracelulares (Pacheco, 2007; Conrads & About, 2018).

A adesão dos microrganismos à superfície dentária e aos tecidos moles adjacentes é determinada pela existência de moléculas de adesão (adesinas), que se fixam a recetores específicos, habitualmente, açúcares simples. Este processo envolve os antígenos adesina I e II (Ag I/II, também referidos na literatura como proteína de superfície, PAc ou P1), a GTF, responsável pela produção de glucano e a proteína de ligação ao glucano (GbpB) responsável pela fixação de glucano às superfícies – são conhecidos por desencadear uma resposta imunológica específica para o antígeno (Patel, 2019).

Outro paradigma em evolução na compreensão do microbioma associado à cárie é o papel que as comunidades microbianas orais promotoras de saúde podem desempenhar na mitigação do ácido produzido por bactérias cariogénicas (Philip et al., 2018).

O conhecimento sobre a estrutura e funcionamento do microbioma, dada a sua associação à disbiose, é crucial para determinar estratégias de reversão desse desequilíbrio e alcançar um estado seguro de equilíbrio (Marsh, 2018).

3. Sistema imunológico e a cavidade oral

O sistema imunológico é uma rede biológica complexa, diversa e dinâmica. A imunidade refere-se à resistência que o hospedeiro exibe face à ocorrência de lesões causadas por microrganismos. Esta, com base na rapidez de início e na presença de memória imunológica, divide-se em imunidade inata e em imunidade adaptativa/ adquirida, sendo que atuam de forma sinérgica (Marshall et al., 2018; McComb et al., 2019; Pereira et al., 2010; Shanmugam et al., 2013; Yu et al., 2019).

A imunidade inata caracteriza-se por ser congénita, ter início rápido, sem memória para reinfeções e menos específica. Por sua vez, a imunidade adquirida, caracteriza-se por ter início menos rápido e mais específica devido à presença de memória protetora contra reinfeções (Marshall et al., 2018; Yu et al., 2019).

Os mecanismos efetores da imunidade inata são representados, essencialmente, pelas células macrofágicas (macrófagos e neutrófilos) e pelo sistema do complemento, como fator de imunidade humoral. Na imunidade adquirida intervêm sobretudo os fatores humorais (nomeadamente todas as classes de imunoglobulinas), assim como os fatores celulares (designadamente linfócitos T e B) (Pereira et al., 2010).

Na cavidade oral, as superfícies dentárias duras coexistem com as superfícies moles da mucosa, ambas protegidas por mecanismos imunes inatos e adaptativos (Yu et al., 2019).

De acordo com uma visão geral dos fatores específicos de defesa do hospedeiro na saliva, em termos de imunidade adaptativa, as superfícies da mucosa oral são protegidas por um sistema sofisticado que é amplamente dependente do sistema imunológico circulatório e é conhecido como sistema imunológico da mucosa (Lamont et al., 2019).

As superfícies mucosas do corpo estabelecem uma interface com o mundo microbiano, e a maioria dos patógenos que infetam os humanos conseguem-no através da invasão das vias mucosas. A cavidade oral constitui a entrada para o trato alimentar. Desta forma, a integridade física e funcional da mucosa oral é importante tanto para a saúde oral como para a saúde geral (Lamont et al., 2019; Yu et al., 2019).

A cavidade oral é um compartimento característico no que se refere à ação do sistema imunológico da mucosa, porque, ao contrário de outros compartimentos da mucosa, os mecanismos imunológicos, são operados pelo sistema imunológico local da mucosa oral (secretor) ou pelo sistêmico (Kurita-Ochiai et al., 2020; Lamont et al., 2019).

De acordo com uma visão geral dos fatores de defesa do hospedeiro inato na saliva, a cavidade oral contém uma série de fatores antimicrobianos inatos que são secretados pelas glândulas salivares, mas também por células epiteliais e neutrófilos (figura 5) (Lamont et al., 2019).

Assim, as respostas imunológicas locais, surgem na cavidade oral através das secreções das glândulas salivares *major* e *minor*, mas também por células epiteliais e neutrófilos. Enquanto as respostas imunológicas sistêmicas surgem na cavidade oral através do fluido crevicular do sulco gengival (GCF). O fluido crevicular tem origem nos capilares sanguíneos e flui para o sulco gengival, transportando mediadores da imunidade inata e adquirida produzidos localmente. Esta resposta imune considera-se sistêmica precisamente porque tem origem em fluidos de tecidos nos capilares sanguíneos (figura 5) (Kurita-Ochiai et al., 2020; Lamont et al., 2019).

Inicialmente pensou-se que o início de respostas imunológicas em qualquer local indutor da mucosa poderia resultar no aparecimento uniforme de anticorpos em todos os locais efetores, daí o nome original “sistema imunológico comum da mucosa”. No entanto, estudos posteriores demonstraram um grau considerável de compartimentação dentro do sistema imunológico da mucosa (Lamont et al., 2019).

Encontra-se bem estabelecido que, embora o sistema imunológico da mucosa e sistêmico coexistam, o sistema da mucosa atua separadamente do sistema imunológico sistêmico. Desta forma, uma resposta imune sistêmica induzida por imunização parental não resulta em imunidade mucosa significativa. No entanto, a imunização da mucosa pode e muitas vezes resulta em imunidade protetora da mucosa, bem como imunidade no compartimento sistêmico (Lamont et al., 2019).

As respostas imunológicas locais emanadas da glândula salivar fazem parte do sistema imunológico da mucosa, enquanto as respostas imunológicas emanadas da fenda de flu-

ído crevicular fazem parte do sistema imunológico sistêmico. Assim, embora o principal isótipo de anticorpo da cavidade oral seja a SIgA, está claro que a imunoglobulina G (IgG) de origem sistêmica no sulco gengival também é biologicamente ativa na cavidade oral. Por conseguinte, a proteção eficaz contra a cárie dentária, requer respostas de anticorpos da mucosa e sistêmica (Kurita-Ochiai et al., 2019).

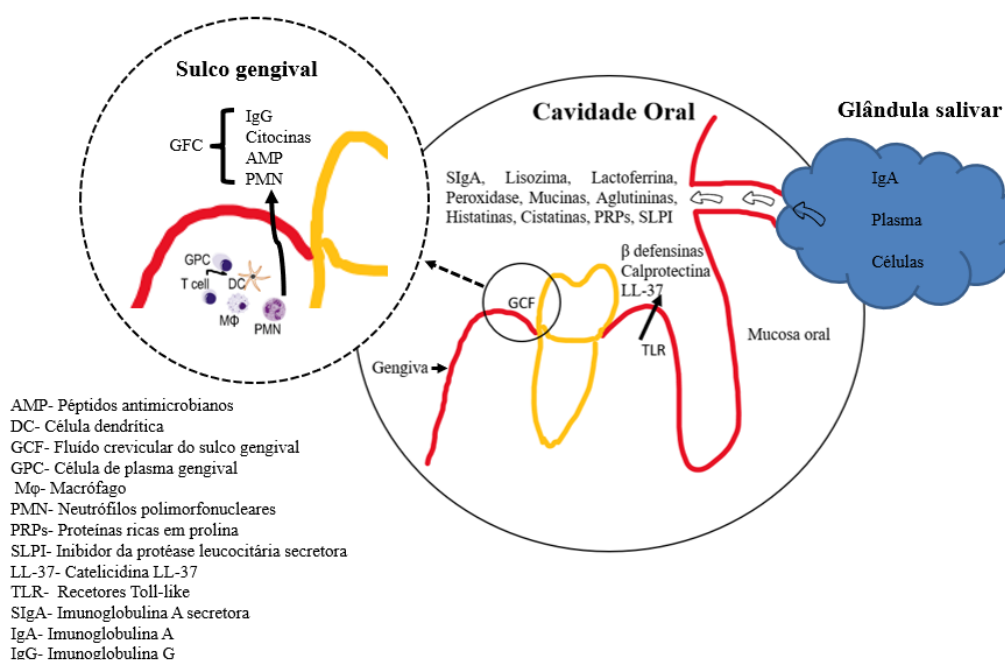


Figura 5- Mecanismos de defesa da cavidade oral (Aptado de Lamont et al., 2019).

As concentrações de IgG, IgA e IgM na saliva humana são 14, 194 e 2μg/ml, respetivamente, o que indica que a SIgA é quantitativamente a imunoglobulina que se apresenta em maior quantidade na cavidade oral (Yan, 2013).

A SIgA é o principal componente imunológico que entra na cavidade oral através das secreções salivares das glândulas *major* e *minor*, sendo o principal agente (mediador humoral) da imunidade adquirida no meio salivar da mucosa oral (figura 5) (Yan, 2013).

Diversos anticorpos que atuam em diferentes organismos, encontram-se naturalmente presentes na cavidade oral. Desta forma, tal como anteriormente referido, o principal anticorpo da cavidade oral é a SIgA, nos humanos, a grande maioria destes anticorpos são isotipos IgA com cerca de 60% e 40% de distribuição de IgA1 e IgA2 respetivamente. No entanto, também se encontram presentes na saliva em quantidades variáveis, IgM e IgG dependendo, em alguns casos, da composição imunológica do indivíduo e/ou doença oral existente (Jalewa & Pandey, 2017; Kurita-Ochiai et al., 2020).

3.1. Indução de anticorpos SIgA na saliva

A produção de anticorpos SIgA na saliva é iniciada em locais indutores especializados do sistema imunológico da mucosa. No que diz respeito às glândulas salivares, os locais indutivos mais relevantes são o anel de *Waldeyer* (adenóides, amígdalas, tecido linfóide associado à mucosa-MALT), o tecido linfóide nasal-NALT e, as placas de *Peyer* no intestino delgado (tecido linfóide associado ao intestino-GALT). Nestes locais existem ao nível da mucosa células epiteliais especializadas capazes de captar os antígenos microbianos e transportá-los por um mecanismo de transcitose para as células apresentadoras de antígenos (APCs). Após o processamento intracelular dos antígenos microbianos, as APCs secretam péptidos antigénicos, fornecendo sinais coestimuladores para antígenos específicos das células T, que assim são ativadas. Por conseguinte, essas células T ao serem sensibilizadas vão ativar as células B. As células B, nas glândulas salivares ao serem estimuladas, diferenciam-se em células plasmáticas que vão secretar anticorpos SIgA na cavidade oral. Estas, juntamente com as células T, migram através dos vasos linfáticos, entram na circulação e alojam-se em locais efetores da mucosa como as glândulas salivares (figura 6) (Abraham et al., 2018; Lamont et al., 2019 McComb et al., 2019).

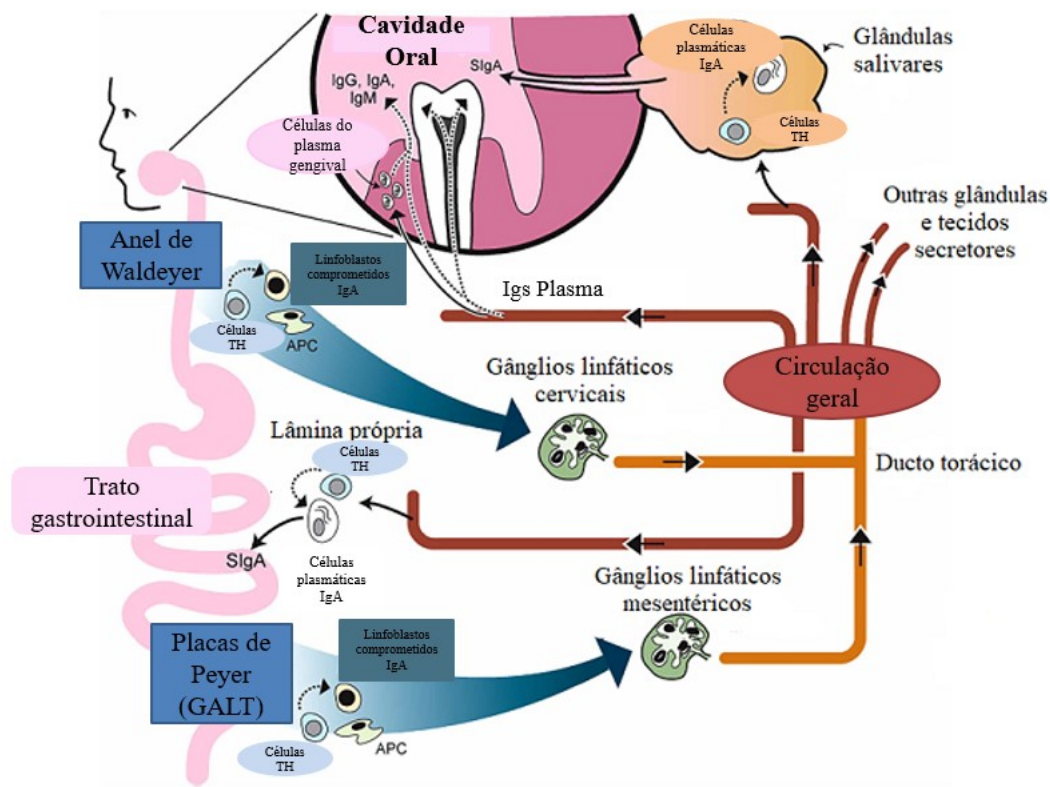


Figura 6- Sistema imunológico da mucosa de uma perspectiva oral (Adaptado de Lamont et al., 2019).

As glândulas salivares secretam mucinas e outros fatores antimicrobianos inatos que protegem as superfícies da mucosa e dos dentes. Estas glândulas constituem um local efetor da mucosa, onde as células B se diferenciam em plasmócitos secretores de IgAs poliméricas. A IgA é secretada na saliva na forma de IgA secretora (SIgA). As células T e B do fluido crevicular gengival e do tecido conjuntivo gengival são estimuladas pelos antígenos existentes na placa bacteriana, ocasionando a produção de inúmeras citocinas (moléculas que atuam sinergicamente, bloqueando a migração dos macrófagos e fixando-os no foco infeccioso) (figura 7) (Pacheco, 2007; Lamont et al., 2019).

As células B diferenciam-se em plasmócitos (células produtoras de anticorpos) que secretam sobretudo IgG mas também IgM ou IgA monomérica. Estas, assim como as imunoglobulinas derivadas da circulação, podem transitar para o sulco gengival. Ocorre aumento de IgG específica contra *S. mutans* no fluido crevicular, que facilita a opsonização, fagocitose, destruição das bactérias pelos granulócitos polimorfonucleares, neutrófilos e macrófagos, e retardamento da progressão da colonização bacteriana (figura 7) (Pacheco, 2007; Lamont et al., 2019).

Os recetores *tool-like receptors* (TLR) encontram-se expressos no epitélio gengival e, em resposta ao desafio bacteriano, induzem a produção de péptidos antimicrobianos (calprotectina, defensinas beta). Os péptidos antimicrobianos e citocinas também são produzidos por leucócitos presentes no tecido conjuntivo gengival, no epitélio juncional ou no sulco gengival, onde os leucócitos são recrutados quimiotaticamente. No sulco gengival podemos também encontrar o sistema do complemento funcional, que é ativado por bactérias subgengivais ou complexos antígeno-anticorpo (figura 7) (Lamont et al., 2019; Marshall et al., 2018).

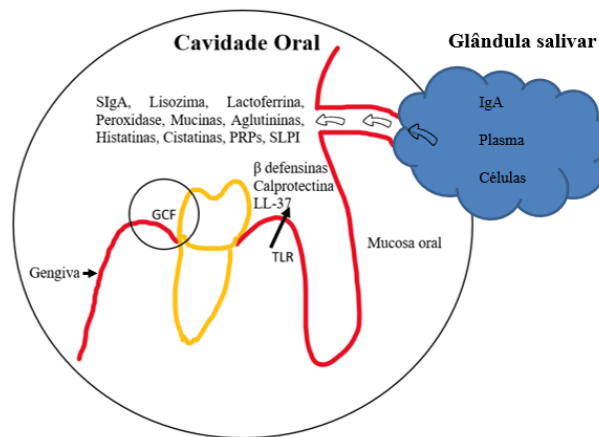


Figura 7- Indução de anticorpos IgA na cavidade oral (Adaptado de Lamont et al., 2019).

3.2. Atividades biológicas de anticorpos SIgA

Os componentes do sistema imunológico oral incluem as glândulas salivares e secreções mucosas, que contêm anticorpos denominados por imunoglobulina A secretora (SIgA). Esta imunoglobulina pode sobreviver em ambientes hostis, tais como o trato digestivo e as vias respiratórias. A SIgA protege todo o corpo contra diversos microrganismos invasores (Yan, 2013).

A SIgA, é um tipo de anticorpo que atua essencialmente no sistema imunológico da mucosa e serve como primeira linha de defesa na proteção da cavidade oral e do trato respiratório superior. Como os plasmócitos nas glândulas salivares produzem SIgA, há uma grande quantidade de SIgA presente na saliva (Matsuzaki et al., 2020).

Por meio das secreções salivares, a SIgA reveste e protege os dentes contra bactérias cariogênicas. Embora o anticorpo SIgA esteja ausente, tanto na saliva como noutras secreções no nascimento, é a principal imunoglobulina secretada a partir do primeiro mês de vida. As crianças entre os 12 e os 24 meses sintetizam principalmente anticorpos séricos para antígenos de *S. mutans*, apresentando geralmente concentrações mais altas de SIgA salivar do que as tidas no primeiro ano de vida, isto porque é nesta altura que estas bactérias começam a acumular-se na superfície dos dentes (Smith & Mattos-Graner, 2008; Yan, 2013).

SIgA é uma imunoglobulina relativamente estável que pode manter a sua atividade de anticorpo por muito tempo no ambiente proteolítico da cavidade oral. A principal função de defesa da SIgA envolve a exclusão imunológica de antígenos solúveis e particulados, que é um mecanismo eficaz para proteger as superfícies da mucosa. Ao ligar-se e bloquear as adesinas microbianas, os anticorpos SIgA podem inibir a colonização microbiana e, além disso, podem neutralizar a ação de enzimas ou toxinas microbianas. Para essas funções de defesa, os anticorpos SIgA são consideravelmente mais eficientes do que anticorpos monoméricos, como IgG (Lamont et al., 2019).

O sistema imunológico oral passa por um rápido desenvolvimento. SIgA está ausente na saliva dos recém-nascidos, no entanto, a sua secreção ocorre por volta do primeiro mês de vida, ou seja, os seus níveis emergem rapidamente no período pós-natal e por volta de 1 a 2 anos de idade, atingindo os níveis de adultos aos 4-7 anos. Algumas semanas após a exposição inicial a *S. mutans*, é secretada sIgA na mucosa oral. A saliva das crianças contém os isótopos IgM e IgA1 no primeiro mês de vida. Posteriormente evidencia-se uma distribuição de anticorpos salivares semelhante à do adulto, nomeadamente das subclasses IgA1 e IgA2 (Lamont et al., 2019; Shanmugam et al., 2013).

Além da idade, existem outros fatores importantes que podem influenciar os níveis salivares de SIgA, incluindo a taxa de fluxo salivar, tabagismo, gravidez entre outros (Lamont et al., 2019).

3.3 Ação dos anticorpos SIgA na defesa da cárie- resposta protetora

Diversos estudos têm demonstrado que a exposição natural a *S. mutans* resulta numa resposta imunológica da mucosa a estes microrganismos (Yan, 2013).

Outras investigações relataram diferentes associações entre os níveis de anticorpo IgA para *S. mutans* e a ocorrência de cárie dentária. Embora os anticorpos SIgA exerçam importantes funções de defesa, os resultados dos estudos que tentaram correlacionar os níveis de anticorpos SIgA com a cárie dentária não foram conclusivos. Na verdade, os níveis de anticorpos SIgA para *S. mutans*, são correlacionados de forma variada positiva ou negativamente com a experiência anterior de cárie dentária. Portanto, os resultados podem ser interpretados de maneiras diferentes para sugerir que os anticorpos podem conferir proteção ou, inversamente, que os anticorpos simplesmente refletem a exposição anterior a *S. mutans* (Lamont et al., 2019). As diversas conclusões desses estudos refletem a complexidade da resposta imune à exposição natural a *S. mutans* em diferentes indivíduos (Smith & Mattos-Graner, 2008).

No entanto, a aplicação na mucosa de vacinas contra cárie em roedores induz respostas de anticorpos SIgA protetores que suprimem a colonização das superfícies dentárias por *S. mutans* inoculados oralmente, bem como a formação de lesões de cárie, mesmo em animais alimentados com uma dieta rica em sacarose. Além disso, os anticorpos SIgA humanos inibem a aderência de *S. mutans* a modelos das superfícies dentárias revestidas com película salivar (Lamont et al., 2019).

Além das imunoglobulinas secretoras, a saliva também pode conter IgA e IgG monomérica, que entram na cavidade oral através do fluido crevicular do sulco gengival (GCF). Os anticorpos IgG derivados de GCF podem ser protetores contra cáries através da opsonização de *S. mutans* com subsequente fagocitose (Pacheco, 2007; Lamont et al., 2019).

Como os *S. mutans* são geralmente endógenos, presentes na cavidade oral em diferentes quantidades em todos os indivíduos, e sendo que a cárie dentária pode ocorrer em qualquer momento ao longo da vida, é difícil avaliar a eficácia da proteção conferida pelos anticorpos SIgA salivares resultantes da indução de produção por exposição natural a *S. mutans*. Assim, não está completamente esclarecido se a sIgA disponível naturalmente

contra *S. mutans* se associa a proteção contra cárie dentária em humanos. A secreção natural de SIgA contra *S. mutans* pode não ser suficientemente robusta para fornecer efeito protetor contra a adesão e colonização de *S. mutans* e até mesmo as seguintes cáries dentárias (Yan, 2013).

4. Vacinação/ Imunização contra a cárie dentária

A OMS reconheceu a cárie dentária, o cancro e as doenças cardiovasculares como as três principais doenças que requerem emergentes medidas preventivas e tratamentos efetivos. Assim, as evidências atuais, sustentam o facto de as estratégias tradicionais de prevenção e tratamento se apresentarem como insuficientes para uma eficiente redução da prevalência de lesão de cárie dentária (Bai et al., 2019).

Dado que a cárie dentária é multifatorial e ocorre como resultado da atividade de microrganismos de uma microbiota oral comensal normal, o desenvolvimento de uma vacina contra esta doença apresenta um alto nível de complexidade. Para além disso, como a cárie dentária não se trata de uma doença fatal evitável, o desenvolvimento de uma vacina para esta patologia exige que o antígeno apresente extrema eficácia e não cause efeitos adversos (Surya et al., 2018).

A alta taxa de prevalência de cárie dentária em todo o mundo, tanto na população jovem como na população adulta, sustenta a necessidade urgente de construção e disponibilização de uma vacina anticárie. A vacinação contra cáries dentárias é uma abordagem programada e planeada para pré imunizar e proteger indivíduos com tendência para a doença, principalmente crianças, usando proteínas presentes na flora oral, devendo induzir uma resposta imunológica, que pode impedir a colonização da superfície do dente e, assim, prevenir a cárie dentária (Jalewa & Pandey, 2017).

O desenvolvimento de uma vacina anticárie eficaz tem-se assumido urgente, pois considera-se a forte possibilidade de se assumir como a melhor estratégia de prevenção de lesão de cárie (Bao et al., 2015; Chhabra & Rajpal, 2016).

No final da década de 40 do século XX, a cárie dentária foi considerada como uma doença infecciosa e transmissível (Philip et al., 2018).

A vacina anticárie é esperada desde o início dos anos cinquenta do século XX. Contudo, apesar de décadas de investigação, atualmente ainda não há vacina comercialmente disponível (Patel, 2019).

O reconhecimento de que a cárie dentária humana é uma doença infecciosa e transmissível, juntamente com a compreensão dos sinais de colonização e o crescimento de estirpes estreptocócicas cariogénicas em biofilmes orais é importante para a construção de uma forma aprimorada de eliminação ou inativação da atividade cariogénica de bactérias nocivas, ou seja, introdução de uma vacina (Bowen, 2015; Jalewa & Pandey, 2017; Mafla et al., 2018).

A tomada de consciência de que *S. mutans* é o microrganismo predominante na etiologia e patogénese da cárie dentária, dado ser responsável pela formação da placa bacteriana na superfície do dente que, por sua vez, ocasiona o desenvolvimento de lesão de cárie dentária forneceu a base para estudos direcionados para o desenvolvimento de regimes de imunização que afetariam a imunidade contra a cárie (Arora et al., 2018; Bai et al., 2019; Jalewa & Pandey, 2017).

A primeira evidência de que a imunidade contra a cárie poderia ser induzida pela imunização com antígenos *S. mutans* surgiu há mais de uma década, ou seja, o raciocínio é que a imunização com *S. mutans*, deve induzir uma resposta imunológica, o que pode impedir o organismo de colonizar a superfície do dente e, assim, prevenir a cárie. A cárie dentária, ocorre nas superfícies dos dentes, encontram-se cobertas por secreções, nas quais o principal isótipo de imunoglobulina presente é a SIgA. Desta forma, acredita-se que os procedimentos requeridos para a imunização devem resultar na indução de produção de anticorpos SIgA salivares, dado serem provavelmente os meios mais eficazes para causar imunidade contra a cárie (Arora et al., 2018; Chen et al., 2013; Malavika et al., 2016).

A proteção contra a cárie dentária pode ser alcançada experimentalmente pela eliciação de IgA salivar direcionada a antígenos de *S. mutans* (Yang, et al., 2019).

A demonstração inicial em modelos animais experimentais de que anticorpos IgA salivares para *S. mutans* foram capazes de proteger contra a formação de cárie, levou a estudos que visam determinar os mecanismos imunológicos envolvidos na indução e re-

gulação das respostas de anticorpos IgA salivares e nas propriedades de uma vacina que seria eficaz na indução da imunidade à cárie e ainda assim seria segura para uso em humanos (Arora et al., 2018).

Todos estes progressos fomentam o interesse, cada vez maior, na minimização do impacto da lesão de cárie através da produção de uma vacina, como medida de saúde pública crucial, vacina esta com efeito terapêutico que represente uma forma complementar e económica de curar/erradicar a cárie no futuro (Bao et al., 2015).

As vacinas são substâncias imunobiológicas, introduzidas no corpo, projetadas para induzir o sistema imunitário a adquirir proteção específica contra determinadas doenças, estimulando a produção de anticorpos protetores e mecanismos imunológicos. Estas são preparadas a partir de organismos vivos modificados; organismos inativos ou mortos; toxóides; frações celulares ou até mesmo das suas combinações. Administradas para prevenir o desenvolvimento de uma doença infecciosa e o adoecimento da pessoa (Abraham et al., 2018; Arora et al., 2018; Gupta & Mankel, 2020; Jalewa & Pandey, 2017; Malavika et al., 2016; Marshall et al., 2018; Surya et al., 2018).

As vacinas foram desenvolvidas para combater várias crises de saúde pública em todo o mundo (Jalewa & Pandey, 2017). Diversos programas de imunização levaram à eliminação e/ou controlo de várias doenças infecciosas: varíola, poliomielite, sarampo, parotidite epidémica, rubéola, doença por *Haemophilus influenza* tipo B, pertússis, tétano e difteria (Yan, 2013).

A vacina anticárie ideal deveria ser capaz de a) eliminar os microrganismos da cavidade oral por agregação mediada por anticorpos após a colonização e acumulação de *S. mutans*, b) integrar múltiplos anticorpos específicos para bloquear os domínios de ligação ao glucano e c) inativar as enzimas GTF responsáveis pela formação de glucano e assim garantir o aumento da atividade antimicrobiana por sinergismo (Jalewa & Pandey, 2017).

Dado que a cárie dentária geralmente se desenvolve lentamente e pode ocorrer e/ou persistir ao longo da vida, parece evidente a pertinência de antecipação de proteção imunológica de forma precedente à colonização inicial, bem como conferisse uma proteção imunológica duradoura. Assim, a duração e a memória anamnética das respostas

de anticorpos salivares são fatores importantes (Bao et al., 2015; Philip et al., 2018; Shah et al., 2018).

A colonização na cavidade oral por *S. mutans* ocorre no início da vida, principalmente durante o período habitualmente designado por "janela de infeciosidade" (após o início da erupção da dentição decídua), vários estudos têm demonstrado que o momento da detecção inicial de *S. mutans* varia entre os 7 e os 36 meses, relacionado com o período de tempo que coincide com a erupção dos dentes decíduos, pelo que será mais pertinente e necessário imunizar bebés ou crianças antes da colonização inicial com *S. mutans* (Ghazal et al., 2018; Jalewa & Pandey, 2017).

Se a colonização bacteriana do biofilme dentário estiver completa após a erupção de todos os dentes decíduos, e se for possível, através da imunização, prevenir a colonização de *S. mutans* anteriormente a este período, o benefício da imunização precoce pode alargar-se até que os dentes definitivos comecem a surgir na cavidade oral, expondo novas condições ecológicas (Chhabra & Rajpal, 2016).

Embora a cárie dentária tenha atraído uma crescente atenção nas últimas décadas, apenas uma pequena parte desse interesse, nomeadamente no que concerne à sua prevenção tem merecido o devido investimento financeiro (Yan et al., 2013). Assim, aspetos determinantes para a concretização da emergente necessidade de produção de conhecimento nesta área se afluam na tentativa de despertar o interesse de entidades financiadoras e de especialistas em saúde pública (Patel, 2019).

Os dados existentes sugerem que a vacina anticárie pode ajudar a melhorar a saúde oral e o controlo da cárie dentária em termos de saúde pública (Yang, et al., 2019).

Parece certo que a vacinação é uma estratégia imperiosa a concretizar para uma proteção efetiva contra a cárie dentária, nomeadamente as lesões em decorrência de infeções por *S. mutans* (Bai et al., 2019). A pretensão de construção de uma vacina anticárie tem ganho terreno dada a natureza transmissível e infecciosa da cárie dentária (Jalewa & Pandey, 2017). Há uma forte probabilidade de a vacina contra *S. mutans* ser a estratégia mais eficaz na prevenção da ocorrência de lesão de cárie dentária (Bai et al., 2019). Estas vacinas pretendem atuar contra bactérias cariogénicas tais como o *S. mutans* e *Streptococcus sobrinus* (Patel, 2019).

4.1. Mecanismo de ação

A proteção da superfície dentária contra a cárie é conferida por dois mecanismos imunitários principais. Um utiliza a saliva e atua sobre o domínio salivar, o outro, envolve o fluido crevicular gengival e atua sobre o domínio gengival (figura 8) (Chhabra & Rajpal, 2016; Giasuddin et al., 2017).

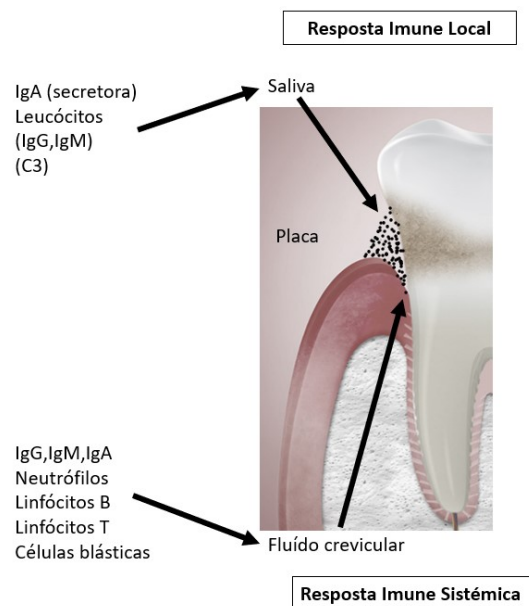


Figura 8- Fatores imunes na interface placa/dente/gengiva (Adaptado de Giasuddin et al., 2017).

A saliva contém 1% a 3% de anticorpos sobretudo IgA, o que faz deste o principal constituinte da imunoglobulina na saliva fornecendo defesa imunológica específica, no entanto, existe também a presença de anticorpos IgM e IgG. Estes três componentes são libertados no fluido do sulco gengival juntamente com outros agentes imunológicos celulares, tais como linfócitos, macrófagos e neutrófilos que também estão associados à resposta imunológica (Abraham et al., 2018; Chhabra & Rajpal, 2016; C. Gupta & Mankel, 2020).

Segundo Abraham et al. (2018), Chhabra e Rajpal (2016), Gupta e Mankel (2020) e Shah et al. (2018), os mecanismos de atividade de anticorpos IgA salivares contra *S. mutans* são os seguintes:

- A IgA salivar pode atuar como uma aglutinina específica interagindo com os receptores da superfície bacteriana e inibir a colonização e subsequente formação de cárie. Além disso, a IgA também pode inativar a GTF, levando à síntese reduzida de glucanos extracelulares e diminuição de formação de placa.
- A imunização direta do tecido linfóide associado ao intestino (GALT) pode causar a produção de IgA secretada pelas glândulas salivares, impedindo a adesão de *S. mutans* ao esmalte.
- Elementos celulares e humorais do sistema imunológico detetados nos sulcos gengivais podem exibir a sua atividade na superfície dentária. Após a imunização subcutânea com *S. mutans*, os macrófagos fagocitam e processam o antígeno.

4.2. Resposta imune

Quanto à resposta imune, esta encontra-se dividida em resposta primária e resposta secundária. No que diz respeito à resposta primária, quando um antígeno é administrado pela primeira vez a um animal ou humano, existe um período latente de indução de 3 a 10 dias antes do aparecimento de anticorpos no sangue. Após este período são desenvolvidos os anticorpos de primeira linha, sendo sobretudo do tipo IgM. Estes aumentam de forma constante nos 2-3 dias consecutivos, atingindo um nível máximo e, em seguida decrescem instantaneamente (quase tão rápido quanto se desenvolveram) assim que se desenvolvem. Em situações em que o estímulo do antígeno é suficiente, ocorre um aumento de anticorpos IgG que atingem um pico após 7 a 10 dias e o seu nível também vai diminuindo de forma lenta e gradual ao longo de um período de várias semanas ou meses. Um resultado importante do desafio antigénico primário, prende-se com a educação do sistema reticuloendotelial do corpo. As “células de memória” ou células inici-

adas, são produzidas por linfócitos B e T, sendo essas células responsáveis pela memória imunológica que se estabelece após a imunização (Arora et al., 2018; Gupta & Mankel, 2020).

Por sua vez, a resposta secundária ou resposta de reforço, difere da resposta primária. A resposta secundária, envolve um pico de produção de anticorpos IgM e IgG. É necessária a colaboração entre os linfócitos B e T para iniciar uma resposta secundária. Há uma produção breve dos anticorpos IgM que permanecem por um período de tempo transitório, e uma produção muito maior e mais prolongada dos anticorpos IgG que permanecem durante mais tempo (Arora et al., 2018; Gupta & Mankel, 2020).

A esta colaboração existente por parte da resposta primária e secundária dá-se o nome de resposta imunológica que juntamente com a memória imunológica são a base da vacinação e revacinação (Gupta & Mankel, 2020).

4.3. Determinantes antigénicos de *Streptococcus mutans*

Diversos estudos revelaram que vários dos componentes proteicos envolvidos na patogénese molecular dos *S. mutans* podem induzir imunidade protetora. Nos últimos 40 anos, foram desenvolvidas vacinas visando os antígenos de virulência presentes nos *S. mutans* e que têm ação anticariogénica, propriedades que são os principais constituintes para a preparação de vacinas (figura 9 e 10) (Kurita-Ochiai et al., 2019; Patel, 2019).

Na última década, as investigações focaram-se no estudo de antígenos de proteína – adesinas de superfície (como família antígeno proteico de superfície, Ag I/II ou PAc), enzima GTF e GBP – todas associadas à capacidade de virulência e de colonização da superfície do dente. Por tal, estas características assumem-se como componentes que podem ser utilizados como alvos eficazes para vacinas anticárie (Jalewa & Pandey, 2017; Shah et al., 2018). Como o *S. mutans* é o principal agente bacteriano da cárie dentária, os fatores de virulência que determinam a sua capacidade de aderência às superfícies dentárias são alvos importantes para uma intervenção preventiva de lesão de cárie dentária. A capacidade de aderência do *S. mutans* à superfície dentária é o primeiro passo e

um dos principais fatores determinantes na formação da placa bacteriana (figura 9 e 10) (Shah et al., 2018; Yesh et al., 2018).

Espera-se que estes candidatos a determinantes antigênicos da vacina, reduzam a formação de cáries por meio de SIgA específica de Ag na saliva e produção de IgG específica de Ag no fluido crevicular dos sulcos gengivais (figura 9 e 10) (Kurita-Ochiai et al., 2019).

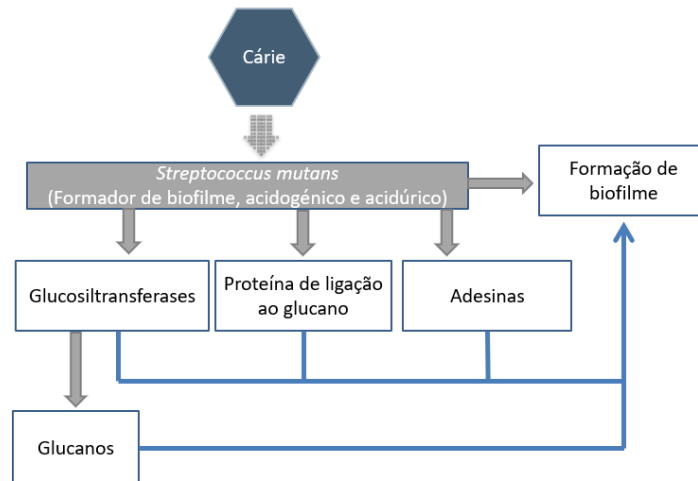


Figura 9- Fatores de virulência dos *S. mutans* e antígenos alvo para o desenvolvimento de vacinas (Adaptado de Patel, 2019).

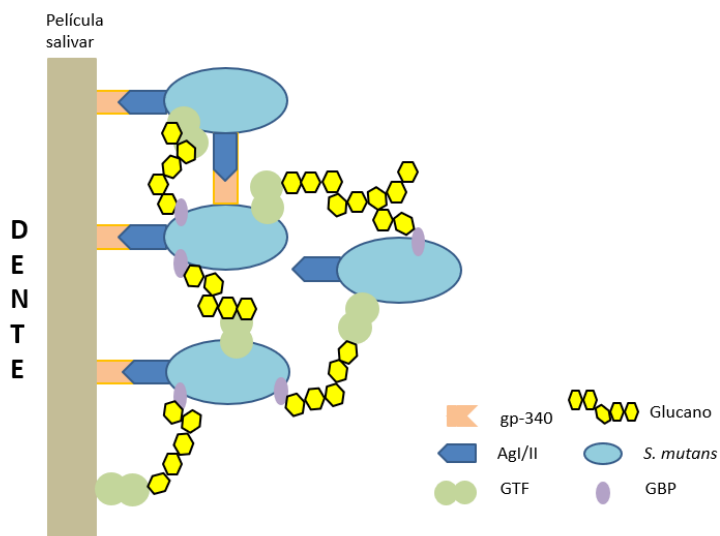


Figura 10- Determinantes antigênicos dos *S. mutans* (Adaptado de Lamont et al., 2019).

4.3.1. Adesinas

Adesinas são os principais componentes antigênicos de *S. mutans*. Os *S. mutans* produzem um antígeno de proteína de superfície celular, referido como antígeno de proteína de superfície de *S. mutans* serótipo c (PAc) também denominado antígeno I/II, P1 ou proteína B. Este antígeno foi apresentado como um fator de virulência chave para a adesão dentária por *S. mutans* (figura 9 e 10) (Jalewa & Pandey, 2017; Kurita-Ochiai et al., 2020).

A adesão de *S. mutans* à película salivar envolve uma proteína de superfície principal que representa um membro da família AgI/II de adesinas streptocócicas. Esta família de proteínas, possuem domínios multifuncionais que foram adaptados para se ligarem a receptores da película salivar, ou seja, é responsável em parte, pela adesão inicial à película salivar. Desempenhando assim, um papel fundamental no desenvolvimento de placa bacteriana que geralmente é iniciada pelos *S. colonizadores* primários (Lamont et al., 2019).

Os anticorpos que são direcionados à molécula Ag I/II, bloqueiam a adesão dos *S. mutans* da saliva revestida sobre a hidroxiapatite (Jalewa & Pandey, 2017). Bloquear ou inibir esta adesina da superfície celular por SIgA específica do antígeno na saliva é uma abordagem lógica para a prevenção da colonização inicial dos dentes por *S. mutans* (Kurita-Ochiai et al., 2020).

Estas cadeias polipeptídicas simples, contêm uma região de repetição em tandem rica em alanina no terço N-Terminal e uma região de repetição rica em prolina no centro da molécula que estão associadas aos domínios de ligação salivares (Chhabra & Rajpal, 2016).

Segundo Abraham et al. (2018), os antígenos I e II exibem uma atividade aumentada devido à prolina e alanina colocadas centralmente que estão localizadas no terço N-terminal. Estudos *in vitro* bem como *in vivo*, que usam variadas abordagens de imunização, indicam que o anticorpo com especificidade para adesinas dos *S. mutans*, pode interferir na adesão bacteriana e subsequentes cáries dentárias causadas por *S. mutans*.

4.3.2. Glucosiltransferases

Tal como anteriormente referido, a GTF é uma proteína com várias funções que funciona como enzima para catalisar a síntese de glucano solúvel em água e insolúvel em água a partir da sacarose (figura 9 e 10) (Arora et al., 2018; Luo et al., 2017).

Esta enzima cliva a ligação entre as porções de glicose e frutose na sacarose. A glicose ativada é então transferida para um polímero de glucano em crescimento. Os glucanos também se podem ligar a uma área de sequências repetidas no terço C-terminal da enzima. Essas áreas de função oferecem várias possibilidades para respostas imunológicas mais direcionadas (Arora et al., 2018).

S. mutans apresenta 3 (iso)formas de GTF (genes responsáveis pela síntese de glucano em *S. mutans*): Enzima sintetizadora de glucano insolúvel em água (GTF-I); Enzimas de síntese de glucanos insolúveis em água e solúveis em água (GTF-SI); Enzimas de síntese de glucano solúveis em água (GTF-S) cujos respetivos genes correspondentes/codificantes são GTF-B, GTF-C e GTF-D respetivamente encontram-se presentes em *S. mutans* (Abraham et al., 2018; Gupta & Mankel, 2020).

O crescimento de *S. mutans* na presença de anticorpos direcionados às GTFs, impede a atividade sintética das enzimas, diminuindo significativamente a quantidade de formação de biofilme nas superfícies (Abraham et al., 2018; Chhabra & Rajpal, 2016). Assim, a presença de anticorpo para GTF na cavidade oral, antes da infeção, pode influenciar significativamente o desfecho da doença, presumivelmente por interferência com uma ou mais das atividades funcionais da enzima (Arora et al., 2018; Malavika et al., 2016).

Desta forma, tal como esperado, os estudos de imunização que usaram vacinas com GTFs intactas demonstraram proteger com sucesso os animais infetados com *S. mutans*. As mutações nos genes GTF levaram os *S. mutans* a perderem a capacidade de produzir GTF impedindo a formação de doença (Chhabra & Rajpal, 2016).

Uma vez que as GTFs das duas principais espécies de *S. cariogénicos* em humanos- *S. mutans* e *Streptococcus sobrinus*- têm sequências muito semelhantes nesses domínios

funcionais, a imunização com a proteína GTF de uma espécie pode induzir uma medida de proteção para outras espécies (Chhabra & Rajpal, 2016).

4.3.3. Proteínas de ligação ao glucano

A capacidade dos *S. mutans* se ligarem aos glucanos é mediada, pelo menos em parte, por proteínas de ligação ao glucano associadas à parede celular (figura 9 e 10) (Malavika et al., 2016).

Existem 3 proteínas distintas com atividade de ligação ao glucano secretadas por *S. mutans*: GBP-A, GBP-B e GBP-C (Gupta & Mankel, 2020). Estas proteínas estão presentes na superfície do *S. mutans* e atuam como uma célula recetora para agregação mediada por glucano (Jalewa & Pandey, 2017).

Uma vez que as proteínas de ligação ao glucano (Gbp) estão presentes na superfície das células de *S. mutans*, podem fornecer recetores para a agregação mediada pelo glucano, fazendo com que estas proteínas tenham recebido atenção como potencial mecanismo de produção de vacinas. Até ao momento, apenas GBP-B mostrou induzir respostas imunes protetoras à cárie dentária experimental. Curiosamente a saliva de crianças geralmente contém anticorpos IgA para GBP-B, indicando que a infeção inicial com *S. mutans* pode levar à indução natural de imunidade a essa proteína. Métodos bioinformáticos de identificação de regiões moleculares responsáveis por esta imunogenicidade produziram pelo menos uma vacina de subunidade GbpB que foi eficaz em estudos *in vitro*. Ao contrário do GTF, no entanto, a proteção induzida por *S. mutans* GbpB não se estende a *Streptococcus sobrinus* (Arora et al., 2018).

4.3.4. Dextranases

Enzima produzida por *S. mutans*, quando usada como antigénio, evita a colonização de organismos na placa bacteriana inicial (Jalewa & Pandey, 2017).

5. Imunização

As estratégias possíveis de imunização da mucosa têm sido desenvolvidas no sentido de induzir o aumento do nível de anticorpos salivares, que pudessem persistir por períodos prolongados e garantir memória imunológica (Arora et al., 2018). Parece certo que a vacinação através das mucosas pode induzir tanto a memória IgA como células B de memória IgG (Lycke, 2012).

A imunização é uma abordagem que recorre a proteínas presentes na flora oral, os anticorpos para muitos microrganismos, incluindo *S. mutans*, estão naturalmente presentes na cavidade oral. Em humanos, a maioria desses anticorpos são isótipos IgA (Jalewa & Pandey, 2017).

Diversas investigações, tanto *in vitro* como *in vivo* e alguns ensaios clínicos em humanos, determinaram muitos aspetos pertinentes para a concretização do desenvolvimento de vacinas anticárie (Patel, 2019). Embora o princípio básico de proteção imunológica dentária contra cárie dentária causada por *S. mutans* tenha sido estabelecida em estudos *in vitro*, mantém-se a necessidade de apurar uma abordagem vacinal em humanos (Yan, 2013). As diferentes abordagens de imunização, tanto ativa como passiva, têm demonstrado sucesso em modelos animais e em ensaios clínicos humanos (Abraham et al., 2018; Jalewa & Pandey, 2017; Surya et al., 2018).

Várias investigações desenvolvidas em humanos (adultos) ainda que em pequena escala, têm demonstrado a possibilidade de aumentar o nível de anticorpos SIgA salivares para *S. mutans* e, em alguns casos, interferir na colonização dos mesmos através da vacinação. A possível justificação é que a imunização com *S. mutans* deve induzir uma resposta imune, o que pode impedir o organismo de colonizar a superfície do dente e, assim, prevenir a cárie dentária. Nos últimos anos, algumas vacinas promissoras foram desenvolvidas e testadas em animais (Malavika et al., 2016; Patel, 2019).

5.1 Imunização ativa

Este tipo de imunização é muito mais eficaz e durador devido ao envolvimento da resposta do hospedeiro. No desenvolvimento de uma vacina contra a cárie dentária, muitos estudos têm tido por base a imunização ativa usando antígenos alvo. As principais adesinas de superfície celular, como AgI/II (PAc ou P1) de *S. mutans* foram identificadas e caracterizadas. Estudos *in vitro* e *in vivo* têm mostrado que os anticorpos desenvolvidos contra estas adesinas impedem a adesão de *S. mutans* no dente revestido de saliva (Malavika et al., 2016; Patel, 2019).

As primeiras investigações sobre vacinação anticárie usavam células vivas de *S. mutans* como agentes imunogênicos. Contudo, e apesar de se ter obtido proteção contra a cárie dentária com estas vacinas, considerou-se a possibilidade de induzirem reações cruzadas no tecido cardíaco humano. Por tal, o foco de interesse no âmbito da vacinação anticárie direcionou-se para outras vacinas, tais como (e sobretudo): vacinas de subunidades, recombinantes e vacinas de ácido desoxirribonucleico (DNA) (Madhumitha et al., 2019; Marsh et al., 2009).

A imunização ativa tem a vantagem de induzir a produção endógena de anticorpos salivares e o estabelecimento da memória imunológica, mas requer o compromisso de realizar ensaios necessários em humanos para estabelecer a eficácia e segurança (Arora et al., 2018).

Muitos estudos sobre imunização ativa têm demonstrado o importante papel anticárie da SIgA (Gupta & Mankel, 2020). A SIgA impede a adesão dos microrganismos à superfície do dente, etapa inicial e fundamental do processo de colonização bacteriana (Bao et al., 2015; Patel, 2019).

5.1.1. Avanços na produção de vacina contra a cárie

Nas últimas décadas, novas abordagens conduziram ao desenvolvimento de vários tipos de vacinas, através de diferentes vias de imunização, com o objetivo de induzir altos ní-

veis de anticorpos salivares que possam persistir por períodos prolongados (Jalewa & Pandey, 2017).

5.1.1.1. Vacinas de subunidade

Como referido anteriormente, tem sido comprovado que a utilização de células bacterianas inteiras *Streptococcus* pode induzir anticorpos reativos ao coração, devido aos quais a formulação de vacinas de subunidade para prevenção e controle da cárie dentária têm sido o ponto crucial para imensas pesquisas (Gupta & Mankel, 2020; Madhumitha et al., 2019).

Neste tipo de vacinas, um antígeno de uma proteína particular do organismo é usado como antígeno. Proteínas antigénicas de um organismo causador de doença diferente também podem ser unidas por forma a que estas vacinas possam ser projetadas para induzir imunidade a mais do que uma infeção (Surya et al., 2018).

Foram estudadas e construídas vacinas de subunidade, ou seja, vacinas que contêm os elementos estruturais da família das adesinas/ a parte funcional do genoma responsável pela produção de Ag I/II ou GTFs ou GBP. Este tipo de vacinas, apresentam cópias únicas ou múltiplas de epítomos funcionais associados a qualquer uma das proteínas de virulência (monoméricas) ou em combinações (diméricas). As vacinas de subunidade podem ter como alvo múltiplas propriedades de virulência, as mesmas, aumentaram a produção de anticorpos desejados e eliminaram algumas das respostas imunes indesejadas (Patel, 2019).

As vacinas de subunidades podem ser constituídas por múltiplos epítomos que têm como objetivo atuar em diferentes funções do mesmo componente, por exemplo, atividade catalítica e atividade de ligação a glucano de GTF ou em funções de diferentes componentes, por exemplo, ligações salivares de Ag I/II e atividade catalítica de GTF (Kaur et al., 2014). Tal possibilidade permite que se eliminem regiões que podem induzir a produção de anticorpos que não são desejados (Jalewa & Pandey, 2017).

Investigações recentes tentaram otimizar as respostas imunes a epítomos funcionais associados ao catalisador de processo de ligação salivar, atividades de ligação de glucano

cuja construção contém uma única ou várias cópias de epítomos desses domínios (Jalewa & Pandey, 2017).

Estas vacinas são muito seguras pois não apresentam o DNA do agente patogénico (Miranda, et al., 2001).

5.1.1.1.1. Vacinas de péptidos sintéticos

As vacinas de péptidos sintéticos são construídas com antígenos alvo da região funcional produzidos sinteticamente. A imunização subcutânea com um péptido sintético derivado da região rica em alanina de Ag I/II de *S. mutans*, induziu um alto nível de anticorpos IgG. As proteínas de fusão que contêm a região rica em alanina de ligação à saliva (PAcA) de adesina PAc com o domínio de ligação do glucano (GB) de GTF-I, uma enzima que catalisa a síntese de glucano insolúvel em água a partir de sacarose, também inibiu a adesão dependente da sacarose de *S. mutans* a uma superfície de hidroxiapatite (Patel, 2019).

A abordagem vacinal através de péptidos sintéticos tem sido inovadora ao demonstrar uma região imunogénica (região de repetição rica em alanina de Ag I/II) e potencial para indução de imunidade protetora. Os péptidos sintéticos fornecem anticorpos não apenas no fluido crevicular, mas também na saliva. O péptido sintético utilizado é derivado da enzima GTF (Giasuddin et al., 2017; Jalewa & Pandey, 2017).

As vacinas de subunidade eficazes, foram concebidas usando péptidos sintéticos ou proteínas recombinantes para dirigir a resposta imunitária aos domínios da função de ligação salivar (Arora et al., 2018).

A conjugação de péptidos funcionais associados a outras proteínas de vacinas tem resultado no aumento da imunidade conferida pelo péptido e inibido a formação de cárie (Malavika et al., 2016).

5.1.1.1.2. Vacinas conjugadas

No final da década de 80, foi descoberto que as limitações das vacinas poderiam ser ultrapassadas através de um processo designado por conjugação (Jalewa & Pandey, 2017). Assim, outra estratégia que pode interferir a vários níveis da patogénese molecular de *S. mutans* é a conjugação química de polissacáridos bacterianos com proteínas (Malavika et al., 2016).

Além da importância da inclusão de vários alvos de atuação na vacina, a conjugação do polissacárido com a proteína aumenta a imunogenicidade e conduz à produção de anticorpos e de células de memória (Chatterjee, 2018; Kaur et al., 2014). As vacinas conjugadas são ainda promissoras no campo da vacinação anticárie pois podem intercetar mais do que uma propriedade virulenta do *S. mutans* (Jalewa & Pandey, 2017).

5.1.1.2. Vacinas recombinantes

As vacinas recombinantes são preparadas isolando o genoma funcional responsável pelos antígenos alvo e ligando-os a vetores. Este vetor mutante recombinante produziria as respetivas proteínas ou, na aplicação, desencadearia uma resposta imune (Patel, 2019).

A abordagem recombinante, aplicada no desenvolvimento de péptidos sintéticos direcionados à produção de vacina contra a cárie, permite proporcionar a expressão de porções maiores de domínios funcionais do que as que podem ser acomodados pelos péptidos sintéticos (Chatterjee, 2018; Mehta et al., 2015).

5.1.1.3. Vacinas de DNA

Recentemente, tem sido dada atenção considerável ao desenvolvimento de vacinas de DNA, este tipo de vacinas fornece uma estratégia promissora para induzir imunidade específica e protetora para eliminar bactérias cariogénicas. As vacinas de DNA anti-

cárie demonstraram a capacidade de inibir a infecção por *S. mutans* e proteger o hospedeiro contra a cárie (Luo et al., 2017).

A vacinação com DNA é uma nova estratégia de imunização contra doenças infecciosas dentárias. Estas vacinas tornaram-se a tendência na pesquisa de vacinas contra a cárie dentária uma vez que apresentam vantagens sobre as vacinas tradicionais, como fácil preparação e administração, respostas imunes celulares e humorais de longa duração, têm baixo custo, são relativamente seguras em comparação com as vacinas virais atenuadas, a expressão da proteína antigénica é estável com antigenicidade mais forte, para além de se apresentarem flexíveis para integrar genes que codificam antígenos e sequências imunoestimulatórias (Luo et al., 2017; Patel, 2019).

A sequência genética de alguns microrganismos orais, como o *S. mutans*, possibilitou o conhecimento das regiões mais importantes dos principais antígenos que podem induzir uma resposta imune adequada. Para este fim, têm vindo a ser aplicadas técnicas de genética molecular na construção de moléculas híbridas. Assim, têm sido desenvolvidas novas formas de apresentação desses imunogénios, incluindo vacinas de DNA, nas quais um gene específico é injetado e o seu produto é gerado no próprio organismo. O DNA de *S. mutans*, utilizado para o desenvolvimento deste tipo de vacina é extraído por lise mecânica ou química, e o seu material genético, está no gene codificador da proteína antigénica, que será utilizada para imunização. A resposta imune induzida por vacinas de DNA é iniciada com a ativação de células apresentadoras de antígenos, estas desempenham um papel crucial na indução dessa resposta (Surya et al., 2018).

A vacina de DNA anticárie induz a produção de anticorpos SIgA específicos que podem prevenir a cárie dentária, pela inibição da aderência de *S. mutans* à superfície dentária e a formação de biofilme, reduzindo assim a incidência de cárie dentária (Huang et al., 2013). A intensidade da resposta imunitária induzida pela vacina anticárie de DNA está estreitamente associada ao nível de expressão dos antígenos clonados disponíveis para as células apresentadoras de antígeno (Jiang et al., 2017).

A frequência, o intervalo de tempo e as doses das vacinas de DNA anticárie devem ser estritamente controladas de forma a evitar a imunotolerância. Devem ainda ser considerados os potenciais efeitos colaterais destas vacinas (Luo et al., 2017).

A vacinação com DNA anticárie evoca uma forte resposta imune humoral e celular contra antígenos associados a *S. mutans* e apresenta baixa imunogenicidade devido à baixa eficiência de captação (Luo et al., 2017; Mukherjee, 2017).

Assim, as vacinas de DNA são promissoras na prevenção da cárie dentária. No entanto, os desafios permanecem devido à baixa imunogenicidade destas vacinas e a grande dosagem de DNA plasmidial necessário para a imunização. Alguns dos mais recentes e importantes desenvolvimentos no campo da vacinação anticárie passam por avanços na construção de vacina de fusão de DNA anticárie: a codificação dos dois domínios antígenicos mais importantes de *S. mutans* demonstrou sucesso na redução dos níveis de cárie dentária em animais, no entanto, a proteção conferida contra *Streptococcus sobrinus* demonstrou-se fraca (Jalewa & Pandey, 2017; Kurita-Ochiai et al., 2020; Shi et al., 2012).

A proteína flagelina recombinante derivada de *Salmonella* pode aumentar as respostas IgA específicas na saliva e a capacidade protetora de pGJA-P/VAX, apresentando-se como um candidato a adjuvante mucoso eficaz para a imunização intranasal de uma vacina de DNA anticárie (Jiang et al., 2017; Shi et al., 2012). A vacina de DNA anticárie administrada por via intranasal com a proteína flagelina recombinante como um adjuvante da mucosa aumentou a resposta de IgA salivar e conferiu melhor proteção contra a cárie dentária. No entanto, a imunogenicidade relativamente fraca das vacinas de DNA e a necessidade de uma grande quantidade de antígenos permanecem desafios significativos. A estratégia de fusão de flagelina e PAc é promissora para o desenvolvimento de vacinas anticárie, e a proteína recombinante KF-rPAc poderá ser usada como vacina anticárie administrada em mucosa (Sun, et al., 2012). As nanopartículas otimizadas assumem-se como uma estratégia auspiciosa para permitir que as vacinas de DNA cruzem várias barreiras fisiológicas, e assim, induzir uma imunidade específica e protetora da mucosa por meio da administração intranasal (Chen et al., 2013).

5.2. Imunização passiva

Uma abordagem alternativa de desenvolver anticorpos contra a cárie dentária é através da administração passiva do anticorpo via oral. A administração passiva de anticorpos

tem sido analisada como possibilidade para a vacinação anticárie (Arora et al., 2018). Neste tipo de imunização, são administrados anticorpos que circulam no corpo e conferem proteção específica (Patel, 2019).

Estudos sugeriram que anticorpos passivamente dirigidos contra um determinante antigénico essencial da superfície celular de *S. mutans* (AgI/II), podem suprimir a colonização oral com *S. mutans*, o que previne a aderência de *S. mutans* à película adquirida na superfície do dente, ocasionando diminuição da placa bacteriana e das lesões cariogénicas (Gupta & Mankel, 2020; Malavika et al., 2016).

Segundo Arora et al. (2018), trata-se de uma abordagem vantajosa dado que os riscos da imunização ativa podem ser superados. A administração passiva de anticorpos exógenos pré formados oferece a vantagem de evitar riscos, embora pequenos, inerentes a qualquer procedimento de imunização ativa. No entanto, na ausência de qualquer resposta ativa por parte do recetor, o seu efeito mantém-se apenas durante algumas horas a 3 dias (tempo que os anticorpos administrados persistem em boca), dado que não é produzida memória imunológica, ou seja, a imunidade passiva é obtida apenas por um curto período de tempo.

Portanto, a necessidade de fornecer uma fonte contínua de anticorpos para manter a proteção por um tempo prolongado permanece um grande desafio dado que tem que existir uma vacinação repetida e as doses de reforço estão dependentes da adesão do paciente (Madhumitha et al., 2019).

As estratégias de imunização passiva incluem o desenvolvimento de anticorpos para antígenos *S. mutans*, compreendendo o uso de:

- Elixir bucal composto por leite bovino e soro de leite gerado a partir de vacas imunizadas (com uma vacina que contém *S. mutans* inteiros) para controle de *S. mutans* (Patel, 2019). Este leite reduz a cárie por conter anticorpos IgG policlonais (Yesh et al., 2018);
- Anticorpos de gema de ovo cuja redução da cárie foi observada devido à presença de células inteiras mortas com formalina e associações de células GTFs

que obteve sucesso com o declínio provisório da percentagem de *S. mutans* na saliva/placa dentária (Arora et al., 2018);

- Plantas transgênicas (plantas de tabaco geneticamente modificadas com conteúdo de nicotina), que podem produzir anticorpos monoclonais contra AgI/II impedindo a formação de biofilme em humanos e ainda através de tentativas no sentido de injetar péptidos em frutas que podem ser eficazes na proteção, diminuição do potencial de cárie dos *S. mutans*, e erradicação da doença (Bai et al., 2019; Malavika et al., 2016; Patel, 2019; Suyu et al., 2018; Yesh et al., 2018). Trata-se da primeira vacina derivada de plantas geneticamente modificadas, por ser insípida e incolor, pode ser aplicada diretamente nos dentes em vez de ser injetada (Giasuddin et al., 2017; Gupta & Mankel, 2020).

A imunização passiva é menos eficaz e requer grandes quantidades de aplicações repetidas, desta forma, a imunização ativa tornou-se o principal foco de pesquisa (Patel, 2019).

A criação de “vacinas comestíveis” pressupõe a introdução de genes desejados selecionados de plantas e, em seguida, induzir essas plantas transgênicas a fabricar proteínas codificadas. As “vacinas comestíveis”, à semelhança das vacinas de subunidades convencionais, são compostas por proteínas antigênicas e são desprovidas de genes patogênicos. Em consequência, não têm como estabelecer infecção, garantindo segurança, sobretudo em pacientes imunocomprometidos. Enquanto as vacinas de subunidades convencionais são caras, carecem de tecnologia, necessitam de purificação, requerem refrigeração e produzem uma resposta pobre da mucosa, as “vacinas comestíveis” aumentariam a adesão, em especial nas crianças, e devido à administração oral, passaria a ser dispensável equipas médicas para a sua administração. Este tipo de vacinas exibe boa estabilidade genética, são estáveis ao calor, não requerem manutenção no frio e podem ser armazenadas próximo do local de uso. A não exigência de seringas e agulhas diminui a possibilidade de infecção. O medo da contaminação com vírus animais seria eliminado uma vez que os vírus vegetais não infetam humanos (Surya et al., 2018).

6. Vias de administração da vacina

Diversos estudos verificam que a exposição do antígeno ao tecido linfóide associado à mucosa no intestino, local nasal, retal ou brônquico pode induzir respostas imunes não apenas no respectivo local/região de indução, mas também na periferia. Desta forma, surgiu a noção de um sistema imunológico comum da mucosa tendo, consequentemente, sido exploradas várias vias mucosas de administração da vacina, para induzir respostas imunes protetoras aos antígenos da vacina contra a cárie dentária (Abraham et al., 2018; Arora et al., 2018; Patel, 2019).

Tal como anteriormente referido, o principal constituinte imunológico das glândulas salivares *major* e *minor* é a IgA secretora salivar, que pode ser induzida pela aplicação na mucosa de uma vacina contra a cárie (Patel, 2019).

6.1. Via Oral

A administração da vacina por via oral tem sido investigada, variados estudos, basearam-se na indução oral de imunidade no tecido linfóide associado ao intestino (GALT) para induzir respostas de anticorpos IgA salivares protetoras. Nestes mesmos estudos, foram aplicados antígenos através de alimentação por via oral, intubação gástrica ou em vacina sob a forma de cápsulas ou lipossomas (Jalewa & Pandey, 2017; Yesh et al., 2018).

Após a realização de ensaios clínicos realizados em ratos, com administração em meio aquoso compreendendo *S. mutans* morto, observou-se um declínio significativa de cáries, relacionado com níveis elevados de anticorpos IgA salivares (Abraham et al., 2018).

Por outro lado, experiências realizadas em humanos, através da ingestão de *S. mutans* em cápsulas de gelatina resultaram num aumento de anticorpos SIgA na saliva, embora por um período de tempo limitado. A memória imunológica em resposta a SIgA é bastante limitada, e isso pode reduzir o valor da imunização oral. Experiências que utilizaram esta via de administração estabeleceram que a indução da imunidade da mucosa por

si só foi suficiente para alterar o curso da infecção por *S. mutans* e doenças em modelos animais e em humanos. Contudo, a administração via oral, não tem sido considerada a via ideal, uma vez que causou como efeitos adversos acidez estomacal (Arora et al., 2018; Jalewa & Pandey, 2017).

6.2. Via Intranasal

Em estudos recentes, realizaram-se tentativas no sentido de criar imunidade vigilante em diferentes locais da mucosa oral, ou seja, tentou-se induzir imunidade protetora em locais indutivos da mucosa que estão em relação anatômica mais próxima com a cavidade oral (Abraham et al., 2018). A aplicação de vacinas por via intranasal tem como alvo o tecido linfóide associado ao nariz (NALT) (Jalewa & Pandey, 2017).

Curiosamente, a mucosa nasal é um local interessante para a indução de resposta imunológica sistêmica e da mucosa oral. A mucosa nasal reúne características relevantes: acessibilidade, menor distribuição de enzimas em comparação com a via oral e densa população celular afeta ao sistema imunológico, frequentemente referida como tecido linfóide. Dada a proximidade anatômica com a cavidade oral e as propriedades que lhe conferem melhor conveniência para administração da vacina, a imunização intranasal é provavelmente a primeira escolha para a vacina contra a cárie (Chen et al., 2013; Surya et al., 2018).

A administração intranasal de antígenos, que têm como alvo o tecido linfóide associado ao nariz (NALT) tem sido amplamente adotada para a imunização de antígenos bacterianos associados à agregação/colonização de *S. mutans* porque entrega o antígeno diretamente aos locais indutores de IgA denominados (NALT) sem a influência de enzimas e ácidos do trato gastrointestinal (Arora et al., 2018; Kurita-Ochiai et al., 2020). Evitando a colonização e acumulação de microrganismos (Yesh et al., 2018).

Vários estudos atuais, demonstraram que a vacinação por via intranasal é eficaz para a estimulação de proteção específica do anticorpo IgA na mucosa e IgG sérica. Esta via de imunização da mucosa pode provocar respostas imunológicas específicas, e requer

uma dose muito menor de antígeno do que a via oral para a indução de resposta imunológica na mucosa oral e sistêmica (Yan, 2013).

Os métodos e avanços para a indução de anticorpos SIgA salivares anticárie específicos e aumento de anticorpos SIgA salivares anticárie específicos por imunização intranasal com um adjuvante mucoso eficaz têm sido descritos, nomeadamente por imunização intranasal com proteína de fusão flagelina-PAc (Yan, 2013).

6.3. Via Tonsilar

Na literatura foi descrito que a indução do antígeno através da via tonsilar, pode propagar resposta imune na cavidade oral (Abraham et al., 2018). O tecido tonsilar contém os elementos necessários para poder ativar as respostas secretoras de IgA, apesar da predominância de resposta de IgG ser dominante neste tecido. As amígdalas palatinas, e sobretudo, as nasofaríngeas, têm sido sugeridas como via interessante para indução de imunidade, pois fornecem células precursoras para locais efetores da mucosa, tais como as glândulas salivares (Arora et al., 2018; Jalewa & Pandey, 2017).

6.4. Via Glândulas salivares *minor*

As glândulas salivares *minor*, povoam os lábios, bochechas e palato mole. A resposta imunológica salivar, pode ter uma ótima resposta, através da indução da mucosa das glândulas salivares *minor*. Estas glândulas têm sido sugeridas como vias potenciais para a indução na mucosa de respostas imunes, devido aos seus ductos secretores curtos e largos que facilitam o acesso retrógrado de bactérias, dos seus produtos e toxinas e devido aos agregados de tecido do sistema linfático que costumam estar associados a esses ductos (Abraham et al., 2018; Arora et al., 2018; Jalewa & Pandey, 2017). São a melhor via de indução mucosa (Yesh et al., 2018).

6.5. Via Retal

Locais mais remotos da mucosa, como por exemplo, a via retal, também foram investigados quanto ao seu potencial indutivo de respostas de IgA salivar para antígenos de *S. mutans* (Mehta et al., 2015). No trato intestinal inferior, a região colorretal apresenta-se como uma região que possui grande concentração de folículos linfóides, o que sugere ser uma localização indutiva para as respostas imunes na mucosa em humanos. Estudos preliminares indicaram que esta rota também poderia ser usada para induzir respostas IgA salivares a antígenos *S. mutans*, como GTF. Poder-se-ia, portanto, prever o uso de supositórios vacinais como alternativa para crianças em que doenças respiratórias impossibilitam a aplicação intranasal da vacina (Abraham et al., 2018; Arora et al., 2018; Jalewa & Pandey, 2017; Yesh et al., 2018).

Esta via de indução de imunidade celular assenta no pressuposto de que o *S. mutans* é absorvido, possibilitando uma resposta imunológica associada ao tecido linfóide intestinal (placas de Peyer). Estas células sensibilizadas podem migrar para as glândulas salivares, contribuindo para a produção de IgA encontrada na saliva (Pereira et al., 2010).

6.6. Via Sistêmica

Como resultado da administração subcutânea bem sucedida de *S. mutans* em macacos, foram produzidos predominantemente anticorpos séricos IgG, IgM e IgA. Os anticorpos chegam à cavidade oral através do fluído dos sulcos gengivais e protegem contra a cárie dentária. Estudos demonstraram que os anticorpos IgG são mantidos em quantidades elevadas, por sua vez os anticorpos IgM diminuem progressivamente e os anticorpos IgA aumentam lentamente a quantidade. O desenvolvimento de anticorpos IgG séricos ocorre meses após a imunização. A proteção contra cáries foi associada predominantemente ao aumento de anticorpos IgG séricos (figura 11) (Abraham et al., 2018; Arora et al., 2018).

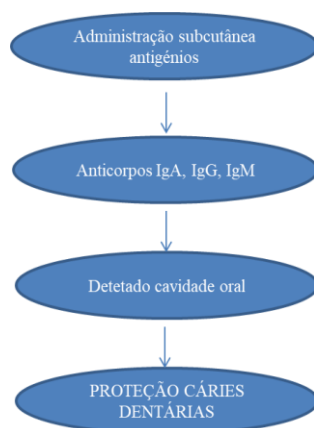


Figura 11- Via sistêmica (Adaptado de Abraham et al., 2018).

6.7. Via gengivosalivar

A fim de reduzir os efeitos colaterais, o fluído crevicular do sulco gengival tem sido usado como uma via favorável para administrar antígenos de *S. mutans*, pois tem o potencial de desencadear resposta imune e a capacidade de superar os efeitos prejudiciais de outras vias de administração. O fluído crevicular é considerado a melhor via de administração. São induzidos anticorpos IgA e IgG (Abraham et al., 2018; Arora et al., 2018; Yesh et al., 2018).

7. Adjuvantes e sistemas de aplicação para a vacina contra a cárie

Atualmente, a investigação no âmbito da vacinação e mais precisamente da imunização contra a cárie dentária espelha aperfeiçoamento em resultado das lições aprendidas ao longo das últimas décadas de estudo nesta área. Um desses avanços é evidenciado pela tentativa de melhorar a resposta imunológica do hospedeiro através do uso de adjuvantes e do estudo de vias alternativas para administração do antígeno (Patel, 2019).

As principais estratégias para a concretização bem sucedida de vacinação contra a cárie dentária através das mucosas passa pelo estudo e elaboração de um sistema adjuvante eficaz, ou seja, que garanta a promoção de imunidade protetora nas membranas da mucosa oral (Shanmugam et al., 2013).

Os adjuvantes são moléculas às quais são adicionados péptidos antigénicos para obter uma resposta imune potente (Surya et al., 2018). Os sistemas de entrega fornecem um direcionamento mais eficiente da vacina (Jalewa & Pandey, 2017).

Os adjuvantes aceleram, prolongam ou aumentam as respostas imunológicas específicas do antígeno quando usados em combinação com os antígenos vacinais específicos que melhoram a capacidade do sistema imunológico responder à injeção de antígeno (Marshall et al., 2018; Patel, 2019).

Para Surya et al. (2018), o adjuvante aumenta a antigenicidade do antígeno das seguintes maneiras:

- Atua como um depósito ou reservatório, por meio do qual o antígeno pode ser libertado progressivamente;
- Tem a capacidade de apresentar o antígeno diretamente às células imunocompetentes;
- Alguns adjuvantes atuam como estimuladores imunológicos químicos das células linfóides.

Adjuvantes usados com antígenos da vacina contra a cárie nas pesquisas recentes:

-Acoplamento do antígeno de *S. mutans* com subunidades não tóxicas da toxina da cólera e enterotoxina termolábil de *E.coli*- a toxina da cólera é um poderoso adjuvante imunológico da mucosa, usado para aumentar a resposta do sistema imunológico da mucosa a uma variedade de patógenos bacterianos e virais. A aplicação na mucosa de uma proteína solúvel ou antígeno peptídico por si só raramente resulta em respostas de IgA altas ou constantes. No entanto, a adição de pequenas quantidades de toxina da cólera ou das enterotoxinas termolábeis de *E.coli* intimamente relacionadas pode aumentar amplamente as respostas imunes da mucosa a antígenos de *S. mutans* aplicados intragástricamente, intranasalmente ou a péptidos derivados desses antígenos. O acoplamento da proteína com a unidade não tóxica da toxina da cólera foi eficaz em suprimir a colonização de *S. mutans* (Abraham et al., 2018; Chatterjee, 2018; Gupta & Mankel, 2020; Malavika et al., 2016; Yesh et al., 2018).

-Microcápsulas e micropartículas de polilactideo-coglicolideo (PLGA) têm sido usadas como sistemas de entrega local devido à sua capacidade de controlar a taxa de liberação, evitar os mecanismos de eliminação/depuração de anticorpos preexistentes e degradar lentamente, sem provocar uma resposta inflamatória ao polímero. A imunização oral com estas microesferas efetivamente administrou e libertou a vacina no tecido linfóide associado ao intestino, conforme determinado pela sua capacidade de induzir uma resposta disseminada de anticorpos IgA anti-toxina na mucosa (Giasuddin et al., 2017; Gupta & Mankel, 2020; Malavika et al., 2016; Yesh et al., 2018).

-Vetores vivos, como fusão com *Salmonella*- atua como vetor de vacina eficaz quando a fusão é feita com várias técnicas recombinantes e têm-se demonstrado eficazes em fusões vacinais (Surya et al., 2018; Gupta & Mankel, 2020; Yesh et al., 2018).

-Lipossomas- Acredita-se que os lipossomas melhoram a resposta imunológica da mucosa, facilitando a captação de células M e a entrega do antígeno a elementos linfóides do tecido indutivo. Verificou-se que a eficácia através do uso de lipossomas aumenta duas vezes em ratos, em humanos, foram encontrados anticorpos IgA aumentados. Os lipossomas têm sido usados em vários medicamentos, sobretudo medicamentos contra o cancro de modo a direcionar as células de forma eficaz para onde devem chegar (Giasuddin et al., 2017).

A alteração da composição lipídica pode alterar o tamanho das partículas dos lipossomas, desta forma, uma população de lipossomas mais pequenos pode entregar o antígeno rapidamente, enquanto uma população de lipossomas maiores entrega o antígeno lentamente, alcançando assim, uma libertação sustentada do antígeno (Surya et al., 2018).

A administração de lipossomas que contêm vacina forneceu proteção parcial contra cáries dentárias e também pode trazer respostas imunes protetoras a patógenos de superfícies mucosas (Gupta & Mankel, 2020).

Assim, a adição de adjuvantes e antígenos juntos é uma melhoria significativa na pesquisa de vacinação contra a cárie (Surya et al., 2018).

Um progresso significativo tem sido alcançado no campo dos sistemas adjuvantes, nomeadamente pela exclusão de propriedades tóxicas para a mucosa, mantendo as suas propriedades adjuvantes. Os sistemas de entrega ativados (vetores bacterianos atenuados) e inativados (lipossomas e micropartículas) têm sido identificados como veículos mais eficientes para a vacina contra a cárie dentária (Jalewa & Pandey, 2017).

8. Tempo de imunização

Acredita-se que atualmente, o momento ideal para administração da vacina (imunização) contra a cárie dentária varie entre os seis e os doze meses, ou seja, depois do aparecimento dos primeiros dentes em boca, mas antes da infeção/colonização por parte das bactérias *S. mutans*, porém difere de autor para autor (Surya et al., 2018).

A colonização oral por *S. mutans* ocorre principalmente durante um período denominado por “janela de infeciosidade”, que ocorre após a erupção dos dentes decíduos (Charone et al., 2012; Chhabra & Rajpal, 2016).

Antes da erupção dos primeiros dentes decíduos, as crianças já têm capacidade de produzir resposta imunológica através de SIgA salivar. Por tal, para crianças com risco normal de infeção, um programa de imunização contra a cárie dentária deveria iniciar-se antes da “janela de infeciosidade” (Kaur et al., 2014).

A “janela de infeciosidade” tal como referido, corresponde ao período de tempo em que *S. mutans* mostra maior colonização em crianças. O sistema imunológico oral passa por um rápido desenvolvimento com o anticorpo secretório IgA sendo este secretado na saliva com 1 mês de idade. Algumas semanas após a exposição inicial a *S. mutans*, a IgA da mucosa é secretada. A saliva do bebé contém os isótopos de IgM e IgA1 no primeiro mês de vida. A adesão inicial de *S. mutans* ao dente dá-se através da interação da proteína bacteriana com a lecitina na película dentária. As adesinas presentes em *S. mutans* ligam-se à película dentária seguida pela secreção de GTFs que auxiliam no acúmulo de um grande número de *S. mutans*. Isto ocorre devido a uma interação com as proteínas de ligação ao glucano associadas às células bacterianas. Liberta-se ácido láctico pelo meta-

bolismo de *S. mutans* isso leva à desmineralização do esmalte, causando cárie (Chhabra & Rajpal, 2016).

Se a colonização bacteriana do biofilme dentário for completa após a erupção de todos os dentes decíduos e se for possível, por meio da imunização, prevenir colonização anterior a este período de *S. mutans*, então o benefício da imunização precoce pode estender-se até que os dentes definitivos comecem a surgir, expondo novas condições ecológicas (Giasuddin et al., 2017; Mehta et al., 2015).

Os *S. mutans* são transmitidos primariamente pelas mães às crianças, pelo que as mães são uma possibilidade de imunização ativa ou passiva contra *S. mutans* dos filhos (Kaur et al., 2014). A indução de anticorpos contra *S. mutans* no leite materno, torna o ato de amamentar um mecanismo de imunização passiva contra *S. mutans* (Singh et al. 2013).

A proteção neonatal dá-se por meio de anticorpos transferidos passivamente pela amamentação. As crianças amamentadas podem receber até um grama por dia de imunoglobulina. Tudo indica que os anticorpos do leite materno interferem com a ligação dos microrganismos à mucosa oral/dente e previnem a exposição a proteínas alimentares no lactante, desempenhando um papel na prevenção da invasão microbiana (Jalewa & Pandey, 2017).

Porém, esta estratégia não evidencia impacto relevante, pelo menos nas sociedades ocidentais, onde o aleitamento materno termina habitualmente muito antes da “janela de infeciosidade” para os *S. mutans* (Singh et al. 2013).

As evidências disponíveis, demonstram que a supressão da população de *S. mutans* nas mães, reduz o nível de infecção nas crianças e, além disso, o efeito pode ser detetado anos mais tarde, conforme revelado por um nível reduzido de cárie. Esta constatação realça uma vez mais a importância dos cuidados médico dentários pré-natais, que a cárie dentária é uma doença familiar e reconhece oportunidades clínicas para prevenir a cárie (Bowen, 2015).

A população alvo principal para uma vacina contra a cárie dentária seriam bebês/crianças para os quais as questões de segurança são mais rigorosas. A maioria dos adultos pode já ter tido cáries e, por esse motivo, pode não apresentar respostas imunológicas adequadas (Giasuddin et al., 2017).

9. Riscos associados à vacina anticárie

Todas as vacinas, mesmo que fabricadas de forma adequada, comportam os seus riscos (Malavika et al., 2016). Como riscos inerentes, pode haver risco de hipersensibilidade e de resistência microbiana e pode haver reatividade cruzada de certos componentes antigénicos de *S. mutans* (Yesh et al., 2018).

Neste contexto é importante referir que, de acordo com pesquisa, tem sido comprovado que a utilização de células bacterianas inteiras de *S.* pode originar reações cruzadas com os tecidos normais do hospedeiro. Alguns estudos descrevem que uma das principais desvantagens do uso de vacinas que contenham *S.*, incluindo *S. mutans*, contra a cárie é a possibilidade de induzir anticorpos que podem apresentar reação cruzada com antígenos do tecido do miocárdio humano e a proteína miosina do músculo esquelético. A vacinação de seres humanos contra a cárie dentária, pode aumentar a suscetibilidade a endocardite estreptocócica. Tal determina o interesse de novas pesquisas em busca de antígenos bacterianos que estejam ausentes do tecido cardíaco (Gupta & Mankel, 2020; Kaur et al., 2014).

Os resultados de vários estudos comprovam que as vacinas anticárie têm de estar livres de elementos na sua composição que induzam a produção de anticorpos com reação cruzada com o tecido cardíaco do hospedeiro, para tal é importante identificar estes antígenos com este potencial (reatividade cruzada) e excluí-los no projeto das vacinas (Luo et al., 2017). Podendo levar ao desenvolvimento de uma vacina potencialmente mais segura que será mais aceitável para uso humano (Giasuddin et al., 2017).

Alguns estudos concluíram que os anticorpos que determinam a reatividade cruzada correspondem a antígenos da membrana celular da bactéria (e não ao Ag I/II) ou podem dever-se a uma estimulação não específica do sistema imunitário (Pereira et al., 2010). Estas investigações recentes mostraram que a porção do terminal C do Ag I/II contém um epítopo com reação cruzada com a IgG humana, pelo que este epítopo não deve ser integrado em vacinas contra a cárie dentária (Kaur et al., 2014).

Para serem evitadas reações cruzadas, têm sido utilizadas técnicas de genética e biologia molecular na purificação e síntese peptídica de subunidades estreptocócicas relacionadas com a colonização bacteriana na superfície dentária (Jalewa & Pandey, 2017).

10. Perspetivas da vacinação anticárie: futuro

Visto que a cárie dentária geralmente se desenvolve lentamente e pode ocorrer ao longo da vida, pode-se prever que a proteção imunológica necessite ser igualmente duradoura. Sabe-se que *S. mutans* não é o único microrganismo cariogénico e que uma série de fatores influenciam no desenvolvimento da doença. Posto isto, surge a questão de até que ponto a vacinação bem sucedida contra *S. mutans* poderia reduzir a incidência de cárie dentária (Giasuddin et al., 2017).

Uma vacinação bem sucedida dirigida contra *S. mutans* pode percorrer um longo caminho na melhoria do estado de cárie das populações vulneráveis e servir como uma importante medida de saúde pública noutras. No entanto, é obrigatória uma análise completa da necessidade, custo benefício e risco benefício da vacina em várias sociedades e comunidades (Giasuddin et al., 2017).

Embora o conhecimento atual sustente que a colonização oral com *S. mutans* ocorre principalmente durante uma janela de infeciosidade após o início da erupção dos dentes decíduos, não está definido se existem mais oportunidades de colonização, por exemplo, quando as crianças entram na escola e interagem socialmente com um grupo muito maior (Arora et al., 2018).

Desta perspetiva, segundo Arora et al. (2018) surgem duas considerações:

- a) Seria necessário imunizar bebés ou crianças a fim de fornecer proteção imunológica antes da colonização inicial com *S. mutans*;
- b) A imunização de reforço para recuperar respostas pode ser desejável para evitar a colonização em momentos posteriores.

Como a transmissão de *S. mutans* parece ser principalmente de mãe para filho, uma terceira possibilidade é que as mães jovens possam ser imunizadas ativa ou passivamente com o objetivo de reduzir a sua carga oral de *S. mutans* juntamente com profilaxia convencional ou outras intervenções, diminuindo assim a probabilidade e extensão da transmissão para os seus filhos. Se as bactérias transferidas estiverem revestidas com anticorpos salivares maternos, isso provavelmente reduzirá a sua capacidade de colonizar a boca do bebé (Arora et al., 2018).

Estudos futuros deverão pesquisar novos genes de virulência alvo ou proteínas antigénicas, desenvolver vacinas, usar o melhor adjuvante comprovado historicamente e técnica de administração e aprimorar ainda mais através do uso de nanotecnologia. Por outro lado, as vacinas existentes que foram testadas em animais mais comprovadas podem ser aprimoradas até ao nível necessário para serem administradas em humanos (Gupta & Mankel, 2020).

São necessários estudos multicêntricos e ensaios clínicos em humanos por forma a que as diferentes vacinas possam ser discutidas, comparadas e avaliada a sua segurança e eficácia. Devem concentrar-se esforços numa perspetiva coletiva na vacina mais promissora, em vez da pesquisa ser realizada isoladamente. Além disto, os ensaios em humanos e pesquisas adicionais podem ser conduzidos para estabelecer a eficácia, a dosagem e o período de proteção (Patel, 2019).

Por forma a prevenir, doenças orais como a cárie, têm sido examinadas vacinas que usam componentes bacterianos e/ ou virais e adjuvantes para ativar inicialmente a imunidade inata levando a uma imunidade adquirida específica do antígeno (Kurita-Ochiai et al., 2020).

Espera-se que a vacina contra a cárie funcione como prevenção da mesma. A passar pela quinta década de investigação sobre as possíveis abordagens para a construção de uma vacina segura e capaz de prevenir ou retardar o desenvolvimento de lesões cariosas, nenhuma vacina foi introduzida no mercado até à data, sobretudo devido a uma baixa capacidade de indução e manutenção de anticorpos protetores em fluídos orais, sendo que a eliminação de microrganismos comensais prende-se com outro desafio (Gupta & Mankel, 2020; Malavika et al., 2016).

Um dos maiores desafios para o século 21 é eliminar o fenómeno da reatividade cruzada do coração humano de uma vacina anticárie para uso humano. Qualquer vacina, para ter sucesso, deve ser eficaz, segura e aceitável para o público no geral. Ainda que a cárie dentária seja uma das doenças mais importantes em termos de prevalência, sofrimento, comodidade e custo, é uma condição que não leva à morte ou grave incapacidade do paciente. Consequentemente, qualquer método prospetivo, incluindo a imunização, não deve acarretar qualquer tipo de risco (Giasuddin et al., 2017).

Atualmente, as iniciativas de desenvolvimento de uma vacina contra a cárie parecem apresentar desinteresse, estando os recursos de pesquisa direcionados noutro sentido (Surya et al., 2018).

Certo é que mais investimento financeiro para investigação neste campo é emergente, bem como o corte com as tradições focadas nos tratamentos ao invés da prevenção. Não descurando a importância de manter comportamentos adequados de higiene oral, tendo em conta que continuará a ser a chave para uma boa saúde oral e uma diminuição considerável na ocorrência de cárie (Patel, 2019).

III. CONCLUSÃO

Nas últimas décadas, pôde-se observar um grande progresso na área da medicina dentária, que não se demonstra apenas por inovação nas técnicas, equipamentos e materiais para tratamento dentário, mas também através de importantes tentativas de inovação no campo da prevenção da doença oral.

A saúde oral é parte integrante do bem estar geral, doenças como a cárie dentária são importantes problemas de saúde pública que embora não sejam fatais, têm um grande impacto na vida diária das pessoas devido a problemas inerentes tais como dor, dificuldades que possam surgir para comer podendo mesmo levar à restrição de certas atividades.

Apesar da prevenção contra a cárie dentária ser uma preocupação existente há vários anos e ainda que haja conhecimento de inúmeras técnicas preventivas, nenhum destes métodos reduz a suscetibilidade do hospedeiro ser afetado por cárie dentária. Assim, é crucial a procura de uma abordagem alternativa por forma a combater esta doença.

Seria importante fazer ver aos pacientes e à própria área de medicina dentária que uma restauração, por imprescindível que seja, não representa o tratamento da doença cárie dentária, de forma a que, possam ser aceites novos métodos de prevenção.

O *S. mutans* é considerado o principal agente etiológico da cárie dentária em humanos. Os produtos de ligação como polímeros da glucose (glucano) e proteínas (glucosiltransferases) e adesinas são fatores de virulência de *S. mutans*, e por sua vez, fortes candidatos para uma vacina contra a cárie dentária. Os fatores de virulência do *S. mutans*, na presença de hidratos de carbono da dieta, encontram o meio ideal para concretizar as suas propriedades de adesão e acumulação no biofilme oral, desencadeando a desmineralização dos tecidos dentários e ocasionando lesão de cárie dentária.

O desenvolvimento de vacinas eficientes e seguras continua a ocupar um lugar de destaque entre os objetivos da saúde pública mundial. Não obstante, a imunização contra a cárie dentária adquirida pela vacinação tem vindo a ser explorada como uma relevante possibilidade de solução terapêutica. A emergência de necessidade de concretização deste instrumento de prevenção assume especial importância para as populações com

limitações de acesso aos serviços de saúde. Além do mais, o conhecimento dos sinais que regulam a colonização e o crescimento de *S. mutans* em biofilme dentário, podem auxiliar no desenvolvimento de técnicas aprimoradas para erradicar bactérias cariogênicas.

No entanto, existem inúmeras razões pelas quais nenhuma vacina contra a cárie dentária foi lançada no mercado até agora. Não só devido à baixa capacidade de induzir e manter anticorpos protetores em fluídos orais como também a possibilidade de eliminação de microrganismos comensais. Desta forma têm sido estudadas novas estratégias de imunização da mucosa e adjuvantes seguros.

Espera-se que a vacina contra a cárie funcione como prevenção a longo prazo da doença. A utilização destas vacinas será uma mais valia na prevenção/ tratamento da doença em crianças, pacientes com deficiência, bem como em pacientes geriátricos melhorando o estado de cárie das populações vulneráveis e por outro lado servir como uma importante medida de saúde pública. Estas poderiam ser incorporadas no programa de vacinação e seriam rentáveis a longo prazo, fornecendo imunidade ao longo da vida.

Torna-se imperativa a necessidade de mais estudos/ ensaios em humanos de vacinas experimentais com o intuito de avaliar a eficácia e segurança e ainda adquirir mais informações sobre a cárie por forma a desenvolver uma vacina e para que a mesma seja disponibilizada para a população em geral. A respeito do assunto, deve ainda ter-se em conta o facto de que antes da introdução de qualquer tipo de vacina em circulação no mercado, devem ser efetuados testes adequados com essas mesmas vacinas, que não perturbem/interfiram a microflora comensal da cavidade oral que evoluiu ao longo de muitos séculos.

Para que uma vacina contra a cárie dentária seja aceite, existe um vasto número de requisitos e questões que necessitam ser cumpridos e respondidas. Uma das questões de preocupação que pode surgir prende-se com o desenvolvimento de microrganismos resistentes devido ao uso excessivo de antibióticos nos dias de hoje, assim, quanto mais cedo a vacina for fabricada menos chances de fracasso pode vir a ter. Outra questão é qual será o efeito a longo prazo da ação da vacina sobre a microflora oral, isto porque deve existir a perceção de que no microbioma oral, existem membros benéficos e a

compreensão da saúde e da doença requer o conhecimento de todos os microrganismos, não apenas de alguns patogênicos.

O foco principal da imunização deve ser a ação contrária a longo prazo da cárie dentária, pois a doença trata-se de um processo contínuo.

O desenvolvimento de uma vacina contra a cárie aplicável em humanos, pode ser um sucesso num futuro próximo em comparação com outras medidas preventivas de cárie existentes. A técnica de vacinação irá prevenir ou diminuir o impacto da cárie dentária.

Perante o conhecimento de que a cárie dentária afeta todas as faixas dentárias e pode ter inúmeras consequências, torna-se fundamental que os médicos dentistas reconheçam a evolução dos paradigmas etiológicos do processo de cárie dentária e as suas implicações clínicas. Os profissionais de saúde oral devem incorporar diretrizes baseadas em evidência científica na sua prática clínica para benefício dos seus pacientes.

IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, M., Shwetha, K. N., Vanishri, H. C., Roopa, R. S., Dominic, A., & Sowmya, S. V. (2018). Vaccine for Dental Caries - An Imminent Target. *Journal of Dental & Oro-Facial Research*, 14(1), 49–54.
- Arora, B., Setia, V., Kaur, A., Mahajan, M., Sekhon, H., & Singh, H. (2018). Dental Caries Vaccine: An Overview. *Indian Journal of Dental Sciences*, 10, 121–125. https://doi.org/10.4103/IJDS.IJDS_128_17
- Arweiler, N. B., & Netuschil, L. (2016). The oral microbiota. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 902, 45–60. https://doi.org/10.1007/978-3-319-31248-4_4
- Bai, G., Tian, Y., Wu, J., Gu, Y., Chen, Z., Zeng, F., & Liu, J. (2019). Construction of a fusion anti-caries DNA vaccine in transgenic tomato plants for PAcA gene and cholera toxin B subunit. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 66(6), 924–929. <https://doi.org/10.1002/bab.1806>
- Bao, R., Yang, J. Y., Sun, Y., Zhou, D. H., Yang, Y., Li, Y. M., Cao, Y., Xiao, Y., Li, W., Yu, J., Zhao, B. L., Zhong, M. H., & Yan, H. M. (2015). Flagellin-PAc fusion protein inhibits progression of established caries. *Journal of Dental Research*, 94(7), 955–960. <https://doi.org/10.1177/0022034515582224>
- Bowen, W. H. (2015). Dental caries – not just holes in teeth! A perspective. *Molecular Oral Microbiology*, 31(3), 228–233. <https://doi.org/10.1111/omi.12132>
- Braga, M. M., Mendes, F. M., & Ekstrand, K. R. (2010). Detection activity assessment and diagnosis of dental caries lesions. *Dental Clinics of North America*, 54(3), 479–493. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2010.03.006>
- Carpenter, G. H. (2013). The secretion, components, and properties of saliva. *Annual Review of Food Science and Technology*, 4(1), 267–276. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182700>
- Charone, S., Cardoso, C., & Groisman, S. (2012). Vacina anticárie: o estado da arte. *PerioNews*, 89-93.
- Chatterjee, K. (2018). Caries Vaccine: The Journey So Far. *ACTA SCIENTIFIC DENTAL SCIENCES*, 3(1), 111–115.
- Chen, L., Zhu, J., Li, Y., Lu, J., Gao, L., Xu, H., Fan, M., & Yang, X. (2013). Enhanced Nasal Mucosal Delivery and Immunogenicity of Anti-Caries DNA Vaccine through Incorporation of Anionic Liposomes in Chitosan/DNA Complexes. *PLoS ONE*, 8(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071953>
- Cherukuri, G., Veeramachaneni, C., Rao, G. V., Pacha, V. B., & Balla, S. B. (2021). Insight into status of dental caries vaccination: A review. *Journal of Conservative Dentistry*, 23(6), 544–549. https://doi.org/10.4103/JCD.JCD_402_20

- Chhabra, R., & Rajpal, K. (2016). Caries vaccine: A boom for public health. *Annals of Tropical Medicine and Public Health*, 9(1), 1–3. <https://doi.org/10.4103/1755-6783.168715>
- Conrads, G., & About, I. (2018). Pathophysiology of Dental Caries. *Monographs in Oral Science*, 27, 1–10. <https://doi.org/10.1159/000487826>
- Costa, S., Adelário, A., Vasconcelos, M., & Abreu, M. (2012). Explanatory Models for Dental Caries: From the Organismic to Ecosystemic Model. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*, 285-91.
- Costalonga, M., & Herzberg, M. C. (2014). The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunology Letters*, 162(2), 22–38. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.08.017>
- Divya, R., Jayasrikrupaa, R., & Aravindhya, N. (2020). Dental Caries: Recent Update. *European Journal of Molecular & Clinical Medicine*.
- Fontana, M., Young, D. A., Wolff, M. S., Pitts, N. B., & Longbottom, C. (2010). Defining dental caries for 2010 and beyond. *Dental Clinics of North America*, 54(3), 423–440. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2010.03.007>
- Frencken, J. (2018). Caries Epidemiology and Its Challenges. *Monographs in Oral Science*, 27, 11–23. <https://doi.org/10.1159/000487827>
- Ghazal, T. S., Levy, S. M., Childers, N. K., Carter, K. D., Caplan, D. J., Warren, J. J., Cavanaugh, J. E., & Kolker, J. (2018). Mutans Streptococci and Dental Caries: A New Statistical Modeling Approach. *Caries Research*, 52(3), 246–252. <https://doi.org/10.1159/000486103>
- Giasuddin, A. S. M., Huda, S. N., Jhuma, K. A., & Haq, A. M. M. (2017). Dental Caries Vaccine Availability: Challenges for the 21st Century. *Immunology & Immunotherapy*, 1(1).
- Gupta, C., & Mankel, H. (2020). Caries Vaccine: An Overview. *Saudi Journal of Oral and Dental Research*. <https://doi.org/10.36348/sjodr.2020.v05i05.003>
- Hara, A. T., & Zero, D. T. (2010). The caries environment: Saliva, pellicle, diet, and hard tissue ultrastructure. *Dental Clinics of North America*, 54(3), 455–467. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2010.03.008>
- Harvey J. D. (2017). Periodontal Microbiology. *Dental clinics of North America*, 61(2), 253–269. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2016.11.005>
- Heijnsbroek, M., Gerardu, V. A., Buijs, M. J., van Loveren, C., ten Cate, J. M., Timmerman, M. F., & van der Weijden, G. A. (2006). Increased salivary fluoride concentrations after post-brush fluoride rinsing not reflected in dental plaque. *Caries research*, 40(5), 444–448. <https://doi.org/10.1159/000094292>

- Huang, L., Xu, Q. A., Liu, C., Fan, M. W., & Li, Y. H. (2013). Anti-caries DNA vaccine-induced secretory immunoglobulin A antibodies inhibit formation of *Streptococcus mutans* biofilms in vitro. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34(2), 239–246. <https://doi.org/10.1038/aps.2012.145>
- Hummel, R., Akveld, N. A. E., Bruers, J. J. M., Sanden, W. J. M., Su, N., & van der Heijden, G. J. M. G. (2019). Caries Progression Rates Revisited: A Systematic Review. *Journal of Dental Research*, 98(7), 746–754. <https://doi.org/10.1177/0022034519847953>
- Jalewa, S., & Pandey, V. (2017). Drill and Fill". *Int J Res Health Allied Sci*, 3(5).
- Jiang, H., Hu, Y., Yang, M., Liu, H., & Jiang, G. (2017). Enhanced immune response to a dual-promoter anti-caries DNA vaccine orally delivered by attenuated *Salmonella typhimurium*. *Immunobiology*, 222(5), 730–737. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2017.01.007>
- Karad, A., & Dhole, P. (2019). Evaluation of Remineralizing Efficacy of Calcium Sucrose Phosphate: A Systematic Review of In Vitro Studies. *Journal of Indian Orthodontic Society*, 53(3), 171–182. <https://doi.org/10.1177/0301574219862499>
- Kaur, A., Gupta, N., & Sharma, S. (2014). Immunology of dental caries and caries vaccine - part II. *International Journal of Pharmacy and Biomedical Sciences*, 3-8.
- Kubala, E., Strzelecka, P., Grzegocka, M., Lietz-Kijak, D., Gronwald, H., Skomro, P., & Kijak, E. (2018). A Review of Selected Studies That Determine the Physical and Chemical Properties of Saliva in the Field of Dental Treatment. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6572381>
- Kurita-Ochiai, T., Hashizume-Takizawa, T., Kobayashi, R., & Yamamoto, M. (2020). Mucosal vaccines for oral disease. *Mucosal Vaccines: Innovation for Preventing Infectious Diseases*, 649–661. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811924-2.00037-7>
- Lamont, R. J., Hajishengallis, G. N., Koo, H., & Jenkinson, H. F. (2019). *Oral Microbiology and Immunology (ASM Books)* (3rd ed.). ASM Press.
- Li, X., Wang, J., Joiner, A., & Chang, J. (2014). The remineralisation of enamel: A review of the literature. *Journal of Dentistry*, 42, S12–S20. [https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(14\)50003-6](https://doi.org/10.1016/S0300-5712(14)50003-6)
- Luo, W., Wen, S., Yang, L., & Zheng, G. (2017). Mucosal anti-caries DNA vaccine: a new approach to induce protective immunity against streptococcus mutans. *Int J Clin Exp Pathol*, 10(2).
- Lycke, N. (2012). Recent progress in mucosal vaccine development: Potential and limitations. *Nature Reviews Immunology*, 12(8), 592–605. <https://doi.org/10.1038/nri3251>

- Madhumitha, M., Vijayakumar, M., Ponnuduraiarangannal, Jeevarathan, J., Amudha, S., & Aarthi, J. (2019). Challenges in shortcomings of caries vaccination: An insight. *Indian Journal of Public Health Research and Development*, 10(12), 1145–1147. <https://doi.org/10.37506/v10/i12/2019/ijphrd/192288>
- Mafla, A. C., Villalobos-Galvis, F. H., & Heft, M. W. (2018). Illness perceptions amongst individuals with dental caries. *Community Dental Health*, 35(1), 16–22. https://doi.org/10.1922/CDH_4098Mafla07
- Malavika, J., Hiremath, S., Das, M., Musareth, A., & Arora, P. (2016). Dental Caries Vaccine: A Review. *International Journal of Oral Health and Medical Research*, 3(4), 104–108.
- Maltz, M., Tenuta, L. M. A., Groisman, S., & Cury, J. A. (2016). *Cariologia: Conceitos Básicos, Diagnóstico e Tratamento Não Restaurador* (1a ed). Editora Artes Medicas.
- Marsh, P. D. (2018). In Sickness and in Health-What Does the Oral Microbiome Mean to Us? An Ecological Perspective. *Advances in dental research*, 29(1), 60–65. <https://doi.org/10.1177/0022034517735295>
- Marsh, P. D. (2010). Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. *Dental clinics of North America*, 54(3), 441–454. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2010.03.002>
- Marsh, P., Martin, M., Lewis, M., & Williams, D. (2009). *Oral microbiology* (5a ed). Churchill Livingstone/Elsevier.
- Marshall, J. S., Warrington, R., Watson, W., & Kim, H. L. (2018). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*, 14. <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1>
- Matsuzaki, K., Sugimoto, N., Islam, R., Hossain, M. E., Sumiyoshi, E., Katakura, M., & Shido, O. (2020). Salivary immunoglobulin a secretion and polymeric ig receptor expression in the submandibular glands are enhanced in heat-acclimated rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3). <https://doi.org/10.3390/ijms21030815>
- McComb, S., Thiriot, A., Akache, B., Krishnan, L., & Stark, F. (2019). Introduction to the Immune System. *Methods in Molecular Biology*, 2024, 1–24. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9597-4_1
- Mehta, V., Singh, V., Choudhary, R., & Joshi, P. (2015). MINIMAL INVASIVE DENTISTRY : A REVIEW. *DENTAL IMPACT*, 7(1), 82–90.
- Miranda, J., Andrade, E., Souza, G., Alves, R., Almeida, D., & Pinto, L. (2001). Vacinação: uma opção preventiva contra a cárie dental aprimorada pelos conhecimentos da imunologia e da biotecnologia. *Pós-Graduação em Revista*, 67–76.

- Mosaddad, S. A., Tahmasebi, E., Yazdanian, A., Rezvani, M. B., Seifalian, A., Yazdanian, M., & Tebyanian, H. (2019). Oral microbial biofilms: an update. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 38(11), 2005–2019. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03641-9>
- Mosca, A. C., & Chen, J. (2017). Food-saliva interactions: Mechanisms and implications. *Trends in Food Science and Technology*, 66, 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.005>
- Mukherjee, E., & Das, A. (2017). It's all in your genes! - Prospects of Gene Therapy in Dentistry. *Journal of Dental and Medical Sciences*, 16(12), 84–89. <https://doi.org/10.9790/0853-1612128489>
- Newbrun, E. (1983). *Cariology* (3^a ed.). Quintessence Publishing Company.
- Opal, S., Garg, S., Jain, J., & Walia, I. (2015). Genetic factors affecting dental caries risk. *Australian Dental Journal*, 60(1), 2–11. <https://doi.org/10.1111/adj.12262>
- Pacheco, F. (2007). Imunologia da Cavidade Oral. Em F. Pacheco, F. Arosa, & E. Cardoso, *Fundamentos de Imunologia*. (pp. 301-26). Lidel Edições Técnicas.
- Patel, M. (2019). Dental caries vaccine: are we there yet?. *Letters in Applied Microbiology*, 70(1), 2–12. <https://doi.org/10.1111/lam.13218>
- Pereira, A., Neves, A., & Trindade, A. (2010). Imunologia da cárie dentária - Artigo de revisão. *Acta Med Port*, 663-668.
- Philip, N., Suneja, B., & Walsh, L. (2018). Beyond streptococcus mutans: Clinical implications of the evolving dental caries aetiological paradigms and its associated microbiome. *British Dental Journal*, 224(4), 219–225. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2018.81>
- Philip, N., Suneja, B., & Walsh, L. J. (2018). Ecological Approaches to Dental Caries Prevention: Paradigm Shift or Shibboleth?. *Caries Research*, 52(2), 153–165. <https://doi.org/10.1159/000484985>
- Piekoszewska-Ziętek, P., Turska-Szybka, A., & Olczak-Kowalczyk, D. (2017). Single nucleotide polymorphism in the aetiology of caries: Systematic literature review. *Caries Research*, 51(4), 425–435. <https://doi.org/10.1159/000476075>
- Pitts, N. B., Mazevet, M. E., Mayne, C., Banerjee, A., Banjsak, L., Fisher, J., Fontana, M., Genuis, M., Johnson, L., Martignon, S., Melo, P., & Nyblom, Y. (2018). Shaping the future of dental education: Caries as a case-study. *European Journal of Dental Education*, 22, 30–37. <https://doi.org/10.1111/eje.12345>
- Pitts, N. B., Zero, D. T., Marsh, P. D., Ekstrand, K., Weintraub, J. A., Ramos-Gomez, F., Tagami, J., Twetman, S., Tsakos, G., & Ismail, A. (2017). Dental caries. *Nature Reviews Disease Primers*, 3. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.30>

- Sala, E. C., & García, P. B. (2013). *Odontología preventiva y comunitaria* (4a ed.) (Spanish Edition). Elsevier España.
- Shah, V., Chovateeya, S., Patel, D. K., Suthar, N., Shah, A., & Patel, J. (2018). Vaccination against Dental Caries – Possibilities, Prospects & Dangers. *Journal of Advanced Medical and Dental Sciences Research*, 6(5), 9–11. <https://doi.org/10.21276/jamdsr>
- Shanmugam, K. T., Masthan, K. M. K., Balachander, N., Jimson, S., & Sarangarajan, R. (2013). Dental caries vaccine- A possible option?. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 7(6), 1250–1253. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/5246.3053>
- Shi, W., Li, Y. H., Liu, F., Yang, J. Y., Zhou, D. H., Chen, Y. Q., Zhang, Y., Yang, Y., He, B. X., Han, C., Fan, M. W., & Yan, H. M. (2012). Flagellin enhances saliva IgA response and protection of anti-carries DNA vaccine. *Journal of Dental Research*, 91(3), 249–254. <https://doi.org/10.1177/0022034511424283>
- Simón-Soro, A., Guillen-Navarro, M., & Mira, A. (2014). Metatranscriptomics reveals overall active bacterial composition in caries lesions. *Journal of Oral Microbiology*, 6(1). <https://doi.org/10.3402/jom.v6.25443>
- Singh, V., Bhaskar, D., Chandan, A., & Punia, H. (2013). Caries vaccine: a review. *Heal Talk Journal of Clinical Dentistry*, 20-23. <http://www.healtalkht.com/PDF/Page%2020-23%20Dr%20Vikas%20Singh-Caries%20V>
- Smith, D., & Mattos-Graner, R. (2008). Secretory immunity following mutans streptococcal infection or immunization. *Curr Top Microbiol Immunol*, 131-156.
- Sun, Y., Shi, W., Yang, J., Zhou, D., Chen, Y., Zhang, Y., & Yang, Y. (2012). Flagellin-Pac fusion protein is a high-efficacy anti-carries mucosal vaccine. *J Dent Res.*, 941-947. doi:10.1177/0022034512457684
- Surya, V., Rena, E., Rajamani, T., Ambili, A., Aravind, A., & Sharath, C. (2018). Newer Developments in the field of Caries Vaccine- A Review. *Journal of Advanced Medical and Dental Sciences Research*, 6(12). <https://doi.org/10.21276/jamdsr>
- Tao, S., Zhu, Y., Yuan, H., Tao, S., Cheng, Y., Li, J., & He, L. (2018). Efficacy of fluorides and CPP-ACP vs fluorides monotherapy on early caries lesions: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 13(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196660>
- Twetman, S. (2018). Prevention of dental caries as a non-communicable disease. *European Journal of Oral Sciences*, 126, 19–25. <https://doi.org/10.1111/eos.12528>
- Vukosavljevic, D., Custodio, W., Buzalaf, M. A. R., Hara, A. T., & Siqueira, W.L. (2014). Acquired pellicle as a modulator for dental erosion. *Archives of Oral Biology*, 59(6), 631–638. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.02.002>

- Wagner, Y., & Heinrich-Weltzien, R. (2017). Risk factors for dental problems: Recommendations for oral health in infancy. *Early Human Development*, 114, 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2017.09.009>
- Wang, K., Zhou, X., Li, W., & Zhang, L. (2019). Human salivary proteins and their peptidomimetics: Values of function, early diagnosis, and therapeutic potential in combating dental caries. *Archives of Oral Biology*, 99, 31–42. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.12.009>
- Wong, A., Subar, P. E., & Young, D. A. (2017). Dental Caries: An Update on Dental Trends and Therapy. *Advances in Pediatrics*, 64(1), 307–330. <https://doi.org/10.1016/j.yapd.2017.03.011>
- Yadav, K., & Prakash, S. (2017). Dental Caries: A Microbiological Approach. *Journal of Clinical Infectious Diseases & Practice*, 2(1). <https://doi.org/10.4172/2476-213x.1000118>
- Yan, H. M. (2013). Salivary IgA enhancement strategy for development of a nasal-spray anti-caries mucosal vaccine. *Science China Life Sciences*, 56(5), 406–413. <https://doi.org/10.1007/s11427-013-4473-5>
- Yang, H., Yan, Z., Zhang, Z., Realivazquez, A., Ma, B., & Liu, Y. (2019). Anti-caries vaccine based on clinical cold-adapted influenza vaccine: A promising alternative for scientific and public-health protection against dental caries. *Medical Hypotheses*, 126, 42–45. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2019.03.006>
- Yesh, S., Devendra, C., Ravi, N., Atul, B., Tangutoori, T., & Eliezer, R. (2018). Dental Caries Vaccine-A Change. *ACTA SCIENTIFIC DENTAL SCIENCES*, 2.
- Young, D. A., Nový, B. B., Zeller, G. G., Hale, R., Hart, T. C., Truelove, E. L., Ekstrand, K. R., Featherstone, J. D. B., Fontana, M., Ismail, A., Kuehne, J., Longbottom, C., Pitts, N., Sarrett, D. C., Wright, T., Mark, A. M., Beltran-Aguilar, E., & Tran, C. (2015). The american dental association caries classification system for clinical practice: A report of the american dental association council on scientific affairs. *Journal of the American Dental Association*, 146(2), 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.adaj.2014.11.018>
- Yu, J. C., Khodadadi, H., & Baban, B. (2019). Innate immunity and oral microbiome: a personalized, predictive, and preventive approach to the management of oral diseases. *EPMA Journal*, 10(1), 43–50. <https://doi.org/10.1007/s13167-019-00163-4>