

Vacina anti-cárie, uma nova alternativa de prevenção das cáries dentárias?

Uma revisão sistemática

Mohammad Yamane JABER

Dissertação conducente ao Grau de Mestre em
Medicina Dentária (Ciclo Integrado)

Gandra, 8 de junho de 2022

Mohammad Yamane JABER

Dissertação conducente ao Grau de Mestre em
Medicina Dentária (Ciclo Integrado)

Vacina anti-cárie, uma nova alternativa de prevenção das cáries dentárias?

Uma revisão sistemática

Trabalho realizado sob a Orientação de Professora Doutora Carla Batista Pinto

Declaração de Integridade

Eu, acima identificado, declaro ter atuado com absoluta integridade na elaboração deste trabalho, confirmo que em todo o trabalho conducente à sua elaboração não recorri a qualquer forma de falsificação de resultados ou à prática de plágio (ato pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria do trabalho intelectual pertencente a outrem, na sua totalidade ou em partes dele). Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores foram referenciadas ou redigidas com novas palavras, tendo neste caso colocado a citação da fonte bibliográfica.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer os meus pais e à minha família por todo o seu apoio, amor e presença comigo durante estes 5 anos.

Gostaria também de agradecer à minha orientadora, professora Carla Pinto, pela sua ajuda e pelo tempo que dedicou à orientação e redação desta dissertação comigo, pela sua grande disponibilidade e pelos seus numerosos conselhos.

Gostaria também de agradecer toda a equipa do CespU por me ter dado a oportunidade de me juntar a esta faculdade e aspirar a esta profissão que tanto amo.

Agradeço ao pessoal docente do CespU pela qualidade do seu ensino e pela partilha dos seus conhecimentos e perícia ao longo dos anos.

Agradeço aos meus amigos por me terem acompanhado durante estes anos e por todos os bons momentos que passámos juntos.

Tem sido 5 anos gratificantes tanto a nível pessoal como profissional. Obrigado!

Resumo

Introdução: Diferentes vacinas foram encontradas até à data para ajudar a prevenir a cárie dentária, segundo os diferentes antígenos e adjuvantes estudados e dando respostas imunológicas variadas.

Objetivos: O objetivo desta revisão sistemática é apresentar as diferentes vacinas investigadas e analisar os seus efeitos imunológicos quanto à adesão de *Streptococcus mutans* sobre a superfície dentária e o aparecimento de cárie num modelo animal.

Material e Métodos: A pesquisa bibliográfica foi efetuada nas bases de dados PubMed, Semantic Scholar, Research Gate e Science Direct. Dos 588 artigos encontrados, 21 foram escolhidos para esta revisão sistemática. Apenas artigos de idioma inglês e publicados entre 2012 e 2022 foram escolhidos. Os artigos utilizados apresentam estudos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo*.

Resultados: Todas as vacinas anti-cárie apresentadas e analisadas neste estudo estimulam o sistema imunológico dos modelos animais utilizados, pela produção de anticorpos IgA e IgG, permitindo assim uma inibição da colonização ou agregação de *Streptococcus mutans* no biofilme oral. Estas vacinas, através da sua imunogenicidade, demonstraram reduzir a ocorrência ou desenvolvimento de cárie dentária.

Conclusão: A investigação sobre a vacina tem sido feita principalmente em animais e mostra resultados encorajadores e positivos quanto aos benefícios desta vacina na prevenção ou redução da formação de cárie dentária.

Palavras-chave: *Vaccines; Dental Caries; Immunization*

Abstract

Introduction: Different vaccines have been found to date to help prevent dental caries, according to the different antigens and adjuvants studied and giving varied immunological responses.

Objective: The aim of this systematic review is to present the different vaccines investigated and to analyze their immunological effects on *Streptococcus mutans* adhesion on the tooth surface and the appearance of caries in an animal model.

Material and Methods: The literature search was carried out in PubMed, Semantic Scholar, Research Gate and Science Direct databases. Of the 588 articles found, 21 were chosen for this systematic review. Only English language articles published between 2012 and 2022 were selected. The articles used present pre-clinical in vitro and in vivo studies.

Results: All the anti-caries vaccines presented and analyzed in this study stimulate the immune system of the animal models used, by the production of IgA and IgG antibodies, thus allowing an inhibition of colonization or aggregation of *Streptococcus mutans* in the oral biofilm. These vaccines, through their immunogenicity, have been shown to reduce the occurrence or development of dental caries.

Conclusion: Research on the vaccine has been carried out mainly in animals and shows encouraging and positive results regarding the benefits of this vaccine in preventing or reducing the formation of dental caries.

Key words: *Vaccines; Dental Caries; Immunization*

Índice Geral

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	2
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	3
3.1- Critérios de Elegibilidade.....	3
3.2- Fontes de informação.....	4
3.3- Seleção dos artigos	5
4. RESULTADOS.....	6
4.1- Seleção dos estudos	6
4.2- Características dos estudos incluídos.....	8
4.3- Características dos estudos utilizando modelos animais.....	29
4.4- Análise de qualidade dos estudos incluídos.....	40
5. DISCUSSÃO.....	49
5.1- Inibição da formação de placa graças aos fatores de virulência e outros componentes do <i>Streptococcus mutans</i>	49
5.2- Os adjuvantes e sistemas de entrega melhoram a imunogenicidade dos antigénios	51
5.3- A flagelina como adjuvante das vacinas anti-cárie	56
5.4- A quimiocina, um potencial adjuvante das vacinas anti-cárie.....	58
5.5- Novas técnicas para realização e melhoramento de uma vacina anti-cárie	59
6. CONCLUSÃO.....	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

Índice de figuras e gráficos

Figura 1- Fluxograma da pesquisa bibliográfica	8
Figura 2- Distribuição dos modelos animais utilizados nos estudos	10
Figura 3- Distribuição dos artigos de acordo com o fator de virulência estudado...	13

Índice de tabelas

Tabela 1- Estratégia PICOS.....	3
Tabela 2- Estratégia de pesquisa e bases de dados	5
Tabela 3- Classificação dos artigos de acordo com o adjuvante coadministrado ou antigénio produzido	10
Tabela 4- Classificação de acordo com o fator de virulência estudado	12
Tabela 5- Resultados dos estudos incluídos.....	15
Tabela 6- Características da realização do antigénio e características da amostra	29
Tabela 7- Características da intervenção nos modelos animais.....	33
Tabela 8- Outras características e resultados encontrados nos estudos realizados em modelos animais.....	38

Lista de siglas e abreviaturas

(KF + rPac) – Mistura de rPac e KF

(KF-rPac) – Proteína recombinante, é a fusão de KF e rPac

(Pac + FimH-S.T) – Vacina anti-cárie Pac mais FimH-S.T

A-P – Fragmento do antígeno da proteína de superfície Pac, domínio de ligação salivar de Pac

Ac(s) – Anticorpo(s)

AL – Lipossomas aniônicos

AL/CS/DNA – Nanopartícula coadministrada com pGJA-P/VAX

ANOVA – Análise de variância

ATB – Antibióticos

BALB/c – Albino, estirpe imunodeficiente de laboratório

BHI – Meio de Infusão Cerebral e Cardíaca

BLPstS – Transformantes positivos

C57BL/6J – Estirpe congénita comum de ratinho de laboratório

CA-GTF – GTF associada à célula (antígeno do *SM*)

CCL-19 – C-C ligando a quimiocina 19

CCR7 – Recetor de quimiocina C-C tipo 7

Célula NK – Célula exterminadora natural

CFU – Unidade de formação de colónias

CMV – Promotor eucariótico

COS-7 – Células não esteroideogénicas (utilizadas para experiências de transfecção para analisar as ações das moléculas funcionais)

CS – Quitosana

CSTM – Trimetil quitosana

CTB – Gene codificador da subunidade B da toxina da cólera

D2 e D3 – Principais domínios da região de antigenicidade da KF

DC2.4 – Linha de células dendríticas derivadas de medula óssea murina

DCs – Células dendríticas murinas

DEAE – Dietilaminoetílico

DLN – Gânglios linfáticos drenantes

DOPE – Dioleoilfosfatidylethanolamine

DOPG – 1,2- Dioleoilfosfatidilglicerol

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática

FCA – Adjuvante completo de Freund

FIA – Adjuvante incompleto de Freund

FimH – Adesina representativa das fímbrias do tipo 1

FimH-S.T – Proteínas recombinantes derivadas de *S. Typhimurium*

FliC – Proteína flagelina recombinante derivada da *Salmonella*

GBR – Região de ligação do glucano

GFP – Proteína Verde Fluorescente

GLU – Glucano

Grupo PBS – Grupo controlo

GS-5 – Serotipo c de *SM*

GTF – Glicosiltransferase

GTF-I – Glicosiltransferase-I

gtfB – Glicosiltransferase B (gene que codifica o tipo GTF-I do GTF)

gtfBN – gene gtfB com o fragmento 1,3 Kb da metade do terminal N amplificada

GUS – β -glucuronidase

i.g. – Intra-gastrointestinal

i.m. – Intramuscular

i.n. – Intranasal

i.p. – Intra-peritoneal

IFN- γ - Interferon gamma (citocina)

IgA – Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina G

IgY – Imunoglobulina Y (anticorpos da gema do ovo da galinha)

IL-6 – Interleucina-6 (citocina)

IPTG – Isopropil- β -D-tio-galactoside

Kb – Kilobase

KF – Flagelina recombinante derivada de *Escherichia coli*

KFD2-rPac – Proteína de fusão flagelina-RPac de segunda geração

KPB – Tampão de fosfato de potássio

LB – Luria-Bertani

LT – Toxina termolábil

LTK4R – Adjuvante LT mutante (derivados não tóxicos da toxina labílica (LT) produzida por *Escherichia coli* enterotoxigênica)

MAb – Anticorpo monoclonal

MCP-1 – Proteína quimiotática de monócitos-1

MDP – Dipeptídeo muramil

mir-9 – microARN-9

MPL – Monofosforilo lipídico A

Ni-NTA - Ácido níquel-nitrilotriacético (para purificar proteínas recombinantes contendo uma sequência de polihistidina)

nirB – Promotor procariótico

NPs – Nanopartículas

OVA – Ovalbumina

P1 - Uma proteína fibrilar de superfície celular de *SM*

P1₃₉₋₅₁₂ – Outro fragmento derivado de P1 gerado em *Bacillus subtilis*, abrangendo os aminoácidos 39 a 512

PAc – Uma proteína fibrilar de superfície celular de *SM*

PACa – Região A de proteína de superfície celular PAC

PACa-ctxB – Vacina de ADN anti-cárie realizada através da fusão do gene codificador PACa de *SM* com o gene codificador da CTB

Pam₃CSK₄ – TLR2 agonista

PBS – Tampão fosfato-salino

pCCL19/GFP – Plasmídeo codificando a proteína de fusão CCL19/GFP

pCI-IL-6 – Plasmídeo expressando IL-6

pCIA-P – Vacina de ADN anti-cárie que codifica a região A-P do gene pac de *SM*

pCMVnir – Plasmídeo contendo o promotor procariótico *nirB* e o promotor eucariótico *CMV*

pCN-SS/SG – Plasmídeo construído pela clonagem de segmentos de ADN que codificam SBR e GBR no vetor duplo promotor pCMVnir

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PEG – Polietilenoglicol

pGJA-P/VAX – Vacina anti-cárie construída através da codificação de um domínio GLU das enzimas glucosyltransferase juntamente às regiões A e P do antígeno da proteína de superfície (PAC) de *SM*

pNir-SS/SG – Fragmento de SS/SG clonado em plasmídeo pNir-16L1E7 para construir um controlo positivo

Pst – Sistema de captação de fosfatos

PstS – O componente de ligação ao substrato de Pst

pVAX1-*wapA* – O fragmento de WapA clonado no plasmídeo pVAX1

rPac – Proteína PAC recombinante (antígeno alvo PAC contendo o fragmento A-P do PAC de *SM*)

rPstS – Forma recombinante de PstS (purificada da *Escherichia coli*)

s.c. – Subcutânea

SAG - Aglutinina salivar (complexo proteico multimérico)

SBR – Região de ligação salivar

SEM – Erro padrão da média

SigA – IgA secretora

SM – *Streptococcus mutans*

SPF – Specific-pathogen-free

ST – *Salmonella Typhimurium*

TLR4 – Toll-like receptor 4

WapA – Proteína A (associada à parede)

WB – Western Blot

1. Introdução

A cárie dentária é uma doença infecciosa-contagiosa crónica microbiológica do dente, que se apresenta pela desmineralização do tecido calcificado ⁽¹⁾. É de etiologia multifatorial e depende da dieta. A OMS, Organização Mundial da Saúde, classifica a cárie dentária, o cancro e as doenças cardiovasculares como as 3 maiores doenças que necessitam de medidas curativas ⁽¹⁾.

Há muitas formas para prevenir esta doença, como por exemplo, seguir uma alimentação saudável, escovar bem os dentes com a técnica adequada ⁽²⁾, a utilização de fluor nas suas várias formas, selantes de fissuras e clorexidina ⁽³⁾.

Vários estudos tentam desenvolver um novo meio de forma a diminuir a prevalência desta doença, nomeadamente a vacina anti-cárie.

As vacinas são um método frequentemente usado para reduzir e prevenir o aparecimento de doenças infecciosas. A vacina anti-cárie está ainda em desenvolvimento e vários estudos estão a ser feitos para tentar criar imunidade no corpo humano ⁽⁴⁾.

Como é do conhecimento geral, há diversas bactérias patogénicas que causam cáries dentárias. Entre elas, podem citar-se os *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Actinomyces viscosus*.

O *Streptococcus mutans* é a espécie mais prevalente e mais agravante da cárie dentária ⁽⁵⁾. É uma bactéria Gram-positiva anaeróbia, que sintetiza o ácido láctico através da glicólise da sacarose. Este ácido, devido ao contacto das bactérias na superfície do dente, provoca a dissolução e destruição das estruturas dentárias ⁽⁵⁾. Deste modo, a investigação sobre a vacina é principalmente dirigida para *Streptococcus mutans* ⁽⁵⁾, com o objetivo de inibir a virulência deste fator no biofilme oral.

A vacina contém um agente semelhante a um micro-organismo, sendo uma substância imuno-biológica, que ajuda na produção de um anticorpo e fornece imunidade ativa para uma doença infecciosa em particular ⁽⁶⁾. O agente é, geralmente, a combinação de um organismo vivo, inativado ou morto, ou de toxinas do micro-organismo, ou de substâncias presentes na superfície da bactéria ⁽⁶⁾.

Nos últimos tempos, com a ajuda da biologia molecular, as sequências do genoma da cadeia de ADN do *Streptococcus mutans* foram descobertas e disponibilizadas, o que melhora e acelera o desenvolvimento de uma vacina. Estas vacinas de ADN recombinante

em desenvolvimento são preparadas isolando o genoma funcional do antigénio e associando-o a um vetor ⁽⁷⁾.

Várias pesquisas sobre a vacina anti-cárie foram feitas, mas a resposta imunitária é insuficiente e fraca. Por este motivo, vários estudos e investigações têm sido realizados de forma a melhorar o efeito da vacina ⁽⁸⁾.

O objetivo da vacina é induzir a produção de anticorpos salivares ou séricos que podem inibir mecanismos independentes da sacarose ou dependentes da sacarose ⁽⁹⁾, isto é, inibir a acumulação e/ou colonização por *Streptococcus* na superfície dos dentes ⁽⁵⁾, de acordo com a escolha do antigénio da vacina. Estratégias de imunização das mucosas foram desenvolvidas para induzir níveis elevados de anticorpos que podem persistir por longos períodos e que estabelecem uma memória imune.

As cáries dentárias, são um problema recorrente, que acarreta muitas complicações orais e psicológicas. As soluções preventivas usadas atualmente têm bons efeitos para prevenir as cáries, mas não são suficientes. A administração de uma vacina pode ser uma boa maneira de reduzir o aparecimento de cáries, mesmo nos primeiros anos de vida.

Assim, os estudos nesta área revestem-se de particular importância, devendo ser progressivos ao longo dos anos até se conseguir desenvolver uma vacina que facilitará o dia a dia das pessoas.

Então, a problemática que podemos colocar aqui é: Quais são os diferentes métodos encontrados até agora para a conceção da vacina? Qual é o seu mecanismo para criar imunidade? Finalmente, a vacina pode realmente ser um meio eficaz para prevenir as cáries dentárias?

2. Objetivos

Objetivo principal: resumir as pesquisas de forma a fornecer uma melhor compreensão da atual investigação e do funcionamento de uma possível vacina anti-cárie.

Os principais objetivos desta revisão sistemática visam:

- ➔ Explicar como é feita a acumulação/colonização de *Streptococcus* no biofilme oral dentário e perceber a ação dos anticorpos estimulados pela vacina para impedir ou inibir a agregação ou colonização por *Streptococcus*.

- Descrever os diferentes métodos de construção das vacinas de ADN anti-cárie, mostrando vários estudos realizados nos últimos anos, para tentar melhorar a vacina.
- Descrever os mecanismos de imunização estimulados pela vacina segundo o antigénio utilizado e modo de administração.

3. Material e Métodos

Para a realização desta revisão sistemática, o protocolo utilizado foi o descrito segundo as recomendações PRISMA. Foi utilizada como orientação a *checklist* com 27 itens do PRISMA, disponível em <http://prisma-statement.org/PRISMAStatement/Checklist>

3.1- Critérios de Elegibilidade

Os estudos incluídos na presente revisão sistemática foram selecionados de acordo com os seguintes critérios, segundo a estratégia PICOS, apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Estratégia PICOS

População (Population)	Estudos pré-clínicos feitos em animais que foram submetidos a injeções de diferentes vacinas desenvolvidas.
Intervenção do PICO (Intervention)	Construção de diferentes tipos de vacinas usando antigénios específicos do <i>Streptococcus mutans</i> , injetados nos animais.
Interesse do PICO (Interest)	Observar a eficácia da resposta imunitária pela produção de anticorpos contra as bactérias <i>Streptococcus mutans</i> nos animais.
Comparação (Comparator)	Comparação das várias vacinas em desenvolvimento de acordo com os resultados obtidos (vacinas usando componentes antigénicos do <i>Streptococcus mutans</i> como ativadores da resposta imunitária, vacinas compostas por péptidos sintetizados ou vacinas de ADN recombinante).
Resultados (Outcome)	Analisar a potencial eficácia destas vacinas para criar imunidade contra as cáries.
Desenho dos estudos (Study design)	Estudos pré-clínicos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> , ensaios pré-clínicos.

- **Critérios de inclusão**
 - Artigos acessíveis e não bloqueados;
 - Artigos completos que correspondam ao tema apresentado;
 - Estudos realizados *in vivo* em animais, uma vez que não há, até hoje, estudos realizados em seres humanos;
 - Estudos realizados *in vitro*;
 - Artigos exclusivamente em inglês;
 - Artigos publicados entre 2012 e 2022;
 - Livros.

- **Critérios de exclusão**
 - Artigos bloqueados;
 - Artigos cujo título ou resumo não estejam relacionados com a temática;
 - Artigos com idioma diferente do inglês;
 - Revisões sistemáticas;
 - Artigos publicados anteriormente ao ano de 2012.

3.2- Fontes de informação

Uma pesquisa bibliográfica foi realizada nas bases de dados PubMed, Science Direct, Research Gate e Semantic Scholar. A pesquisa utilizou palavras-chave MeSH (MeSH terms): "Vaccines"[Mesh] AND "Dental Caries"[Mesh] AND "Immunization"[Mesh]. Artigos publicados desde 2012 até 2020 foram utilizados na língua inglesa nesta pesquisa.

A metodologia da pesquisa bibliográfica esta detalhada na Tabela 2.

Tabela 2- Estratégia de pesquisa e bases de dados

Base de dados	Palavras-Chave	Artigos encontrados	Artigos selecionados
PubMed	(<i>Vaccines</i>) AND (<i>Dental Caries</i>)	87	9
Semantic Scholar	(<i>Vaccines</i>) AND (<i>Dental Caries</i>) AND (<i>Immunization</i>) Campos de estudo selecionados: "Medicine" e "Biology"	160	7
Research Gate	<i>Vaccines</i>) AND (<i>Dental Caries</i>) AND (<i>Immunization</i>)	80	4
Science Direct	(<i>Vaccines</i>) AND (<i>Dental Caries</i>) AND (<i>Immunization</i>)	261	1

3.3- Seleção dos artigos

Etapa I

Os artigos foram selecionados em relação às bases de dados Semantic Scholar, Research Gate e Science Direct, com as seguintes palavras-chave MeSH: "Vaccines"[Mesh] AND "Dental Caries"[Mesh] AND "Immunization"[Mesh]. A base de dados PubMed foi também utilizada na pesquisa dos artigos com as palavras-chave "Vaccines"[Mesh] AND "Dental Caries"[Mesh]. Apenas foram selecionados artigos relacionados com o tema da dissertação e datados da última década (intervalo de tempo 2012-2022 escolhido). Esta revisão incide sobre um tema que tem sido estudado durante anos (primeiros artigos publicados desde 1968). No entanto, têm surgido recentemente novos estudos e publicações, sendo deste modo mais relevante a escolha de artigos publicados apenas nos últimos anos. Assim, foi aplicado um primeiro filtro de acordo com a data de publicação dos artigos. Estes são depois selecionados após a leitura do título e do resumo. Os que são relevantes para os objetivos e problemas da tese são mantidos. Os artigos não

escritos em inglês e os duplicados são eliminados. Os artigos que estão bloqueados ou não acessíveis são também removidos.

Etapa II

Os artigos foram lidos na sua totalidade para ver quais os que cumpriam efetivamente os objetivos deste estudo.

Etapa III

Os artigos finais selecionados de acordo com os critérios de inclusão e após a leitura completa são cuidadosamente e rigorosamente analisados. São apresentados e resumidos em forma de tabela com os diferentes resultados de cada artigo.

4. Resultados

4.1- Seleção dos estudos

Etapa I: Resultados da base de dados

Com base na pesquisa das bases de dados Pubmed, Science Direct, Research gate e Semantic Scholar, foi encontrado um total de 588 artigos. Foi feita uma primeira seleção de acordo com a data de publicação do artigo e após leitura do título e do resumo, perfazendo um total de 79 artigos. Destes, 46 foram excluídos por não cumprirem os critérios de inclusão, por exemplo por não estarem disponíveis, por estarem presentes em duplicado, por serem escritos em idioma diferente do inglês ou por não cumprirem os objetivos do estudo e, portanto, os critérios de inclusão. Isto deixou 33 artigos elegíveis para leitura completa.

A organização, a ordenação dos diferentes artigos e a bibliografia foram feitas utilizando o software Zotero.

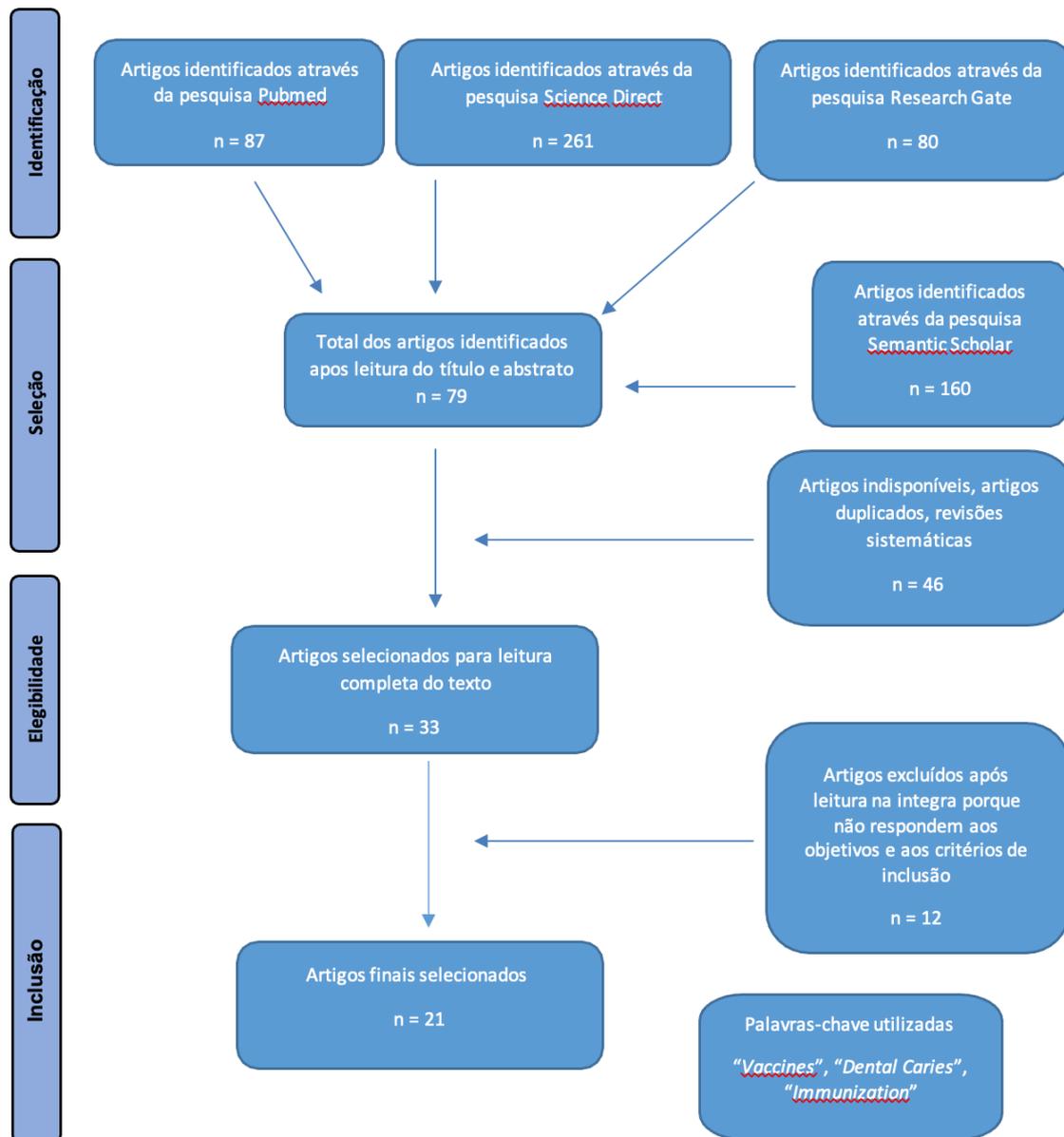
Etapa II: Revisão dos artigos

Nesta fase, estes 33 artigos foram revistos e lidos na íntegra para ver quais os que cumpriram efetivamente os objetivos desta revisão sistemática e foram, portanto, finalmente selecionados.

Etapa III: Inclusão dos artigos

Destes 33 artigos, 12 foram excluídos porque não abordavam especificamente os objetivos do estudo, deixando assim 21 artigos, que serão utilizados para a redação desta dissertação.

Figura 1- Fluxograma da pesquisa bibliográfica



Revisões sistemáticas foram utilizadas como apoio na redação desta dissertação. Estão referenciadas nos anexos no fim do estudo.

4.2- Características dos estudos incluídos

4.2.1- Ano de publicação

Os artigos são referenciados de acordo com a sua data de publicação. Podemos notar que há um maior número de artigos publicados em 2017 (4 artigos) e 2019 (4

artigos). Este tema tem sido alvo de interesse desde finais da década de 60, tendo sido feitos nos últimos anos novos estudos, mais extensos e mais relevantes. Portanto, apenas artigos da última década foram utilizados nesta dissertação.

4.2.2- Tipo de estudo

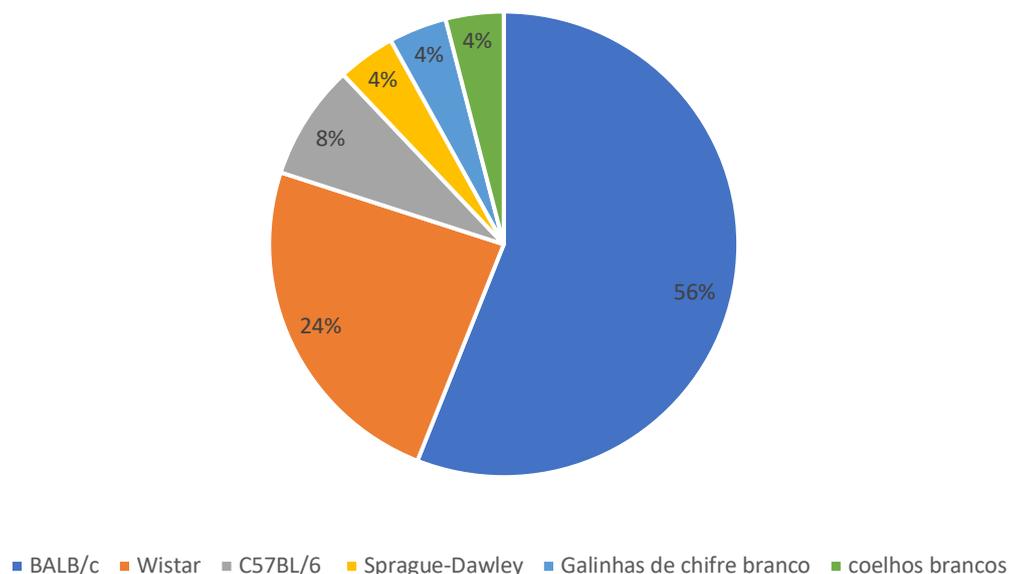
Dos vários estudos utilizados, um foi realizado exclusivamente *in vitro*, cinco estudos foram realizados em modelos animais (*in vivo*) e *in vitro*, e quinze estudos foram realizados exclusivamente em modelos animais (*in vivo*).

Nos estudos realizados *in vivo*, num primeiro tempo, há o desenvolvimento da vacina. Depois, num segundo tempo, a imunização dos animais é feita com essa mesma vacina. O desenvolvimento da vacina é feito, na maioria dos estudos, em duas partes: primeiro, bactérias estão cultivadas em condições de cultura *in vitro*, de modo a purificar as proteínas necessárias à construção da vacina; depois, é realizada a construção da vacina (por exemplo, por fusão ou por combinação dos antigénios com os adjuvantes). A construção é, maioritariamente, genética. O mesmo protocolo é seguido nos estudos *in vivo* e *in vitro*, com a adição de uma intervenção *in vitro*.

Os modelos utilizados são animais (principalmente ratinhos, ratos, coelhos e galinhas). Este projeto está ainda em desenvolvimento nos laboratórios e para já só foi aprovado em animais, mas não em seres humanos. Portanto, em todos os artigos encontrados, no caso de ser utilizado um modelo vivo, este modelo será um animal. Por isso, infelizmente, as descobertas realizadas até à data não permitem conhecer os efeitos que a vacina pode ter no ser humano, sejam eles negativos ou positivos. Mas esta dissertação pode dar uma ideia, através dos resultados obtidos nos animais, dos eventuais resultados em seres humanos. A aplicação em humanos depende do sucesso dos ensaios em animais.

No gráfico seguinte podemos ver a percentagem de cada modelo animal utilizado nos estudos selecionados.

Figura 2- Distribuição dos modelos animais utilizados nos estudos



Nesta revisão sistemática, foram utilizados diferentes artigos, cada um propondo diferentes métodos para a entrega de uma vacina anti-cárie. Por outro lado, neste estudo são propostos diferentes antígenos para a produção da vacina. Os diferentes adjuvantes coadministrados ou antígenos produzidos *in vitro* estão listados na tabela 3.

A maioria dos artigos destaca estudos feitos para melhorar as vacinas anti-cárie já produzidas, fazendo um adjuvante cujo objetivo é melhorar e reforçar a resposta imunitária. A procura de novos e mais eficazes antígenos candidatos é permanente.

Tabela 3- Classificação dos artigos de acordo com o adjuvante coadministrado ou antígeno produzido

Antígeno ou adjuvante	Total dos artigos em relação ao antígeno ou adjuvante
Quimiocina ligante	2: Yan <i>et al</i> (2013) ⁽¹¹⁾ , Yan <i>et al</i> (2016) ⁽¹⁰⁾
CTB	1: Bai <i>et al</i> (2019) ⁽¹⁾
FimH-S.T	1: Liu <i>et al</i> (2019) ⁽¹³⁾
<i>CMV-nirB</i>	1: Jiang <i>et al</i> (2017) ⁽¹²⁾
Chitosan complexos	3: Chen <i>et al</i> (2013) ⁽⁴⁾ , Li <i>et al</i> (2016) ⁽⁵⁾ , Bi <i>et al</i> (2019) ⁽¹⁹⁾

Proteína recombinante P1 ₃₉₋₅₁₂ do <i>Bacillus subtilis</i>	2: Batista <i>et al</i> (2014) ⁽⁹⁾ , Batista <i>et al</i> (2017) ⁽¹⁷⁾
FliC ou KF	5: Shi <i>et al</i> (2012) ⁽⁸⁾ , Sun <i>et al</i> (2012) ⁽²⁰⁾ , Bao <i>et al</i> (2015) ⁽¹⁴⁾ , Sun <i>et al</i> (2016) ⁽¹⁵⁾ , Yang <i>et al</i> (2017) ⁽¹⁸⁾ , Batista <i>et al</i> (2014) ⁽⁹⁾
Glucoconjugados	1: St Michael <i>et al</i> (2017) ⁽²⁾
pCI-IL-6	1: Su <i>et al</i> (2014) ⁽¹⁶⁾
CA-GTF	1: Sentila <i>et al</i> (2013) ⁽³⁾
rPstS	1: Ferreira <i>et al</i> (2015) ⁽²¹⁾
Esponja de plasmideo miR-9	1 : Jia <i>et al</i> (2019) ⁽⁷⁾
GTFBN	1 : Kim <i>et al</i> (2012) ⁽²²⁾

Abreviaturas: rPstS – Forma recombinante de PstS (purificada da *Escherichia coli*); CTB – Gene codificador da subunidade B da toxina da cólera; FimH-S.T – Proteínas recombinantes derivadas de *S. typhimurium*; *nirB* – Promotor procariótico; *CMV* – Promotor eucariótico; P1₃₉₋₅₁₂ – Outro fragmento derivado de P1 gerado em *Bacillus subtilis*, abrangendo os aminoácidos 39 a 512; FliC – Proteína flagelina recombinante derivada da *Salmonella*; KF – Flagelina recombinante derivada de *Escherichia coli*; pCI-IL-6 – Plasmídeo expressando IL-6; ; CA-GTF – GTF associada à célula (antigénio do *SM*); mir-9 – microARN-9; GTFBN – gene *gtfB* com o fragmento 1,3 Kb da metade do terminal N amplificada.

Existem várias fases na patogénese molecular de *Streptococcus mutans* e cada uma destas fases oferece alvos para intervenção imunológica. O primeiro passo envolve a colonização da cavidade oral por estreptococos acidogénicos. Isto é estabelecido pela ligação de antigénio I/II em *Streptococcus mutans* com as glicoproteínas das mucosas encontradas na saliva parótida e sub-mandibular, que constituem os componentes derivados do hospedeiro na película dentária que cobre as superfícies dentárias⁽²³⁾.

Os anticorpos poderiam intervir neste processo bloqueando os recetores necessários para a colonização (por exemplo, adesinas) ou acumulação (por exemplo, domínios de ligação ao glucano de GBPs e GTF) dentro do biofilme dentário⁽²³⁾.

Streptococcus mutans, um agente etiológico primário no desenvolvimento da cárie dentária humana, produz uma série de fatores de virulência que podem ser potenciais candidatos a uma vacina. Estudos demonstraram que a inibição eficaz da formação de cáries pode ser conseguida através da imunização sistémica com estes fatores de

virulência ⁽²²⁾. A aderência de *Streptococcus mutans* à superfície do dente envolve duas fases: uma fase independente da sacarose e uma fase dependente da sacarose.

Existem dois fatores de virulência principais para a infeção por *Streptococcus mutans*:

→ Uma proteína de superfície PAc, também designada como antigénio I/II, B ou P1 ⁽⁸⁾, que é uma adesina envolvida na aderência independente da sacarose ⁽²¹⁾. Esta adesina é um recetor que é necessário para a **colonização** por *Streptococcus mutans*. PAc é responsável pela aderência do *Streptococcus mutans* a glicoproteínas salivares ⁽¹⁵⁾. A etapa inicial independente da sacarose é mediada por uma interação reversível entre P1 e a glicoproteína salivar gp340, adsorvida ao esmalte dentário.

→ Glucosiltransferases (GTF), sintetizadas por *Streptococcus mutans*. A sacarose é uma fonte natural de energia para esta enzima, e GTF é a enzima chave que catalisa a conversão da sacarose em polissacarídeos de cadeia longa, os glucanos ⁽²²⁾. A atividade de GTF extracelular, libertada pelo *Streptococcus mutans*, é conseguida através da função glucan-binding ⁽²⁴⁾, iniciando o processo de acumulação de estreptococos acidogénicos na placa dentária. De facto, *Streptococcus mutans* tem a capacidade de aderir à superfície dentária na presença de sacarose através da formação de glucanos insolúveis em água, que são polissacarídeos que ajudam na ligação das bactérias à superfície dentária ⁽²⁵⁾. Deste modo, GTF é uma enzima essencial para a **agregação** (ou acumulação) de *Streptococcus mutans*. As atividades de GTF do *Streptococcus mutans* são necessárias para a aderência dependente da sacarose.

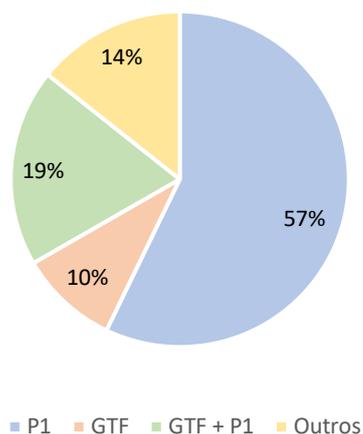
Os diferentes artigos foram classificados de acordo com o facto de lidarem com P1, GTF, ou P1 e GTF (Tabela 4).

Tabela 4- Classificação dos artigos de acordo com o fator de virulência estudado

Artigo sobre uma vacina anti-cárie produzida através da base do estudo e análise da proteína P1	Artigo sobre uma vacina anti-cárie produzida através da base do estudo e análise da glucosiltransferase	Artigo sobre uma vacina anti-cárie, produzida através da base do estudo e análise da glucosiltransferase e da proteína P1
- Sun <i>et al</i> (2012) ⁽²⁰⁾ - Yan <i>et al</i> (2013) ⁽¹¹⁾	- Kim <i>et al</i> (2012) ⁽²²⁾ - Sentila <i>et al</i> (2013) ⁽³⁾	- Shi <i>et al</i> (2012) ⁽⁸⁾ - Chen <i>et al</i> (2013) ⁽⁴⁾

<ul style="list-style-type: none"> - Su <i>et al</i> (2014) ⁽¹⁶⁾ - Batista <i>et al</i> (2014) ⁽⁹⁾ - Bao <i>et al</i> (2015) ⁽¹⁴⁾ - Yan <i>et al</i> (2016) ⁽¹⁰⁾ - Sun <i>et al</i> (2016) ⁽¹⁵⁾ - Yang <i>et al</i> (2017) ⁽¹⁸⁾ - Batista <i>et al</i> (2017) ⁽¹⁷⁾ - Bai <i>et al</i> (2019) ⁽¹⁾ - Liu <i>et al</i> (2019) ⁽¹³⁾ - Bi <i>et al</i> (2019) ⁽¹⁹⁾ 		<ul style="list-style-type: none"> - Jiang <i>et al</i> (2017) ⁽¹²⁾ - Jia <i>et al</i> (2019) ⁽⁷⁾
---	--	---

Figura 3- Distribuição dos artigos de acordo com o fator de virulência estudado



67% dos artigos selecionados dizem exclusivamente respeito à proteína P1.

O único artigo que trata de uma vacina anti-cárie produzida através da base de estudo e análise da proteína A é o de Li *et al* (2016) ⁽⁵⁾. A proteína A associada à parede celular (WapA), também conhecida como AgIII ou antígeno A, que é um precursor do antígeno extracelular A, é também um fator de aderência e agregação (é uma molécula de superfície) que é responsável pela patogenicidade do *SM* ⁽⁵⁾.

O único artigo que trata de uma vacina anti-cárie produzida através da base de estudo e análise da proteína recombinante rPstS é o de Ferreira *et al* (2015) ⁽²¹⁾.

Os sistemas de transporte bacterianos de tipo ATP-binding cassette (ABC) estão envolvidos em várias funções fisiológicas, tais como a absorção de nutrientes e a regulação das características associadas à virulência bacteriana ⁽²¹⁾. Em *Streptococcus mutans*, o sistema de transporte ABC de absorção de fosfatos (sistema PstS) é funcional e é responsável, em parte, pelo crescimento bacteriano em meio de caldo com baixa concentração de fosfato inorgânico. Adicionalmente, o componente de ligação ao fosfato (PstS) desempenha um papel relevante na adesão de *Streptococcus mutans* às superfícies abióticas ⁽²¹⁾. Os componentes de ligação ao substrato dos sistemas de transporte ABC foram testados como antígenos alvo para diferentes espécies bacterianas, como *Streptococcus mutans* ⁽²¹⁾.

O artigo escrito por St Michael *et al* (2017) ⁽²⁾, propõe um outro tipo de vacina: as vacinas glicoconjugadas baseadas em polissacarídeos rhamnan na superfície celular de *Streptococcus mutans*. Estas vacinas poderiam fornecer imunidade sistêmica para matar o patógeno quando este entra na corrente sanguínea, e também se prevê que os anticorpos produzidos após a imunização conjugada terão acesso à cavidade dentária. Os polímeros de superfície de rhamnan são responsáveis pela serologia de *Streptococcus mutans*, que é classificada em quatro serotipos c, e, f, k com base na estrutura destes glicopolímeros de rhamnose ⁽²⁾.

4.2.3- Resultados dos estudos incluídos

Dos artigos selecionados, diferentes informações foram referenciadas, listadas e resumidas na tabela abaixo (Tabela 5). A tabela agrupa os resultados de cada artigo a fim de melhor os compreender e analisar. Está dividido em seis partes: autor, título, objetivos, material e métodos, resultados e conclusões.

Tabela 5- Resultados dos estudos incluídos

Autor (ano) Desenho do estudo	Título	Objetivos	Material e métodos	Resultados	Conclusões
Kim <i>et al</i> (2012) Estudo <i>in vitro</i> e utilizando modelos animais <u>Ensaio pré- clínico</u>	A monoclonal antibody specific to glucosyltransferase B of <i>Streptococcus mutans</i> GS-5 and its glucosyltransferase inhibitory efficiency	Desenvolvimento de uma vacina contra a cárie através da produção de um anticorpo monoclonal contra o fator GTFB.	Amplificação de um fragmento 1,3 Kb da metade N-terminal do gene gtfB de <i>SM</i> e expressão da proteína truncada (GTFBN). Utilização da proteína como imunogénio em ratinhos BALB/c. Seleção e estabelecimento de um hibridoma (clone que apresenta a maior afinidade) (HBN8) capaz de produzir anti-GTFBN. Purificação do Ac monoclonal anti-GTFBN. Para testar a atividade inibitória do anticorpo anti- GTFBN contra o GTFB de <i>SM</i> , o nível de GLU insolúvel foi medido. Os GTFs brutos foram preparados e <i>SM</i> foi cultivado. Anticorpo monoclonal anti- GTFBN purificado foi adicionado às soluções. A concentração dos GLUs produzidos foi determinada através da medição da densidade ótica.	O anticorpo anti- GTFBN inibiu a atividade enzimática da GTFB bruta do <i>SM</i> GS-5 de uma forma dose- dependente.	Estes dados sugerem que o MAb produzido poderia ser utilizado como vacina para evitar a agregação de <i>SM</i> nas superfícies dentárias e prevenir a formação de cárie dentária.
Abreviaturas: gtfB – Glucosyltransferase B (gene que codifica o tipo GTF-I do GTF); Kb – Kilobase; <i>SM</i> – <i>Streptococcus mutans</i> , gtfBN – GTFB gene com o fragmento 1,3 Kb da metade do terminal N amplificada; MAb – Anticorpo monoclonal; BALB/c – Albino, estirpe imunodeficiente de laboratório; Ac(s) – Anticorpo(s)					
Shi <i>et al</i> (2012)	Flagellin Enhances Saliva IgA Response	Utilizar FliC como adjuvante	Ratos Wistar fêmea SPF são desmamados aos 18 dias de	O FliC promoveu a produção de IgG	Este estudo demonstra que o

<p>Estudo utilizando modelos animais <u>Ensaio pré-clínico</u></p>	<p>and Protection of Anti-caries DNA Vaccine</p>	<p>mucosal para vacina de ADN anti-cárie (pGJA-P/VAX) e analisar os efeitos na colonização por <i>SM</i>.</p>	<p>idade e alimentados com dieta criogénica. No dia 27, os 5 grupos de ratos foram imunizados por via intranasal. Amostras de saliva foram recolhidas após injeção intraperitoneal com carbacol para estimulação do fluxo de saliva, e amostras de sangue também, após anestesia e sangramento dos ratos (dia 103). Os níveis de anticorpos específicos de IgG sérico e S-IgA salivar contra PAc foram determinados por ELISA.</p>	<p>específico de PAc em soro e IgA em saliva. Respostas melhoradas de IgA específico de PAc na saliva estavam associadas à inibição da colonização por <i>SM</i>.</p>	<p>FliC recombinante poderia melhorar as respostas específicas de IgA na saliva e a capacidade protetora do pGJA-P/VAX, e que dá melhor proteção com menos lesões de cáries significativas.</p>
<p>Abreviaturas: IgA – Imunoglobulina A; FliC – Proteína flagelina recombinante derivada da <i>Salmonella</i>; <i>SM</i> – <i>Streptococcus mutans</i>; pGJA-P/VAX – Vacina anti-cárie construída através da codificação de um domínio GLU das enzimas glucosyltransferase juntamente às regiões A e P do antígeno da proteína de superfície (PAc) de <i>SM</i>; SPF – Specific-pathogen-free; IgG – Imunoglobulina G; ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática.</p>					
<p>Sun <i>et al</i> (2012) Estudo utilizando modelos animais <u>Ensaio pré-clínico</u></p>	<p>Flagellin-PAC Fusion Protein is a High-efficacy Anti-caries Mucosal Vaccine</p>	<p>Comparar a eficácia protetora contra cárie da vacina utilizando a proteína recombinante KF-rPac com a do rPac sozinho ou (KF + rPac) em ratos.</p>	<p>Ratos Wistar fêmea SPF desmamados foram adquiridos. <u>Primeiro protocolo:</u> 44 ratos imunizados com KF + rPac ou KF-rPac no dia 22. O soro e saliva foram recolhidos (dia 92) e analisados. <u>Secundo protocolo:</u> os ratos foram desmamados (dia 18) e criados com dieta cariogénica. Antibióticos foram adicionados à dieta (dias 20 a 22). Os ratos foram desafiados com CFU de <i>SM</i>. 30 ratos foram</p>	<p>KF-rPac promoveu anticorpos específicos de rPac significativamente mais elevados do que uma dose equivalente de rPac sozinho ou uma mistura de KF + rPac, tanto no soro como na saliva. Imunização intranasal de 8,5µ KF-rPac poderia alcançar 64,2 % de redução de cárie dentária em ratos.</p>	<p>A fusão da flagelina e PAc é promissora para o desenvolvimento de vacinas anti-cárie, e o KF-rPac poderia ser utilizado como vacina anti-cárie mucosal.</p>

			<p>imunizados intranasalmente (dia 28) com KF + rPac ou KF-rPac. Soro e saliva foram recolhidos e analisados (dia 98).</p>		
<p>Abreviaturas: KF – Flagelina recombinante derivada de <i>Escherichia coli</i>; PAC – Uma proteína fibrilar de superfície celular de <i>SM</i>; rPac – Proteína PAC recombinante (antigénio alvo PAC contendo o fragmento A-P do PAC de <i>SM</i>); (KF-rPac) – Proteína recombinante, é a fusão de KF e rPac; (KF + rPac) – Mistura de rPac e KF; Ni-NTA – Ácido níquel-nitilotriacético (para purificar proteínas recombinantes contendo uma sequência de polihistidina); SPF - Specific-pathogen-free; <i>SM</i> <i>Streptococcus mutans</i>; CFU – Colony forming unit; A-P – Fragmento do antigénio da proteína de superfície PAC, domínio de ligação salivar de PAC.</p>					
<p>Chen <i>et al</i> (2013) Estudo utilizando modelos animais <u>Ensaio pré-clínico</u></p>	<p>Enhanced nasal mucosal delivery and immunogenicity of anti-caries DNA vaccine through incorporation of anionic liposomes in chitosan/DNA complexes</p>	<p>Conceção de nanopartículas otimizadas (AL/CS/DNA) para permitir que as vacinas de ADN (pGJA-P/VAX) atravessem várias barreiras fisiológicas e obter assim uma imunidade específica e protetora da mucosa através da administração intranasal.</p>	<p>Foram preparados lipossomas aniônicos constituídos por DOPG/DOPE. NPs de CS/DNA foram preparados adicionando um volume igual da solução CS diluída a uma solução ADN. Cinco grupos de ratinhos BALB/c fêmea foram imunizados com diferentes vias de administração: ADN nu (i.n.), ADN nu (i.m.), CS/DNA (i.n.), AL/CS/DNA (i.n.) e grupo PBS (i.n.). Os animais foram inoculados com 25 mg de pGJA-P/VAX. Foram também imunizados com 25mg de pGJA-P/VAX por i.m. Uma imunização secundária foi realizada após 2 semanas. A saliva e o soro foram recolhidos às 2, 4, 6, 8 e 12 semanas após a última imunização.</p>	<p>Em comparação com o sistema tradicional CS/DNA, o novo desenho tornou mais eficiente a transfecção e prolongou o tempo de residência do AL/CS/DNA na superfície da mucosa nasal. Os resultados mostraram que o AL/CS/DNA induziu um nível mais elevado de SIgA do que o CS/DNA no estudo animal e uma imunidade da mucosa a longo prazo. AL/CS/DNA exibiu uma citotoxicidade mínima.</p>	<p>Os NPs AL/CS/DNA são um sistema seguro e eficaz, que pode ser potencialmente utilizado como um sistema de entrega de vacinas de ADN sem adjuvantes para a imunidade das mucosas.</p>
<p>Abreviaturas: AL – Lipossomas aniônicos; CS – Quitosana; CS/DNA – Quitosana/DNA; AL/CS/DNA – Nanopartícula coadministrada com pGJA-P/VAX; pGJA-P/VAX - Vacina anti-cárie construída através da codificação de um domínio GLU das enzimas glicosiltransferase juntamente às regiões A e P do antigénio da proteína de superfície (PAC) de <i>SM</i>; DOPG – 1,2- Dioleoilfosfatidilglicerol; DOPE – Dioleoilfosfatidiletanolamina;</p>					

BALB/c – Rato albino, estirpe imunodeficiente de laboratório; PBS – Tampão fosfato-salino; Grupo PBS – Grupo controlo; i.n. – Intranasal; i.m. – Intramuscular; NPs – Nanopartículas; SigA – IgA secretora.

<p>Yan <i>et al</i> (2013) Estudo utilizando modelos animais <u>Ensaio pré-clínico</u></p>	<p>Co-delivery of ccl19 gene enhances anti-caries DNA vaccine pCIA-P immunogenicity in mice by increasing dendritic cell migration to secondary lymphoid tissues</p>	<p>Investigar como a coadministração do gene que codifica CCL-19 afetou as respostas imunitárias sistémicas de uma vacina anti-cárie pCIA-P em ratos.</p>	<p>Foi construída pCCL19 /GFP com codificação plasmídica. As células COS-7 foram transfectadas com o plasmídeo. O efeito quimiotático de pCCL19/GFP nas DCs foi avaliado <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>. A ratinhos BALB/c foi administrada a vacina de ADN anti-cárie pCIA-P mais pCCL19/GFP ou apenas pCIA-P. Os esplenócitos dos ratinhos foram estimulados com a proteína PAC durante 48 horas. A presença de pCCL19/GFP no baço e nos gânglios linfáticos drenantes foi avaliada por PCR.</p>	<p>O nível de expressão de CCL19/GFP foi aumentado 48h após transfecção de COS-7. CCL19/GFP mostrou potente atividade quimiotática em DCs <i>in vitro</i>. O nível de IgG específico do soro PAC foi aumentado de 4 para 14 semanas nos ratos vacinados com pCIA-P mais pCCL19/GFP. Após coadministração pCCL19/GFP foi detetado no baço e nos gânglios linfáticos drenantes.</p>	<p>O CCL-19 serve como adjuvante eficaz para a vacina de ADN anti-cárie, induzindo a migração quimiotática das DCs para tecidos linfoides secundários.</p>
<p>Abreviaturas: CCL-19 – C-C ligando a quimiocina 19; pCIA-P – Vacina de ADN anti-cárie que codifica a região A-P do gene pac de <i>SM</i>; GFP – Green fluorescente protein; pCCL19/GFP – Plasmídeo codificando a proteína de fusão CCL19/GFP; PAC - Uma proteína fibrilar de superfície celular de <i>SM</i>; PCR – Polymerase Chain Reaction; COS-7 – Células não esteroideogénicas (utilizadas para experiências de transfecção para analisar as ações das moléculas funcionais); DCs – Células dendríticas murinas.</p>					
<p>Sentila <i>et al</i> (2013) Estudo <i>in vitro</i> e utilizando modelos animais <u>Ensaio pré-clínico</u></p>	<p>Protection against Dental Carries by Passive Immunization with Hen Egg Yolk Antibody Using Cell Associated Glucosyltransferase of <i>Streptococcus mutans</i></p>	<p>Gerar anticorpos de gema de ovo de galinha contra a GTF associada às células.</p>	<p>IgY foi criado em galinha com chifres brancos, contra CA-GTF de <i>Streptococcus mutans</i>. O nível de Ac no soro foi monitorizado e as doses de reforço foram dadas sempre que necessário. Os Acs foram purificados a partir da gema do ovo usando PEG e sulfato de amónio e cromatografia</p>	<p>Níveis elevados de Acs superiores a 1:10000 foram detetados por ELISA no 150º dia. A concentração de IgY na gema de ovo foi aumentada durante o período de imunização e atingiu o máximo de 3,9 mg/ml. Houve uma</p>	<p>A síntese total de GLU por preparação de CA-GTF a partir de <i>SM</i> foi significativamente inibida pela adição de Acs contra CA-GTF. IgY específico de <i>SM</i> pode prevenir a cárie dentária</p>

			em coluna de troca iónica de celulose DEAE. Para avaliar a inibição total da síntese de glucano por Acs, uma mistura de reação contendo sacarose e GTF e várias concentrações de Acs num volume de KPB foi incubada a 37°C durante 3 h.	diminuição no crescimento de <i>SM</i> com o aumento da concentração de IgY.	imobilizando e incapacitando as bactérias de converter açúcar em ácido, prevenindo, assim a cárie dentária.
<p>Abreviaturas: GTF – Glucosiltransferase; IgY – Imunoglobulina Y (anticorpos da gema do ovo da galinha); CA-GTF – GTF associada à célula (antigénio do <i>SM</i>); Ac(s) – Anticorpo(s); PEG – Polietilenoglicol; DEAE – Dietilaminoetilico; ELISA – Enzme-linked immunosorbent assay; <i>SM</i> – <i>Streptococcus mutans</i>; GLU – Glucano; KPB – Tampão de fosfato de potássio.</p>					
Su <i>et al</i> (2014) Estudo utilizando modelos animais <u>Ensaio pré-clínico</u>	Intranasal co-delivery of IL-6 gene enhances the immunogenicity of anti-caries DNA vaccine	Investigar os efeitos da coadministração da IL-6 que exprime o plasmídeo pCI-IL-6 sobre a imunogenicidade da vacina de ADN anti-cárie pCIA-P.	pCI-IL-6 foi construído através da inserção do gene murino IL-6 no vector pCI. Um grupo de ratinhos BALB/c foi coimunizado intranasalmente com pCIA-P mais pCI-IL-6, e o outro grupo foi imunizado com pCIA-P mais pCI vetor (dias 0 e 14). Os esplenócitos dos ratinhos BALB/c foram reestimulados com a proteína PAc. Ratos Wistar foram imunizados e foram igualmente utilizados como modelos de cárie.	Nos ratinhos coimunizados com pCI-IL-6, IgG (soro) e IgA (saliva) foram superiores ao do grupo controlo (semana 4 e 8). A secreção de IFN- γ dos esplenócitos em reposta à reestimulação com PAc foi mais elevada nos ratinhos pCI-IL-6 do que nos ratinhos controlo (IL-4 não tinha diferença). A proliferação dos esplenócitos dos ratinhos pCI-IL-6 foi superior à dos ratinhos pCIA-P e pCI (grupo controlo). Os ratos pCI-IL-6 apresentaram níveis	A coadministração intranasal do gene IL-6 aumenta significativamente a imunogenicidade da vacina de ADN anti-cárie.

				de cárie mais baixos do que os ratos controlo.	
<p>Abreviaturas: IL-6 – Interleucina-6 (citocina); pCI-IL-6 – Plasmídeo expressando IL-6; pCIA-P – Vacina de ADN anti-cárie que codifica o antígeno da proteína de superfície PAc de <i>SM</i>; PAc - Uma proteína fibrilar de superfície celular de <i>SM</i>; BALB/c – Rato albino, estirpe imunodeficiente de laboratório; IgG – Imunoglobulina G; IgA – Imunoglobulina A; IFN-γ - Interferon gamma (citocina).</p>					
<p>Batista <i>et al</i> (2014) Estudo <i>in vitro</i> e utilizando modelos animais <u>Ensaio pré-clínico</u></p>	<p>Immunogenicity and <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> protective effects of antibodies targeting a recombinant form of the <i>Streptococcus mutans</i> P1 surface protein</p>	<p>Investigar as características imunológicas de P1₃₉₋₅₁₂ em combinação com diferentes adjuvantes após administração parentérica aos ratos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Purificação de fragmentos derivados de P1₃₉₋₅₁₂ e adjuvantes proteicos. - Reatividade de MAbs anti-P1 com P1₃₉₋₅₁₂ (por Elisa). - Interação entre P1₃₉₋₅₁₂ e SAG imobilizado e inibição da aderência de <i>SM</i> ao SAG por anticorpos anti- P1₃₉₋₅₁₂ (por ressonância plasmônica de superfície). - Grupos de cinco ratinhos BALB/c fêmea foram imunizados com três doses s.c. (intervalos de 15 dias) - Cada dose consistiu em P1 misturada com hidróxido de alumínio (alume), LTK4R ou FliC. Os grupos controlo foram imunizados com PBS. -Para avaliar a neutralização dependente do anticorpo, as bactérias foram incubadas com soros dos vários grupos de imunização durante 30 min a 37°C. 	<p>A coadministração de adjuvante melhorou as respostas de anticorpos séricos anti-P1 e afetou a especificidade dos dois epítotos. Acs específicos de P1₃₉₋₅₁₂ criados em ratinhos imunizados com adjuvantes mostraram um aumento significativo da inibição da adesão de <i>SM</i> ao SAG. A colonização oral por <i>SM</i> em ratinhos foi prejudicada na presença de Acs anti- P1₃₉₋₅₁₂, particularmente os que foram criados em combinação com adjuvantes.</p>	<p>Os resultados confirmam a utilidade de P1₃₉₋₅₁₂ como potencial candidato para o desenvolvimento de vacinas anti-cárie.</p>
<p>Abreviaturas: P1₃₉₋₅₁₂ – Outro fragmento derivado de P1 gerado em <i>Bacillus subtilis</i>, abrangendo os aminoácidos 39 a 512; P1 - Uma proteína fibrilar de superfície celular de <i>SM</i>; MAb - Anticorpo monoclonal; SAG - Aglutinina salivar (complexo proteico multimérico); <i>SM</i> – <i>Streptococcus mutans</i>; BALB/c - Rato albino, estirpe imunodeficiente de laboratório; s.c. – Subcutânea; LT – Toxina termolábil; LTK4R – Adjuvante LT mutante (derivados não tóxicos da toxina labílica (LT) produzida por <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica); FliC - Proteína flagelina recombinante derivada da <i>Salmonella</i>; PBS – Tampão fosfato-salino; Ac(s) – Anticorpo(s).</p>					

<p>Bao <i>et al</i> (2015) Estudo utilizando modelos animais <u>Ensaio pré-clínico</u></p>	<p>Flagellin-PAC Fusion Protein Inhibits Progression of Established Caries</p>	<p>Investigar o efeito terapêutico de uma vacina mucosal de proteína de fusão (KF-rPac) contra a cárie dentária, utilizando um novo protocolo de imunização sobre a progressão da cárie dentária em ratos com implante prévio de <i>SM</i> nas suas cavidades orais.</p>	<p><u>Protocolo A:</u> avaliar a progressão das cáries com base nos procedimentos. Ratos Wistar fêmea criados com dieta cariogénica Keyes 2000, foram alimentados com ATB durante 5 dias e depois desafiados por CFU de <i>SM</i> Ingbritt 5 vezes (1 por dia). <u>Protocolo B:</u> avaliar a eficácia terapêutica por modelo de cárie. Os ratos foram alimentados com ATB. Após o desafio, 20 ratos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: controlo, PBS, rPac, KF-rPac. Dia 56: o grupo controlo foi sacrificado e definido como a linha de base das cáries e os outros grupos foram imunizados i.n.com PBS, rPac ou KF-rPac. Dia 126: soro e saliva foram recolhidos para análise da resposta dos Acs.</p>	<p>KF-rPac, por imunização nasal pode promover respostas sistémicas dos Acs das mucosas específicos de PAC e inibir eficazmente a progressão da cárie dentária após o implante de <i>SM</i> na cavidade oral dos ratos. Os ratos imunizados com KF-rPac apresentaram uma redução de cárie de 53,9% em comparação com os ratos do grupo controlo.</p>	<p>Os resultados apoiam o conceito de administração de KF-rPac a humanos após infeção. O estudo demonstrou que o KF-rPac poderia ser utilizado como vacina terapêutica mucosal.</p>
<p>Abreviaturas: (KF-rPac) – Proteína de fusão flagelina-PAC; <i>SM</i> – <i>Streptococcus mutans</i>; PBS - Tampão fosfato-salino; i.n. – intranasalmente; Ac(s) – Anticorpo(s); ATB – Antibióticos; CFU - Colony forming unit; rPac - Proteína PAC recombinante (antígeno alvo PAC contendo o fragmento A-P do PAC de <i>SM</i>); (KF-rPac) - Proteína recombinante, é a fusão de KF e rPac.</p>					
<p>Ferreira <i>et al</i> (2015) Estudo utilizando modelos animais</p>	<p>Sublingual immunization with the phosphate-binding-protein (PstS) reduces oral colonization by</p>	<p>Avaliar a indução da imunidade protetora à colonização dentária por <i>SM</i> após a imunização</p>	<p>rPstS foi construída com as características estruturais preservadas. Ratinhos BALB/c fêmea foram imunizados com administração sublingual. Cada grupo recebeu rPstS</p>	<p>Acs séricos criados em ratinhos imunizados com rPstS interferiram com a adesão de bactérias à cavidade oral de ratinhos</p>	<p>Os resultados indicam que o PstS do <i>SM</i> é um potencial antígeno alvo capaz de induzir respostas de Acs</p>

<u>Ensaio pré-clínico</u>	<i>Streptococcus mutans</i>	sublingual de ratos com formulações de vacinas contendo rPstS com um derivado da toxina LT.	intacta sozinha ou combinada com LTK4R, ou PBS para o grupo controlo. Antes da inoculação, células <i>SMNG8</i> eram aplicadas na superfície dentária com uma micropipeta.	desafiados com <i>SM</i> . Da mesma forma, ratinhos imunizados com rPstS foram parcialmente protegidos da colonização oral após o desafio com a estirpe <i>SMNG8</i> .	específicos e protetores após administração sublingual.
---------------------------	-----------------------------	---	--	--	---

Abreviaturas: Pst – Sistema de captação de fosfatos; PstS – O componente de ligação ao substrato de Pst; rPstS – Forma recombinante de PstS (purificada da *Escherichia coli*); LT – Toxina termolábil; LTK4R – Adjuvante LT mutante (derivados não tóxicos da toxina lábilica (LT) produzida por *Escherichia coli* enterotoxigénica); *SM* – *Streptococcus mutans*; BALB/c – Rato albino, estirpe imunodeficiente de laboratório; PBS – Tampão fosfato-salino; Ac(s) – Anticorpo(s).

Yan <i>et al</i> (2016) Estudo utilizando modelos animais <u>Ensaio pré-clínico</u>	CCL17 combined with CCL19 as a nasal adjuvant enhances the immunogenicity of an anti-caries DNA vaccine in rodents	Examinar se a coadministração do CCL17 e do CCL19 poderia reforçar a imunogenicidade de uma vacina de ADN anti-cárie, pCIA-P em roedores.	Foram construídos pCCL17/VAX e pCCL19/VAX. A ratinhos BALB/c foi i.n. administrado pCCL17/VAX, pCCL19/VAX, ou pCCL17/VAX mais pCCL19/VAX. Aos ratinhos foi coadministrado pCIA-P. Os ratos Wistar foram utilizados como modelos de cárie e desafiados oralmente com <i>SM</i> e depois foi-lhes administrado pCIA-P em combinação com pCCL17/VAX, pCCL19/VAX, ou pCCL17/VAX mais pCCL19/VAX.	CCL17 e CCL19 com duplo adjuvante mais pCIA-P induziu níveis significativamente mais elevados de IgA salivar anti-PAC e anticorpo IgG sérico anti-PAC em ratinhos, e reforçou a capacidade do pCIA-P na inibição da colonização por <i>SM</i> em superfícies de dentes de ratinho.	Um adjuvante nasal construído pela combinação de CCL17 e CCL19 atrai DCs mais maduras para os tecidos da linfóide secundária, induzindo respostas melhoradas de Acs contra pCIA-P e reduzindo <i>SM</i> .
---	--	---	--	--	---

Abreviaturas: *SM* – *Streptococcus mutans*; CCL17 – C-C ligando a quimiocina 17; CCL19 – C-C ligando a quimiocina 19; pCIA-P – Vacina de ADN anti-cárie que codifica a região A-P do gene *pac* de *SM*; pCCL17/VAX – plasmídeo codificando CCL17; pCCL19/VAX – plasmídeo codificando CCL19; BALB/c – Rato albino, estirpe imunodeficiente de laboratório; DCs – Células dendríticas murinas; Ac(s) – Anticorpo(s).

Sun <i>et al</i> (2016) Estudo <i>in vitro</i> e utilizando	Flagellin-rPAC vaccine inhibits biofilm formation but not proliferation of <i>S. mutans</i>	Examinar através da imunização de roedores se a administração de KF-rPAC inibe	-Ratinhos BALB/c foram divididos aleatoriamente em 5 grupos e i.n. imunizados com PBS, KF, rPAC, KF mais rPAC, KF-rPAC.	Nos ratos e nos ratinhos imunizados, a formação do biofilme foi negativamente correlacionada com	KF-rPAC poderá também proteger os dentes contra cáries, inibindo a formação da estrutura do
--	---	--	---	--	---

<p>modelos animais</p> <p><u>Ensaio pré-clínico</u></p>		<p>a formação de biofilme dentário e a proliferação de <i>SM</i> ou apenas a formação de biofilme dentário.</p>	<p>-Ratos Wistar fêmea foram utilizadas como modelos de cáries, imunizados (dia 28) com PBS, KF, rPAC, KF mais rPAC, KF-rPAC e reforçados (dia 56 e 84). Soro e saliva foram recolhidos (dia 98) e analisados.</p> <p>-As culturas de <i>SM</i> foram inoculadas em meio BHI pré-aquecido. As culturas foram diluídas em BHI fresco, e depois 100 ml da suspensão celular com 100 ml de soro diluído em BHI 20 vezes ou saliva diluída 5 vezes em BHI foram incubados nos poços de um agregado de 96 poços de cultura celular. A formação de biofilme foi então quantificada através da medição da absorvência da solução com espectrofotómetro de microplacas.</p>	<p>o nível de Ac(s) específicos de rPAC.</p>	<p>biofilme entre bactérias, mas não a proliferação.</p>
<p>Abreviaturas: KF-rPAC – Proteína recombinante, é a fusão de KF e rPAC; <i>SM</i> – <i>Streptococcus mutans</i>; BALB/c – Rato albino, estirpe imunodeficiente de laboratório; i.n. – Intranasalmente; PBS – Tampão fosfato-salino; KF – Flagelina recombinante derivada de <i>Escherichia coli</i>; Ac(s) – Anticorpo(s); BHI – Meio de Infusão Cerebral e Cardíaca.</p>					
<p>Li <i>et al</i> (2016)</p> <p>Estudo utilizando modelos animais</p> <p><u>Ensaio pré-clínico</u></p>	<p>Enhancement of immunogenic response and protection in model rats by CSTM nanoparticles anticaries DNA vaccine</p>	<p>Construir uma vacina de ADN anti-cárie, utilizando como antigénio a proteína WapA, e avaliar a sua capacidade de obter respostas</p>	<p>O fragmento de WapA foi clonado em plasmídeo pVAX1 para gerar pVAX1-<i>wapA</i>. As nanopartículas de pVAX1-<i>wapA</i>/CSTM foram preparadas pelo método de coacervação complexa. Os ratos Sprague-Dawley foram distribuídos</p>	<p>Níveis de IgG específicos significativamente mais elevados nos imunizados com nanopartículas em comparação com os imunizados com pVAX1-<i>wapA</i>. Os</p>	<p>O WapA é um excelente candidato para o desenvolvimento de vacinas anti-cárie. As nanopartículas são um sistema</p>

		imunitárias mucosas e sistémicas em ratos.	aleatoriamente em cinco grupos após a infeção e foi-lhes administrado um dos seguintes: nanopartículas pVAX1- <i>wapA</i> / CSTM, pVAX1- <i>wapA</i> , nanopartículas pVAX1/CSTM (todas i.m.) ou nanopartículas pVAX1- <i>wapA</i> / CSTM, nanopartículas pVAX1/CSTM (todas i.n.).	níveis de Acs IgA e IgG anti-WapA após imunização i.n. foram significativamente mais elevados do que os que se seguiram à administração intramuscular de nanopartículas ou pVAX1- <i>wapA</i> nu.	eficaz de administração.
Abreviaturas: WapA – Proteína A (associada à parede); pVAX1- <i>wapA</i> – O fragmento de WapA clonado no plasmídeo pVAX1; CSTM – Trimetil quitosana; i.m. – intramuscular; i.n. – Intranasal; Ac(s) – Anticorpo(s).					
St Michael <i>et al</i> (2017) Estudo <i>in vitro</i> e utilizando modelos animais <u>Ensaio pré-clínico</u>	Investigating the candidacy of the serotype specific rhamnan polysaccharide based glycoconjugates to prevent disease caused by the dental pathogen <i>Streptococcus mutans</i>	Examinar a candidatura da vacina dos polissacarídeos específicos do serotipo elaborado por <i>SM</i> .	Preparação das vacinas glicoconjugadas utilizando o rhamnan contendo polímeros dos serotipos f e k. Coelhas brancas foram imunizadas s.c. com os glucoconjugados (hidratos de carbono conjugados). Ratinhos BALB/c fêmeas foram imunizados i.p.com os glicoconjugados.	Uma resposta imunitária robusta aos glicoconjugados foi obtida com reatividade cruzada consistente com as semelhanças estruturais dos polímeros dos diferentes serotipos.	Os glicoconjugados dos polímeros de <i>SM</i> de rhamnan são um potencial candidato a vacina para visar a cárie dentária e outras sequelas após a fuga de <i>SM</i> da cavidade oral.
Abreviaturas: <i>SM</i> – <i>Streptococcus mutans</i> ; s.c. – Subcutânea; BALB/c – Rato albino, estirpe imunodeficiente de laboratório; i.p. – Intra-peritoneal.					
Jiang <i>et al</i> (2017) Estudo utilizando modelos animais <u>Ensaio pré-clínico</u>	Enhanced immune response to a dual-promoter anti-caries DNA vaccine orally delivered by attenuated <i>Salmonella typhimurium</i>	Conceber um sistema de expressão duplo promotor (<i>CMV-nirB</i>) esperando fornecer uma grande e persistente quantidade de	Os promotores <i>CMV</i> e <i>nirB</i> foram incluídos no plasmídeo que abriga os genes que codificam os epítomos funcionais de dois fatores de virulência de <i>SM</i> : SBR de PAc e GBR de GTF-I. A estirpe SL3261 atenuada de <i>ST</i> foi utilizada como vetor de administração por	Após o desafio, os ratinhos imunizados com <i>Salmonella</i> expressando SBR e GBR sob o controlo do promotor <i>CMV-nirB</i> mostraram uma redução significativa no número de <i>SM</i> na placa dentária em	Este estudo mostra a eficácia de uma estratégia de duplo promotor na vacina de ADN anti-cárie ao empregar a <i>Salmonella</i> atenuada como

		proteína antigénica.	via mucosal. A vacina anti-cárie foi administrada i.g. a ratinhos BALB/c para avaliação da eficácia deste regime imunitário. Vacinação de reforço foi feita (semana 16). Um teste de desafio com a estirpe UA159 de <i>SM</i> foi realizado em ratos após a segunda imunização (modelos de infeção).	comparação com os ratinhos imunizados por vetor ou não imunizados. A redução também foi significativa nas semanas 3 a 8 após o desafio, quando comparada com os que receberam clones de <i>Salmonella</i> apenas com o promotor <i>nirB</i> .	veículo de imunização por via mucosal.
<p>Abreviaturas: <i>nirB</i> – Promotor procariótico; <i>CMV</i> – Promotor eucariótico; <i>SM</i> – <i>Streptococcus mutans</i>; <i>SBR</i> – Região de ligação salivar; <i>PAC</i> – Uma proteína fibrilar de superfície celular de <i>SM</i>; <i>GBR</i> – Região de ligação do glucano; <i>GTF-I</i> – Glucosyltransferase-I; <i>ST</i> – <i>Salmonella Typhimurium</i>; i.g. – Intra-gastrointestinal; BALB/c – Rato albino, estirpe imunodeficiente de laboratório.</p>					
Yang <i>et al</i> (2017) Estudo utilizando modelos animais <u>Ensaio pré-clínico</u>	Second-generation Flagellin-rPAC Fusion Protein, KFD2-rPAC, Shows High Protective Efficacy against Dental Caries with Low Potential Side Effects	Construir uma proteína de fusão de segunda geração flagelina-rPAC, para reduzir a antigenicidade da parte flagelina e possíveis efeitos secundários relacionados.	Produção de KFD2-rPAC, através da substituição dos D2 e D3 da KF por rPAC. Os ratinhos BALB/c fêmeas foram divididos aleatoriamente em 4 grupos e imunizados i.n. com rPAC, KF-rPAC, KFD2-rPAC ou PBS sozinho. 2 protocolos de modelos de ratos para avaliar a eficácia do KFD2-rPAC contra as cáries: protocolo A para testar a eficácia profilática e protocolo B para testar o efeito terapêutico.	Em comparação com KF-rPAC, KFD2-rPAC induz respostas de anticorpos específicos de flagelina inferiores mas comparáveis relativamente aos anticorpos específicos de rPAC e confere uma proteção profilática comparável contra cáries em ratos que foram imunizados antes do estabelecimento das cáries.	Baixos efeitos secundários e alta eficácia protetora contra a cárie torna KFD2-rPAC um promissor candidato a vacina contra a cárie.
<p>Abreviaturas: KFD2-rPAC – Proteína de fusão flagelina-RPAC de segunda geração; D2 e D3 – Principais domínios da região de antigenicidade da KF; rPAC – Proteína PAC recombinante (antigénio alvo PAC contendo o fragmento A-P do PAC de <i>SM</i>); BALB/c – Rato albino, estirpe imunodeficiente de laboratório; i.n. – Intranasal; KF-rPAC – Proteína recombinante, é a fusão de KF e rPAC; PBS – Tampão fosfato-salino; Ac(s) – Anticorpo(s).</p>					

<p>Batista <i>et al</i> (2017) Estudo utilizando modelos animais <u>Ensaio pré-clínico</u></p>	<p>LT adjuvant modulates epitope specificity and improves the efficacy of murine antibodies elicited by sublingual vaccination with the N-terminal domain of <i>Streptococcus mutans</i> P1</p>	<p>Avaliar a imunogenicidade, a eficácia protetora de anticorpos criados em ratinhos após imunização sublingual com uma forma recombinante da adesina P1 de <i>SM</i>.</p>	<p>Para imunização sublingual, grupos de 5 animais (BALB/c) foram inoculados com polipéptido recombinante purificado P1³⁹⁻⁵¹², sozinho ou coadministrado com LTK4R, nos dias 1, 15 e 30. As amostras de soro foram colhidas um dia antes da primeira dose (amostra pré-imune), duas semanas após cada dose subsequente e dois meses após a última dose. O sangue foi colhido por punção sub-mandibular.</p>	<p>Indução de respostas sistêmicas e imunitárias da mucosa fortes e duradouras. A incorporação de LTK4R resultou num aumento da atividade anti-adesiva e anti-colonização contra <i>SM</i>, e da capacidade de induzir níveis elevados de Ac(s) específicos e melhorar a produção de células secretoras de IgA específicos.</p>	<p>A administração sublingual de uma vacina de subunidade baseada em P1 com LTK4R representa uma abordagem promissora para a prevenção da cárie dentária causada por <i>SM</i>.</p>
<p>Abreviaturas: LT – Toxina termolábil; P1 – Uma proteína fibrilar de superfície celular de <i>SM</i>; BALB/c – Rato albino, estirpe imunodeficiente de laboratório; <i>SM</i> – <i>Streptococcus mutans</i>; LTK4R – Adjuvante LT mutante (derivados não tóxicos da toxina labílica (LT) produzida por <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica); Ac(s) – Anticorpo(s); P1³⁹⁻⁵¹² – Outro fragmento derivado de P1 gerado em <i>Bacillus subtilis</i>, abrangendo os aminoácidos 39 a 512.</p>					
<p>Bai <i>et al</i> (2019) Estudo <i>in vitro</i></p>	<p>Construction of a fusion anti-caries DNA vaccine in transgenic tomato plants for PACA gene and cholera toxin B subunit</p>	<p>Construir uma vacina de fusão de ADN anti-cárie em plantas de tomate transgénico para PACA gene e a toxina Subunidade B da cólera.</p>	<p>Construção de uma vacina de fusão de ADN anti-cárie (PACa-ctxB) através da fusão do gene codificador PACA de <i>SM</i> com o gene codificador da CTB. Posteriormente, os plasmídeos foram integrados nos genomas do tomate através da tecnologia de transformação vegetal mediada por <i>Agrobacterium</i>. A presença de transgenes no genoma do tomate foi</p>	<p>Os resultados mostraram que os tomates transgénicos podem fornecer um sistema útil para a produção de antigénio de cárie humana.</p>	<p>A utilização de uma vacina vegetal oral é um conceito novo para a criação de vacinas modernas, o que proporciona uma plataforma para investigação e desenvolvimento de medidas preventivas de cáries.</p>

			confirmada por PCR, GUS e WB.		
<p>Abreviaturas: PACA – Região A de proteína de superfície celular PAC; <i>SM</i> – <i>Streptococcus mutans</i>; PACA-ctxB – Vacina de ADN anti-cárie realizada através da fusão do gene codificador PACA de <i>SM</i> com o gene codificador da CTB; PCR – Reação em cadeia da polimerase; GUS – β-glucuronidase; WB – Western Blot; ; CTB – Gene codificador da subunidade B da toxina da cólera.</p>					
Liu <i>et al</i> (2019) Estudo utilizando modelos animais <u>Ensaio pré-clínico</u>	FimH as a mucosal adjuvant enhances persistent antibody response and protective efficacy of the anti-caries vaccine	Investigar se a proteína recombinante FimH-S.T poderia modular a resposta imunológica da vacina anti-cárie <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	FimH recombinante derivada de <i>Salmonella</i> foi construída e purificada. A expressão de marcadores de maturação de células dendríticas e libertação de citocinas foi realizada por citometria de fluxo, PCR em tempo real e ELISA. A ratinhos BALB/c foi administrado PAC, (PAC + FimH-S.T) e (PAC + MPL). Ratos Wistar SPF foram também imunizados para estabelecimento do modelo de cárie <i>in vivo</i> .	FimH-S.T induziu maturação fenotípica de DC2.4 através da regulação da expressão de moléculas coestimuladoras, e provocou produção de citocinas pela via de sinalização dependente de TLR4. Os ratinhos imunizados com (PAC + FimH-S.T) melhoraram os Acs específicos de PAC no soro e na saliva e promoveram a proliferação de esplenócitos.	FimH-S.T recombinante poderia melhorar as respostas específicas de IgA e a proteção da vacina anti-cárie, possuindo a capacidade adjuvante mucosal ao ativar o DC2.4 através da via de sinalização TLR4.
<p>Abreviaturas: FimH – Adesina representativa das fimbrias do tipo 1; FimH-S.T – Proteínas recombinantes derivadas de <i>S. Typhimurium</i>; ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática; BALB/c – Rato albino, estirpe imunodeficiente de laboratório; PAC – Uma proteína fibrilar de superfície celular de <i>SM</i>; (PAC + FimH-S.T) – Vacina anti-cárie PAC mais FimH-S.T; MPL – Monofosforilo lipídico A; DC2.4 – Linha de células dendríticas derivadas de medula óssea murina; TLR4 – Toll-like receptor 4; Ac(s) – Anticorpo(s); SPF – Specific-pathogen-free.</p>					
Bi <i>et al</i> (2019) Estudo utilizando modelos animais <u>Ensaio pré-clínico</u>	The Combinations Chitosan-Pam ₃ CSK ₄ and Chitosan-Monophosphoryl Lipid A: Promising Immune-Enhancing Adjuvants for Anticaries Vaccine PAC	Investigar o efeito de duas combinações adjuvantes da quitosana mais Pam ₃ CSK ₄ (chitosan-Pam ₃ CSK ₄) e da quitosana mais monofosforilo	Expressão e purificação do PAC recombinante. Sete grupos de ratinhos C57BL/6J foram imunizados através da mucosa bucal com OVA, OVA mais MDP, OVA mais quitosana, OVA mais Pam ₃ CSK ₄ , OVA mais MPL ou OVA mais iE-DAP (dia 0), e foram	PAC-chitosan-Pam ₃ CSK ₄ ou PAC-chitosan-MPL promoveu níveis mais elevados de Acs específicos de PAC em soro e saliva, inibiu a colonização por <i>SM</i> nas superfícies	As combinações chitosan-Pam ₃ CSK ₄ e chitosan-MPL são promissoras para o desenvolvimento de vacinas anti-cárie.

		lipídico A (chitosan-MPL) nas respostas imunitárias à proteína PAC <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .	impulsionados (dia 7). Um grupo recebeu apenas PBS. Ratinhos SPF fêmea C57BL/6J, como modelo experimental de cárie, foram alimentados com uma dieta cariogénica (Keyes 2000).	dentárias e conferiu um melhor efeito de proteção com menos atividades de cárie do que apenas PAC.	
<p>Abreviaturas: Pam₃CSK₄ – TLR2 agonista; MPL – Monofosforilo lipídico A; PAC – Uma proteína fibrilar de superfície celular de <i>SM</i>; C57BL/6J – Estirpe congénita comum de ratinho de laboratório; OVA – Ovalbumina; MDP – Dipeptídeo muramil; PBS – Tampão fosfato-salino; SPF – Specific-pathogen-free; Ac(s) – Anticorpo(s); <i>SM</i> – <i>Streptococcus mutans</i>.</p>					
Jia <i>et al</i> (2019) Estudo utilizando modelos animais <u>Ensaio pré-clínico</u>	Enhancing the immunogenicity of a DNA vaccine against <i>Streptococcus mutans</i> by attenuating the inhibition of endogenous miR-9	Aumentar a imunogenicidade de uma vacina de ADN pGLUA-P contra <i>SM</i> atenuando a inibição do miR-9 endógeno.	Construção de pGLUA-P. A esponja de mir-9 foi concebida de acordo com os sítios de ligação mir-9. Ratinhos BALB/c fêmea foram injetados com ADN plasmídico através de injeção em músculo quadríceps. 1 grupo foi imunizado com a mistura de pGLUA-P e esponja de miR-9. 1 grupo foi imunizado com a mistura de vacina de ADN pGLUA-P e esponja de NC. 1 grupo foi imunizado com a mistura de plasmídeo vetorial pCl e esponja de miR-9. 1 grupo foi imunizado com a mistura de plasmídeo vetorial pCl e esponja de NC.	A mutação dos sítios de ligação miR-9 no fragmento de gene que codifica a GLU-A-P aumentou significativamente a expressão da proteína antigénica. A esponja de miR-9 pode melhorar a expressão da GLU-A-P. A coimunização com a esponja de miR-9 e a vacina de ADN anti-cárie melhorou significativamente a resposta imunitária específica <i>in vivo</i> .	Atenuar a inibição da miR-9 endógena melhorou a expressão antigénica e a imunogenicidade da vacina de ADN anti-cárie.
<p>Abreviaturas: pGLUA-P – Vacina de ADN que pode exprimir a proteína antigénica GLU-A-P; <i>SM</i> – <i>Streptococcus mutans</i>; miR-9 – microARN-9, membro da família miRNA; BALB/c – Rato albino, estirpe imunodeficiente de laboratório; NC – Negative control; GLU-A-P – Proteína antigénica, incluindo o domínio de ligação a glucano do glucosiltransferase-I e as regiões ricas em alanina e prolina (A-P) do antígeno da proteína da superfície celular (PAC) de <i>SM</i>.</p>					

4.3- Características dos estudos utilizando modelos animais

A realização prévia da vacina nos estudos utilizando modelos animais está apresentada na tabela 6 segundo o meio de amplificação, meio de purificação do antígeno e condição de cultura/construção do antígeno. As características da amostra estão apresentadas na mesma tabela segundo o modelo animal e tamanho da amostra e a idade e sexo do animal.

Tabela 6- Características da realização do antígeno e características da amostra

Autor e ano	Características da realização do antígeno			Características da amostra	
	Meio de amplificação	Meio de purificação	Condição de cultura / Construção do antígeno	Modelo animal e tamanho da amostra	Idade Sexo
Kim <i>et al</i> , 2012	PCR	Proteína GTFBN: coluna Ni-NTA e tubo de diálise em água destilada.	-Cultura durante a noite a 37°C em 2 mL de meio LB contendo canamicina SMGS-5 foi inoculado em 2 mL de meio BHI.	<u>Imunização:</u> ratinhos BALB/c	4 semanas de idade Fêmeas
Shi <i>et al</i> , 2012	PCR	<u>Plasmídeo:</u> EndoFree Plasmid Maxi Kit <u>FliC e PAc</u> recombinante: cromatografia de afinidade numa coluna Ni-NTA.	Não especificado	<u>Imunização e modelo de cáries:</u> Ratos Wistar n=25, 5 grupos (5 por grupo)	Imunização: 27 dias de idade Fêmeas
Sun <i>et al</i> , 2012	PCR	KF, rPac e KF-rPac purificados com cromatografia de afinidade numa coluna Ni-NTA.	Não especificado	<u>Imunização e modelos de cáries:</u> Ratos Wistar SPF <u>Protocolo A:</u> n=44, 11 grupos (4 por grupo) <u>Protocolo B:</u> n=30, 5 grupos (6 por grupo)	18 dias de idade Fêmeas
Chen <i>et al</i> , 2013			As NPs foram incubadas com DNase I em tampão	<u>Imunização:</u> ratinhos BALB/c	6 a 8 semanas de idade Fêmeas

			de reação a 37°C durante 30 min.	Grupos de 5 (n=10)	
Yan <i>et al</i> , 2013	RT-PCR	Todos os plasmídeos foram isolados e purificados com o EndoFree Plasmid Giga kit.	As células COS-7 foram transfectadas com pCCL19/ GFP utilizando o reagente de transfecção Sofast.	<u>Existência plasmídica e expressão nos DLN e no baço e imunização:</u> ratinhos BALB/c 5 por grupo	6 semanas de idade Fêmeas
Sentila <i>et al</i> , 2013	Não especificado	Método de diálise	A estirpe <i>SM</i> foi cultivada em meio BHI.	<u>Imunização:</u> Galinhas de chifre branco	21 semanas de idade
Su <i>et al</i> , 2014	PCR utilizando o ADNc como modelo	Não especificado	Construção da IL-6 de expressão plasmídica: o ARN total foi separado das DC2.4 e transcrito em ADNc invertido.	<u>Imunização:</u> -Ratinhos BALB/c 2 grupos (8 por grupo) -Ratos Wistar (modelos de cárie) 14 ratos	BALB/c: fêmeas Ratos Wistar: 18 dias
Batista <i>et al</i> , 2014	Não especificado	Não especificado	As estirpes de <i>SM</i> foram cultivadas em meio BHI. Expressão e purificação de P1, fragmentos truncados de P1 e as proteínas adjuvantes (LTK4R e FliC) em estirpes de <i>E. coli</i> ou <i>Bacillus subtilis</i> .	<u>Imunização:</u> ratinhos BALB/c Grupos de cinco ratinhos	6 a 8 semanas de idade Fêmeas
Bao <i>et al</i> , 2015	Não especificado	rPAC e KF-rPAC purificados por cromatografia de afinidade numa coluna Ni-NTA.	Não especificado	<u>Imunização e modelo de cárie:</u> Ratos Wistar SPF <u>Protocolo A:</u> n=30, 6 grupos (5 por grupo)	18 dias de idade Fêmeas

				Protocolo B: n=20, 4 grupos (5 por grupo)	
Ferreira <i>et al</i> , 2015	PCR	BLPstS purificado em HisTrap HP coluna de níquel-resina.	As estirpes de <i>Escherichia coli</i> utilizadas para clonar e expressar o gene PstS foram cultivadas em meio LB. A estirpe <i>SM</i> foi cultivada em meio BHI. BLPstS foram cultivados durante a noite em meio LB, inoculados em 50 ml de meio LB e cultivados.	<u>Imunização:</u> ratinhos BALB/c	6 a 8 semanas de idade Fêmeas
Yan <i>et al</i> , 2016	RT-PCR	Plasmídeos pCCL19/pVAX e pCCL17/pVAX purificados com EndoFree Plasmid Giga kit.	COS-7 foram transfectadas com pCCL19/VAX, pCCL17/VAX ou pVAX1 utilizando o reagente de transfecção Sofast.	<u>Imunização:</u> -Ratinhos BALB/c n= 5 por grupo -Ratos Wistar (modelos de cárie) n= 24, 4 grupos de 6 elementos	BALB/c: 6 semanas de idade, fêmeas Wistar: 18 dias de idade, fêmeas
Sun <i>et al</i> , 2016	PCR	KF-rPac purificada por cromatografia de afinidade numa coluna Ni-NTA.	A estirpe de <i>SM</i> foi cultivada em meio BHI.	<u>Imunização:</u> -Ratinhos BALB/c, n= 30, 5 grupos (6 por grupo) -Ratos Wistar (modelos de cárie), 6 por grupo	BALB/c: 6 a 8 semanas de idade, fêmeas Wistar: 18 dias de idade, fêmeas
Li <i>et al</i> , 2016	O gene <i>wapA</i> foi amplificado a partir do ADN genómico de <i>SM</i>	Proteína de fusão WapA purificada por cromatografia de gel-filtração.	O ADN plasmídico foi isolado de <i>E. coli</i> e transfectado com pVAX1- <i>wapA</i> por um método de lise alcalina modificado utilizando o AxyPrep™ Maxi Plasmid Kit.	<u>Imunização e modelos de cárie:</u> Ratos Sprague-Dawley SPF n= 40, 5 grupos (8 por grupo)	21 dias de idade Fêmeas
St Michael <i>et al</i> , 2017	Não especificado		Os serotipos de <i>SM</i> foram cultivados a partir de meio congelado por	<u>Imunização:</u> Coelhos brancos da Nova	Coelhos brancos: fêmeas

			inoculação de 20 placas de ágar de chocolate Oxoid. Os polissacarídeos foram isolados de acordo com o método de Hamada.	Zelândia e ratinhos BALB/c	Ratinhos BALB/c: 6 a 8 semanas de idade, fêmeas
Jiang <i>et al</i> , 2017	PCR	SBR e GBR recombinantes purificados com HisTrap kit.	-As estirpes bacterianas foram cultivadas rotineiramente a 37 °C em meio LB ou ágar e suplementadas com ampicilina 100µg/ml (LB+amp) quando necessário. SM UA159 foi cultivada em meio BHI.	<u>Imunização:</u> Ratinhos BALB/c SPF n= 48, 4 grupos de 12 <u>Modelo de infecção:</u> Ratinhos BALB/c SPF n= 24, 4 grupos de 6	6 a 8 semanas de idade Fêmeas
Yang <i>et al</i> , 2017	Não especificado	KF, rPac, KF-rPac e KFD2-rPac purificados por cromatografia de afinidade numa coluna Ni-NTA.	O gene fliC da estirpe <i>E. coli</i> e o fragmento A-P da proteína Pac codificada pelo gene pac de <i>SM</i> foram obtidos a partir de pesquisas anteriores. O gene fliC truncado, kfd2, foi obtido a partir de um estudo anterior do autor.	<u>Determinação de citocina no soro e detecção (para bioensaio):</u> ratinhos C57BL/6 (para determinação de citocina pode-se utilizar BALB/c) <u>Imunização:</u> ratinhos BALB/c, n=24, 4 grupos de 6 <u>Imunização, modelo de cárie e análise dos Acs:</u> ratos Wistar SPF	C57BL/6 e BALB/c: 6 a 8 semanas de idade, fêmeas Wistar: 18 dias de idade, fêmeas
Batista <i>et al</i> , 2017	Não especificado	O antígeno da vacina P1 ₃₉₋₅₁₂ foi purificado a partir da estirpe de expressão <i>Bacillus subtilis</i> .	A estirpe <i>SM</i> foi cultivada em meio Todd-Hewitt ou em meio BHI. O <i>Bacillus subtilis</i> recombinante foi	<u>Imunização:</u> ratinhos BALB/c 5 ratinhos por grupo	6 a 8 semanas de idade Fêmeas

		O adjuvante LTK4R foi purificado a partir de uma estirpe de <i>E. coli</i> .	cultivado aerobicamente a 37°C com agitação constante em meio LB.		
Liu <i>et al</i> , 2019	PCR	A purificação da proteína recombinante FimH-S.T foi realizada por uma resina de ligação Ni-NTA His.	A FimH-S.T recombinante foi expressa em <i>E. coli</i> com 0,1mM IPTG durante a noite a 16°C.	<u>Imunização:</u> -Ratinhos BALB/c (para análise dos Acs), n= 32, 4 grupos de 8 -Ratos Wistar SPF, n=24, 4 grupos de 6	BALB/c: 6 a 8 semanas de idade, fêmeas Wistar: 18 dias de idade, fêmeas
Bi <i>et al</i> , 2019	Não especificado	PAC foi purificado usando uma resina ligante Ni-NTA His com imidazol.	PAC foi expresso em <i>E. coli</i> contendo o plasmídeo recombinante pET20b(+)-AP.	<u>Imunização e modelos de cárie:</u> Ratinhos C57BL/6J	6 a 8 semanas Fêmeas
Jia <i>et al</i> , 2019	Não especificado	O ARN total incluindo microARN foi purificado utilizando o miRNeasy Kit.	O método PCR de extensão de sobreposição foi utilizado para a mutação dos locais de ligação miR-9 no fragmento GLUA-P.	<u>Imunização:</u> Ratinhos BALB/c 4 grupos	6 semanas de idade Fêmeas

As características de cada intervenção realizada nos estudos foram resumidas na tabela 7, segundo o tipo de injeção, o antigénio e a dose injetada, o antibiótico administrado na dieta, a infeção dos modelos animais de CFU de *SM* e o método de recolha de sangue ou da saliva para futura análise dos anticorpos.

Tabela 7- Características da intervenção nos modelos animais

Autor e ano	Tipo de injeção	Antigénio e Dose injetada	Antibiótico	CFU	Método de recolha de sangue ou da saliva
Kim <i>et al</i> , 2012	- Por via intravenosa	-1º imunização: FCA e proteína GTFBN (cerca de 80 mg em PBS).			

	(1° imunização) - s.c. (2° e 3° imunizações)	-2° imunização: FIA mais GTFBN -3° imunização: antigénio emulsionado no FIA (80 mg em PBS)			
Shi <i>et al</i> , 2012	i.n.	pVAX1 (100 µg), FliC (20 µg), pGJA-P/ VAX (100 µg), pGJA- P/VAX (100 µg) + FliC (10 µg), ou pGJA-P/VAX (100 µg) + FliC (20 µg)	ampicilina, cloranfenicol e carbenicilina	2 × 10 ⁹ CFU de <i>SM</i>	Ratinhos anestesiados foram sangrados a partir do plexo retro-orbital. Foram recolhidas amostras de saliva após a injeção i.p. de cada rato com carbacol em PBS para estimulação do fluxo de saliva.
Sun <i>et al</i> , 2012	i.n.	-1° protocolo: KF + rPAC ou KF-rPAC equivalente à mole de 0, 1, 2.5, 5, 10, ou 20 µg rPAC. -2° protocolo: PBS, KF (3.5 µg), rPAC (5 µg), KF (3.5 µg) mais rPAC (5 µg), ou KF-rPAC (8.5 µg)	ampicilina, cloranfenicol e carbenicilina (2° protocolo)	2 × 10 ⁹ CFU de <i>SM</i> (2° protocolo)	
Chen <i>et al</i> , 2013	-i.n. -i.m.	ADN nu, ADN nu, CS/DNA, AL/ CS/DNA e grupo PBS. Cada animal foi inoculado com 25 mg de plasmídeo pGJA-P/VAX em pequenas gotas. Os animais também foram imunizados com 25 mg de plasmídeo pGJA-P/VAX em HEPES.			Cada animal foi injetado com solução de pilocarpina estéril (10 mg/mL) a fim de recolher amostras de saliva. O sangue foi colhido por punção retro-orbital com uma seringa.
Yan <i>et al</i> , 2013	i.m. (músculo quadríceps)	-pCIA-P (100 µg) mais adjuvantes plasmídeos quimiocinéticos (100 µg) -pCIA-P (100 µg) mais o vector pAcGFP1-N1 (100 µg) ou PBS (100 µL)			O sangue periférico foi recolhido do plexo retro- orbital com uma seringa. O soro foi obtido por centrifugação.

Sentila <i>et al</i> , 2013	i.m.	-1º imunização: 1 mL de suspensão antigénica preparada emulsificando 0,5 mL de GTF do <i>SM</i> com um volume igual de FCA. -2º imunização: mesma via e volume que a primeira imunização, mas a FCA foi substituída por FIA.			
Su <i>et al</i> , 2014	i.n.	pCIAP mais pCI IL6 (1º grupo) pCIAP mais pCI vector (2º grupo) Total de 25 µL de cada plasmídeo	ampicilina, cloranfenicol e carbenicilina (na dieta dos ratos e não na dos ratinhos)	2 × 10 ⁹ CFU de <i>SM</i> (infecção nos ratos)	O sangue periférico foi recolhido da veia angular com uma agulha de seringa de 1 mL As amostras de saliva foram colhidas após estimulação com injeção i.p.de pilocarpina.
Batista <i>et al</i> , 2014	s.c.	10 µg de proteína P139-512 (por animal) misturada com 12,5 µg de hidróxido de alumínio, 1 µg de LTK4R, ou 5 µg de FliC. Os grupos controlo foram imunizados com PBS.		3 × 10 ⁹ CFU de <i>SM</i> foram aplicadas a cada ratinho com micropipeta	Os ratinhos foram sangrados por punção submandibular. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente durante 30 min e depois incubadas durante mais 30 min a 4°C.
Bao <i>et al</i> , 2015	i.n.	PBS, rPAC (5 µg), ou KF-rPAC (8.5 µg)	ampicilina, cloranfenicol e carbenicilina	2 × 10 ⁹ CFU de <i>SM</i>	Ratinhos anestesiados foram sangrados a partir do plexo retro-orbital. Foram recolhidas amostras de saliva após a injeção i.p. de cada ratinho com carbacol em PBS para estimulação do fluxo de saliva.
Ferreira <i>et al</i> , 2015	Sublingual	5 µg da proteína rPstS intacta sozinha ou combinada com 1 µg do LTK4R ou PBS para o grupo controlo.		Desafio de colonização oral contra ratinhos imunizados.	Foram recolhidas amostras de sangue por punção submandibular.

Yan <i>et al</i> , 2016	i.n.	pCCL17/VAX (50 µg) mais pVAX1 (50 µg), pCCL19/VAX (50 µg) mais pVAX1 (50 µg), pCCL17/VAX (50 µg) mais pCCL19/VAX (50 µg), ou pVAX1 (100 µg). 24h depois, 100 µg de pCIAP foram entregues	ampicilina, cloranfenicol e carbenicilina (só nos modelos de ratos)	2 × 10 ⁹ CFU de <i>SM</i> (só nos modelos de ratos)	O sangue periférico foi recolhido do plexo retro-orbital. As amostras de saliva foram colhidas após a estimulação do fluxo de saliva por injeção i.p. de pilocarpina.
Sun <i>et al</i> , 2016	i.n.	-Imunização dos ratinhos: PBS, KF (0,7 mg), rPac (1 mg), KF (0,7 mg) mais rPac (1 mg), KF-rPac (1,7 mg) -Imunização dos ratos: PBS, KF (3,5 mg), rPac (5 mg), KF (3,5 mg) mais rPac (5 mg), KF-rPac (8,5 mg)		2 × 10 ⁹ CFU de <i>SM</i> (só nos modelos de ratos)	
Li <i>et al</i> , 2016	-i.n. -i.m.	100 µg de nanopartículas pVAX1- <i>wapA</i> /CSTM, pVAX1- <i>wapA</i> , nanopartículas pVAX1/CSTM (todas i.m.) ou 100 µg de nanopartículas pVAX1- <i>wapA</i> /CSTM, nanopartículas pVAX1/CSTM (todas i.n.)	ampicilina, cloranfenicol e carbenicilina (só nos modelos experimentais para cárie)	2 × 10 ⁹ CFU de <i>SM</i> (só nos modelos experimentais para cárie)	Foram recolhidas amostras de sangue do plexo retro-orbital. As amostras de saliva foram colhidas após a injeção de pilocarpina i.p.
St Michael <i>et al</i> , 2017	-s.c. (coelhos) -i.p. (ratinhos BALB/c)	-Imunização dos coelhos: 50 µg de carboidratos conjugados com FIA. -Imunização dos ratinhos: 10 µg de carboidratos conjugados com o adjuvante Sigma			-Coelhos: soros recuperados após hemorragia experimental da artéria timpânica anterior e através de punção terminal do coração. -Ratinhos: punção terminal do coração.
Jiang <i>et al</i> , 2017	i.g.	pCN-SS/SG ou pNir-SS/SG ou pCMVnir	Penicilina G, ampicilina, cloranfenicol e carbenicilina	Imunização: 5 × 10 ⁹ CFU de clone da vacina de <i>S. typhimurium</i>	As amostras de soro foram obtidas a partir de sangue colhido do plexo retro-orbital. As amostras de saliva foram colhidas após a

			(só no modelo de infeção)	em 0,2 ml de PBS Modelo de infeção: 2 × 10 ⁹ CFU de <i>SM</i>	estimulação do fluxo de saliva por injeção i.p. de pilocarpina.
Yang <i>et al</i> , 2017	i.n.	-Imunização dos ratinhos (modelo de cárie): rPAC (1 µg), KF-rPAC (1.7 µg), KFD2-rPAC (1.4 µg) ou PBS. -Imunização dos ratos: rPAC (5 µg), 5 µg de rPAC equivalente mole de 8,5 µg de KF-rPAC, KFD2-rPAC (7 µg), ou PBS.	Os ratos foram alimentados com antibióticos durante 3 dias consecutivos.	2 × 10 ⁹ CFU de <i>SM</i> (só no modelo de cárie)	
Batista <i>et al</i> , 2017	Sublingual	polipéptido recombinante purificado P1 ₃₉₋₅₁₂ (5 mg/dose), sozinho ou coadministrado com LTK4R (1 mg/dose)		1 × 10 ⁸ CFU de <i>SM</i>	O sangue foi recolhido por punção sub-mandibular. Para amostras de saliva, os animais foram injetados i.p. com pilocarpina.
Liu <i>et al</i> , 2019	i.n.	-Imunização dos ratinhos e dos ratos: PBS como controlo negativo, 50 µg PAC, 50 µg PAC + 10 µg FimH-S.T e 50 µg PAC + 10 µg MPL	Penicilina G, ampicilina, cloranfenicol e carbenicilina (só no modelo de cárie: ratos)	2 × 10 ⁹ CFU de <i>SM</i> (só no modelo de cárie)	Para a recolha de amostras de saliva: estimulação do fluxo salivar por injeção i.p. com pilocarpina. As amostras de sangue foram colhidas do plexo retro-orbital.
Bi <i>et al</i> , 2019	Submucosal	Imunização dos ratinhos: 100 µg de OVA, OVA mais 40 µg de MDP, OVA mais 32 µg de quitosana, OVA mais 25 µg de Pam ₃ CSK ₄ , OVA mais 15 µg de MPL, ou OVA mais 50 µg de iE-DAP. Imunização dos ratos: 50 µg de PAC, PAC mais 32 µg de quitosana, PAC mais 15 µg de MPL, PAC mais 25 µg de Pam ₃ CSK ₄ , PAC-chitosan-	ampicilina, cloranfenicol e carbenicilina (só no modelo de cárie: ratos)	2 × 10 ⁹ CFU de <i>SM</i> (só no modelo de cárie: ratos)	Estimulação do fluxo salivar por injeção i.p. de cada ratinho com pilocarpina. Foram colhidas amostras de sangue do plexo retro-orbital.

		Pam ₃ CSK ₄ , PAc-chitosan-MPL, ou PBS			
Jia <i>et al</i> , 2019	I.m.	1º grupo: mistura de pGLUA-P e esponja de miR-9 (100 µg de cada plasmídeo) 2º grupo: mistura de vacina de ADN pGLUA-P e esponja de NC (100 µg de cada plasmídeo) 3º grupo: mistura de plasmídeo vetorial pCI e esponja de miR-9 (100 µg de cada plasmídeo) 4º grupo: mistura de plasmídeo vetorial pCI e esponja de NC (100 µg de cada plasmídeo)			O sangue periférico foi recolhido do plexo retro-orbital.

Outros dados e resultados importantes são apresentados na tabela 8: o método de análise de anticorpos utilizado, os anticorpos produzidos pelo organismo após a injeção, o fenómeno bloqueado para evitar a cárie e a análise estatística.

Tabela 8- Outras características e resultados encontrados nos estudos realizados em modelos animais

Autor e ano	Método de análise dos Acs	Acs produzidos	Fenómeno bloqueado	Método de comparação
Kim <i>et al</i> , 2012	ELISA, dot blot, western blot	IgG (IgG2a)	Agregação	Os valores médios e o SEM foram analisados estatisticamente usando a Origem 7. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de $p < 0,05$.
Shi <i>et al</i> , 2012	ELISA	IgG, IgA	Agregação, colonização	Respostas específicas de Acs, contagem de CFU e proteção contra a cárie foram comparadas entre grupos por ANOVA. Foi utilizado o teste de correlação de classificação Spearman. As diferenças foram mostradas em $p < 0,05$ ou $p < 0,01$.

Sun <i>et al</i> , 2012	Método de Keyes	IgG, IgA	Colonização	Toda a análise de dados foi realizada com ANOVA. Foram feitas comparações em pares pelo teste de Dunnett
Chen <i>et al</i> , 2013	ELISA	IgG, IgA	Agregação, colonização	As diferenças entre os diferentes grupos foram determinadas pela ANOVA. As comparações foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ e altamente significativas quando $p < 0,01$.
Yan <i>et al</i> , 2013	ELISA	IgG	Colonização	As diferenças nas percentagens foram determinadas por ANOVA seguida de comparações utilizando o teste Student-Newman-Keuls. $p < 0,05$ foi considerado significativo.
Sentila <i>et al</i> , 2013	ELISA	IgY	Agregação	
Su <i>et al</i> , 2014	ELISA	IgG, IgA	Colonização	As diferenças foram determinadas pelo teste t de Student's. As diferenças foram consideradas significativas em $p < 0,05$ e altamente significantes em $p < 0,01$.
Batista <i>et al</i> , 2014	ELISA	IgG (IgG2a, IgG2b)	Colonização	As diferenças estatisticamente significativas foram determinadas por ANOVA, e por pós-testes de comparação múltipla de Bonferroni.
Bao <i>et al</i> , 2015	ELISA	IgG, IgA	Colonização	Todas as análises de dados foram realizadas por ANOVA. Quando o valor de p era significativo ao nível de 5%, foram feitas comparações em pares entre o grupo experimental e as condições de controlo utilizando o teste de comparação múltipla de Bonferroni.
Ferreira <i>et al</i> , 2015	ELISA (IgG, IgG2a, IgG1) Ensaio ELISPOT (IgA)	IgG (IgG2a, IgG1) IgA	Colonização	As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ e altamente significantes quando $p < 0,01$ e foram determinadas por ANOVA, seguida do pós-teste de Bonferroni.
Yan <i>et al</i> , 2016	ELISA	IgG, IgA	Colonização	As diferenças foram determinadas por ANOVA, seguida de comparações utilizando o teste Student-Newman-Keuls. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.
Sun <i>et al</i> , 2016	ELISA	IgG, IgA	Colonização	Todas as análises de dados foram realizadas por ANOVA. Quando o valor p era significativo ao nível de 5%, foram feitas comparações entre o grupo

				experimental e as condições de controlo utilizando o teste de comparação múltipla de Bonferroni.
Li <i>et al</i> , 2016	ELISA	IgG, IgA	Agregação, colonização	As médias do grupo foram comparadas por ANOVA. $p < 0,05$ foi presumido refletir uma diferença estatisticamente significativa entre os valores médios do grupo.
St Michael <i>et al</i> , 2017	Imunofluorescência	IgG		
Jiang <i>et al</i> , 2017	ELISA	IgG (IgG2a, IgG1) IgA	Agregação, colonização	Os dados foram avaliados por análise da ANOVA. $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.
Yang <i>et al</i> , 2017	ELISA	IgG, IgA	Colonização	Todas as análises de dados foram realizadas por ANOVA. Quando o valor p era significativo ao nível de 5%, foram feitas comparações entre o grupo experimental e as condições de controlo utilizando o teste de Tukey para comparações múltiplas.
Batista <i>et al</i> , 2017	ELISA (IgG, Ig2a, IgG1) Ensaio ELISPOT (IgA)	IgG (IgG2a, IgG1), IgA	Colonização	As diferenças estatisticamente significativas foram determinadas por ANOVA e pós-teste de Bonferroni. $p < 0,05$ foi considerado significativo.
Liu <i>et al</i> , 2019	ELISA	IgG (IgG2a, IgG1), IgA	Colonização	ANOVA ou um teste t de Student foi utilizado para comparar as diferenças entre os diferentes grupos. As diferenças foram mostradas em $p < 0,05$ ou $p < 0,01$.
Bi <i>et al</i> , 2019	ELISA	IgG (IgG2b, IgG1), IgA	Colonização	Os dados foram avaliados utilizando ANOVA ou um teste t de Student. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.
Jia <i>et al</i> , 2019	ELISA	IgG	Agregação, colonização	As diferenças nas concentrações relativas de anticorpos séricos entre quatro grupos de ratinhos foram analisadas utilizando ANOVA seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas. Foram calculadas comparações estatísticas de meios de dois grupos com o teste t de Student.

4.4- Análise de qualidade dos estudos incluídos

Como mencionado anteriormente, muitos estudos têm sido feitos para melhorar várias vacinas existentes de várias maneiras diferentes.

4.4.1- Os adjuvantes

Os adjuvantes representam outro componente essencial das vacinas ⁽¹²⁾. Estudos recentes têm investigado a utilização de adjuvantes para melhorar a eficácia imunológica das vacinas de ADN ⁽⁵⁾.

- A este respeito, os derivados não tóxicos da toxina lábil (LT) produzida pela *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), como o LTK4R, representam uma das alternativas mais poderosas disponíveis até agora ⁽¹²⁾. Estudos que apresentam o adjuvante LTK4R: Batista *et al* (2017) ⁽¹⁷⁾, Batista *et al* (2014) ⁽⁹⁾, Ferreira *et al* (2015) ⁽²¹⁾.
- O monofosforil lipídico A (MPL), um agonista do TLR4, foi licenciado na Europa e utilizado como componente de uma vacina melhorada em muitos estudos. A atividade adjuvante do MPL é principalmente atribuída à sua capacidade de desencadear a produção de citocinas, anticorpos e ativação de células T citotóxicas ⁽⁷⁾. Este adjuvante é utilizado na preparação de uma vacina anti-cárie nos estudos de Liu *et al* (2019) ⁽¹³⁾, Bi *et al* (2019) ⁽¹⁹⁾.
- FCA e FIA são também adjuvantes utilizados em alguns estudos, como, por exemplo, nos estudos de Kim *et al* (2012) ⁽²²⁾, Sentila *et al* (2013) ⁽³⁾, St Michael *et al* (2017) ⁽²⁾, Jiang *et al* (2017) ⁽¹²⁾, Batista *et al* (2014) ⁽⁹⁾.
- As quimiocinas ligantes CCL17 e CCL19 foram utilizadas como adjuvantes nos estudos de Yan *et al* ^(10,11), nos quais foi demonstrado que a combinação de CCL17 e CCL19 com o antigénio pCIA-P melhorou a resposta de anticorpos específicos do PAc em ratos.
- Um dos passos recentes na utilização da imunização passiva contra a cárie dentária é a geração de anticorpos em plantas transgênicas ⁽²³⁾ como no estudo de Bai *et al* (2019) ⁽¹⁾, que destaca a construção de uma vacina de ADN de fusão anti-cárie em plantas de tomate transgênico, através da combinação do gene codificador da subunidade B da toxina da cólera (CTB) como adjuvante e PAcA.
- No estudo de Liu *et al* (2019) ⁽¹³⁾, foi avaliado o efeito do adjuvante mucosal FimH-S.T, derivado de *Salmonella typhimurium* sobre as respostas específicas dos anticorpos PAc, a proliferação de esplenócitos e a formação de lesões de cárie em ratos. De facto, investigações recentes relataram que o FimH purificado conseguiu ligar-se diretamente ao TLR4 e induziu uma potente produção de citocinas pró-inflamatórias em células imunitárias, tais como macrófagos e células NK.

- A quitosana possui vantagens como portador de vacinas devido à sua atividade imunoestimuladora e propriedades bio-adesivas que aumentam a absorção e a permeabilização celulares, bem como a proteção antigénica ⁽⁵⁾. A quitosana é ensaiada como adjuvante no estudo de Bi *et al*/(2019) ⁽¹⁹⁾. CSTM, um derivado da quitosana, foi estudado como adjuvante na administração da vacina no trabalho de Li *et al*/(2016) ⁽⁵⁾. O estudo de Chen *et al*/(2013) ⁽⁴⁾ visa melhorar a entrega do antigénio e assim o efeito da vacina combinada com o adjuvante quitosana, incorporando lipossomas aniónicos no complexo quitosana/ADN. Esta melhoria da entrega do antigénio é obtida graças às características únicas destes lipossomas, incluindo propriedades bio-adesivas, eficácia no transporte de antigénios através da abertura transitória de junções apertadas de células, biocompatibilidade e baixa toxicidade ⁽⁴⁾.
- A flagelina é o ligante do recetor semelhante a Toll 5 (TLR5), que é um dos recetores do padrão molecular associado ao agente patogénico. Como potente ativador imunitário, a flagelina provou ser um adjuvante mucosal eficaz em muitas vacinas contra agentes patogénicos ⁽¹⁷⁾. Diversos estudos, como os de Batista *et al*/(2014) ⁽⁹⁾, Bao *et al*/(2015) ⁽¹⁴⁾, Sun *et al*/(15,20), Shi *et al*/(2012) ⁽⁸⁾ e Yang *et al*/(2017) ⁽¹⁸⁾, têm utilizado este adjuvante. A flagelina pode ser derivada da *Escherichia coli* (neste caso, será chamada KF) ou da *Salmonella* (neste caso, será chamada FliC).
- As citocinas como adjuvantes da vacina intranasal são utilizadas para melhorar a imunogenicidade da vacina de ADN devido aos seus efeitos potentes sobre a imunidade inata e adaptativa, bem como a diversidade funcional das respostas imunitárias ⁽¹⁶⁾. No estudo de Su *et al*/(2014) ⁽¹⁶⁾, a citocina IL-6 é utilizada como adjuvante.

4.4.2- Construção de nanopartículas

As nanopartículas preparadas a partir de biomateriais oferecem várias vantagens em relação a outros sistemas de entrega de antigénios. Por exemplo, podem proteger o ADN da degradação *in vitro* e *in vivo* e melhorar a eficiência da transfecção, reduzindo assim a dose necessária para alcançar uma resposta imunitária melhorada ⁽⁵⁾ como foi demonstrado no estudo de Li *et al*/(2016) ⁽⁵⁾. As nanopartículas podem também fornecer uma solução ideal para aliviar os problemas associados à administração nasal de vacinas de ADN ⁽⁴⁾, como foi observado no estudo de Chen *et al*/(2013) ⁽⁴⁾.

4.4.3- Comparações realizadas nos artigos

Em alguns artigos, há uma comparação entre diferentes métodos de administração de antígenos para ver qual é mais eficaz e qual resulta numa maior produção de anticorpos:

- No estudo de Li *et al* (2016) ⁽⁵⁾ foi demonstrado que os níveis de anticorpos anti-WapA IgA e IgG após injeção intranasal são significativamente mais elevados do que os produzidos após injeção intramuscular. Também as lesões por cárie foram significativamente mais baixas em ratos imunizados com nanopartículas pVAX1-*wapA*/CSTM intranasalmente em comparação com ratos imunizados com o mesmo antígeno por via intramuscular.
- No estudo de Chen *et al* (2013) ⁽⁴⁾ foi demonstrada uma resposta sérica forte, que durou pelo menos 12 semanas nos ratinhos vacinados via administração intramuscular.

Outros estudos comparam os diferentes resultados em função dos antígenos administrados que sejam coadministrados, combinados com adjuvantes ou sozinhos, para ver que forma produz os melhores resultados:

- No estudo de Shi *et al* (2012) ⁽⁸⁾ foram demonstrados os seguintes resultados: os níveis de IgG sérica específica de PAc e IgA salivar específica de PAc eram significativamente mais elevados nos grupos pGJA-P/VAX mais FliC. A contagem de CFU foi significativamente menor em grupos pGJA-P/VAX mais FliC do que no grupo pGJA-P/VAX. Grupos pGJA-P/VAX mais FliC tiveram pontuações significativamente mais baixas de cárie de esmalte do que grupos pGJA-P/VAX. Em relação às lesões do esmalte, grupos pGJA-P/VAX mais FliC tiveram pontuações significativamente mais baixas de cárie de esmalte do que as do grupo pGJA-P/VAX. A análise destes dados mostrou que a proteína recombinante FliC, utilizada juntamente com pGJA-P/VAX, reforçou a capacidade da pGJA-P/VAX de inibir a colonização por *Streptococcus mutans* em superfícies de dentes de ratos e promoveu a capacidade de reduzir as lesões por cárie.
- No estudo de Sun *et al* (2012) ⁽²⁰⁾, os resultados mostraram que a proteína de fusão KF-rPAc induziu a produção de IL-8 e MCP-1. A proteína KF-rPAc induziu respostas significativamente mais elevadas de IgG sérica específica de rPAc, IgA sérica, e IgA salivar do que a mistura de KF e rPAc com dose de rPAc equivalente. Foram observadas menos lesões significativas por cárie, incluindo lesões do esmalte, lesões dentinárias

ligeiras e lesões dentinárias moderadas do que nos ratos imunizados com PBS, KF, rPAC, e KF + rPAC. Em comparação com os ratos imunizados com PBS, os que foram imunizados com a proteína de fusão KF-rPAC exibiram 64,2% de redução de cárie, enquanto os ratinhos imunizados com KF + rPAC ou rPAC mostraram apenas 19,7% e 2,2% de redução, respetivamente.

- No estudo de Chen *et al* (2013) ⁽⁴⁾, foi demonstrado que o AL/CS/DNA protegeu eficazmente o ADN contra a degradação pela DNase I, enquanto o ADN nu foi facilmente digerido por uma baixa concentração de DNase I. Foram verificados melhores resultados de transfecção com AL/CS/DNA do que com CS/DNA. O AL/CS/DNA apresentou uma capacidade adesiva mais poderosa do que o CS/DNA. Estes resultados forneceram a evidência de que o AL/CS/DNA é mais poderoso a penetrar na camada da mucosa. Além disso, a resposta IgG específica do grupo AL/CS/DNA, em comparação com o grupo CS/DNA, apresentou significância estatística apenas na semana 4. Estes resultados indicaram que o AL/CS/DNA é um sistema atrativo de entrega de vacinas de ADN para a indução de respostas fortes da mucosa.
- No estudo de Yan *et al* (2013) ⁽¹¹⁾, foi observado um aumento na resposta de anticorpos anti-PAC IgG séricas no grupo coadministrado (pCIA-P mais pCCL19/GFP) durante todo o período experimental, que foi significativamente diferente do grupo controlo (pCIA-P). Os ratinhos que foram coimunizados com a pCCL19/GFP demonstraram níveis de IFN- γ significativamente mais elevados em comparação com os outros grupos.
- No estudo de Su *et al* (2014) ⁽¹⁶⁾, a expressão plasmídica foi confirmada por Western blot, que mostrou que a expressão de IL-6 no grupo de imunização pCIA-P mais pCI-IL-6 (grupo experimental) foi mais elevada do que a do grupo de imunização pCIA-P mais pCI (grupo controlo). Os níveis médios de anticorpos IgG específicos séricos do grupo experimental (coimunização com IL-6) foram significativamente mais elevados do que os do grupo controlo. Os níveis de anticorpos IgA específicos da saliva no grupo experimental foram significativamente mais elevados do que no grupo controlo. Os ratos imunizados com pCIA-P mais pCI-IL-6 mostraram uma produção significativamente mais elevada de IFN- γ com comparação com o grupo controlo. O grupo experimental apresentou pontuações de cárie mais baixas do que o grupo controlo.
- No estudo de Batista *et al* (2014) ⁽⁹⁾, foi demonstrado que a coadministração de adjuvantes, particularmente o alúmen e o LT, aumentou significativamente as respostas

sistémicas de IgG contra P1. Ratinhos imunizados com P1₃₉₋₅₁₂ combinado com adjuvantes (alúmen e LT) mostraram não só um aumento das quantidades de IgG1, mas também maiores quantidades de IgG2a e/ou IgG2b. Os anticorpos criados em ratinhos imunizados com P1₃₉₋₅₁₂ misturado com alúmen mostraram menor reatividade a *SM* do que os anticorpos em amostras colhidas de animais imunizados com P1₃₉₋₅₁₂. Em contraste, os anticorpos em soros recolhidos de animais imunizados com LT e FliC foram mais reativos a *SM* do que em soros de ratinhos imunizados com P1₃₉₋₅₁₂. Os adjuvantes aumentam a capacidade de neutralização de anticorpos anti- P1₃₉₋₅₁₂ *in vivo*.

- No estudo de Bao *et al* (2015) ⁽¹⁴⁾, O KF-rPac induziu respostas significativamente mais elevadas de IgG sérico específico de Pac, IgA sérico, e IgA salivar do que apenas o rPac com dose de Pac equivalente. A eficácia de inibição da cárie do grupo vacinado KF-rPac foi significativamente superior à do grupo vacinado com rPac sozinho.
- No estudo de Ferreira *et al* (2015) ⁽²¹⁾, a coadministração da rPstS com o LTK4R aumentou os níveis da subclasse de anticorpos IgG2a e IFN- γ , o que estimula os mecanismos da resposta imunitária celular.
- No estudo de Yan *et al* (2016) ⁽¹⁰⁾, no grupo coadministrado pCCL17/VAX e pCCL19/VAX, as respostas de anticorpos IgA salivares e IgG séricos específicos de Pac foram significativamente melhoradas em comparação com o grupo pCCL17/VAX ou melhoradas no grupo coadministrado só para os anticorpos IgG séricos em comparação com o grupo pCCL19/VAX. Assim, em comparação com o primeiro estudo de Yan *et al* (2013) onde apenas o plasmídeo pCCL19 foi administrado com o antigénio, este estudo mais recente do mesmo autor mostra que a coadministração de pCCL19/VAX com pCCL17/VAX melhora ainda mais a resposta imunológica.
- No estudo de Sun *et al* (2016) ⁽¹⁵⁾, foram observadas significativamente menos cáries nos ratos imunizados com a proteína de fusão KF-rPac do que nos que foram imunizados com PBS, KF, rPac, e KF + rPac. KF-rPac induziu as respostas mais elevadas de anticorpos IgG e IgA no soro e IgA na saliva.
- No estudo de Li *et al* (2016) ⁽⁵⁾, foi observado que os níveis de anticorpos IgG específicos no soro dos grupos de nanopartículas pVAX1- *wapA*/CSTM foram superiores aos dos grupos pVAX1- *wapA*. Os níveis de IgA específico nos grupos de nanopartículas pVAX1- *wapA*/CSTM foram significativamente mais elevados do que nos grupos imunizados com pVAX1- *wapA*.

- No estudo de Jiang *et al* (2017) ⁽¹²⁾, foi observado através da análise dos resultados, que respostas específicas de anticorpos IgA salivares a SBR e GBR induzidas em ratinhos que receberam clones de *Salmonella* contendo ou o plasmídeo pCN-SS/SG ou o pNir-SS/SG foram significativamente superiores às dos controlos pCMVnir-imunizados ou não imunizados. As respostas específicas de IgA a SBR ou GBR pelos anticorpos IgA salivares em ratinhos imunizados com SL3261/pCN-SS/SG foram também significativamente aumentadas após a imunização e significativamente mais elevadas do que as observadas nos que receberam SL3261/pNir-SS/SG. Os ratinhos que receberam clones de *Salmonella* contendo pCN-SS/SG ou pNir-SS/SG mostraram uma redução significativa ($p < 0,01$) na colonização por *SM* em comparação com os ratinhos falso-imunizados, que receberam SL3261/pCMVnir. Estes resultados demonstraram a eficácia da estratégia de duplo promotor *CMV-nirB* numa vacina contra a colonização da cavidade oral por *SM*.
- No estudo de Yang *et al* (2017) ⁽¹⁸⁾, foi observada uma produção significativamente maior de IL-6 e IFN- γ nos grupos imunizados com KF-rPAC ou KFD2-rPAC em comparação com o grupo rPAC. KFD2-rPAC foi menos eficiente na indução de IL-6 e IFN- γ do que KF-rPAC a 1 nM de concentração. Isto demonstrou que o KFD2-rPAC tem atividade agonista de TLR5, mas menos eficiente do que o seu homólogo de primeira geração, KF-rPAC. Os anticorpos induzidos por KFD2-rPAC ou KF-rPAC foram 100 vezes mais elevados do que os induzidos apenas por rPAC. Soros de ratinhos imunizados com KFD2-rPAC inibiram eficazmente a formação de biofilme quando comparados com soros de ratinhos imunizados com PBS ou rPAC. Mais importante, a eficácia inibidora dos soros de ratinhos imunizados com KFD2-rPAC foi a mesma que a dos ratinhos imunizados com KF-rPAC. Foram observadas pontuações de cárie total significativamente mais baixas nos ratos imunizados com proteína KF-rPAC ou KFD2-rPAC do que nos ratos imunizados apenas com PBS ou com rPAC.
- No estudo de Batista *et al* (2017) ⁽¹⁷⁾, foi demonstrado o seguinte: os ratinhos imunizados com P1₃₉₋₅₁₂ e LTK4R desenvolveram respostas IgG séricas específicas de P1₃₉₋₅₁₂ que persistiram durante pelo menos dois meses após o fim do regime de imunização, em contraste com os ratinhos imunizados com a proteína P1₃₉₋₅₁₂ sem LTK4R. Ratinhos imunizados com P1₃₉₋₅₁₂ misturados com LTK4R obtiveram níveis aumentados de IgG2a e uma relação IL6/IFN- γ mais baixa. A imunização com P1₃₉₋₅₁₂ coadministrada com LTK4R aumentou significativamente a geração de anticorpos capazes de impedir a colonização

oral por *SM*. A coadministração do adjuvante mucoso LTK4R alterou qualitativamente a especificidade epitópica da resposta específica de anticorpos P1₃₉₋₅₁₂ em ratinhos imunizados.

- No estudo de Liu *et al* (2019) ⁽¹³⁾, a adição de FimH-S.T ou MPL a PAc melhorou significativamente os níveis de IgG específicos em comparação com o grupo PAc ou PBS. Foram detetados níveis melhorados de IgG de soro específicos de PAc no grupo PAc + FimH-S.T. As respostas de IgA induzidas pelo grupo PAc + FimH-S.T foram significativamente superiores às do grupo PAc + MPL. O grupo FimH-S.T + PAc apresentou um alto nível de isótipo IgG1, que aumentou o nível de IgG1/IgG2a em comparação com PAc. Os ratos imunizados com PAc+ FimH-S.T ou PAc + MPL mostraram significativamente menos cáries do que os grupos PBS e PAc.
- No estudo de Bi *et al* (2019) ⁽¹⁹⁾, foram obtidos os seguintes resultados: os títulos de anticorpos de IgG1 no grupo OVA-Pam₃CSK₄ foram os mais elevados, seguidos pelos grupos OVA-chitosan e OVA-MPL. Para o IgG2b, os grupos OVA-Pam₃CSK₄ e OVA-MPL induziram uma resposta de anticorpos mais forte do que os outros grupos testados. Em relação ao IgG1, o OVA-chitosan-Pam₃CSK₄ induziu uma resposta de anticorpos mais forte do que o OVA-chitosan-MPL. Os ratinhos vacinados com PAc-chitosan-Pam₃CSK₄ mostraram a maior resposta de anticorpos anti-PAc IgG1 durante todo o período experimental. O nível de IgA anti-PAc salivar no grupo PAc-chitosan-Pam₃CSK₄ foi o mais elevado, seguido pelo grupo PAc-chitosan-MPL. Ratinhos imunizados com PAc-chitosan-Pam₃CSK₄ ou PAc-chitosan-MPL apresentaram significativamente menos lesões de esmalte e dentinárias do que os ratinhos imunizados com PAc.

4.4.4- Modificação genética da conceção da vacina de ADN: os últimos avanços

Embora extremamente eficaz em modelos de pequenos animais, a vacina de ADN não tem funcionado bem em ensaios clínicos em humanos. Uma razão importante para esta limitação é a má expressão do antigénio nos tecidos humanos após a imunização. Por este motivo, é de grande interesse melhorar a eficácia de expressão da proteína antigénica codificada pela vacina de ADN. Uma forma de resolver este problema é modificar o desenho da vacina de ADN. Os MicroARNs (miRNAs) são ARNs endógenos, pequenos ARNs não codificantes. São utilizados naturalmente pelas células para suprimir

a expressão genética através da inibição da tradução ou indução da degradação de ARNms específicos ⁽⁷⁾. No estudo de Jia *et al* (2019) ⁽⁷⁾, foi demonstrado que o miR-9 tem múltiplos sítios de ligação a fragmentos dos genes GLU e A-P (GLU-A-P). Estes fragmentos são as principais regiões imunogênicas do GTF-I e PAc (importantes fatores de virulência do *Streptococcus mutans*). miR-9 inibe a expressão da proteína antigénica codificada pela vacina de ADN anti-cárie. Atenuar a inibição do miR-9 endógeno pela mutação dos sítios de ligação de miR-9 aos fragmentos dos genes melhorou a expressão da proteína antigénica GLU-A-P codificada pela vacina de ADN anti-cárie. Um plasmídeo de esponja de miR-9 foi capaz de melhorar a expressão e a imunogenicidade *in vivo* da proteína antigénica GLU-A-P codificada pela vacina de ADN anti-cárie ⁽⁷⁾.

5. Discussão

5.1- Inibição da formação de placa graças aos fatores de virulência e outros componentes do *Streptococcus mutans*

A maioria dos estudos incluídos nesta revisão trata de dois fatores de virulência do *Streptococcus mutans* – GTF e P1 - que estão a ser estudados e utilizados como antigénios para criar uma resposta imunológica, o que, dependendo do fator de virulência estudado, evitará a colonização ou agregação do *Streptococcus mutans* nos dentes diminuindo, assim, a ocorrência de cárie dentária.

Glicosiltransferase-I (GTF-I) e um antigénio de proteína de superfície PAc (ou P1) são os principais fatores de virulência dos *Streptococcus mutans*⁽⁶⁾.

A formação da placa dentária é iniciada por glucanos insolúveis produzidos por *Streptococcus mutans* GTFB e GTFC, que fornecem sítios de ligação para outras bactérias orais⁽²²⁾. No estudo de Kim *et al*(2012), a proteína recombinante GTFBN foi produzida e utilizada depois como imunogénio para produzir anticorpos anti-GTFBN. Foi produzido menos polissacarídeo na presença do MAb, em comparação com o controlo. Assim, concluímos que o MAb inibiu a atividade do GTFB⁽²²⁾.

No estudo de Batista *et al*(2014), foram investigadas as características funcionais, conformacionais e imunológicas da proteína P1₃₉₋₅₁₂, uma proteína recombinante gerada em *Bacillus subtilis* que engloba a região de ligação à saliva da proteína P1 de *Streptococcus mutans* e sequências adjacentes. Os anticorpos anti-P1₃₉₋₅₁₂ interferiram com a adesão de *Streptococcus mutans* à SAG imobilizada, tanto *in vitro* como *in vivo*. Os dados atuais indicam que o P1₃₉₋₅₁₂ preserva epítomos chave reconhecidos por anticorpos capazes de inibir a aderência mediada por P1 de *Streptococcus mutans* às superfícies revestidas por SAG. Em conclusão, estes resultados indicam que o P1₃₉₋₅₁₂ contém epítomos alvo relevantes e induz anticorpos neutralizantes inibidores da aderência que são eficazes *in vivo*⁽⁹⁾.

A proteína do *Streptococcus mutans* PstS é um candidato interessante para abordagens baseadas em vacinas porque influencia a adesão *in vitro* e a produção de biofilme por *Streptococcus mutans*, que são fatores importantes na patogénese da cárie dentária⁽²¹⁾. A manutenção da estrutura proteica, como observado na rPstS, é importante para conservar os epítomos, o que é crucial para a sua função imunológica. No estudo de

Ferreira *et al* (2015) foi demonstrado que a PstS recombinante produzida em *Escherichia coli* exibe uma boa imunogenicidade quando administrada sozinha, com a indução de altos níveis de anticorpos IgG específicos ⁽²¹⁾. Além disso, foi também mostrado que a proteína nativa PstS expressa nas células de *Streptococcus mutans* é acessível aos anticorpos anti-PstS criados após a vacinação com a proteína recombinante rPstS ⁽²¹⁾. Os anticorpos IgG prejudicaram a colonização oral nos ratinhos ingênuos e conferiram proteção parcial contra a colonização nos ratinhos vacinados. A estratégia de imunização com rPstS gerou anticorpos capazes de neutralizar a aderência de *Streptococcus mutans* à cavidade oral do ratinho. Neste estudo, os resultados foram comparados com os do estudo de Batista *et al* (2014) utilizando P1₃₉₋₅₁₂ como antígeno. Após comparação, foi observado que ambos os antígenos (rPstS e P1₃₉₋₅₁₂) reduziram a colonização oral em ratinhos vacinados. Estes resultados indicam que a rPstS representa um alvo potencial para anticorpos capazes de controlar a adesão das células bacterianas à cavidade oral e pode representar um antígeno alvo promissor, particularmente quando combinado com outros antígenos especificamente envolvidos com as propriedades adesivas de *Streptococcus mutans*, tais como a proteína P1 ⁽²¹⁾.

No estudo de Li *et al* (2016), foi construído um novo plasmídeo recombinante baseado no gene *Streptococcus mutans wapA* (pVAX1-*wapA*). Neste estudo, foi demonstrado que o pVAX1-*wapA* induz IgG sérico e IgA salivar em ratos imunizados. O pVAX1-*wapA* conferiu proteção contra o desafio com *Streptococcus mutans* no modelo de ratos. A eficácia protetora da imunização com pVAX1-*wapA* contra cáries num modelo de ratos indica que a proteína WapA é um candidato adequado para o desenvolvimento de uma vacina anti-cárie ⁽⁵⁾.

No estudo de St Michael *et al* (2017), a informação estrutural conhecida para os polímeros específicos do serotipo *Streptococcus mutans* foi confirmada e alargada. Os anti-soros derivados de imunizações tanto em ratinhos como em coelhos foram capazes de reconhecer serotipos homólogos e heterólogos em títulos semelhantes. A funcionalidade dos soros derivados foi examinada, em virtude da determinação da capacidade dos anti-soros para facilitar a morte opsonofagocítica de estirpes homólogas e heterólogas de *Streptococcus mutans*. Para os soros derivados do serotipo k conjugado, apenas foi examinada a capacidade de matar a estirpe homóloga. Para o serotipo f conjugado, foram observados títulos semelhantes contra a estirpe homóloga e

excelentes títulos também foram observados contra as estirpes do serotipo k. No entanto, os títulos não foram tão elevados quando a estirpe do serotipo c era o alvo. Para soros de coelho derivados do serotipo k conjugado, foram observados excelentes títulos de eliminação contra as estirpes homólogas do serotipo k. Para os soros de coelhos derivados do serotipo f foram observados bons títulos de eliminação para a estirpe homóloga do serotipo f e para as estirpes heterólogas do serotipo k. Os soros derivados são capazes de matar tanto os serotipos homólogos como os heterólogos, levantando a possibilidade de uma vacina baseada num número limitado de serotipos específicos de polímeros à base de rhamnan poder ser suficiente para combater os *Streptococcus mutans*⁽²⁾.

5.2- Os adjuvantes e sistemas de entrega melhoram a imunogenicidade dos antigénios

Estudos recentes têm investigado a utilização de adjuvantes e sistemas de entrega para melhorar a eficácia imunológica das vacinas de ADN⁽⁵⁾.

Uma vacina pGJA-P/VAX foi construída através da codificação de GLU da enzima GTF juntamente com as regiões A e P da proteína de superfície PAc de *Streptococcus mutans*⁽⁴⁾. Esta vacina parecia funcionar de forma ineficaz através da administração intranasal. Por isso, no estudo de Chen *et al* (2013), foram incorporados lipossomas aniónicos no CS/pGJA-P/VAX. Este procedimento induziu respostas fortes de mucosas e relativamente fracas de anticorpos sistémicos após imunização intranasal em ratinhos⁽⁴⁾.

Foram utilizados diferentes métodos para melhorar a imunogenicidade das vacinas de ADN, incluindo adjuvantes de citocinas. A administração de plasmídeos que codificam uma citocina é vantajosa porque a citocina é expressa e atua no local de expressão dos antigénios⁽¹⁶⁾. No estudo de Su *et al* (2014), a IL-6 foi estudada como um estimulador imunitário natural. A IL-6 é uma citocina segregada por muitos tipos de células diferentes. A IL-6 expressando plasmídeo pCI-IL-6 foi construída e coimunizada com pCIA-P intranasal em ratinhos e ratos. Foi constatado que os níveis de IgA salivares específicos de antigénios e anticorpos IgG séricos para PAc foram significativamente mais elevados nos ratinhos co-imunizados em comparação com os ratinhos imunizados com pCIA-P nas semanas 4 e 8. Além disso, os ratos que receberam o pCIA-P e o pCI-IL-

6 apresentaram menor atividade de cárie do que os ratos imunizados com pCIA-P. Estas descobertas sugerem que o plasmídeo IL-6 como adjuvante mucosal melhorou eficazmente tanto a resposta imunitária mucosal como a resposta imunitária sistêmica, inibindo assim a gravidade da cárie dentária induzida por *Streptococcus mutans*. Estes resultados sugerem ainda que a administração intranasal de IL-6 é um método eficaz para aumentar a imunogenicidade de uma vacina de ADN anti-cárie e que a IL-6 também pode ser um adjuvante de mucosa promissor para outras vacinas de ADN ⁽¹⁶⁾.

No estudo de Batista *et al* (2014), foi observado que a incorporação de adjuvantes com P1₃₉₋₅₁₂ aumentou significativamente a quantidade total de anticorpos IgG específicos de P1. A coadministração com alúmen e LTK4R resultou em aumentos nos níveis de IgG2a específicos de antígenos e tornou ainda mais eficaz a indução de anticorpos capazes de inibir a colonização oral inicial de ratinhos pela *Streptococcus mutans* cariogênica, enquanto o LTK4R e FliC promoveram aumentos nos níveis de IgG2b ⁽⁹⁾. Assim, a imunização com P1₃₉₋₅₁₂, especialmente quando coadministrada com adjuvantes, representa uma estratégia promissora para a geração de anticorpos neutralizantes, que atuam tanto *in vitro* como *in vivo* para reduzir a aderência de *Streptococcus mutans*. Os adjuvantes modulam o sistema imunitário para melhorar a quantidade, e particularmente a qualidade, da resposta do anticorpo hospedeiro contra P1 ⁽⁹⁾.

No estudo de Batista *et al* (2017), foi explorado se a via sublingual seria eficaz para a prevenção da colonização oral com *Streptococcus mutans* utilizando uma formulação de vacina baseada no antígeno P1₃₉₋₅₁₂ em combinação, ou não, com um adjuvante de mucosa (LTK4R). Nestes ensaios, foi demonstrado que a administração sublingual de uma formulação vacinal contendo P1₃₉₋₅₁₂ e LTK4R induziu níveis mais elevados de IgG sérica e IgA específicas de P1₃₉₋₅₁₂, em comparação com P1₃₉₋₅₁₂ administrada sozinha. Foi demonstrado também que a imunidade induzida pela vacina após imunização sublingual de P1₃₉₋₅₁₂ com o adjuvante LTK4R prejudicou mais eficazmente a colonização bacteriana da cavidade oral em comparação com os grupos não adjuvantes P1₃₉₋₅₁₂. Foi verificado neste estudo que a fina especificidade dos epítomos reconhecidos pelos anticorpos foi aparentemente alterada. De facto, foi demonstrado que os anticorpos obtidos em ratinhos de diferentes grupos de imunização apresentavam assinaturas únicas de

anticorpos, sugerindo que a incorporação de LTK4R melhora a eficácia protetora de P1₃₉₋₅₁₂ através da modulação da especificidade epitópica dos anticorpos gerados. Em resumo, estes resultados demonstraram que a inclusão do LTK4R na formulação da vacina teve um impacto positivo não só nos níveis de anticorpos específicos contra o imunogénio da vacina, mas também na sua especificidade epitópica final e atividade funcional contra a proteína-alvo P1 na superfície da célula bacteriana, interferindo assim com as propriedades adesivas de *Streptococcus mutans*⁽¹⁷⁾.

Os resultados obtidos por Ferreira *et al* (2015), demonstraram que a imunogenicidade de rPstS pode ser reforçada pela presença de adjuvantes, pela utilização da proteína LTK4R⁽²¹⁾. Além disso, observou-se que o rPstS induziu sozinho níveis mais elevados de IgG1 e IL-6. Contudo, a coadministração com LTK4R aumentou os níveis dos anticorpos IgG2a e IFN- γ , o que estimula os mecanismos da resposta imunitária celular⁽²¹⁾.

No estudo de Li *et al* (2016), um derivado da quitosana, a trimetil quitosana (CSTM), foi coadministrada com pVAX1-*wapA* para averiguar se este procedimento melhora as respostas imunitárias e mucosais nos ratos. Títulos de anticorpos IgG específicos nos grupos imunizados com nanopartículas CSTM- PVW foram superiores aos dos grupos imunizados com pVAX1-*wapA*. Além disso, as respostas específicas de IgA nos grupos imunizados com nanopartículas CSTM-PVW foram significativamente mais elevadas do que as dos grupos imunizados com pVAX1-*wapA* sozinha. Estas observações indicam que o sistema de entrega de nanopartículas é necessário para melhorar a imunogenicidade da vacina de ADN. Estes resultados validam ainda outros relatórios de que as nanopartículas CSTM atuam como adjuvantes nas respostas imunitárias induzidas pela administração de vacinas nasais devido às suas propriedades mucoadesivas e capacidade de estimular a maturação tardia das DCs. Assim, as nanopartículas de CSTM representam um potencial sistema de entrega de vacinas de ADN, especialmente para a imunização através das mucosas⁽⁵⁾.

O tecido linfóide associado ao intestino (GALT) é uma parte constituinte do sistema imunitário mucosal comum e serve como um importante local indutivo⁽¹²⁾. Para aproveitar esta vantagem, foi aplicada no estudo de Jiang *et al* (2017) uma vacina mucosal à base de *Salmonella* administrada intra-gastrointestinalmente para a prevenção da cárie dentária. Foi criada uma fórmula de vacina de ADN com promotores

procarióticos e eucarióticos (duplo promotor). Foi constatado neste estudo que a expressão persistente do antigénio sob o controlo dos promotores *CMV* e *nirB* pode fornecer uma estimulação contínua das células imunitárias, resultando numa resposta imunitária duradoura. As respostas imunitárias reforçadas da mucosa após o reforço da imunização persistiram em níveis mais elevados durante um período de tempo mais longo no grupo imunizado com *CMV-nirB* do que no grupo imunizado com *nirB*, demonstrando que a fórmula *CMV-nirB* foi mais eficiente na indução de uma resposta imunitária salivar do que o promotor *nirB* utilizado sozinho numa vacina à base de *Salmonella*. Em ratinhos que receberam SL3261/pCN-SS/SG, foram observados níveis persistentemente mais baixos de *Streptococcus mutans* do que naqueles que receberam SL3261/pNir-SS/SG, o que se assemelhava às respostas de IgA salivares mais elevadas e prolongadas observadas no grupo imunizado com SL3261/pCN-SS/SG. Isto sugeriu que, em comparação com o promotor *nirB* utilizado sozinho, o sistema de expressão de duplo promotor (*pCMVnir*) seria mais competente na indução de uma imunidade de IgA salivar de longa duração e na supressão contínua da colonização por *Streptococcus mutans* ⁽¹²⁾.

Como foi dito anteriormente, a vacina proteica PAc aparenta ser um antigénio candidato adequado para melhorar os anticorpos SIgA. Contudo, a baixa imunogenicidade e a tendência para induzir tolerância natural limitaram a sua aplicação isolada, o que tornou altamente urgente o desenvolvimento de um adjuvante vacinal eficaz contra a cárie dentária ⁽¹³⁾. Assim, no estudo de Liu *et al* (2019), a proteína FimH-S.T recombinante foi construída e purificada, tendo sido avaliada a sua eficácia como adjuvante *in vitro* e *in vivo*. A citometria de fluxo e a análise ELISA demonstraram que a FimH-S.T induziu a maturação fenotípica da DC2.4 e impulsionou a libertação de citocinas pró-inflamatórias, fornecendo assim sinais potentes para induzir respostas imunitárias adaptativas. Além disso, DC2.4 tratadas com FimH-S.T promoveram eficazmente a produção e secreção de IL-6 e TNF- α em comparação com as células não tratadas. Foi também analisado que a FimH-S.T misturada com PAc induziu IgA salivares específicos de PAc mais elevados do que os induzidos apenas por PAc. Os ratos imunizados com PAc + FimH-S.T e PAc + MPL permitiram uma redução de 46,2% e 45,0% de cáries, respetivamente, enquanto PAc por si só não induziu uma proteção significativa contra as cáries. Cumulativamente, estes dados mostraram que a vacina ajustada FimH-S.T tem o potencial de proporcionar uma proteção robusta contra a cárie

dentária. Em conclusão, a FimH-S.T recombinante, como uma promissora adjuvante, mostrou capacidade suficiente para levantar respostas persistentes de anticorpos e conferiu uma melhor proteção da vacina anti-cárie ⁽¹³⁾.

No estudo de Bi *et al*/(2019), as respostas de anticorpos em ratinhos que receberam imunização com PAc-chitosan-MPL ou PAc-chitosan-Pam₃CSK₄ por injeção submucosa foram mais elevadas do que em ratinhos que receberam imunização com PAc sozinha. O nível de resposta de anticorpos IgG séricos específicos na semana 2 no grupo PAc-chitosan-Pam₃CSK₄ foi 3 vezes maior do que no grupo PAc. Além disso, os grupos PAc-chitosan-MPL e PAc-chitosan-Pam₃CSK₄ mantiveram uma resposta elevada de anticorpos na semana 10 após o reforço. Os resultados do modelo do ratinho mostraram que nos grupos infetados com *Streptococcus mutans*, os ratinhos imunizados PAc-chitosan-MPL e PAc-chitosan-Pam₃CSK₄ tiveram significativamente menos lesões dentárias do que os ratinhos imunizados com PAc. Estas descobertas demonstraram que as novas combinações de PAc-chitosan-Pam₃CSK₄ e PAc-chitosan-MPL melhoraram significativamente a velocidade, magnitude e longevidade da resposta específica dos anticorpos e aumentaram o efeito protetor contra *Streptococcus mutans* em comparação com a imunização com PAc sozinha. Também conseguiram reter mais tecido dentário e melhorar os títulos de anticorpos em amostras de soro e salivares, em comparação com PAc sozinha. A quitosana é um polímero polissacarídico linear hidrofílico com elevado potencial no fornecimento de várias moléculas hidrofílicas e agentes medicamentosos e capacidades imuno-estimuladoras para promover respostas imunitárias. Assim, a quitosana é utilizada como constituinte de uma vacina anti-cárie ⁽¹⁹⁾.

No estudo de Jia *et al*/(2019), foi descoberto que a co-transfecção da esponja de miR-9 pode aumentar a expressão da proteína antigénica GLUA-P e melhorar as respostas imunitárias *in vivo*. Estes resultados sugerem que atenuar a inibição de microARNs endógenos pode ser um método promissor para melhorar a expressão antigénica e a imunogenicidade da vacinação intramuscular do ADN. A cotransfecção da esponja de miR-9 pode também aumentar a expressão da proteína antigénica GLUA-P em células humanas primárias com expressão de miR-9. NF- κ B é uma família de fatores de transcrição envolvidos em respostas inflamatórias e imunitárias. Foi descoberto que a esponja de miR-9 pode melhorar a expressão de NF- κ B1, e assim melhorar a resposta

imunitária através desta expressão. Atenuar a inibição do miR-9 endógeno aumentou a expressão do antígeno e a imunogenicidade da vacina de ADN anti-cárie ⁽⁷⁾.

Estes resultados demonstraram que a adição de adjuvante ou a utilização de um novo sistema de administração mais eficiente melhora a imunogenicidade do antígeno.

5.3- A flagelina como adjuvante das vacinas anti-cárie

A flagelina bacteriana, uma subunidade proteica do flagelo, pode ser reconhecida pela superfície celular, através do recetor TLR5. Como padrão de molécula associada ao patógeno (PAMP) e potente ativador imunitário, a flagelina demonstrou ser um adjuvante eficaz e, mais importante, ser um adjuvante eficaz da mucosa, ajudando muitos tipos de vacinas a induzir níveis elevados de respostas locais de anticorpos IgA ⁽¹⁵⁾. A ativação de TLR5 mediada por flagelina ativa genes pró-inflamatórios incluindo IL-6, TNF- α ⁽¹³⁾.

No estudo de Shi *et al* (2012), a análise dos dados apresentados mostrou que a pGJA-P/VAX, utilizada em conjunto com a FliC, aumentou as respostas dos anticorpos IgG sérica específica de PAC e IgA salivar específica de PAC, em comparação com a pGJA-P/VAX sozinha, e diminuiu significativamente a colonização por *Streptococcus mutans* em dentes de ratos. Mais importante, a FliC promoveu a capacidade da pGJA-P/VAX de reduzir as lesões de cárie, proporcionando uma proteção eficaz contra a cárie dentária. Neste estudo, ratos imunizados com 100 μ g pGJA-P/VAX + 10 μ g FliC e 100 μ g pGJA-P/VAX + 20 μ g FliC mostraram 41,1% e 47,0% de redução da cárie, respetivamente. O aumento das respostas de anticorpos IgA específicos de PAC causados pela proteína FliC foi correlacionado com a diminuição da colonização por *Streptococcus mutans* em dentes de rato e a redução das lesões de cárie. Estes resultados demonstram que a FliC é um promissor candidato, como adjuvante mucosal, para potencial utilização na vacina anti-cárie ⁽⁸⁾.

No estudo de Sun *et al* (2012), foi escolhido como adjuvante uma flagelina derivada de uma bactéria não patogénica, *Escherichia coli*, devido à sua natureza não patogénica e perfil de resposta imunitária característico. Neste estudo, foi integrado adjuvante e antígeno alvo numa proteína recombinante para o desenvolvimento de uma vacina anti-cárie mucosal. Os resultados mostraram que a proteína de fusão do fragmento A-P de PAC e flagelina derivada de *Escherichia coli* elevou a resposta de

anticorpos IgA salivares específicos de rPAC e a eficácia protetora contra cáries em ratos. Também foi demonstrado que a estratégia de fusão do antigénio rPAC com flagelina reduziu significativamente a dosagem da vacina. Os resultados mostraram fortes correlações inversas entre a pontuação total de cárie e a IgA salivar específica da rPAC, IgA sérica específica da rPAC, e IgG sérica específica da rPAC. Assim, foi demonstrado que a proteína de fusão flagelina-rPAC, que combina antigénio vacinal e o adjuvante flagelina numa única proteína recombinante, é uma vacina anti-cárie mucosal de alta eficácia ⁽²⁰⁾.

No estudo de Batista *et al* (2014), vários compostos alternativos, incluindo moléculas de origem microbiana, tais como flagelina (FliC) de *Salmonella enterica serovar Typhimurium* ⁽⁹⁾, têm recebido um interesse crescente como potenciais adjuvantes de vacinas.

Para investigar melhor o efeito terapêutico da proteína de fusão flagelina-PAC (KF-rPAC), um novo protocolo foi concebido no estudo de Bao *et al* (2015) para testar as respostas de anticorpos. Os protocolos anteriores, utilizados para a avaliação da vacina anti-cárie profilática ou terapêutica, geralmente imunizavam ratos 5 dias antes ou depois da inoculação oral de *Streptococcus mutans* para desafio. No presente estudo, ratos foram imunizados 56 dias após desafio, permitindo o estabelecimento de lesões cariosas. Este novo protocolo permitiu, não só verificar o implante de *Streptococcus mutans* e confirmar a progressão das cáries, mas também investigar se a imunização e a resposta imunitária podem parar ou aliviar as lesões cariadas estabelecidas. Estes dados, trabalhando com um protocolo de infeção prolongado, demonstraram que a imunização nasal da proteína de fusão de PAC e flagelina melhorou a produção de IgA salivares específicas de PAC e inibiu significativamente a progressão de cáries estabelecidas. Uma vez que a imunização e as respostas de IgA salivares melhoradas resultantes demonstraram proteção no modelo terapêutico, foi especulado que esta vacinação pode ser benéfica para crianças cujos dentes decíduos já estão infetados, protegendo os seus dentes permanentes da infeção durante a transição da dentição decídua para a dentição permanente e possivelmente mais tarde na vida. Em conclusão, este estudo demonstrou que a proteína de fusão KF-rPAC oferece potencial como candidata à vacina terapêutica mucosal para inibir a progressão da cárie dentária causada por *Streptococcus mutans* ⁽¹⁴⁾.

No estudo de Yang *et al* (2017), foi caracterizada a proteína de fusão de segunda geração flagelina-RPAC, uma candidata à vacina concebida para evitar uma resposta

indesejada de anticorpos específicos de flagelina e efeitos secundários inflamatórios, induzindo ao mesmo tempo anticorpos eficazes contra PAc e proporcionando uma elevada eficácia protetora contra as cáries dentárias. A propriedade proteica da flagelina confere-lhe tanto a vantagem da modificação fácil como a desvantagem da imunogenicidade. A flagelina contém dois domínios N/C altamente conservados (D0 e D1) e um domínio central hipervariável (D2/D3). O domínio D2/D3, o principal domínio de antigenicidade da KF, promove a neutralização da produção de anticorpos específicos do domínio TLR5. Para reduzir a imunogenicidade da flagelina, foi construída uma proteína de fusão de segunda geração flagelina-rPAc, KFD2-rPAc, na qual rPAc substituiu D2/D3. Os resultados deste estudo demonstraram que a imunogenicidade da própria flagelina é substancialmente reduzida em KFD2-rPAc. O KFD2-rPAc induziu mais de 10 vezes menos respostas de anticorpos específicos de flagelina em ratinhos e ratos. A potencial resposta inflamatória induzida pela flagelina também deve ser restringida. Em conclusão, KFD2-rPAc, a proteína de fusão de segunda geração flagelina-rPAc, induziu respostas inflamatórias sistémicas de baixo potencial e respostas baixas de anticorpos específicos de flagelina, mas alta proteção imunitária contra cáries. Estas vantagens fazem do KFD2-rPAc um promissor candidato à vacina anti-cárie ⁽¹⁸⁾.

5.4- A quimiocina, um potencial adjuvante das vacinas anti-cárie

Um novo tipo de adjuvante, as quimiocinas, foi apresentado nos estudos de Yan *et al*/(2013, 2016). As quimiocinas são pequenas proteínas que atuam principalmente como quimiotractantes para tipos específicos de leucócitos e desempenham papéis importantes nas respostas inflamatórias e na formação e organização dos órgãos linfoides. Estudos recentes indicaram que as quimiocinas podem atuar como adjuvantes da vacinação de ADN através do recrutamento de DCs e outras células imunitárias para locais imuno-indutivos. Pensa-se que a migração das DCs é um dos eventos mais importantes para a indução da imunidade protetora contra agentes patogénicos. Supõe-se que a sobreexpressão exógena do CCL19 no tecido linfoide pode aumentar o recrutamento de DCs apresentando antígenos, facilitando assim o contacto entre as DCs e as células T. O CCL19 é um ligante funcional de alta afinidade para CCR7, a molécula recetora expressa em DCs maduras. Foi demonstrado que o CCL19 e o CCR7 desempenham um papel importante na pesquisa de DCs nos tecidos linfoides ⁽¹¹⁾. O

estudo de Yan *et al* (2013) revelou que os baços e DLN dos ratinhos injetados sistemicamente com ADN CCL19 tiveram um aumento significativo no número de DCs maduras, o que orquestrou uma indução mais eficaz das respostas imunitárias e um aumento da imunogenicidade da vacina. Esses resultados demonstraram que a administração do gene CCL19 com uma vacina de ADN anti-cárie pCIA-P via injeção intramuscular aumentou significativamente as respostas imunitárias sistêmicas ao pCIA-P, bem como a produção de IFN- γ em ratinhos, em comparação com a vacinação pCIA-P. Isso demonstra que o CCL19 é um adjuvante atrativo para a vacina de ADN anti-cárie ⁽¹¹⁾.

Estudos recentes mostraram que a expressão do CCR7 só na superfície de DCs não era suficiente para garantir a sua plena função de guiar a migração de DCs. No estudo de Yan *et al* (2016) foi demonstrado que a sobreexpressão exógena do CCL17 por si só poderia melhorar o recrutamento de DCs para DLN, o que demonstra *in vivo* que o CCL17 está envolvido no processo de migração de DCs. Os resultados indicaram que a administração do CCL17 e CCL19 levou a uma maior migração de DCs para DLNs em comparação com o CCL17 ou CCL19 entregues isoladamente. pCIAP e o plasmídeo do CCL17 foram administrados intranasalmente a ratinhos. Observou-se um aumento significativo dos níveis de IgG séricas específicas de PAc e níveis de IgA salivares específicas de PAc em comparação com o grupo controlo tratado com ADN vetorial. A administração do CCL17 e CCL19 com pCIAP levou a respostas melhoradas de anticorpos em comparação com o CCL17 ou CCL19 entregues sozinhos após a imunização. A colonização por *Streptococcus mutans* nas superfícies dentárias e as pontuações de cárie foram reduzidas nos ratos coadministrados com CCL17 e CCL19 em comparação com os ratos administrados pelo CCL17 ou pelo CCL19. Estes resultados confirmaram o efeito imunopotenciador do CCL17 quando coadministrado com o CCL19 ⁽¹⁰⁾.

5.5- Novas técnicas para realização e melhoramento de uma vacina anti-cárie

No estudo de Sentila *et al* (2013), foi feita uma tentativa de fornecer dados preliminares sobre a utilização de imunoglobulina de gema de ovo de galinha criada contra o antígeno de *Streptococcus mutans* associado às células. As galinhas foram imunizadas com o antígeno CA-GTF de *Streptococcus mutans* para criar anticorpos. Os ovos de galinha apresentam uma fonte ideal de anticorpos alternativa aos mamíferos,

uma vez que a IgY no sangue das galinhas é transportada para o ovo, acumulando-se na gema do ovo em grandes quantidades. Portanto, uma galinha imunizada produz mais de 40 g de IgY por ano através dos ovos, o equivalente à produção de 40 coelhos. A produção laboratorial de anticorpos envolve imunização e sangramento de animais, sujeitando estes animais a grande stress. No entanto, a utilização de galinha para este fim é de dupla vantagem. A principal vantagem é a produção de altos níveis de anticorpos pelas galinhas em comparação com os mamíferos, minimizando assim o número de animais necessários. A segunda vantagem é o reconhecimento da gema de ovo, obtida da galinha imunizada, como uma excelente fonte de anticorpos policlonais há mais de uma década. Estes anticorpos podem ser utilizados para desenvolver um enxaguamento bucal contendo os anticorpos específicos juntamente com agentes estabilizadores que, quando administrados oralmente, reduzem o número de *Streptococcus mutans* na placa dentária e saliva, formando complexos antígeno-anticorpos, neutralizando assim a placa. As abordagens acima mencionadas sugerem que a imunização oral poderia ser um método eficiente de prevenção da cárie dentária humana ⁽³⁾.

Uma nova técnica foi utilizada para criar uma vacina anti-cárie no estudo de Bai *et al* (2019). As plantas transgênicas geneticamente modificadas estão a tornar-se importantes sistemas de expressão de proteínas exógenas que são rentáveis. Vários estudos confirmaram que as vacinas de plantas transgênicas podem estimular eficazmente respostas imunitárias específicas da mucosa e do humor em animais e não têm efeitos secundários adversos em animais experimentais. O tomate é a principal planta hospedeira que produz vacinas orais. Atualmente, é a planta transgênica vacinal comestível mais utilizada, devido às suas características saborosas e nutritivas ⁽¹⁾. Nos ensaios de Bai *et al* (2019), a região A do gene *pac* de *Streptococcus mutans* e o plasmídeo de mosaico da subunidade B da toxina da cólera foram transferidos para o tomate e a sua integração no genoma do tomate foi confirmada. As vacinas orais vegetais são novos conceitos para o avanço das vacinas modernas e esta é uma área potencial para mais investigação e avanço na prevenção da cárie dentária ⁽¹⁾.

A modificação genética dos antígenos utilizados na concepção de uma vacina anti-cárie também pode ser promissora, como foi demonstrado no estudo de Jia *et al* (2019). Os microARNs desempenham o papel de silenciamento genético, que tem sido utilizado

em vacinas, de acordo com a literatura ⁽⁷⁾. No trabalho de Jia *et al* (2019), foi demonstrado que a expressão da proteína antigénica poderia ser suprimida pelos microARNs. A abolição do efeito do microARN através da mutação de sítios de ligação ou esponja de microARN melhorou efetivamente a expressão das proteínas antigénicas. Foi descoberto também que a coadministração com a esponja de microARN melhorou significativamente a resposta imunitária do soro ao antígeno codificado pela vacina de ADN. A utilização da tecnologia de esponja de miR-9 na vacinação pode ter vários benefícios potenciais:

- A esponja de microARN pode atenuar a inibição do microARN endógeno e melhorar a expressão antigénica.
- A esponja de microARN pode ser concebida para visar não só um único microARN específico, mas também membros da família microARN.
- A esponja de microARN contra microARNs imunossupressores pode aumentar a imunogenicidade da vacinação.
- A esponja do microARN pode ser expressa por plasmídeo de ADN.

Este estudo pode fornecer informações úteis para a conceção da vacina de ADN ⁽⁷⁾.

6. Conclusão

Esta revisão sistemática proporciona uma melhor compreensão e apreciação dos progressos feitos até à data na vacina anti-cárie. De facto, foi demonstrado através deste estudo que foram utilizados diferentes métodos para criar esta vacina em primeiro lugar, e depois para melhorar as suas propriedades imunológicas. Até à data, a investigação sobre a vacina tem sido feita principalmente em animais e mostra resultados encorajadores e positivos quanto aos benefícios desta vacina na prevenção ou redução da formação de cárie dentária. Através da análise destes artigos, podemos concluir os seguintes resultados:

- As vacinas estudadas permitem estimular a produção de anticorpos IgG e IgA necessários para o reconhecimento e eliminação de certos componentes do *Streptococcus mutans* como, por exemplo, P1 ou GTF.

- As vacinas estudadas permitem uma diminuição da formação de placa bacteriana nos dentes, graças à sua ação direta quer na colonização, quer na agregação de *Streptococcus mutans*, dependendo se o antigénio é P1 ou GTF.
- As vacinas estudadas levam a uma diminuição do aparecimento de cárie dentária nos modelos imunizados.

Até à data, nenhuma vacina foi introduzida no mercado, o que salienta a necessidade de mais investigação nesta área, para que possam ser iniciados estudos em humanos e determinar, assim, os efeitos da vacina sobre uma amostra humana.

7. Referências bibliográficas

1. Bai G, Tian Y, Wu J, Gu Y, Chen Z, Zeng F, Liu J. Construction of a fusion anti-carries DNA vaccine in transgenic tomato plants for PAcA gene and cholera toxin B subunit. *Biotechnol Appl Biochem* 2019 Dec 5;66(6):924-9.
2. St Michael F, Yang Q, Cairns C, Vinogradov E, Fleming P, Hayes AC, Aubry A, Cox AD. Investigating the candidacy of the serotype specific rhamnan polysaccharide based glycoconjugates to prevent disease caused by the dental pathogen *Streptococcus mutans*. *Glycoconj J* 2017 Oct 2;35(1):53-64.
3. Sentila R, Karthika S, Michael A, Himathi A. Protection against Dental Carries by Passive Immunization with Hen Egg Yolk Antibody Using Cell Associated Glucosyltransferase of *Streptococcus mutans*. *J Med Microb Diagn* 2013 Jun 28;2:125.
4. Chen L, Zhu J, Li Y, Lu J, Gao L, Xu H, Fan M, Yang X. Enhanced nasal mucosal delivery and immunogenicity of anti-carries DNA vaccine through incorporation of anionic liposomes in chitosan/DNA complexes. *PLoS One* 2013 Aug 20;8(8):e71953.
5. Li H, Lu Y, Xiang J, Jiang H, Zhong Y, Lu Y. Enhancement of immunogenic response and protection in model rats by CSTM nanoparticles anticaries DNA vaccine. *Nanomedicine (Lond)*. 2016 May 12;11(11):1407-16.
6. Bumb S. Role of Caries Vaccine in Prevention of Dental Caries. *J Head Neck Physicians Surg* 2013 Sep 14;1:1-4.
7. Jia R, Yan L, Guo J. Enhancing the immunogenicity of a DNA vaccine against *Streptococcus mutans* by attenuating the inhibition of endogenous miR-9. *Vaccine* 2019 Nov 29;38(6):1424-30.
8. Shi W, Li YH, Liu F, Yang JY, Zhou DH, Chen YQ, Zhang Y, Yang Y, He BX, Han C, Fan MW, Yan HM. Flagellin enhances saliva IgA response and protection of anti-carries DNA vaccine. *J Dent Res* 2012 Mar;91(3):249-54.
9. Batista MT, Souza RD, Ferreira EL, Robinette R, Crowley PJ, Rodrigues JF, Brady LJ, Ferreira LCS, Ferreira LCC. Immunogenicity and *in vitro* and *in vivo* protective effects of antibodies targeting a recombinant form of the *Streptococcus mutans* P1 surface protein. *Infect Immun* 2014 Sep 15;82(12):4978-88.

10. Yan Y, Yu F, Zeng C, Cao L, Zhang Z, Xu Q. CCL17 combined with CCL19 as a nasal adjuvant enhances the immunogenicity of an anti-caries DNA vaccine in rodents. *Acta Pharmacol Sin* 2016 Aug 15;37(9):1229-36.
11. Yan Y, Qi S, Su L, Xu Q, Fan M. Co-delivery of ccl19 gene enhances anti-caries DNA vaccine pCIA-P immunogenicity in mice by increasing dendritic cell migration to secondary lymphoid tissues. *Acta Pharmacol Sin* 2013 Jan 21;34(3):432-40.
12. Jiang H, Hu Y, Yang M, Liu H, Jiang G. Enhanced immune response to a dual-promoter anti-caries DNA vaccine orally delivered by attenuated *Salmonella typhimurium*. *Immunobiology* 2017 Jan 22;222(5):730-7.
13. Liu Z-F, Chen J-L, Li W-Y, Fan M-W, Li Y-H. FimH as a mucosal adjuvant enhances persistent antibody response and protective efficacy of the anti-caries vaccine. *Arch Oral Biol* 2019 Feb 16;101:122-9.
14. Bao R, Yang JY, Sun Y, Zhou DH, Yang Y, Li YM, Cao Y, Xiao Y, Li W, Yu J, Zhao BL, Zhong MH, Yan HM. Flagellin-PAc Fusion Protein Inhibits Progression of Established Caries. *J Dent Res* 2015 Apr 16;94(7):955-60.
15. Sun Y, Yang Y, Zhou D, Cao Y, Yu J, Zhao B, Zhong M, Li Y, Yang J, Yan H. Flagellin-rPac vaccine inhibits biofilm formation but not proliferation of *S. mutans*. *Hum Vaccin Immunother* 2016 Jul 8;12(11):2847-54.
16. Su L, Yu F, Li Z, Zeng C, Xu Q, Fan M. Intranasal co-delivery of IL-6 gene enhances the immunogenicity of anti-caries DNA vaccine. *Acta Pharmacol Sin* 2014 Apr 31;35(5):592-8.
17. Batista MT, Ferreira EL, Pereira G de S, Stafford P, Maeda DLNF, Rodrigues JF, Brady LJ, Johnston SA, Ferreira LCS, Ferreira L. LT adjuvant modulates epitope specificity and improves the efficacy of murine antibodies elicited by sublingual vaccination with the N-terminal domain of *Streptococcus mutans* P1. *Vaccine* 2017 Nov 6;35(52):7273-82.
18. Yang J, Sun Y, Bao R, Zhou D, Yang Y, Cao Y, Yu J, Zhao B, Li Y, Yan H, Zhong M. Second-generation Flagellin-rPac Fusion Protein, KFD2-rPac, Shows High Protective Efficacy against Dental Caries with Low Potential Side Effects. *Sci Rep* 2017 Sep 11;7(1):11191.

19. Bi Y, Xu Q, Su L, Xu J, Liu Z, Yang Y, Tang H, Li Y, Fan M. The Combinations Chitosan-Pam₃ CSK₄ and Chitosan-Monophosphoryl Lipid A: Promising Immune-Enhancing Adjuvants for Anticaries Vaccine PAc. *Infect Immun* 2019 Nov 18;87(12).
20. Sun Y, Shi W, Yang JY, Zhou DH, Chen YQ, Zhang Y, Yang Y, He BX, Zhong MH, Li YM, Cao Y, Xiao Y, Li W, Yu J, Li YH, Fan MW, Yan HM. Flagellin-PAc fusion protein is a high-efficacy anti-caries mucosal vaccine. *J Dent Res* 2012 Jul 19;91(10):941-947.
21. Ferreira EI, Batista MT, Cavalcante RCM, Pegos VR, Passos HM, Silva DA, Balan A, Ferreira LCS, Ferreira RCC. Sublingual immunization with the phosphate-binding-protein (PstS) reduces oral colonization by *Streptococcus mutans*. *Mol Oral Microbiol* 2015 Oct 9;31(5):410-22.
22. Kim M-A, Lee M-J, Jeong H-K, Song H-J, Jeon H-J, Lee K-Y, Kim J-G. A monoclonal antibody specific to glucosyltransferase B of *Streptococcus mutans* GS-5 and its glucosyltransferase inhibitory efficiency. *Hybridoma (Larchmt)* 2012 Aug 23;31(6):430-5.
23. Chatterjee K. Caries Vaccine: The Journey So Far. *Acta Sci Dent Sci* 2018 Dec 17;3:111-5.
24. Shanmugam Kt, Masthan Kmk, Balachander N, Sudha J, Sarangarajan R. Dental Caries Vaccine – A Possible Option? *J Clin Diagnostic Res* 2013 Jun 1;7:1250-3.
25. Cherukuri G, Chandrasekhar V, Rao G, Pacha V, Balla SB. Insight into status of dental caries vaccination: A review. *J Conserv Dent* 2020 Nov 1;23:544-9.