



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ROSARIO MAMANI BARRI

**ANTICORPOS ANTI-*Streptococcus mutans* E ANTI-*Streptococcus sobrinus* E CÁRIE DENTÁRIA EM PRÉ-ESCOLARES: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**

---

Londrina  
2018

ROSARIO MAMANI BARRI

**ANTICORPOS ANTI-*Streptococcus mutans* E ANTI-*Streptococcus sobrinus* E CÁRIE DENTÁRIA EM PRÉ-ESCOLARES: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Odontologia da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Emerson José Venancio

Londrina  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

B275 Barri, Rosario Mamani.  
Anticorpos anti-Streptococcus mutans e anti-Streptococcus sobrinus e cárie dentária em pré-escolares : uma revisão sistemática / Rosario Mamani Barri. - Londrina, 2018.  
71 f. : il.

Orientador: Emerson José Venancio.  
Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, , 2018.  
Inclui bibliografia.

1. Anticorpos - Tese. 2. Cárie dentária - Tese. 3. Streptococcus mutans - Tese. 4. Streptococcus sobrinus - Tese. I. Venancio, Emerson José . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. . IV. Título.

CDU 616.31

ROSARIO MAMANI BARRI

**ANTICORPOS ANTI-*Streptococcus mutans* E ANTI-*Streptococcus sobrinus* E CÁRIE DENTÁRIA EM PRÉ-ESCOLARES: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Odontologia da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Emerson José Venancio  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Solange de Paula Ramos  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr.<sup>a</sup>. Luciana Tiemi Inagaki  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 19 de Fevereiro de 2018

Dedico esta dissertação a minha família que foi a inspiração, motivação e força para a conclusão desse objetivo.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus** por me permitir esta experiência.

A **Universidade Estadual de Londrina**, pela acolhida.

Ao **Programa de Alianças para Educação e Capacitação (PAEC)** da **Organização de Estados Americanos (OEA)**, e o **grupo Coimbra de Universidades Brasileiras (GCUB)** pelo convênio com a EUL/CAPES.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela bolsa da modalidade demanda social.

Ao **Programa de Pós-Graduação**, Mestrado em Odontologia, pela oportunidade.

A meu orientador Prof. Dr. **Emerson José Venancio** pelos ensinamentos teóricos e laboratoriais que foram de grande valor.

A minha co-orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Cássia Cilene Dezan Garbelini** e a toda a equipe da **Bebê Clínica-UEL** por me abrirem as portas e estarem sempre dispostos a me ajudar, grata.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Solange de Paula Ramos** por toda ajuda, paciência, compreensão e carinho, muito obrigada.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Carla Cristiane Silva** pela ajuda durante o desenvolvimento da revisão.

A minhas colegas **Ana Claudia Poletto** e **Paola Singi** por todo apoio, ajuda, paciência e companheirismo durante o Mestrado. Muito obrigada.

A minha família londrinense, **Selma e Daniel Doraído** por me acolher na sua casa e me fazer sentir em família.

A minha amiga **Danielle Doraído** por compartilhar sua família maravilhosa, me escutar e acreditar sempre em mim, me ensinar a ter tolerância e respeitar os outros mesmo tendo gostos e costumes diferentes, além de me oferecer sua amizade verdadeira e incondicional, gratidão.

A meu namorado **Franz Reynaldo Suxo Hinojosa** pelo apoio e compreensão dos momentos de ausência.

A **todos** que diretamente ou indiretamente me ajudaram no curso do Mestrado, muito obrigada.

*“A educação é o nosso passaporte para o futuro, pois, o amanhã pertence as pessoas que se preparam hoje”.*

Malcolm X

BARRI, Rosario Mamani. **Anticorpos anti-*Streptococcus mutans* e anti-*Streptococcus sobrinus* e cárie dentária em pré-escolares: uma revisão sistemática.** 2018. 72 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## RESUMO

A cárie dentária é uma disbiose biofilme-açúcar dependente complexa, que necessita para seu desenvolvimento da presença de bactérias cariogênicas. As principais bactérias cariogênicas são *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, as quais apresentam antígenos diretamente relacionados com a adesão às superfícies dos dentes, como as glicosiltransferases (Gtf), as proteínas de ligação ao glucano (Gbp), e as adesinas denominadas Ag I/II. A resposta imune contra esses antígenos envolve as imunoglobulinas presentes na saliva sIgA, IgA, IgG e IgM. As imunoglobulinas, em especial a sIgA, atuam fornecendo proteção contra a cárie, uma vez que interagem com os antígenos bacterianos inibindo a colonização. A cárie da primeira infância é uma doença que afeta crianças e ocorre numa idade crítica onde a microbiota e o sistema imunológico da cavidade bucal encontram-se em desenvolvimento. Assim, o objetivo dessa revisão sistemática foi investigar a relação dos anticorpos específicos anti-*S. mutans* e anti-*S. sobrinus* no desenvolvimento da cárie dentária em pré-escolares. Para tanto, as seguintes palavras-chave foram utilizadas de forma isolada e combinada nas buscas: “*Child, Preschool*” “*Preschool Child*” “*Preschool Children*” “*Streptococcus*” “*Immunoglobulins*” “*Immunoglobulin*” “*Immune Globulins*” “*Antibodies*” “*Antibody*”. As bases de dados utilizadas foram Lilacs, Medline, Scielo, Cochrane, Prospero, Embase, Web of Science e Scopus. A análise do risco de viés foi feita pela escala Newcastle-Ottawa (NOS). O resultado inicial da busca foi 5.279 artigos, dos quais 2.454 foram excluídos por duplicatas e restaram 2.825 estudos. A partir disto, 2.804 artigos foram excluídos pelo título e resumo e após leitura dos 21 textos completos, restaram 4 artigos elegíveis para análise qualitativa desta revisão. De uma forma geral os artigos incluídos neste estudo têm baixo risco de viés. Porém, os artigos selecionados têm limitações como o não esclarecimento do cálculo do tamanho da amostra e cálculo do poder das análises estatísticas. Além disso, os artigos selecionados utilizavam diferentes técnicas para os antígenos de *S. mutans* (PAc, Glu, GtfB, GbpB, e a região SBR do antígeno I/II) e de *S. sobrinus* em suas análises o que impediu a realização do estudo meta-analítico. Por outro lado, a análise qualitativa dos estudos mostrou que dois observaram uma diminuição dos níveis de anticorpos IgA específicos contra estreptococos do grupo *mutans* e a aumento da severidade da cárie da primeira infância. Com relação ao papel de anticorpos anti-*S. sobrinus*, há apenas um estudo que investigou a relação entre esses anticorpos e a cárie dentária. Nesse estudo, não foi encontrada uma relação direta entre os níveis de anticorpos IgA anti-*S. sobrinus* e a cárie dentária precoce. Portanto, os resultados obtidos, não permitem estabelecer o efeito dos níveis de anticorpos no desenvolvimento da cárie dentária em pré-escolares e novos estudos devem ser feitos para analisar essa questão.

**Palavras-chave:** Anticorpos. Cárie dentária. Disbiose. Pré-escolares. *Streptococcus mutans*. *Streptococcus sobrinus*.

BARRI, Rosario Mamani. **Anticorpos anti-*Streptococcus mutans* e anti-*Streptococcus sobrinus* e cárie dentária em pré-escolares: uma revisão sistemática.** 2018. 72 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## ABSTRACT

Dental caries is a complex dependent biofilm-sugar dysbiosis that requires the presence of cariogenic bacteria. The major cariogenic bacteria are *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* expressing adhesion antigens (Ags) to tooth surfaces, such as glycosyltransferases, glucan binding proteins, and Ag I / II adhesin. The immune response to these Ags involves the IgA, IgG and IgM class antibodies present in saliva, especially secretory IgA (IgAs). Early childhood caries occurs at a critical age where the microbiota and immune system of the oral cavity are developing. The objective of this systematic review was to investigate the relationship of anti-S. mutans and anti-S. sobrinus specific antibodies in saliva during the development of dental caries in preschoolers. The key-words “Child, Preschool” “Preschool Child” “Preschool Children” “Streptococcus” “Immunoglobulins” “Immunoglobulin” “Immune Globulins” “Antibodies” “Antibody” were used to search the databases Cochrane, Embase, LILACS, MEDLINE, PROSPERO, SciELO, Scopus and Web of Science. The risk-of-bias analysis was done by Newcastle-Ottawa Scale. Initially 5,279 articles were identified, and after the exclusion of duplicate articles that did not meet the selection criteria there were four articles eligible for qualitative analysis. The four articles demonstrated low risk of bias, however, they present limitations such as not describing the calculation of sample size and statistical power in the data analysis. In addition, the articles used different methodologies to investigate the relationship between Acs and Ags of *S. mutans* and *S. sobrinus*, which precluded the accomplishment of the meta-analytical study. On the other hand, qualitative analysis showed that two studies found a relationship between low levels of specific IgAs against *S. mutans* Ags and increased severity of early childhood caries, whereas two studies did not observe a relationship. Only one study investigated the relationship between anti-*S. sobrinus* IgAs and early dental caries, and no relationship was observed. The obtained results do not allow to establish a relation between the levels of anti-*S. mutans* or anti-*S. sobrinus* Acs in the development of dental caries in preschoolers, thus new studies should be done to analyze this issue.

**Key words:** Antibody. Dental caries. Dysbiosis. Preschool children. *Streptococcus mutans*. *Streptococcus sobrinus*.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1</b> – Fluxograma de seleção dos estudos elegíveis a partir de todas as citações identificadas (PRISMA) .....	42
<b>Tabela 1</b> – Critérios de exclusão dos estudos.....	43
<b>Tabela 2</b> – Critérios de inclusão dos estudos.....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPD	<i>American Academy of Pediatric Dentistry</i>
Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
ECC	<i>Early childhood caries</i>
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
Gtf	<i>Glycosyltransferase</i>
Gbp	<i>Glucan binding protein</i>
HMS	<i>High Mutans Streptococci</i>
HOMD	<i>Human Oral Microbiome Database</i>
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
LILACS	<i>Latin American and Caribbean Literature in Health Sciences</i>
Medline	<i>MEDILARS online</i>
NOS	<i>Newcastle-Otawa-Scale</i>
Pac	<i>Protein antigen c</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PROSPERO	<i>International prospective register of systematic reviews</i>
PUBMED	<i>Public/Publisher MEDLINE</i>
Poli-Ig	Receptor de imunoglobulina polimérica
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
PRISMA	Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses
SCIELO	<i>Scientific Eletronic Library Online</i>
S-ECC	<i>Severe early childhood caries</i>
slgA	<i>Secretory immunoglobulin A</i>
SpaA	<i>Surface protein antigen A</i>
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>S. sobrinus</i>	<i>Streptococcus sobrinus</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
	OBJETIVO.....	17
<b>2</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>ARTIGO: INFLUÊNCIA DOS ANTICORPOS ANTI-Streptococcus mutans E ANTI-Streptococcus sobrinus NO DESENVOLVIMENTO DA CÁRIE DENTÁRIA EM PRÉ-ESCOLARES: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA</b> .....	<b>24</b>
	<b>APÊNDICES</b> .....	<b>52</b>
	APÊNDICE A – Protocolo Prospero .....	53
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>59</b>
	ANEXO 1 – Versão adaptada da Escala de Newcastle-Ottawa (NOS) .....	60
	ANEXO 2 – Questionário da versão modificada da Escala de Newcastle- Ottawa.....	64
	ANEXO 3 – Normas para publicação na revista Journal of Caries Research .....	66

## INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma das doenças bucais mais prevalentes em todo o mundo (SELWITZ et al., 2007). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) a cárie dentária afeta entre 60 a 90% das crianças em idade escolar e quase 100% dos adultos, representando um problema de saúde pública mundial (PETERSEN et al., 2016). No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde, a prevalência de cárie é de 53,4% em crianças de 5 anos de idade (BRASIL, 2010).

A cárie dentária é definida como uma disbiose biofilme-açúcar dependente complexa (GIACAMAN et al., 2017; RUDNEY et al., 2015). A fermentação bacteriana dos açúcares provenientes da dieta, especialmente a sacarose, faz com que ocorra diminuição do pH local e conseqüente perda de minerais, o que produz a desmineralização da superfície dentária (SHEIHAM et al., 2015; MARSH et al., 2015; FEJERSKOV et al., 2004; CURY et al., 2000).

A desmineralização do esmalte dentário é caracterizada pela dissolução e liberação dos cristais de hidroxiapatita, nesta fase o pH diminui a 5,5 que é o pH crítico para a desintegração do esmalte (DAWES et al., 2003). Este processo pode ser revertido por meio da absorção dos mesmos minerais, fenômeno denominado de remineralização. Além disso, o flúor presente na saliva atua como um catalisador para a difusão dos minerais tornando o esmalte mais resistente (CAROUNANIDY et al., 2009; USHA et al., 2009; SELWITZ et al., 2007; DAWES et al., 2003).

Contudo, neste complexo cenário, outros fatores como, estilo de vida, comportamento, higiene, exposição a fluoretos, hábitos alimentares, níveis sociodemográficos e socioeconômicos, fatores ambientais e componentes salivares além do tempo de interação entre esses componentes também podem contribuir para o desenvolvimento da cárie (BORGES et al., 2016; CASTILHO et al., 2013; HARRIS et al., 2012; CAROUNANIDY et al., 2009; SELWITZ et al., 2007; FEATHERSTONE et al., 2004).

Dentre os fatores relacionados com a cárie dentária a saliva no âmbito da sua composição e função, merece destaque. A saliva é considerada um fluido biológico complexo devido a sua composição e é originado nas glândulas parótida, submandibular, sublingual e glândulas salivares menores da mucosa bucal (LEE et al., 2009; LAWRENCE et al., 2002). A saliva é composta de 99,5% de água e 0,5%

de componentes sólidos, dos quais 0,3% são substâncias orgânicas e 0,2% inorgânicas (LIU et al., 2012; CHIAPPIN et al., 2007). Algumas moléculas orgânicas são enzimas, peptídeos e proteínas e as inorgânicas são cloro, sódio, fósforo, cálcio, potássio, nitrogênio, oxigênio e bicarbonato (MUNGIA et al., 2008). A composição salivar é variável entre os indivíduos e entre glândulas e a secreção salivar pode ser classificada como serosa, mucosa ou mista (BAGHERIAN et al., 2012; MUNGIA et al., 2008; SHIFA et al., 2008; SCHIPPER et al., 2007).

Estudos mostram que a composição salivar pode ser um indicador sensível para a saúde dental (HEMADI et al., 2017; GIANNOBILE et al., 2011), predizendo futuras lesões e determinando a prevalência de cárie (SINGH et al., 2015), além de ser responsável pelo equilíbrio ecológico na cavidade bucal (VAN'T HOF et al., 2014). A saliva também é apontada como um dos fatores importantes para indicar quadros fisiológicos ou patológicos no corpo humano (KACZOR-URBANOWICZ et al., 2017; LIMA et al., 2010; HOFMAN et al., 2001).

A saliva têm como função: lubrificação, manutenção da integridade dentária, proteção e hidratação das mucosas, paladar, formação do bolo alimentar, digestão, limpeza, ação antimicrobiana e tamponante. Essas funções estão relacionadas com as características do fluido salivar e sua composição (PICCO et al., 2017; SINGH et al., 2015; BAGHERIAN et al., 2012; PUY et al., 2006; HUMPHREY et al., 2001; MOSS et al., 1995).

Na cavidade bucal o pH é mantido pela saliva perto da neutralidade em um valor de aproximadamente 6,7 - 7,3 (BALIGA et al., 2013). Esta manutenção do pH é sustentada por dois mecanismos: fluxo salivar e capacidade tampão. O fluxo salivar elimina os carboidratos que podem ser metabolizados e também remove os ácidos produzidos pelas bactérias e a capacidade tampão, neutraliza a acidez proveniente da alimentação e da atividade bacteriana (BALIGA et al., 2013). Nos estudos de Picco (2017) e Singh (2015) foram encontrados maiores valores de pH, fluxo, capacidade tampão salivar em crianças (4 - 8 anos) sem cárie do que em crianças com cárie. Estes autores sugerem que estes fatores são predisponentes para o desenvolvimento da cárie dentária.

Neste contexto, a saliva possui função antimicrobiana que é mediada por conteúdos salivares representadas por proteínas, mucinas, peptídeos, enzimas como lactoferrina, lisozima, peroxidase e anticorpos das classes sIgA (Imunoglobulina A secretora), IgA, IgG e IgM. Sendo o papel destes anticorpos

neutralizar e aglutinar toxinas, bactérias e vírus (DAWES et al., 2015; CHIAPPIN et al., 2007). Especificamente na cavidade bucal, esses anticorpos fornecem proteção às estruturas dentárias, impedindo o desenvolvimento da doença cárie (DAWES et al., 2015; KAROLEWSKA et al., 2008; CHIAPPIN et al., 2007; VAN NIEUW AMERONGEN et al., 2004; HUMPHREY et al., 2001; RUDNEY et al., 1995).

Os anticorpos são originados a partir de células B presentes em tecidos linfóides associados as mucosas (BRANDTZAEG et al., 1995). As células B sofrem diferenciação em células produtoras de anticorpos, os plasmócitos, quando estimuladas pelo antígeno (BRANDTZAEG et al., 1995). No caso da sIgA, os plasmócitos migram para glândulas salivares na camada basal das células epiteliais acinares produzem a IgA (BRANDTZAEG et al., 1995). A seguir, a IgA liga ao receptor poli-Ig (receptor de imunoglobulina polimérica) na camada basal das células epiteliais e é transportada à saliva em formação. A sIgA é secretada na saliva com o fragmento do receptor poli-Ig, chamado de componente secretor que fornece uma capacidade de resistir à degradação proteolítica de enzimas bacterianas e digestivas (BRANDTZAEG et al., 1995). Os anticorpos IgA, IgG e IgM presentes na saliva são produzidos pelos plasmócitos circulantes, estes anticorpos estão presentes na cavidade oral por exsudação através do fluido gengival (AASE et al., 2016; MACPHERSON et al., 2008; BRANDTZAEG et al., 2007; KOPEC et al., 2002; BRANDTZAEG et al., 1995; MORTIMER et al., 1988).

No começo da vida, o bebê nasce com o sistema imunológico imaturo devido à falta de experiência antigênica (SIMON et al., 2015). Durante e após o nascimento, a cavidade bucal dos bebês é colonizada por bactérias comensais, as quais estimulam o desenvolvimento do sistema imunológico (SIMON et al., 2015). Assim as superfícies das mucosas proporcionam uma barreira protetora e o sistema imunológico inato e adquirido atuam de maneira conjunta intensificando a proteção contra os antígenos microbianos (KIYONO et al., 2015). Até os 3 anos de idade a criança passa por mudanças significativas no seu desenvolvimento, a colonização microbiana e o sistema imunológico estão em amadurecimento, e influenciam o estado da saúde bucal. Aproximadamente aos 3 anos, a microbiota da criança está instalada e amadurecida, bem como seu sistema de defesa mediado por anticorpos contra antígenos presentes na microbiota (HOLGERSON et al., 2015; ARRIETA et al., 2014).

Além disso, outro fator relacionado com a cárie dentária é a presença do

biofilme, que são comunidades microbianas incorporadas a uma superfície e estão estrutural e funcionalmente organizados por várias espécies bacterianas que se encontram em homeostase (MARSH et al., 2017; SANZ et al., 2017; MARSH, 2006). Estas bactérias estão integradas a uma matriz extracelular de polímeros ligados a uma superfície em contato com uma fase fluida, localizada na superfície dental (MARSH et al., 2017; SANZ et al., 2017; MARSH, 2006). Quando os micro-organismos se encontram em íntima proximidade, ocorre uma ampla gama de interações que podem ser sinérgicas ou antagônicas. Além disso, estas comunidades microbianas complexas sofrem mudanças na composição desde o nascimento até o envelhecimento (MIRA et al., 2017; MARSH et al., 2017).

A composição do biofilme pode ser influenciada pelo ambiente bucal, e a presença de fatores de estresse, como influências dietéticas, podem levar a mudanças das interações dessas comunidades, promovendo alterações do estado de simbiose desencadeando um estado de disbiose e conseqüentemente a doença cárie (MARSH et al., 2017; MIRA et al., 2017; SANZ et al., 2017; ROBERTS et al., 2015). A formação do biofilme dental e o sistema de *quorum sensing* estão relacionados com a regulação do crescimento, a ativação de genes envolvidos na produção de polissacarídeos, redução do metabolismo e a produção de fatores de virulência (LEUNG et al., 2015). Todos esses eventos são fundamentais para o desenvolvimento da cárie (LEUNG et al., 2015; LEMOS et al., 2013; KOLENBANDER et al., 2002).

O banco de dados do Microbioma Oral Humano (HOMD) tem catalogado mais de 600 espécies bacterianas na cavidade bucal humana, provenientes de indivíduos saudáveis e doentes, com patologias periodontais, cáries, infecções endodônticas e câncer bucal (CHEN et al., 2010). Os principais micro-organismos relacionados com o desenvolvimento da cárie são *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* (RUDNEY et al., 2015; SÁNCHEZ-ACEDO et al., 2013; KOGA et al., 2002). *S. mutans* é considerado o principal agente etiológico da doença e é intensamente responsivo a sacarose, com a produção de ácido láctico capaz de tolerar um pH baixo, além de secretar adesinas que permitem a sua ligação com a superfície dentária (RUDNEY et al., 2015). Seus principais fatores de virulência são o antígeno I/II (Ag I/II) também conhecido como P1, antígeno B ou proteína de adesão celular (PAC). Além deste, igualmente importantes são a glicosiltransferase (Gtf) e a proteína de ligação ao glucano (Gbp). Esses antígenos

estão diretamente relacionados com a capacidade de adesão às superfícies dos dentes (NOGUEIRA et al., 2005). Por outro lado, a presença de *S. sobrinus* está mais relacionada com a gravidade e progressão da cárie (KALESINSKAS et al., 2014; JIANG et al., 2012). Este micro-organismo apresenta fatores de virulência similares ao *S. mutans*, como as Gtf, Gbp e as adesinas SpaA ou Pag (KALESINSKAS et al., 2014; SHANMUGAM et al., 2013; JIANG et al., 2012).

Foi previamente descrito que a indução de anticorpos específicos contra estes antígenos pode impedir o desenvolvimento da cárie dentária, diminuindo ou eliminando a colonização por estes micro-organismos (ROBINETTE et al., 2011; KOGA et al., 2002). Um estudo, em 1982, mostrou o efeito protetor dos anticorpos e o desenvolvimento da cárie em crianças e adolescentes de 3 a 14 anos (BOLTON e HLAVA, 1982). Por outro lado, YAZAKI e colaboradores (1999) no estudo de crianças entre 3 e 8 anos não encontraram diferenças em relação aos níveis de sIgA anti-*S. mutans* entre grupos com e sem cárie, indicando que estes anticorpos não apresentam proteção eficiente contra a cárie.

No estudo de Colombo et al. (2016) os autores observaram em crianças com *severe early childhood caries* (S-ECC) uma diminuição dos anticorpos sIgA contra o antígeno GbpB do *S. mutans*, sugerindo que essa redução possa potencializar a gravidade da lesão de cárie. Uma vez que esse antígeno encontra-se na superfície celular e é importante para o *S. mutans*, pois favorece a agregação e colonização bacteriana no biofilme dental (STIPP, 2008).

Os antígenos PAc e GLU do *S. mutans* têm sido relacionados com o processo inicial de aderência da bactéria com a película adquirida sobre a superfície dos dentes. Os antígenos I/II ou PAc encontram-se na superfície do *S. mutans* e agem como adesinas na ligação dos estreptococos durante a colonização (DEMUTH, 1990). GLU é um domínio ligante de glucano da Gtf, e é considerado o principal fator de virulência dos *S. mutans* (Li et al., 2009; ZHANG et al., 2002). A Gtf é essencial para expressão da virulência dos *S. mutans* devido a capacidade de produzir glucanos a partir de sacarose. Além disso, tem um papel importante na aderência e acúmulo de estreptococos grupo mutans no biofilme de pré-escolares (OMAR et al., 2011). Yang et al. (2015) demonstraram que níveis de sIgA totais e específicos foram significativamente maiores contra esses antígenos, PAc e GLU, em crianças com S-ECC, sugerindo que o aumento de concentração de antígenos no S-ECC estimula à produção de anticorpos mas a concentração desses anticorpos

para *S. mutans* na saliva é muito baixa para prevenir a infecção por bactérias cariogênicas e inibir o desenvolvimento de cárie. Por outro lado, Cao et al. (2016) também compararam os níveis específicos de sIgA anti-PAc e anti-GLU em crianças sem cárie e com diferentes níveis de cárie dentária e observaram que não houve diferenças significativas nos níveis desses anticorpos entre os grupos, os níveis de anti-PAc e anti-GLU eram muito baixos, não concordando com os achados de Yang et al. (2015).

Parisotto et al. (2011) acompanharam por um ano crianças sem cárie e com cárie ativa. Após o acompanhamento foi observado que a concentração total de IgA salivar aumentou em ambos os grupos. Com relação aos níveis de anticorpos específicos contra a GbpB e a região SBR do Ag I/II do *S. mutans* e o antígeno Gtf do *S. sobrinus*, também aumentaram em ambos os grupos e não foram observadas diferenças. No entanto, Nogueira et al. (2005) encontraram níveis baixos de IgA específicos para o antígeno I/II, em crianças infectadas com *S. mutans*.

Naspitz et al. (1999) de forma similar não encontraram diferenças entre os grupos com e sem cárie, em relação aos níveis de anticorpos específicos sIgA, IgA, IgG e IgM contra proteínas dos *S. mutans*. Os resultados apresentados por estes autores não mostraram correlação entre os anticorpos e a atividade da cárie, sugerindo que não há influência no desenvolvimento da doença. Além disso, a falta de reconhecimento do antígeno I/II pelos anticorpos nestas crianças sugere uma imaturidade imunológica específica.

Assim, o papel da resposta imunológica dos anticorpos contra antígenos dos estreptococos grupo mutans no desenvolvimento da cárie tem apresentado resultados contraditórios na literatura.

## **OBJETIVO**

O objetivo deste estudo foi realizar uma revisão sistemática para investigar a relação dos anticorpos específicos *anti-S. mutans* e *anti-S. sobrinus* no desenvolvimento da cárie da primeira infância em pré-escolares.

## REFERÊNCIAS

- AASE, A. et al. Salivary IgA from the sublingual compartment as a novel noninvasive proxy for intestinal immune induction. **Mucosal immunology**, v. 9, n. 4, p. 884-893, 2016.
- ARRIETA, M. C. et al. The intestinal microbiome in early life: health and disease. **Frontiers in immunology**, v. 5:427,2014.
- BAGHERIAN, A.; ASADIKARAM, G. Comparison of some salivary characteristics between children with and without early childhood caries. **Indian Journal of Dental Research**, v. 23, n. 5, p. 628, 2012.
- BALIGA, S.; MUGLIKAR, S.; KALE, R. Salivary pH: A diagnostic biomarker. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 17, n. 4, p. 461, 2013.
- BRANDTZAEG, P. E. R. Do salivary antibodies reliably reflect both mucosal and systemic immunity?. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1098, n. 1, p. 288-311, 2007.
- BRANDTZAEG, P. E. R. Molecular and cellular aspects of the secretory immunoglobulin system. *Apmis*, v. 103, n. 1 - 6, p. 1-19, 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Projeto SB Brasil 2010**. Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: Resultados principais. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.
- BOLTON, R. W.; HLAVA, G. L. Evaluation of salivary IgA antibodies to cariogenic microorganisms in children. Correlation with dental caries activity. **Journal of dental research**, v. 61, n. 11, p. 1225-1228, 1982.
- BORGES, S. T. et al. Factors associated with caries: a survey of students from southern Brazil. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 34, n. 4, p. 489-494, 2016.
- CAO, X. X. et al. Immunogenicity and prediction of epitopic region of antigen Ag I/II and glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. **Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]**, v. 36, n. 3, p. 416-421, 2016.
- CAROUNANIDY, U.; SATHYANARAYANAN, R. Dental caries: A complete changeover (Part II) - Changeover in the diagnosis and prognosis. **Journal of conservative dentistry: JCD**, v. 12, n. 3, p. 87, 2009.
- CASTILHO, A. R. F. D. et al. Influence of family environment on children's oral health: a systematic review. **Jornal de Pediatria (Versão em Português)**, v. 89, n. 2, p. 116-123, 2013.
- CHEN, T. et al. The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information. **Database**, v. 2010, 2010.

CHIAPPIN, S. et al. Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. **Clinica chimica acta**, v. 383, n. 1, p. 30-40, 2007.

COLOMBO, N. H. et al. Relationship between the IgA antibody response against *Streptococcus mutans* GbpB and severity of dental caries in childhood. **Archives of oral biology**, v. 67, p. 22-27, 2016.

CURY, J. A. et al. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. **Caries Research**, v. 34, n. 6, p. 491-497, 2000.

DAWES, C. et al. The functions of human saliva: A review sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI. **Archives of oral biology**, v. 60, n. 6, p. 863-874, 2015.

DAWES, C. et al. What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid? **Journal-Canadian Dental Association**, v. 69, n. 11, p. 722-725, 2003.

DEMUTH, D. R. et al. Comparison of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* receptors for human salivary agglutinin. **Microbial pathogenesis**, v. 9, n. 3, p. 199-211, 1990.

FEATHERSTONE, J. D. B. The continuum of dental caries-evidence for a dynamic disease process. **Journal of dental research**, v. 83, n. 1\_suppl, p. 39-42, 2004.

FEJERSKOV, O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. **Caries research**, v. 38, n. 3, p. 182-191, 2004.

GIACAMAN, R. A. Sugars and beyond. The role of sugars and the other nutrients and their potential impact on caries. **Oral Diseases**, 2017.

GIANNOBILE, W. V. et al. Translational and clinical applications of salivary diagnostics. **Advances in dental research**, v. 23, n. 4, p. 375-380, 2011.

JIANG, Q. et al. AP-PCR detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in caries-free and caries-active subjects. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 365, n. 1-2, p. 159-164, 2012.

KACZOR-URBANOWICZ, K. E.; MARTIN C-P, C.; ARO, K.; TU, M.; GARCIA-GODOY, F.; WONG, D. T. Saliva diagnostics—Current views and directions. **Experimental Biology and Medicine**, v. 242, n. 5, p. 459-472, 2017.

KALESINSKAS, P. et al. Reducing dental plaque formation and caries development. A review of current methods and implications for novel pharmaceuticals. **Stomatologija**, v. 16, n. 2, p. 44-52, 2014.

KAROLEWSKA, E. et al. Antibacterial potential of saliva in children with leukemia. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 105, n. 6, p. 739-744, 2008.

KIYONO, H.; AZEGAMI, T. The mucosal immune system: From dentistry to vaccine development. **Proceedings of the Japan Academy, Series B**, v. 91, n. 8, p. 423-439, 2015.

KOGA, T. et al. Immunization against dental caries. **Vaccine**, v. 20, n. 16, p. 2027-2044, 2002.

KOLENBRANDER, P. E. et al. Communication among oral bacteria. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 66, n. 3, p. 486-505, 2002.

KOPEC, L. K. et al. Influence of antibody on the structure of glucans. **Caries research**, v. 36, n. 2, p. 108-115, 2002.

HARRIS, J. Dental neglect in children. **Paediatrics and Child Health**, v. 22, n. 11, p. 476-482, 2012.

HEMADI, A. S. et al. Salivary proteins and microbiota as biomarkers for early childhood caries risk assessment. **International journal of oral science**, v. 9, n. 11, p. e1, 2017.

HOFMAN, L. F. Human saliva as a diagnostic specimen. **The Journal of nutrition**, v. 131, n. 5, p. 1621S-1625S, 2001.

HOLGERSON, P. L. et al. Maturation of oral microbiota in children with or without dental caries. **PloS one**, v. 10, n. 5, p. e0128534, 2015.

HUMPHREY, S. P.; WILLIAMSON, R. T. A review of saliva: normal composition, flow, and function. **The Journal of prosthetic dentistry**, v. 85, n. 2, p. 162-169, 2001.

LEMONS, J. A. et al. Streptococcus mutans: a new Gram-positive paradigm? **Microbiology**, v. 159, n. 3, p. 436-445, 2013.

LEUNG, V. et al. The formation of Streptococcus mutans persists induced by the quorum-sensing peptide pheromone is affected by the LexA regulator. **Journal of bacteriology**, v. 197, n. 6, p. 1083-1094, 2015.

LAWRENCE, H. P. Salivary markers of systemic disease: noninvasive diagnosis of disease and monitoring of general health. **Journal-Canadian Dental Association**, v. 68, n. 3, p. 170-175, 2002.

LEE, Y-H; WONG, D. T. Saliva: an emerging biofluid for early detection of diseases. **American journal of dentistry**, v. 22, n. 4, p. 241, 2009.

LI, Y. et al. Enhanced immunogenicity of an anti - caries vaccine encoding a cell - surface protein antigen of Streptococcus mutans by intranasal DNA prime - protein boost immunization. **The journal of gene medicine**, v. 11, n. 11, p. 1039-1047, 2009.

LIMA, D. P. et al. Saliva: reflection of the body. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 3, p. e184-e188, 2010.

LIU, J.; DUAN, Y. Saliva: A potential media for disease diagnostics and monitoring. **Oral oncology**, v. 48, n. 7, p. 569-577, 2012.

MACPHERSON, A. J. et al. The immune geography of IgA induction and function. **Mucosal immunology**, v. 1, n. 1, p. 11-22, 2008.

MARSH, P. D.; HEAD, D. A.; DEVINE, D. A. Ecological approaches to oral biofilms: control without killing. **Caries research**, v. 49, n. Suppl. 1, p. 46-54, 2015.

MARSH, P. D.; ZAURA, E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 44, n. S18, 2017.

MARSH, P. D. Dental plaque as a biofilm and a microbial community—implications for health and disease. **MC Oral health**, v. 6, n. 1, p. S14, 2006.

MORTIMER, P. P.; PARRY, J. V. The use of saliva for viral diagnosis and screening. **Epidemiology & Infection**, v. 101, n. 2, p. 197-201, 1988.

MIRA, A.; SIMON - SORO, A.; CURTIS, M. A. Role of microbial communities in the pathogenesis of periodontal diseases and caries. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 44, n. S18, 2017.

MOSS, S. J. Clinical implications of recent advances in salivary research. **Journal of Esthetic and Restorative Dentistry**, v. 7, n. 5, p. 197-203, 1995.

MUNGIA, R. et al. Interaction of age and specific saliva component output on caries. **Aging clinical and experimental research**, v. 20, n. 6, p. 503-508, 2008.

OMAR, M.; KHATTAB A.; RASHED, A. Glucosyltransferase B, immunoglobulin a, and caries experience among a group of Egyptian preschool children. **Journal of Dentistry for Children**, v. 79, p. 63-68, 2011.

NASPITZ, G. M. C. C. et al. Anti - Streptococcus mutans antibodies in saliva of children with different degrees of dental caries. **Pediatric allergy and immunology**, v. 10, n. 2, p. 143-148, 1999.

NOGUEIRA, R. D. et al. Characterization of salivary immunoglobulin A responses in children heavily exposed to the oral bacterium Streptococcus mutans: influence of specific antigen recognition in infection. **Infection and immunity**, v. 73, n. 9, p. 5675-5684, 2005.

PARISOTTO, T. M. et al. Immunological and microbiologic changes during caries development in young children. **Caries research**, v. 45, n. 4, p. 377-385, 2011.

PETERSEN, P. E.; OGAWA, H. Prevention of dental caries through the use of fluoride—the WHO approach. **Community dental health**, v. 33, n. 2, p. 66-8, 2016.

PICCO, D. C. R. et al. Children with a Higher Activity of Carbonic Anhydrase VI in Saliva Are More Likely to Develop Dental Caries. **Caries research**, v. 51, n. 4, p. 394-401, 2017.

PUY, C. L. The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 11, n. 5, p. 449-55, 2006.

ROBERTS, F. A.; DARVEAU, R. P. Microbial protection and virulence in periodontal tissue as a function of polymicrobial communities: symbiosis and dysbiosis. **Periodontology 2000**, v. 69, n. 1, p. 18-27, 2015.

ROBINETTE, R. A. et al. A therapeutic anti-Streptococcus mutans monoclonal antibody used in human passive protection trials influences the adaptive immune response. **Vaccine**, v. 29, n. 37, p. 6292-6300, 2011.

RUDNEY, J. D. et al. Protein relative abundance patterns associated with sucrose-induced dysbiosis are conserved across taxonomically diverse oral microcosm biofilm models of dental caries. **Microbiome**, v. 3, n. 1, p. 69, 2015.

RUDNEY, J. D. Does variability in salivary protein concentrations influence oral microbial ecology and oral health? **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 6, n. 4, p. 343-367, 1995.

SANZ, M. et al. Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 44, n. S18, 2017.

SÁNCHEZ-ACEDO, M. et al. Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus detection by Polymerase Chain Reaction and their relation to dental caries in 12 and 15 year-old schoolchildren in Valencia (Spain). **Medicina oral, patología oral y cirugía bucal**, v. 18, n. 6, p. e839, 2013.

SCHIPPER, R. G.; SILLETTI, E.; VINGERHOEDS, M. H. Saliva as research material: biochemical, physicochemical and practical aspects. **Archives of oral biology**, v. 52, n. 12, p. 1114-1135, 2007.

SELWITZ, R. H.; ISMAIL, A. I.; PITTS, N. B. Dental caries. **The Lancet**, v. 369, n. 9555, p. 51-59, 2007.

SHANMUGAM, K. T. et al. Dental caries vaccine—a possible option? **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 7, n. 6, p. 1250, 2013.

SHEIHAM, A.; JAMES, W. P. T. Diet and dental caries: The pivotal role of free sugars reemphasized. **Journal of dental research**, v. 94, n. 10, p. 1341-1347, 2015.

SHIFA, S. et al. Quantitative assessment of IgA levels in the unstimulated whole saliva of caries-free and caries-active children. **Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry**, v. 26, n. 4, p. 158, 2008.

SIMON, A. K.; HOLLANDER, G. A.; MCMICHAEL, A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. In: **Proc. R. Soc. B. The Royal Society**, p. 20143085. 2015.

SINGH, S. et al. Saliva as a prediction tool for dental caries: an in vivo study. **Journal of oral biology and craniofacial research**, v. 5, n. 2, p. 59-64, 2015.

STIPP, R. N. et al. Transcriptional analysis of gtfB, gtfC, and gbpB and their putative response regulators in several isolates of *Streptococcus mutans*. **Molecular Oral Microbiology**, v. 23, n. 6, p. 466-473, 2008.

USHA, C.; SATHYANARAYANAN, R. Dental caries-A complete changeover (Part I). **Journal of conservative dentistry: JCD**, v. 12, n. 2, p. 46, 2009.

VAN NIEUW AMERONGEN, A.; BOLSCHER, J. G. M.; VEERMAN, E. C. I. Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology?. **Caries research**, v. 38, n. 3, p. 247-253, 2004.

VAN'T HOF, W. Antimicrobial defense systems in saliva. In: *Saliva: Secretion and Functions*. **Karger Publishers**, p. 40-51, 2014.

YANG, Y. et al. Comparison of immunological and microbiological characteristics in children and the elderly with or without dental caries. **European journal of oral sciences**, v. 123, n. 2, p. 80-87, 2015.

YAZAKI, S. C. et al. Anti-*Streptococcus mutans* IgA in children with and without dental caries. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, v. 13, n. 3, p. 211-217, 1999.

ZHANG, P. et al. Enhanced immunogenicity of a genetic chimeric protein consisting of two virulence antigens of *Streptococcus mutans* and protection against infection. **Infection and immunity**, v. 70, n. 12, p. 6779-6787, 2002.

## ARTIGO

Artigo formatado de acordo com as normas da revista Caries Research

### **INFLUÊNCIA DOS ANTICORPOS ANTI-*Streptococcus mutans* E ANTI-*Streptococcus sobrinus* NO DESENVOLVIMENTO DA CÁRIE DENTÁRIA EM PRÉ-ESCOLARES: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**

#### **RESUMO**

A cárie dentária é definida como uma disbiose biofilme-açúcar dependente complexa. A cárie dentária quando ocorre na primeira infância pode causar danos irreversíveis na cavidade bucal, que causam um impacto negativo na saúde geral e no desenvolvimento da criança, além de aumentar o risco de cárie na dentição permanente. O papel da resposta imune humoral não está completamente entendido e as crianças nessa fase apresentam um sistema imune em processo de maturação. Assim, esta revisão sistemática teve como objetivo investigar a influência dos anti-*S. mutans* e anti-*S. sobrinus* específicos com a ocorrência da cárie dentária em pré-escolares. As bases de dados utilizadas foram Lilacs, Medline, Scielo, Cochrane, Prospero, Embase, Web of Science e Scopus. As palavras-chaves utilizadas de forma isolada e combinada nas buscas foram: “Child, Preschool” “Preschool Child” “Preschool Children” “Streptococcus” “Immunoglobulins” “Immunoglobulin” “Immune Globulins” “Antibody” “Antibodies”. O resultado da busca foi 5.279 artigos, dos quais 2.454 foram excluídos por duplicatas e restaram 2.825 estudos. A partir disso, 2.804 artigos foram excluídos pelo título e resumo, após leitura dos 21 textos completos restaram quatro artigos elegíveis para análise qualitativa. Para o risco de viés dos quatro estudos foi utilizada à escala modificada de NOS. Não foi possível a realização de estudo meta-analítico devido a utilização de diferentes técnicas de detecção para os antígenos do *S. mutans* e *S. sobrinus*. De uma forma geral os estudos analisados tem baixo risco de viés. Desses estudos, dois observaram uma relação negativa entre os níveis de anticorpos IgA específicos contra *S. mutans* e a cárie da primeira infância, sugerindo um papel protetor para os anticorpos anti-*S. Mutans*, enquanto os outros dois estudos não encontraram efeito protetor. Com relação ao estudo que avaliou o *Streptococcus sobrinus* não foi encontrada uma relação direta entre os níveis de

anticorpos IgA anti-*S. sobrinus* e a cárie dentária precoce. Portanto, com os resultados obtidos não se pode afirmar que os anticorpos têm um papel no desenvolvimento da cárie em pré-escolares e novos estudos devem ser feitos para analisar essa questão.

**Palavras-chave:** Anticorpos, Cárie dentária, Disbiose, Pré-escolares, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*.

## Introdução

A cárie é definida como uma disbiose biofilme-açúcar dependente complexa [Marsh et al., 2015; Sheiham e James, 2015; Giacaman, 2017]. A principal causa desta doença é o consumo de alimentos ricos em açúcares, especialmente a sacarose [Cury et al., 2000; Fejerskov, 2004; Rudney et al., 2015]. Contudo, outros fatores como: micro-organismos, higiene, exposição a fluoretos, níveis sociodemográficos e socioeconômicos, fatores ambientais e comportamentais, componentes imunológicos, composição e fluxo salivar também podem contribuir no desenvolvimento da cárie dentária [Selwitz et al., 2007; Harris, 2012; Borges et al., 2016].

Neste contexto, a saliva é um elemento essencial do hospedeiro e apresenta importante papel no processo de desenvolvimento da cárie dentária. A saliva apresenta componentes orgânicos e inorgânicos, representados por diversas proteínas e enzimas [Puy, 2006; Schipper et al., 2007; Mungia et al., 2008; Bagherian e Asadikaram, 2012]. O fluido salivar possui múltiplas funções, tais como manutenção da integridade da mucosa oral, capacidade tampão, além de outras funções como ação antimicrobiana [Singh et al., 2015; Picco et al., 2017]. A função antimicrobiana da saliva é mediada em parte por conteúdos salivares, como a imunoglobulina A secretora (sIgA) e as imunoglobulinas IgA, IgG e IgM, o anticorpo sIgA é a principal molécula da imunidade adaptativa na cavidade bucal [Smith e Taubman et al., 1993; Bagherian e Asadikaram, 2012]. O papel destes anticorpos é neutralizar e aglutinar toxinas e micro-organismos, oferecendo proteção às estruturas dentárias e mucosa bucal [Chiappin et al., 2007; Karolewska et al., 2008; Dawes et al., 2015].

Os principais micro-organismos relacionados com o desenvolvimento da cárie dentária são *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* [Koga et al., 2002;

Rudney et al., 2015]. *S. mutans* é considerado o principal micro-organismo e utiliza a sacarose como fonte de energia [Krzyściak et al., 2014]. O metabolismo da sacarose pelo *S. mutans* leva a produção de ácido láctico, e conseqüentemente a redução do pH do meio, que afeta diretamente o processo de desmineralização/remineralização da estrutura dentária [Takahashi e Nyvad, 2008; Rudney et al., 2015].

Os principais fatores de virulência dos *S. mutans* são o antígeno I/II (Ag I/II) também conhecido como P1, ou antígeno B (AgB) ou ainda proteína de superfície celular (PAc). Além deste, igualmente importantes são as glicosiltransferases (GtfB, GtfC, GtfD) e as proteínas de ligação ao glucano (GbpA, GbpB, GbpC) [Smith e Mattos-Graner, 2008]. Esses antígenos estão diretamente relacionados com a capacidade de adesão às superfícies dentárias [Nogueira et al., 2005; Law et al., 2007]. Por outro lado, a presença de *S. sobrinus* está mais relacionada com a gravidade e progressão da cárie [Hirose et al., 1993; Jiang et al., 2012]. Este micro-organismo apresenta fatores de virulência similares ao *S. mutans*, como as glicosiltransferases (Gtf), a adesina Pag ou SpaA, e as proteínas de ligação ao glucano (Gbp) [Jiang et al., 2012; Shanmugam et al., 2013; Kalesinskas et al., 2014].

A indução de anticorpos específicos contra estes antígenos pode impedir o desenvolvimento da cárie dentária, diminuindo ou eliminando a colonização por micro-organismos cariogênicos [Ma et al., 1998; Koga et al., 2002; Robinette et al., 2011]. Um dos primeiros estudos, em 1982, mostrou o efeito protetor dos anticorpos e o desenvolvimento da cárie em crianças e adolescentes de 3 a 14 anos [Bolton e Hlava, 1982]. Por outro lado, Yazaki et al. [1999] analisando um grupo de crianças entre 3 e 8 anos não encontraram diferenças em relação aos níveis de sIgA anti-*S. mutans* entre grupos com e sem cárie, indicando que estes anticorpos não apresentam proteção contra a cárie.

Em resumo, a cárie dentária da primeira infância é uma condição especialmente preocupante, que afeta a criança numa idade crítica do seu desenvolvimento e tem conseqüências importantes na saúde bucal e geral da criança. Por isso, o conhecimento do papel da resposta imunológica dos anticorpos contra antígenos dos estreptococos do grupo mutans no desenvolvimento da cárie é um assunto de extrema importância, já que a literatura apresenta resultados contraditórios. Neste sentido, o objetivo desta revisão sistemática foi investigar se

há relação dos anticorpos salivares específicos anti-*S. mutans* e anti-*S. sobrinus* no desenvolvimento da cárie dentária em pré-escolares.

## **Materiais e Métodos**

Essa revisão sistemática seguiu os critérios do PRISMA (Principais itens para relatar Revisões sistemáticas e Meta-análises) [Moher et al., 2009].

As pesquisas foram realizadas nas seguintes bases de dados: Medline (1950 - Março 2017), LILACS-*Latin American and Caribbean Health Science* (1982 - Março 2017), SCIELO-*Scientific Electronic Library Online* (1998 - Março 2017), EMBASE-*Biomedical Research* (1980 - Março 2017), Web of Science (1945 - Março 2017), Scopus (1995 - Março 2017), Central Register of Controlled Trials - Cochrane Library (2012 - Março 2017) e PROSPERO (2011 - Março 2017). Essa revisão foi cadastrada no PROSPERO (Registro Internacional Prospectivo de Revisões Sistemáticas), número do registro CRD42017057437.

A estratégia de busca utilizou as seguintes palavras-chave: “*Child, Preschool*”, “*Preschool Child*”, “*Preschool Children*”, “*Streptococcus*”, “*Immunoglobulins*”, “*Immunoglobulin*”, “*Immune Globulins*”, “*Antibody*”, “*Antibodies*”. Os operadores booleanos " OR " e " AND " foram aplicados para combinar as palavras-chave em todas as bases de dados. Quando necessário, foram realizadas alterações para adequar as palavras de acordo com a especificidade de cada base de dados.

Não houve restrição de datas ou de linguagem na inclusão dos estudos desta revisão. Todos os procedimentos de busca foram realizados por dois examinadores independentes e cegos para os resultados. As buscas iniciaram em 07/11/2016 e finalizaram em 31/03/2017. Quando títulos e resumos sugeriam que o estudo tinha potencial elegível para inclusão, foi obtida uma cópia do texto completo do manuscrito. Desacordos entre os dois examinadores quanto à elegibilidade de um estudo foram resolvidos por discussão ou, quando necessário, por um terceiro avaliador.

Foram incluídas nesta revisão, estudos com crianças saudáveis de 3 a 6 anos de idade, as quais não estavam fazendo uso de antimicrobianos, ou medicamentos que pudessem ter efeitos relacionados a frequência de cárie em crianças ou na imunidade dos participantes. Também foram incluídos estudos em crianças com e sem cárie diagnosticadas de acordo com o índice ceo-d (Dentes

cariados, extraídos e obturados) e ceo-s (Superfícies cariados, extraídos e obturados) preconizado pela Organização Mundial da Saúde [OMS-1997].

Além disso, foram incluídos estudos quantitativos que permitiram comparar a função imune com o desenvolvimento da cárie por meio de métodos de avaliação da concentração de anticorpos específicos anti-*S. mutans* e anti-*S. sobrinus* utilizando testes laboratoriais, além da obtenção de amostra de saliva não estimulada.

Foram excluídos estudos relacionados com vacinas e testes imunológicos em animais de todos os tipos, comentários, relatos de casos, séries de casos, editoriais, resumos de conferências, revisão narrativa de literatura, artigos de opinião e cartas ao editor. Todas as buscas foram incluídas em programa gerenciador de referências (ENDNOTE-X7) e artigos em duplicatas foram removidos.

O risco de viés foi avaliado utilizando a versão modificada da *Newcastle-Otawa-Scale* (NOS). A NOS contém oito domínios de avaliação de viés, e cada domínio recebe uma pontuação que pode variar entre 0 e 3. O escore 0 representa alto risco, 1 moderado risco, 2 médio risco, e 3 baixo risco de viés. A maior pontuação nesta escala é 27, que representa estudos com baixo risco de viés. Os estudos não foram excluídos pelo alto risco de viés, mas o viés dos estudos incluídos foi considerado na síntese dos resultados (Tabela 2) e na interpretação dos achados. O coeficiente Kappa foi calculado usando o programa SPSS 20.0 (Chicago, IL, USA) para avaliar a concordância entre os avaliadores para o risco de viés dos estudos incluídos.

## Resultados

Na figura 1 o processo de seleção dos estudos é mostrado. De acordo com a estratégia de busca estabelecida foram identificados um total de 5.279 artigos, dos quais 2.454 foram removidos por duplicata, permanecendo 2.825 estudos. A partir deste número, 2.804 artigos foram excluídos após leitura do título e resumo, restando 21 registros selecionados. Desses, dois artigos foram excluídos por se tratar de revisão de literatura [Tenovuo, 1986; Tenovuo e Aaltonen, 1991] e três por não serem localizados pelo COMUT nacional e internacional e nem pelo contato por e-mail com os autores [Smith e Taubman, 1995; Khazanova et al., 1995, Tenovuo, 1991]. Os 16 artigos restantes tiveram o texto completo analisado sendo que 12 artigos foram excluídos por não atenderem aos critérios de inclusão (Tabela 1), restando apenas quatro estudos elegíveis para esta revisão. Os 12 estudos foram

excluídos nessa fase devido a amostra não estar dentro da faixa etária, ou por terem analisado saliva estimulada, ou por não deixar claro a forma de obtenção da saliva, um por não ter grupo controle composto por crianças sem cárie, ou por não analisar anticorpos anti-*S. mutans* ou anti-*S. sobrinus* (**Tabela 1**). Na tabela 2 estão descritos os quatro estudos incluídos que preencheram os critérios de elegibilidade da presente revisão sistemática.

Nos estudos de Naspitz et al. [1999], Parisotto et al. [2011] e Yang et al. [2015], Colombo et al. [2016] o diagnóstico de cárie foi realizado pelos índices de ceod/ceos. Adicionalmente Colombo et al. [2016], Yang et al. [2015] e Naspitz et al. [1999] utilizaram a classificação de cárie dentária pela American Academy of Pediatric Dentistry (AAPD, 2005), que define a cárie da primeira infância e cárie severa da primeira infância. A cárie da primeira infância (ECC) é definida como “presença de um ou mais dentes decíduos cariados (lesões cavitadas ou não), perdidos (devido à cárie) ou restaurados antes do 71 meses de idade” e a cárie severa de infância, cárie rampante ou cárie de mamadeira (S-ECC) como “qualquer sinal de superfície lisa cariada, com ou sem cavidade em crianças com menos de 3 anos de idade, e mais de quatro, cinco e seis superfícies afetadas em dentes anteriores decíduos aos 3 e 5 anos de idade” [Yang et al., 2015]. Com relação ao desenho experimental dos 4 estudos incluídos, apenas o estudo de Parisotto et al. [2011] realizou estudo longitudinal com acompanhamento de um ano. A obtenção das amostras de saliva em todos os estudos foi realizada de forma não estimulada, com no mínimo uma hora de jejum antes da coleta das amostras.

Colombo et al. [2016] estudaram a associação entre a severidade da cárie da primeira infância e os níveis de *S. mutans* e anticorpos IgA contra antígenos GbpB do *S. mutans*. Este estudo transversal avaliou 57 crianças de 36 a 60 meses de idade, estratificadas em três grupos (19 crianças sem cárie, 17 com ECC e 21 S-ECC). A concentração dos anticorpos salivares IgA foi determinada por método de ELISA (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática) e os anti-GbpB *S. mutans* foram detectados pelo método de Western Blotting. Quanto aos níveis de *S. mutans* foram detectadas diferenças nos três grupos S-ECC 5,63 (3,15-8,3) UFC (Unidades formadoras de Colônia), ECC 3,74 (0-6,66) UFC sem cárie 3,35 (0-7,29) UFC. Os níveis de IgA total não apresentaram diferenças entre os grupos. Os autores também verificaram que em crianças com altos níveis de *S. mutans* os níveis de IgA anti-GbpB foram menores no grupo S-ECC quando comparados com os grupos

ECC e sem cárie, mostrando que a redução da resposta das IgA contra *S. mutans* pode apresentar influência na cárie dentária da primeira infância.

Parisotto et al. [2011] estudaram a associação entre desenvolvimento da cárie, colonização com micro-organismos relacionados com a cárie e imunidade nas crianças que estão iniciando a transição para dentição mista. A amostra deste estudo longitudinal foi composta de 40 crianças de 3 a 4 anos de idade (23 sem cárie e 17 com cárie ativa). Os níveis de IgA total e IgA para epítomos de virulência do *S. mutans* foram medidos por Ensaio Luminex. Quanto aos níveis de *S. mutans* e Lactobacilos os resultados não apresentam diferenças significativas entre os grupos no *baseline*. Por outro lado houve aumento dos níveis do *S. mutans* e Lactobacilos no grupo cárie ativa durante o acompanhamento de um ano. Os níveis de IgA aumentaram significativamente em ambos os grupos (*baseline* 116,46±18,91 µg/ml e acompanhamento 153,36±18,36 µg/ml) e o mesmo aconteceu para os níveis de IgA específicos para Gtf, GbpB e Ag I/II (SBR). Existem nove peptídeos (QGQ, VAR, SYI, SIG, GGY, Peptídeo 7, LBK, GLU e Peptídeo 16) associados com domínios de importância biológica para o Gbp e Gtf dos estreptococos. Durante o acompanhamento de um ano os níveis de anticorpos IgA para sete desses domínios Gbp do *S. mutans* (VAR, SYI, SIG) e Gtf do *S. sobrinus* (GGY, LVK, GLU, Peptídeo 16) estavam aumentados significativamente no grupo sem cárie. No entanto, no grupo com cárie ativa houve aumento dos anticorpos somente contra três desses peptídeos (VAR, SIG, GLU). Com relação ao *S. sobrinus* houve um aumento dos níveis de anticorpos anti-peptídeo 16 derivado do antígeno Gtf I em indivíduos livres de cárie. A análise multivariada mostrou que menores níveis de sIgA no *baseline* estão significativamente associados com alto risco de cárie. Os resultados deste estudo sugerem que o nível de *S. mutans* e lactobacilos estão associados com cárie dentária nesta população e parece haver uma modulação diferenciada nestes anticorpos em crianças com e sem cárie e a resposta da IgA para epítomos de virulência podem influenciar a severidade da doença.

Yang et al. [2015] estudaram a relação entre ECC, os níveis de *S. mutans* na saliva e a concentração de IgA e sIgA. A amostra desse estudo transversal foi composta de 70 crianças de 3 a 4 anos (36 crianças sem cárie e 34 com ECC e S-ECC). A quantificação dos níveis de sIgA e IgA para antígenos PAc e GLU do *S. Mutans* foi determinada pelo método de ELISA e qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real). Os resultados desse estudo expressos em log<sub>10</sub>

mostraram níveis de *S. mutans* maiores no grupo S-ECC ( $5,4 \pm 1,91$ ) do que no ECC ( $4,6 \pm 1,09$ ) e sem cárie ( $4,5 \pm 4,06$ ). A concentração de sIgA total foi maior no grupo S-ECC ( $5,7 \pm 0,22$ ) do que nos grupos ECC ( $5,5 \pm 0,20$ ) e sem cárie ( $5,5 \pm 0,29$ ) e os níveis de sIgA anti-PAc e anti-GLU foram maiores no grupo S-ECC porém não apresentaram diferença estatística.

Naspitz et al. [1999] no seu estudo transversal avaliaram a relação da resposta imune bucal e a severidade da cárie dentária em 49 crianças de 3 a 5 anos de idade. A amostra foi estratificada em três grupos (20 crianças sem cárie, 15 com ECC e 14 com S-ECC). O nível de sIgA foi medido pelo método de Elisa bem como os títulos de IgA, IgG e IgM e para especificidade dos antígenos foi utilizado o método de Western Blotting. Os resultados apresentaram números menores de unidades formadoras de colônia (UFC) de *S. mutans* no grupo sem cárie  $12 (0-252 \times 10^3)$  UFC quando comparado com ECC  $430 (0,9-1.600 \times 10^3)$  UFC e S-ECC  $848 (29-7.600 \times 10^3)$  UFC. Nenhuma diferença significativa entre os níveis de sIgA foi observada entre os grupos, e nenhuma diferença foi encontrada entre os três grupos quanto ao título de anticorpos anti-*S. mutans* IgA, IgG e IgM. Além de não identificar diferenças entre os grupos, verificaram a ausência de anticorpos na saliva das crianças contra o Antígeno I/II (185 kDa) sugerindo uma imaturidade imunológica específica, já que esses antígenos foram identificados somente no grupo controle de adultos.

Os resultados do risco de viés (Tabela 2) demonstraram bons escores dos artigos selecionados, e de maneira geral pode-se assumir baixo risco de viés dos estudos. Destaca-se a investigação de Yang et al. [2015] que apresentou um excelente escore, 23 de 27 itens, com baixo risco de viés. Seguido pelo estudo de Colombo et al. [2016] com escore de 21 de 27 itens. Os escores mais críticos foram de Naspitz et al. [1999] e de Parisoto et al. [2011] com valores de 17 e 18 dos 27 itens da escala NOS, respectivamente. O risco de viés obtido é o resultado da análise por dois avaliadores tendo um coeficiente Kappa de 0,89, o que é interpretado como excelente nível de concordância [Landis e Koch, 1977].

## **Discussão**

O papel da imunidade mediada por anticorpos na cárie dentária, seja em adultos ou crianças, é um tema investigado por diversos autores e que até o momento não apresenta resultados conclusivos. Nesta revisão sistemática

investigamos as possíveis relações entre a presença de anticorpos anti-*S. mutans* ou anti-*S. sobrinus* e a cárie da primeira infância em pré-escolares. Entretanto apesar da importância do tema, apenas 4 artigos estavam de acordo com os critérios de inclusão definidos e foram selecionados para esta revisão sistemática. Destes artigos, apenas dois observaram uma relação entre os níveis de anticorpos contra *S. mutans* e a cárie da primeira infância.[Parisoto et al. 2011, Colombo et al. 2016].

No estudo de Colombo et al. [2016] os autores observaram que crianças com S-ECC tem níveis menores de anticorpos IgA contra o antígeno GbpB do *S. mutans* quando comparado com crianças sem cárie ou com ECC. O antígeno GbpB é uma molécula que participa na interação entre as células e aos resíduos de glucanos presentes na superfície do dente. Portanto, anticorpos anti-GbpB podem interferir na adesão e permanência de *S. mutans* à superfície dental, e a redução de anticorpos anti-GbpB observada nesse estudo pode estar relacionada a gravidade da doença. Por outro lado, é importante observar que há uma relação positiva entre os níveis de anticorpos anti-*S. mutans* e a concentração de *S. mutans*. Isso é esperado uma vez que a produção de anticorpos está relacionada a concentração do antígeno dentro de determinados limites. Este achado realça a importância da observação da redução dos níveis de anticorpos anti-GbpB em indivíduos com cárie severa. Por isso, a realização de estudos que investigassem se a redução dos níveis de anticorpos anti-GbpB ocorre antes do aumento da severidade da cárie ou se é uma consequência desse aumento na severidade são importantes. Caso a redução ocorra antes, isto sugere que esses anticorpos fornecem uma proteção contra cárie severa.

Outro estudo que observou uma possível relação entre os níveis de anticorpos anti-*S. mutans* e a cárie dentária foi feito por Parisotto et al. [2011]. Nesse estudo longitudinal, os autores observaram que, após um ano de acompanhamento, os indivíduos sem cárie produzem níveis maiores de anticorpos contra peptídeos derivados dos antígenos GbpB e Gtf do que indivíduos com cárie ativa. Em especial, que há um aumento de anticorpos contra peptídeos envolvidos na atividade catalítica e de ligação a glucana da Gtf. Esse antígeno está relacionado com a formação de polissacarídeos extracelulares solúveis e insolúveis, que são componentes fundamentais do biofilme [Giacaman, 2017]. Por outro lado, os autores não observaram diferenças nos níveis de anticorpos anti-GbpB e anti-SBR

do Ag I/II de *S. mutans*, e anti-Gtf de *S. sobrinus* entre os indivíduos com cárie ou sem cárie. Além disso, nesse estudo os autores dividiram os grupos somente em crianças com e sem cárie enquanto Colombo et al., 2016 estratificaram os indivíduos com relação a gravidade da cárie, o que não permite uma comparação mais precisa entre os dois estudos. De modo semelhante ao estudo de Parisotto et al. [2011], seria importante a realização de estudos longitudinais que permitissem a avaliação do momento do surgimento dessas diferenças entre os níveis de anticorpos contra antígenos de *S. mutans*. De uma forma geral, ambos estudos sugerem que anticorpos contra antígenos/peptídeos específicos tem um papel protetor contra a cárie dentária. Portanto, esses resultados sugerem um papel protetor dos anticorpos anti-*S. mutans*.

Além desses dois estudos que encontraram uma relação entre os níveis de anticorpos IgA anti-*S. mutans* e cárie da primeira infância, dois outros estudos investigaram essa relação e não encontram nenhuma associação significativa. Yang et al. [2015] investigaram a relação entre os antígenos PAc e GLU dos *S. mutans* e a cárie precoce em crianças e não observaram nenhuma correlação. Estes antígenos tem sido relacionado com o processo inicial de aderência da bactéria com a película adquirida sobre a superfícies dos dentes. PAc é um antígeno da superfície celular dos *S. mutans* e GLU é um domínio ligante de glucano da glicosiltransferase, sendo considerados um dos principais fatores de virulência dos *S. mutans* [Zhang et al., 2002; Li et al., 2009]. Enquanto Naspitz et al. [1999] não encontraram uma relação entre os níveis de IgA anti-*S. mutans* e cárie dentária precoce. Esse foi o único estudo que investigou anticorpos contra células de *S. mutans* e não antígenos isolados. Provavelmente essa falta de relação entre os níveis de IgAs específicos e a cárie da primeira infância está relacionado ao tipo de antígeno analisado e sugere que a relação protetora mediada por anticorpos é dependente do antígeno analisado, em especial aos antígenos Gbp e Gtf.

Com relação ao papel de anticorpos anti-*S. sobrinus*, há apenas um estudo que investigou a relação entre esses anticorpos e a cárie dentária [Parisotto et al., 2011]. Nesse estudo, não foi encontrada uma relação direta entre os níveis de anticorpos IgA anti-*S. sobrinus* e a cárie dentária precoce. Essa análise foi feita por Western Blotting e nenhuma relação foi encontrada. Por outro lado, nesse mesmo estudo os autores encontraram um aumento dos níveis de anticorpos anti-peptídeo 16 derivado do antígeno Gtf I do *S. sobrinus* em indivíduos livres de cárie, o que

pode sugerir que a presença desses anticorpos pode ter um papel protetor contra a cárie dentária precoce.

Um resultado secundário observado em todos os estudos selecionados é a relação entre os níveis de IgA total na saliva e a cárie precoce em crianças. Todos os estudos incluídos na revisão sistemática, investigaram a relação entre os níveis de anticorpos totais da classe IgA e a cárie da primeira infância. Dos quatro estudos analisados, dois não observaram essa relação. Enquanto Yang et al. [2015] observaram um maior nível de IgA total em indivíduos com cárie precoce severa. Aparentemente esse maior nível de anticorpos totais pode estar relacionado ao maior nível de *S. mutans* nesses indivíduos. Enquanto Parisotto et al. [2011] observaram um nível maior de anticorpos totais em indivíduos livres de cárie após um ano de acompanhamento. O que sugere que os níveis de anticorpos totais podem estar relacionados com uma maior proteção contra a cárie.

Com relação aos estudos incluídos nesta revisão sistemática um aspecto importante verificado a partir dos resultados foi o baixo risco de viés apresentado a partir da escala NOS. Entretanto, é importante destacar algumas limitações gerais que impedem a generalização dos resultados. Destaca-se principalmente a não existência do cálculo do tamanho da amostra dos estudos incluídos, assim como a verificação do poder das análises estatísticas. Além disso, investigações incluídas nesta revisão sistemática foram realizadas com diferentes antígenos do *S. mutans* (PAc, Glu, GtfB, GbpB, e a região SBR do antígeno I/II) e do *S. sobrinus* o antígeno Gtf com seus isotipos Gtf-I e Gtf-S homólogos ao GtfB e GtfC do *S. mutans*, devido a essa diversidade de antígenos estudados por diferentes técnicas de detecção, não foi possível a realização do estudo meta-analítico.

Com relação aos estudos excluídos da síntese qualitativa (Tabela 1) desta revisão, duas razões foram determinantes: a faixa etária, diferente do foco desta revisão e a metodologia de obtenção da saliva a partir de estimulação.

A escolha da faixa etária segue o preconizado pela OMS que recomenda a idade pré-escolar para o monitoramento da prevalência de cárie e dos padrões de saúde bucal [WHO, 1997; OLIVEIRA et al., 2008].

Já o método de obtenção da saliva pode influenciar as concentrações elementares salivares, portanto é indicado o uso de saliva não estimulada para avaliação quantitativa dos níveis de IgA na saliva total a fim de que a concentração de proteínas IgA permaneça inalterada [Shifa et al., 2008].

Deste modo em futuras investigações sugere-se que os desenhos experimentais se preocupem com a distinção clara dos grupos com e sem cárie, incluindo a possibilidade de análise dos diferentes níveis de cárie dentária. Além disso, que os estudos sejam preferencialmente longitudinais com análise dos níveis de anticorpos em diferentes tempos ao longo do estudo. E a análise da resposta via IgA contra principais antígenos de *S. mutans* e *S. sobrinus*, bem como as células desses micro-organismos. Devem ser considerados também a forma de coleta das amostras salivares para não interferir no desfecho principal e aspectos estatísticos como cálculo do tamanho amostral e verificação do poder das análises devem ser claramente expostos nos estudos.

### **Conclusão**

Baseado nos resultados obtidos não podemos afirmar que os anticorpos têm um papel no processo da cárie dentária em pré-escolares e que novos estudos devem ser feitos para analisar essa questão.

### **Agradecimentos**

Os três primeiros autores agradecem à CAPES pelas bolsas de estudos (Números 1603586, 1763042, 1693076 respectivamente).

### **Conflito de interesse**

Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

### **Referências Bibliográficas**

Aaltonen AS, Tenovuo J, Lehtonen OP: Antibodies to the oral bacterium *Streptococcus mutans* and the development of caries in children in relation to maternal dental treatment during pregnancy. *Archives of oral biology* 1988;33:33-39.

Alaluusua S, Renkonen O. V. *Streptococcus mutans* establishment and dental caries experience in children from 2 to 4 years old. *Scand J Dent Res* 1983; 91: 453-457.

American Academy of Pediatric Dentistry, American Academy of Pediatrics, American Academy of Pediatric Dentistry Council on Clinical Affairs: Policy on early childhood caries (ECC): classifications, consequences, and preventive strategies. *Pediatric dentistry* 2005;27:31

Bagherian A, Asadikaram G: Comparison of some salivary characteristics between children with and without early childhood caries. *Indian Journal of Dental Research* 2012;23:628.

Bolton RW, Hlava GL: Evaluation of salivary IgA antibodies to cariogenic microorganisms in children. Correlation with dental caries activity. *Journal of dental research* 1982;61:1225-1228.

Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, Elio F: Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clinica chimica acta* 2007;383:30-40.

Colombo NH, Pereira JA, da Silva MER, Ribas LFF, Parisotto TM, de Oliveira Mattos-Graner R, Duque C: Relationship between the IgA antibody response against *Streptococcus mutans* GbpB and severity of dental caries in childhood. *Archives of oral biology* 2016;67:22-27.

Cury JA, Rebelo MAB, Cury ADB, Derbyshire MTVCC, Tabchoury CPM: Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. *Caries Research* 2000;34:491-497.

Dawes C, Pedersen AML, Villa A, Ekstron J, Proctor GB, Vissink A, Sia YW: The functions of human saliva: A review sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI. *Archives of oral biology* 2015;60:863-874.

Everhart DL, Bamgboye PO, Schwartz MS: Salivary anti-*Streptococcus mutans* changes over a six-month period in children ages two-five years. *Journal of dental research* 1982;61:386-390.

Everhart DL, Rothenberg K, Carter Jr WH, Klapper B: The determination of antibody to *Streptococcus mutans* serotypes in saliva for children ages 3 to 7 years. *Journal of dental research* 1978;57:631-635.

Fejerskov O: Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries research* 2004;38:182-191.

Fernandes FRC, Mayer MPA, Zelante F, Carneiro-Sampio MMS, Nagao AT: Detection and characterization of salivary antibodies against *S. mutans* in edentulous and dentate children. *Immun Cell Biol* 1997;75-41.

Gahnberg L, Smith DJ, Taubman MA, Ebersole JL: Salivary IgA antibody to glucosyltransferase of oral microbial origin in children. *Arch Oral Biol* 1985; 30:551-556.

Giacaman A: Sugars and beyond. The role of sugars and the other nutrients and their potential impact on caries. *Oral Diseases* 2017.

Harris J: Dental neglect in children. *Paediatrics and Child Health* 2012;22:476-482.

Jiang Q, Yu M, Min Z, Yi A, Chen D, Zhang Q: AP-PCR detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in caries-free and caries-active subjects. *Molecular and cellular biochemistry* 2012;365:159-164.

Hirose H, Hirose K, Isogai E, Miura H, Ueda I. Close association between *Streptococcus sobrinus* in the saliva of young children and smooth-surface caries increment. *Caries research* 1993;27:292-297.

Kalesinskas P, Kačergius T, Ambrozaitis A, Pečiulienė V, Ericson D: Reducing dental plaque formation and caries development. A review of current methods and implications for novel pharmaceuticals. *Stomatologija* 2014;16:44-52.

Krzyściak W, Jurczak A, Kościelniak D, Bystrowska B, Skalniak A. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2014;33:499-515.

Karolewska E, Konopka T, Pupek M, Chybicka A, Mendak M: Antibacterial potential of saliva in children with leukemia. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2008;105:739-744.

Khazanova VV, Zemskaja EA, Dmitrieva NA, Sakharova EB, Balashov AN: The local immunity of the oral cavity in dental caries. *Stomatologija* 1995;74:62-64.

Koga T, Oho T, Shimazaki Y, Nakano Y: Immunization against dental caries. *Vaccine* 2002;20:2027-2044.

Koga-Ito CY, Martins CADP, Balducci I, Jorge AOC: Correlation among mutans streptococci counts, dental caries, and IgA to *Streptococcus mutans* in saliva. *Brazilian oral research* 2004;18:350-355.

Landis JR, Koch GG: The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977;159-174.

Law, V.; Seow, W. K.; Townsend, G: Factors influencing oral colonization of mutans streptococci in young children. *Australian dental journal* 2007;93-100.

Li Y, Jin J, Yang Y, Bian Z, Chen Z, Fan M: Enhanced immunogenicity of an anti - caries vaccine encoding a cell - surface protein antigen of *Streptococcus mutans* by intranasal DNA prime - protein boost immunization. *The journal of gene medicine* 2009;11:1039-1047.

Ma JKC, Hikmat BY, Wycoff K, Vine ND, Chargelegue D, Yu L, Lehner T: Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nature medicine* 1998;4:601-606.

Marsh PD, Head DA, Devine DA: Ecological approaches to oral biofilms: control without killing. *Caries research* 2015;49:46-54.

Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, Prisma Group: Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS medicine* 2009;6:e1000097.

Mungia R, Cano SM, Johnson DA, Dang H, Brown JP: Interaction of age and specific saliva component output on caries. *Aging clinical and experimental research* 2008; 20:503-508.

Naspitz GMCC, Nagao AT, Mayer MPA, Carneiro - Sampaio MMS: Anti - *Streptococcus mutans* antibodies in saliva of children with different degrees of dental caries. *Pediatric allergy and immunology* 1999;10:143-148.

Nogueira RD, Alves AC, Napimoga MH, Smith DJ, Mattos-Graner RO: Characterization of salivary immunoglobulin A responses in children heavily exposed to the oral bacterium *Streptococcus mutans*: influence of specific antigen recognition in infection. *Infection and immunity* 2005;73:5675-5684.

Oliveira TM, Silva TC, Sakai VT, Prestes MP, Honório HM, Magalhães AC, Machado MAAM: Comparison between dmfs and modified dmfs indices in babies and preschool children. *Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo* 2008; 20:128-33.

Omar OM, Khattab NMA, Rashed LA: Glucosyltransferase B, immunoglobulin a, and caries experience among a group of Egyptian preschool children. *Journal of Dentistry for Children* 2011;79:63-68.

Parisotto TM, King WF, Duque C, Mattos-Graner RO, Steiner-Oliveira C, Nobre-Dos-Santos M, Smith J: Immunological and microbiologic changes during caries development in young children. *Caries research* 2011;45:377-385.

Picco DDCRR, Lopes LM, Marques MR, Line SRP, Parisotto TM, Dos Santos MN: Children with a Higher Activity of Carbonic Anhydrase VI in Saliva Are More Likely to Develop Dental Caries. *Caries research* 2017;51:394-401.

Puy CL: The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006;11:449-55.

Robinette RA, Oli MW, McArthur WP, Brady LJ: A therapeutic anti-*Streptococcus mutans* monoclonal antibody used in human passive protection trials influences the adaptive immune response. *Vaccine* 2011;29:6292-6300.

Rudney JD, Jagtap PD, Reilly CS, Chen R, Markowski TW, Higgins L, Griffin TJ: Protein relative abundance patterns associated with sucrose-induced dysbiosis are conserved across taxonomically diverse oral microcosm biofilm models of dental caries. *Microbiome* 2015;3:69.

Schipper RG, Silletti E, Vingerhoeds MH: Saliva as research material: biochemical, physicochemical and practical aspects. *Archives of oral biology* 2007;52:1114-1135.

Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB: Dental caries. *Lancet* 2007; 369:51-59.

Shanmugam KT, Masthan KMK, Balachander N, Sudha Jimson SR: Dental caries vaccine—a possible option? *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR* 2013;7:1250.

Sheiham A, James WPT: Diet and dental caries: The pivotal role of free sugars reemphasized. *Journal of dental research* 2015;94:1341-1347.

Shifa S, Muthu MS, Amarlal D, Prabhu VR: Quantitative assessment of IgA levels in the unstimulated whole saliva of caries-free and caries-active children. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry* 2008;26:158.

Singh S, Sharma A, Sood PB, Sood A, Zaidi I, Sinha A: Saliva as a prediction tool for dental caries: an in vivo study. *Journal of oral biology and craniofacial research* 2015; 5:59-64.

Smith DJ, Taubman MA: Emergence of immune competence in saliva. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 1993;3:335-341.

Smith DJ, Taubman, MA: Development of salivary IgA antibody to oral streptococcal antigens associated with virulence. *Advances in experimental medicine and biology* 1995;371:1141.

Smith J, Mattos-Graner O: Secretory immunity following mutans streptococcal infection or immunization. In: *Specialization and Complementation of Humoral Immune Responses to Infection* 2008;131-156.

Takahashi N, Nyvad B: Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries research* 2008;42:409-418.

Tenovuo J, Aaltonen S: Antibody responses to mutans streptococci in children. *Proceedings of the Finnish Dental Society. Suomen Hammaslaakariseuran toimituksia* 1991;87:449-461.

Tenovuo J: Humoral immune response to *Streptococcus mutans* in children. *Proceedings of the Finnish Dental Society. Suomen Hammaslaakariseuran toimituksia* 1986;82:312.

Tenovuo J: The microbiology and immunology of dental caries in children. Review of Medical Microbiology 1991;2:76-82.

Tenovuo J, Lehtonen OP, Aaltonen AS. Caries development in children in relation to the presence of mutans streptococci in dental plaque and of serum antibodies against whole cells and protein antigen I/II of Streptococcus mutans. Caries research 1990;24: 59-64.

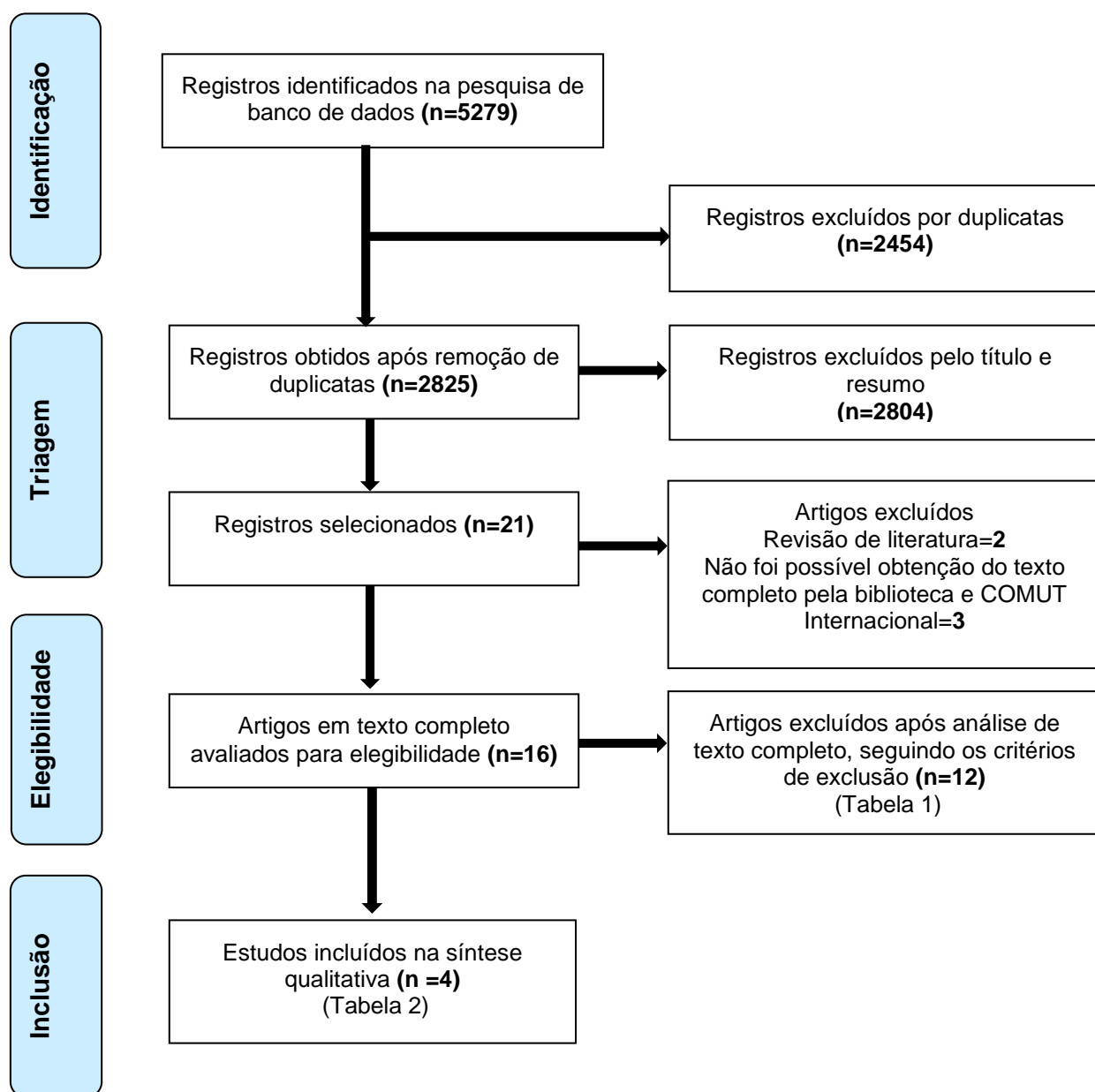
Tenovuo J, Lehtonen OP, Aaltonen AS. Serum and salivary antibodies against Streptococcus mutans in young children with and without detectable oral S. mutans. Caries research 1987;21:289-296.

World Health Organization: Oral health surveys, basics methods. 4<sup>th</sup> ed. Geneva: Stylus Public;1997.

Yang Y, Li Y, Lin Y, Du M, Zhang P, Fan M: Comparison of immunological and microbiological characteristics in children and the elderly with or without dental caries. European journal of oral sciences 2015;123:80-87.

Yazaki SC, Koga-Ito CY, Jorge AOC, Unterkircher CS: Anti-Streptococcus mutans IgA in children with and without dental caries. Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo 1999;13:211-217.

Zhang P, Jespersgaard C, Lamberty-Mallory L, Katz J, Huang Y, Hajishengallis G, Michalek SM: Enhanced immunogenicity of a genetic chimeric protein consisting of two virulence antigens of Streptococcus mutans and protection against infection. Infection and immunity 2002;70:6779-6787.



**Figura 1:** Fluxograma de seleção dos estudos elegíveis a partir das citações identificadas [Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, The PRISMA Group, 2009].

**Tabela 1.** Descrição dos estudos excluídos de acordo com os critérios de exclusão propostos na metodologia.

<b>Autor (Ano)</b>	<b>Critérios de exclusão</b>
EVERHART, D.L. et al., 1978	- Não foi esclarecido se a coleta de saliva foi não estimulada; - Idade de 3 a 7 anos.
BOLTON, R. W. et al., 1982	- Coleta de saliva estimulada - Idade de 3 a 14 anos.
EVERHART, D.L. et al., 1982	- Não foi utilizado como grupo controle crianças sem cárie; - Idade de 2 a 5 anos.
ALALUUSUA, S. et al., 1983	- Idade de 1 a 4 anos
GAHNBERG, L. et al., 1985	- Idade de 2 a 48 meses.
TENOVUO, J. et al., 1987	- Idade de 0,8 a 3 anos.
AALTONEN, A. S. et. al., 1988	- Coleta de saliva estimulada.
TENOVUO, J. et al., 1990	- Idade de 0,8 a 3,8 anos.
FERNANDES, et al., 1997	- Idade de 3 a 34 meses.
YAZAKI, S.C. et al., 1999	- Coleta de saliva estimulada.
KOGA-ITO C. Y. et al.,2004	- Coleta de saliva estimulada; - Idade de 3 a 12 anos.
OMAR, M. et al., 2011	- Anticorpos anti- <i>S.mutans</i> ou anti- <i>S.sobrinus</i> não analisados.

**Tabela 2.** Características dos estudos incluídos

Autor	Amostra	Métodos	Resultados		
Conclusões	Risco				
de viés					
NASPIT Z et al., 1999	49 crianças de 3 a 5 anos. SC (n=20), ECC (n=15), S-ECC (n=14).	Estudo transversal; ELISA (para determinar o total de slgA, IgA, IgG e IgM). Western Blotting para reconhecimento dos antígenos do <i>S. mutans</i> ).	Não há diferenças estatísticas nos níveis de slgA ou IgA, IgG e IgM anti- <i>S. mutans</i> entre os grupos com diferentes experiências de cárie dentária.	A falta de reconhecimento do antígeno I/II pelas crianças sugere uma imaturidade imunológica.	17/ 24
PARISO TTO et al., 2011	40 crianças de 3 a 4 anos. SC (n = 23), CA (n = 17). Lesões de manchas brancas foram incluídas no escores de cáries.	Estudo Longitudinal; Os níveis de IgA e IgA para anti-GbpB e SBR (Ag I/II) de antígenos de <i>S. mutans</i> e antígeno Gtf de <i>S. sobrinus</i> GbpB e Gtf foram medidos por Ensaio Luminex	Os níveis de IgA aumentaram significativamente em ambos os grupos, mas foi significativamente maior no grupo sem cárie e os níveis IgA anti-GbpB, anti-SBR e anti-Gtf maiores em SC no acompanhamento de 1 ano.	Os níveis de <i>S. mutans</i> e Lactobacilos estão associados com cárie em pré-escolares e o sistema imune está passando por um processo importante de maturação. A resposta da IgA para epítomos de virulência podem influenciar a severidade da doença.	18/ 24
YANG et al., 2015	70 crianças de 3 a 4 anos. SC (n = 36), CA (n=21 ECC, n=13 S-ECC).	Estudo transversal; Os níveis de slgA e slgA anti-PAc e GLU do <i>S. mutans</i> e níveis de <i>S. mutans</i> por ELISA e qPCR.	Os níveis de <i>S. mutans</i> , slgA total e slgA anti-PAc ou anti-GLU do <i>S. mutans</i> foram maiores no grupo S-ECC, porém a slgA específica não apresentou diferença estatística.	Crianças com S-ECC têm níveis de IgA totais mais altos, provavelmente devido aos altos níveis de <i>S. mutans</i> , sugerindo que esses anticorpos não são efetivos contra a cárie dentária em pré-escolares.	23/ 24
COLOMBO et al., 2016	57 crianças de 3 a 5 anos. SC (n=19),	Estudo transversal; ELISA (níveis de IgA e IgA anti-	Os níveis de <i>S. mutans</i> foram maiores no grupo S-ECC.	Os níveis de IgA anti-GbpB estão diretamente relacionados aos	

	ECC (n=17), S-ECC (n=21). Subgrupos em relação aos níveis de Streptococcus orais: SC(LMS), ECC(LMS), S-ECC(LMS), SC(HMS), ECC(HMS), S-ECC(HMS).	GbpB); Western Blotting para reconhecimento do IgA anti-GbpB do <i>S. mutans</i> . Cultura para níveis de Streptococcus mutans.	Não há diferenças estatísticas nos níveis totais de IgA. Níveis anti-GbpB maiores em SC (HMS) e ECC (HMS) do que em S-ECC (HMS).	níveis de Streptococcus de mutans, em crianças com cárie severa. IgA anti-GbpB pode oferecer proteção contra a cárie dentária.	21/ 24
--	---	---	--	--	-----------

Legenda: SC (sem cárie); CA (Cárie ativa); ECC (cárie da primeira infância); S-ECC (cárie severa da primeira infância); LMS (baixo nível de *S. Mutans*); HMS (altos níveis de *S. Mutans*) ; Gft (glicosiltransferase); PAc (proteína de adesão celular); Gbp (proteína ligante de glucano); sIgA (imunoglobulina A secretora); IgA, IgG, IgM (imunoglobulinas A, G e M); qPCR (PCR em tempo real).

## APÊNDICES

## APÊNDICE A

### PROTOCOLO PROSPERO

#### REVIEW TITLE AND TIMESCALE

##### 1. Review title

Influence of anti-*Streptococcus mutans* and anti-*Streptococcus sobrinus* antibodies in the development of dental caries in children: a systematic review

##### 2. Original language

Influência dos anticorpos anti-*Streptococcus mutans* e anti-*Streptococcus sobrinus* no desenvolvimento da cárie em crianças: uma revisão sistemática

##### 3. Anticipated or actual start date

15/02/17

##### 4. Anticipated completion date

31/12/17

##### 5. Stage of review at time of this submission

Review stage	Started	Completed
Preliminary searches	No	No
Piloting of the study selection process	No	No
Formal screening of search results against eligibility criteria	No	No
Data extraction	No	No
Risk of bias (quality) assessment	No	No
Data analysis	No	No

#### REVIEW TEAM DETAILS

##### 6. Named contact

Emerson José Venancio

##### 7. Named contact email

[emersonj@uel.br](mailto:emersonj@uel.br)

##### 8. Named contact address

Universidade Estadual de Londrina Departamento de Ciências Patológicas. Rodovia Celso Garcia Cid | Pr 445 Km 380 | Campus Universitário Cx. Postal 10.011 | CEP 86.057-970 | Londrina – PR.

##### 9. Named contact phone number

+55 43 33715736

## 10. Organisational affiliation of the review

Universidade Estadual de Londrina

[www.uel.br](http://www.uel.br)

## 11. Review team members and their organisational affiliations

Dr. Emerson Venancio - Universidade Estadual de Londrina

Dra Carla Cristiane Silva - Universidade Estadual do Norte do Paraná

Dra Solange de Paula Ramos - Universidade Estadual de Londrina

Rosario Mamani Barri - Universidade Estadual de Londrina

Ana Cláudia Poletto - Universidade Estadual de Londrina

Paola Singi - Universidade Estadual de Londrina

## 12. Funding sources/sponsors

Barri, R.M., Poletto, A.C., Singi P. have scholarships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil.

## 13. Conflicts of interest

There are no conflicts of interest

## 14. Collaborators

Not applicable

## REVIEW METHODS

### 15. Review question(s)

Do anti-*Streptococcus mutans* or anti-*Streptococcus sobrinus* antibodies influence the origin and development of dental caries in children?

### 16. Searches

The following electronic bibliographic databases will be searched: MEDLINE, Embase, LILACS (Latin American and Caribbean Health Science Literature Database), SciELO (Scientific Electronic Library Online), Web of Science, Scopus, and the Cochrane Central Register of Controlled Trials (CENTRAL). The strategy will specify each of the electronic databases.

There will not be any restrictions on date or language for the published papers. In addition, forward citations and reference lists of the retrieved papers will be scanned. The search strategy will be formulated with the following keywords and synonyms: Preschool Children (population); *Streptococcus* (intervention); Immunoglobulin, Immune Globulins, antibody (intervention).

Articles in more than one database will only be considered once. Only original studies will be included in the review. Case reports, case series, review articles, and opinion articles will be excluded.

### **17. URL to search strategy**

Not applicable

### **18. Condition or domain being studied**

Dental caries is a public health problem. Recent studies define dental caries as a multifactorial disease, and a biofilm sucrose-dependent dysbiosis developed by the frequent consumption of foods rich in sugars (RUDNEY et al., 2015 and SHEIHAM et al., 2015). *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* are closely related to dental caries. *S. mutans* is the main etiological agent of dental caries. It produces lactic acid from sucrose, is able to tolerate a low pH, and has adhesions that allow its attachment to the dental surface (RUDNEY et al., 2015). Its main virulence factors are the I/II antigen, glycosyltransferases and glucan-binding proteins. These antigens are directly related to the ability to adhere to tooth surfaces by structuring the dental biofilm (COLOMBO et al., 2016).

The presence of *S. sobrinus* is related to the severity and progression of dental caries and has similar virulence factors to *S. mutans*. It synthesizes glycosyltransferases for the generation of soluble and water insoluble glucans (KALESINSKAS et al., 2014). It also presents adhesions such as Spa or Pag, which have sequences homologous to the glucan-binding proteins of *S. mutans* (SHANMUGAM et al., 2013). It is recognized that the role of antibodies against *Streptococcus* antigens in the development of dental caries is complex. Such relationships have been investigated; however, there are contradictory results.

### **19. Participants/population**

This review will include studies with healthy preschool children who are not taking antimicrobials, immunosuppressive drugs, or drugs which have a known effect on the frequency of dental caries in children, or on bacteria or the immunity of the participants, including vaccines.

### **20. Intervention(s), exposure(s)**

The levels of anti-*S. mutans* and/or anti-*S. sobrinus* antibodies in the saliva of preschool children with dental caries will be analyzed.

**21. Comparator(s)/control**

The levels of anti-*S. mutans* and/or anti-*S. sobrinus* antibodies in the saliva of pre-school children with dental caries will be compared with the levels of these same antibodies present in the saliva of preschool children without dental caries.

**22. Types of study to be included**

In this revision any type of study that allows comparisons between levels of anti-*S. mutans* or anti-*S. sobrinus* antibodies in saliva from preschool children with or without dental caries will be included.

**23. Context**

Studies that investigate healthy preschool children who do not use drugs that influence the microbiota, immune system, or dental caries will be included. Studies that investigate levels of salivary anti-*S. mutans* or anti-*S. sobrinus* antibodies in preschool children with dental caries or with no dental caries will be included.

**24. Primary outcome(s)**

Verify the possible influence of specific anti-*S. mutans* or anti-*S. sobrinus* antibodies on dental caries frequency in preschool children.

**25. Secondary outcomes**

Not applicable.

**26. Data extraction (selection and coding)**

To begin with, all titles found in the databases will be organized such that duplicate titles can be removed. Next, the titles and abstracts will be reviewed and clearly ineligible studies discarded. The remaining titles will be retained for the second round when the full text of the papers will be obtained for further review and judgment on their inclusion in the review. Both these review stages will be independently performed by two researchers. In cases of disagreement, remaining members of the review team will discuss the inclusion or not of the manuscript. The EndNote reference management program will be used during this process.

**27. Risk of bias (quality) assessment**

The quality of papers will be evaluated by two independent researchers, using a modified version of the Newcastle Ottawa Scale (NOS), previously used by Perera et al. (2015). This scale was chosen as it is expected that the majority of included papers will have a cross-sectional design. In this version, the scale contains four domains of risk assessments that measure selection bias (methods of participant selection), performance bias (how the researchers dealt with confounders), detection bias (statistical approach), and information bias (assessments of exposure and

outcomes). In each domain the scale measures the likelihood of bias with scores ranging from 0 (high risk of bias) to 3 (low risk of bias). Additionally, for studies with an acute design (pre and post exercise), the quality of papers will be evaluated using the “Quality Assessment Tool for Before-After (Pre-Post) Studies With No Control Group” scale.

The risk of bias for each of the studies will be evaluated by two independent authors and each study assigned a score according to the criteria. In cases of disagreement, remaining members of the review team will discuss the inclusion or not of the paper. The Kappa coefficient will be applied to measure agreement between the researchers.

## **28. Strategy for data synthesis**

A data collection form will be used to obtain the following data: authors, aim, design, participants’ characteristics, methods to measure outcomes and exposures, confounders and how the studies dealt with them, statistical approach, and main results. Descriptive tables will be used to summarize the results of individual papers and, where possible, data will be pooled using appropriate quantitative analysis techniques, however if this is not possible, a narrative summary of the data will be performed.

## **29. Analysis of subgroups or subsets**

The group of pre-school children with dental caries will be subdivided into pre-school children with active dental caries and pre-school children with a history of dental caries. Data from the pre-school children with dental caries group and the subgroups will be analyzed individually and compared with the group of preschool children without dental caries.

## **REVIEW GENERAL INFORMATION**

### **30. Type and method of review**

Select the type of review from the drop down list.

### **31. Language**

English

### **32. Country**

Brazil

**33. Other registration details**

Not applicable

**34. Reference and/or URL for published protocol**

Not applicable

**I give permission for this file to be made publicly available**

Yes

**35. Dissemination plans**

Yes

**36. Keywords**

Dental Caries, preschool children, Streptococcus, humoral immunity, specific antibodies

**37. Details of any existing review of the same topic by the same authors**

Not applicable

**38. Current review status**

Not started

**39. Any additional information**

Not applicable

**40. Details of final report/publication(s)**

## **ANEXOS**









## ANEXO 2

## QUESTIONARIO: Modified Newcastle-Ottawa Scale

Score
0= Definitely No (high risk of bias)
1= Mostly No
2= Mostly Yes
3= Definitely Yes (low risk of bias)

## PARTICIPANTE 1

Domain of Evaluation	Colombo, et al.,2016	Naspitz, et al., 1999	Parisotto, et al., 2011	Yang et al., 2015
Is the source population (cases, controls, cohorts) appropriate and representative of the population of interest?	0	0	0	2
Is the sample size sufficient and is there sufficient power to detect a meaningful difference in the outcome of interest?	0	0	0	0
Did the study adjust for any variables or confounders that may influence the outcome?	3	0	2	3
Did the study use appropriate statistical analysis methods relative to the outcome of interest?	3	2	3	3
Is there little missing data and did the study handle it accordingly?	3	3	3	3
Is the methodology of the outcome measurement explicitly stated and is it appropriate?	3	3	3	3
Is there an objective assessment of the outcome of interest?	3	3	2	3
Was the follow-up sufficiently long enough for the outcome to occur?	3	3	2	3
Was there minimal loss to follow-up and are subjects lost to follow-up unlikely to introduce bias?	3	3	3	3

## PARTICIPANTE 2

<b>Domain of Evaluation</b>	Colombo, et al.,2016	Naspitz, et al.,1999	Parisotto, et al., 2011	Yang, et al.,2015
Is the source population (cases, controls, cohorts) appropriate and representative of the population of interest?	0	0	0	2
Is the sample size sufficient and is there sufficient power to detect a meaningful difference in the outcome of interest?	0	0	0	0
Did the study adjust for any variables or confounders that may influence the outcome?	3	0	2	3
Did the study use appropriate statistical analysis methods relative to the outcome of interest?	3	2	3	3
Is there little missing data and did the study handle it accordingly?	3	3	3	3
Is the methodology of the outcome measurement explicitly stated and is it appropriate?	3	3	3	2
Is there an objective assessment of the outcome of interest?	3	3	2	3
Was the follow-up sufficiently long enough for the outcome to occur?	3	3	2	3
Was there minimal loss to follow-up and are subjects lost to follow-up unlikely to introduce bias?	3	3	3	3

## ANEXO 3

### Normas para publicação na revista Caries Research

#### Aims and Scope

'Caries Research' is an international journal, the aim of which is to promote research in dental caries and related fields through publication of original research and critical evaluation of research findings. The journal will publish papers on the aetiology, pathogenesis, prevention and clinical control or management of dental caries. Papers on health outcomes related to dental caries are also of interest, as are papers on other disorders of dental hard tissues, such as dental erosion. Aspects of caries beyond the stage where the pulp ceases to be vital are outside the scope of the journal. The journal reviews papers dealing with natural products and other bacterial inhibitors against specific criteria, details of which are available from the Editor.

#### Submission

Manuscripts written in English should be submitted online. Should you experience problems with your submission, please contact Prof. David Beighton (Editor-in-Chief, Caries Research) Department of Microbiology The Henry Wellcome Laboratories for Microbiology and Salivary Research, KCL Dental Institute, Floor 17, Guys Tower London Bridge SE1 9RT (UK). Tel.+442071887465 Fax+442071887466 [cre@karger.com](mailto:cre@karger.com)

During the online submission you will be asked to list complete mailing addresses, including e-mail addresses of three potential reviewers for your manuscript.

Copies of any 'in press' papers cited in the manuscript must accompany the submission. Manuscripts reporting on clinical trials must be accompanied by the CONSORT checklist (see below).

#### Plagiarism Policy

Whether intentional or not, plagiarism is a serious violation. We define plagiarism as a case in which a paper reproduces another work with at least 25% similarity and without citation. If evidence of plagiarism is found before/after acceptance or after publication of the paper, the author will be offered a chance for rebuttal. If the arguments are not found to be satisfactory, the manuscript will be retracted and the author sanctioned from publishing papers for a period to be determined by the responsible Editor(s).

#### Conditions

All manuscripts are subject to editorial review. Manuscripts are received with the explicit understanding that the data they contain have not previously been published (in any language) and that they are not under simultaneous consideration by any other publication.

Submission of an article for publication implies the transfer of the copyright from the author to the publisher upon acceptance. Accepted papers become the property of Caries Research and may not be reproduced by any means, in whole or in part, without the written consent of the publisher.

For legal reasons, we must receive your '**Submission Statement**' with your original (hand-written) signature. Please download, print, sign and either fax or scan it to make it legally binding.

It is the author's responsibility to obtain permission to reproduce illustrations, tables, etc., from other publications. Authors of papers describing research on human subjects are required to state that they have adhered to the Declaration of Helsinki.

## Types of Papers

*Original papers or Short Communications* are reports of original work (including systematic reviews and meta-analyses). Both have the structure outlined below but for Short Communications the abstract should be less than 100 words and the manuscript should not exceed 3 printed pages, equivalent to about 9 manuscript pages (including tables, illustrations and references).

*Reviews* can have a freer format but should nevertheless commence with a Title page, an Abstract and an Introduction defining the scope. Reviews are not subject to page charges.

*Current topics* are concise articles that present critical discussion of a topic of current interest, or a fresh look at a problem, and should aim to stimulate discussion.

*Letters to the Editor*, commenting on recent papers in the journal, are published occasionally, together with a response from the authors of the paper concerned.

## Preparation of Manuscripts

Text should be one-and-a-half-spaced, with wide margins. All pages and all lines must be numbered, starting from the title page. A conventional font, such as Times New Roman or Arial, should be used, with a font size of 11 or 12. Avoid using italics except for Linnaean names of organisms and names of genes.

Manuscripts should be prepared as a text file plus separate files for illustrations. The text file should contain the following sequence of sections: Title page; Declaration of interests; Abstract; Introduction; Materials and Methods; Results; Discussion; Acknowledgements; References; Legends; Tables. Each section should start on a new page, except for the body of the paper (Introduction to Acknowledgements), which should be continuous. Lines in the manuscript must be numbered consecutively from the title page until the last page. Submissions which do not conform to these simple guidelines will be returned to the author.

**Title page:** The first page of each manuscript should show, in order:

- the title, which should be informative but concise;
- the authors' names and initials, without degrees or professional status, followed by their institutes;
- a short title, maximum length 60 characters and spaces, for use as a running head;
- a list of 3-10 key words;
- the name of the corresponding author and full contact details (postal address, telephone and fax numbers, and e-mail address).

**Declaration of Interests:** Potential conflicts of interest should be identified for each author or, if there are no such conflicts, this should be stated explicitly. Conflict of interest exists where an author has a personal or financial relationship that might introduce bias or affect their judgement. Examples of situations where conflicts of interest might arise are restrictive conditions in the funding of the research, or if an author or their employer holds patent(s) on a product used in the study, or payment to an investigator from organisations with an interest in the study (including employment, consultancies, honoraria, ownership of shares, travel grant). Investigators should disclose potential conflicts to study participants and should state whether they have done so. The possible existence of a conflict of interest does not preclude consideration of a manuscript for publication, but the Editor might consider it appropriate to publish the disclosed information along with the paper.

**Abstract:** The abstract should summarise the contents of the paper in a single paragraph of no more than 250 words (to ensure that the abstract is published in full by on-line services such as PubMed).

No attempt should be made to give numerical results in detail. References are not allowed in the abstract.

**Introduction:** This section should provide a concise summary of the background to the relevant field of research, introduce the specific problem addressed by the study and state the hypotheses to be tested.

**Materials and Methods (or Subjects and Methods):** All relevant attributes of the material (e.g. tissue, patients or population sample) forming the subject of the research should be provided. Experimental, analytical and statistical methods should be described concisely but in enough detail that others can repeat the work. The name and brief address of the manufacturer or supplier of major equipment should be given.

Statistical methods should be described with enough detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results. When possible, findings should be quantified and appropriate measures of error or uncertainty (such as confidence intervals) given. Sole reliance on statistical hypothesis testing, such as the use of P values, should be avoided. Details about eligibility criteria for subjects, randomization and the number of observations should be included. The computer software and the statistical methods used should be specified. See Altman et al.: Statistical guidelines for contributors to medical journals [Br Med J 1983;286:1489–93] for further information.

Manuscripts reporting studies on human subjects should include evidence that the research was ethically conducted in accordance with the Declaration of Helsinki ([World Medical Association](#)). In particular, there must be a statement in Materials and Methods that the consent of an appropriate ethical committee was obtained prior to the start of the study, and that subjects were volunteers who had given informed, written consent.

Information detailing the power and sample size calculations must be included in the manuscript.

Randomized clinical trials should be reported according to the standardised protocol of the [CONSORT Statement](#). The CONSORT checklist must be submitted together with papers reporting clinical trials.

Randomized clinical trials must be registered at [clinicaltrials.gov](#) or similar national authority and the trial number included in the manuscript.

Trials beginning after 1 July 2012 must be registered before recruitment of the first patient. Caries Research will accept 'retrospective registration' of trials that began before 1 July 2012 (retrospective meaning registration occurs after patient enrolment begins). When submitting a paper on a clinical trial, the trial registration number should be stated at the end of the abstract in the following format: Trial registration: [name of the trial registry, the registry URL and the trial registration number].

In studies on laboratory animals, the experimental procedures should conform to the principles laid down in the [European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes](#) and/or the [National Research Council Guide for the Care and Use of Laboratory Animals](#).

Unless the purpose of a paper is to compare specific systems or products, commercial names of clinical and scientific equipment or techniques should only be cited, as appropriate, in the 'Materials and Methods' or 'Acknowledgements' sections. Elsewhere in the manuscript generic terms should be used.

In any manuscript involving microradiography, the following information must be included: the radiation source and filters used and the kV used (this determines the wavelength of radiation and hence the validity of using Angmar's equation).

Manuscripts on experimental enamel caries should show that the lesions retain a relatively well-preserved surface layer, i.e. are not surfacesoftened lesions. Proof of surface integrity can be provided either as illustrations in the paper or as supplementary material for the reviewers. Transverse microradiography, polarized light microscopy of a section immersed in water or backscattered scanning electron microscopy of a polished cross-section can be used to provide the necessary proof. To allow the nature of experimental changes to be assessed, microradiographs or micrographs should be provided to show part of the experimental lesion and the adjacent control (e.g. figure 2 of Zaura et al.: Caries Res 2007;41:489–492). Again, these images can be provided as part of the paper or as supplementary material for review purposes.

**Results:** Results should be presented without interpretation. The same data should not be presented in both tables and figures. The text should not repeat numerical data provided in tables or figures but should indicate the most important results and describe relevant trends and patterns.

**Discussion:** This section has the functions of describing any limitations of material or methods, of interpreting the data and of drawing inferences about the contribution of the study to the wider field of research. There should be no repetition of preceding sections, e.g. reiteration of results or the aim of the research. The discussion should end with a few sentences summarising the conclusions of the study. However, there should not be a separate 'Conclusions' section.

**Acknowledgements:** Acknowledge the contribution of colleagues (for technical assistance, statistical advice, critical comment etc.) and provide the position(s) of author(s) employed by commercial firms. This section should describe the source(s) of funding that have supported the work including relevant grant numbers. Please also include this sentence: "The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript." If this statement is not correct, you must describe the role of any sponsors or funders, and amend the sentence as needed. Additionally, the roles of all authors must be described (For example: Conceived and designed the experiments: AA, BB. Performed the clinical examination: AA, CC. Performed the experiments: DD, FF. Analyzed the data: BB, FF. Wrote the paper: AA, CC, FF, EE).

**Legends:** The table headings should be listed first, followed by the legends for the illustrations.

**Tables:** Tables should be numbered in Arabic numerals. Each table should be placed on a separate page. Tables should not be constructed using tabs but by utilising the table facilities of the word-processing software.

#### **Illustrations:**

Illustrations should be numbered in Arabic numerals in the sequence of citation. Figure numbers must be clearly indicated on the figures themselves, outside the image area.

- Black and white half-tone illustrations must have a final resolution of 300 dpi after scaling, line drawings one of 800-1200 dpi.
- Figures with a screen background should not be submitted.
- When possible, group several illustrations in one block for reproduction (max. size 180 x 223 mm).

#### **Color Illustrations**

**Online edition:** Color illustrations are reproduced free of charge. In the print version, the illustrations are reproduced in black and white. Please avoid referring to the colors in the text and figure legends.

**Print edition:** Up to 6 color illustrations per page can be integrated within the text at CHF 960.00 per page.

#### **References**

Reference to other publications should give due acknowledgement to previous work; provide the reader with accurate and up-to-date guidance on the field of research under discussion; and provide evidence to support lines of argument. Authors should select references carefully to fulfil these aims without attempting to be comprehensive.

Cited work should already be published or officially accepted for publication. Material submitted for publication but not yet accepted should be cited as 'unpublished results', while unpublished observations communicated to the authors by another should be cited as 'personal communication', with credit in both cases being given to the source of the information. Neither unpublished nor personally communicated material should be included in the list of references. Abstracts more than 2 years old and theses should not be cited without a good reason, which should be explained in the covering letter accompanying the paper.

References should be cited by naming the author(s) and year. Where references are cited in parenthesis, both names and date are enclosed in square brackets. Where the author is the subject or object of the sentence, only the year is enclosed in brackets.

One author: [Frostell, 1984] or Frostell [1984]. Two authors: [Dawes and ten Cate, 1990] or Dawes and ten Cate [1990]. More than two authors: [Trahan et al., 1985] or Trahan et al. [1985].

Several references cited in parenthesis should be in date order and separated by semi-colons: [Frostell, 1984; Trahan et al., 1985; Dawes and ten Cate, 1990].

Material published on the World Wide Web should be cited like a reference to a print publication, and the URL included in the reference list (not in the text), together with the year when it was accessed.

The reference list should include all the publications cited in the text, and only those publications. References, formatted as in the examples below, should be arranged in strict alphabetical order. All authors should be listed. For papers by the same authors, references should be listed according to year. Papers published by the same authors in the same year should be distinguished by the letters a, b, c, ... immediately following the year, in both the text citation and the reference list. For abbreviation of journal names, use the Index Medicus system. For journals, provide only the year, volume number and inclusive page numbers.

### *Examples*

(a) *Papers published in periodicals*: Lussi A, Longbottom C, Gyax M, Braig F: Influence of professional cleaning and drying of occlusal surfaces on laser fluorescence in vivo. *Caries Res* 2005;39:284-286.

(b) *Papers published only with DOI numbers*: Theoharides TC, Boucher W, Spear K: Serum interleukin-6 reflects disease severity and osteoporosis in mastocytosis patients. *Int Arch Allergy Immunol* DOI: 10.1159/000063858.

(c) *Monographs*: Matthews DE, Farewell VT: *Using and Understanding Medical Statistics*. Basel, Karger, 1985.

(d) *Edited books*: DuBois RN: Cyclooxygenase-2 and colorectal cancer; in Dannenberg AJ, DuBois RN (eds): *COX-2*. *Prog Exp Tum Res*. Basel, Karger, 2003, vol 37, pp 124-137.

(e) *Patents*: Diggins AA, Ross JW: Determining ionic species electrochemically. UK Patent Application GB 2 064 131 A, 1980.

(f) *World Wide Web*: Chaplin M: Water structure and behavior. [www.lsbu.ac.uk/water](http://www.lsbu.ac.uk/water), 2004.

## Supplementary Material

Multimedia files and other supplementary files, directly relevant but not essential to the conclusions of a paper, enhance the online version of a publication and increase its visibility on the web. These files will undergo editorial review. The Editors reserve the right to limit the scope and length of the supplementary material. Multimedia and supplementary material should meet production quality standards for publication without the need for any modification or editing. Files should not exceed 10 MB in size. Figures and tables need to have titles and legends, and all files should be supplied separately and labeled clearly. All supplementary material should be referred to in the main text. A DOI number will be assigned to supplementary material and it will be hosted online at <https://karger.figshare.com> under a CC BY license. Authors will be charged a processing fee of CHF 250.00 for supplementary material.

## Digital Object Identifier (DOI)

S. Karger Publishers supports DOIs as unique identifiers for articles. A DOI number will be printed on the title page of each article. DOIs can be useful in the future for identifying and citing articles published online without volume or issue information. More information can be found at [www.doi.org](http://www.doi.org)

## Self-Archiving/Green Open Access

Karger permits authors to archive their pre-prints (i.e. pre-peer review) or post-prints (i.e. accepted manuscript after peer review but before production) on their personal or their institution's internal website. In addition, authors may post their accepted manuscripts in public Open Access repositories and scientific networks (e.g. ResearchGate or Mendeley) no earlier than 12 months following publication of the final version of their article. For all self-archiving, the posted manuscripts must:

- Be used for noncommercial purposes only
- Be linked to the final version on [www.karger.com](http://www.karger.com)
- Include the following statement:

'This is the peer-reviewed but unedited manuscript version of the following article: [insert full citation, e.g. *Cytogenet Genome Res* 2014;142:227–238 (DOI: 10.1159/000361001)]. The final, published version is available at [http://www.karger.com/?doi=\[insert DOI number\]](http://www.karger.com/?doi=[insert DOI number]).

It is the author's responsibility to fulfill these requirements.

For papers published online first with a DOI number only, full citation details must be added as soon as the paper is published in its final version. This is important to ensure that citations can be credited to the article. Manuscripts to be archived in PubMed Central due to funding requirements will be submitted by Karger on the author's behalf [see Funding Organizations (NIH etc.)]. For self-archiving Author's Choice™ (Gold Open Access) articles, see Author's Choice™.

## Author's Choice™

Karger's Author's Choice™ service broadens the reach of your article and gives all users worldwide free and full access for reading, downloading and printing at [www.karger.com](http://www.karger.com). The option is available for a one-time fee of CHF 3,000.00, which is a permissible cost in grant allocation. More information can be found at [www.karger.com/authors\\_choice](http://www.karger.com/authors_choice). The final, published version of the article may be posted at any time and in any repository or on other websites, in accordance with the relevant Creative Commons license. Reposted Open Access articles must:

- Follow the terms of the relevant Creative Commons license
- Be linked to the final version on [www.karger.com](http://www.karger.com)
- Include the following statement:

The final, published version of this article is available at [http://www.karger.com/?doi=\[insert DOI number\]](http://www.karger.com/?doi=[insert DOI number]). It is the author's responsibility to fulfill these requirements. For papers published online first with a DOI number only, full citation details must be added as soon as the paper is published in its final version. This is important to ensure that citations can be credited to the article.

## Funding Organizations (NIH etc.)

The U.S. National Institutes of Health (NIH) Public Access Policy mandates that accepted, peer-reviewed manuscripts are archived in its digital database, PubMed Central (PMC), within 12 months of the official publication date. As a service to authors, Karger submits NIH-funded articles to PMC on behalf of the authors immediately upon publication. The NIH assigns a PMCID within approximately 1 month and the manuscript will appear in PMC after a 12-month embargo. For authors making their

paper Open Access through Author's Choice™, the embargo will be overridden, thereby accelerating the accessibility of the article. Karger also complies with other funders' requirements (including Wellcome Trust and RCUK) for submission to PMC. Authors should include information on their grant in the Acknowledgements section of their papers.

### Page Charges

There are no page charges for papers of six or fewer printed pages (including tables, illustrations and references). A charge of CHF 650.00 will be levied for each page in excess of the allotted six printed pages. The allotted size of a paper is equal to approximately 18 double-spaced typescript pages (including tables, illustrations and references).

### Proofs

Unless indicated otherwise, proofs are sent to the first-named author and should be returned with the least possible delay. Alterations other than the correction of printer's errors are charged to the author. No page proofs are supplied to the author.

### Reprints

Order forms and a price list are sent with the proofs. Orders submitted after this issue is printed are subject to considerably higher prices.