

REVISTA

BIOCIENCIAS

Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud

Vol. 15, Núm. 2 (2020)

¿PODEMOS LLEGAR A UNA SOCIEDAD LIBRE DE CARIES?

Fevrier, L. Paz Cortés, M.M

Universidad Alfonso X el Sabio

Facultad de Ciencias de la Salud

Villanueva de la Cañada

¿PODEMOS LLEGAR A UNA SOCIEDAD LIBRE DE CARIES?

Fevrier, L

Estudiante grado Odontología. Universidad Alfonso X El Sabio.

Paz Cortés, M.M

Licenciada en Odontología UCM. Máster en Odontopediatría. Doctor en Odontología.
Profesora Asociada Facultad Odontología. Universidad Alfonso X El Sabio.

Dirección de correspondencia : Marta Macarena Paz Cortés mpazcor@uax.es

RESUMEN

Introducción: La caries dental es una enfermedad que predomina en la población mundial y que afecta especialmente a los niños.

Objetivos: El objetivo de este trabajo fue evaluar las técnicas de prevención actuales para elegir la más efectiva y descubrir si una vacuna puede cumplir todos los criterios científicos necesarios para enfrentarse a esta patología.

Material y método: Para poder llevar a cabo este trabajo, se ha realizado una revisión de la literatura consultando las bases de datos Pubmed, ProQuest y EBSCO en castellano e inglés, siguiendo unos criterios de inclusión y exclusión.

Resultados y discusión: La mayoría de los estudios han demostrado que los fluoruros son los métodos más sencillos, con costes moderados y eficaces para prevenir la caries. Las vacunas han tenido resultados positivos demostrados en los animales y primates, pero no existe comercialización por el uso humano.

Conclusiones: Esta enfermedad multifactorial se puede prevenir y controlarse a través de una higiene adecuada y el uso de fluoruros siendo el más famoso MI Paste Plus®. Los probióticos son también eficientes cuando se usan únicamente a corto plazo para disminuir los niveles de placa dental y el número de *Streptococcus Mutans*. A pesar de los prometedores avances de laboratorio, las vacunas contra la caries aún están lejos de ser una realidad actual.

Palabras clave: “caries dental”, “prevención”, “vacuna” y “fluoruro

ABSTRACT

Introduction: Dental caries is a disease that predominates in the world population and that especially affects children.

Objectives: The objective of this work is to evaluate current prevention techniques to choose the most effective one and to discover if a vaccine can meet / match all the scientific criterias necessary to face this pathology.

Material and method: In order to carry out this research, a review of the literature consulted in the Pubmed, ProQuest and EBSCO databases in Spanish and English has been done, using inclusion and exclusion criterias.

Results and discussion: Most studies have shown that fluorides are the simplest, low-cost, and effective methods of preventing caries. Vaccines have demonstrated positive results in animals and primates, but do not yet exist in human use.

Conclusions: This multifactorial disease can be prevented and controled through adequate hygiene and the use of fluorides, the most famous being MI Paste Plus. Probiotics are also efficient when used in the short term to decrease dental plaque levels and the number of *Streptococcus mutans*. Despite promising laboratory advances, vaccines against dental caries are still far from being a reality today.

Key words: "dental caries", "prevention", "vaccine" and "fluoride"

1. INTRODUCCIÓN

La caries dental es una enfermedad multifactorial que predomina en la población mundial y que afecta especialmente a los niños. Afecta primero al esmalte, luego a la dentina y si no se trata con tiempo, afectará a la pulpa, lo que tiene consecuencias mucho más graves como inflamación, dolor, necrosis y pérdida de vitalidad del diente. Es imprescindible acudir con regularidad a la consulta para prevenirla, detectarla lo antes posible si ya se ha desarrollado, y entonces tratarla. Sin embargo, el manejo debe ir encaminado hacia la prevención y no en el tratamiento de las lesiones cariosas producidas. Como se sabe, la prevención actual y más habitual se basa principalmente en la higiene oral, la dieta y el flúor (1,2).

Los padres tienen que prestar una importante atención a la salud oral de sus hijos. Mientras el niño adquiere destreza para limpiar sus dientes, deben ser los padres los que refuercen dicha limpieza. Una vez erupcionados los dientes, los padres tienen que cepillar al menos dos veces al día e insistir por la noche, antes de que se vayan a dormir (3,4).

En cuanto a la dieta, el consumo diario y la frecuencia de ingestión de azúcares, así como el tipo de alimento (pegajoso), influye en la aparición de la lesión cariosa. El consumo por día no debe superar el 10% de energía total diaria y mejor si es inferior al 5% (3,4).

Además, el flúor presente en los dentífricos ha permitido reducir de manera significativa la enfermedad cariosa en el mundo (24%). La concentración recomendable de flúor se encuentra entre 1000 ppm (partes por millón) y 1500 ppm; si se encuentra por debajo de este rango, no tendría efecto beneficioso para prevenir la caries (3,4).

Hoy en día, se encuentran otros métodos más novedosos de prevención de la enfermedad cariosa:

1.1 PROBIÓTICOS

Se basan en el uso de antimicrobianos anti-estreptocócicos, que son efectivos a corto plazo para disminuir los niveles de placa dental y el número de *Streptococcus Mutans* en la saliva. Son 100% naturales y ayudan a restablecer una microbiota equilibrada, inhibiendo selectivamente los patógenos orales en lugar de toda la comunidad bacteriana.

Proporcionan beneficios adicionales como un color de diente más blanco, aliento más fresco y encías más sanas (5,6).

Los probióticos tienen un mecanismo de acción preciso. Poseen la capacidad de producir ácidos lácticos y acéticos que disminuyen el pH del medio. Van a competir con las cepas patógenas por las fuentes de nutrientes y liberan peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, realizando una actividad similar a la de los antibióticos. La forma no disociada del ácido orgánico pasa a la célula bacteriana y se disocia dentro del citoplasma. Por lo tanto, la disminución del pH intracelular o la acumulación intercelular de la forma ionizada del ácido orgánico conduce a la muerte del patógeno (5,6).

La mayoría de los probióticos son bacterias Gram positivas que pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Se han empleado también probióticos intestinales como *Lactobacillus Rhamnosus* GG, *Lactobacillus Reuteri* y *Bifidobacterium* y han permitido alcanzar niveles reducidos de *Streptococcus Mutans* (5-7). No obstante, estas cepas tienen limitaciones para la colonización de tejidos orales. Una nueva generación de cepas probióticas se ha desarrollado más recientemente y proceden de la cavidad bucal del ser humano. Pertenecen a bacterias comensales que no son nocivas porque tienen un potencial patógeno muy bajo. Se descubrió un probiótico eficaz para la salud oral llamado *Streptococcus Thermophilus*. Está integrado en la biopelícula presente en la superficie de HA (hidroxiapatita) e interfiere con el crecimiento de *S. Sobrinus* (5-7). Otra bacteria Gram positiva que se está utilizando actualmente es el *Streptococcus Salivarius* (bacteria oxidasa y catalasa negativa). Dos de las cepas de este patógeno más utilizadas son: las K12 y M18. La cepa K12 reduce niveles de VSC (compuestos volátiles de azufre). La cepa JH, tiene una actividad potente frente a *Streptococcus Mutans* (5-7). La *Streptococcus Salivarius* es una bacteria oxidasa y catalasa negativa.

- La cepa K12 fue aislada por primera vez en la saliva de un niño con buena salud y fue utilizada durante más de una década como probiótico comercial en Nueva Zelanda.
- La cepa M18 demostró su efectividad en la reducción de la formación de placa bacteriana en los escolares y aumenta las posibilidades de prevenir el desarrollo de nuevas lesiones cariosas en los niños.
- La cepa JH tiene una acción inhibitoria in vitro de las cepas de *Streptococcus Mutans* y *Streptococcus Sobrinus*, que son microorganismos asociados con la caries dental (6).

Otros probióticos tales como ProBiora3®, G-U-M periobalance® y GanEdenBC30® han sido también elaborados. El más utilizado es el ProBiora3® y está compuesto por las cepas KJ3 de *Streptococcus Oralis*, la cepa KJ2 de *Streptococcus Uberis* y la cepa JH145 de *Streptococcus Rattus*. Cuando el producto ProBiora3® pasa a la boca y se mezcla con la saliva, los probióticos liofilizados se activan y se adhieren a los dientes y tejidos de la encía creando unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias activas. El mecanismo de acción es el mismo que se ha explicado previamente. Las bacterias compiten por los nutrientes. Gracias al suministro diario de ProBiora3®, se restablecen condiciones favorables y un equilibrio microbiano (5).

1.2 FLUORUROS

Las pastas dentales están formadas por varios componentes, abrasivos y sales de fluoruro. La cantidad de flúor debe estar comprendida entre 1000 y 1500 ppm, pero se recomienda la concentración más alta por una principal razón. Los abrasivos poseen la capacidad de influir negativamente, es decir perjudicar la acción anticaries del fluoruro presente en la pasta (8,9). Los distintos tipos básicos de fluoruros utilizados actualmente se pueden observar en la tabla que aparece a continuación.

TIPOS DE FLUORUROS	COMPOSICION / PROPIEDADES	ACCION
FLUORURO DE SODIO	-0,22% de la pasta dental en los productos de 1000ppm. -Alto y rápido poder de ionización. -Poder anticaries.	Participa en la remineralización del esmalte descalcificado y interfiere en el crecimiento de microorganismos de la placa dental
MONOFLUORFOSFATO DE SODIO	-Unión covalente del fluoruro con el fosfato. -Poder anticaries. -500 ppm en niños <10 años y que beben agua fluorada. -Concentración de al menos 1000 ppm para la población en general.	La acción depende de la liberación mediante la hidrólisis enzimática del monofluorofosfato gracias a las fosfatasas de la saliva
FLUORURO DE ESTAÑO	-Poder antibacteriano -Poder anticaries -Sabor astringente	-Remineraliza el esmalte parcialmente desmineralizado gracias al calcio y fosfato de la saliva. -Produce fluoropatita. -Disminuye la formación de placa bacteriana.

Tabla 1: Tipos de fluoruros y sus propiedades. Tabla realizada por el autor (8)

Estos tres fluoruros son los más utilizados desde hace varias décadas por su considerable efecto anticaries. Los dos principales abrasivos asociados a estos fluoruros son la sílice y el metafosfato de sodio por sus propiedades compatibles (8,9).

El modo de acción del fluoruro para controlar el proceso de caries se puede explicar de manera sencilla en dos ítems. La primera parte incluye el ataque cariogénico sobre el esmalte parcial o totalmente cubierto por fluoruro de calcio y la segunda, lo que sucede después de la reacción ácida. Tras un estímulo cariogénico, la capa de fosfato que cubre los depósitos de fluoruro de calcio se disuelve, permitiendo la liberación de calcio y fluoruro.

El flúor liberado del fluoruro de calcio se añade al flúor presente en el fluido del esmalte, que se une a los cristales de hidroxiapatita. Cuando estos cristales están completamente cubiertos por fluoruro adsorbido, sus superficies se vuelven similares a la fluorapatita y no se disuelven con ácidos producidos por las bacterias. Es decir, se inhibe la desmineralización. Sin embargo, cuando los cristales de hidroxiapatita sólo están cubiertos parcialmente por fluoruro adsorbido, las superficies no recubiertas se disuelven porque no están totalmente protegidas (8,9).

Después de la reacción ácida, los tampones de la saliva aumentan gradualmente el pH hasta alcanzar un valor de 7. A $\text{pH} > 5.5$, la remineralización se producirá naturalmente, ya que la saliva está sobresaturada con respecto al mineral dental. En presencia de bajos niveles de fluoruro, los fluidos tienen una concentración ampliamente superior con respecto a la fluorhidroxiapatita, lo que permite la precipitación de apatita fluorada sobre los cristales parcialmente disueltos. Este mineral recién formado es más resistente a los futuros ataques ácidos. Este mecanismo de acción se puede observar resumido en las imágenes que se muestran a continuación (Figura 1) (9)

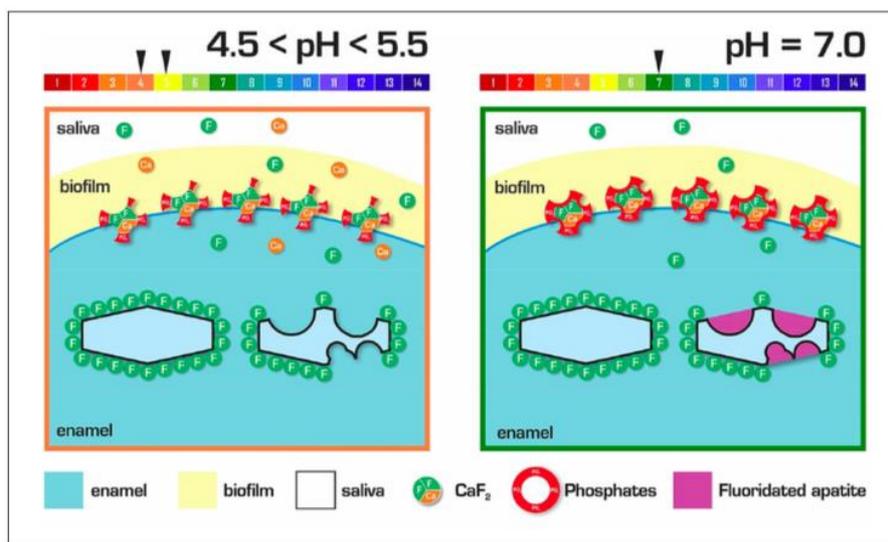


Figura 1: Modo de acción del flúor para controlar el proceso de caries (9)

Hoy en día, se utiliza una alternativa al procedimiento restaurador tradicional llamado fluoruro de diamina de plata que permite detener la caries y prevenir su progresión. Únicamente usado en Japón durante los años 1970, no siendo muy popular en el resto del mundo. Pero, en la actualidad, muchos países han recomendado el uso de fluoruro de diamina a una concentración de 38% para la prevención de la lesión cariosa. Se considera casi el doble de efectivo que el barniz de flúor. El fluoruro de diamina de plata tiene un pH alcalino comprendido entre 8 y 9. Es más estable que la solución básica de fluoruro de plata y puede mantenerse en una concentración constante. Tampoco requiere ningún agente reductor. Es un producto ventajoso e interesante.(10,11). La marca comercial más famosa de fluoruro de diamina de plata llamada Fluoroplat® con una concentración del 38% y un contenido de flúor de 44,800 ppm.(10,11)

La aplicación tópica de fluoruro de diamina de plata en la dentina expuesta provoca la formación de una capa escamosa, que obstruye parcialmente los túbulos dentinarios. La plata del fluoruro de diamina interactúa con grupos de proteínas sulfhídrido y con ácido desoxirribonucleico (DNA), alterando el enlace de hidrógeno e inhibiendo los procesos respiratorios. También se ha demostrado que el fluoruro de diamina de plata puede inhibir la formación de biopelículas y esta inhibición es bastante importante en los primeros 7 días después de la aplicación (10,11). Cuando el ión de fluoruro de diamina de plata se pone en contacto con la dentina, penetra en el tejido a una profundidad de 50-100 μ . Reacciona con la hidroxiapatita del diente para liberar fluoruro de calcio y fosfato de plata, que son responsables de la prevención de la caries (10,11). Este fluoruro tiene un efecto antibacteriano e inhibe cepas cariogénicas de *Streptococcus Mutans* a una concentración superior o igual a 0,12 μ mol/mL y la aglutinación inducida por dextrano del mismo microorganismo a una concentración de 0,59 μ mol/mL (10).

Actualmente, existen varios estudios comparativos entre dos principales y nuevos agentes, el primero es el xilitol y el segundo, CPP-ACP que significa fosfopéptido de caseína - fosfato de calcio amorfo y proviene del inglés *Casein Phosphopeptide- Amorphous Calcium Phosphate*.(12-14). En primer lugar, el xilitol es un alcohol de azúcar de cinco carbonos derivado de los materiales forestales y agrícolas. El nombre viene de la palabra "xilosa" que significa azúcar de madera y de la que se fabricó el xilitol por primera vez. Su uso médico data de 1960 cuando se empleó como terapia de infusión en postoperatorios, en la dieta de pacientes diabéticos y quemaduras. La terapia de infusión consiste en el tratamiento de una persona mediante soluciones infusionadas que contienen una sustancia farmacéutica específica que son administradas intravenosamente para lograr la reposición de la volemia y la curación del paciente (12-14). Más recientemente, se utiliza como edulcorante combinado con otros productos con el fin de mejorar la salud oral. El xilitol interrumpe los procesos de producción de energía de *Streptococcus Mutans* que conducen a un ciclo de consumo de energía inútil y muerte celular. El xilitol reduce la formación de placa y la adherencia bacteriana. Tiene un papel antibacteriano e inhibe la desmineralización del esmalte reduciendo la producción de ácido y se considera que tiene un efecto inhibitorio directo sobre *Streptococcus Mutans*.

Los beneficios del xilitol a nivel dental fueron primero reconocidos en Finlandia en 1970 gracias a estudios en animales. Los primeros estudios en humanos fueron conocidos como los "Estudios de azúcar de Turku" y demostraron la relación entre la placa dental y el xilitol, así como la seguridad del xilitol para el consumo humano. Cinco años más tarde en el mismo país, se creó el primer chicle con el objetivo de reducir la caries y mejorar la salud (12-14). Se ha demostrado que la ingesta de xilitol conduce a resultados positivos, como la reducción de la incidencia de caries y los niveles de *Streptococcus Mutans* en la flora oral debido a la incapacidad de los cinco carbonos de azúcar del xilitol para ser fermentados por esa misma bacteria. Los barnices de xilitol pueden ser alternativas prometedoras para aumentar la remineralización del esmalte. El barniz de xilitol más popular se llama Polimo®, fabricado en Turquía y está compuesto de 5% de fluoruro de sodio, xilitol y saborizante. Existe otro cuyo nombre es Profluorid® y con la misma concentración de fluoruro de sodio (12-14).

En segundo lugar, con los progresos científicos y el avance de la nanotecnología, se ha conseguido modificar las pastas dentales incorporando partículas muy finas de fosfato de calcio para fomentar la remineralización de los tejidos dentales. Se creó el CPP-ACP, un producto lácteo, que fue inventado por el profesor Eric Reynold y su equipo en la Universidad de Melbourne. La Autoridad de la Industria Lechera Victoriana en Abbotsford en Australia registró el producto como Recaldent®. Es un componente formado por fragmentos proteicos naturales nombrados caseínas, alfa-lactalbumina, beta-lactoglobulina e inmunoglobulinas. Este producto tiene una consistencia pegajosa que actúa como un vehículo eficaz de entrega de ACP al diente. Utiliza moléculas naturales (CPP) que se unen a los iones de calcio y fosfato y estabilizan el ACP. Cuando el fluoruro se encuentra con el CPP-ACP, el péptido se combina y se estabiliza preferentemente con fluoruro para crear una fuente excelente para la construcción de fluorapatita. Utilizando calcio, fosfato y fluoruro biodisponibles, se puede lograr todo el potencial del fluoruro para ayudar a proteger y reparar los dientes (15,16).

Ante un ataque bacteriano (pH ácido), los complejos de CPP y ACP se disocian y liberan calcio y fosfato que rellenan el espacio ocupado por la saliva e inhiben la colonización bacteriana. El CPP-ACP se pone en contacto con el esmalte y va a interactuar con los iones hidrógeno para producir calcio, fosfato y hidrógeno. Hay una interacción entre los iones y la superficie ácida creada por los microorganismos. Eso facilitará la remineralización, inhibirá la desmineralización y prevendrá la caries formando un depósito de fosfato de calcio, es decir retiene iones de calcio y fluoruro en el entorno bucal. Permite una mayor resistencia del diente frente a la caries y a la erosión. Este mecanismo de acción se puede entender mejor, gracias a la figura 2 que se muestra a continuación (12,15,16).

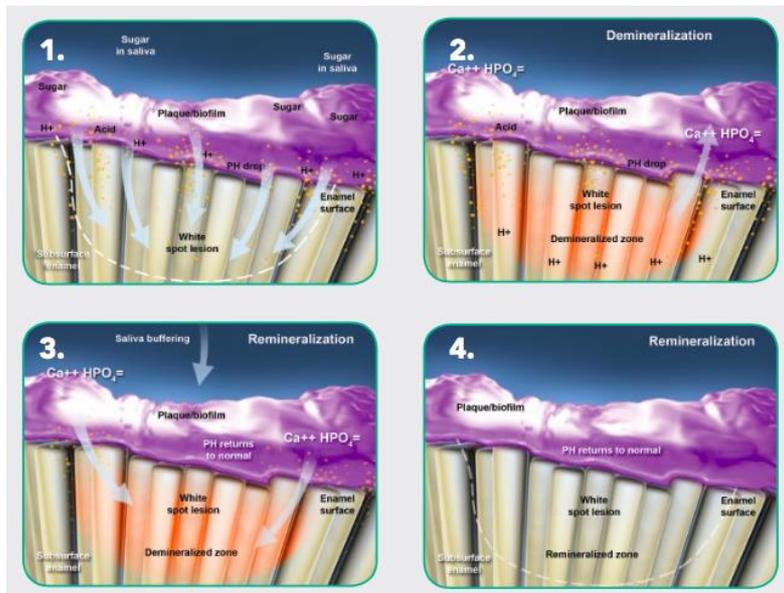


Figura 2: Mecanismo de acción del Recaldent® (17)

En la consulta odontológica, se encuentra en distintos productos tales como:

- MI Varnish®, creado en Japón y cuyos componentes son: 30-50% de acetato de polivinilo, 10-30% de colofonia hidrogenada, 20-30% de etanol, 1-8% de fluoruro de sodio, 1-5% de CPP-ACP y 1-5% de dióxido de silicio. Este barniz de fluoruro de sodio tiene una acción desensibilizante al aplicarlo en las superficies dentales. Su uso está indicado en dientes hipersensibles y debe ser empleado después de limpiar y secar bien los dientes. Además, fortalece el esmalte y tiene una baja viscosidad lo que favorece su dispersión en zonas difíciles de acceso. Los pacientes que utilizan MI Varnish® deben dejar de usar geles o colutorios que contienen flúor el día de la aplicación (16).
- MI Paste® fue comercializado por la compañía de fabricación y venta de materiales dentales GC América Inc. Su forma es parecida a una pasta dental y su aplicación es tópica. Posee principalmente agua y CPP-ACP al 10%. Está recomendado en pacientes de cualquier edad excepto los que son alérgicos a la proteína de la leche.

El profesional, después de haber realizado una limpieza dental, aplica la pasta y esta se adhiere a la placa bacteriana y a la hidroxiapatita del medio oral buscando fosfato y calcio disponibles para interactuar. El contacto de la saliva con el CPP-ACP hace este último más efectivo (15-17).

- MI Paste Plus® producido por la misma empresa y la GC Corporation de Tokyo, además de estar compuesto con CPP-ACP, tiene flúor y su forma es CPP-ACPF. Su indicación está limitada a pacientes mayores de 6 años a causa de su contenido en flúor. Se puede decir que MI Paste Plus® compuesto por CPP-ACP y fluoruro, es un excelente vehículo de entrega de remineralización para el fluoruro (figura 3) (15-17).



Figura 3: Forma comercializada de la pasta MI Paste® y MI Paste Plus® y sus componentes (17)

1.3 VACUNAS

El último enfoque odontológico para combatir la caries dental es a través del desarrollo de una vacuna eficaz en el futuro que sea adecuada para aplicaciones de salud pública, especialmente en entornos que no se prestan a la atención regular de la salud bucodental. Para desarrollar una vacuna contra la caries dental se debe identificar la causa bacteriana específica responsable de la enfermedad cariosa y la función de las glándulas salivares que actúan como un sitio efector del sistema inmunitario de la mucosa (18-24).

En el caso de la caries dental, se ha demostrado que *Streptococcus Mutans* es el principal microorganismo implicado, aunque otros como *Streptococcus Sobrinus*, *Lactobacillus Acidophilus* o *Actinomyces Viscosus* tienen también un papel en el desarrollo de la caries (18-24).

En segundo lugar, se debe estudiar y determinar los componentes bacterianos que tienen la capacidad de producir las vacunas más efectivas. Los estudios preclínicos han revelado que diferentes componentes proteicos involucrados en la patogénesis molecular de *Streptococcus Mutans* pueden inducir inmunidad protectora. Primero, se han propuesto productos superficiales o secretados de *Streptococcus Mutans* como candidatos a antígenos de vacunas contra la caries, pero, hoy en día, los estudios se han centrado en tres antígenos proteicos:

- Adhesinas:

Las adhesinas se han purificado gracias a los dos patógenos fundamentales *Streptococcus Mutans* conocido también con los nombres de antígeno I / II, antígeno B, PAc o P1 y *Streptococcus Sobrinus* que puede ser identificado como SpaA o PAG. Ambas han evidenciado ser antígenos efectivos, tanto como proteínas intactas como vacunas de subunidades. Las adhesinas son cadenas de polipéptidos individuales que tienen 1600 residuos y en *Streptococcus Mutans*, contienen dominios de unión salival asociados con una región repetitiva rica en alanina en el tercio N-terminal y una región repetida rica en prolina en el centro de la molécula. La abundante evidencia in vitro e in vivo que utiliza una variedad de enfoques de inmunización activa y pasiva indica que los anticuerpos con especificidad para las adhesinas de *Streptococcus Mutans* pueden interferir con la adherencia bacteriana a la hidroxiapatita recubierta de saliva y el futuro desarrollo de caries dental. Varios enfoques han demostrado que la inmunización activa con el antígeno I / II intacto o la inmunización pasiva con anticuerpos monoclonales o transgénicos contra los supuestos epítomos del dominio de unión salival dentro de este componente pueden proteger a los humanos de las lesiones cariosas (18-21,24-29).

▪ Gulcosiltransferasas (GTF):

Previamente, se ha descubierto que los *Streptococcus Mutans* que han perdido la capacidad de producir glucano a través de mutaciones naturales o bien inducidas en los genes de GTF, no producen enfermedad relevante en animales. El crecimiento de este microorganismo en presencia de anticuerpos contra el GTF disminuye considerablemente la cantidad de placa en las superficies. Por lo tanto, los estudios de inmunización con vacuna de GTF intactas fueron exitosos debido a que protegen a los animales infectados por esta bacteria. Las secuencias producidas de las GTF van desde 1400 a casi 1600 residuos de aminoácidos y contienen secuencia homóloga considerable, a pesar de las diferencias en la solubilidad en agua y los enlaces entre los glucanos que se sintetizan.

Existen tres tipos: GTF-S (Water-soluble glucan synthesizing enzymes), GTF-S-I (Water insoluble and water-soluble glucan synthesizing enzymes) y GTF-I (Glucan synthesizing enzyme). En el caso de *Streptococcus Mutans*, se encuentra diferentes genes responsables de la síntesis de glucano como se puede ver en la tabla 2 (18-21,25-29).

Tipos de genes	Síntesis
Gtf-B	Glucano insoluble unido a α -1,3
Gtf-C	Glucano con enlaces α -1,3 y α -1,6
Gtf-D	Glucano soluble ligado a α -1,6

Tabla 2: Síntesis de diferentes tipos de glucanos según los genes del Streptococcus Mutans

Tabla realizada por el autor (19,20,25)

La administración pasiva de anticuerpos contra el GTF en la dieta tuvo también éxito y un papel protector. Se puede afirmar que la GTF es una proteína que proporciona mucho interés ya que tiene varias funciones. Esta enzima corta el enlace entre los restos de glucosa y fructosa en sacarosa. La glucosa activada se transfiere luego a un polímero de glucano en crecimiento. Los glucanos también pueden unirse a un área de secuencias repetidas en el tercio C terminal de la enzima. Estas áreas de función ofrecen diversas posibilidades para respuestas inmunes más específicas. Las vacunas de péptidos sintéticos o proteínas recombinantes, diseñadas para incluir una o más áreas de función sospechosas, protegen los animales de la caries dental.

Dado que los GTF de las dos principales especies de estreptococos cariogénicos en humanos, *Streptococcus Mutans* y *Streptococcus Sobrinus* sintetizan cada uno muchas GTF y tienen secuencias muy similares en estos dominios funcionales, la inmunización con proteínas GTF o vacunas de subunidades de una especie puede inducir una medida de protección para las otras especies. Por lo tanto, la presencia de anticuerpos contra el GTF en la cavidad oral, antes de la infección, puede influir de manera significativa en el resultado de la enfermedad, por la posible interferencia con una o más de las actividades funcionales de la enzima (18-21,23-28,30).

- Proteínas de unión al glucano (GBP o Gbp): Los *Streptococcus Mutans* poseen la capacidad de unirse a los glucanos mediante las Gbp asociadas a la pared celular. Este microorganismo secreta tres proteínas con actividades distintas de unión al glucano. Se encuentran la Gbp-A, la Gbp-B y la Gbp-C. De estas tres proteínas, solo se han ensayado experimentos en los cuales la proteína Gbp-B fue la única en producir una respuesta inmune protectora contra la caries. Esta inmunidad se logra gracias a una inyección subcutánea de Gbp-B en una zona de la glándula salival o mediante la vía intranasal. Sin embargo, a diferencia del GTF, la protección inducida por la liberación de Gbp-B por *Streptococcus Mutans* no se extiende a las especies de *Streptococcus Sobrinus* (18-21,24-29).

Para poder llegar a la creación de una vacuna estable y eficaz, se han llevado a cabo numerosos experimentos que han sido ensayado en animales y posteriormente en humanos (20,21,28). Las ratas, los conejos y los monos se han utilizado en gran medida en estudios de inmunización. La capacidad de llegar a un diagnóstico preciso de caries mediante el examen de la superficie del diente y establecer grandes grupos experimentales hace que los roedores sean una buena opción para los animales de laboratorio. Numerosos estudios han demostrado que los *Streptococcus Mutans* pueden provocar caries en fosas y fisuras, así como en superficies lisas, proximales y radiculares de los dientes de animales tanto gnotobióticos como convencionales. Los animales gnotobióticos son animales libres de gérmenes con excepción de la microbiota específica y conocida que han sido introducidos intencionalmente. Se han demostrado más pruebas de la participación de *Streptococcus Mutans* en la etiología de la caries a partir de estudios de inmunización. En uno de esos estudios, la administración oral de células de *Streptococcus Mutans* a ratas gnotobióticas indujo la producción de anticuerpos secretores en la saliva y la reducción de la incidencia de caries en estos animales (20,21,28).

En general, se utilizan rutas de inmunización que son la vía oral, subcutánea, las glándulas salivares, la intranasal, amigdalina y la rectal, es decir vías de administración con *Streptococcus Mutans* (18-22,27,28,30).

Todas las vacunas, aunque se fabriquen adecuadamente, parecen tener riesgos en distintos niveles. Se realizó un estudio en el cual varios conejos fueron inmunizados con algunas cepas de *Streptococcus Mutans*. Proporcionó una evidencia de que los antígenos en *Streptococcus Mutans* podrían provocar anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con el tejido cardíaco, lo que a su vez puede provocar casos de miocarditis, lo que representa un riesgo inaceptable para la salud (19,20,27). Igualmente, se informó que los experimentos con sueros de conejos inmunizados con células enteras de *Streptococcus Mutans* y con un antígeno proteico de alto peso molecular de *Streptococcus Mutans* reaccionaron de forma cruzada con los tejidos del corazón humano. En efecto, la vacuna de *Streptococcus Mutans* puede no solo reaccionar contra un antígeno específico sino también reaccionar de forma cruzada contra los tejidos del corazón, lo cual es más común en pacientes con fiebre reumática. Por lo tanto, la vacuna debe ser lo suficientemente pura con la eliminación de epítomos específicos en AgI / II debido a que causa reactividad cardíaca (19,20,27). Sin embargo, los ensayos elaborados únicamente en animales no permiten concluir que la vacuna contra la caries en el hombre represente un riesgo aumentado de aparición de miocarditis provocado por *Streptococcus Mutans*. Debido al potencial de las células enteras estreptocócicas para producir anticuerpos reactivos para el corazón, el desarrollo de una alternativa, es decir una vacuna de subunidades para controlar la caries dental ha sido el foco de una intensa investigación (19,20,27).

Las secuencias genéticas de ciertos microorganismos orales, como el *Streptococcus Mutans*, permitieron conocer las partes más importantes de los antígenos principales, que pueden inducir una mejor respuesta inmune. Hoy en día, las técnicas genéticas moleculares se han utilizado en la elaboración de moléculas híbridas para poder afrontar los efectos secundarios y negativos encontrados previamente. Por lo tanto, se han desarrollado nuevas formas de presentar estos inmunógenos, incluida la vacuna de ADN, que se obtiene por transferencia y producción de una proteína específica para la inmunización. El ADN de *Streptococcus Mutans*, empleado para el desarrollo de este tipo de vacuna, se extrae por lisis mecánica o química y se puede encontrar el gen que codifica la proteína antigénica en su material genético, que se utilizará para producir inmunidad (19-23,27,29).

Se ha investigado nuevas rutas para poder potenciar aspectos específicos de la respuesta inmune para inducir anticuerpos en cantidad y calidad suficiente con el fin de superar las desventajas existentes revisadas anteriormente. Por ello, la elaboración de una vacuna efectiva contra la caries dental se podría conseguir mediante complementos, adyuvantes y sistemas de suministro como son los liposomas, fusionando con *Salmonella*, acoplamiento con subunidad no tóxica de toxina del cólera y enterotoxina inestable al calor de *Escherichia Coli*, microcápsulas y micropartículas, nanopartículas, y antígenos y anticuerpos de plantas entre otros (19-23,27,29).

Recientemente, se ha descubierto otra vacuna constituida por una proteína llamada p1025. Esta proteína supera y “engaña” a *Streptococcus Mutans* para que crea que no hay sitios vacíos en el diente para el ataque. La p1025 se comporta como la proteína de la bacteria que consiste en una proteína de superficie que se adhiere al esmalte, ocupando todos los sitios de acoplamiento (24,27,28).

Además, la vacunación debe realizarse cuando los bebés son inmunocompetentes con respecto a la producción de IgA salival y antes de que ocurra la infección con *Streptococcus Mutans*. Este efecto se logra mejor antes de los 12 meses de edad. Se pueden requerir una o más inmunizaciones de refuerzo. Esto se puede entender mejor gracias a la figura 4 que se muestra a continuación (31,32)

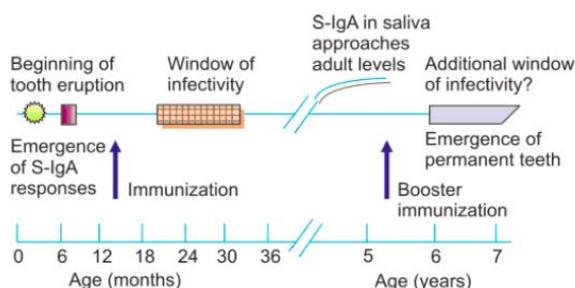


Figura 4: Momento adecuado para la vacunación en la mucosa contra la caries dental (32)

A pesar de los prometedores avances de laboratorio, las vacunas contra la caries aún están lejos de ser una realidad actual. La mayoría de los estudios se han realizado en animales y aún con experimentos llevados a cabo en primates y la evidencia de la eficacia de las vacunas, no existe comercialización para el uso humano (23,24,27,28).

Asimismo, la elaboración de vacunas necesita inversiones a gran escala, lo que implica un coste elevado, y no es ventajoso para los sistemas de salud pública. Se debe seguir investigando y contestar a preguntas imperativas, como el tiempo de supervivencia de la vacuna con una concentración adecuada en la cavidad bucal, la mejor vía de administración, así como una reducción en la posibilidad de reacciones cruzadas. (23,24,27,28)

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo fue evaluar las técnicas de prevención actuales para elegir la más efectiva y descubrir si una vacuna puede cumplir todos los criterios científicos necesarios para enfrentarse a esta patología.

3. MATERIAL Y MÉTODO

Para poder llevar a cabo esta investigación, se ha realizado una revisión de la literatura consultando las bases de datos Pubmed, ProQuest y EBSCO en castellano e inglés. Se han usado las palabras claves “caries dental”, “prevención”, “vacuna” y “fluoruro” con criterios de inclusión y exclusión. Los criterios de inclusión y exclusión se muestran a continuación:

CRITERIOS DE INCLUSIÓN	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN
<ul style="list-style-type: none"> - Artículos publicados a partir de 2014 en adelante. - Artículos en inglés y castellano. - Artículos de páginas webs oficiales. - Revisiones bibliográficas y sistemáticas. - Artículos de casos clínicos, casos-controles y cohortes. 	<ul style="list-style-type: none"> - Artículos anteriores a 2014. - Artículos con acceso limitado y de pago. - Artículos de texto no completo. - Artículos escritos en otro idioma distinto de inglés o castellano.

Esta búsqueda se realizó gracias a las ecuaciones y operadores booleanos “AND/OR” con las palabras claves en inglés:

- ✓ [(dental caries) AND (prevalence) AND (europe)]
- ✓ [(prevention) AND (tooth decay) AND (review)]
- ✓ [(probiotic) OR (fluoride) AND (tooth decay prevention)]
- ✓ [(dental caries) AND (vaccine)]
- ✓ [(dental caries) AND (fluoride)]

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La mayoría de los estudios han demostrado que los fluoruros son los métodos más sencillos, con costes moderados y eficaces para prevenir la caries. Pero, también, la literatura recoge que el uso de probióticos puede ser también una técnica beneficiosa para prevenir la caries (6,33).

Burton y cols. en el año 2013 realizaron un ensayo clínico controlado en el cual 38 personas tomaron un probiótico compuesto por la cepa M18 de *Streptococcus Salivarius*. En el grupo control no había tratamiento y estaba también formado por 38 personas. El grupo tratado tomó el probiótico en tabletas de desintegración oral una vez al día durante tres meses. Se evaluaron los niveles salivales de *Streptococcus Salivarius*, *Streptococcus Mutans*, *Lactobacilos*, *Estreptococos Hemolíticos* β y especies de *Cándida*. Los análisis de cultivos celulares de las muestras secuenciales de saliva no mostraron diferencias significativas en los recuentos reducidos de *Streptococcus Mutans* entre los grupos de estudio (6).

Otra investigación fue llevada a cabo por Di Pierro y cols. dos años más tarde. Fue un ensayo clínico aleatorizado y controlado en el cual 40 personas tomaron el probiótico constituido por la cepa M18 de *Streptococcus Salivarius* y otras 43 personas, un placebo. Esta vez, la vía de administración fue a través de pastillas, es decir dos pastillas cada día durante un periodo de tres meses. Se estudió el cariograma de las muestras, basado en un conjunto de factores patológicos y protectores cuya variable probablemente más relevante en la predicción del riesgo de caries fue la "experiencia de caries" y, de hecho, se ha demostrado una fuerte relación entre la experiencia de caries y el riesgo de caries (6,33).

Aparentemente, en ambos experimentos (Burton y Di Pierro), las pruebas microbianas, destinadas a evaluar la presencia de *Streptococcus Mutans*, no parecen ser relevantes. Esto podría deberse a que, en presencia de flúor, junto con una dieta adecuada en términos de calidad y cantidad, se puede tolerar un alto número de *Streptococcus Mutans* sin causar un daño significativo a los dientes.

Sin embargo, en el estudio de 2015, se representó gráficamente los valores del cariograma calculados (en porcentaje) utilizando el valor promedio de los elementos enumerados y se demostró que el tratamiento con el producto basado en la cepa M18 mejoraba significativamente las "posibilidades de evitar nuevas caries dentales", de 20 a 70, reduciendo el parámetro "bacterias", de 29 a 7, y reduciendo la "susceptibilidad", de 23 a 9. No hubo variaciones estadísticas relevantes evidentes en el grupo no tratado (6,33).

Las vacunas han tenido resultados positivos demostrados en los animales y primates, pero no existe comercialización par el uso humano. Se han encontrado varias posibilidades debatidas, explicadas y resumidas en la tabla.

AUTORES Y AÑO	TIPO DE ANIMAL Y ESTUDIO	TIPO DE VACUNA	VÍA DE ADMINISTRACIÓN	EFEECTO	CONCLUSIÓN
Yang y cols. /2009 (34)	Ratas gnobióticas; In vivo	Vacuna de ADN: pGJA-P/VAX	Intranasal	- Producción aumentada de IgG y SIgA. - Disminución crecimiento lesiones de caries en esmalte (21.1%), lesiones leves de dentina (33.0%) y lesiones moderadas de dentina (40.9%).	- Proceso de producción de la sustancia eficiente. - Alto grado de pureza y eficiencia deseada: ensayos clínicos favorables.
Niu y cols. /2009 (35)	Ratas gnobióticas / In vivo	Vacuna de ADN: pGJA-P/VAX	- Intransal - Intramuscular	- Reducción niveles de caries causada por <i>Streptococcus Mutans</i> . - Efecto protector débil contra la infección por <i>Streptococcus Sobrinus</i> .	Tras la clonación de la región catalítica del fragmento Gtf-I de <i>Streptococcus Sobrinus</i> , se produjo la inhibición de la síntesis del glucano insoluble en agua por <i>Streptococcus Sobrinus</i> , que puede dar lugar a una nueva configuración de la vacuna.
Chen y cols. / 2013 (36)	In vitro: incorporación de liposomas aniónicos en complejos de quitosano / ADN	Vacuna de ADN: pGJA-P/VAX	/	Mayor eficiencia de introducción del material y mayor tiempo de supervivencia del liposoma aniónico / quitosano / ADN: produce mayor nivel de sIgA.	Mínima toxicidad, pero las nanopartículas desarrolladas tienen un potencial de entrega de vacunas de ADN: inmunidad de la mucosa más eficiente.
Su y cols./ 2014 (37)	Ratas / In vivo	Vacuna de ADN : pCI-IL-6	Intranasal	Las ratas inmunizadas con la variación pCI-IL-6 mostraron niveles de caries más bajos que el grupo de ratas control.	La administración intranasal de IL-6 mejora de manera significativa la inmunogenicidad de la vacuna de ADN anticaries.

Yang y cols. realizaron un experimento en 2009, mediante un proceso de producción industrial a gran escala bajo el sistema “Buenas Prácticas de Manufacturación” (normas aplicables a las operaciones de fabricación) mediante la combinación y optimización de procedimientos comunes de la unidad, tales como la lisis alcalina, la precipitación, la eliminación de endotoxinas y la cromatografía en columna. Los controles de calidad de la vacuna liofilizada a granel y finalmente purificada se realizaron de acuerdo con las directrices autorizadas. Los ratones y las ratas gnotobióticas se inmunizaron por vía intranasal con pGJA-P / VAX verificado clínicamente y con quitosano (polímero natural compuesto por polisacárido obtenido a partir de la desacetilación de la quitina). Los niveles de anticuerpos de IgG en suero y SIgA salival se evaluaron mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (test ELISA), y la actividad de caries se evaluó mediante el método de Keyes. pGJA-P / VAX y pVAX1 preparados por un kit comercial a escala de laboratorio se utilizaron como controles. Los resultados fueron positivos disminuyendo el crecimiento de lesiones de caries en los dientes (28,34).

El experimento de Niu y cols. se realizó también en 2009 y siguiendo el mismo método que el de Yang y cols. Se estudiaron los resultados en relación con *Streptococcus Mutans*, pero también sobre *Streptococcus Sobrinus*. Obtuvieron menos niveles de caries en relación a *Streptococcus Mutans*, pero una protección más débil en cuanto a la infección por *Streptococcus Sobrinus* (28,35).

Chen y cols. enfocaron sus investigaciones en el diseño de nanopartículas optimizadas que ofrecía una estrategia prometedora para permitir que las vacunas de ADN cruzaran varias barreras fisiológicas para provocar una inmunidad específica y protectora de la mucosa a través de la administración intranasal. En este estudio, se informó de un nuevo sistema de nanopartículas diseñado mediante la incorporación de liposomas aniónicos en complejos de quitosano / ADN. Con una absorción celular mejorada, las nanopartículas de liposomas aniónicos, complejos de quitosano / ADN construidas permiten la administración de la vacuna de ADN anti-caries pGJA-P / VAX en la mucosa nasal. Se realizó una electroforesis en gel y está demostró una alta capacidad de carga de ADN y una protección eficaz del ADN contra la nucleasa. La carga superficial de liposomas aniónicos en complejos de quitosano / ADN dependía en gran medida del entorno de pH, lo que permitía la liberación intracelular de ADN cargado a través de una forma mediada por pH. Asimismo, se evaluaron los niveles de sIgA, es decir hubo una producción mayor y entonces, una inmunidad de la mucosa más eficiente (28,36).

En cuanto al último experimento estudiado en este trabajo, lo realizó Su y cols. en 2014, es decir cinco años más tarde que el de Yang y cols. El plásmido pCI-IL-6 se construyó insertando el gen murino (subfamilia de ratas) de IL-6 en el vector pCI. La expresión de IL-6 in vitro se evaluó mediante análisis de transferencia Western. Consiste en una técnica de laboratorio usando electroforesis en gel para detectar una proteína de interés en una muestra de sangre o de tejido. Los ratones de tipo BALB / c se inmunizaron por vía intranasal con pCIA-P más pCI-IL-6. El ELISA evaluó IgG anti-PAc e IgA secretora (sIgA). Los esplenocitos (cualquiera de los diferentes tipos de glóbulos blancos, siempre que esté situado en el bazo o purificado del tejido esplénico) de los ratones se reestimularon con la proteína PAc y se midió la producción de IFN- γ (interferón gamma, es decir una citocina producida por los linfocitos T CD4+ y natural killer) e IL-4 (interleucina 4 que es una proteína del grupo de las citosinas producidas por las células T) usando ELISA. La proliferación de esplenocitos se analizó con citometría de flujo. Las ratas se inmunizaron de manera similar, y las puntuaciones de caries dental se determinaron usando el método Keyes. Este experimento permitió a las ratas inmunizadas con el pCI-IL-6 una disminución de los niveles de caries además de una importante inmunogenecidad (28,37).

5. CONCLUSIONES

- 1) La literatura recoge que las principales medidas de prevención contra la caries son una higiene correcta utilizando cepillos dentales y dentífricos adecuados según la edad y el tipo de diente, una dieta sana evitando los azúcares y alimentos pegajosos y el empleo de fluoruros siendo las más eficaz esta última.
- 2) Los probióticos permiten restablecer condiciones favorables en la cavidad oral y son exclusivamente efectivos a corto plazo para disminuir los niveles de placa dental y el número de *Streptococcus Mutans*.
- 3) Los fluoruros son métodos sencillos y con costes razonables siendo el mejor MI Paste Plus® conocido también con el nombre de Tooth Mousse Plus®. Además de reducir el riesgo de caries y favorecer la remineralización, esta pasta resulta muy útil y eficaz en dientes sensibles, con lesiones blancas, defectos de desarrollo del esmalte e incluso en pacientes con tratamientos ortodóncicos.
- 4) La mayoría de los estudios sobre la elaboración de una vacuna se han realizado en animales y han resultado eficaces. Sin embargo, aún con experimentos llevados a cabo en primates, no existe vacuna para humanos en el mercado actual debido a la capacidad disminuida de obtener y mantener anticuerpos protectores en los fluidos orales. La creación de vacunas implica inversiones a gran escala, lo que significaría un importe alto por parte de la población.

6. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Brenna F, Toffenetti F, Pescarmona GC. Odontología restauradora: procedimientos terapéuticos y perspectivas de futuro. Ámsterdam: Ámsterdam : Elsevier-Masson; 2010.
- (2) Cameron AC, Widmer RS. Manual de Odontología pediátrica. 3ª ed.. ed. Madrid: Madrid : Elsevier; 2010.
- (3) Catalá Pizarro M, Cortés Lillo O. La caries dental: una enfermedad que se puede prevenir. Anales de Pediatría Continuada 2014;12(3):147-151.
- (4) Camila Palma, Cesar Brabo Carrillo, Ailin Cabrera. Recomendaciones basadas en la evidencia para la prevención de caries en infantes. 2017.
- (5) Singh G, Kohli A, Mehrotra A, Divya D, Garg K. We can WAR against Tooth Decay, but are still “BREWING” . Epidemiology 2014;26(6):862-872.
- (6) Poorni S, Srinivasan MR, Nivedhitha MS. Probiotic Streptococcus strains in caries prevention: A systematic review. Journal of conservative dentistry : JCD 2019 Mar;22(2):123-128.
- (7) Suryakant C Deogade. Probiotics: contributions to oral health. Oral health and dental management 2015;14(3):443-451.
- (8) Jessica Contreras Rosales, Dolores De la Cruz Cardoso, Irene Castillo Chaires, Maricela Arteaga Mejía. Dentífricos fluorurados: composición . Vertientes: Revista Especializada en Ciencias de la Salud 2014.
- (9) Ten Cate JM, Buzalaf MAR. Fluoride Mode of Action: Once There Was an Observant Dentist. Journal of Dental Research 2019;98(7):725-730.
- (10) Galui S, Pal S, Pabale S, Saha S, Sarkar S. Stretching new boundaries of caries prevention with silver diamine fluoride: A review of literature. International Journal of Pedodontic Rehabilitation 2018;3(1):1-4.
- (11) Horst JA, Heima M. Prevention of Dental Caries by Silver Diamine Fluoride. Compendium of continuing education in dentistry (Jamesburg, N.J. : 1995) 2019;40(3):158.
- (12) Jafari K, Hekmatfar S, Fereydunzadeh M. In vitro Comparison of Antimicrobial Activity of Conventional Fluoride Varnishes Containing Xylitol and Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate. Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry 2018 Jul;8(4):309-313.
- (13) Yadav S, Sachte V, Malik M, Chopra R. Effect of three different compositions of topical fluoride varnishes with and without prior oral prophylaxis on Streptococcus mutans count in biofilm samples of children aged 2–8 years: A randomized controlled trial . J Indian Soc Pedod Prev Dent 2019;37(3):286-291.

- (14) Janakiram C, Deepan Kumar CV, Joseph J. Xylitol in preventing dental caries: A systematic review and meta-analyses. *Journal of natural science, biology, and medicine* 2017;8(1):16-21.
- (15) Julissa Amparo Dulanto Vargas. Efectividad de pastas dentales a base de calcio, fosfato y flúor en la remineralización de lesiones iniciales de caries
. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2018.
- (16) Wilman Ruíz Vigo. EFICACIA REMINERALIZADORA DE RECALDENT VS BARNIZ FLUORADO EN LESIONES DE MANCHA BLANCA EN ESMALTE in vitro
Universidad del Cauca; 2017.
- (17) The essential solution for sensitive teeth: the MI Paste Family. GC America 2019.
- (18) Arora B, Setia V, Kaur A, Mahajan M, Sekhon H, Singh H. Dental caries vaccine: An overview. *Indian Journal of Dental Sciences* 2018 Apr 1,;10(2):121-125.
- (19) Sharma Yesh, Chaudhary Devendra, Nagpal Ravi, Bishnoi Atul, Trinath Tangutoori, Rapsang Eliezer. Dental Caries Vaccine – A Change
. *Acta Scientific Dental Sciences* 2018;2(10):41-44.
- (20) Malavika J, S S Hiremath, Madhushree Das, Ameena Musareth, Priyanka Arora. Dental Caries Vaccine: A Review
. *International Journal of Oral Health and Medical Research* 2016;3(4):104-108.
- (21) Abraham M, Shwetha KN, Vanishri HC, Roopa RS, Dominic A, Sowmya SV. Vaccine for Dental Caries - An Imminent Target
. *Journal of Dental & Oro-facial Research* 2018;14(1).
- (22) Surya.V, Rena Ephraim, Rajamani. T, Ambili Ayilliath, Aravind. A, Sharath chandrasekhar. Newer Developments in the field of Caries Vaccine- A Review
. *Journal of Advanced Medical and Dental Sciences Research* 2018;6(12).
- (23) Manoj Kumar, Shikha Chaudhary, Arvind Singh. Dental Caries Vaccine: A Review
. *DHR International Journal Of Medical Sciences (DHR-IJMS)* 2015;6(2).
- (24) Tilak Raj Pathak. Dental Caries Vaccine: Need of the Hour
. *International Journal of Oral Health and Medical Research* 2016;2(5):138-139.
- (25) Chhabra R, Rajpal K. Caries vaccine: A boom for public health. *Annals of Tropical Medicine and Public Health* 2016 Jan 1,;9(1):1.
- (26) Babu A, Malathi L, Karthick R, Sankari S. Immunology of Dental Caries. *Biomedical and Pharmacology Journal* 2016 Aug 25,;9(2):823-826.
- (27) Shilpa Singh, Sakshi Kataria. An Insight into Caries Vaccine
. *International Journal of Oral Health and Medical Research* 2015;2(4):107-110.
- (28) Silva DRd, Silva, Andréa Cristina Barbosa da, Filho RM, Verli FD, Marinho SA. Vaccine against Dental Caries: An Update. *Advances in Microbiology* 2014;4(13):925-933.

- (29) Krishnendu Chatterjee. Caries Vaccine: The Journey So Far . Acta Scientific Dental Sciences 2019;3(1):111-115.
- (30) Vidhi Shah, Siddhi Chovateeya, Dhruv kumar Patel, Nima Suthar, Anshul Shah, Jhanvi Patel. Vaccination against Dental Caries – Possibilities, Prospects & Dangers . Journal of Advanced Medical and Dental Sciences Research 2018;6(5).
- (31) Nikhil Marwah. Textbook of Pediatric Dentistry. Fourth Edition ed.: Jaypee Brothers Medical Publishers; 2019.
- (32) C. M. Marya. A Textbook of Public Health Dentistry. First edition. ed.: Jaypee Brothers Medical Publishers; 2011.
- (33) Di Pierro F, Zanvit A, Nobili P, Risso P, Fornaini C. Cariogram outcome after 90 days of oral treatment with Streptococcus salivarius M18 in children at high risk for dental caries: results of a randomized, controlled study. Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry 2015 Oct 1;2015(default):107-113.
- (34) Yang Y, Li Y, Zhang A, Bi L, Fan M. Good Manufacturing Practices production and analysis of a DNA vaccine against dental caries. Acta Pharmacologica Sinica 2009;30(11):1513-1521.
- (35) Niu Y, Sun J, Fan M, Xu QA, Guo J, Jia R, et al. Construction of a New Fusion Anti-Caries DNA Vaccine. Journal of Dental Research 2009;88(5):455-460.
- (36) Chen L, Zhu J, Li Y, Lu J, Gao L, Xu H, et al. Enhanced Nasal Mucosal Delivery and Immunogenicity of Anti-Caries DNA Vaccine through Incorporation of Anionic Liposomes in Chitosan/DNA Complexes. PloS one 2013;8(8):e71953.
- (37) Su L, Yu F, Li Z, Zeng C, Xu Q, Fan M. Intranasal co-delivery of IL-6 gene enhances the immunogenicity of anti-caries DNA vaccine. Acta Pharmacologica Sinica 2014;35(5):592-598.