

# Respuesta de células T, citocinas y anticuerpos frente al péptido (365-377) de la proteína de adhesión celular de *Streptococcus mutans*

*T Cell, Cytokine, and Antibody Response to Streptococcus mutans Cell Surface Protein Antigen Peptide (365-377)*

## Nelly Stella Roa Molina

Odontóloga, magistra en Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. PhD, Universidad Nacional Autónoma de México, México. Profesora asistente, Centro de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología, Pontificia Universidad Javeriana.

## Soledad Isabel Gómez Ramírez

Odontóloga, magistra en Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Profesora asistente, Centro de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología, Pontificia Universidad Javeriana.

## Adriana Rodríguez Ciódaro

Bacterióloga, magistra en Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Profesora asociada, Centro de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología, Pontificia Universidad Javeriana.

## RESUMEN

**Antecedentes:** en la búsqueda de un antígeno vacunal óptimo contra la caries dental en humanos se ha utilizado el péptido PAC<sub>(365-377)</sub> de la proteína PAC de *Streptococcus mutans*, el cual presenta epítopes T y B para ratones. Poco se conoce acerca de la respuesta en humanos naturalmente sensibilizados. **Objetivo:** analizar la respuesta inmune humoral y celular frente a PAC<sub>(365-377)</sub> en relación con el estado de la caries dental. **Métodos:** se tomaron 30 muestras distribuidas en tres grupos: caries activa, historia de caries y libres de caries. A cada paciente se le cuantificaron las concentraciones de inmunoglobulina A y G (IgA e IgG) salivales y séricas frente al péptido por ELISA y las células productoras de las citocinas IFN- $\gamma$  e IL-2 (perfil TH1), IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (perfil TH2) por la técnica de estimulación antígeno-específica por citometría de flujo. **Resultados:** se encontró una respuesta de memoria celular y de anticuerpos frente al péptido PAC<sub>(365-377)</sub> en humanos naturalmente sensibilizados. Se detectaron tres perfiles de citocinas: TH0, TH1 y TH2, con predominio del perfil TH0 por LTCD4+ y T1 por LTCD8+ en sujetos libres de caries. El 54 % de los individuos no respondió a las citocinas analizadas por LTCD4+ y el 70 % por LTCD8+. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la producción de anticuerpos salivales y séricos entre los grupos. **Conclusiones:** la respuesta inmune humoral y celular específica frente al péptido PAC<sub>(365-377)</sub> de *S. mutans* no muestra diferencia entre pacientes con caries e individuos resistentes a la enfermedad, en humanos naturalmente sensibilizados.

## PALABRAS CLAVE

*Streptococcus mutans*; caries dental; péptido PAC<sub>(365-377)</sub>; citocinas; anticuerpos

## ÁREAS TEMÁTICAS

Caries dental; inmunología

## ABSTRACT

**Background:** PAC<sub>(365-377)</sub> peptide derived of *Streptococcus mutans* PAC protein has been used in the search for a vaccine against dental caries in humans. This peptide has T and B epitopes in animal model (mice) but this is unknown in naturally sensitized humans. **Purpose:** To analyze the humoral and cellular immune response to the PAC<sub>(365-377)</sub> peptide regarding dental caries status. **Methods:** 30 subjects were classified into three groups: active cavities, history of cavities, and caries free subjects. Blood and saliva samples were obtained from each subject. Measures included total amount of salivary and serum IgA and IgG against the PAC<sub>(365-377)</sub> peptide through ELISA and detection of functional populations of memory T cells that reacted to the PAC<sub>(365-377)</sub> peptide through frequency of IFN- $\gamma$  and IL-2 (TH1 profile), IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13 (TH2 profile) with antigen-specific immune function assays through flow cytometry. **Results:** A memory cellular and humoral immune response against the PAC<sub>(365-377)</sub> peptide in naturally sensitized humans was observed. TH0, TH1, and TH2 profiles were detected with TH0 profile prevalence for LTCD4+ and TH1 profile prevalence for LTCD8+ in the caries free group. 54% of subjects did not react to LTCD4+ analyzed cytokines and 70% for LTCD8+. There were no statistically significant differences between the groups studied. **Conclusions:** Cellular and humoral immune response to the PAC<sub>(365-377)</sub> synthetic peptide from *S. mutans* did not show association with health or disease in naturally sensitized humans.

## KEYWORDS

*Streptococcus mutans*; dental caries; peptide PAC<sub>(365-377)</sub>; cytokines; antibodies

## THEMATIC FIELDS

Dental caries; immunology

## CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

Roa NS, Gómez SI, Rodríguez A. Respuesta de células T, citocinas y anticuerpos frente al péptido (365-377) de la proteína de adhesión celular de *Streptococcus mutans*. Univ Odontol. 2014 Jul-Dic; 33(71): 29-40. <http://dx.doi.org/10.11144/Javeriana.uo33-71.rcca>

doi:10.11144/Javeriana.uo33-71.rcca

Recibido para publicación: 03/06/2014

Aceptado para publicación: 17/09/2014

Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/universitasodontologica>

## INTRODUCCIÓN

Las infecciones bacterianas de la cavidad oral, en especial la caries dental y la enfermedad periodontal, son más frecuentes en la especie humana. En Colombia, el Tercer Estudio Nacional de Salud Bucal reportó que el 88,7 % de la población de 5 a 65 años de edad presentaba historia de caries dental. En pacientes con dentición permanente, la historia de caries se presenta en el 19,9 % en niños de 7 años, y en el 71,9 % a los 12. En la adolescencia, la proporción aumenta a 89,5 %, y a los 35 años la mayoría de la población ha tenido alguna experiencia de enfermedad. La prevalencia (lesiones cavitarias activas en el momento del estudio) era del 65,3 % (1).

Hasta el momento, no hay evidencia convincente de que solo la cuidadosa limpieza mecánica de los dientes por parte del paciente, sobre todo en la población infantil (como un mecanismo para eliminar el agente etiológico de la placa dental) reduzca la incidencia de la caries dental. No obstante, si la limpieza la realiza un profesional que incluye, además, tratamiento con flúor y sellantes, la caries y la enfermedad periodontal se presentan con menos frecuencia. Los inconvenientes son los altos costos y la falta de acceso de todos los individuos a este tipo de terapias preventivas, lo que hace que la patología cariosa todavía se presente en la actualidad.

Los estreptococos del grupo mutans son importantes agentes etiológicos asociados con las etapas iniciales en caries dental y, entre estos, *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) serotipo c ha sido el microorganismo más relacionado con esta patología. Teniendo en cuenta que la caries dental es una entidad ocasionada por un agente infeccioso específico, una de las posibles estrategias para controlarlo sería una vacuna que permita prevenir la enfermedad. Esta vacuna se enfocaría en bloquear mecanismos fisiopatológicos como la adherencia del *S. mutans* al diente y la producción de glucanos insolubles. Sin embargo, ello continúa en la fase de experimentación animal, a pesar de que desde hace aproximadamente treinta años se vienen desarrollando investigaciones en el área.

La colonización de las superficies del diente por parte de estos microorganismos se considera el primer paso para el inicio de la caries. La adhesión ocurre mediante dos mecanismos principales: independiente y dependiente de sacarosa. En el primer mecanismo, la unión resulta de la interacción de la proteína PAC

del *S. mutans* con las proteínas de la película adquirida sobre la superficie dental. Adicionalmente, esta proteína no solo es importante en la adhesión del microorganismo a la glicoproteína de la saliva (2,3), sino que también influencia la formación de la biopelícula dental (4), la promoción de la agregación plaquetaria (5) y la invasión bacteriana de la dentina dependiente del colágeno (6).

La PAC pertenece a un grupo de proteínas del grupo de *Streptococcus* A y B denominadas AgI/II que se caracterizan porque su tamaño está en el rango entre 140 y 180 kDa. Los miembros de esta familia de proteínas contienen entre 1310 y 1653 aminoácidos que presentan en su secuencia primaria varias regiones conservadas que inician con el motivo señal en el terminal amino importante en la secreción. Le sigue la región A (rica en alanina) que se caracteriza por tener 3-4 repeticiones de alanina con 82 residuos cada una y un contenido de 23-30 % de alanina. La región V contigua (la más variable) presenta una forma globular de hoja  $\beta$  en pliegue de sándwich. Enseguida viene la región P (rica en prolina) que presenta 3-4 repeticiones de prolina cada una de 39 residuos con 35 % de contenido de prolina. A continuación se observa la zona más conservada en el terminal carboxilo con el motivo LPxTG sortasa, que es la responsable de la unión covalente al peptidoglicano de la pared celular. En toda la extensión de la proteína se presentan zonas de alta y baja afinidad para la unión a la aglutinina salivar (SAG), complejo de glicoproteínas que sirve como receptor humano para Ag I/II de *S. mutans*, el cual es secretado por las glándulas salivares como parte del fluido salivar. Su principal componente es el receptor de la glicoproteína de 340 kDa conocido como gp340 (7-9).

La proteína PAC tiene un peso molecular entre 185 y 190 kDa y contiene un péptido señal ubicado en los residuos (1-38). Dentro de su estructura se pueden observar dos regiones repetitivas: la primera se localiza hacia el amino-terminal y se le conoce como región A o rica en alanina. Se extiende desde el residuo Thr 219 hasta el Lys 464. De los 246 residuos, 82 son alanina. En ella se encuentran las regiones de mayor interés para el diseño de la vacuna anticaries, que son las comprendidas entre los residuos (301-319) y (365-377) (10,11). Se ha observado que el último residuo es antigénico, inmunogénico y presenta epítopes T y B; es reconocido por varias cepas de ratón, y puede unirse a moléculas DR en humanos: DR5/2(DRB1\*1101/\*1501), DR9/2(DRB1\*0901/\*1501) y DR8/9(DRB1\*08032/\*0901) (12). Además, su se-

cuencia es similar a la secuencia de PAg<sub>(364-382)</sub>, PAg<sub>(365-376)</sub> y PAg<sub>(292-309)</sub> de *S. sobrinus*, y a varias secuencias de SSP-5 de *S. sanguis* (13) con los cuales presenta reacción cruzada.

Este péptido posee epítopes T, es decir, puede estimular los linfocitos para desencadenar mecanismos de la respuesta específica. Básicamente, los antígenos son tomados por las células presentadoras de antígenos (CPA) y son procesados para ser presentados conjuntamente con los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase II a los linfocitos T (LT), especialmente los CD4+, y de clase I a los linfocitos T CD8+.

Estos LT activados se pueden clasificar de acuerdo con el perfil de citocinas que originan dos clases de respuesta inmune: celular por los LTH1 y humoral por los LTH2. Entre las citocinas liberadas por los LTH1 están el INFg, la IL-2 y el TNFa, que activan otras células para que generen defensa por mecanismos de citotoxicidad. Los LTH2 sintetizan IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 que, a través de receptores específicos, actúan sobre los linfocitos B para que, una vez activados, se conviertan en células plasmáticas productoras de anticuerpos específicos para la neutralización del antígeno que originó el proceso. Un ejemplo es el péptido PAc<sub>(365-377)</sub>, que posee epítopes B y genera la respuesta de memoria para el mismo microorganismo (14).

La mayoría de estudios realizados con péptidos sintéticos derivados de la proteína PAc se enfocan en la respuesta inmune humoral, especialmente para la inmunoglobulina A (IgA) salival y la inmunoglobulina G (IgG) sérica. Dichos estudios cuantifican la unión de estos anticuerpos (de ratones inmunizados o humanos naturalmente sensibilizados) con cada uno de los péptidos en estudio para la determinación de epítopes B (10-13,15-19). En cuanto a la respuesta inmune celular, se observa linfoproliferación de células T para determinar epítopes T, pero el perfil de citocinas que se sintetizan como producto de esta respuesta no se ha tenido en cuenta. Solo se reportan en la literatura trabajos sobre respuesta inmune celular específica con la respectiva producción de citocinas que utilizan *S. mutans* completo (20-23), la proteína PAc completa (24) y péptidos de otros factores de virulencia como GTF-I<sub>(1301-1322)</sub> (25).

A partir de la mayoría de los estudios se puede inferir que este microorganismo es un fuerte inductor de IL-12, INF-g, TNFa, IL-6 y pocas IL-2, IL-4 e IL-10 (21), con un tipo de respuesta que se inclina hacia T1 (23). Algunos

estudios realizados por varios grupos han mostrado que el *S. mutans* induce una potente respuesta de INF-g en cultivo de células mononucleares de sangre periférica, con una proporción reducida de CD4/CD8 con predominio de células TCD8+ e inhibición en la producción de IL-2 (20,21,23,26).

Al saber que la respuesta inmune efectora depende del tipo de citocina que se sintetice frente a un proceso de activación antigénica y teniendo en cuenta la importancia del péptido PAc<sub>(365-377)</sub> en la búsqueda de un antígeno vacunal, en este trabajo se detectó la síntesis de citocinas intracelulares INF-g e IL-2 (perfil TH1), IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (perfil TH2) por los LTCD4+ de sangre periférica de humanos naturalmente sensibilizados activados por el péptido antigénico vacunal PAc<sub>(365-377)</sub>. También se detectaron las concentraciones de anticuerpos IgA e IgG salivales y séricos específicos para el péptido y establecer la relación entre la respuesta de individuos con caries activa, historia de caries y libres de caries, que podría dar razón a la resistencia a la enfermedad en un porcentaje bajo de la población.

La hipótesis planteada para este estudio fue que en los individuos libres de caries, la respuesta de memoria frente al péptido PAc<sub>(365-377)</sub> de *S. mutans* está mediada por linfocitos T CD4+ con producción de citocinas del perfil TH2. Ella induce la producción de anticuerpos IgA e IgG que bloquean la unión inicial de *S. mutans* a la superficie dental. El objetivo general del trabajo fue relacionar la respuesta inmune humoral mediada por IgA e IgG local y sistémica y celular mediada por los LTCD4+ y las citocinas INF-g e IL-2 (perfil TH1), IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (perfil TH2) frente al péptido PAc<sub>(365-377)</sub> en presencia o ausencia de caries dental.

Uno de los grandes inconvenientes para conseguir el antígeno vacunal que genere protección es que, a diferencia de los microorganismos contra los cuales la vacunación ha sido un éxito, el *S. mutans* hace parte de la microflora oral. Esto quiere decir que su prolongado contacto con los tejidos bucales induce una variedad de respuestas a través del sistema inmune secretor local y el sistémico. Además, la respuesta inmune previa en los individuos puede modificar el comportamiento del sistema inmune ante los antígenos vacunales. Por lo tanto, encontrar si existe esta diferencia permitirá modular la respuesta inmune de los individuos susceptibles, para inducir una respuesta inmune protectora que le permita liberarse de la enfermedad. Además de buscar nuevos antígenos vacunales para prevenir la caries dental, se pretende

mejorar la calidad de vida de la población mundial, en especial de países en los que las medidas preventivas todavía no llegan al 100 % de la población.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para cumplir con los objetivos propuestos, se diseñó un estudio observacional descriptivo de corte transversal.

### Población y muestra

De la población de pacientes que acuden a las clínicas de la Facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá, Colombia, se tomaron 30 muestras correspondientes a tres tipos de personas: 10 sin caries dental, los cuales se identificaron como libres de caries (LC); 10 con historia de caries (HC), con lesiones restauradas, sin presencia de caries activa, y 10 pacientes con caries activa (CA), por lo menos 2 lesiones cariosas en boca. La razón por la cual se distribuyeron los pacientes con experiencia de caries en dos grupos diferentes es que estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación han mostrado que el número de *S. mutans* en la saliva de pacientes con lesiones activas es significativamente mayor que los que se encuentran en pacientes con lesiones tratadas (datos en proceso de publicación). Esto permite suponer que las variaciones en el tipo de respuesta inmune entre individuos dependen de la presencia del microorganismo y no de la resistencia natural a la enfermedad.

El tamaño de la muestra se calculó utilizando el programa estadístico Power and Precision para Kruskal-Wallis, con un poder de 0,8 y un error alfa de 0,005. Después del examen oral y clasificación del índice de dientes cariados, obturados o perdidos (COP), se tomaron muestras de sangre anticoagulada con heparina y sin anticoagulante, previa lectura y firma del consentimiento informado por parte de los pacientes o sus acudientes. Como criterios de inclusión se tuvieron en cuenta que los pacientes presentaran dentición permanente, sin afectación sistémica y que no se hubieran sometido a terapia preventiva con flúor o sellantes. Se excluyeron aquellos individuos que no aceptaron firmar el consentimiento informado o que fueran edéntulos. Excepto por la presencia o no de caries, todos los participantes estaban sistémicamente sanos.

### Consideraciones éticas

Este estudio corresponde a la categoría de investigación con riesgo mínimo, de acuerdo con las normas científicas, técnicas y administrativas para la inves-

tigación en salud, artículo 11, capítulo 1, registradas en la Resolución 008430 de 1993, del Ministerio de Salud de la República de Colombia. El consentimiento informado fue diseñado teniendo en cuenta esta resolución y las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación y Experimentación Biomédica en Seres Humanos de la Declaración de Helsinki.

### Péptido sintético y antígenos

En este estudio se utilizó el péptido PAC<sub>(365-377)</sub> con la secuencia TYEALKQYEADL y un peso molecular de 1514,7 g/mol. Este péptido se sintetizó con el método T-Boc en la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (Fidic). La cromatografía líquida de alto rendimiento y la espectrometría de masas se llevaron a cabo para purificar y analizar masas y aminoácidos, respectivamente. La pureza del péptido fue del 92,9 %. El péptido fue diluido en dimetilsulfóxido al 10 % y agua destilada estéril en una concentración de 2 mg/ml. Se utilizaron 25 µg/ml para estimular  $1 \times 10^6$  células/ml. Como control positivo se utilizó la enterotoxina B del *Staphylococcus aureus* (Sigma®) en una concentración de 3,75 µg/ml para  $1 \times 10^6$  células/ml, previa estandarización (27). Como control negativo se tomaron  $1 \times 10^6$  células/ml, incubadas en las mismas condiciones y en el mismo tiempo de las células estimuladas con el enterotoxina estafilocócica B y el péptido sintético PAC<sub>(365-377)</sub>.

### Estimulación antígeno-específica de células mononucleares de sangre periférica

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) fueron purificadas de muestras de sangre heparinizada por gradiente de densidad por Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences®). Se cultivó una concentración final de  $1 \times 10^6$  células/ml en medio RPMI (del Roswell Park Memorial Institute), suplementado con 25 mmol de amortiguador HEPES, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 10 % de suero fetal bovino (SFB) a 37 °C con 5 % CO<sub>2</sub> durante 10 horas. Además de los antígenos, para la activación se usaron los anticuerpos coestimuladores CD28 (1 µg/ml) y CD49d (1 µg/ml) (Becton Dickinson®). La brefeldina A (BD) (2 µg/ml) fue adicionada. Al final de la incubación, se realizaron dos lavados con PBS, PBS más EDTA (5 nmol) y amortiguador de lavado (PBS-0,5 % suero bovino fetal, 0,02 % azida de sodio). Después de los lavados, se procedió a realizar la marcación extra e intracelular.

### Marcación extra e intracelular

Las poblaciones celulares activadas se determinaron mediante el péptido sintético PAC<sub>(365-377)</sub> por citometría

de flujo (28,29). Las células estimuladas y no estimuladas se resuspendieron en 200  $\mu$ l de amortiguador FACS (PBS pH 7,6; 1 % SFB y 0,09 % de azida de sodio), se agregaron los anticuerpos específicos contra los marcadores de superficie CD3 FITC, CD4 PercPe y CD69 APC (Becton Dickinson®), durante 15 minutos a 4 °C en la oscuridad. Las células se fijaron y permeabilizaron para la marcación intracelular, siguiendo el protocolo indicado en el estuche Cytofix/Cytoperm (Becton Dickinson®). Se utilizaron los anticuerpos anticitocinas IFN-g PE, IL-2 PE, IL-4 PE, IL-5 PE, IL-10 PE e IL-13 PE con sus respectivos control de isotipo IgG2b PE de ratón (para IFN-g), IgG1 PE de ratón (para IL-2 e IL-4), IgG2a de rata (para IL-10) e IgG1 PE de rata (para IL-13) (Becton Dickinson®). Finalmente, las células se lavaron y fijaron con paraformaldehído al 2 % para el análisis por citometría.

### Análisis por citometría de flujo

Una vez marcadas las células, estas fueron adquiridas en un citómetro de flujo FACScalibur (BD Immunocytometry Systems®) y analizadas por medio del programa Cell Quest. La forma de adquisición y análisis de los resultados fue igual para todas las muestras a partir de la selección de células CD3+/CD4+/CD69 o CD3+/CD8+/CD69 (los valores de las células CD8+ fueron considerados de la población CD3+CD4-). A partir de estas regiones se obtuvieron los porcentajes de células citocina positivas (+). El número de eventos adquiridos en la región de interés fue de 50.000 por tubo para las células sin estimular y las células estimuladas con el péptido.

### Detección de anticuerpos IgA e IgG salivales anti PAC<sub>(365-377)</sub>

Se sensibilizaron placas de 96 pozos (Costar-Subotect®) con 100  $\mu$ l de péptido sintético PAC<sub>(365-377)</sub> (10  $\mu$ g/ml) diluido en amortiguador carbonato pH 9,6, por tres horas a 37 °C y toda la noche a 4 °C. La placa se lavó 3 veces con PBS-Tween al 0,05 % y se bloqueó con leche descremada al 5 %. Posterior a un nuevo lavado, se adicionaron 100  $\mu$ l de las muestras de saliva concentrada y de suero diluidas con PBS 1:5 para IgA y 1:20 para IgG (previa estandarización). Después de la incubación por una hora a 37 °C y de un nuevo lavado, los anticuerpos unidos fueron detectados por la adición de 100  $\mu$ l de anti-IgA (1:2500) y anti-IgG humanas (1:7500) conjugados con fosfatasa alcalina. Después de una hora a 37 °C, se agregaron 100  $\mu$ l de la solución de sustrato p-nitrofenilfosfato 1 mg/ml (SIGMA) por 30 min a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción con NaOH 3 M y se leyeron las absorbancias en un espectrofotómetro con una longitud

de onda de 405 nm. Los valores se reportan como unidades arbitrarias de absorbancia.

### Análisis de la información

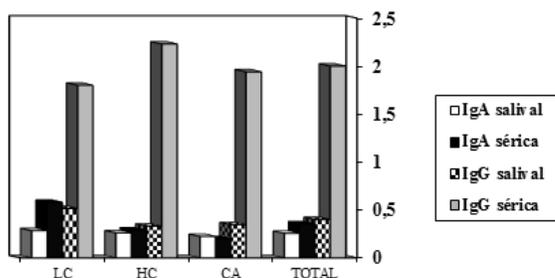
Como no hay antecedentes del comportamiento normal de las variables contempladas en este trabajo, se utilizó estadística no paramétrica. Para determinar el perfil de citocinas producido por los LTCD4+ y los LTCD8+ estimulados con el péptido PAC y la diferencia de repuesta en los perfiles se realizó una prueba estadística de chi cuadrado ( $\chi^2$ ), con un error alfa de 0,05. Para comparar la diferencia en la producción de cada citocina (nivel de medición ordinal), por linfocitos T activados con el péptido PAC<sub>(365-377)</sub>, obtenidos de sangre periférica de individuos con caries activa, historia de caries y libres de caries (nivel de medición nominal) y en las cantidades de anticuerpos específicos, se utilizó la prueba H de Kruskal-Wallis con un nivel de significancia del 0,05, para corregir el aumento en el error de tipo alfa por los *post hoc* posteriores. Para observar la asociación entre variables en pares, se usó la prueba U de Mann-Whitney. La prueba de Wilcoxon se usó con el propósito de observar diferencias entre las subpoblaciones de los linfocitos con respecto a la producción de cada citocina y se presentan las distribuciones intercuartílicas.

## RESULTADOS

### Detección de anticuerpos IgA e IgG séricos y salivales específicos para PAC<sub>(365-377)</sub>

Los resultados mostraron que hay IgA e IgG específicas contra el péptido PAC tanto en saliva como en suero en todos los pacientes estudiados. Como sucede con la mayoría de eventos biológicos, la variabilidad entre individuos es muy alta, que se refleja en las grandes desviaciones estándar. En general, el promedio de IgG fue mayor que el de IgA, tanto en saliva como en suero. Con respecto a sus concentraciones en los diferentes grupos, no se encontraron diferencias significativas; sin embargo, los valores más altos de IgA sérica e IgG salival se hallaron en el grupo de individuos libres de caries, mientras que el grupo con los valores más altos de IgG sérica fue historia de caries (figura 1).

FIGURA 1  
 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IGA E IGG SÉRICOS Y  
 SALIVALES ESPECÍFICOS PARA PAC<sub>(365-377)</sub>



Nota: las barras representan los promedios de las unidades arbitrarias de absorbancia obtenidas de muestras de saliva y suero para los grupos de estudio: libres de caries (LC), historia de caries (HC) y caries activa (CA).

### Análisis de células T PAC<sub>(365-377)</sub> específicas y producción de citocinas

El análisis de los resultados de la población total mostró que en sangre periférica hubo en promedio 587 células T CD3+/CD4+/CD69+ de memoria específicas para el péptido por cada 10.000 linfocitos T CD3+/CD4+ totales. Asimismo, la proporción de la respuesta de las células CD3+/CD8+/CD69+ fue de 538 células específicas de memoria por cada 10.000 linfocitos T CD3+/CD8+. Estos resultados muestran cómo la respuesta de memoria (LT CD69+) frente al péptido PAC<sub>(365-377)</sub> es similar para las dos poblaciones de linfocitos T. Los análisis de los porcentajes de células productoras de citocinas se hicieron sobre las poblaciones CD69+, no sobre el total de células analizadas.

Se encontraron resultados positivos para las citocinas IL-2, IL-4, IL-10, 1 IL-3 e IFN-g; pero no se observó respuesta de las células CD3+/CD4+ y CD3+/CD8+ en ninguno de los individuos de los tres grupos estudiados para IL-5. Por eso se excluyó esta citocina de los análisis de la muestra total, por grupos y por perfiles.

### Citocinas inducidas por el péptido PAC<sub>(365-377)</sub>

De todos los pacientes estudiados, los LT CD4+ de 8 individuos libres de caries, 2 con historia de caries y 4 con caries activa fueron productores de una o varias citocinas. Solo un individuo libre de caries produjo todas las citocinas. No mostraron respuesta 16 individuos.

Al comparar los individuos con respuesta por citocina entre los grupos de estudio por medio de  $\chi^2$ , se encontraron diferencias estadísticamente significativas

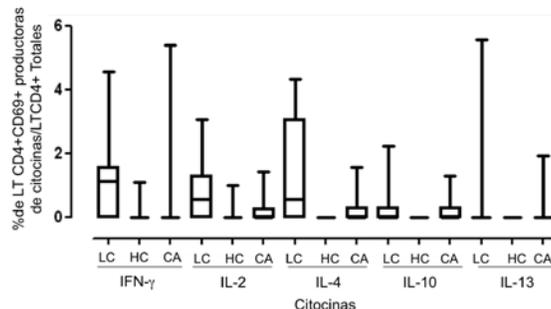
en la producción de IFN-g ( $p = 0,002$ ), IL-4 ( $p = 0,008$ ) e IL-2 ( $p = 0,04$ ), pero no para IL-10 e IL-13.

Las células T CD8+ de 4 individuos libres de caries, uno con historia de caries y 4 con caries activa mostraron respuesta. Dos individuos libres de caries fueron productores de todas las citocinas y 21 no respondieron. Al comparar los individuos con respuesta por citocina entre los grupos de estudio, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la producción de IFN-g ( $p = 0,02$ ) solamente.

### Porcentaje de células TCD4+ productoras de citocinas

El porcentaje de células TCD4+ productoras de IFN-g fue diferente para cada grupo. Fue mayor en el grupo LC al compararlo con HC ( $p = 0,008$ ) y CA ( $p = 0,02$ ) (U de Mann-Whitney). Los grupos HC y CA tuvieron una mediana de 0 y un pico máximo de 0,10 % y 5,4 %, respectivamente. No hubo diferencias entre el grupo de HC y CA. La mayoría de los individuos no mostró respuesta (figura 2).

FIGURA 2  
 FRECUENCIA DE CÉLULAS TCD4+ PRODUCTORAS DE CITOCINAS



Nota: se muestra la distribución intercuartílica de los porcentajes de células T CD4+ productoras de citocinas. Las diferencias de porcentaje de citocina entre los grupos fueron analizadas por medio de la H de Kruskal-Wallis. La comparación entre grupos se hizo con la prueba U de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).

Al analizar el porcentaje de células TCD4+ productoras de IL-2 no hay diferencias significativas entre los tres grupos ( $p = 0,07$ ). Sin embargo, al comparar los grupos LC y HC se encontraron diferencias significativas ( $p = 0,04$ ). En el grupo LC, la mediana fue de 0,57 % con un máximo de 3,04 %. La mediana de los grupos HC y CA fue de 0. El percentil 75 de los individuos CA fue de 0,25 %.

La producción de IL-4 fue diferente entre los grupos ( $p = 0,02$ ), mayor en el grupo LC que en el HC ( $p = 0,03$ ) y similar al CA ( $p = 0,12$ ). La distribución

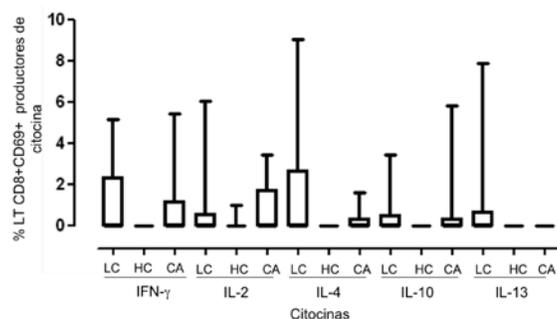
intercuartílica muestra que el grupo LC en el percentil 75 fue de 3,04 % con un máximo de 4,3 %. El grupo CA tuvo un percentil de 75 de 0,27 %. Los grupos CA y HC tuvieron una mediana de 0. Ningún individuo del grupo HC mostró respuesta.

IL-10 e IL-13 no mostraron diferencias significativas entre los grupos estudiados. El grupo HC no mostró respuesta para IL-10 e IL-13. La mediana fue 0 para las dos citocinas en todos los grupos. Para la IL-10, el percentil 75 fue de 0,30 % con un máximo de 2,01 % para LC y un percentil 75 de 0,29 % con un máximo de 1,3 % para CA. La IL-13 mostró un valor máximo en el grupo LC de 5,55 % y en CA de 1,92 % (figura 2).

### Porcentaje de células TCD8+ productoras de citocinas

El porcentaje de células TCD8+ productoras de citocinas no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. La distribución intercuartílica evidencia que la mediana de todos los grupos para la producción de citocina fue 0. El grupo HC no tuvo respuesta, excepto para IL-2 con un máximo de 1 %. El grupo de LC tendió a producir un mayor porcentaje de citocinas que el grupo CA para todas las citocinas, excepto para la IL-2, en que la respuesta fue inversa. El grupo CA no respondió para IL-13 (figura 3). Aunque se observó menor cantidad de respondedores para LTCD8+, el porcentaje de células positivas para algunas citocinas tiende a ser mayor que para los LTCD4+. Por ejemplo, en el grupo LC la IL-4 tuvo un valor máximo de 9,03 %; la IL-13, de 7,86 %, y la IL-2, de 6,2 %.

FIGURA 3  
FRECUENCIA DE CÉLULAS TCD8+  
PRODUCTORAS DE CITOCINA



Nota: se muestra la distribución intercuartílica de los porcentajes de células T CD8+ productoras de citocinas. Las diferencias de porcentaje de citocina entre los grupos fue analizada con la prueba H de Kruskal-Wallis y la comparación entre grupos se hizo con la prueba U de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).

### Comparación del porcentaje de células TCD4+ y CD8+ productoras de citocinas

Al comparar las subpoblaciones CD4+ y CD8+, no hubo diferencias significativas en el porcentaje de células positivas para ninguna citocina, en LC, HC y CA (Wilcoxon;  $p > 0,05$ ). Ambas subpoblaciones celulares tuvieron un comportamiento similar en la producción de citocinas en todos los grupos de estudio. En LC fue alta; en CA, intermedia, y en HC, baja y con tendencia a no tener respuesta, excepto en IL-2 (expresada por LTCD8+, donde la respuesta en CA fue mayor que en LC). Aunque las dos subpoblaciones poseen el mismo patrón de comportamiento, hay que resaltar que los CD4 tuvieron diferencias entre los grupos internamente para IFN-g, IL-2 e IL-4, como se describió.

### DISCUSIÓN

El estudio de la respuesta inmune frente a las diferentes proteínas importantes en la fisiopatología de la caries dental, producida por el *S. mutans*, se ha enfocado en humanos a evidenciar la respuesta de anticuerpos, especialmente de tipo IgA e IgG. Se han mostrado *in vitro* mecanismos de acción de la IgA salival que incluyen la prevención de la colonización del diente por *S. mutans* y la neutralización de algunos factores de virulencia (10). *In vivo*, en cambio, los resultados no han permitido establecer un papel protector para la respuesta humoral específica en la caries dental. La inmunidad mediada por células ha sido menos estudiada y se ha observado una mayor respuesta proliferativa de linfocitos T específicos contra *S. mutans* en individuos con menores índices de caries (30).

En la literatura disponible, las investigaciones relacionadas a la proteína PAC reportan la presencia de epítopes T y B (importantes en la inmunogenicidad) (11,15,16,30-34), respuesta linfoproliferativa frente a PAC y a péptidos derivados de esta proteína como PAC<sub>(365-377)</sub> y PAC<sub>(803-853)</sub> (24,35). No obstante, hasta la fecha no se han hallado reportes en los cuales se analice la respuesta celular y el perfil de citocinas que se sintetizan en respuesta a estos péptidos en individuos naturalmente sensibilizados. Teniendo en cuenta la importancia del tipo de citocinas que se liberan al medio como respuesta al proceso de activación antigénica, en este estudio se analizó la síntesis de citocinas intracelulares por células activadas con este péptido, candidato para usarlo como antígeno vacunal contra *S. mutans*, debido a los resultados obtenidos en el modelo animal y, en menor grado, en el modelo humano.

Con respecto a la respuesta humoral, se conoce que el centro del epítipo de células B reconocido por los anticuerpos que inhiben la unión entre PAC y los componentes salivares es -Y-----Y-, que está presente en PAC<sub>(301-319)</sub> y PAC<sub>(361-379)</sub>, en el modelo animal (12). Las últimas investigaciones realizadas con PAC<sub>(365-377)</sub> se han encaminado a estudiar formas de aumentar su inmunogenicidad. Las modificaciones más empleadas usan dos o tres copias de la unidad peptídica, repeticiones con un residuo de alanina o glicina como espaciador o sin espaciadores, repeticiones en tándem con un espaciador de alanina y una unidad peptídica elongada con KQY ubicada en la porción carboxiterminal del péptido TYEAALKQYEADLKQY, las llamadas MAP (péptido antigénico múltiple), MAP4 (4 repeticiones de la unidad peptídica unidos por lisina) y MAP8 (8 repeticiones de la unidad peptídica unidos por lisina). Se concluyó que la mejor modificación que se podría hacer a la unidad peptídica original PAC<sub>(365-377)</sub> sería la forma trimérica con espaciadores A y G en ausencia de adyuvante (18,36).

Oishi y colaboradores (37), en un estudio en ratones B10.D2 publicado en el 2001, observaron que solo la unidad peptídica trimérica indujo una cantidad significativa de anticuerpos en condiciones libres de adyuvante y que, además de los espaciadores de A y G, la monolisina o dilisinas como espaciadores fueron muy efectivos, incluso mejor que con A y G solas. Este punto es importante, ya que se sabe que, al usar pares de residuos básicos como KK, KR y RR, los cuales son un sitio de clivaje de catepsina B, una de las enzimas más importantes para el procesamiento antigénico en el contexto de moléculas de clase II, podría ayudar al mejoramiento de la presentación y procesamiento antigénico por esta vía. En el estudio concluyeron que las repeticiones en tándem con espaciadores de dilisina son muy efectivas para proveer antigenicidad de la unidad peptídica PAC<sub>(365-377)</sub>.

No se han reportado en el modelo humano investigaciones similares a las encontradas para el modelo animal con péptidos sintéticos. En esta investigación, como era de esperarse, los valores en saliva fueron menores que en suero; pero es sorprendente que las concentraciones de IgA salival son menores que las de IgG salival. Tal vez sea un reflejo de la respuesta sistémica, ya que las cantidades de IgG sérica son seis veces mayores que la IgA en el suero. Las muestras fueron de saliva completa; por lo tanto, tienen influencia de la respuesta local mediada por la IgA secretora y de la respuesta sistémica a través del fluido gingival. Sin embargo, no se encontraron diferencias en la

respuesta humoral que indiquen que la producción de anticuerpos específicos frente al péptido PAC sean protectores contra la enfermedad. Es posible que la presencia permanente de este péptido en la proteína natural del *S. mutans* conduzca a una respuesta prolongada y evidente de anticuerpos. En este estudio se confirma la presencia de epítopos B en humanos naturalmente sensibilizados.

Algunos reportes sobre estudios de proliferación y producción de citocinas frente a *S. mutans* completo o péptidos de las glucosiltransferasas como GTF-I<sub>(1301-1322)</sub> han encontrado que hay respuesta por los linfocitos T CD4+ y producción de citocinas como IFN-g principalmente (21,23,25), IL-4 e IL-10 (21) e IL-12 y TNFα (23). Estos resultados muestran que el *S. mutans* es capaz de activar la producción de citocinas asociadas especialmente con inflamación, aumento de función de monocitos y tipo de respuesta TH1, que pueden estar correlacionados con el tipo de respuesta *in vivo* (23). A pesar que los datos preliminares descritos por nuestro grupo de investigación, en los cuales se observaba una tendencia al perfil TH2 (38), después de mejorar el análisis y hacer una corrección estadística, estos reportes de la literatura coinciden con lo encontrado en este estudio, en el que el péptido induce una respuesta variada de citocinas. Se hallaron diferencias significativas en el número de LTCD4+ CD69+ productores de IFN-g, IL-2 e IL-4, y el número de individuos con respuesta de estas citocinas fue mayor en el grupo de libres de caries. No obstante, a diferencia de lo reportado para *S. mutans* completo, la respuesta no se cataloga como tipo TH1, sino como TH0.

Otros estudios mostraron que no solamente esta bacteria grampositiva estimula células T CD4+ y células NK, sino que también estimula de forma muy importante las células TCD8+ con su respectiva secreción de citocinas, con mayor proporción de IFN-g (20). Además del IFN-g, se observó en menor proporción la expresión de mRNA para IL-4 e IL-10, lo que sugiere un perfil de preferencia de tipo T1 (21). Asimismo, en el presente estudio se observó que los sujetos libres de caries tuvieron respuesta de LTCD8+ CD69+ de IFN-g, es decir, con una preferencia por un perfil T1; pero el porcentaje de células TCD8+ productoras de citocinas no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para ninguna citocina. Estos respondieron a IL-10, IL-4 y, en menor porcentaje, a IL-13, lo que la hace una respuesta variada.

Por otro lado, en la literatura se describe que la presencia de *S. mutans* induce una proporción reducida

de CD4/CD8 con predominio de células TCD8+ en células mononucleares de sangre periférica (20). Ello es contrario a lo observado en este estudio, donde dicha proporción de células TCD4+ vs. TCD8+ y el porcentaje de respuesta fueron muy similares entre los dos grupos de linfocitos frente al péptido PAC<sub>(365-377)</sub> de *S. mutans*. Asimismo, el patrón de respuesta de células productoras de citocina fue igual para las dos subpoblaciones de linfocitos T: mayor en LC, seguido por CA y menor en HC. Fue diferente en LTCD8+ productores de IL-2, donde fue mayor la producción por los individuos con CA, luego LC y, por último, HC. El grupo HC tiende a mostrar menor respuesta, posiblemente por la tolerancia oral o el agotamiento clonal de células T y B generados por la persistencia crónica de microorganismos orales, como se ha descrito previamente (39).

Las células TCD3+/CD4+ y TCD3+/CD8+ se dividieron, con base en su expresión de CD4 y CD8 y según las citocinas que ellas secretan, en T0: IL-2, IFN $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13; T1: IL-2, IFN-g y TNF-a, y T2: IL-2: IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Dependiendo del perfil involucrado, las células T pueden cumplir un importante papel en ambas respuestas celular y humoral para ambos patógenos intracelulares y extracelulares (20). En este estudio se observaron cuatro perfiles de citocinas diferentes en respuesta al péptido PAC<sub>(365-377)</sub> para cada uno de los linfocitos T CD3+/CD4+ y T CD3+/CD8+: T0, T1, T2. En el cuarto grupo se incluyeron las células activadas, pero sin secreción de las citocinas estudiadas (no secretores).

Entre los resultados esperados en esta investigación se pretendía encontrar una mayor respuesta de un perfil T2 frente al péptido PAC<sub>(365-377)</sub> en los individuos libres de caries. Ello podría explicar la resistencia natural de la enfermedad, dado que estas citocinas, a través de receptores específicos, actúan sobre los linfocitos B. Estos activados se convertirían en células plasmáticas productoras de anticuerpos específicos para neutralizar el antígeno que originó el proceso. Se puede mencionar como ejemplo el péptido PAC<sub>(365-377)</sub> que, como se ha dicho, posee epítopes B, lo que genera la respuesta de memoria frente al mismo microorganismo (14).

Los datos obtenidos en esta investigación conducen a proponer que en individuos naturalmente sensibilizados se encuentra una respuesta de memoria al péptido PAC<sub>(365-377)</sub> y que, en general, para los LT no hay un tipo de perfil definido de citocinas en respuesta a dicho péptido. No obstante, predomina la respuesta

de tipo TH0 para los LTCD4+ y T1 para los LTCD8+ en los sujetos libres de caries y que citocinas como el IFN-g, la IL-4 o la IL-2, entre otras, también pudieran inducir cambio de clases en el LB para la consecuente producción de anticuerpos de tipo IgA e IgG (40). Esta respuesta celular no tiene relación con la ausencia o el estado de la enfermedad, dado que no se encontraron diferencias en la respuesta humoral entre los grupos de estudio que indiquen que la producción de anticuerpos específicos IgA salival e IgG sérica frente al péptido PAC sean protectores contra la caries dental.

Senpuku y colaboradores reportaron en 1998 que el péptido PAC<sub>(365-377)</sub> contiene epítopes T que activan una respuesta de células mononucleares de sangre periférica en humanos. Sin embargo, la respuesta está restringida por las moléculas del CMH (12). De igual forma, el mismo grupo reporta que este péptido es capaz de activar células T en ratones y que, además, estas células reaccionan cruzadamente en presencia de la proteína completa (15).

Las diferencias poblacionales en la respuesta inmune frente a un mismo antígeno pueden explicarse por el polimorfismo de las moléculas del CMH que participan en la activación de las células T. En la literatura se ha reportado la relevancia de las moléculas del CMH, debido a que las células pueden reconocer epítopes T, dependiendo de los motivos de unión a las moléculas CMH clase II como son H-2 en modelo animal y HLA-DR en modelo humano (19,24,35). La afinidad entre la molécula CMH y el péptido afecta la reactividad de la célula T. Se conoce que el péptido PAC<sub>(365-377)</sub> presenta motivos de unión para las moléculas HLA-DR5, DR6 y DR8. Para los otros DR la unión es débil (19). En esta investigación no se analizaron las moléculas del CMH de los individuos estudiados, pues si se pretende encontrar un péptido vacunal óptimo, este debe generar una respuesta en la gran mayoría de la población sin que dependa de la presencia de alguna molécula de HLA determinada.

Las células T CD8+ reconocen antígenos en el contexto del CMH de clase I, lo cual se asume para ser inaccesible a antígenos exógenos solubles. Sin embargo, se ha reportado un cambio en el camino del procesamiento del antígeno, ya que otros antígenos diferentes a péptidos sintetizados endógenamente se pueden presentar y procesar en asociación con el CMH de clase I. Un estudio publicado en 1991 muestra que en monos inmunizados con antígenos estreptocócicos solubles se genera una respuesta proliferativa específica y una producción de anticuerpos restringi-

da por clones de células TCD8+ (30). Los resultados observados en este trabajo muestran que este péptido PAC<sub>(365-377)</sub> fue reconocido por el 0,054 % de los LT CD3+/CD8+ y como producto de este reconocimiento hubo producción de citocinas.

Por otro lado, en este estudio se encontró que 16 pacientes no mostraron respuesta por LTCD4+ y 21 por LTCD8+. La mayoría de dichos individuos estaba dentro del grupo con HC. Esta ausencia de respuesta se explica por el modelo estructural de Larson y colaboradores, que ilustra cómo la conformación de la molécula a manera de entorchado o plegamiento hace que cambie la orientación de aminoácidos y, de alguna manera, estos no sean expuestos (zona coincidente con el péptido en estudio) y reconocidos por el sistema inmunológico de muchos individuos. Esto podría ser un mecanismo de evasión del microorganismo (36), por ello la persistencia de la enfermedad.

Los resultados de este estudio sugieren que PAC<sub>(365-377)</sub>, cuya secuencia es TYEALKQYEDL con epítopes T (como se encontró en esta investigación) y B en estado natural, no es un péptido vacunal efectivo en humanos, dada la divergencia en las respuestas encontradas y al hecho de que, aun cuando la respuesta predominante es de tipo TH0 en LTCD4+ y T1 en LTCD8+, no hay una correlación con la producción de anticuerpos protectores. Se sustenta esto en que los anticuerpos se observaron de igual manera en los pacientes con la enfermedad, lo que indica su poca importancia en la protección contra la caries dental.

Tal vez estudios conducentes a aumentar la inmunogenicidad y a probar cambios estructurales-conformacionales en el péptido lleven a obtener mejores posibilidades de respuesta al utilizar este antígeno vacunal. Por otro lado, ya que los resultados publicados en estudios con péptidos sintéticos en modelo animal y humano no reportan ser suficientemente inmunogénicos, se están diseñando otras estrategias para incrementar la respuesta inmune como vacunas anticaries recombinantes o de ADN, con la proteína completa rPac, con los otros factores de virulencia como GLU y CAT, y usando adyuvantes diferentes a los convencionales, como la flagelina o cosuministrando a dichas vacunas genes de citocinas quimiotácticas como la IL-6 o la ccl19 (41-46).

## CONCLUSIONES

Los resultados descritos en esta investigación conducen a proponer que en individuos naturalmente sensibilizados se encuentra una respuesta de memoria al péptido PAC<sub>(365-377)</sub>, con producción de citocinas y anticuerpos tipo IgA e IgG salivales y séricos específicos contra el péptido. Sin embargo, esta respuesta no es protectora, pues no se observó una correlación entre el tipo de respuesta celular y humoral que hiciera la diferencia entre pacientes con caries e individuos resistentes a la enfermedad.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue patrocinado por la Vicerrectoría Académica de la Pontificia Universidad Javeriana y la Fundación para la Promoción de la Investigación y la Tecnología “Banco de la República”. Se agradece a la doctora Gloria Cristina Moreno Abello, por su asesoría en el análisis estadístico de los resultados.

## REFERENCIAS

1. República de Colombia, Ministerio de Salud. III Estudio Nacional de Salud Bucal ENSAB III. Tomo VII. 1a ed. Bogotá: República de Colombia, Ministerio de Salud; 1999.
2. Crowley PJ, Brady LJ, Piacentini DA, Bleiweis AS. Identification of a salivary agglutinin-binding domain within cell surface adhesin P1 of *Streptococcus mutans*. Infect Immun. 1993 Apr; 61(4): 1547-52.
3. Munro GH, Evans P, Todryk S, Buckett P, Kelly CG, Lehner T. A protein fragment of streptococcal cell surface antigen I/II which prevents adhesion of *Streptococcus mutans*. Infect Immun. 1993 Nov; 61(11): 4590-8.
4. Pecharki D, Petersen FC, Assev S, Scheie AA. Involvement of antigen I/II surface proteins in *Streptococcus mutans* and *Streptococcus intermedius* biofilm formation. Oral Microbiol Immunol. 2005 Dec; 20(6): 366-71.
5. Matsumoto-Nakano M, Tsuji M, Inagaki S, Fujita K, Nagayama K, Nomura R, Ooshima T. Contribution of cell surface protein antigen c of *Streptococcus mutans* to platelet aggregation. Oral Microbiol Immunol. 2009 Oct; 24(5): 427-30.
6. Love RM, McMillan MD, Park Y, Jenkinson HF. Coinvasion of dentinal tubules by *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus gordonii* depends upon binding specificity of streptococcal antigen I/II adhesin. Infect Immun. 2000 Mar; 68(3): 1359-65.
7. Zhang S, Green NM, Sitkiewicz I, Lefebvre RB, Musser JM. Identification and characterization of an antigen I/II family protein produced by group A *Streptococcus*. Infect Immun. 2006 Jul; 74(7): 4200-13.

8. Brady LJ, Maddocks SE, Larson MR, Forsgren N, Persson K, Deivanayagam CC, Jenkinson HF. The changing faces of *Streptococcus* antigen I/II polypeptide family adhesins. *Mol Microbiol*. 2010 Jul; 77(2): 276-86.
9. Jenkinson HF, Demuth DR. Structure, function and immunogenicity of streptococcal antigen I/II polypeptides. *Mol Microbiol*. 1997 Jan; 23(2): 183-90.
10. Takahashi I, Okahashi N, Matsushita K, Tokuda M, Kanamoto T, Munekata E, Russell MW, Koga T. Immunogenicity and protective effect against oral colonization by *Streptococcus mutans* of synthetic peptides of a streptococcal surface protein antigen. *J Immunol*. 1991 Jan; 146(1): 332-6.
11. Okahashi N, Takahashi I, Nakai M, Senpuku H, Nisizawa T, Koga T. Identification of antigenic epitopes in an alanine-rich repeating region of a surface protein antigen of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun*. 1993 Apr; 61(4): 1301-6.
12. Senpuku H, Yanagi K, Nisizawa T. Identification of *Streptococcus mutans* PAC peptide motif binding with human MHC class II molecules (DRB1\*0802, \*1101, \*1401 and \*1405). *Immunol*. 1998 Nov; 95(3): 322-30.
13. Kawashima M, Hanada N, Hamada T, Tagami J, Senpuku H. Real-time interaction of oral streptococci with human salivary components. *Oral Microbiol Immunol*. 2003 Aug; 18(4): 220-5.
14. Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell*. 1994 Jan; 76(2): 241-51.
15. Senpuku H, Miyauchi T, Hanada N, Nisizawa T. An antigenic peptide inducing cross-reacting antibodies inhibiting the interaction of *Streptococcus mutans* PAC with human salivary components. *Infect Immun*. 1995 Dec; 63(12): 4695-703.
16. Senpuku H, Nakai M, Koga T, Hanada N, Nisizawa T. Identification of a repeated epitope recognized by human serum antibodies in a surface protein antigen of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol*. 1996 Apr; 11(2): 121-8.
17. Senpuku H, Kato H, Takeuchi H, Noda A, Nisizawa T. Identification of core B cell epitope in the synthetic peptide inducing cross-inhibiting antibodies to a surface protein antigen of *Streptococcus mutans*. *Immunol Invest*. 1997 Aug-Dec; 26(5-7): 531-48.
18. Kato H, Takeuchi H, Oishi Y, Senpuku H, Shimura N, Hanada N, Nisizawa T. The immunogenicity of various peptide antigens inducing cross-reacting antibodies to a cell surface protein antigen of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol*. 1999 Aug; 14(4): 213-9.
19. Nomura Y, Eto A, Hanada N, Senpuku H. Identification of the peptide motifs that interact with HLA-DR8 (DRB1\*0802) in *Streptococcus mutans* proteins. *Oral Microbiol Immunol*. 2002 Aug; 17(4): 209-14.
20. Plitnick LM, Banas JA, Jelley-Gibbs DM, O'Neil J, Christian T, Mudzinski SP, Gosselin EJ. Inhibition of interleukin-2 by a Gram-positive bacterium, *Streptococcus mutans*. *Immunol*. 1998 Dec; 95(4): 522-8.
21. Hahn CL, Best AM, Tew JG. Cytokine induction by *Streptococcus mutans* and pulpal pathogenesis. *Infect Immun*. 2000 Dec; 68(12): 6785-9.
22. Engels-Deutsch M, Pini A, Yamashita Y, Shibata Y, Haikel Y, Schöller-Guinard M, Klein JP. Insertional inactivation of pac and rmlB genes reduces the release of tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-8 induced by *Streptococcus mutans* in monocytic, dental pulp, and periodontal ligament cells. *Infect Immun*. 2003 Sep; 71(9): 5169-77.
23. Jiang Y, Magli L, Russo M. Bacterium-dependent induction of cytokines in mononuclear cells and their pathologic consequences in vivo. *Infect Immun*. 1999 May; 67(5): 2125-30.
24. Brookes RH, Rayfield LS, Bergmeier LA, Shepherd PS. Isolation of a human T cell line specific for a streptococcal cell surface antigen. *FEMS Microbiol Immunol*. 1991 Jan; 3(3): 177-83.
25. Roa NS, Gomez SI, Rodriguez A. Cytokines produced by CD4+ T cells against a synthetic GTF-I(1301-1322) peptide of *Streptococcus mutans* in naturally sensitized humans. *Acta Odontol Latinoam*. 2008 Jan; 21(2): 153-8.
26. Chia JS, Lien HT, Hsueh PR, Chen PM, Sun A, Chen JY. Induction of cytokines by glucosyltransferases of streptococcus mutans. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002 Jul; 9(4): 892-7.
27. Hermann C, von Aulock S, Graf K, Hartung T. A model of human whole blood lymphokine release for in vitro and ex vivo use. *J Immunol Methods*. 2003 Apr; 275(1-2): 69-79.
28. Maino VC, Picker LJ. Identification of functional subsets by flow cytometry: intracellular detection of cytokine expression. *Cytometry*. 1998 Nov; 34(5): 207-15.
29. Jaimes MC, Rojas OL, Gonzalez AM, Cajiao I, Charpillenne A, Pothier P, Kohli E, Greenberg HB, Franco MA, Angel J. Frequencies of virus-specific CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes secreting gamma interferon after acute natural rotavirus infection in children and adults. *J Virol*. 2002 Apr; 76(10): 4741-9.
30. Lehner T, Walker P, Smerdon R, Childerstone A, Bergmeier LA, Haron J. Identification of T- and B-cell epitopes in synthetic peptides derived from a *Streptococcus mutans* protein and characterization of their antigenicity and immunogenicity. *Arch Oral Biol*. 1990 Jan; 35 Suppl: 39S-45S.
31. Matsushita K, Nisizawa T, Nagaoka S, Kawagoe M, Koga T. Identification of antigenic epitopes in a surface protein antigen of *Streptococcus mutans* in humans. *Infect Immun*. 1994 Sep; 62(9): 4034-42.
32. Senpuku H, Iizima T, Yamaguchi Y, Nagata S, Ueno Y, Saito M, Hanada N, Nisizawa T. Immunogenicity of peptides coupled with multiple T-cell epitopes of a surface protein antigen of *Streptococcus mutans*. *Immunol*. 1996 Jun; 88(2): 275-83.
33. Kelly CG, Todryk S, Kendal HL, Munro GH, Lehner T. T-cell, adhesion, and B-cell epitopes of the cell surface *Streptococcus mutans* protein antigen I/II. *Infect Immun*. 1995 Sep; 63(9): 3649-58.

34. Walker PR, Smerdon R, Haron J, Lehner T. Mapping major and minor T-cell epitopes in vitro and their immunogenic or tolerogenic effect in vivo in non-human primates. *Immunol.* 1993 Oct; 80(2): 209-16.
35. Childerstone A, Haron J, Lehner T. The reactivity of naturally sensitized human CD4 cells and IgG antibodies to synthetic peptides derived from the amino terminal sequences of a 3800 MW *Streptococcus mutans* antigen. *Immunol.* 1990 Feb; 69(2): 177-83.
36. Gómez SI, Barrientos S. Antígenos usados en vacunas contra la caries dental. *Univ Odontol.* 2013 Jul-Dic; 32(69): 73-82.
37. Oishi Y, Onozuka A, Kato H, Shimura N, Imai S, Nisizawa T. The effect of amino acid spacers on the antigenicity of dimeric peptide--inducing cross-reacting antibodies to a cell surface protein antigen of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol.* 2001 Feb; 16(1): 40-4.
38. Roa NS, Rodríguez A. Inmunidad Celular y humoral frente a microorganismos cariogénicos y sus factores de virulencia en caries dental en humanos naturalmente sensibilizados. *Univ Odontol.* 2013 Jul-Dic; 32(69): 61-72.
39. Suárez LJ BM, Salazar J, Roa NS, Fonseca AP, Cuellar A, Rodríguez A. Comparación de la síntesis de interleucina- 1B por monocitos y linfocitos B estimulados con lipopolisacárido en pacientes con enfermedad periodontal. *Univ Odontol.* 2012 Ene-Jun; 31(66): 103-13.
40. Estes DM. Regulation of IgA responses in cattle, humans and mice. *Vet Immunol Immunopathol.* 2010 Nov; 138(4): 312-7.
41. Sun Y, Shi W, Yang JY, Zhou DH, Chen YQ, Zhang Y, Yang Y, He BX, Zhong MH, Li YM, Cao Y, Xiao Y, Li W, Yu J, Li YH, Fan MW, Yan HM. Flagellin-PAC fusion protein is a high-efficacy anti-caries mucosal vaccine. *J Dent Res.* 2012 Oct; 91(10): 941-7.
42. Niu Y, Sun J, Fan M, Xu QA, Guo J, Jia R, Li Y. Construction of a new fusion anti-caries DNA vaccine. *J Dent Res.* 2009 May; 88(5): 455-60.
43. Okuda K, Hanada N, Usui Y, Takeuchi H, Koba H, Nakao R, Watanabe H, Senpuku H. Inhibition of *Streptococcus mutans* adherence and biofilm formation using analogues of the SspB peptide. *Arch Oral Biol.* 2010 Oct; 55(10): 754-62.
44. Barbieri DS, Tonial F, Lopez PV, Sales Maia BH, Santos GD, Ribas MO, Glienke C, Vicente VA. Antiadherent activity of *Schinus terebinthifolius* and *Croton urucurana* extracts on in vitro biofilm formation of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol.* 2014 May; 59(9): 887-96.
45. Su LK, Yu F, Li ZF, Zeng C, Xu QA, Fan MW. Intranasal co-delivery of IL-6 gene enhances the immunogenicity of anti-caries DNA vaccine. *Acta Pharmacol Sin.* 2014 May; 35(5): 592-8.
46. Yan YH, Qi SC, Su LK, Xu QA, Fan MW. Co-delivery of ccl19 gene enhances anti-caries DNA vaccine pCIA-P immunogenicity in mice by increasing dendritic cell migration to secondary lymphoid tissues. *Acta Pharmacol Sin.* 2013 Mar; 34(3): 432-40.

## CORRESPONDENCIA

Nelly Stella Roa Molina  
nelly.roa@javeriana.edu.co  
nellyroa@gmail.com

Soledad Isabel Gómez Ramírez  
soledad.gomez@javeriana.edu.co

Adriana Rodríguez Cíodaro  
arodrig@javeriana.edu.co  
aciodaro@gmail.com