

Antígenos usados en vacunas contra la caries dental

Antigens employed as potential vaccine against dental caries

73

Univ Odontol. 2013 Jul-Dic; 32(69): 73-82. ISSN 0120-4319

DOSSIER CARIES DENTAL: INVESTIGACIÓN Y CONOCIMIENTO BÁSICO

Soledad Isabel Gómez Ramírez
Odontóloga y magistra en Ciencias,
Pontificia Universidad Javeriana,
Bogotá, Colombia. Profesora asistente,
Facultad de Odontología, Pontificia
Universidad Javeriana.

Silvia Barrientos Sánchez
Odontóloga, Universidad Nacional
de Colombia, Bogotá, Colombia.
Especialista en Estomatología,
magistra en Ciencias y profesora
asistente, Pontificia Universidad
Javeriana, Bogotá, Colombia. Docente,
Universidad Nacional de Colombia.

RESUMEN

La caries dental continúa siendo un problema de salud pública mundial, a pesar de medidas como la fluorización del agua y el incremento de los planes de prevención. Desde los años sesenta, cuando se consolidó el papel microbiano en la fisiopatología, se iniciaron estudios encaminados a desarrollar una vacuna con fines preventivos. El *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), que es el principal microorganismo asociado, presenta tres antígenos importantes en la formación de la biopelícula: las glucosiltransferasas (GTF), la proteína de adhesión celular (Pac) y las proteínas fijadoras de glucanos (GBP). Estos antígenos proteicos participan en la colonización del microorganismo a la superficie del diente de diferentes formas: Pac es la responsable de la adhesión inicial a la superficie dental; las GTF, de la unión irreversible, y las GBP, de la unión a otras bacterias o coagregación. Cada una de estas proteínas ha sido estudiada en su conformación y mecanismo de acción, en búsqueda de la proteína óptima para inducir, en forma de vacuna, una respuesta inmune protectora frente a la caries. El objetivo del presente artículo es hacer un recuento de los aspectos más relevantes sobre estos antígenos y el estado actual del proceso de desarrollo de una vacuna con cada uno de ellos.

PALABRAS CLAVE

Streptococcus mutans, glucosiltransferasas (GTF), proteína de adhesión celular (Pac), proteínas de unión a glucanos (GBP), caries dental, vacuna, antígenos.

ÁREAS TEMÁTICAS

Caries dental, vacunas, salud oral, inmunología oral.

ABSTRACT

Dental caries remains a public health problem worldwide despite measures such as water fluoridation, and increased prevention plans. Since the 60's when the paper of microbial pathophysiology was consolidated, studies began to develop a vaccine for prevention purposes. *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), the main microorganism associated to dental decay have three relevant antigens in biofilm formation that are glucosyltransferases (GTFs), cell adhesion protein (Pac), and glucan binding proteins (GBP). These protein antigens involved in colonization of the microorganism to the surface of the tooth in different ways: Pac is responsible for the initial adhesion, irreversible binding GTF and GBP binding to other bacteria or coaggregation. Each of these proteins has been studied in their conformation and their mechanism of action aiming to induce optimal protein, as a vaccine, a protective immune response against caries. The aim of this review is to provide an account of the most relevant aspects of these antigens and the current status of the process of developing a vaccine to each of them.

KEY WORDS

Streptococcus mutans, glucosyltransferase (GTF), cell surface protein (Pac), glucan binding protein (GBP), dental caries, antigen.

THEMATIC FIELDS

Dental caries, oral health, vaccine, oral immunology.

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

Gómez SI, Barrientos S. Antígenos usados en vacunas contra la caries dental. Univ Odontol. 2013 Jul-Dic; 32(69):73-82.

SICI:
2027-3444(201307)32:69<73:AUVCCD>2.0.CO;2-5

Recibido para publicación: 31/01/2013
Aceptado para publicación: 11/03/2013

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

INTRODUCCIÓN

La caries dental es una enfermedad que continúa siendo un problema de salud pública mundial, por lo que las investigaciones en los ámbitos clínico y de ciencias básicas se han incrementado y han dado como resultado un nuevo paradigma de la caries, que la define como la destrucción localizada de los tejidos duros del diente, causada por los productos ácidos derivados de la fermentación bacteriana de los carbohidratos, en un proceso crónico, de sitio específico, multifactorial y dinámico. El resultado es el desequilibrio, debido a la disminución del pH entre la parte mineral del diente y la biopelícula, que lleva a una pérdida de mineral a través del tiempo que se traducen con cambios de color hasta cavidades evidentes (1-6).

La característica común de las biopelículas es la presencia de una matriz derivada de los microorganismos, constituida por agua en un 80%, exopolisacáridos, proteínas y lípidos, y sus propiedades fisicoquímicas dependen no solo de la bacteria, sino del medio ambiente en el que se desarrollen. Gracias a la interacción de una multiplicidad de factores contenidos en la biopelícula, este puede aumentar su masa crítica hasta cinco veces en un término de 24 horas (7). La literatura reconoce, hoy por hoy, la multifactoriedad de la etiología de la caries, sin que cada elemento por sí solo se constituya en absoluto iniciador del proceso. Dentro de los componentes examinados, se encuentran los microorganismos, especialmente el *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), que se encuentra entre el 47% y el 82%, como parte del complejo amarillo, y al que se le atribuyen funciones como adhesión, agregación o coagregación de bacterias dentro de la biopelícula y producción de ácidos, procesos todos esenciales en la fisiopatología de la enfermedad.

La evidencia muestra claramente que la fuente primaria de exopolisacáridos en la biopelícula dental proviene de la sacarosa y el almidón, y su interacción con glucosil y fructosiltransferasas, desde la formación de la película adquirida necesaria para la conformación de dicha biopelícula (8). También se asocia el *Lactobacillus acidophilus* en la caries avanzada, que se denomina cariógeno secundario, porque se observa cuando la lesión ya es visible clínicamente, y el *Actinomyces viscosus*, que se relaciona con caries radicular (9).

El *S. mutans* presenta múltiples factores de virulencia; pero las glucosiltransferasas (GTF), el antígeno proteico de adhesión celular (PAC o Ag I/II) y las proteínas

de unión a glucanos (GBP, por su sigla en inglés) son de especial interés para la vacuna contra la caries, ya que desempeñan un papel importante en la adhesión y establecimiento de la biopelícula dental. La etiopatogenia de la enfermedad se desarrolla en tres fases: en la primera hay adhesión de este microorganismo a la película adquirida por medio de Ag I/II. En la segunda fase ocurre la acumulación en presencia de azúcares por medio de las GTF y de las GBP. Y en la tercera fase los glucanos interactúan con las GTF y las GBP para lograr la agregación y multiplicación de las bacterias (5,10-14). El objetivo del presente artículo de revisión exhaustiva de la literatura es describir los aspectos más relevantes acerca de los antígenos de *S. mutans* importantes en la formación de la biopelícula y el estado actual del proceso de desarrollo de una vacuna con cada uno de ellos.

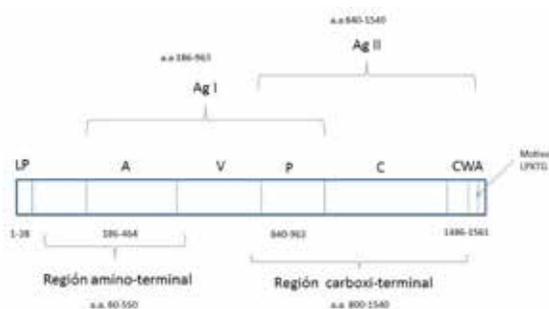
PROTEÍNAS DE ADHESIÓN CELULAR (PAC)

Esta proteína ha sido muy estudiada debido al papel que cumple en la adherencia, en la colonización y en el desarrollo de la biopelícula dental. De acuerdo con el grupo de investigación que la ha estudiado, se ha nombrado como proteína IF, por el grupo de Woods; proteína P1, por el grupo de Knox; proteína SR, por el grupo de Frank; PAC, por el grupo de Koga, y antígeno I/II (Ag I/II), por el grupo de Russel y colaboradores, que la llamaron así, porque observaron dos antígenos en la pared de *S. mutans*, pero más adelante se dieron cuenta de que el antígeno II hacía parte del antígeno I (14-19).

Al observar la estructura lineal de esta proteína, se diferencian seis regiones específicas funcionales: la primera es la *región LP*, donde se localiza el péptido líder que va desde el aminoácido (a.a.) 1 al 38, y adyacente a esta se encuentra la región amino-terminal (N terminal), que está delimitada entre los a.a. 60 y el 550, donde se ubica la segunda región, denominada *región A*, por ser rica en alanina, con 3 repeticiones completas de alanina y una incompleta, la cual se dispone desde el a.a. 186 al 464. La tercera es la más variable y de allí su nombre de *región V*, que se orienta desde el a.a. 465 al 839. La cuarta corresponde a la región carboxiterminal, conocida como *región C*, que se despliega desde al a.a. 800 al 1540, donde se halla la quinta región, correspondiente a la *región P*, por presentar tres repeticiones completas de prolina y una incompleta, lo que le confiere hidrofobicidad a la proteína, y se prolonga del a.a. 840 al 963. Y la sexta es la *región CWA* (*cell wall anchoring sequences*), la del anclaje a la pared celular, y se extiende desde el a.a.

1486 al 1561. En esta última región se halla un dominio transmembranal *LPXTG* necesario para el anclaje a la pared que se extiende de los a.a. 1537 al 1556. Este dominio es reconocido por la enzima sortasa, responsable de la unión covalente entre este antígeno y el peptidoglicano de la pared celular. Es importante entender que el antígeno I está constituido por las regiones AVP; mientras que el antígeno II, por la región carboxiterminal, como se muestra en la figura 1 (20).

FIGURA 1
REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA ESTRUCTURA AG I/II

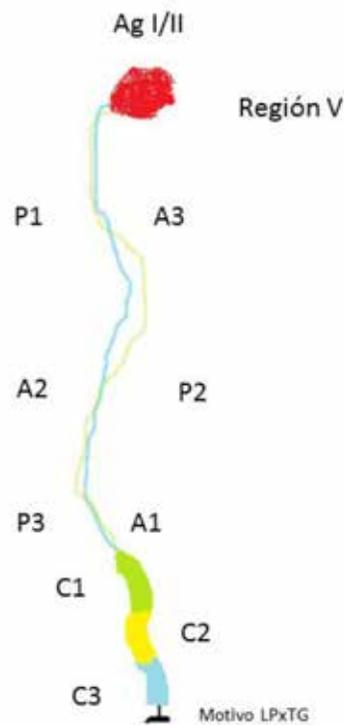


El modelo estructural de Larson y colaboradores ha originado información que se debe tener en cuenta para los nuevos proyectos en esta área. Luego de purificar y cristalizar la proteína, este grupo —por medio de remplazos, asesoramiento con resonancia de plasmones de superficie (SPR) y con microscopía electrónica— estudió las regiones V y C dispuestas entre las regiones A (A1, A2 y A3) y P (P1, P2 y P3), donde encontraron tres dominios a los que les dieron el nombre de C1 (a.a. 992-1142), C2 (a.a. 1143-1332) y C3 (a.a. 1333-1486), en los cuales se hallan iones de calcio que estabilizan la orientación de los a.a. para que puedan interactuar con las cadenas de carbohidratos; también dos sitios comprendidos entre A3VP1 y entre C1-C2, importantes tanto para la unión al receptor superficial de la aglutinina salivar como para la inhibición de *S. mutans*, como se muestra en la figura 2 (20).

El grupo de Delmuth y colaboradores estudió diferentes cepas del género de estreptococos, como son *S. mutans*, *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*) y *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), debido a que se encuentran en diferentes tejidos y producen diferentes enfermedades, para verificar la presencia de Ag I/II al mismo tiempo que su composición. Ellos concluyen que la adhesión de estos microorganismos a los tejidos humanos envuelve el reconocimiento de los componentes del hospedero por parte de las bacterias mediante el Ag I/II, cuando interactúa con los constituyentes salivares, proteínas de la matriz celular como la fibronectina, el fibrinógeno y el colágeno que

media la adherencia de las células a la superficie. Con respecto a su composición, en el grupo de *Streptococcus viridans* estas adhesinas están compuestas por 1310-1653 a.a.; mientras que en *S. agalactiae* por 826-932 a.a.. Entre tanto, mientras que en el grupo de *S. pneumoniae* no se ha encontrado (21).

FIGURA 2
REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL MODELO DE LARSON CON LAS REGIONES A, V, C Y P



Las nuevas tecnologías para la prevención y tratamiento de la caries dental incluyen los agentes quimioprolácticos, péptidos antimicrobianos (AMP, por su sigla en inglés), las vacunas, los probióticos y los sustitutos del azúcar (22). Los agentes quimioprolácticos se presentan en forma de enjuagues orales, pastas dentales, geles o barnices que liberan de manera lenta el medicamento en la boca y obtienen un efecto prolongado contra la actividad de *S. mutans* para reducir la virulencia del microorganismo. Ejemplos de estos son la clorhexidina y el triclosán. Los AMP se definen como péptidos de bajo peso molecular (usualmente menores de 10 kDa) que se utilizan para combatir las infecciones, debido a su capacidad de unión a la parte negativa de la membrana de la bacteria, el lipopolisacárido (LPS), que da como resultado final la muerte celular, ya sea por disrupción de la superficie o por otros mecanismos.

El mecanismo más estudiado es la vacuna, que se caracteriza por la producción específica de anticuerpos

a partir de la inmunidad innata. Se busca incorporar antígenos bacterianos purificados en el sistema inmune de mucosas para que luego se libere en los sitios de inducción de la inmunoglobulina A (IgA). El mecanismo de acción de estos anticuerpos es la eliminación de la bacteria, por medio de la agregación mediada por anticuerpos, la inhibición de la adherencia bacteriana por medio del bloqueo de los receptores de superficie y la modificación de las funciones metabólicas de las enzimas bacterianas (22).

Aunque se ha trabajado mucho en el tema de la vacuna contra la caries, esta todavía se encuentra en los estadios iniciales. Se sabe que las glándulas salivares producen anticuerpos por inmunización directa del tejido linfoide asociado a intestino (GALT, por su sigla en inglés), que la IgA salivar actúa como una aglutinina específica que interactúa con los receptores de la superficie bacteriana inhibiendo en parte la colonización y subsecuente caries. Finalmente, que existen en la actualidad dos vías de inmunización ante la bacteria que provoca la caries: la vía activa, aplicada mediante la estimulación directa del sistema inmune del individuo para que este produzca por sí mismo anticuerpos contra la bacteria generadora de la caries, o la vía pasiva, que inocula los anticuerpos directamente mediante la aplicación de un *spray* aplicado en la nariz o en las paredes de la boca (22).

Con respecto a la respuesta inmune contra Ag I/II, su estudio en modelo animal se ha desarrollado en ratas, hámsteres y monos. Los grupos de investigación han buscado epítopes, que son porciones del antígeno que son reconocidas de manera específica por los linfocitos. Son importantes para la adhesión (adhesintopes), para reconocimiento específico por los linfocitos B (epítape B) y para el reconocimiento específico por los linfocitos T (epítape T), indispensables para el desarrollo de una vacuna efectiva contra la caries (22).

De los estudios de Brady, Nakai y Kelly, que examinaron las regiones A y V en busca de adhesintopes, se obtuvo un epítape importante de los a.a. 1025 a 1044 y continuaron haciendo pruebas pero con resultados débiles. Ya en el 2011, después de hacer estudios con anticuerpos monoclonales denominados *Guy's 13* (sintetizados en plantas), no solo evaluaron la protección conferida por estos anticuerpos, sino las propiedades inmunomoduladoras, y llegaron a la conclusión de que existe una interacción entre las regiones A y P, al inducir un cambio en la especificidad, el isotipo y la funcionalidad de los anticuerpos anti-Ag I/II, por medio de los anticuerpos monoclonales 6-10 A, 5-5 D,

3-10 E, 4-10 A, que inhibieron la adhesión debido a la interacción de epítopes entre estas regiones (23,24).

Mientras tanto, el grupo de Moisset encontró la secuencia TELARVQKANADAKAAY en la región A, que se repite tres veces, y el grupo de Senpuku halló la secuencia YYEAALKQYEADL, que se repite cuatro veces. Con estos hallazgos se continuaron los estudios con el objetivo de bloquear la interacción del antígeno con películas salivares para inhibir la adhesión y posterior colonización de *S. mutans* a la superficie dental pero la reacción no ha sido muy fuerte (25-28).

Adicionalmente, se han utilizado péptidos sintéticos o recombinantes, conjugados de proteínas-carbohidrato, vacunas basadas en ADN. Como ejemplo está el proyecto del grupo de Yu, que quiso probar el efecto de un recombinante de PAC (fragmento de A y de P) utilizando como coadyuvante la flagelina (hace parte de la subunidad proteica del flagelo), la cual es reconocida por el receptor de tipo Toll (TLR5), importante en las respuestas inflamatorias. Ellos concluyen que con esta vacuna se obtiene una respuesta específica de la IgA protectora (29,30).

Asimismo, el grupo de Michalek probó el efecto de una vacuna de Salmonella, que expresa la región de unión a la saliva (SBR) de Ag I/II en las células dendríticas, que ejercen un papel importante en la diferenciación de las células T efectoras, y observaron bajas concentraciones de interleucina 10 (IL-10) y altas de IL-6, que induce una respuesta de tipo Th2 (31).

GLUCOSILTRANSFERASAS (GTF)

Las GTF son proteínas con capacidad enzimática que permiten acelerar y moderar las condiciones de reacción, mayor especificidad y capacidad de regulación del metabolismo de los carbohidratos durante la formación de la biopelícula. Estas enzimas convierten la sacarosa en glucanos, importantes porque permiten la acumulación de *S. mutans* en las superficies dentales, dividen la sacarosa, liberan fructosa y obtienen energía para la conversión extracelular de glucosa y fructosa en glucanos altamente ramificados.

Se les ha descrito como proteínas asociadas a las fimbrias y secretadas al medio por *Streptococci mutans*, *sobrinus*, *downei*, *gordoni* y *sanguis*, aunque las más estudiadas son las de *S. mutans*, ya que este es el microorganismo con mayor asociación a la caries (32). Se conocen tres tipos de GTF: la GTF B, que cataliza

la reacción para la producción de glucanos insolubles; la GTF C, que puede conducir la reacción tanto de glucanos solubles como insolubles, y la GTF D, que solo cataliza la reacción de glucanos solubles. Una vez sintetizadas, estas pueden encontrarse de dos formas: asociadas a las fimbrias del microorganismo o en el medio en estado soluble y en cada una de sus formas tiene diferentes grados de actividad.

En 1970, cuando se consolida la teoría del papel de *S. mutans* en la fisiopatología de la enfermedad, se inician los estudios sobre el metabolismo de carbohidratos, la hidrólisis la estructura de los glucanos insolubles, teniendo como enzimas mediadoras a dos GTS. Al purificarlas y determinar su especificidad antigénica y los mecanismos de su inhibición, se reconoció una disminución en la caries y se fortaleció la investigación sobre la vacuna en modelos animales (33-35).

Posteriormente, los avances en biología molecular permiten la manipulación genética de los microorganismos, al modificar la expresión de diversos factores de virulencia y, por lo tanto, su impacto en el desarrollo de la enfermedad, y al explicar también la formación de la biopelícula a partir de la estructura de los glucanos solubles e insolubles (36-38). En 1987, Hanada realiza la descripción y purificación de una tercera GTF que se caracteriza como mediadora de la producción de glucanos solubles y la denomina GTF D. A finales de los años ochenta, se entra de lleno en los estudios desde la perspectiva inmunológica y autores como Taubman describen los experimentos encaminados a dilucidar la respuesta inmune con miras a desarrollar una vacuna efectiva contra la caries (39). Concomitantemente, el conocimiento sobre la genética permite determinar las secuencias, sus mecanismos de control y de regulación propios de la bacteria y los dependientes del medio, para la secreción de las GTF.

La secuencia de aminoácidos de estas proteínas varía entre 1400 a 1600 y tienen regiones homólogas entre sí, a pesar de la diferencia de función en la síntesis de glucanos. El peso molecular es de 162 KDa para la GTF B, de 149 KDa para la GTF C y de 155 KDa para la GTF D. Están codificadas en tres genes del estreptococo que tiene distintos promotores y son altamente sensibles a los cambios de temperatura, pH del medio y disponibilidad de sacarosa. Tiene dos funciones conocidas: la primera es contribuir, en conjunto con otras moléculas como PAC, a los procesos de adherencia a las superficies dentales y la segunda como sintetizador de glucanos necesarios para el crecimiento y manutención de la

biopelícula. Para cumplir con su función deben tener sus sitios proteicos activos íntegros y en condiciones de estereoespecificidad, que permitan su unión al sustrato de sacarosa, y la adhesión de otras bacterias y glucanos. Su mecanismo de acción permite las desramificaciones del glucógeno, porque rompen el enlace alfa 1-4, llevan tres de los cuatro residuos y los unen a ramificaciones más largas; entre tanto, el residuo alfa 1-6 es hidrolizado a glucosa por la misma enzima. Los polisacáridos producidos son glucanos solubles que contienen un 60% de enlaces alfa 1-6 y un 17% de ramificaciones; mientras que aquellos insolubles contienen un 57% de alfa 1-3, un 28% de alfa 1-6 y un 8% de ramificaciones (40). La solubilidad de los glucanos permite la disponibilidad de azúcares como insumo energético para los distintos microorganismos contenidos en la placa; mientras que los glucanos insolubles le confieren su capacidad de regular la entrada y salida de algunos compuestos, por ejemplo, iones, con lo que protegen el microambiente allí contenido de las condiciones cambiantes de la cavidad oral.

La molécula de GTF, en términos generales, está compuesta por una región N terminal, identificada por mutagénesis, que se asocia con su actividad catalítica, es decir, la que desdobra la sacarosa y se conoce como CAT; mientras que la región C terminal permite la asociación de glucanos y es conocida como región GBP. Las dos regiones son igualmente importantes en términos funcionales, ya que al perderse cualquiera de ellas, se reduce la cariogenicidad de la bacteria. Esto se ha comprobado gracias al hecho de que con anticuerpos específicos de tipo IgA o IgG, contra cualquiera de estas dos regiones, es posible controlar sustancialmente la caries. Los estudios que comparan las secuencias de aminoácidos de la GTF evidencian la existencia de cuatro regiones, un péptido señal de 40 aminoácidos, una región de 360 aminoácidos sin función conocida al parecer especie específica, un dominio catalítico de 500 aminoácidos y una serie de seis repeticiones que constituyen la región de unión a glucanos. La región CAT es altamente hidrofóbica, y por su conformación existen estudios controversiales sobre su capacidad para ser reconocida por el sistema inmune, y hoy se supone que la región variable de 360 aminoácidos tiene mayor capacidad inmunogénica que CAT (41).

Se ha comprobado la existencia de regiones conservadas de 19 aminoácidos del a.a. 409 al 427 y del a.a. 435 a 453 de la GTFB, regiones funcionalmente importantes para la actividad enzimática y la adhe-

rencia, y al inhibir estas regiones es posible detener la formación de glucanos insolubles sin afectar la producción de glucanos solubles por parte de GTF D, e incluso la sustitución de un solo residuo de Asp en estas regiones se traduce con una disminución en la hidrólisis de la sacarosa (42).

En cuanto a la producción de GTF B en cepas obtenidas de pacientes sanos, se observa que algunas no la producen *in vitro*, pero aun así se detecta formación de placa y de glucanos probablemente gracias a la actividad de las otras dos enzimas. En individuos sanos también se encuentran cepas secretoras de GTF B; pero que por alguna razón conformacional o de control inmunológico no es cariogénica. Esto muestra que la secreción enzimática depende de muchos factores que varían de manera constante y extrema en la cavidad oral, donde, en poco tiempo, se cambian la temperatura, el pH, las concentraciones iónicas, y aun de factores inmunológicos como la IgA (43).

Cabe anotar que la actividad de las enzimas varía dependiendo de si se encuentran en estado soluble en el medio salival o están adheridas a superficie como la hidroxiapatita. Ello muestra una mayor actividad en estado de adhesión que afecta directamente la estructura tridimensional de la matriz en la biopelícula.

En cuanto a los aspectos genéticos, se reconoce que los tres tipos de GTF están codificadas en los genes *gtfB*, *gtfC* y *gtfD* con 4,4 kbp, 4,3 kbp y 5,3 kbp, respectivamente. Los dos primeros parecen ser cotranscritos por mecanismos reguladores comunes, mientras que *gtfD* lo hace de manera independiente. La transcripción, la traducción y la secreción de las enzimas dependen de factores del microorganismo, de la fase de crecimiento y del medio en el que se encuentra al disminuir el pH, por ejemplo, así como la disponibilidad de iones de cobre.

Hoy por hoy se conocen varios genes reguladores como Reg Mm Lux S y *vicRK*, *RopA*. Cualquier alteración genética por mutación se traduce en la pérdida de la capacidad catalítica de la enzima y se observa que el microorganismo requiere la presencia de las tres GTF para ejercer su actividad cariogénica (8). Los estudios genéticos de las GTF en la última década llevan la investigación hacia el desarrollo de vacunas con ADN que codifica las proteínas como PAc y GTF y que tienen la capacidad de inducir una respuesta inmune local y sistémica efectiva en roedores (44).

Como parte de los estudios de una vacuna contra la caries, se busca el reconocimiento de las regiones de las proteínas con mayores propiedades antigénicas. Así, se han explorado, dentro de las moléculas de GTF, aquellas secuencias que puedan ser epítopes tanto T como B, es decir, las que por su conformación o por su secuencia puedan ser reconocidas por el sistema inmune, en asocio con el complejo mayor de histocompatibilidad. Algunos estudios indican que la región CAT contiene un epítipo B, mientras que GLU contiene epítopes tanto B como C y, de hecho, la inmunización con los dos tipos de epítopes genera una respuesta protectora mayor que la que se obtiene con los epítopes por separado (45).

Es un hecho que la colonización de *S. mutans*, desde edades tempranas, induce una respuesta inmune natural; sin embargo, aún no es claro cuál es el papel de dicha respuesta, tanto local como sistémica, frente a la colonización. Este se debe a que en la mayoría de los casos esta no tiene un papel protector frente a la patología, a pesar de que se ha visto que individuos sanos naturalmente sensibilizados pueden tener mayores concentraciones de IgA e IgG específicas contra GTF, que parecen ejercen una función protectora contra la caries. Al comparar las concentraciones de IgA séricas en grupos de niños sin caries y con distintos índices de caries aparecen diferencias estadísticamente significativas, aunque la IgG no mostró diferencias (46).

Queda claro que el mecanismo de formación y mantenimiento de la placa es un proceso dinámico que depende de la disponibilidad de sacarosa en el medio, que dura hasta cuatro horas, y la actividad de GTF se detecta segundos después del cepillado. La presencia de dextranasas y mutanasas en la biopelícula, enzimas que rompen los enlaces glucosídicos, permite mantener el equilibrio de ecosistema, los valores diferenciales de pH, las concentraciones iónicas y la apertura de sitios de unión de las proteínas implicadas en el metabolismo bacteriano.

PROTEÍNAS DE UNIÓN A GLUCANOS (GBP)

La habilidad de los distintos estreptococos orales para colonizar y mantenerse en el medio oral se hace también a través de estas moléculas. Se trata de proteínas más pequeñas identificadas en *S. mutans* y *sobrinus*, y tienen la capacidad de unirse a glucanos alfa 1-6. Se han descrito varios tipos GBP A, GBP B,

GBP C y GBP D. La GBP A es una proteína de 59 kDa, con mayor afinidad por los glucanos solubles gracias a su región C terminal y a sus 16 series de repeticiones; entre tanto, GBP B pesa 41,3 kDa y su grupo N terminal es altamente inmunogénico. Finalmente, GBP C tiene un peso molecular de 63 kDa y GBP D pesa 76 kDa.

Con base en sus secuencias, se han venido desarrollando péptidos sintéticos, considerados epítopes interesantes como antígenos vacunales (47-49). Las GBP A y D tienen en su grupo carboxiterminal repeticiones terminales muy parecidas a las de la molécula de GTF; mientras que la GBP C parece funcionar como un receptor de glucanos importante en la adhesión dependiente de sacarosa (50).

En realidad, las GBP son proteínas que forman un grupo bastante heterogéneo con diferentes tamaños, dominios, afinidad por los glucanos e, incluso, funciones. Se reconoce que pueden relacionarse con la morfología de la biopelícula, hidrolizar los peptidoglucanos y actuar como agente de cohesión en la placa, agregación o inhibidor de dextranasas. Los estudios permiten suponer que la pérdida de alguna de las proteínas fijadoras de glucanos se traduce en la formación de una biopelícula más lábil en el medio oral, vinculado esto al hecho de que la GBP B está involucrada con la estabilidad de la pared celular y, por lo tanto, en la conformación de la placa (50). El mecanismo de adhesión de glucanos a la GBP depende no solo de su secuencia de aminoácidos, sino de la conformación de plegamientos que forman un núcleo hidrofóbico con un dominio externo capaz de interactuar con la molécula de glucanos tanto solubles como insolubles. Un apunte importante es el poco significado que parecen tener las GBP en otros modelos, como el que se asocia al desarrollo de endocarditis infecciosa, lo que demuestra el comportamiento particular de cada proteína, en diferentes tipos de biopelículas (51). Estudios en ratas han mostrado que estas proteínas inducen una respuesta inmune inmediata mediada por IgA, modelo que parece comportarse de manera similar al humano (52).

Es claro que el desarrollo de una vacuna contra la caries es difícil, por cuanto esta debe inducir una respuesta inmune-protectora, permanente y sin daño al huésped. Se busca un epítipo que produzca una respuesta de memoria a través de la sensibilización de los linfocitos T y B que, a su vez, induzcan esencialmente una producción de IgA salival que debe inactivar, de acuerdo con el antígeno vacunal, la adhesión, la producción de glucanos o la coagregación

de otros microorganismos. También se puede inducir a una respuesta tanto celular como humoral en el fluido crevicular. Se han hecho ensayos con los microorganismos vivos atenuados, regiones específicas de PAC, GTF y GBP, tanto naturales como péptidos sintéticos. Además se han usado diferentes vías de administración que incluyen oral, intranasal, tonsilar e incluso rectal. Se han usado coadyuvantes, como la toxina colérica, para activar mejor el sistema e inducir de respuesta inmune pasiva con anticuerpos hechos en huevo o derivados de la leche.

Actualmente, los trabajos más relevantes se están haciendo con vacunas de ADN que usan antígenos recombinantes y que también buscan inducir un aumento de la IgA específica para evitar la formación de la película o la maduración de la biopelícula. Al igual que en estudios anteriores, los resultados son contradictorios, ya que algunos autores encuentran una franca disminución de la caries, mientras otros encuentran que esta disminución no se da a pesar de la presencia de IgA específica. No se logra aún una respuesta efectiva, pese a buenos resultados en roedores, pues todavía no hay estudios en humanos, probablemente porque se desconoce a ciencia cierta el efecto de la inhibición de *S. mutans* en la ecología de la cavidad oral.

Además de la disrupción mecánica de la biopelícula, la inhibición de la GTF y las GBP ha mostrado ser un medio efectivo para su control, y para este efecto se han buscado inhibidores naturales y sintéticos que controlen tanto la enzima en estado soluble y en estado de adsorción. Derivados de los amonios cuaternarios, aminos alifáticos, extractos de plantas como el té verde, ácido oleico, polifenoles y anticuerpos, tanto activos como pasivos, han mostrado diferentes grados de control de la enzima. Se especula sobre su mecanismo de acción, pero podría ser a través del bloqueo de la actividad enzimática por unión en el aminoácido Asp del sitio activo de la enzima, la adición de cadenas laterales de aminoácidos a la GTF o el bloque del dominio GPB (8).

CONCLUSIÓN

Los factores de virulencia asociados a *S. mutans* son muy diversos y su control es una de las claves para prevenir la enfermedad dental. Aún existen muchos aspectos moleculares indispensables para el desarrollo de una vacuna pero, mientras tanto, el control de estos factores seguirá siendo con la disrupción

mecánica y el uso de sustancias que interfieran en la formación de placa, que han demostrado, junto con el flúor, ser los medios más efectivos conocidos hasta hoy, como base para el desarrollo de programas preventivos. A pesar de que la evidencia muestra una respuesta inmune protectora en animales al utilizar los principales factores de virulencia como blancos, hay probablemente mecanismos por los cuales el microorganismo escapa a la respuesta inmune y se vale de otras formas para mantenerse protegido.

REFERENCIAS

- Fontana M, Young DA, Wolff MS, Pitts NB, Longbottom C. Defining dental caries for 2010 and beyond. *Dent Clin North Am.* 2010 Jul; 54(3):423-40.
- Fejerskov O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries Res.* 2004 May-Jun; 38(3): 182-91.
- Kidd EA, Fejerskov O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res.* 2004; 83(Spec issue): C35-C38.
- Marsh PD. Dental plaque as a biofilm and a microbial community: Implications for health and disease. *BMC Oral Health.* 2006 Jun 15; 6(Suppl 1): S14.
- Nicolas GG, Lavoie MC. *Streptococcus mutans* and oral streptococci in dental plaque. *Can J Microbiol.* 2011 Jan; 57(1): 1-20.
- Takahashi N, Nyvad B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Res.* 2008; 42(6): 409-18.
- Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000.* 2002; 28: 12-55.
- Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res.* 2011; 45(1): 69-86.
- Loesche WJ. Microbiology of dental decay and periodontal disease. In: Baron S, editor. *Medical microbiology.* 4th ed. Galveston: University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.
- Jaramillo LM, Gómez SI. Antígeno proteico de superficie celular (Pac) de *Streptococcus mutans*. *Univ Odontol.* 2004, 54-55: 125-31.
- Taubman MA, Nash DA. The scientific and public health imperative for a vaccine against dental caries. *Nat Rev Immunol.* 2006 Jul; 6(7): 555-63.
- Shivakumar KM, Vidya SK, Chandu GN. Dental caries vaccine. *Indian J Dent Res.* 2009 Jan-Mar; 20(1): 99-106.
- Koga T, Oho T, Shimazaki Y, Nakano Y. Immunization against dental caries. *Vaccine.* 2002 May 15; 20(16): 2027-44.
- 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.
- 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.
- Russell MW, Lehner T. Characterization of antigens extracted from cells and culture fluids of *Streptococcus mutans* serotype c. *Arch Oral Biol.* 1978; 23(1): 7-15.
- 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.
- 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.
- 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.
- Larson MR, Rajashankar KR, Crowley PJ, Kelly C, Mitchell TJ, Brady LJ, Deivanayagam C. Crystal structure of the C-terminal region of *Streptococcus mutans* antigen I/II and characterization of salivary agglutinin adherence domains. *J Biol Chem.* 2011 Jun 17; 286(24): 21657-66.
- Jenkinson HF, Demuth DR. Structure, function and immunogenicity of streptococcal antigen I/II polypeptides. *Mol Microbiol.* 1997 Jan; 23(2): 183-90.
- Chen F, Wang D. Novel technologies for the prevention and treatment of dental caries: a patent survey. *Expert Opin Ther Pat.* 2010 May; 20(5): 681-94.
- 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.
- Robinette RA, Oli MW, McArthur WP, Brady LJ. A therapeutic anti-*Streptococcus mutans* monoclonal antibody used in human passive protection

- trials influences the adaptive immune response. *Vaccine*. 2011 Aug 26; 29(37): 6292-300.
25. Li Y, Jin J, Yang Y, Bian Z, Chen Z, Fan M. Enhanced immunogenicity of an anti-caries vaccine encoding a cell-surface protein antigen of *Streptococcus mutans* by intranasal DNA prime-protein boost immunization. *J Gene Med*. 2009 Nov; 11(11): 1039-47.
 26. Li LN, Guo LH, Lux R, Eckert R, Yarbrough D, He J, Anderson M, Shi WY. Targeted antimicrobial therapy against *Streptococcus mutans* establishes protective non-cariogenic oral biofilms and reduces subsequent infection. *Int J Oral Sci*. 2010 Jun; 2(2): 66-73.
 27. Sullivan R, Santarpia P, Lavender S, Gittins E, Liu Z, Anderson MH, He J, Shi W, Eckert R. Clinical efficacy of a specifically targeted antimicrobial peptide mouth rinse: targeted elimination of *Streptococcus mutans* and prevention of demineralization. *Caries Res*. 2011; 45(5): 415-28.
 28. Inaba E, Uematsu H, Nishiyama Y, Watanabe H, Senpuku H. The role of anti-Pac (361–386) peptide SIgA antibody in professional oral hygiene of the elderly. *Gerodontology*. 2009; 26: 259-67.
 29. Zhao W, Zhao Z, Russell MW. Characterization of antigen-presenting cells induced by intragastric immunization with recombinant chimeric immunogens constructed from *Streptococcus mutans* AgI/II and type I or type II heat-labile enterotoxins. *Mol Oral Microbiol*. 2011 Jun; 26(3): 200-9.
 30. 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.
 31. Xu Q, Katz J, Zhang P, Ashtekar AR, Gaddis DE, Fan M, Michalek SM. Contribution of a *Streptococcus mutans* antigen expressed by a Salmonella vector vaccine in dendritic cell activation. *Infect Immun*. 2011 Sep; 79(9): 3792-800.
 32. Takehara T, Ansai T, Kunimori A, Yamashita Y, Hanada N. The extension of alpha-D-1, 3 - branch linkages by 1,3-alpha-D-glucan synthase from *Streptococcus sobrinus*. *FEMS Microbiol Lett*. 1991 Sep 15; 67(1): 69-71.
 33. Genco RJ, Emmings FG, Evans RT, Apicella M. Purification, characterization, and immunogenicity of cell-associated glucan from *Streptococcus mutans*. *J Dent Res*. 1976 Apr; 55(Spec issue): C115-C20.
 34. Evans RT, Emmings FG, Genco RJ. Prevention of *Streptococcus mutans* infection of tooth surfaces by salivary antibody in Iruis monkeys (*Macaca fascicularis*). *Infect Immun*. 1975 Aug; 12(2): 293-302.
 35. Chludzinski AM, Germaine GR, Schachtele CF. Purification and properties of dextransucrase from *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol*. 1974 Apr; 118(1): 1-7.
 36. Koga T, Inoue M. Cellular adherence, glucosyltransferase adsorption, and glucan synthesis of *Streptococcus mutans* AHT mutants. *Infect Immun*. 1978 Feb; 19(2): 402-10.
 37. Wenham DG, Davies RM, Cole JA. Insoluble glucan synthesis by mutans sucrose as a determinant of the cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *J Gen Microbiol*. 1981 Dec; 127(2): 407-15.
 38. Pucci MJ, Macrina FL. Cloned *gtfA* gene of *Streptococcus mutans* LM7 alters glucan synthesis in *Streptococcus sanguis*. *Infect Immun*. 1985 Jun; 48(3): 704-12.
 39. Taubman MA, Smith DJ. A mucosal approach to immunoprophylaxis of dental infections. *Adv Exp Med Biol*. 1987; 216B: 1721-30.
 40. Aires CP, Koo H, Sasaki GL, Iacomini M, Cury J A. A procedure for characterizing glucans synthesized by purified enzymes of cariogenic *Streptococcus mutans*. *Int J Biol Macromol*. 2010 Jun; 46(5): 551-4.
 41. Hoshino T, Kondo Y, Saito K, Terao Y, Okahashi N, Kawabata Sh, Fujiwara T. Novel epitopic region of glucosyltransferase B from *Streptococcus mutans*. *Clin Vaccine Immunol*. 2011 Sep; 18(9): 1552-1561.
 42. Chia JS, Yang CS, Chen JY. Functional analyses of a conserved region in glucosyltransferases of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun*. 1998 Oct; 66(10): 4797-803.
 43. Barrientos S, Rodríguez A. Production of glucosyltransferase B and glucans by *Streptococcus mutans* strains isolated from caries-free individuals. *Acta Odontol Latinoam*. 2011; 24(3): 258-64.
 44. Huang L, Xu QA, Liu C, Fan MW, Li YH. Anti-caries DNA vaccine-induced secretory immunoglobulin A antibodies inhibit formation of *Streptococcus mutans* biofilms in vitro. *Acta Pharmacol Sin*. 2012 Dec 31.
 45. Taubman M, Holmberg C, Smith D. Diepitopic construct of functionally and epitopically complementary peptides enhances immunogenicity, reactivity with glucosyltransferase, and protection from dental caries. *Infect Immun*. 2001 July; 69(7): 4210-6.
 46. Kirtaniya BC, Chawla HS, Tiwari A, Ganguly NK, Sachdev V. Natural prevalence of antibody titers to glucosyltransferase of *Streptococcus mutans* in serum in high and low caries active children. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2010 Apr-Jun; 28(2): 91-4.

47. Russell RR. Glucan-binding proteins of *Streptococcus mutans* serotype c. J Gen Microbiol. 1979 May; 112(1): 197-201.
48. Smith DJ, Akita H, King WF, Taubman MA. Purification and antigenicity of a novel glucan-binding protein of *Streptococcus mutans*. Infect Immun. 1994 Jun; 62(6): 2545-52.
49. Sato Y, Yamamoto Y, Kizaki H. Cloning and sequence analysis of the gbpC gene encoding a novel glucan-binding protein of *Streptococcus mutans*. Infect Immun. 1997 Feb; 65(2): 668-75.
50. Lynch DJ, Fountain TL, Mazurkiewicz JE, Banas JA. Glucan-binding proteins are essential for shaping *Streptococcus mutans* biofilm architecture. FEMS Microbiol Lett. 2007 Mar; 268(2): 158-65. Epub 2006 Dec 1.
51. Banas JA, Vickerman MM. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. Crit Rev Oral Biol Med. 2003; 14(2): 89-99.
52. Nogueira RD, King WF, Gunda G, Culshaw S, Taubman MA, Mattos-Graner RO, Smith D. Mutans streptococcal infection induces salivary antibody to virulence proteins and associated functional domains. Infect Immun. 2008 Aug; 76(8): 3606-13. Epub 2008 May 12.

CORRESPONDENCIA

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

Silvia Barrientos Sánchez
barrien@javeriana.edu.co