

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE ODNTOLOGÍA  
POSTGRADO DE ODONTOLOGÍA INFANTIL**

**APECTOS INMUNOLÓGICOS LOCALES DE LA CARIES  
DENTAL**

Trabajo especial presentado ante la ilustre  
Universidad Central de Venezuela por la  
Odontólogo Anyuska Medina Rojas para  
optar al título de especialista en  
Odontología Infantil

Caracas, 08 de Diciembre de 2005

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
POSTGRADO DE ODONTOLOGÍA INFANTIL

**APECTOS INMUNOLÓGICOS LOCALES DE LA CARIES  
DENTAL**

**AUTOR:** Od. Anyuska Medina Rojas.

**TUTOR:** Dra. María Correnti.

Caracas, 08 de Diciembre de 2005

Aprobado en nombre de la  
Universidad Central de Venezuela  
por el siguiente jurado examinador

----- (Coordinador) Nombre y Apellido C.I.	----- Firma
--	----------------

----- Nombre y Apellido C.I.	----- Firma
------------------------------------	----------------

----- Nombre y Apellido C.I.	----- Firma
------------------------------------	----------------

Observaciones: -----  
-----  
-----

Caracas, 08 de Diciembre de 2005

## DEDICATORIA

A mis padres, que con su esfuerzo y dedicación este logro no hubiera sido posible. Papá eres único y he sentido mucho apoyo en ti y en realidad me has ayudado a demostrarte que la idea es lograr lo deseado, no importa el tiempo. Mami, eres la mejor del mundo, tu amor y tu entrega incondicional me hacen sentir cada vez más fuerte.

A mi hermano Luis Rafael, porque eres único y especial; en realidad tú me has apoyado en muchas cosas, de veras no tengo como agradecerte; en ti he sentido una mano capaz de ayudarme en los momentos más difíciles.

A mis tíos Víctor Rojas y María S. de Rojas, quienes pudieron dirigirme y encaminarme por esta agitada ciudad llamada Caracas y tenerme mucha paciencia. En verdad son únicos y para mí son demasiado especiales.

A mis primas María V. y María A.; con quienes compartí momentos de alegrías, lágrimas, tristezas, etc, y me brindaron todo el apoyo sin esperar nada a cambio.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, que me ha llevado al logro de esta ardua tarea, la cual algunas veces se llega a perder el sentido durante los días difíciles y era preferible dejarlo todo.

A la Dra Tina Correnti, quien me ha ayudado a entender el sentido de la Inmunología y con su dedicación todo se hizo en un ambiente placentero y con mucha armonía. Dra, siempre la recordaré.

Al Dr. Oscar Valbuena quien, de una manera desinteresada y cariñosa me ayudó a ver la inmunología con cariño.

A mis amigas, quienes nunca me han dado la espalda y me han brindado todo su apoyo. Marlene, Belkis, ustedes son para mí como parte de mi familia...infinitas gracias.

A mi querida docente, Dra. Onelia Crespo, con quien compartí momentos de conocimiento, alegría, intensidad, tristezas y me ayudó a sobrellevarlo de la mejor manera, siempre con su palabra sabia a flor de piel.

## LISTA DE CONTENIDOS

	PÁGINA
Dedicatoria .....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	x
Lista de gráficos.....	xi
Resumen.....	xii
I.- Introducción.....	1
II.- Revisión de la literatura.....	4
1.- Inmunología General.....	4
2.- Microorganismos implicados en la caries.....	10
2.1.-Colonización primaria.....	10
2.1.1.- <i>Streptococcus</i> .....	13
2.1.1.1.-Factores de virulencia de <i>S. mutans</i> .....	14
2.2.- Colonización secundaria.....	16
2.2.1.- <i>Lactobacillus</i> .....	18
2.2.2.- <i>Veillonella</i> .....	23
3.- Respuesta inmunológica en el niño.....	24
3.1.- Limitaciones inmunológicas del recién nacido.....	25
3.2.- Desarrollo de la respuesta celular. Población de células B1 (CD5+).....	27

3.3.- El Sistema Th1/Th2 en el feto y el recién nacido.....	29
3.4.- Desarrollo prenatal de los mecanismos de la inmunidad .secretora.....	31
3.5.- Desarrollo del sistema inmunológico durante la infancia.....	33
3.6.- Respuesta inmunológica contra la caries en el niño.....	35
4.- El Sistema Inmunitario Secretor.....	36
4.1.- MALT .....	38
4.1.1.- GALT.....	40
5.- La respuesta inmunológica en la caries dental.....	42
6.- Predisposición genética a contraer caries dental.....	46
7.- Inmunidad celular.....	50
8.- Saliva y respuesta inmunológica.....	53
8.1.- Respuesta humoral frente a la caries.....	54
8.1.1.- Anticuerpos salivales.....	55
8.1.2.- Estructura, síntesis y funciones.....	56
8.1.3.- Anticuerpos séricos .....	61
9.- Métodos utilizados para la evaluación de la respuesta inmunológica a la caries.....	63
9.1.- Inmunoprecipitación .....	64
9.2.- Aglutinación.....	65
9.3.- Fijación del complemento.....	67
9.4.- Inmunofluorescencia.....	68

9.5.- ELISA.....	70
9.5.1.- Técnica Sándwich o directa .....	71
9.5.2.- Técnica Elisa indirecto .....	72
9.5.3.- Elisa Competitivo.....	73
9.6.- Inmunoblotting.....	74
9.7.- Detección de la respuesta celular.....	76
9.7.1.- Fagocitosis.....	77
9.7.2.- Estimulación linfocitaria.....	78
9.7.3.- Citotoxicidad.....	80
9.7.4.- PCR.....	82
10.- Vacunas y caries dental.....	85
10.1.- Pac.....	87
10.2.- GTFs.....	88
10.3.- GBPs.....	88
11.- Inmunización pasiva.....	90
11.1.-Anticuerpos monoclonales.....	92

## LISTA DE FIGURAS

	<b>PÁGINA</b>
1.- Regiones del sistema inmunitario secretor .....	37
2.- Función de las APCs.....	40
3.- Transporte de la IgA secretora.....	42
4.- La respuesta inmunológica de la saliva.....	46
5.- Desarrollo de la inmunidad celular .....	52
6.- Estructura de la IgA secretora.....	57
7.- Procedimiento para la inmunoprecipitación.....	65
8.- Técnica de aglutinación.....	66
9.- Técnica de fijación del complemento.....	68
10.- Inmunofluorescencia indirecta.....	69
11.- Inmunofluorescencia directa.....	70
12.- Técnica de Sándwich.....	72
13.- Técnica de ELISA indirecto.....	73
14.- ELISA competitivo.....	74
15.- Técnica de Inmunoblot.....	76
16.- Técnica de la estimulación blástica.....	79
17.- Técnica de la citotoxicidad.....	81
18.- Técnica de PCR.....	84
19.- Producción de Anticuerpos monoclonales.....	93

## LISTA DE TABLAS

### PÁGINA

1.- IgG durante desarrollo prenatal y postnatal.....	32
2.- Funciones de la IgA secretora.....	57

## LISTA DE GRÁFICOS

### PÁGINA

1.- Cambios asociados a la edad en los niveles de la IgG sérica .....	34
2.- Anticuerpos séricos frente al <i>S. mutans</i> .....	49

## RESUMEN

La caries dental es una enfermedad de etiología multifactorial, que involucra factores complejos, tales como: La susceptibilidad genética del individuo donde los alelos ubicados en el Complejo Mayor de Histocompatibilidad modulan la inmunocompetencia del sistema inmunológico; el cual determina la cantidad y calidad de anticuerpos, así como la cantidad y producción de células efectoras y la cantidad de las proteínas del complemento. La virulencia producida por los microorganismos de la placa dental marca la capacidad infectiva de los mismos, al igual que la infectividad de estos y su capacidad replicativa. Los hábitos de higiene y alimentación del hospedero está relacionada con la susceptibilidad del mismo, ya que una dieta pobre en nutrientes aumenta la predisposición a contraer infecciones.

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE ODNTOLOGÍA  
POSTGRADO DE ODONTOLOGÍA INFANTIL**

**APECTOS INMUNOLÓGICOS LOCALES DE LA CARIES  
DENTAL**

Trabajo especial presentado ante la ilustre  
Universidad Central de Venezuela por la  
Odontólogo Anyuska Medina Rojas para  
optar al título de especialista en  
Odontología Infantil

Caracas, 08 de Diciembre de 2005

## I.- INTRODUCCIÓN

La caries dental se considera una lesión localizada en los tejidos mineralizados del diente, de carácter infeccioso y de naturaleza inespecífica causada por una gran cantidad de factores que la hace de etiología multifactorial. Se inicia con la formación de la película adquirida donde se encuentran involucrados microorganismos que hacen posible su formación, tales como los del género *Streptococcus*, los cuales representan las primeras colonias bacterianas en agregarse a la superficie de la película adquirida, produciendo ácidos responsables del ataque carioso<sup>1</sup>. En segundo lugar se suman los *Lactobacillus*, una vez que el proceso de descalcificación ha sido instaurado<sup>2,3</sup>.

Hasta la actualidad, esta enfermedad ha sido más tratada que prevenida; es por ello que el odontólogo debe tener conocimiento de su formación desde todos los puntos de vista.

Han sido numerosas las teorías que tratan de definir su producción, éstas abarcan desde las teorías primitivas, como la teoría vermicular, la humoral y la de Van Leeuwenhoek (S. XVII); pasando por la teoría vital de Jourdain (S. XVIII), la

teoría Química de Parmlly (1819), la teoría Químico parasitaria de Miller (1882), la proteolítica de Gotlieb, la de proteólisis-quelación, la teoría de las sulfatasas y de las fosfatasas endógenas, llegando por último a la teoría endógena trofo-microbiana y a la endógena simpática; donde en éstas últimas no solo se incluyen los microorganismos implicados, sino la alteración del equilibrio iónico incluyendo una falla del Sistema Nervioso Vegetativo, produciendo desajuste en la secreción de saliva que genera la descalcificación del tejido<sup>2,3,4</sup>.

Una vez que el tejido del diente ha sido descalcificado, la caries avanza hasta llegar a la pulpa. Sin embargo, existen mecanismos complejos en el individuo que poseen la capacidad de detener la invasión microbiana a partir de ciertos componentes internos<sup>1,4</sup>.

Desde el punto de vista inmunológico, es válido decir que la caries dental representa una lesión donde no sólo tienen relevancia el número y la virulencia de los microorganismos que intervienen, sino que también el individuo es capaz de crear una barrera, generada por la actividad de la saliva. Este fluido además de actuar como medio amortiguador que ayuda a neutralizar la acidez del medio; contiene moléculas del

sistema de defensa como las inmunoglobulinas A y G (IgA, IgG), principales componentes de la inmunidad humoral, que tienden a contrarrestar la invasión microbiana. También es importante destacar el papel que ejercen los linfocitos T como generadores de la inmunidad celular<sup>1,2,5</sup>.

El propósito de este trabajo es suministrar información acerca de los aspectos inmunológicos de carácter local que se producen durante la formación de la caries dental, así como determinar los agentes involucrados en este proceso y los posibles sistemas de protección para evitar la caries.

## II.- REVISIÓN DE LA LITERATURA

### 1.- INMUNOLOGÍA GENERAL

La Inmunología es la ciencia que estudia el sistema inmunológico, al igual que los órganos, tejidos, células y los factores que tienen como fundamento, la defensa del individuo. Los organismos están expuestos a los microorganismos tales como virus, bacterias, protozoos, hongos o las moléculas producidas por ellos<sup>1,4</sup>.

La respuesta inmunitaria abarca una serie de mecanismos que participan en la defensa contra las infecciones y en otros procesos patológicos no infecciosos como los fenómenos alérgicos, autoinmunes o de rechazo de injertos. El sistema inmunológico dispone de los mecanismos innatos y los mecanismos adaptativos, para reconocer a los microorganismos causantes de las infecciones y desarrollar respuestas que consigan su eliminación<sup>3,5</sup>.

La **respuesta innata** se define como un estado de respuesta no modificada por el contacto repetido con una

sustancia, de acción inmediata y carece de memoria inmunológica; a diferencia de la **inmunidad adaptativa**, que es un estado de respuesta frente a una sustancia modificada por la exposición previa a esta, de acción lenta, su mecanismo de reconocimiento es específico y tiene memoria inmunológica<sup>1,3,6</sup>.

El sistema inmunológico está constituido por células distribuidas en los órganos centrales y periféricos; presenta un mecanismo de activación y regulación, basado en la producción de marcadores de membrana, factores solubles denominado citocinas (linfocinas, monocinas, interleucinas). Los marcadores de membrana (clusters de diferenciación o CD) son proteínas de membrana de los leucocitos que participan en la diferenciación y maduración celular, linaje celular, estado de activación celular, receptores (antígeno, complemento, inmunoglobulinas, citocinas) o como moléculas de adhesión<sup>2,3,6,7</sup>.

El sistema inmunológico está formado por un grupo de células distribuidas por los órganos centrales y periféricos de todo el organismo. Su activación da origen a la aparición de dos tipos de respuesta: La respuesta inmunitaria humoral y la

respuesta inmunitaria celular. La **respuesta inmunitaria humoral** se caracteriza por la producción de inmunoglobulinas o anticuerpos, capaces de reconocer y reaccionar frente a la sustancia que provocó la activación del sistema inmunitario (antígenos o Ags); los anticuerpos son producidos por las células plasmáticas, que derivan de los linfocitos B<sup>7,8,9</sup>. En la **respuesta inmunitaria celular** participan los linfocitos T o timodependientes, los cuales al ser sensibilizados por el contacto previo con el antígeno, son capaces de reconocerlo o de producir citocinas con actividad reguladora de la respuesta inmunológica<sup>1,7,8</sup>.

Existen unos órganos y tejidos linfoides primarios o centrales que se encargan de la linfopoyesis: médula ósea y timo. La médula ósea produce las células precursoras de las células del sistema inmunológico y es el lugar donde maduran los linfocitos B. En el timo se produce la selección y maduración de las células precursoras de los linfocitos T<sup>6</sup>. Los órganos y tejidos linfoides secundarios o periféricos (médula ósea, bazo, ganglios linfáticos y agrupaciones asociadas a las mucosas) permiten la coexistencia de linfocitos T y B junto con otros leucocitos y el reconocimiento de antígenos. Cada uno de estos órganos está especializado en responder a

determinados antígenos o patógenos según su forma de acceso al organismo<sup>7,8</sup>.

Los linfocitos T y B son las células centrales de la respuesta inmunitaria específica y expresan en su membrana receptores (TCR y BCR, respectivamente) que permiten que reconozcan a los antígenos de forma específica<sup>3,5,7</sup>. Los **linfocitos Th** (helper o cooperadores) tienen la función de ayudar y coordinar la acción de los linfocitos B (respuesta humoral o de anticuerpos) Actualmente se conocen dos receptores antigénicos de las células T que se diferencian predominantemente por el tipo de linfocinas que producen: Th1, presente en 5% de las células sintetiza interleucina 2 (IL-2) y Th2 que se encuentran en el 95% restante, productor de IL-4<sup>1,7</sup>.

Los **linfocitos Tc/s** (citotóxicos o respuesta celular), constituyen el 35% de los linfocitos circulantes. Dentro de esta población se distinguen dos grupos celulares con diferentes funciones: Las **células T supresoras**, que intervienen en los fenómenos de regulación de la respuesta inmunitaria y las **células T citotóxicas**, responsables de los fenómenos citotóxicos restringidos por el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I. Tienen la capacidad de

reconocer a los antígenos presentes en la superficie de algunas células (tumores, células infectadas por virus)<sup>1,5,6,9</sup>.

El **Complejo mayor de Histocompatibilidad (CMH)**, por participar en los procesos antes mencionados, se conoce como sistema HLA (human leucocyte antigen). En el hombre el CMH está codificado por genes presentes en el brazo corto del cromosoma 6 y se hereda de forma autosómica dominante. En esa región cromosómica se encuentran los genes que codifican tres grupos de moléculas del CMH (genes de clase I, clase II y clase III). La función biológica de las moléculas de histocompatibilidad es la de presentar péptidos antigénicos para la activación de los linfocitos T y la capacidad de diferenciar lo propio y lo no propio<sup>7,8,9,10,11</sup>.

Las **células presentadoras de antígeno (APC)** incluyen a un grupo celular heterogéneo caracterizado por la expresión de moléculas de clase II del CMH, que intervienen en la presentación del antígeno a los linfocitos T colaboradores. Dentro de este grupo de células tenemos las células dendríticas foliculares de las formaciones linfáticas periféricas, los macrófagos, las células de Langerhans de la piel, las células interdigitadas del timo y los linfocitos B. Tienen la capacidad innata de capturar y procesar antígenos

que posteriormente presentan de forma adecuada (pequeñas cadenas de péptidos) a los linfocitos T<sup>6,9,10</sup>.

Los **linfocitos NK** (Natural killer) poseen una actividad citolítica innata y no necesitan una activación previa para destruir células tumorales o infectadas por virus<sup>5,7,8,11</sup>.

Las células del linaje mieloide incluyen a los monocito-macrófagos (fagocitos mononucleares) y a los granulocitos polimorfonucleares (PMN), encargadas de destruir a los patógenos, bien por fagocitosis o mediante una respuesta inflamatoria. Los **monocitos** contienen lisosomas cargados de enzimas con capacidad citotóxica. Entre las funciones más importantes de los **macrófagos** se encuentran la destrucción de antígenos, capaces de adherir, opsonizar, fagocitar, destruir microorganismos y células, así como la presentación del antígeno procesado a los linfocitos T cooperadores<sup>1,9,10</sup>.

El complejo balance entre los elementos que constituyen el sistema de defensa, dirigido por las características genéticas del individuo, predisponen a la adquisición de infecciones aumentando la susceptibilidad a desarrollar enfermedades.

## **2.- MICROORGANISMOS IMPLICADOS EN LA CARIES**

Debido a que el desarrollo de la caries está fuertemente determinado por un delicado equilibrio entre las condiciones genéticas del individuo y las características de virulencia de los microorganismos involucrados, es importante revisar el microambiente y las bacterias comprometidas en el desarrollo de la enfermedad.

### **2.1. Colonización primaria**

La mayor parte de las bacterias derivan de los ecosistemas orales bañados por la saliva, que una vez establecida la película adquirida y en ausencia de una higiene oral adecuada, comienzan a depositarse las primeras poblaciones bacterianas en forma específica; tomando en cuenta la adsorción selectiva de las bacterias, en este caso sobre la película, sobre otras bacterias o sobre la placa formada con anterioridad. Los iones calcio presentes en la saliva pueden neutralizar las cargas negativas entre las bacterias y las glucoproteínas y actuar como puentes entre la película y las

bacterias<sup>8,10</sup>.

*Streptococcus sanguis*, es el primer microorganismo que se adhiere a la superficie de la película adquirida y como tal, inicia la colonización microbiana en la formación de la placa dental supragingival e inmediatamente se adhiere a *Actinomyces viscosus*. Algunos autores señalan que *S. sanguis* y *A. viscosus* son los microorganismos pioneros en la colonización de la placa dental, y que la asociación de estas bacterias con la superficie del diente es considerada como un prerrequisito para la colonización posterior de especies, preferentemente de los géneros *Veillonella* y *Fusobacterium*. Otras bacterias que inician el proceso de colonización son *Streptococcus* del grupo oralis (*S. oralis*, *S. mitis*), *Actinomyces sp.*, *Neisserias sp.*, y *Haemophilus sp*<sup>10</sup>.

Inicialmente la colonización por los *Streptococcus*, especialmente el *sanguis*; se efectúa mediante uniones tipo lectina-carbohidratos; inmediatamente se agrega el *Actinomyces viscosus* con el mecanismo de unión proteína-proteína y los otros *Streptococcus*, mediante mecanismos no muy bien conocidos<sup>10,11,12</sup>. Dichas bacterias están unidas a la

película adquirida por enlaces débiles y reversibles, aunque cierto número de ellas quedan firmemente adheridas y empiezan a proliferar, iniciando fenómenos de agregación y coagregación bacteriana, e incorporando *Streptococcus* peroxidógenos como el *S. mitis*, *S. gordinii*, *S. crista* y otras bacterias como *Rothia dentocariosa*, *Neisseria sp.* y *Corynebacterium matruchotii*<sup>13,14</sup>. La placa fina goza de un metabolismo básico aerobio, formada por microorganismos con esta característica respiratoria, junto a anaerobias facultativas que se adaptan perfectamente a estas circunstancias como son los *Streptococcus*<sup>1,2,3,9,15</sup>. La excepción la constituiría *Veillonella spp.* que sobrevive a partir del lactato, producto metabólico de otros microorganismos de la placa y además posee sistemas especiales de resistencia al oxígeno, como la enzima superóxido dismutasa<sup>12,16</sup>.

En los estudios de placa realizados mediante el microscopio electrónico, se ha observado en dicha etapa, imágenes en forma de granos de maíz, por el predominio de los cocos y posteriormente se ven las típicas mazorcas con formas filamentosas recubiertas de cocos<sup>1,6,15</sup>.

El papel del *S. mutans* en esta fase es variable, dado que

hay placas no cariogénicas, en las que se reportan en bajo número o ausente, sin embargo en las dos últimas décadas, los reportes sobre los mecanismos de adherencia del *S. mutans* y el *S. sobrinus* a la superficie dura dental son confusos y controvertidos<sup>9,17</sup>. Actualmente se sabe que los componentes salivares absorbidos sirven como receptores para las proteínas de unión de *S. Mutans*, mientras que las GTF y los glucanos adsorbidos refuerzan esta adherencia<sup>13</sup>. Debido a la especificidad de las interacciones bacterianas en la película adquirida, se cree que debe transcurrir un cierto tiempo hasta que la presencia de sacarosa induzca su aparición. Otro tanto parece que ocurre con los *Lactobacillus*, cuyo número de microorganismos en esta fase parece insignificante, salvo en placas cariogénicas; en este caso es debido a fenómenos de unión física por atrapamiento de los mismos en la red que se está formando<sup>18,19</sup>.

### **2.1.1- Streptococcus**

Los microorganismos pertenecientes al género *Streptococcus*, básicamente las especies *mutans* (con sus serotipos c, e y f), *sanguis*, *sobrinus* y *cricetus*, han sido asociados a la caries, tanto en animales de experimentación como en humanos. Los *Streptococcus* son bacterias que

presentan forma de coco, crecen en cadenas o en parejas, no tienen movimiento, no forman esporas y generalmente reaccionan positivamente a la coloración de Gram. El *S. mutans*, que ha sido el más aislado en lesiones cariosas en humanos, es el primero en colonizar la superficie del diente después de la erupción. Su nombre lo recibe de su tendencia a cambiar de forma pudiéndose encontrar como coco o, de forma más alargada, como bacilo<sup>12,16</sup>.

#### **2.1.1.- Factores de virulencia de *Streptococcus***

Cuando se habla de virulencia de un microorganismo, se está haciendo referencia a su capacidad de generar una enfermedad. Los factores de virulencia son aquellas condiciones o características específicas de cada microbio que lo hacen patógeno. En el caso de *S. mutans*, los más involucrados en la producción de caries son<sup>12,16,17</sup>.

**a) Acidogenicidad:** A partir de la fermentación de la sacarosa, el *S. mutans* produce principalmente ácido láctico, fundamental en la virulencia debido a que es el ácido más potente que interviene en la desmineralización del diente. La síntesis de polisacáridos proporcionan a la célula un sustrato

de donde obtener energía y mantener la producción de ácidos durante largos períodos de tiempo.

**b) Aciduricidad:** Consiste en la capacidad de producir ácido en un medio con pH bajo.

**c) Acidofilicidad:** El *S. mutans* puede resistir la acidez del medio bombeando protones ( $H^+$ ) fuera de la célula. Esta propiedad le confiere la tolerancia necesaria para sobrevivir y desarrollarse en un medio con pH bajo.

**d) Síntesis de glucanos y fructanos:** Por medio de enzimas como glucosil y fructosiltransferasas (GTF y FTF), se producen los polímeros glucano y fructano, a partir de la sacarosa. Los glucanos insolubles pueden ayudar a la célula a adherirse al diente y ser usados como reserva de nutrientes.

**e) Síntesis de polisacáridos intracelulares:** Como el glucógeno: sirven como reserva alimenticia y mantienen la producción de ácido durante largos periodos aún en ausencia de consumo de azúcar.

**f) Producción de dextranasa:** Además de movilizar reservas de energía, esta enzima puede regular la actividad de las glucosiltransferasas removiendo productos finales de glucano.

## **2.2.- Colonización secundaria**

El desarrollo de las poblaciones bacterianas en la placa es un proceso de transformación progresivo durante el cual la placa aumenta en grosor y en complejidad, comienza entre los 3 a 5 días de la formación de la película adquirida<sup>17</sup>. Continúan los fenómenos de agregación y coagregación bacteriana y también aunque en menos grado, la adhesión de microorganismos a la película. Las bacterias comienzan a aumentar en número, y se da inicio a un proceso de sucesión ecológica autogénica (los microorganismos residentes modifican el ambiente de tal forma que ellos mismos pueden ser sustituidos por otros más adaptados al hábitat modificado). En estas condiciones la placa es un conglomerado bacteriano proliferante y enzimáticamente activo adherida fuertemente a la superficie dentaria<sup>9,12</sup>. Los cambios microbianos que se van produciendo están ligados a diversas causas.

Se presentan antagonismos por competencias de sustratos, producción de  $H_2O_2$  y bacteriocinas y especialmente por consumo de oxígeno, con lo que las bacterias más aeróbicas van siendo sustituidas por anaerobias facultativas. Entran en juego los suministros nutricionales, a partir de fuentes interbacterianas excretoras de elementos energéticos fundamentales. Se observan cambios morfoestructurales con un aumento de formas bacilares, especialmente de *Actinomyces spp.*, los anaerobios más estrictos invaden las zonas más profundas de la placa, los aerobios se disponen en la superficie, y los *Streptococcus* que siguen siendo los más abundantes y altamente facultativos se localizan en cualquier lugar de la placa. Como toda estructura viviente para persistir necesita energía, la que toma de carbohidratos fermentables y provenientes de la dieta, los cuales son desdoblados por la vía glucolítica, obteniendo ATP con producción de  $CO_2$  y ácido láctico y en menor proporción otros ácidos orgánicos como butírico, acético etc.; los cuales van a producir la desmineralización de los cristales de hidroxiapatita iniciando el proceso carioso<sup>11,12,17,20,</sup>

Después de siete días de formada la placa dental, las

especies de *Streptococcus* continúan siendo el grupo predominante, pero a las dos semanas hay un predominio de bacilos anaerobios y las formas filamentosas. Estos cambios microbianos que se van produciendo van ligados a diversas causas, tales como: antagonismo por competencia de sustratos; producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; y especialmente por el consumo de oxígeno en el ambiente, por lo que ocurre una sustitución de especies bacterianas Gram + facultativas por especies bacterianas anaerobias facultativas y estrictas Gram -, proceso llamado Sucesión Autogénica<sup>16</sup>.

La coagregación es un factor primordial que interviene en el crecimiento y posterior maduración de la placa dental, en la cual la adherencia de nuevos microorganismos se realiza sobre la primera capa de estos ya unidos a la superficie del diente. Estas interacciones suceden específicamente a través de proteínas de tipo lectinas y menos específicas resultantes de las fuerzas hidrófobas, electrostáticas y de Van der Waals<sup>12,16,17</sup>.

### **2.2.1.- *Lactobacillus***

El predominio del *Lactobacillus* parece ser alto en la

mayoría de las poblaciones estudiadas. Sin embargo la cantidad de bacterias (según lo medido en saliva) parece variar considerablemente, entre distintos individuos y a veces en los mismos individuos a diversas horas. El *Lactobacillus* es dependiente en sitios retentivos, y las caries profundas son los sitios más importantes y preferidos de éste microorganismo. El contaje de *Lactobacillus* también fluctúa con el producto y la frecuencia de la disponibilidad de los carbohidratos. En muchos casos hay una relación entre la cantidad de *Streptococcus mutans* y de números del *Lactobacillus* presentes, pero existen casos donde tal relación se pierde<sup>19,22</sup>.

En un estudio realizado en individuos adultos suecos, el 50% tenía un contaje  $\geq 10^6$  unidades formadoras de colonia (ufc) por mL de saliva de *Streptococcus mutans* y el 40% presentaban  $\geq 10^5$  ufc de *Lactobacillus* por mL de saliva. En otro estudio, se evaluó un grupo de niños en edades comprendidas entre 9-12 años, obteniéndose que el 50 % tenían un contaje  $< 10^5$  ufc/mL en saliva y el 22%  $\geq 10^5$  ufc/mL saliva o más. Una conexión entre el predominio del *S. sobrinus* y del alto nivel de *Lactobacillus* salivales se puso en evidencia; en un estudio realizado en

Reykjavik en niños de 4 años, casi todos portaban el microorganismo *S. mutans* pero solamente el 58% de ellos presentaban *Lactobacillus*<sup>23,24</sup>.

En un trabajo realizado en los años de 1987-1998 en un grupo escolar perteneciente al Instituto integrado de Kumla, Suecia el predominio y el número de *Lactobacillus* salivales fueron determinados en todos los alumnos que comenzaban el 7° grado (1578 estudiantes), en edades comprendidas entre 12 y 13 años. Las muestras de saliva fueron tomadas en cada alumno y sometidas a exámenes clínicos. El número de *Lactobacillus* relacionado al predominio de la caries y de restauraciones exhibieron una tendencia perceptiblemente más baja en 1998 que en 1987. El predominio de caries (DFS) declinó de 5,2 a 1,8. En 1987, el 45% de los niños reportaron contaje alto de *Lactobacillus* ( $\geq 10^5$  ufc/mL) en saliva, comparando con los resultados obtenidos en 1998. La proporción de niños sin caries varió entre 4-29% durante el período del estudio, mientras que los niños con contajes bajos de *Lactobacillus* en saliva ( $10^3$ - $10^4$  ufc/mL) constituyeron la mayoría en las muestras<sup>26</sup>.

En Escocia en el año 2000 se comparó la frecuencia del aislamiento de *Streptococcus mutans*, (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*), de *Lactobacillus* y de levaduras (microorganismos asociados a la caries), en la saliva de niños de 1 año con y sin caries; y se determinó si el estrato socioeconómico influyó la frecuencia de bacterias presentes y el estado de la caries. El grupo a estudiar consistió en una muestra de 1393 niños de 1 año. Se determinó que 39 infantes eran portadores de caries y las frecuencias del aislamiento de microorganismos cariogénicos asociados fueron comparadas con los infantes que no presentaban caries. Además, los microorganismos *Streptococcus mutans* (29,7%), *Lactobacillus* (15,4%) y las levaduras (23,7%) fueron aislados con más frecuencia de los niños con caries. No se aisló en los niños con caries el *S. Sobrinus*; sin embargo, los niños de estrato socioeconómico bajo presentaron las más altas frecuencias de caries al compararse con niños de condición socioeconómica alta<sup>26</sup>.

Actualmente los *Lactobacillus* se consideran como un factor determinante a la predisposición del desarrollo de la caries. Durante el primer paso en la colonización, los microorganismos se adhieren a los tejidos del diente. El

propósito del citado trabajo fue determinar si hay una relación estadística o alguna diferencia relacionada a la condición bucal con la superficie del *Lactobacillus*. Estudios preliminares de *Lactobacillus* aislados, al igual que las condiciones de higiene y nutricionales de los pacientes. El conteo de *Lactobacillus* fue estadísticamente más bajo en saliva en sujetos con buena higiene bucal. Los *Lactobacillus* en sujetos con caries activas demostraron una gran capacidad de adherirse a las sustancias hidrofóbicas, la más grande propiedad de aglutinarse a las sales y muestran la más baja producción de sustancias inhibitoras<sup>25,27</sup>.

### **2.2.2-Veillonella**

Aunque las evidencias epidemiológicas apuntan a *Streptococcus mutans* como causante de las caries, estas pueden envolver comunidades más complejas. Mediante clonación y secuenciación de los ADNs ribosómicos 16S, Becker MR et al encuentran diferencias entre los microorganismos encontrados en sujetos sanos (*Streptococcus sanguis*) y los encontrados en individuos con caries: *Actinomyces gerencseriae* (iniciador), *Bifidobacterium* (caries profundas), *S. mutans*, *Veillonella*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus parasanguis* y

*Lactobacillus fermentum*. Se calcula actualmente que hay unas 260 especies bacterianas orales cultivadas y la diversidad actual se piensa que es de 500 especies<sup>17</sup>.

Los organismos anaerobios respecto a los aerobios están presentes en una relación de 10:1. Además estos organismos poseen preferencia al área que colonizan de la cavidad bucal, los tejidos finos bucales. Por ejemplo, *S. salivarius* y *Veillonella* se encuentran más comúnmente en saliva, en la lengua y en las superficies bucales, mientras que *el S. mitis* y *el S. mutans* se encuentran más comúnmente en las superficies del diente<sup>23,24,28</sup>.

En el niño también se produce colonización en la cavidad bucal, por parte de las bacterias anteriormente mencionadas, reportándose que *Lactobacillus* y *Veillonella*, constituyen los primeros habitantes de la microbiota bucal; donde la respuesta inmunológica frente al ataque carioso depende del estado de maduración del sistema inmunológico.

### 3.- RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN EL NIÑO

En el **embrión** el sistema inmunológico se desarrolla paralelamente a las células hematopoyéticas, comenzando en los primeros días de la vida embrionaria. Los esbozos linfoides más precoces surgen en forma de yemas situadas en el saco vitelino y en una zona próxima al mesonefros, aorta y gónadas. Luego se trasladará al hígado, donde fundamentalmente radicará la actividad linfocitaria durante la vida fetal. Los linfocitos T necesitan completar su maduración en el timo, por el contrario, los linfocitos B la finalizan en los propios órganos hematopoyéticos. Posteriormente se planteó la hipótesis afirmando que estos pasos de maduración del sistema linfóide no ocurren de una forma rígida y que hay migraciones celulares más directas y precoces hacia el hígado y médula ósea fetal<sup>5</sup>.

En el **recién nacido**, la hematopoyesis ya se realiza eminentemente en la médula ósea, aunque el lactante mantendrá durante semanas una capacidad funcional extramedular de reserva, que en ciertas situaciones le resulta

muy útil<sup>7,30</sup>.

La colonización materna conlleva a la adquisición de anticuerpos maternos por parte del feto. La respuesta inmunológica puede estar relacionada con la colonización materna y los factores genéticos. Una alta colonización materna puede facilitar el desarrollo de una respuesta protectora en el hijo. Se ha demostrado la existencia de diferencias en la respuesta a antígenos que pueden tener base genética<sup>5</sup>.

### **3.1.- Limitaciones inmunológicas del recién nacido**

El recién nacido no posee un sistema inmunológico maduro y esta inmadurez es aún más afectada en caso de parto prematuro. Las limitaciones de la inmunidad neonatal afectan en mayor medida a todos los mecanismos inmunológicos y ello repercute de forma relevante ante la administración de vacunas<sup>30,31</sup>.

Entre las características inmunológicas del recién nacido se ha evidenciado que debido a que ningún factor del

complemento atraviesa la placenta, y el feto empieza a sintetizarlos entre las 4-19 semanas de gestación, según cuál sea el factor, todos están disminuidos al nacimiento. La actividad funcional total del complemento de un recién nacido, sólo alcanza un 50% de la presentada por su madre. Al evaluar la funcionalidad de los linfocitos T *in vitro* se ha observado que responden a los mitógenos de forma inferior a lo normal, además estas células liberan bajas cantidades de citoquinas ante cualquier estímulo. La citotoxicidad mediada por linfocitos T CD8 es deficiente, y también lo es la colaboración de las células T CD4 con los linfocitos B para sintetizar anticuerpos. Los linfocitos vírgenes (CD45RA) predominan, sobre los linfocitos de memoria (CD45R0). Los linfocitos B presentan fenotipos inmaduros en el recién nacido, con dos inmunoglobulinas (IgD, IgM) en la superficie celular, lo que señala la falta de contacto antigénico previo. La síntesis de anticuerpos está disminuida, especialmente aquella que se produce contra polisacáridos y que es independiente de los linfocitos T, pero también la que tiene lugar contra antígenos proteicos, reacción que sí es dependiente de los linfocitos T<sup>31</sup>.

En el feto, la respuesta inmunológica parece orientarse

globalmente en dirección supresora, como corresponde a su situación de injerto en el organismo materno. El recién nacido heredará esta condición, y en parte la mantendrá el lactante hasta que vaya ocurriendo una maduración funcional inmunológica, que en algunos aspectos se retrasará durante meses, incluso años<sup>21,30,31</sup>.

### **3.2.- Desarrollo de la respuesta celular. Población de células B1 (CD5+)**

Existe una población de linfocitos B, denominada B1, que sólo representa un 5% de los linfocitos B del adulto, pero que merece una especial atención por sus peculiaridades y diferencias con la población normal (B2). Además están muy aumentados en la sangre del cordón umbilical y en los primeros meses de vida, participando en reacciones inmunológicas independientes de los linfocitos T dirigidas contra polisacáridos<sup>31</sup>.

La primera peculiaridad es que los linfocitos B1 presentan de forma universal y constitutiva el antígeno de superficie CD5, que es propio de los linfocitos T, ignorándose qué papel juega en esta subpoblación B, aunque quizás participe en

episodios de maduración. Otra característica es que los linfocitos B1 sólo se generan durante la vida fetal, sobreviviendo en cantidad decreciente hasta la edad adulta, sólo por autorregeneración. En experimentos realizados en ratas, se localizan con preferencia en el peritoneo, sugiriendo que cumplen allí prioritariamente sus funciones, pero en el hombre tienen una distribución más amplia, por tejidos linfoides y circulación sanguínea<sup>30,31</sup>.

Las células B1 funcionan con independencia de los linfocitos T. Responden preferentemente contra antígenos hidrocarbonados y sintetizan anticuerpos IgM de forma casi exclusiva. Los anticuerpos que liberan tienen muy escasa afinidad y especificidad, y con frecuencia se desconoce cuál fue el antígeno concreto que desencadenó la respuesta. Por ello, estos anticuerpos reciben a veces la consideración de "anticuerpos naturales". Las isohemaglutininas anti-A o anti-B son un ejemplo de anticuerpos producidos por los linfocitos B1. Aunque en la vida adulta maduran, mejorando su eficacia, en el recién nacido y en el lactante pequeño muestran importantes limitaciones funcionales; sin embargo, pudieran tener cierto protagonismo en la respuesta infecciosa y vacunal contra lipopolisacáridos (LPS) y contra polisacáridos

capsulares. Se puede especular si los linfocitos B1 en el hombre son un residuo del desarrollo filogenético o si tienen algún papel en la respuesta natural anti-bacteriana<sup>31</sup>.

En los últimos años, la población B1 ha adquirido un interés renovado al observarse que la mayoría de las leucemias linfoides crónicas derivan de células B1 y que están implicados en la autoinmunidad ya que estas células sintetizan autoanticuerpos, como IgG anti-ADN, frecuentes de forma asintomática en edades avanzadas, pero otras veces relacionados con procesos patológicos<sup>30</sup>.

### **3.3.- El sistema Th1/Th2 en el feto y en el recién nacido**

La unidad fetoplacentaria muestra un predominio de la función Th2, que en cierto grado también ocurre en las células maternas. Este predominio Th2 es necesario para la normal evolución del embarazo y experimentalmente se ha observado que la activación Th1 por infecciones, parásitos o inmunizaciones pone en peligro su continuidad<sup>18,31</sup>.

Los linfocitos fetales son capaces de sensibilizarse intrauterinamente si entran en contacto con antígenos y esta sensibilización intrauterina sigue un patrón tipo Th2. Por el

contrario, tienen mayor dificultad para establecer una respuesta de tipo celular retardada (Th1), lo que explica su dificultad para aislar localmente una infección y evitar que se disemine. De todos modos, es importante señalar que el recién nacido tiene limitaciones para producir respuestas inmunológicas de cualquier orden. Esta situación que se describe en el feto también la presenta el recién nacido durante los primeros meses de la vida y quizás por más tiempo en algunas situaciones anómalas. Esto tiene repercusión en temas como infecciones, atopia y por supuesto en la reacción a las vacunas. Una cuestión interesante es que la reacción inmunológica ocurrida en este periodo de inmadurez genera células de memoria de tipo Th2 que posiblemente condicione la forma de responder en la vida futura<sup>29,30,31</sup>.

Se debate la hipótesis de que algunos factores externos puedan modificar transitoria o permanentemente el equilibrio Th1/Th2. Los virus y las infecciones intracelulares activan especialmente a los linfocitos Th1, pero otras inmunizaciones actúan selectivamente sobre las Th2. Con respecto a las vacunas, se trata de estimulaciones enfocadas hacia la síntesis de anticuerpos, y la activación de las células de

memoria. A pesar de todas las especulaciones, hasta la fecha no se ha comprobado que las vacunaciones infantiles administradas en edades precoces puedan estar modificando de forma relevante el normal equilibrio Th1/Th2<sup>21,30,31</sup>.

### **3.4.- Desarrollo prenatal de los mecanismos de la inmunidad secretora**

El desarrollo del sistema inmunitario secretor en esta etapa ha sido explorado en muchos estudios usando técnicas de inmunofluorescencia. Las células epiteliales incluyen el componente secretor (CS), los cuales son detectados en etapas tan tempranas, como a los ocho meses de gestación, en la zona de los bronquios; produciendo posterior proceso de expansión de dicho CS hacia el intestino delgado, a las veinte semanas de gestación. Las células que tienen CS se encuentran en el tejido glandular salival, en primer término en la decimonovena semana de gestación, y se hacen más numerosas alrededor de la semana veinticinco. Es en este momento donde encontramos infiltrados celulares que contienen IgM, los cuales son identificados en el intestino delgado, asociados con las Placas de Peyer (GALT)<sup>18,30</sup>.

Hacia la vigésima octava semana de gestación, se encuentra un gran número de células secretoras de IgM se incrementa en todo el tejido linfoide, pero no en las zonas secretoras; consecuentemente hay muy pocas células que contienen IgA, como tejido conectivo y epitelio ductal; hacia la vigésima quinta semana de gestación. Se ha reportado que la presencia de IgG es muy breve en esta etapa<sup>29,30</sup>.

Todo lo indicado anteriormente indica que los componentes del sistema inmunitario secretor están organizados favorablemente en sistemas funcionales (Tabla N° 1), donde la síntesis de anticuerpos IgA secretor es mínima antes del nacimiento.

EDAD GESTACIONAL	CS	IgM	IgA	IgD	IgG	HLA-DR
16 SEMANAS	+	-	-	nr*	nr	-
26 SEMANAS	++	+(20w)	±(25w)	-	±(26w)†	-
NACIMIENTO	++	++	+	-	±	-
1° AÑO	++++	++	++++	+	+	++

+nr: No reportado

†IgG2: 26 semanas de gestación.

IgG3, IgG1: 28 semanas

**Tabla N° 1.- Ig en tejido glandular salival durante el desarrollo prenatal y postnatal. *Smith, D.J, 1993.***

### **3.5.- Desarrollo del sistema inmunológico bucal durante la infancia**

Durante este periodo, se pueden realizar la identificación sistémica de los niveles séricos de IgG, IgM e IgA, desde el nacimiento hasta la edad adulta; revelando que la IgG es el único anticuerpo detectado en el suero del recién nacido<sup>18</sup>.

En la circulación neonatal, la IgG es proveniente de la madre, vía transplacentaria. Después del nacimiento, los niveles de IgG disminuyen considerablemente al principio, pero aumentan consecuentemente, a medida que el niño comienza a adquirir una respuesta inmunológica activa contra los antígenos del ambiente. Los niveles de IgM también empiezan a aumentar, una vez manifiesta la respuesta inmunológica activa<sup>18</sup>. (Gráfico N° 1)

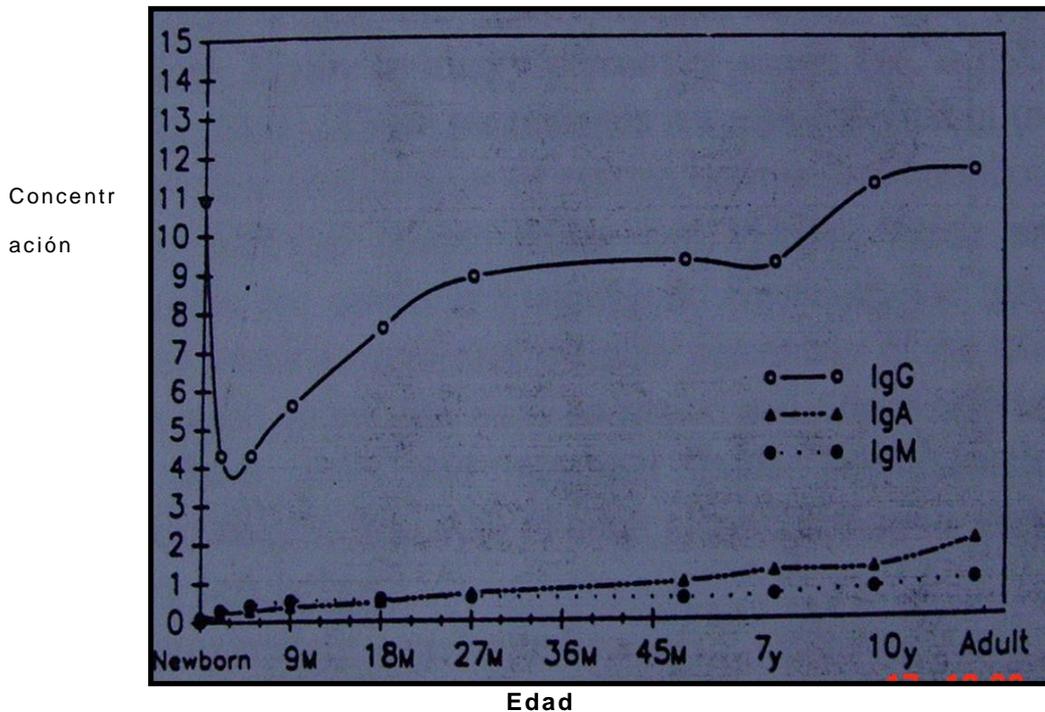


Gráfico N° 1. Cambios asociados a la edad en los niveles de IgG sérica (IgG; IgA; IgM). Smith DJ, 1993.

Una particularidad de la respuesta frente a inmunizaciones orales, si se compara a la sistémica, es que su maduración es mucho más precoz y por ello es más eficaz en niños. Se observó que la vacunación parenteral con *H. influenzae* tipo b produce más anticuerpos séricos en los adultos que en los niños, mientras que la tasa de anticuerpos que aparece en las secreciones es similar, sin diferencia en función de la edad<sup>29,32</sup>.

### **3.6.- Desarrollo en la respuesta inmunológica contra la caries en el niño**

El sistema inmunitario secretor es fundamental en recién nacidos, quienes dependen de la producción de los anticuerpos IgA para defenderse de la colonización por microorganismos de la cavidad bucal.

La efectividad de la respuesta inmunológica frente a los componentes de la caries dental también depende del estado de maduración del sistema inmunológico del individuo; el cual va madurando durante el desarrollo fetal y a los **4 meses** ya se detecta el factor C3 del complemento y la actividad de los linfocitos T. **Al nacer** se detectan los niveles séricos de IgG en el recién nacido, que han sido transferidos por la madre, y que son importantes en la protección frente a los primeros colonizadores bucales como *Lactobacillus* y *Veillonella*<sup>1,3,6,11</sup>.

Los anticuerpos maternos desaparecen a los **5 meses** del nacimiento. Para cuando *S. mutans* comienza a colonizar la

cavidad bucal (al aparecer la primera dentición) ya se encuentran niveles similares a los del adulto de IgM y de IgAs<sup>11</sup>. Los niveles de adulto en la IgG se alcanzan a los 4 años y los de la IgA a los 13 años<sup>8,14</sup>.

#### **4.- EL SISTEMA INMUNITARIO SECRETOR**

El sistema inmunitario secretor es único y exclusivo de las diferentes membranas mucosas del organismo y sus membranas asociadas<sup>6,7</sup>. Constituye un importante componente de carácter local, que protege a las superficies mucosas, capaz de producir una respuesta inmunológica en el individuo, independientemente de la respuesta sistémica, ante agresiones de orden local. Los órganos involucrados incluyen el ojo, oído externo, glándulas salivales, pulmones, tubo digestivo, aparato genitourinario y glándulas mamarias (Figura N° 1)<sup>6,7,8</sup>.

Las mucosas constituyen la puerta de entrada para muchos agentes patógenos y el lugar de contacto con diferentes antígenos (ambientales, alimentos). Así como la piel constituye una barrera físicamente difícil de atravesar por los microorganismos, las mucosas son desde este punto de vista,

más frágiles. Sin embargo, están dotadas de un sistema de protección local, ya que en ellas tiene lugar una respuesta inmunológica con características especiales: Respuesta inmunológica asociada a las mucosas, la cual se desarrolla a partir del tejido linfoide asociado a las mucosas (*Mucosa Associated Lymphoid Tissue: MALT*)<sup>6</sup>.

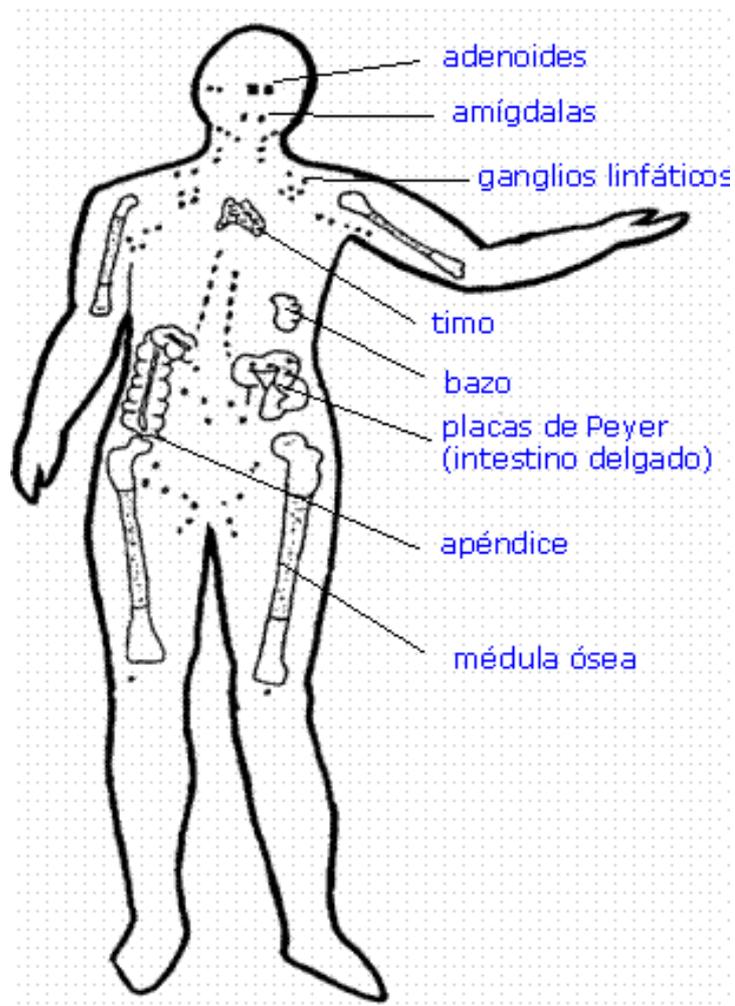


Figura Nº 1. Regiones del sistema inmunitario secretor. *Lehner, 1992.*

#### **4.1.- Tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT)**

Se encuentran agrupaciones de tejido linfoide no encapsulado, situadas en la lámina propia y en las áreas submucosas de los aparatos digestivo, respiratorio y genitourinario. Las células linfoides se hallan presentes, ya sea como cúmulos difusos; u organizados en nódulos, solitarios o agrupados, que contienen centros germinales (folículos secundarios). En el ser humano, las amígdalas y las placas de Peyer (íleon) son particularmente prominentes. El epitelio intestinal, que cubre dichas placas está especializado en el transporte de los antígenos hacia el tejido linfoide. Esta función particular es realizada por unas células epiteliales denominadas células M (micropliegues). Dichas células son capaces de absorber, procesar y transportar los antígenos, para que sean presentados a las células linfoides subepiteliales por las células procesadoras de antígenos (APCs)<sup>8</sup> (figura N° 2).

Además del sistema MALT, se encuentran un gran número de linfocitos en el tejido conjuntivo de la lámina propia y en de

la capa epitelial, dentro de éstos tenemos: Los linfocitos de la lámina propia (LPL), predominantemente células T activadas, aunque también pueden detectarse numerosas células B activas y células plasmáticas, las cuales secretan anticuerpos. Las respuestas inmunológicas humorales a nivel de la mucosa son principalmente del isotipo IgA. La IgA secretora (IgAs) es un anticuerpo que puede atravesar las membranas mucosas y ayuda a impedir la entrada de los microorganismos infecciosos que se transporta a través de las células epiteliales y se libera en el interior de la luz. Los linfocitos intraepiteliales (IEL), son células T que exhiben características fenotípicas distintas de las que presentan los LPL. Aunque el fenotipo de los LPL es similar al de las células que circulan por sangre periférica que tienen el receptor TCR alfa-beta, un porcentaje elevado de IEL son células TCR gamma-delta, la mayoría de los cuales expresan CD8. La mayoría de las células T, LPL e IEL son células de memoria<sup>6,7</sup>.



Figura N° 2 Función de las APCs. Jones, 1999.

#### 4.1.1.- Tejido linfoide asociado al sistema secretor en el intestino (GALT)

La respuesta inmunológica específica ante el ataque de los microorganismos en cavidad bucal, como *Streptococcus mutans* es generada en su mayor parte por la IgAs, la cual es producida por el sistema inmunitario secretor<sup>8,9</sup>.

Dichos anticuerpos pueden ser inducidos en las secreciones locales por estimulación local o por estimulación del GALT; esta última es el resultado tanto de la ingesta como del depósito de antígeno en el intestino delgado; que conlleva a la liberación de células precursoras de IgA en las Placas de Peyer. Dichas células migran a los tejidos mucosos; produciéndose la liberación en los linfáticos regionales, para una posterior migración a los ganglios linfáticos mesentéricos, conducto torácico y torrente sanguíneo, antes de migrar a la lámina propia del intestino y otros tejidos secretores, incluyendo las glándulas mamarias<sup>9,10,11</sup>. Las células plasmáticas de la lámina propia secretan IgA dimérica, que contiene una unidad de cadena J, la cual se une al receptor poli-Ig, producido por las células epiteliales. El complejo es captado por las células y secretado en la luz de la glándula como IgAs mediante el funcionamiento del receptor, dejando el componente secretor adherido a la IgA secretada<sup>10,11</sup>. (Figura N° 3)

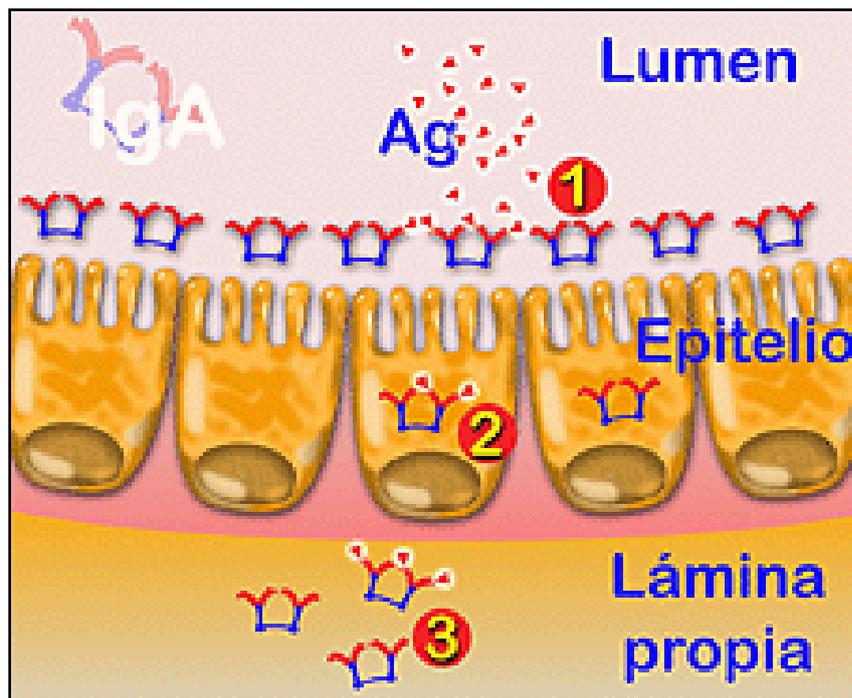


Figura N°3. Transporte de la IgA secretora. Barros, 1991.

Se produce la inmunización local, generada por la proliferación de las células plasmáticas, reclutamiento de otras y el aumento de la repuesta secretora IgA local<sup>10,11</sup>.

## 5.- LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN LA CARIES DENTAL

La Inmunología Oral es la especialidad que se dedica al estudio de la respuesta inmunológica a nivel de la cavidad bucal. Los mecanismos inmunológicos desarrollados en la misma y en otras superficies mucosas son muy importantes en

la protección antimicrobiana, ya que las mucosas están colonizadas por un gran número de agentes microbianos y constituyen una de las principales puertas de entrada de los microorganismos en el humano.

La caries dental es una enfermedad multifactorial en la que influyen fundamentalmente tres factores principales: Los microorganismos de la placa, la dieta y las características genéticas del hospedero. Actualmente se sabe que este último factor, puede jugar un papel muy importante en la respuesta inmunológica que se desarrolla frente a los microorganismos causantes de la caries dental<sup>5</sup>. La pared celular del microorganismo más involucrado en la caries, el *Streptococcus mutans*, está formada por componentes tales como: Glucanos, ácidos lipoteicoicos, glucosiltransferasas (GTF), polisacárido C, capaces de estimular esa respuesta inmunológica en el hospedero<sup>12</sup>.

Los factores de los agentes agresores más importantes para producir una respuesta inmunológica protectora contra la caries, son los antígenos proteicos y la glucosiltransferasa (GTF)<sup>13</sup>.

Para que la respuesta inmunológica pueda efectuar su acción protectora, sus componentes tienen que acceder al lugar donde se produce la caries dental y estos serán diferentes según la localización de la lesión. Así, la protección frente a la caries que se desarrolle en el dominio salival dependerá de la acción de la IgAs, que puede impedir la adhesión de los microorganismos a la superficie dental e inhibir la acción de la GTF; mientras que la protección frente a las caries que se desarrollen en el dominio gingival dependerá de la acción de la IgM e IgG que además de detener la adhesión de los microorganismos a la superficie dental e inhibir la acción de la GTF, pueden aglutinar y opsonizar los microorganismos que serán atacados por los fagocitos presentes en el líquido gingival<sup>8,32</sup>.

La respuesta inmunológica local de la cavidad bucal en el individuo puede potenciarse a través de las vías naturales de inmunización<sup>32</sup>: (Figura N° 4)

**5.1.- Pulpar:** Pequeñas cantidades de IgG, IgM e IgA circulantes pasan a través de la cresta gingival hacia la cavidad bucal y pueden atravesar los túbulos dentinarios

hasta llegar a la cámara pulpar del diente.

**5.2.- Sistémica a través de la encía:** En casos de enfermedad periodontal avanzada, en la encía se encuentran focos de células plasmáticas que segregan IgM, IgG e IgA, los cuales están presentes en los sacos periodontales y dentro de la cavidad bucal.

**5.3.- A través del GALT:** El sistema inmunitario mucoso común consiste en células M, presentes en la mucosa de los tejidos linfáticos de las amígdalas y adenoides (Anillo de Waldeyer) y de las placas de Peyer del intestino; toman los antígenos y lo presentan a las APC; las cuales lo presentan a las células T cooperadoras.

**5.4.- En las glándulas salivales:** La IgA polimérica secretada se desempeña como componente secretor en la superficie basal lateral de las células epiteliales glandulares, la cual es transportada hacia la superficie apical, donde es liberada del componente secretor en forma de IgAs.

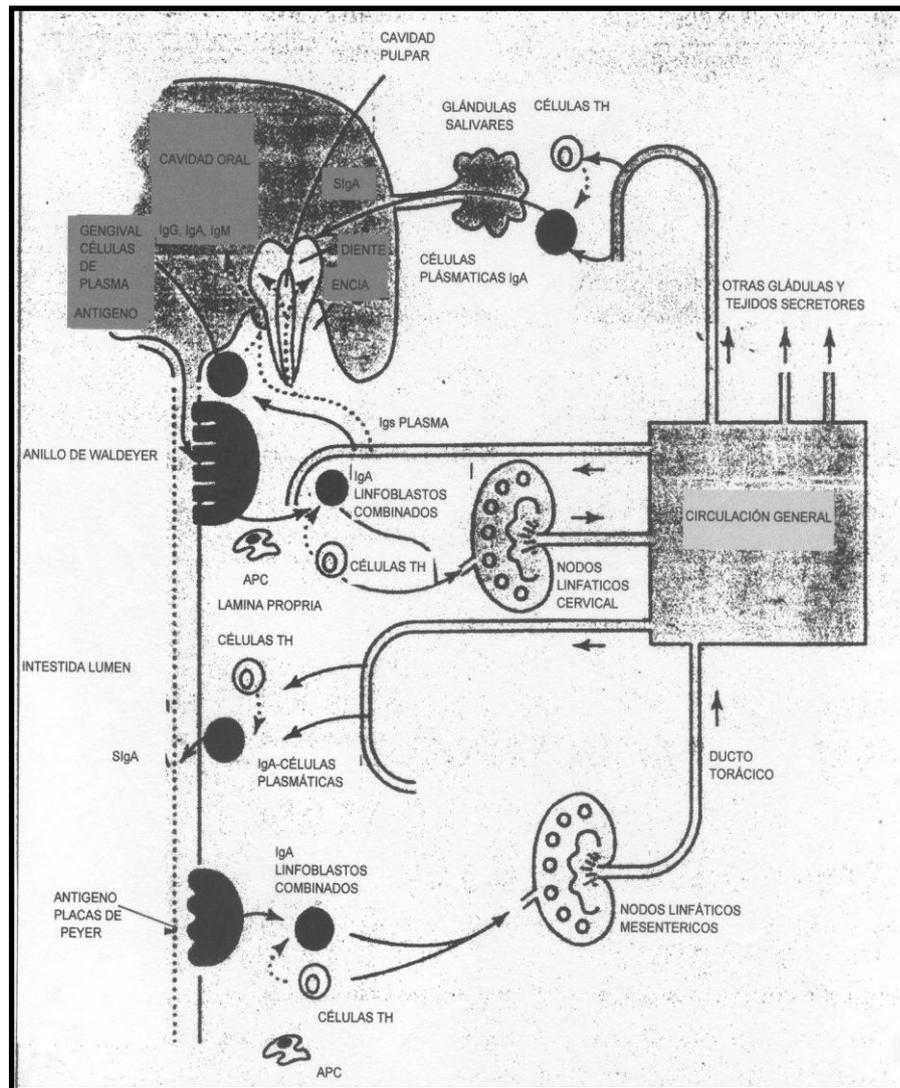


Figura N° 4. El sistema inmunológico común de la mucosa. *Rusell et al, 1999.*

## 6.- PREDISPOSICIÓN GENÉTICA A CONTRAER LA CARIES DENTAL

Con respecto a la higiene bucal y su aspecto de prevención a la presencia de caries, ocurren eventos contradictorios donde individuos con mala higiene y una dieta cariogénica,

presentan resistencia a la caries; y otros que siguen una adecuada higiene y buenos hábitos alimenticios, la susceptibilidad al ataque carioso está incrementada<sup>29</sup>.

Se ha encontrado que los individuos con índice de caries bajo, tienen niveles elevados de los títulos séricos de IgG contra células de *S. mutans* y su antígeno I/II, cuando se comparan con sujetos con índice de caries alto<sup>15,34,35</sup>.

En experimentos donde se utilizó el antígeno estreptocócico (SA) I/II, se encontró que los linfocitos T liberaban cantidades óptimas de factor cooperador específico cuando se empleaba una dosis de 1-10 nanogramos (ng) de SA I/II en sujetos con bajo padecimiento de caries; mientras que las cantidades óptimas de factor para los linfocitos de los sujetos propensos a la caries se lograban con 1000 ng. Esta diferencia en la respuesta sustenta la creencia de que los sujetos resistentes a la caries difieren en su capacidad para elaborar y mantener la respuesta de anticuerpos séricos frente a *S. mutans*<sup>29</sup>.

Además mediante el uso de SA I/II, se evidenció que los individuos HLA-DRW6 positivos alcanzaban una respuesta óptima al emplear dosis bajas, por el contrario sujetos HLA-DRW6 negativos mostraron respuesta adecuada sólo frente a

altas dosis de antígeno. Estos hallazgos apuntan hacia las características genéticas de los individuos que poseen la capacidad para responder a cantidades muy pequeñas de antígenos estreptocócicos lo que puede explicar la presencia de los altos niveles de anticuerpos frente a *S. mutans* en sujetos con pocas caries<sup>29,36</sup>.

Investigaciones realizadas refuerzan el señalamiento que la inmunidad natural frente a la caries puede tener relación con el locus HLA DR ubicado en el cromosoma 6; donde el alelo HLA DR W6 podría ser el responsable del aumento de los niveles de linfocitos T colaboradores ante un ataque mínimo de antígenos de *Streptococcus*; lo que implica una inmunidad más activa, es decir habría una mayor resistencia a la caries<sup>15,36,37</sup>.

Una condición inmunológica contraria incluye en las características genéticas de los individuos la presencia del alelo HLA DR 4, el cual parece ser el responsable del aumento de los niveles de linfocitos T supresores, por lo que repercute en una mayor susceptibilidad a la caries<sup>36,37</sup>.

Otros estudios, han demostrado que la IgG sérica contribuye a la protección contra la caries en el hombre, y que la



## 7.- INMUNIDAD CELULAR

La respuesta inmunológica de tipo celular es el resultado de un complejo sistema de interacciones entre si a través de receptores ubicados en las superficies celulares y de diferentes factores humorales de origen celular y de carácter polipeptídico denominadas citocinas. Las principales células productoras son los linfocitos (linfocinas) y los macrófagos (monocinas)<sup>34,35</sup>.

En ella participan esencialmente los linfocitos Th (CD4+), los cuales constituyen la principal fuente productoras de citocinas en el transcurso de la respuesta inmunológica. Los linfocitos Th1 sintetizan interleucina 2 (IL-2) y actúan preferiblemente sobre los macrófagos y en la respuesta celular. Los linfocitos Th2 producen IL-4 y actúan fundamentalmente sobre los linfocitos B y la respuesta inmunológica humoral<sup>39,40</sup>.

Los linfocitos T citotóxicos (CD8) reconocen el antígeno mediante el receptor T (TcR) y lo hacen sólo cuando el antígeno es degradado y procesado en el interior de las células presentadoras de antígeno (APC) y sus determinantes

antigénicos son expuestos en la superficie de estas células en el seno de una molécula del complejo principal de histocompatibilidad<sup>10,38,39</sup>. En el transcurso de la respuesta inmunológica se pueden distinguir tres fases: La primera corresponde a la captación, procesamiento y presentación; la segunda corresponde a la cooperación celular y la última a la respuesta efectora.

La placa dental es una comunidad microbiana compleja formada por diferentes microorganismos, entre los que destacan los cariogénicos y los relacionados con la enfermedad periodontal<sup>1,2,3,4,10</sup>. En la placa dental se encuentran también componentes microbianos como los lipopolisacáridos, dextranos y ácidos lipoteicoicos que pueden tener efectos inmunopotenciadores o inmunosupresores sobre la respuesta inmunológica<sup>6,10,11,12</sup>.

Para que se induzca una respuesta inmunológica contra los componentes de la placa dental, éstos deben ser absorbidos por la encía. Tras la absorción, los antígenos de la placa dental estimularán una gran variedad de mecanismos inmunológicos que incluyen: La síntesis de anticuerpos, la

activación del complemento, la fagocitosis y la activación de los linfocitos T y B; de la función adecuada de esta respuesta inmunológica dependerá que se desarrollen o no la caries dental y la enfermedad periodontal<sup>16,30</sup>. (Figura N° 5)

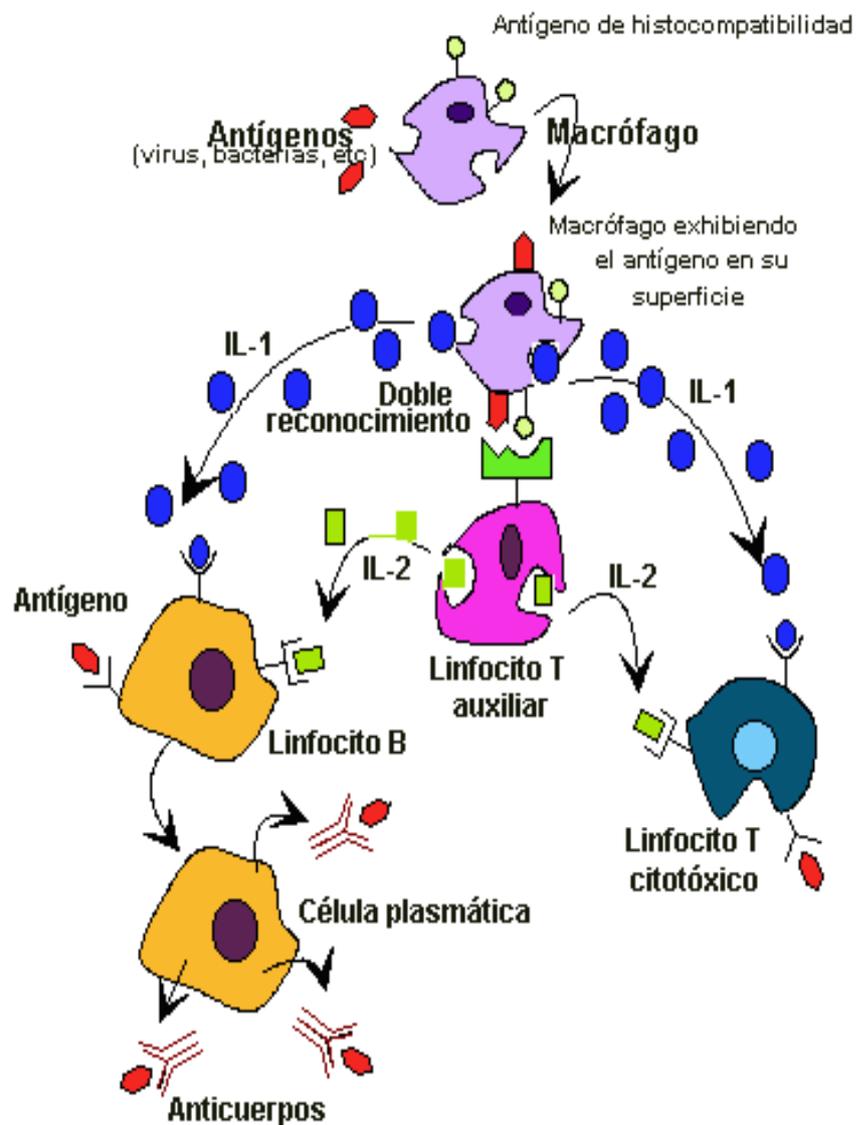


Figura N° 5. Desarrollo de la respuesta celular. Munson, 2004

## **8.- SALIVA Y RESPUESTA INMUNOLÓGICA**

El complejo de inmunidad frente a la caries depende de la demostración de que la enfermedad es una infección. Los dientes están situados en una posición única entre los sistemas inmunitarios secretor y sistémico. La mayoría de la superficie dental es accesible a la saliva, aunque los sitios más susceptibles a la caries, alrededor del borde gingival y entre los dientes, están bañados por el líquido gingival del espacio crevicular que proviene del suero<sup>37,38</sup>.

Los anticuerpos del líquido crevicular tienen su origen en el suero, aunque existe una contribución local, particularmente de IgG. Es por ello, tanto los anticuerpos séricos como los salivales podrían desempeñar un papel en la protección contra la caries, y se han examinado ambos mecanismos en la inmunidad natural en el hombre y en lo que respecta a los efectos protectores de la vacunación en modelos experimentales<sup>39,40</sup>.

Se desconocen exactamente cuáles funciones de la saliva son más importantes en la protección contra la caries dental. Es probable que los efectos de buffer de la saliva basados

principalmente en los sistemas amortiguadores de fosfato y bicarbonato ácido carbónico, sean de mayor importancia en relación a la caries. Así mismo, la velocidad del flujo varía en diferentes individuos, en glándulas distintas y en la respuesta a estímulos diferentes y la composición química de la saliva puede ser alterada por estas variaciones<sup>7,38</sup>. Sin embargo, la relación entre los niveles de los factores antibacterianos no específicos de la saliva y la susceptibilidad a la caries dental no ha sido claramente demostrada.

### **8.1.- Respuesta humoral frente a la caries**

Las propiedades de la saliva, la higiene bucal y la dieta, son algunos de los factores conocidos que afectan la colonización de *Streptococcus mutans*.

La respuesta inmunológica humoral específica en contra de *Streptococcus mutans* cariogénicos es promovida principalmente por los anticuerpos secretores de la saliva, IgAs, los cuales son generados por el sistema inmune secretor de la mucosa; que es más funcional en recién nacidos<sup>16,37,38,41</sup>.

Los anticuerpos IgAs son capaces de reaccionar con los microorganismos en la cavidad bucal y, por lo tanto son

considerados como un importante factor de defensa<sup>10,37</sup>. Dichos anticuerpos pueden interferir en la adhesión bacteriana al diente, sin embargo esta función no se ha determinado.

### **8.1.1.- Anticuerpos salivales**

La IgA secretora es un anticuerpo que puede atravesar las membranas mucosas y ayuda a impedir la entrada de los microorganismos. Un motivo para considerar el MALT como un sistema distinto, es que las células linfoides asociadas a la mucosa recirculan principalmente dentro del sistema linfoide mucoso. Así, las células linfoides estimuladas en las placas de Peyer por un antígeno, viajan por la linfa hacia los órganos linfáticos regionales y luego por el conducto torácico a la circulación, para asentarse de nuevo en las mucosas, donde van a secretar IgA. La recirculación específica (tropismo por las mucosas) se basa en las moléculas de adhesión que éstas células expresan. Basándose en este mecanismo, la estimulación antigénica en un área de la mucosa provoca una respuesta de anticuerpos (IgA) en otras zonas mucosas<sup>39,41</sup>.

#### **8.1.1.1.- Estructura, síntesis y funciones.**

La IgA secretora es dimérica (cadena J) y va asociada a un polipéptido llamado componente secretor, derivado del receptor presente en las células del endotelio, necesario para el transporte de la IgA hacia la luz (Figura N° 6). Su poder opsonizante no es muy grande. Solamente los PMN neutrófilos presentan un receptor para la IgA (Tabla N° 2). Existen dos subclases de IgA: IgA1 e IgA2, con diferente distribución en nuestros tejidos corporales. En los fluidos internos la IgA1 constituye el 90 % de los anticuerpos de la clase IgA. En las secreciones mucosas, la IgA1 supone un 40-60 % y la IgA2 hasta el 60 %, quizás en respuesta a las proteasas producidas por algunos microorganismos que son capaces de hidrolizar la IgA1<sup>39,41</sup>.

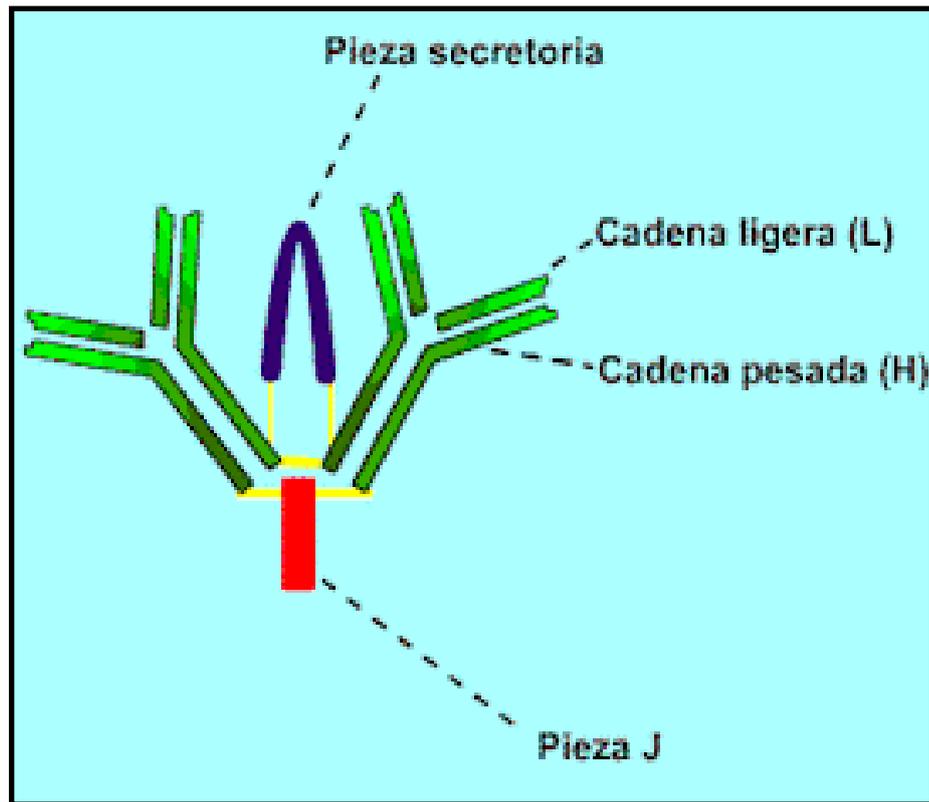


Figura N° 6 Estructura de la IgA secretora. *de Farías, 2003.*

<b>PRINCIPALES FUNCIONES DE LA IgA SECRETORA</b>
Inhibición de la adherencia microbiana
Exclusión de antígenos
Neutralización de virus
Modulación de la actividad enzimática
Neutralización de toxinas

Tabla N° 2. *Funciones de la IgA secretora. Fudenibag, et al. 1982.*

La IgA secretora difiere de la IgA sérica en que las moléculas son prácticamente todas diméricas e independientes de la IgA sérica o monomérica. La IgAs se encuentra en las secreciones que recubren las superficies mucosas, incluyendo las secreciones gástrica, bronquial y nasal, calostro, leche, lagrimas y saliva (parcialmente unidos a mucinas de alto peso molecular)<sup>40,41,42</sup>.

La concentración de IgAs siempre es mayor que la de la IgG. En la saliva entera, las concentraciones de IgAs, IgA e IgM son, aproximadamente, de 20, 0.1 y 0.1 mg/mL, respectivamente. En el suero, la relación entre IgA1 e IgA2 es aproximadamente de 75:25, pero en las secreciones hay menos IgA1 y más IgA2 (40:60)<sup>41,42</sup>

La IgAs es un anticuerpo predominante en las secreciones mucosas, con concentraciones relativamente bajas en el suero. En las glándulas salivales, las moléculas de IgAs son secretadas por las células plasmáticas, en tanto que otra proteína conocida como el componente secretor es producida en las células epiteliales del recubrimiento de los conductos, que le da la propiedad a IgA secretora de no ser

degradada por las enzimas proteolíticas de las secreciones exocrinas<sup>11,29,30</sup>.

La IgAs es predominante en la saliva humana, los anticuerpos de esta clase son los que más probablemente proporcionan protección contra los microorganismos cariogénicos. Tiene funciones en el medio interno (sangre y compartimento intersticial) y en el medio externo (secreciones exocrinas), entre ellas : Atrapamiento y aglutinación de microorganismos, bloqueo de alergenos, inhibición de la colonización de las mucosas por *Candida albicans*, neutralización del virus de la parotiditis y el herpes simple recurrente; otras de sus funciones es activar el complemento no de la forma convencional sino por la vía de la properdina; convirtiéndose en la primera línea de defensa de mucosas y de los dientes<sup>19,36,37</sup>.

El sistema IgAs tiene considerable importancia como factor potencialmente útil contra la caries. La estimulación de este sistema puede evitar posibles reacciones inmunológicas adversas resultantes de los altos niveles de anticuerpos del suero, hipersensibilidad inmediata o inmunidad celular. Sin

embargo, no se sabe de modo definitivo que los anticuerpos salivales IgA ejerzan una función decisiva en la inmunidad de la caries, pero probablemente si lo hacen, y se ha de destacar la importancia de los estudios sobre su influencia y en los experimentos dedicados a la obtención de una vacuna contra la caries<sup>8</sup>. Los anticuerpos derivados del surco gingival también pueden contribuir a dicha inmunidad, pero su aparición en la saliva parece depender en gran medida de la inflamación de la encía<sup>11,17,18</sup>.

Además de la presencia de la IgA también podemos encontrar de los de tipo IgG, que provienen del fluido gingival, estos están en baja cantidad y además son más sensibles a la acción de las proteasas que los anticuerpos IgA, por lo tanto, no son muy útiles en saliva, sin embargo cuando están en baja cantidad la IgG son capaces de opsonizar y por lo tanto potenciar la fagocitosis, mediante la unión al antígeno I/II<sup>44</sup>.

### **8.1.2.- Anticuerpos séricos**

Los posibles mecanismos, mediante los cuales los anticuerpos séricos pueden operar para inhibir la caries, incluyen<sup>43,44</sup>:

a) Prevención de la adherencia bacteriana a la superficie dental y/o a la placa.

b) Inhibición de enzimas específicas como la GTF, responsables de la síntesis de polisacáridos extracelulares a partir de la sacarosa.

c) Inactivación del metabolismo de las bacterias como la fermentación de los carbohidratos.

d) Inhibición del crecimiento o muerte de las bacterias.

e) Oponización de las bacterias.

A pesar de los mecanismos anteriormente mencionados es poco probable que ocurra un efecto bactericida directo mediado inmunológicamente, puesto que éste requiere la disponibilidad de las moléculas del complemento que está ausente en la saliva, aunque se ha encontrado en el líquido subgingival. Además hay escasas evidencias que indique que la presencia de anticuerpos afecte notablemente la capacidad de las bacterias bucales para producir ácidos<sup>8,24,43</sup>.

Se ha sugerido que las caries de las superficies lisas pueden ser afectadas principalmente por los anticuerpos séricos, que existen en el líquido crevicular, en tanto que los anticuerpos salivales pueden ejercer su influencia primordialmente en las caries de fosas y fisuras<sup>41,43,44</sup>.

En la actualidad la única contribución más efectiva que se ha utilizado en la prevención de la caries dental ha sido la introducción de fluoruros. Sin embargo, se están evaluando un número de métodos dirigidos a reducir el ataque bacteriano sobre la superficie del diente. Entre ellos se encuentran la eliminación mecánica de microorganismos adhesivos, técnicas quimioterapéuticas, como el uso de

antimicrobianos sistémicos o tópicos; la implantación de bacterias no cariogénicas en la cavidad bucal que tiene capacidad de antagonizar o reemplazar los microorganismos cariogénicos, y la producción de vacunas contra las bacterias cariogénicas<sup>12,45</sup>.

## **9.- MÉTODOS UTILIZADOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA A LA CARIES**

Para los profesionales de la salud es importante el conocimiento de los métodos utilizados para evaluar y cuantificar la respuesta inmunológica en los pacientes, así como familiarizarse en la interpretación de los resultados que se obtienen para la aplicación de las pruebas.

En la detección de los niveles y la especificidad de los anticuerpos se utilizan diversos tipos de pruebas que se agrupan según la necesidad o no de aplicar un sistema indicador de la unión del antígeno al anticuerpo<sup>32</sup>.

En las pruebas que no necesitan un sistema indicador de que se haya producido la unión antígeno-anticuerpo, el propio fenómeno de unión antígeno-anticuerpo produce una serie de

cambios físicos que ponen de manifiesto que tal interacción ha ocurrido. Las pruebas más utilizadas dentro de este grupo son la inmunoprecipitación y la aglutinación.

### **9.1 Inmunoprecipitación.**

Permite detectar anticuerpos específicos contra un antígeno o para comparar los antígenos presentes en unas mezclas antigénicas complejas. (Figura N°7)

Esta técnica se puede dividir en 5 etapas principales: a) radiomarcaje de una proteína celular, b) extracción de la proteína del tejido; c) incubación de la proteína radiomarcada con los autoanticuerpos del paciente (suero en estudio) d) precipitación del complejo antígeno- anticuerpo (inmunoprecipitación) con la ayuda de proteína IgA o IgG y e) análisis de las proteínas precipitadas mediante gel de poliacrilamida y autoradiografía<sup>45</sup>.

La inmunoprecipitación es un técnica que no desnaturaliza las proteínas antes de que se produzca la unión del antígeno con el autoanticuerpo, y permite así detectar autoanticuerpos dirigidos contra epítomos conformacionales<sup>44,46</sup>.

## Técnica de inmunoprecipitación

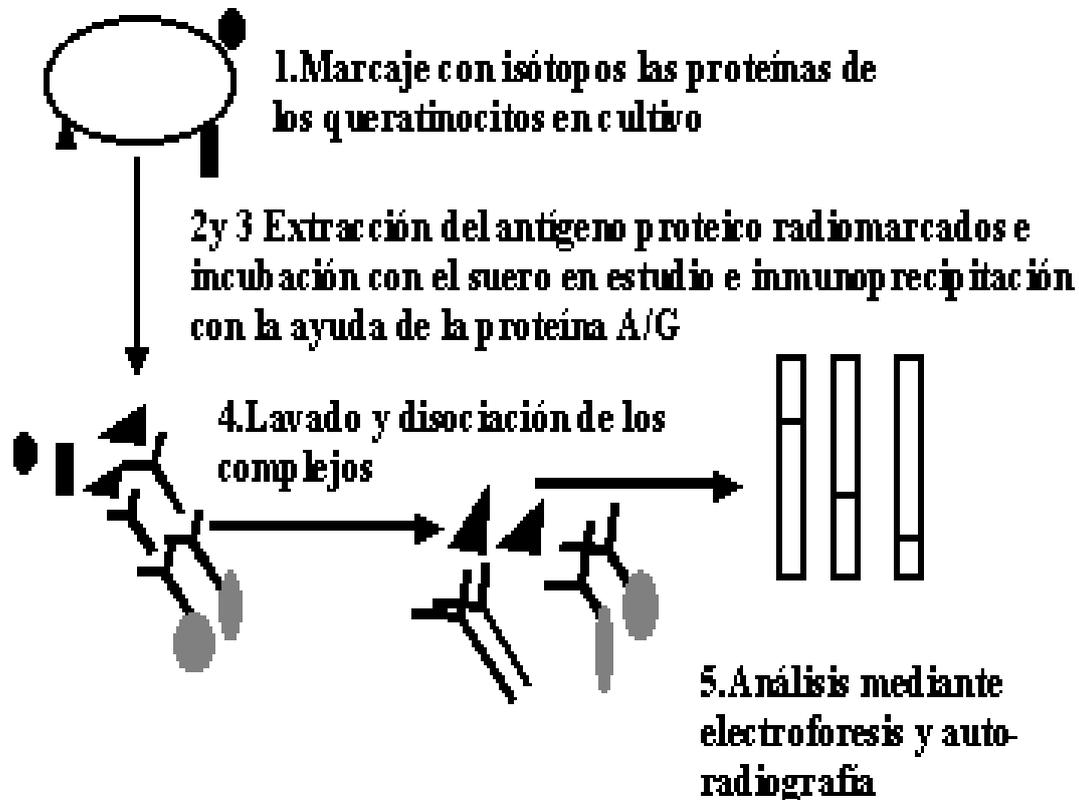


Figura N° 7 Koga, et al. 2003

### 9.2.- Aglutinación

La prueba de aglutinación es una de las más clásicas. En ella, los antígenos son grandes partículas, inclusive células, la cual sigue un principio similar al de la técnica de la inmunoprecipitación<sup>47,48</sup>.

Se utiliza para detectar anticuerpos contra antígenos

localizados en la superficie de células o de partículas de látex. Los anticuerpos al unirse al antígeno producen una unión de las células o partículas denominada aglutinación (Figura N° 8)<sup>9</sup>.

La reacción de aglutinación se diferencia según el modo de realizarla, en **directa**, en la que el antígeno natural es enfrentado al anticuerpo en un portaobjetos o en tubo, observándose la presencia o no de aglutinación; y la aglutinación **pasiva**, en la que un antígeno soluble se fija artificialmente a partículas artificiales, naturales o células enteras<sup>1,44</sup>.

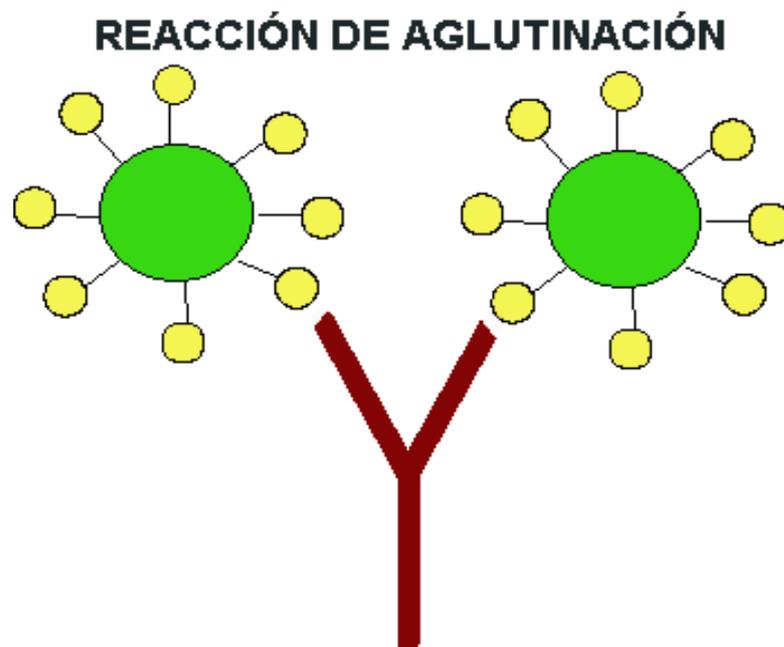


Figura N° 8. *Gahnberg, 1985*

Existe un grupo de pruebas en las que la unión antígeno-anticuerpo no produce una serie de cambios físicos que pongan de manifiesto que ha ocurrido la interacción, por lo que debe utilizarse un sistema indicador de que tal interacción ha ocurrido. Las pruebas más utilizadas dentro de este grupo son la fijación del complemento, inmunofluorescencia, ELISA e inmunoblotting<sup>12,40</sup>.

### **9.3 Fijación del complemento**

El sistema del complemento es el mediador humoral primario de las reacciones antígeno-anticuerpo. Consiste de por lo menos veinte proteínas plasmáticas química e inmunológicamente distintas capaces de actuar de manera recíproca una con otra, con el anticuerpo y con las membranas celulares<sup>14</sup>.

La fijación del complemento por lo general se mide determinando la dilución límite del suero, que lisa los eritrocitos de carnero sensibilizados con anticuerpos anticarnero de conejo (hemolisina), se forma el complejo antígeno-anticuerpo y fijan moléculas del complemento. Una vez producida la reacción antígeno-anticuerpo, se añade el complemento y el sistema indicador. En la muestra clínica que

existan anticuerpos se fijará el complemento y no se producirá la lisis del sistema indicador<sup>12,44</sup>.

Después de coagularse la muestra, preferiblemente a temperatura ambiente, debe separarse el suero del coágulo lo más pronto posible y congelarlo, preferiblemente a -70° C, para prevenir la pérdida de la actividad del complemento (Figura N°9)<sup>44</sup>.

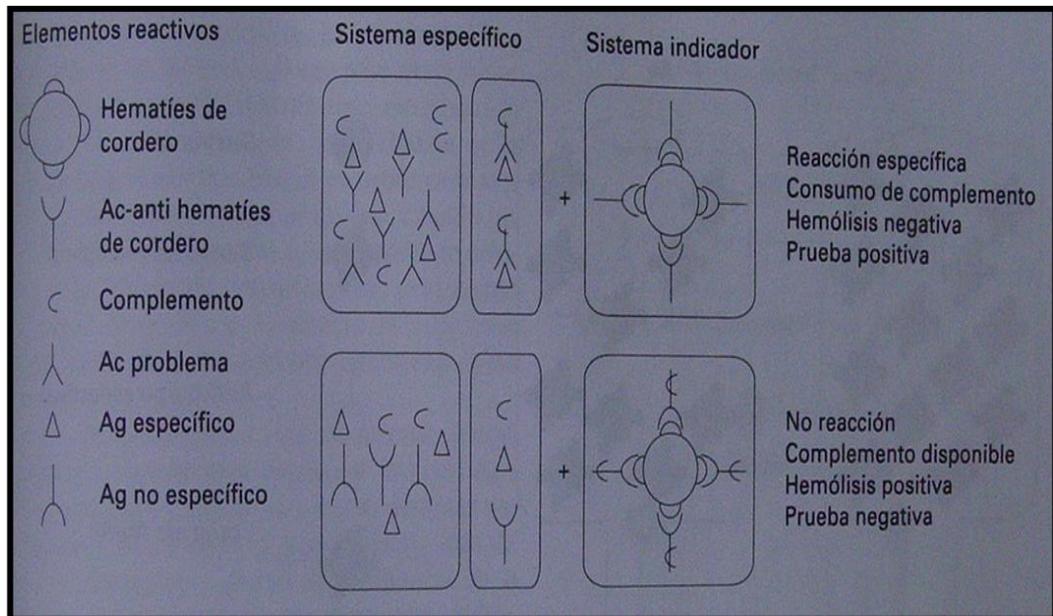


Figura N° 9. Técnica de la fijación del complemento. Liébana, 2000.

#### 9.4 Inmunofluorescencia

Estas técnicas permiten localizar antígenos celulares o tisulares y detectar anticuerpos específicos. Se fundamenta en el marcaje de inmunoglobulinas específicas con moléculas

fluorescentes, como el isotiocianato de fluoresceína (fluorescencia verdosa) o la rodamina (Fluorescencia rojiza). Suelen emplearse dos tipos de inmunofluorescencia<sup>1</sup>.

En la mayor parte de los casos se utiliza la ***inmunofluorescencia indirecta***, en la que la reacción antígeno-anticuerpo se revela con un segundo anticuerpo marcado con una molécula fluorescente. (Figura N° 10). Si el anticuerpo marcado con la molécula fluorescente es el que reacciona directamente con el antígeno se denomina ***Inmunofluorescencia directa*** (Figura N° 11)<sup>1,12,46</sup>.

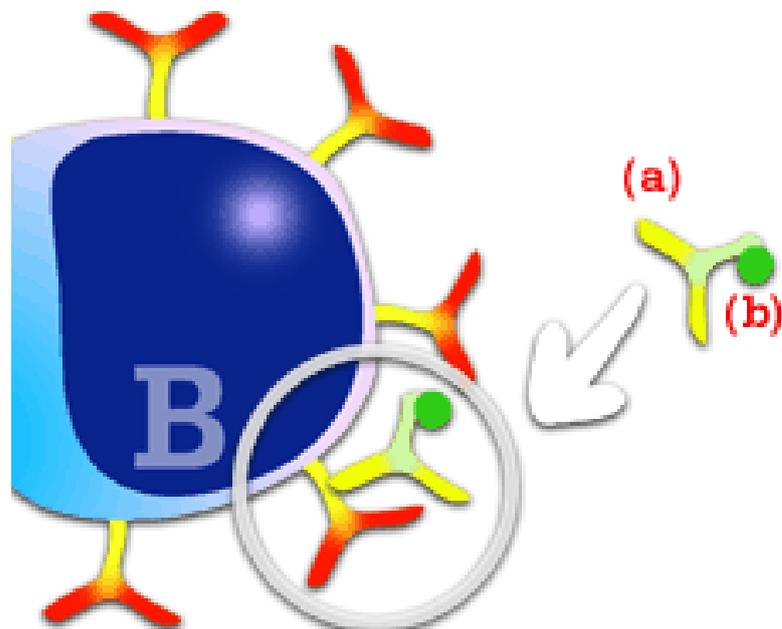


Figura N° 10. Técnica de inmunofluorescencia indirecta Suero policlonal o monoclonal (a) marcado con isocianato de fluoresceína (b) reacciona con las inmunoglobulinas. Ketterl, 1994.

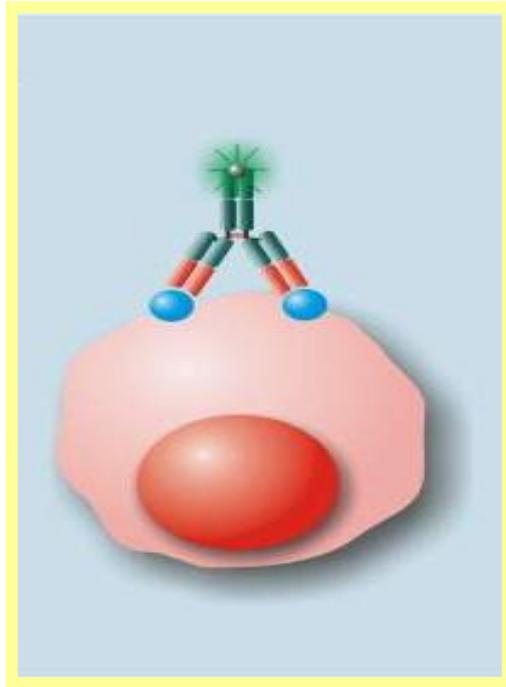


Figura N° 11. Inmunofluorescencia directa *Lehner, 1992.*

Se ha realizado estudios que revelan la positividad de las cepas de *R. dentocariosa* mediante la reacción por inmunofluorescencia de anticuerpos, utilizando antisueros de conejo, así como la existencia de por lo menos dos antígenos comunes en esta especie, identificados por medio de estudios de inmunodifusión<sup>36,37</sup>

#### **9.5.- Ensayo Inmunoenzimático (ELISA).**

El nombre de esta técnica proviene de la abreviación del inglés **enzyme-linked immunosorbent assay**. Consiste en "emparedar" la molécula que haya de analizarse entre otras dos macromoléculas, una de las cuales se halla conjugada a

una enzima, lo cual permite su detección mediante un cromógeno o sustancia luminiscente. Esta técnica es sensible, rápida, permite analizar muchas muestras de suero al mismo tiempo ya que no utiliza radioactividad<sup>1,36,37</sup>.

El antígeno está fijado sobre un soporte sólido y la reacción antígeno anticuerpo se revela con un segundo anticuerpo marcado con un enzima que produce una reacción coloreada al añadir un sustrato cromogénico<sup>12</sup>. En la actualidad se utiliza la técnica de ELISA para el estudio de enfermedades autoinmunes<sup>1,41,42</sup>. Según el diseño de la reacción existen varios tipos de ELISA, <sup>1,41,42</sup>:

**9.5.1.- Sándwich o directa:** Emplea anticuerpos fijados a la base sólida y permite investigar antígenos cuando se añaden anticuerpos marcados con enzima (Ag-Ac-Anti Ac-enzima. (Figura N° 12)



Figura N° 12 Roitt, 1998.

**9.5.2.- Indirecta:** Permite investigar la presencia de anticuerpos mediante el empleo de antígenos fijados a la fase sólida, y la adición de antiinmunoglobulina marcada con enzima<sup>1,3,5</sup>. (Figura N° 13)

## Técnica de ELISA indirecto

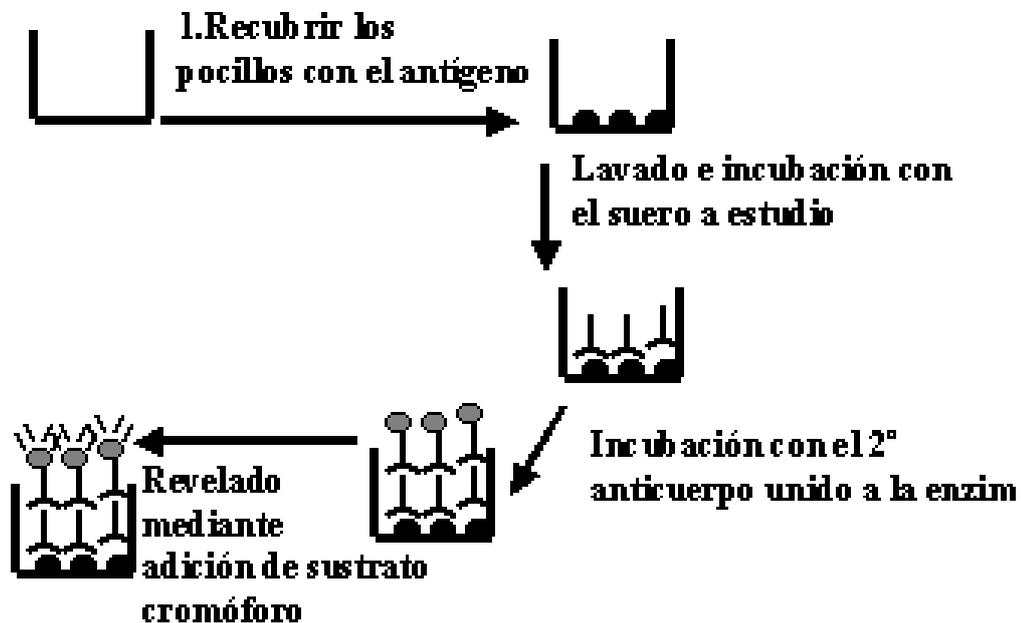


Figura N° 13. Jones, 1999.

### 9.5.3.- ELISA Competitivo

Este sistema es muy utilizado para la detección de anticuerpos específicos<sup>33</sup>. Se parte de un anticuerpo (monoclonal o policlonal), frente a un antígeno conocido, que previamente ha sido inmovilizado en la placa. Se denomina de competición ya que el suero problema es incubado previamente con el antígeno, antes de incubarlo con el antisuero fijado en la placa, y por tanto compite con él<sup>42</sup> (Figura N° 14).

Los pasos siguientes es la adición e incubación del conjugado, lavado y finalización con el sustrato y lectura

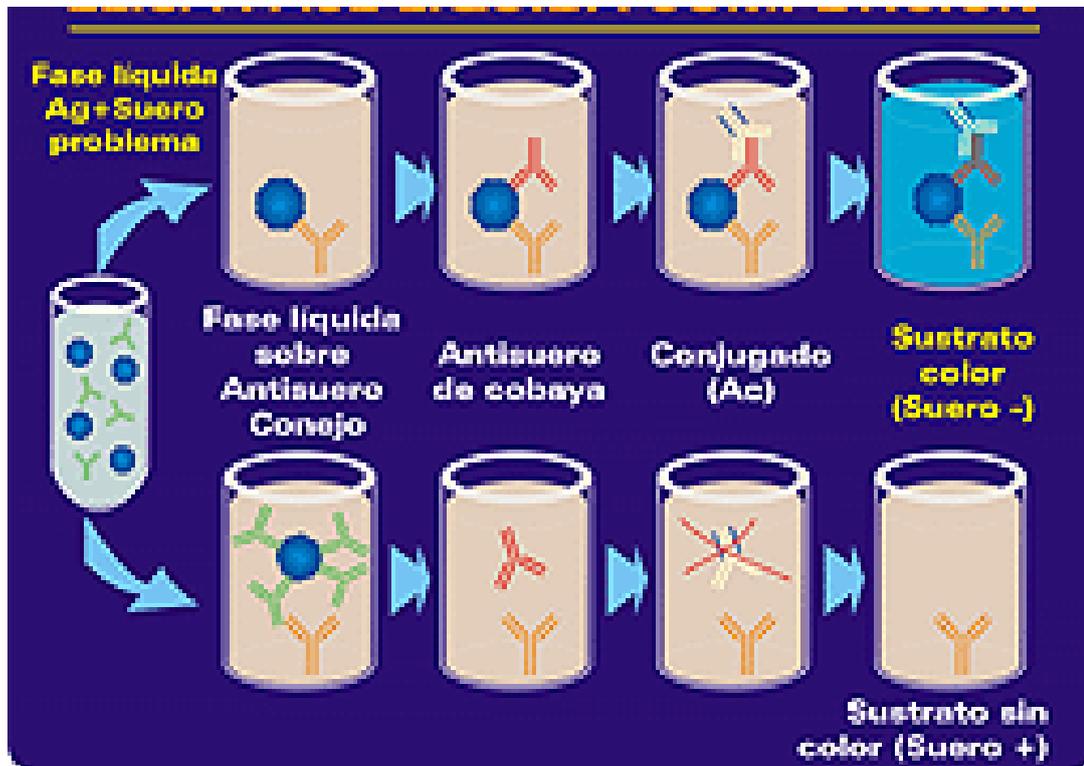


Figura Nº 14. Roitt, 1998.

### 9.6.- Inmunoblotting (Inmunotransferencia).

El Inmunoblot o Western blot es una técnica mediante la cual se separan proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida y después se transfieren electroforéticamente a un papel de nitrocelulosa o una membrana similar, donde son detectadas con anticuerpos que reconocen los antígenos que hay en ellas<sup>1,8,10</sup>.

Consta de tres fases: En la **primera fase** se separan las proteínas (extractos dérmicos o epidermicos) mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, así los antígenos proteicos que se quieren utilizar para detectar los anticuerpos son separados electroforéticamente en un gel según su peso molecular. En la **segunda fase** - denominada inmunobloting o inmunotransferencia- se transfieren las proteínas que han quedado separadas en el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa mediante otro proceso de electroforesis. En la **tercera fase** se utiliza el papel de nitrocelulosa para identificar los anticuerpos dirigidos contra las proteínas transferidas. El papel se corta a tiras y se incuba con los sueros en estudio, posteriormente se incuban las tiras con un reactivo o anticuerpo secundario que permitirá detectar los anticuerpos que se han unido a las proteínas presentes en las tiras.<sup>42,43</sup>. (Figura N° 15)

## Técnica del inmunoblot o Western blot

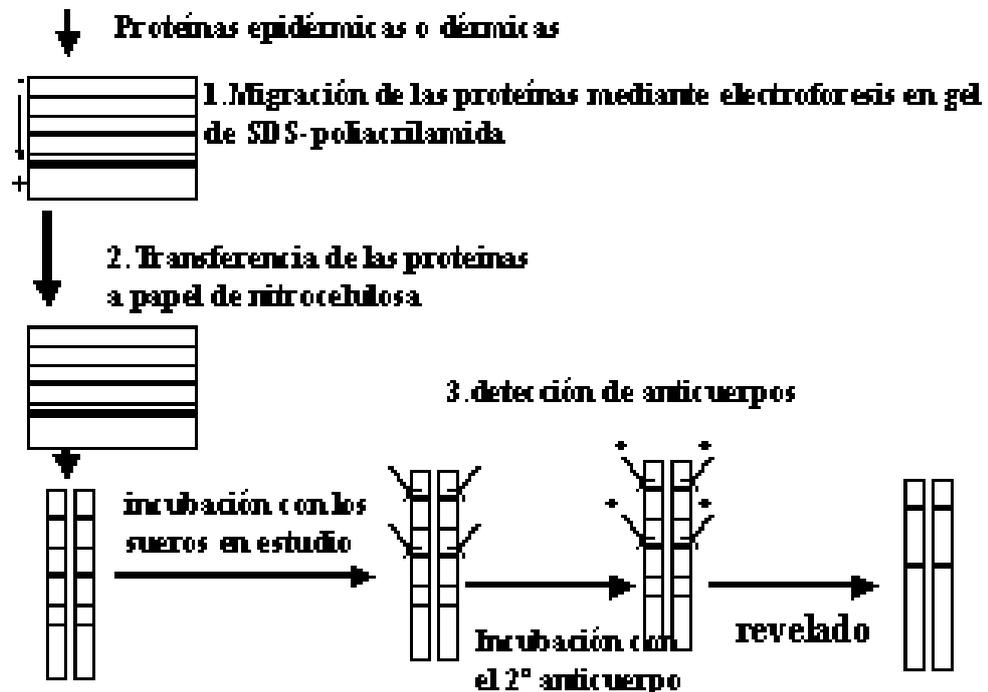


Figura N°15. Jones, 1999

### 9.7. Detección de la respuesta celular

Para estudiar la funcionalidad de las diferentes poblaciones celulares que participan en la respuesta inmune se necesita un primer paso en el que se consiga la purificación de las poblaciones celulares; generalmente se efectúa mediante gradientes de densidad o mediante un sistema automático activado por fluorescencia<sup>42</sup>.

Las técnicas utilizadas para la detección de la respuesta

celular son fagocitosis, estimulación linfocitaria, citotoxicidad.

#### **9.7.1.- Fagocitosis o Inhibición de la migración de macrófagos (MIF)**

La fagocitosis es un mecanismo importante de defensa inespecífica. Esta acción la llevan a cabo diferentes tipos celulares pero principalmente neutrófilos y macrófagos. Los macrófagos intervienen en todos los estadios de la respuesta inmunitaria. En primer lugar, actúan como mecanismo protector rápido que puede responder antes de que haya tenido lugar la amplificación mediada por las células T.

Esta técnica es una de las más valiosas para determinar el grado de sensibilidad de tipo retardado *in vitro*; para ello se observa la inhibición de la migración de macrófagos en tubos capilares sumergidos en un medio de cultivo. Permite analizar la capacidad de los macrófagos y leucocitos polimorfonucleares para fagocitar y destruir intracelularmente microorganismos<sup>27,43</sup>.

### **9.7.2.- Estimulación linfocitaria o blastogénesis**

La utilización de la transformación linfocitaria o blastogénesis es actualmente una de las técnicas más precisas y difundidas para el estudio de la capacidad de estimulación específica y no específica de los linfocitos *in vitro*. Esta técnica se basa en la capacidad que los linfocitos tienen para responder frente a un antígeno (respuesta específica) que por vacunación o por sufrir una infección, ha inducido linfocitos de memoria. Estos linfocitos al estar de nuevo en contacto con el antígeno inducen una transformación blástica<sup>27,43</sup>.

El método de la blastogénesis consiste en cultivar los linfocitos de un organismo con los antígenos que quieren ser evaluados o estudiados y con varios mitógenos que se utilizan como control de la inmunoproliferación (estimulación no específica). La transformación blástica específica se mide por la capacidad que tiene el antígeno de inducir inmunoproliferación<sup>25</sup>.

Tras un tiempo de incubación determinado se añade un isótopo radioactivo (timidina-tritiada) al medio de cultivo donde están los linfocitos. Si hay estimulación blástica

(inmunoproliferación) la timidina se incorporará a los nuevos linfocitos, quedando por tanto las células marcadas radiactivamente. (Figura N° 16)

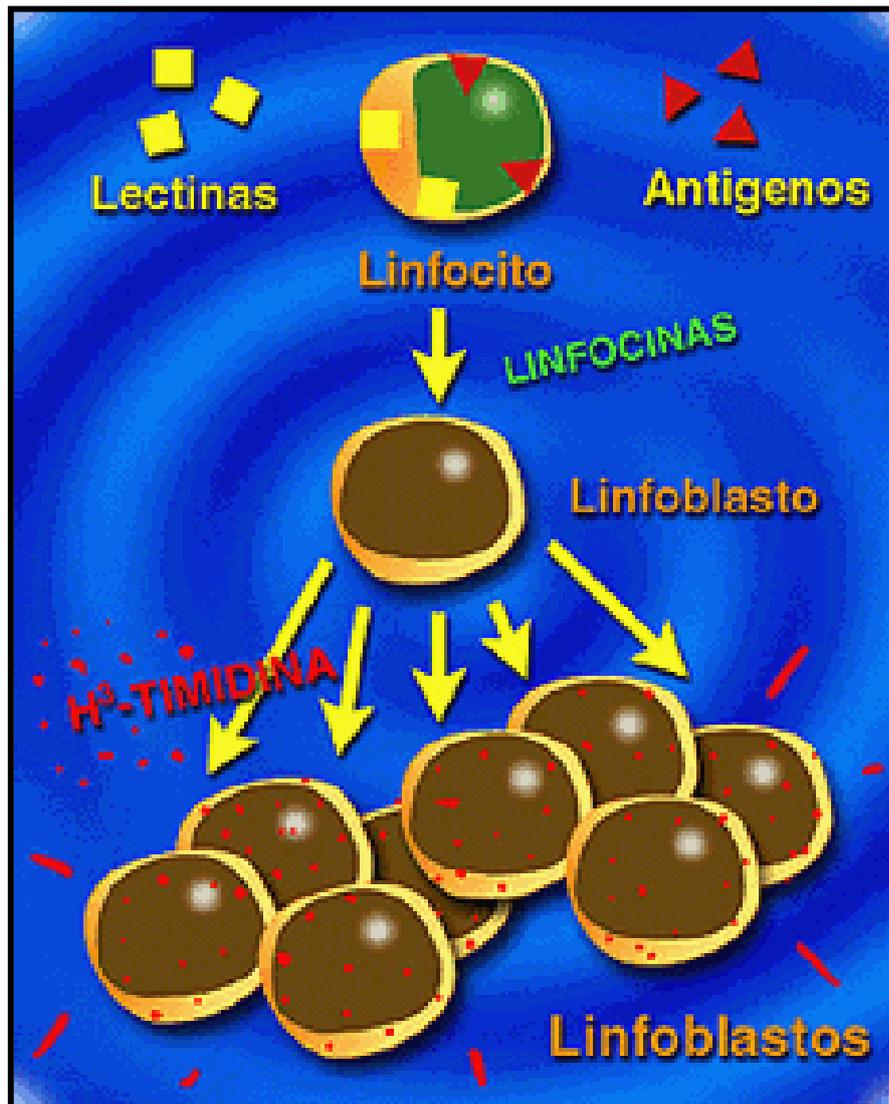


Figura N° 16 Esquema de la estimulación blástica o blastogénesis. Hull, 2005.

### 9.7.3.- Citotoxicidad

La actividad citotóxica de los linfocitos T (CD 8+) frente a una célula diana se puede estudiar, midiendo la capacidad de destrucción, que un determinado número de linfocitos T tienen para destruir un determinado número de células diana, al estar ambas poblaciones en contacto. Hay varios métodos para poder valorar el porcentaje de lisis o muerte celular que expresan las células diana, aunque el más utilizado por su precisión, sensibilidad y reproducibilidad, es el de la liberación de cromo 51 procedente de las células diana. Este método consiste, en lo siguiente: Las células diana (que expresan los antígenos determinados en su membrana) son marcadas con Cromo 51 y puestas en contacto en una proporción adecuada con las células efectoras (linfocitos T)<sup>12,26,47</sup>.

Tras incubar ambas poblaciones celulares conjuntamente por un periodo de tiempo determinado, se centrifugan y seguidamente una parte del sobrenadante resultante es medido mediante un contador de partículas gama para conocer el porcentaje de cromo 51 liberado al medio. A mayor cantidad de cromo liberado mayor actividad citotóxica (Figura N° 17)<sup>46,47</sup>

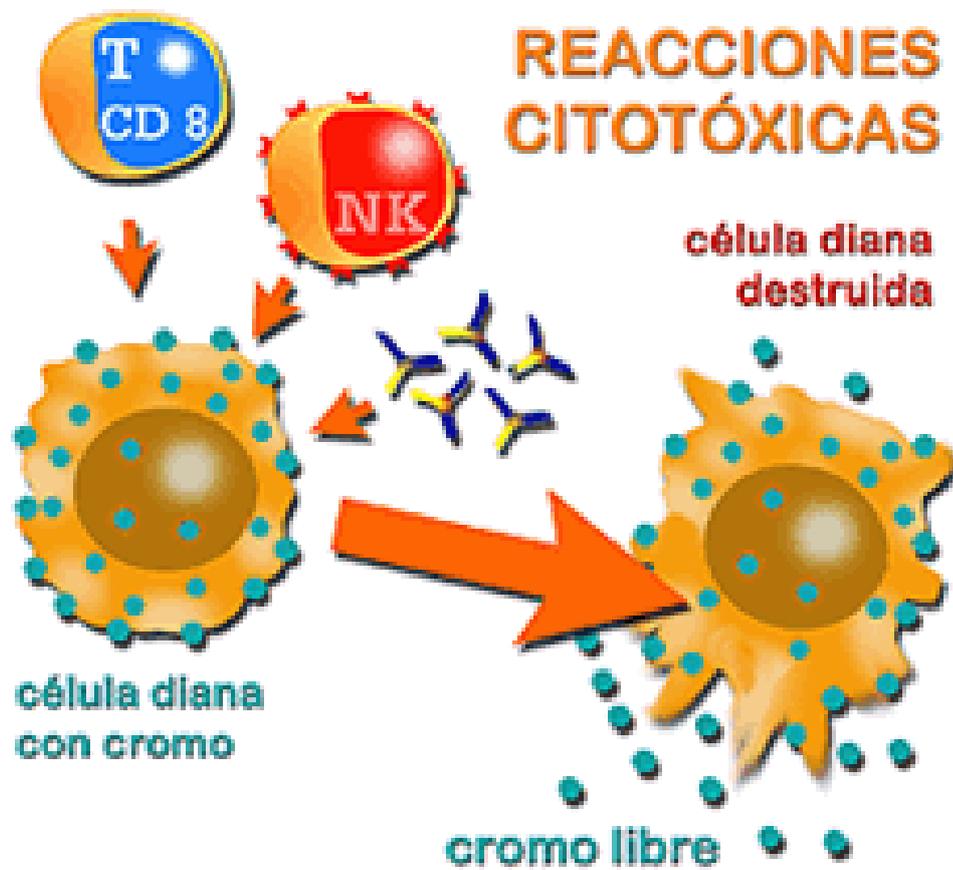


Figura N° 17. Esquema para los estudios de citotoxicidad en sus diferentes formas de inducción: Por linfocitos CD 8+, por células NK y por inmunoglobulinas que activan complemento. *Hull, 2005*

#### 9.7.4.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, mejor conocida como PCR, es una técnica que permite replicar en pocas horas e *in vitro*, pequeñas cantidades de ADN. Por su alta sensibilidad, esta técnica permite identificar un gen a partir de un solo cabello, una célula somática o un espermatozoide. Entre las aplicaciones médicas de la PCR cabe destacar su aporte al desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico. Permite detectar agentes infecciosos como los virus de las hepatitis B y C o regiones del genoma del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH); dentro del campo odontológico permite replicar fragmentos de *Streptococcus mutans* y *S. sobrinus*<sup>43,44</sup>.

Esta técnica permite amplificar pequeñas cantidades de ADN miles de veces. El método se basa en la realización de tres reacciones sucesivas llevadas a cabo a distintas temperaturas. Estas reacciones se repiten cíclicamente entre veinte y cuarenta veces. La muestra se calienta, en el primer paso, hasta lograr la separación de las dos cadenas que constituyen el ADN, hecho que se conoce como **desnaturalización**. En el segundo paso, la temperatura se reduce para permitir la **hibridación** de cada una de las dos cadenas cortas de nucleótidos (oligonucleótidos) con cada una

de las hebras separadas del ADN molde. Se trata de segmentos de ADN de cadena simple, sintetizados en el laboratorio y diseñados de manera tal que permiten definir los límites del tramo de ADN que se desea replicar. En tercer lugar, una enzima ADN polimerasa **extiende** los primers, en el espacio comprendido entre ambos, sintetizando las secuencias complementarias de las hebras del ADN molde. Para ello, la ADN polimerasa usa desoxidionucleósidos trifosfato (dNTPs) agregados a la mezcla de reacción<sup>42</sup>.  
(Figura N° 18 )

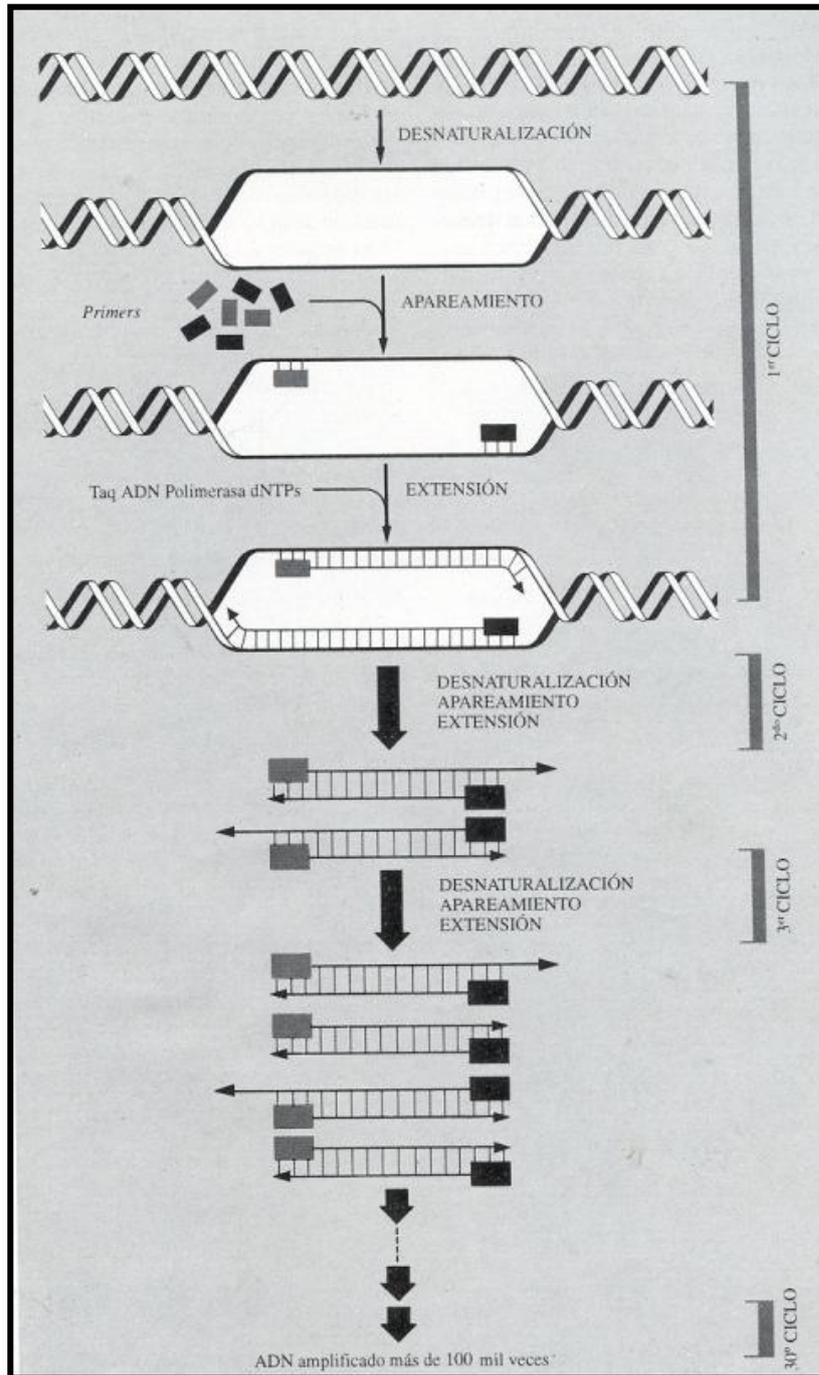


Figura N° 18. Técnica PCR y sus tres etapas: a) desnaturalización, b) hibridación c) extensión *Liébana, 2000.*

## **10.- VACUNAS Y CARIES DENTAL**

En la última década se han hecho posibles esfuerzos dirigidos a la obtención de una vacuna que posea el potencial de inducir y mantener una respuesta inmunológica específica que persista en el tiempo que impida o disminuya la formación de caries.

Una vacuna es un elemento que, al ser introducido al organismo, induce una respuesta inmunológica altamente específica y de memoria que confiere especial protección contra enfermedades de origen infeccioso. Por lo general, encuadra en lo que se conoce como inmunidad activa adquirida. El valor real de las vacunas radica en los efectos preventivos que se consiguen, pues terapéuticamente tienen escaso alcance. El desarrollo de nuevas técnicas en biología molecular han contribuido a acelerar la preparación de vacunas sintéticas que sin duda tendrán una gran importancia en el futuro inmediato<sup>44,45,46</sup>. Los estudios experimentales han aportado valorable información sobre la capacidad de las diferentes rutas de inmunización para lograr una protección frente a la caries dental<sup>7,8</sup>

Se han empleado una variedad de inmunización:

Intravenosa, intraductal, subcutánea, submucosa. Usando estas vías se ha podido conferir protección en modelos experimentales.

La **inmunización oral** ha producido resultados contradictorios y la protección ha sido de corta duración; una particularidad de la respuesta frente a inmunizaciones orales, *sis e compara a la sistémica*, es que su maduración es mucho más precoz y por ello es más eficaz en niños. La **inmunización sistémica** produce altos niveles de anticuerpos séricos y se ha reportado que consigue una reducción del 60-80% en el número de caries, produciendo un ligero aumento en el título de IgAs. Cabe destacar que la **inmunización tópica** solo es posible con antígenos de bajo peso molecular<sup>7,8,11</sup>. La protección se basa fundamentalmente en la acción de la IgG que llega a la cavidad bucal a través del líquido gingival. La seguridad de la inmunización con *S. mutans* es buena ya que no se han encontrado indicios de reacción cruzada con antígenos de músculo cardíaco del hospedador<sup>8,15,33</sup>.

En modelos experimentales también se ha demostrado que la administración de **anticuerpos monoclonales** contra

antígenos de *S. mutans* consigue evitar la colonización dental y reducir el número de caries<sup>15,34,35</sup>.

Todas las líneas de investigación orientadas a la producción de una vacuna contra la caries están apuntando hacia el ataque de los factores involucrados en la adhesión y acumulación bacteriana. Estos blancos son:

#### **10.1.- Proteínas de la pared celular (PAc)**

La proteína de la pared celular del *S. mutans* tiene carácter antigénico y un peso molecular de 190 kDa (kilodaltons). También ha sido denominada antígeno I/II, B, IF, P<sub>1</sub>, MSL-1. Parece que es indispensable en los fenómenos iniciales de adherencia y agregación del microorganismo sobre la superficie dental, tomando como sustrato las proteínas de la película adquirida<sup>18,19</sup>.

## **10.2 Glucosiltransferasas (GTFs)**

Las GTFs son reconocidas como factores de virulencia en la caries dental, lo cual fue inicialmente postulado después de observaciones de lesiones cariosas en experimentos con animales cuando se incluyó sacarosa en su dieta. Esto también fue confirmado con bacterias mutantes que presentaban la característica de ser deficientes de GTFs, los cuales redujeron su cariogenicidad cuando fueron empleadas en modelos experimentales con ratas de laboratorio al ser comparadas con sus progenitoras bacterianas no mutadas<sup>29</sup>.

## **10.3.- Proteínas fijadoras de glucanos (GBPs)**

El *S. mutans* sintetiza al menos dos GBPs, una con un peso molecular de 74 kDa (GBP<sub>74</sub>) y otra de 59 kDa (GBP<sub>59</sub>). Estas proteínas fijan los glucanos libres en el medio, actuando como nexo de unión entre bacterias, formándose así las acumulaciones que quedan adheridas a las superficies dentales. Se han observado que anticuerpos contra GBPs pueden interferir en la patogénesis del *S. mutans*, induciendo la inmunidad protectora de la caries en modelos experimentales con ratas<sup>43,44</sup>.

En base a la capacidad inmunogénica de estas proteínas, se han venido planteando diferentes estrategias para el desarrollo de la vacuna, con la que se busca aumentar los niveles de anticuerpos, especialmente de tipo IgA e IgG, tanto en saliva como en suero, en un proceso comandado por la inmunidad adquirida celular mediada por los linfocitos T. Para ello, se han hecho intentos de lograr una inmunización activa utilizando proteínas completas, combinaciones de porciones de proteína y péptidos sintéticos (secuencias cortas de aminoácidos); éstos son reconocidos por los linfocitos T y B en modelos animales con ratas gnotobióticas (libres de gérmenes) y en monos, con resultados muy alentadores<sup>44,45,46</sup>.

Sin embargo, aunque en la mayoría de los trabajos se reportan resultados que muestran una disminución significativa de la colonización y actividad enzimática del *S. mutans*, reflejadas en índices más bajos de caries dental, no se han alcanzado hasta ahora niveles protectores de anticuerpos, que permitan hablar de una vacuna efectiva desarrollada contra la enfermedad. Es evidente que los esfuerzos actuales están encaminados a optimizar la capacidad inmunogénica de cada una de estas proteínas,

utilizando vehículos como otras bacterias no patógenas (*S. lactis*) y/o adyuvantes, como la toxina colérica, que aumentan considerablemente la respuesta inmunológica, especialmente en los tejidos mucosos como la cavidad bucal<sup>21,45,46</sup>.

## **11.- INMUNIZACION PASIVA**

Se conoce como inmunidad pasiva aquella que se da como resultado de la transferencia de anticuerpos, ya sea transplacentarios o por inyección de anticuerpos obtenidos de un donador previamente inmunizado. Su efectividad es relativamente baja, debido a la vida media de los anticuerpos y a que el receptor puede crear anticuerpos contra ellos, destruyéndolos<sup>47,48,49</sup>.

En el caso de la caries, varios autores han intentado por este método controlar la proliferación y colonización del *S. mutans* sobre las superficies dentales, ensayando la leche bovina y la clara de huevo como vehículos de los anticuerpos, encontrando una reducción en la caries en los animales de experimentación. De otra forma, se han utilizado anticuerpos monoclonales, tipo IgA e IgG, provenientes de ratas y monos, usando como antígenos las PAc y GTFs, previniendo la

colonización de dientes previamente libres de microorganismos. Inclusive, se ha logrado hacer anticuerpos contra PAc en plantas de tabaco por ingeniería genética que proveen protección en los animales hasta por cuatro meses. La permanencia de estos anticuerpos aplicados en forma local es muy limitada, lo que restringe su actividad protectora real<sup>46,50,51,52,53</sup>.

Los anticuerpos monoclonales, descubiertos hace alrededor de tres décadas, se han empleado en el diagnóstico y tratamiento de numerosas enfermedades. En el campo de la estomatología comenzó su aplicación hace más de 15 años. Los anticuerpos monoclonales (AcM) son un instrumento útil y novedoso en el diagnóstico y tratamiento de muchos trastornos. Se han introducido también en el campo de la estomatología, en el proceso de una vacuna contra las caries dentales y en el mejor conocimiento sobre el mecanismo inmunorregulador en la enfermedad periodontal y en las ulceraciones bucales recurrentes<sup>54,55</sup>.

### **11.1.- Teoría de los Anticuerpos Monoclonales (AcM)**

Cuando una proteína se introduce en el cuerpo una variedad de sus antígenos pueden ser reconocidos por el hospedero. El sistema inmune del hospedero, normalmente, reacciona produciendo una variedad de anticuerpos diferentes, cada uno dirigido contra uno de estos determinantes sitios antigénicos. No todos los antígenos son de igual magnitud de estimulación en términos de protección del hospedero. Contrariamente los anticuerpos con relación a los antígenos significativos pueden producirse a niveles bajos e ineficientes. Sin embargo, el Ac producido por una simple célula plasmática es específico para un solo sitio antigénico y la variedad de inmunoglobulinas producidas en respuesta a una proteína representa el gasto colectivo de una población heterogénea de células de plasma<sup>55</sup>.

Cuando una célula plasmática que produce un Ac deseado contra un antígeno se aisló y se mantuvo en cultivo, el Ac de una sola especificidad simple pudo cultivarse y aislarse.

Este Ac único producido por una colonia de células derivadas de una sola célula plasmática

se denomina AcM<sup>52,55</sup>. (Figura N° 19)

El estudio ordinario sobre la patología de las caries dentales se ha concentrado en los *Streptococcus mutans*, en los rasgos de su adherencia a la superficie dental y a la producción de ácidos. La relación de estos microorganismos con la incidencia de caries esta bien establecida.

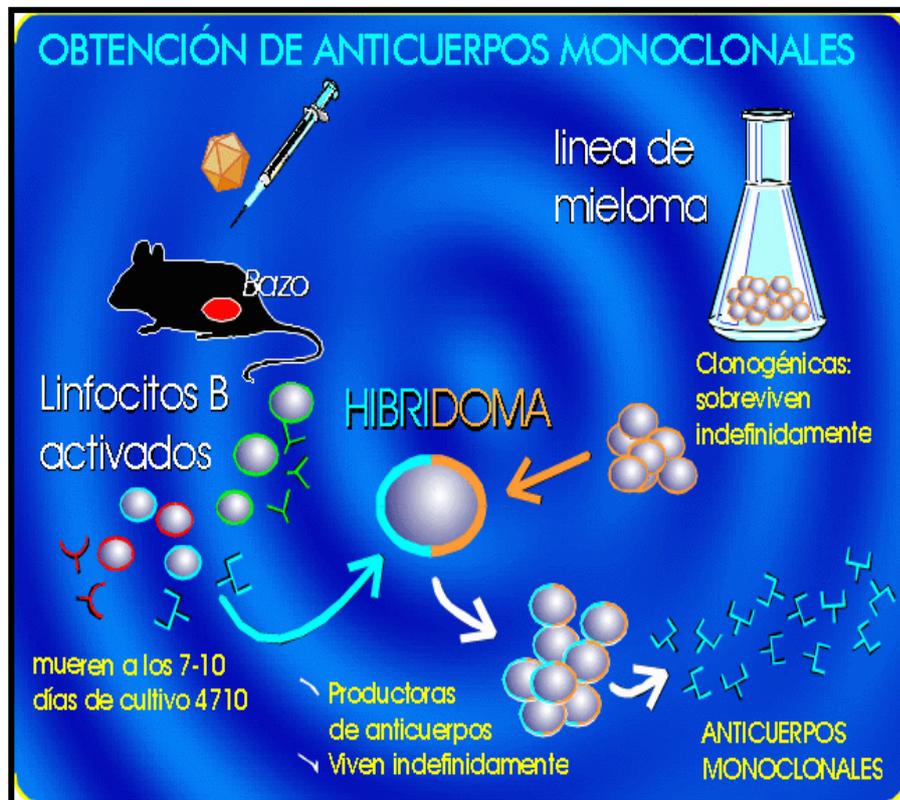


Figura N° 19. Producción de anticuerpos monoclonales. Hull, 2005.

El establecer parámetros que permitieran la producción de vacunas se ve afectada por la posibilidad de provocar miocarditis por reacciones cruzadas con el músculo cardíaco. Con el empleo de AcM se ha logrado estudiar con gran precisión los determinantes antigénicos del serotipo de C del *S. Mutans*, estos determinantes bien específicos y caracterizados pueden emplearse potencialmente en la producción de una vacuna humana apropiada. Así Koges y Everhart reportaron el uso de AcM en este proceso de eliminación del antígeno de reacción cruzada<sup>51,52,53</sup>.

Lehner y colaboradores han reportado también que la inmunización pasiva local con AcM en relación a los *S.Mutans* puede reducir la incidencia de caries dentales. Se reporta el empleo de AcM para la purificación de antígenos específicos que pueden utilizarse con fines de vacunación, los AcM permiten el reconocimiento y cuantificación de los *Streptococcus* en la placa dental, para estudios epidemiológicos y para la predicción de las caries<sup>54,55,56</sup>.

Seguramente, con el esfuerzo constante y prolongado de la comunidad científica mundial para encontrar una vacuna contra esta enfermedad y con el avance de la Ingeniería Genética cuyos productos tienen amplia aplicación en el área de la salud, no debe extrañarnos que en un futuro no muy lejano los profesionales de la Odontología, nos dediquemos a pensar en la prevención y control de otras patologías diferentes de la caries dental.

### III.- REFERENCIAS

- 1.- Liébana, U. Microbiología Oral. Editorial Interamericana. Segunda edición, 2000, pp 410-462.
- 2.- Seif, T. Cariología. Prevención, diagnóstico y tratamiento contemporáneo de la caries dental. Editorial AMOLCA, 1997. pp 35-57.
- 3.- Nolte, W. Microbiología Odontológica. Cuarta edición. México, 1986. Editorial Interamericana. pp 164-176.
- 4.- Ketterl, L. Odontología Conservadora. Cariología. 1994, Masson. pp 25-54.
- 5.- La respuesta inmune en la caries.  
<http://www.ehu.es/noivmoral/10tema22.html>
- 6.- Lehner, T. Inmunology of oral disease. 3° edición. Blackwell. Scientific Pub. 1992. pp 47-59
- 7.- Jones, H.J.; Mason, D.K. Oral manifestations of systemic disease. Enfermedades bucales. 2° edición. Bailliere Tentall, 1999. London. pp 1-5
- 8.- Slots, J; Taubman. Contemporary oral microbiology and immunology. Mosby. Year book, St Louis, 1992. pp 68-85.
- 9.- Barros. Periodoncia, su fundamento biológico. IATROS

ediciones, 1991. Tomo 1, pp 1-105

10.- Jawetz E., Melnick, A. Microbiología Médica. Ed. Manual Moderno. 14<sup>o</sup> Edición 1992 .

11.- H.H. Fudenibag, J. Greenspan; R. Boackle. Enfermedades Bucales y Dentarlas. Inmunología Clínica Edit. Manual Moderno 1982. pp 39-84.

12.- Guilarte C.; Perrone, M. Microorganismos de la placa dental relacionados con la etiología de la periodontitis. Acta Odontológica Venezolana 2004; 42: 3.

13.- Pardi, G.; Perrone, M.; Acevedo, AM.; Mazzali de I., R. Algunas consideraciones sobre Rothia dentocariosa como microorganismo residente. Acta Odontológica Venezolana, 2003; 41 (1): 8-13.

14.- Pardi, G.; Perrone, m.; Acevedo, AM; Mazzali de I., R. Estudios sobre Rothia dentocariosa en pacientes con caries dental. Acta Odontológica Venezolana, 2003; 41 (3): 84-91.

15.- Analyses of *Streptococcus mutans* in saliva with species specific monoclonal antibodies. Hybrid Hybridomics. 2002; 21 (4):225-232.

16.- Roitt, I.; Brostoff, J.; Male, D. Inmunology (5<sup>th</sup> ed) Mosby, 1998. pp 77-98.

17.- Marchant, s.; Bratsford, SR.; Twomey AC.; Roberts, GJ., Beighton D. The predominant microflora of missing caries lesions. Caries Research 2001; (35): 397-406.

18.- Smith, D.J. Ontogeny of immune mechanisms in the oral cavity, 1993, pp 513-523.

19.- Lactobacilli oral health.  
[www.dh.od.mah.se/lbcmmlbchtm](http://www.dh.od.mah.se/lbcmmlbchtm).

20.- Hull, m.; Chow, W. An approach to oral infections and their management. Current Science, 2005; (7): 17-27.)

21.- Smith, DJ; Taubman MA. Emergence of immunocompetence in saliva. Crit Rev Oral Biol Med.1993; 4 (3):335-341.

22.- Ahumad, MC.; Bru, E.; Colloca, ME.; Lopez, ME.; Nader-Macias, ME. Evaluation and comparison of lactobacilli characteristics in the mouth of patients with or without cavities. J. Oral Sci, 2003; 45 (1): 1-9.

23.- Bolton, R.W.; Hlava, G.L. Evaluation of salivary IgA Antibodies to cariogenic microorganisms in children. Correlation with Dental Caries Activity. J. Dent. Res. 1982; 61 (11) 1225-1228.

24.- Khazanova, VV.; Zemskaia EA.; Sakharova, EB.;

Balashov, AN. The local immunity of the oral cavity in dental caries. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd>

25.- Noronha JC.; Massara, M., Souki, B.; Nogucira A. First permanent molar: First indicator of dental caries activity in initial mixed dentition. Braz. Dent. J. (1999), 10 (2): 99-104.

26.- Rodford, JR; Ballantyne HM; Nugent, Z.; Beighton, D.; Robertson, M.; Longbottom, C. Microorganismos en caries asociados en niños de diversos estratos sociales en Escocia. Abolladura 2000; 28 (5): 307-312.

27.- Nylander, A.; Kumlin, I.; Martinson, M.; Twetman, S. Índice de lactobacillus salivales en estudiantes suecos. Eur. J. Sci Oral 2000; 100 (3): 255-258.

28.-Toi Cs.; Cleaton-Jones, PE. ; Daya, NP. Mutans streptococci and other caries associated acidogenic bacteria in five years-old children in South Africa. Oral Microbiol Inmunol. 1999; 14(4):238-243

29.- Chia JS, Chang WC, Yang CS, Chen JY. Salivary and serum antibody response to Streptococcus mutans antigens in humans. Oral Microbiol Inmunol. 2000; 15 (2):131-138.

30.- Munson, MA, et al. Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. J. Clin. Microbiol

2004, 42:3023-3029.

31.- Naspitz GM, Nagao AT, Mayer MP, Carneiro-Sampaio MM. Anti-Streptococcus mutans antibodies in saliva of children with different degrees of dental caries. *Pediatr Allergy Inmunol.* 1999; 10 (2): 143-148.

32.- Russell, M.W.; Hajishengallis, G.; Childers, N.K.; Michalek, S.M. Secretory immunity in defense against cariogenic *mutans Streptococci*. *Caries Research*, 1999; 33:4-15.

33.- Agentes inmunológicos específicos.  
<http://wwwvirtual.unal.edu.co/cursos/odontología>

34.- Brady, I. ; van Tilburg ML; Alford CE, Mc Arthur WP. Monoclonal antibody of the humoral response against mucosally applied *Streptococcus mutans*. *Infect Immun.* 2000; 68 (4):1796-1805.

35.- Zhongua, Kou Qiang, Xue ZC. Effect of monoclonal antibody on the colonization of *Streptococcus sobrinus* and the development of dental caries in rats. *Infect Immun* 1999; 34 (2) 109-111.

36.- Wallengren, MLL; Ericson, D.; Hamberg K.; Johnson, U. HLA-DR4 salivary immunoglobulin A reactions to oral

streptococci. Oral Microbiology and Immunology, 2001: 1645-1653.

37.- Wallengren M.L HLA, salivary IgA and *mutans streptococci*—is there a relation? Swed Dent J Suppl.2004; (166): 1-67.

38.- Patersen, Fc.; Assev, S.; van der Mei HC.; Busscher Hj.; Scheie AA. Functional variation of the antigen I/II surface protein in *Streptococcus mutans* and *Streptococcus intermedius*. Infect. Immun, 2002; 70 (1): 249-256.

39.- Becker, M.R.; Paster, B.J.; Leys, E.J.; Moeschberger, M.L.; Galvin, J.L.; Boches, S.K.; Dewhirst, F.E.; Griffen, A.L. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. Journal of clinical microbiology 2002: 1001-1009.

40.- Cole, MF, Bryan S, Evans MK, Pearce CL, Sheridan MJ, Sura PA, Wientzen RI, Bowden GH. Humoral immunology to commensal oral bacteria in humans infants: salivary secretory immunoglobulin A antibodies reactive with *Streptococcus mitis* biovar 1, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans*, and *Enterococcus faecalis* during the first two years of life. Infect Immun. 1999; 67 (4):1878-1886.

41.- de Farias, DG.; Bezerra, AC. Salivary antibodies,

amylase and protein from children with early childhood caries. Clin Oral Investig. 2003; 7 (3): 154-157.

42.- de Soet JJ.; Schricks MC, Kratz E, Poland DC, van Dijk W, van Amerongen WE. Dental Caries related to plasma IgG and alpha1-acid glycoprotein. Caries Res. 2003; 37 (2): 79-84.

43.- Wallengren ML, Hamberg K.; Ericson D. Salivary IgA reactions to cell-surface antigens of oral streptococci. Oral Microbiol Immunol. 2004; 19 (3): 188-195.

44.- Gahnberg, L.; Smith D.J.; Taubman, M.a.; Ebersole, J.L. Salivary IgA antibody to glucosyltransferase of oral microbial origin in children. Arch. Oral Biol, 1985; 30 (7): 551-556.

45.- Brathal, D.; Serinirach, R.; Hamberg, K.; Widerstrom, L. Immunoglobulin A reaction to oral streptococci in saliva of subjects with different combinations of caries and levels of *mutans Streptococci*. Arch. Oral Biol, 2002; 36 (4): 496-503.

46.- Koga-Ito CY.; Unterkircher, CS.; Watanabe H.; Martins CA.; Vidotto V, Jorge AO. Caries risk tests and salivary levels of immunoglobulin to *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* in mouthbreathing syndrome patients. Caries Res. 2003; 37 (1): 38-43.

47.- Alcota, M.; González, F. Avances en el desarrollo de una vacuna contra la caries dental.

<http://www.redclinica.cl/publicaciones/volumen132/Vacunacaries.pdf>

48.- Michalek, SM; Katz, J Childers, NK. A vaccine dental caries: an overview. BioDrugs. 2001; 15 (8):501-508.

49.- Shimazaki, Y.; Mitoma, M.; Nakano, Y.; Yamashita, Y.; Okano, K.; Nakano, Y.; Fukuyama, M.; Nada, Y.; Koga, T. Passive immunization with milk produced from an immunized cow prevents oral recolonization by Streptococcus mutans.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&do>

50.- Smith, DJ. Caries vaccines for the twenty-first century. J Dent Educ. 2003; 67 (10): 1130-1139.

51.- Han, T.K.; Yoder, S.; Cao, C.; Ugen, K.E.; Dao, M.L. Expression of Streptococcus mutans wall-associated protein A gene in Chinese hamster ovary cells: prospect for a dental caries DNA vaccine. DNA Cell Biol, 2001; 20 (9): 595-601.

52.- Osawa, K.; Miyazaki, K.; Shimura, S.; Okuda, J.; Matsumoto, M.; Ooshima, T. Identification of cariostatic substances in the cacao bean husk: Their anti-glucosyltransferase and antibacterial activities. J. Dent.

Res.2001; 80 (11): 2000-2004.

53.- Brevis: construction of a chimeric shuttle plasmid secreting its gene product. *Biochim Biophys Acta*. 2004, 15 ; 1626 (1-3): 57-64. PMID: 12697330 [PubMed - indexed for MEDLINE]

54.- Hicks, J. Biological factors in dental caries: role of remineralization and fluoride in the dynamic process of demineralization and remineralization. *J. Clin. Pediatr. Dent.* 2004, 28: 203-214.

55.- Smith, DJ.; Kin WF.; Godiska R. Passive transfer of immunoglobulin Y antibody to *Streptococcus mutans* glucan binding protein B confers protection against experimental dental caries. *Infect. Immun*, 2001; 69 (5): 3135-3142.

56.- Llana Puy C., Montañana Ll., C.; Corner N., L. *Med. oral patol. oral cir. bucal (Ed.impr.)*, 2004, vol.9 N°3 pp 338-395.