

Recuento de Células Infiltrantes CD4+, CD8+ y CD19+ en el Tejido Gingival de Individuos con Periodontitis Crónica

Recount of CD4+, CD8+ and CD19+ Infiltrate Cells in Gingival Tissues of Subjects with Chronic Periodontitis

Cisterna C¹, Rivera O¹, Dutzan N¹.

RESUMEN

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria del tejido periodontal, iniciada por el biofilm subgingival, que genera la destrucción progresiva de las estructuras de inserción dentaria. La naturaleza de la respuesta inflamatoria, determinaría el carácter destructivo de la enfermedad, considerándose un importante modelo para investigar el potencial patológico del infiltrado celular. En la periodontitis, este infiltrado incluye linfocitos T y B. Los linfocitos T CD4+ y T CD8+, efectores de la inmunidad celular, son claves en la inmunorregulación, pues pueden generar una respuesta celular o humoral. La relación T CD4+/CD8+ es considerada un indicador de la función del sistema inmune. Para determinar los porcentajes de células CD4+, CD8+ y CD19+ en el tejido gingival de individuos con periodontitis crónica y periodonto sano, y el valor de la razón entre las células CD4+/CD8+, tomamos biopsias de tejido gingival a 17 sujetos con periodontitis crónica y 11 periodontalmente sanos. Las muestras fueron digeridas en colagenasa, inmunotipificadas y analizadas mediante citometría de flujo, obteniendo que los porcentajes de todas las poblaciones estudiadas, así como, el valor de la razón CD4+/CD8+ aumentaron en las muestras de tejido enfermo respecto al tejido sano. Todas estas diferencias fueron estadísticamente significativas. Concluimos que las células CD4+, CD8+ y CD19+, son las más abundantes dentro del infiltrado celular de la periodontitis crónica, y suponemos que las células CD4+ serían claves en la regulación de la respuesta inmune de la enfermedad, dado que su población registró el mayor aumento en el tejido enfermo.

Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral Vol 1(2); 57-60, 2008.

Palabras claves: Periodontitis crónica, linfocitos, infiltrado celular.

ABSTRACT

The periodontitis is an inflammatory disease of the periodontal tissues, initiated by subgingival biofilm, that result in the progressive destruction of the structures that support the teeth. The nature of inflammatory response, could determine the destructive character of disease, and provides an important model for investigation of the pathological potential of cellular infiltrates. In the periodontitis, the infiltrates includes lymphocytes T and B. The lymphocytes T CD4+ and T CD8+, effectors of cellular immunity, are key cells in immunoregulation because they can lead to cellular or humoral response. The ratio of CD4+/CD8+ is considered to be an important indicator for immune system functions. For determinate the percentages of CD4+, CD8+ and CD19+ cells in the gingival tissues of periodontal and healthy subjects, and evaluate the CD4+/CD8+ cells ratio, were obtained biopsies of gingival tissues from 17 chronic periodontitis patients and 11 periodontally healthy subjects. The samples were incubated in collagenase, immunolabeling and analyzed using flow cytometry. The obtained percentages in every studied cell population, as well, the ratio CD4+/CD8+ were increased in the periodontitis biopsies respect to healthy tissues. Every difference was statistically significant. We conclude that CD4+, CD8+ and CD19+, are the most abundant cells in the chronic periodontitis cellular infiltrate, and we suspect that CD4+ cells could be key on the immune response regulation to the disease, since this population recorded the higher increase in sick tissues.

Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral Vol 1(2); 57-60, 2008.

Key words: Chronic periodontitis, lymphocytes, cellular infiltrates.

INTRODUCCIÓN

La periodontitis crónica es una enfermedad de etiología bacteriana y de naturaleza inflamatoria que afecta a los tejidos de inserción del diente, generando la destrucción del ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar⁽¹⁻²⁾.

Los mecanismos de defensa del hospedero frente a la infección pueden ser locales o sistémicos, específicos o inespecíficos, y humorales o celulares⁽³⁾.

En periodontitis, y específicamente en el infiltrado celular de la lesión periodontal establecida y avanzada, los linfocitos del tipo T (LT) y B (LB), jugarían un rol clave, dadas sus funciones inmunorreguladoras y efectoras del sistema inmune⁽³⁻⁴⁾. No obstante, se ha observado también que estas células están involucradas en la patogénesis de la enfermedad exacerbando la respuesta inflamatoria frente al biofilm subgingival y favoreciendo la destrucción tisular⁽³⁾, principalmente mediante la síntesis de citoquinas como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleuquina (IL)-6 y el ligando del receptor activador del factor nuclear κ B (RANKL),

las que contribuyen a la destrucción que caracteriza a la periodontitis⁽⁵⁻⁶⁾. Asimismo, la razón entre las células TCD4+ y las células TCD8+ (CD4+/CD8+) es considerado un importante indicador del carácter de la respuesta inmune, puesto que cada subpoblación celular puede guiar hacia una respuesta particular, pudiendo ser esta predominantemente celular o predominantemente humoral⁽⁷⁻⁸⁾. Estudios han determinado los niveles sanguíneos de células T y B en individuos con periodontitis⁽⁹⁾. No obstante, son pocos los estudios que registran localmente, en los tejidos afectados, la representación que alcanzan estas células⁽⁹⁾. Más aún, los trabajos existentes emplean en su mayoría para el conteo celular técnicas semicuantitativas⁽⁹⁾. Tampoco se han encontrado estudios que simultáneamente cuantifiquen las poblaciones de linfocitos T y B.

El determinar diferencias en la distribución porcentual de estas células, entre individuos periodontalmente sanos y otros enfermos, podría relacionarse con la fisiopatología de la periodontitis crónica⁽⁹⁾.

El propósito de este estudio es determinar y comparar el por-

1. Laboratorio de Biología Periodontal, Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Chile.

centaje de células CD4+, CD8+ y CD19+, así como el valor de la razón CD4+/CD8+ en el tejido gingival de individuos con periodontitis crónica e individuos periodontalmente sanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de individuos

Los sujetos incluidos en este estudio solicitaron tratamiento periodontal, en el Centro de Diagnóstico y Tratamiento Dra. Eloisa Díaz, correspondiente al Servicio de Salud Metropolitano Norte, Santiago.

Para conformar el grupo de individuos con periodontitis crónica, se examinaron 56 sujetos, de los cuales 17 cumplieron con los criterios de inclusión, he ingresaron al estudio. Dichos criterios fueron: edad ≥ 35 años, 14 o más dientes presentes sin contabilizar los terceros molares, de los cuales al menos 6 debían ser molares. Presentar al menos 4 sacos periodontales con PS ≥ 5 mm, 6 sitios periodontales con NIC ≥ 3 mm y evidencia radiográfica de reabsorción ósea. Los criterios de exclusión comprendieron: terapia periodontal previa, condiciones médicas que ameritaran premedicación antibiótica, ingesta de antibióticos, anti-inflamatorios esteroidales o no esteroidales y/o hormonas 6 meses antes del comienzo del estudio, embarazo, fumar 10 o más cigarrillos diarios, o enfermedades que afecten el desarrollo de la enfermedad periodontal.

Como grupo control se estudió a 11 individuos, de edad ≥ 35 años, con al menos 14 dientes sin contabilizar los terceros molares, y de periodonto sano. Los criterios de exclusión para este grupo fueron los mismos que se utilizaron para el grupo de individuos con periodontitis.

Previo al inicio del estudio, todos los participantes firmaron un consentimiento informado, aprobado por el comité de ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Los sujetos enfermos ingresaron a un programa de tratamiento y mantención de enfermedades periodontales.

Evaluación clínica

En todos los individuos, un investigador calibrado efectuó mediciones dicotómicas respecto a la presencia de placa, tras lo cual realizó una profilaxis supragingival, para facilitar el uso de los instrumentos de medición. Luego se tomaron mediciones replicadas de profundidad al sondaje (PS) y nivel de inserción clínica (NIC), y una medición dicotómica respecto del sangramiento al sondaje, todo en seis sitios por diente (mesiobucal, bucal, distobucal, distolingual, lingual, mesiolingual).

Para estas mediciones se utilizó una sonda periodontal milimetrada, tipo Carolina del Norte (Hu Friedy, Gracey, USA).

A los individuos con periodontitis crónica se les tomó una biopsia de tejido gingival, seleccionándose un sitio periodontal con una PS ≥ 5 mm y una pérdida de inserción clínica ≥ 3 mm. En tanto, las biopsias de individuos periodontalmente sanos, provinieron de sitios sometidos a cirugía periodontal por motivos de alargamiento coronario de indicación protésica.

Recuento de células mediante citometría de flujo

Inmediatamente después de su obtención, las biopsias fueron sumergidas en 5 ml de medio de transporte RPMI 1640 suplementado con 50 μ g/mL de Penicilina, 50 μ g/mL de Estreptomicina y 0,1% de L-Glutamina⁽¹⁰⁾, manteniéndolas a 4°C hasta ser procesadas. Al momento de su procesamiento, las muestras fueron lavadas en amortiguador PBS estéril, eliminando detritus y restos de sangre. Luego, fueron pesadas en una balanza analítica (AFA 120 LC, ADAM®) y seccionados, empleando un bisturí de hoja número 15. Después se incubaron en un medio de digestión compuesto por: RPMI 1640, 0,1% L-glutamina, 290 ui/mL de colagenasa clostridial tipo IV, 50 μ g/mL de penicilina, 50 μ g/mL de estreptomicina, en una relación de 1 mL de solución de digestión por cada 50 mg de tejido⁽¹⁰⁾, durante 12 horas ("overnight") en baño termostático (mod. LC3 0155, DAIHAN LAB TECH Co., LTDA. Korea) a 37°C, y agitación constante. Posteriormente las muestras fueron tamizadas utilizando un cell strainer de nylon (BD Falcon™, Ma USA) y lavadas tres veces en PBS estéril mediante centrifugación (Gosheimser 56. Hermle Labortechnik GMBH®, Germany) a 2.500 r.p.m., durante 10 minutos y a 4°C, y se resuspendieron en 500 μ l de medio de cultivo completo, compuesto por

medio RPMI 1640 suplementado con 50 μ g/mL de Penicilina, 50 μ g/mL de Estreptomicina y 100 μ l/ml de suero bovino fetal al 10%. Luego se realizó un conteo celular en cámara de Neubauer (EM, Hirschmann Techcolor) mediante microscopio de contraste de fases (Axiovert 100, Zeiss Co., Germany) donde se evaluó la viabilidad fisiológica celular por exclusión del colorante azul de tripán.

Las células obtenidas, fueron divididas en cinco tubos, con 200.000 células por tubo, suspendidas en 100 μ l de muestra cada uno, tras lo cual se agregó a cada tubo 3 μ l del anticuerpo conjugado o isotipo correspondiente, y durante 30 minutos se les mantuvo en un ambiente protegido de la luz y a 4°C. Para este proceso se utilizaron los anticuerpos: anti-CD4 humano de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) para identificar los linfocitos T cooperadores (CD4+), anti-CD8 humano de ratón conjugado con ficoeritrina (PE) para inmunotipificar a los linfocitos T citotóxicos (CD8+), y anti-CD19 humano de ratón conjugado con FITC para identificar la población de linfocitos B (CD19+) (BD Pharmingen™). Como controles de la emisión de fluorescencia se usaron los isotipos FITC y PE.

Posteriormente, las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo FACSsort Becton Dickinson (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, Ca, USA).

Análisis de datos

Los datos obtenidos por citometría de flujo fueron graficados en software WinMDI® versión 2.8 y analizados en software estadístico Graph Pad Instat®, versión 3.06 (graph Pad software, Inc. Ca, USA).

Para el análisis de las variables de PS, NIC y la edad de los sujetos, se empleó la prueba estadística Welch's corrected t-test. Las variables dicotómicas sangramiento al sondaje y presencia de placa al igual que el género se analizaron utilizando la prueba estadística Fisher's test. En tanto, los porcentajes de células CD4+, CD8+, y CD19+, así como el valor de la razón CD4+/CD8+ del grupo estudio y del grupo control, se les comparó individualmente aplicando la prueba estadística Welch's corrected t-test.

RESULTADOS

Características clínicas

El grupo de individuos con periodontitis crónica, quedó constituido por un 64,71% de mujeres y un 35,29% de hombres (11 mujeres y 6 hombres), de un rango etario entre los 35 y los 73 años (promedio = 51,93 \pm 11,53 años). En el grupo control, el 54,54% fueron mujeres y el 45,45% hombres (6 mujeres y 5 hombres) cuyas edades fluctuaron entre los 35 y los 59 años (promedio = 45,3 \pm 9,01 años). No existieron diferencias significativas entre los grupos experimental y control para estas variables ($p > 0,05$).

El promedio de PS y NIC de los individuos con periodontitis respecto de los individuos periodontalmente sanos fue de 4,24 \pm 0,77 mm versus 1,45 \pm 0,19 mm ($p < 0,0001$) y de 5,14 \pm 1,33 mm versus 1,55 \pm 0,25 mm ($p < 0,0001$) respectivamente. Mientras que, el porcentaje promedio de sitios con sangramiento al sondaje y con presencia de placa bacteriana fueron de 62,25% \pm 10,41 y 54,78% \pm 6,7 en individuos con periodontitis y de 16,4% \pm 3,42 ($p < 0,0001$) y 13,57% \pm 8,85 ($p = 0,0378$) en individuos con periodonto sano.

Recuento celular

Tal como se puede observar en la tabla 1, el porcentaje de células CD4+, CD8+ y CD19+, fue mayor en las muestras de individuos con periodontitis que en las de individuos periodontalmente sanos. Todas estas diferencias porcentuales en el número de las células estudiadas, fueron estadísticamente significativas.

Tabla 1. Porcentaje de células CD4+, CD8+ y CD19+, y valor de la razón CD4+/CD8+, en el tejido gingival de individuos con periodontitis e individuos sanos. (Promedio ± desviación estándar).

	Periodontitis n = 17	Sanos n = 11
Células CD4+ (%)	31,37 ± 15,28	5,29 ± 2,05 €
Células CD8+ (%)	15,4 ± 4,71	3,67 ± 1,58 ¥
Células CD19+ (%)	34,35 ± 16,01	10,87 ± 4,38 ¢
Razón CD4+/CD8+	2,03 ± 0,65	1,44 ± 0,93 ₣

€ Porcentaje de células CD4+ en sujetos con periodontitis v/s sanos, p value < 0,0001.
 ¥ Porcentaje de células CD8+ en sujetos con periodontitis v/s sanos, p value < 0,0001.
 ¢ Porcentaje de células CD19+ en sujetos con periodontitis v/s sanos, p value = 0,005.
 ₣ Razón de células CD4+/CD8+ en sujetos con periodontitis v/s sanos, p value = 0,018.

Recuento de células CD4+

En la figura 1 podemos observar, que el porcentaje de células CD4+ en las muestras de individuos con periodontitis fue de 31,37% ± 15,28 respecto del total de células analizadas, mientras en el grupo control el valor fue de 5,29% ± 2,05 (p<0,0001). Comparativamente, fue en esta población celular donde se constató la mayor diferencia porcentual entre el tejido sano y enfermo (tabla 1).

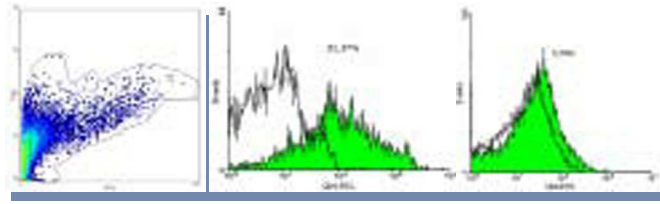


Figura 1. Density Plot e histogramas de una muestra representativa para la determinación del porcentaje de células CD4+ a) Density plot que relaciona tamaño (eje ordenadas) v/s complejidad (eje abscisas) de los eventos registrados por el citómetro de flujo. El área delimitada abarca las células presentes en la muestra y que luego fueron graficadas; b) y c) histogramas del número de células (eje de ordenadas) v/s la intensidad de fluorescencia de estas (eje de abscisas). En blanco se observa el control y en verde la muestra inmunotipificada con anti hCD4-FITC. Se indica el porcentaje promedio de células positivas para el marcaje. b) Individuos con periodontitis crónica; c) individuos sanos.

Recuento de células CD8+

Tal como se aprecia en la figura 2, en el tejido gingival del grupo de individuos enfermos el porcentaje de células CD8+ ascendió al 15,4% ± 4,71 del total de células de la muestra, mientras que en individuos sanos las células CD8+ representaron el 3,67% ± 1,58 (p < 0,0001). Recuento de células CD19+.

Como muestra la figura 3, en el tejido gingival del grupo de estudio, el porcentaje promedio de células CD19+ llegó al 34,35% ± 16,1 versus el 10,87% ± 4,38 del grupo control (p = 0,005).

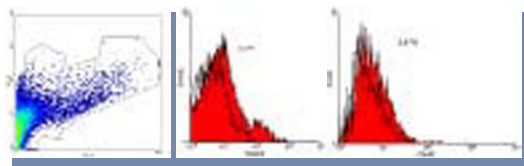


Figura 2. Density Plot e histogramas de una muestra representativa para la determinación del porcentaje de células CD8+ a) Density plot que relaciona tamaño (eje ordenadas) v/s complejidad (eje abscisas) de los eventos registrados por el citómetro de flujo. El área delimitada abarca las células presentes en la muestra y que luego fueron graficadas; b) y c) histogramas del número de células (eje de ordenadas) v/s la intensidad de fluorescencia de estas (eje de abscisas). En blanco se observa el control y en rojo la muestra inmunotipificada con anti hCD8-PE. Se indica el porcentaje promedio de células positivas para el marcaje. b) Individuos con periodontitis crónica; c) individuos sanos.

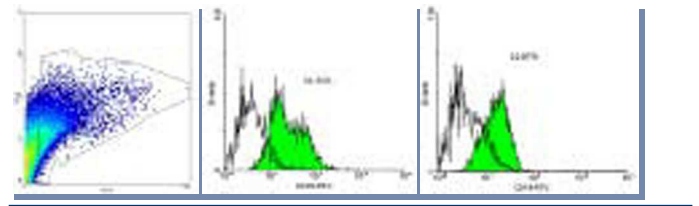


Figura 3. Density Plot e histogramas de una muestra representativa para la determinación del porcentaje de células CD19+ a) Density plot, que relaciona tamaño (eje ordenadas) v/s complejidad (eje abscisas) de los eventos registrados por el citómetro de flujo. El área delimitada abarca las células presentes en la muestra y que luego fueron graficadas; b) y c) histogramas del número de células (eje de ordenadas) v/s la intensidad de fluorescencia de estas (eje de abscisas). En blanco se observa el control y en verde la muestra inmunotipificada con anti hCD19-FITC. Se indica el porcentaje promedio de células positivas para el marcaje. b) Individuos con periodontitis crónica; c) individuos sanos.

Recuento de células CD19+

Como muestra la figura 3, en el tejido gingival del grupo de estudio, el porcentaje promedio de células CD19+ llegó al 34,35% ± 16,1 versus el 10,87% ± 4,38 del grupo control (p = 0,005).

Relación células CD4+/CD8+

El valor de la razón CD4/CD8, tuvo un promedio mayor en el grupo de estudio que en el grupo control (tabla 1). El valor promedio para la razón correspondió en los individuos con periodontitis a 2,03 ± 0,65, y en los individuos periodontalmente sanos a 1,44 ± 0,93 (p = 0,018).

Correlación clínica

Los resultados en lo relativo a los porcentajes de células CD4+, CD8+ y CD19+, no guardaron correlación con respecto a las características clínicas de los individuos incluidos en este estudio.

DISCUSIÓN

La predominancia de los linfocitos en el infiltrado celular del tejido afectado por periodontitis, de manifiesto en este trabajo, avala la idea que este segmento del infiltrado celular es responsable de la regulación de la respuesta inmune en los tejidos periodontales⁽¹¹⁾. Además, los cambios en la composición del infiltrado celular, entre el tejido sano y enfermo, dan señales de una alteración local en los eventos inmunorregulatorios del huésped⁽¹²⁾.

En cuanto a los valores que obtuvimos para las células CD4+ y CD8+, estos se asemejan a los disponibles en la literatura. En biopsias de tejido gingival los trabajos existentes muestran que la cantidad de células CD4+ y CD8+ aumentan en el tejido enfermo respecto al tejido sano⁽¹³⁻¹⁴⁾. Entre los estudios que utilizan citometría de flujo para analizar biopsias de tejido enfermo, se puede establecer un rango para las células CD4+ que fluctúa entre el 21,63 % ± 8,17⁽⁷⁾ y el 30,7 % ± 3,9⁽¹⁵⁾ del total de células. Mientras que para las células CD8+ este rango va desde el 8,58% ± 3,92⁽⁸⁾ al 14,6% ± 1,6⁽¹⁵⁾.

En cuanto a la cantidad de células CD19+, fenotipo expresado por los LB, Cobb et al 1989⁽¹⁶⁾ mediante inmunohistoquímica determinó que estos incrementan su número 20 veces en el tejido enfermo respecto al sano. Este tipo celular en conjunto con su forma celular diferenciada, la célula plasmática, constituyen según otros estudios, el tipo celular predominante del infiltrado celular en periodontitis crónica⁽¹⁷⁻²⁰⁾. No obstante, el hecho que los LB se encuentren en mayor proporción que los LT en periodontitis, no es consistente en todos los estudios, existiendo reportes que señalan un predominio de LT por sobre LB⁽²¹⁾, o al menos una relación de igualdad en sus proporciones⁽²²⁾. Esto último, se asemeja a la relación entre LT y LB que nosotros encontramos.

En tanto, los estudios que han investigado la razón entre células CD4+/CD8+ parecen variar dependiendo del método de evaluación y el lugar de obtención de la muestra^(8,23). Orbak et al 2003⁽⁷⁾, determinó mediante citometría de flujo un valor promedio de la razón CD4+/CD8+ en periodontitis crónica de 2,93 ± 1,68. Semejante al valor de Erciyas et

al 2006⁽⁶⁾, que con un protocolo similar, determinó que el promedio para esta razón era $2,80 \pm 1,26$. No obstante, Seymour et al 1997⁽¹⁵⁾, en biopsias de tejido gingival y empleando citometría de flujo, determinó un valor de la razón CD4+/CD8+ igual a $1,0 \pm 0,1$ en individuos con periodontitis crónica y de $1,8 \pm 0,2$ en individuos periodontalmente sanos. Valores que además contrastó con análisis en sangre periférica, donde obtuvo $2,1 \pm 0,1$ para individuos con periodontitis, y $2,1 \pm 0,1$ para individuos sanos.

Otros trabajos que compararon biopsias de tejido gingival de sitios activos, inactivos y sanos, observaron que en los sitios activos existía una mayor proporción de LB que en los sitios estables⁽²⁴⁾. Asimismo, Liljenberg et al 1994⁽¹⁴⁾, encontró que LT y LB están en mayor proporción en sitios activos que en sitios inactivos, aunque no registró diferencias entre sitios enfermos y sitios inactivos.

Esta información podría explicar la alta desviación estándar que obtuvimos en el recuento de las células CD4+ y CD19+. Esto porque, tomamos biopsias de tejido gingival enfermo, sin conocer si los sitios estaban activos o inactivos. A la luz de la información, existiría una diferencia en el recuento de estas células dependiendo del estado de progresión de la enfermedad^(14,24), por lo que sería de esperar que la cantidad de linfocitos variara marcadamente entre las muestras de periodontitis, y en consecuencia, registrar una alta desviación estándar en nuestros datos, tal como sucedió.

Las diferencias existentes entre los resultados obtenidos por otros investigadores y nuestros hallazgos se deben en parte al tipo de muestra analizada. En los estudios previos, las muestras estudiadas se obtuvieron posterior a la fase no quirúrgica del tratamiento periodontal, lo que produce una disminución en la cantidad y calidad del biofilm subgingival y por tanto una disminución de la inflamación y de la cantidad de células infiltrantes en los tejidos afectados. En nuestro trabajo, las muestras de los individuos con periodontitis se recolectaron antes de que

el sujeto fuese sometido a tratamiento, lo que en nuestra opinión, refleja con mayor exactitud los procesos inmunológicos desarrollados durante la patología.

Es destacable que algunos estudios al evaluar el infiltrado celular en el tejido gingival, antes y después del tratamiento periodontal no quirúrgico, determinaron que la densidad de células T y B declina después del tratamiento^(7-8,24), lo cual se aproxima a lo encontrado en el tejido sano.

CONCLUSIONES

El presente trabajo demuestra que existe un aumento estadísticamente significativo en la proporción de células CD4+, CD8+ y CD19+ en el tejido gingival de individuos con periodontitis crónica, comparado con el tejido gingival de individuos periodontalmente sanos, al igual que en el valor de la razón entre células CD4+/CD8+.

Este trabajo enfocado en las células que protagonizan la respuesta inmune adquirida, junto a nuevas investigaciones, en el futuro puede facilitar el entendimiento acerca de los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la periodontitis. Esto a su vez, puede llevar al desarrollo de nuevas modalidades de diagnóstico y tratamiento de la enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio de investigación fue financiado por el Proyecto Fondecyt 1050518.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Socransky S, Haffajee A. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J periodontol.* 1992; 63(4): 322-331.
- Socransky S, Haffajee A, Cugini M, Smith C, Kent Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998; 25: 134-144.
- Kornman K, Page R, Tonetti M. The Host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000.* 1997; 14: 33-53.
- Page R, Schroeder H. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest.* 1976; 34(3): 235-249.
- Vernal R, Dutzan N, Hernández M y cols. High expression levels of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand associated with human chronic periodontitis are mainly secreted by CD4+ T lymphocytes. *J Periodontol.* 2006; 77: 1772-1780.
- Takayanagi H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. *J Periodontol Res.* 2005; 40: 287-293.
- Orbak R, Erciyas K, Erzurum H. Flow cytometric analysis of T-lymphocyte subsets after different treatment methods in smokers and non smokers with chronic periodontitis. *Int Dent J.* 2003; 53: 159-164.
- Erciyas K, Orbak R, Kavrut F, Demir T, Kaya II. The changes in T lymphocyte subsets following periodontal treatment in patients with chronic periodontitis. *J Periodont Res.* 2006; 41: 165-170.
- Malberg K, Molle A, Streuer D, Gangler P. Determination of lymphocyte populations and subpopulations extracted from chronically inflamed human periodontal tissues. *J Clin Periodontol.* 1992; 19: 155-158.
- Stoufi ED, Taubman MA, Ebersole JL, Smith DJ. Preparation and characterization of human gingival cells. *J Periodontol Res.* 1987; 22(2): 144-149.
- Han X, Kawai T, Eastcott J, Taubman M. Bacterial-responsive B lymphocytes induce periodontal bone resorption. *The journal of immunology.* 2006; 176: 625-631.
- Teng Y. The role of acquired immunity and periodontal disease progression. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003; 14(4): 237-252.
- Reinhardt RA, Bolton RW, McDonald T, DuBois LM, Kaldahl WB. In situ lymphocyte subpopulations from active versus stable periodontal sites. *J Periodontol.* 1988; 59: 656-670.
- Liljenberg B, Lindhe J, Berglundh T, Dahlen G, Jonsson R. Some microbiological, histopathological and immunohistochemical characteristics of progressive periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1994; 21: 720-727.
- Seymour G, Taubman M, Eastcott J, Gemmell E, Smith D. CD29 expression on CD4+ gingival lymphocytes supports migration of activated memory T lymphocytes to diseased periodontal tissue. *Oral Microbiol Immunol.* 1997; 12 (3): 129-134.
- Cobb CM, Singla O, Feil P, Theisen, F, Schultz R. Comparison of NK-cell (Leu-7+ and Leu-11b+) populations in clinically healthy gingiva, chronic gingivitis and chronic adult periodontitis. *J Periodontol Res.* 1989; 24(1):1-7.
- Seymour G, Greenspan J. The phenotypic characterization of lymphocyte subpopulations in established human periodontal disease. *J Periodontol Res.* 1979; 14: 39-46.
- Lindhe J, Liljenberg B, Listgarten M. Some microbiological and histopathological features of periodontal disease in man. *J Periodontol.* 1980; 51(5): 264-269.
- Okada H., Kida T, Yamagami H. Identification and distribution of immunocompetent cells in inflamed gingiva of human chronic periodontitis. *Infection and Immunity.* 1983; 41: 365-374.
- Passo S, Reinhardt RA, DuBois LM, Cohen D. Histological characteristics associated with suppurating periodontal pockets. *J Periodontol.* 1988; 59(11): 731-740.
- Modeer T, Dahllof G, Axio E, Sundqvist K. Subpopulations of lymphocytes in connective tissue from adolescents with periodontal disease. *Acta Odontologica Scandinavica.* 1990; 48: 153-159.
- Berglundh T, Liljenberg B, Tarkowski A, Lindhe J. Local and systemic TCR V gene expression in advanced periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1998; 25: 125-133.
- Taubman M, Kawai T. Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2001; 12(2): 125-135.
- Berglundh T, Donati M. Aspects of adaptive host response in periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2005; 32 (6): 87-107.

CORRESPONDENCIA AUTOR

Nicolás Dutzan Muñoz

Olivos 943. Independencia. Santiago. Chile.

ndutzan@gmail.com

Trabajo recibido el 27/02/2008.

Aprobado para su publicación el 01/07/2008.