

Una revisión de Literatura sobre Avances en Inmunología y Respuesta del Huésped en Enfermedad Periodontal

Adolfo Contreras R, Od. *

Palabras claves:

Inmunología/Periodontitis,
Respuesta del huésped Periodontitis,
HLA/CMH/Antígenos,
CDs,
Citoquinas,
Anticuerpos,
Proteoglicanos,
Mediadores de destrucción tisular.

RESUMEN

El entendimiento de la Respuesta Inmune del individuo a la infección bacteriana periodontal, resulta importante para establecer nuevos y/o mejores criterios diagnósticos o pronósticos. También sirve, para proponer terapias más racionales en el tratamiento de las Periodontitis.

Esta revisión pretende actualizar sobre los avances en el área de la Inmunobiología y la aplicación de dichos conocimientos en el entendimiento de la Inmuno/patogénesis de las Enfermedades Periodontales.

Se analizan los siguientes aspectos: Las células del sistema inmune, las moléculas de superficie celulares, el complejo mayor de histocompatibilidad; (CMH); los antígenos de diferenciación (CDs); los receptores, las adhesinas como las integrinas, los Icam, las selectinas, las adhesinas vasculares; las moléculas efectoras como los anticuerpos, las citoquinas, el complemento, los mediadores de la inflamación como los proteoglicanos, las kininas, las anafilotoxinas, los productos del ácido araquidónico como las prostaglandinas y los leucotrienos, aminos activas como la histamina, los mecanismos de inmunidad innata y, finalmente, la respuesta inmune del huésped en las enfermedades periodontales.

* Profesor Asistente Departamento de Estomatología, Facultad de Salud. Universidad del Valle. Cali-Colombia

INTRODUCCION

La enfermedad periodontal es causada por infección bacteriana. Numerosas evidencias implican a los microorganismos de la placa dental como los agentes etiológicos de las periodontitis y las gingivitis.

Algunos géneros bacterianos se consideran Periodontopáticos como: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Espiroquetas* y *Eikenella corrodens*, principalmente estas bacterias son comúnmente encontradas en los pacientes con diagnóstico de Periodontitis crónica del adulto.^{1,2,3}

Otra bacteria, el *Actinomyces actinomycetemcomitans* (A.a), se considera el agente causal de la Periodontitis Juvenil Localizada.^(2,3,4)

Todos los microorganismos mencionados poseen factores de virulencia que causan la destrucción del tejido periodontal e incluso pueden llegar a causar la muerte en animales de experimentación.^{5,6}

El rol del huésped en la patogénesis de las Periodontitis es importante, puesto que en respuesta a la infección, el organismo genera una serie de acciones, con el fin de evitar la diseminación bacteriana. Muchas veces esta activa respuesta puede terminar en destrucción tisular como resultado de reacciones inespecíficas e inmunológicas. Revisemos primero los avances recientes en Inmunobiología para entender el componente del individuo en la Patogénesis de la enfermedad Periodontal.

Avances recientes en Inmunobiología

La investigación en Inmunología en pocos años ha llegado a producir cambios revolucionarios en el entendimiento y el manejo de muchas enfermedades humanas. Las fronteras de esta rama del conocimiento

parecen ilimitadas, habiéndose publicado mucho en investigación básica y aplicada. En la enfermedad periodontal, la Inmunología ayuda al entendimiento de la respuesta del huésped y genera expectativas desde diversos puntos de vista como: el diagnóstico, pronóstico, el establecimiento de poblaciones a riesgo de sufrir estas patologías o aplicando técnicas de biología molecular como el DNA recombinante y clonación se intentan producir vacunas contra los microorganismos causantes de Periodontopatías.

Las áreas de más reciente desarrollo son las siguientes: *Métodos de genética molecular aplicados a estudiar la complejidad del sistema inmune; *clonaje de células inmunes; *estudio de los antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad(CMH); *Identificación de receptores de superficie celular y estudio de sus funciones biológicas, *entendimiento de los mecanismos de regulación de efectores y mediadores inmunológicos.^{7,8}

Para entender esta compleja pero importante área del conocimiento, discutamos secuencialmente:

- 1) Las células del sistema inmune.
- 2) Las moléculas regulatorias en la superficie celular.
- 3) Las moléculas efectoras.
- 4) La inmunidad innata.
- 5) La respuesta del huésped en enfermedad periodontal.

1) Células del sistema inmune:

El sistema inmune en los humanos, ha evolucionado para proteger al huésped contra microorganismos patógenos y sustancias extrañas. El reconocimiento de esta moléculas foráneas es mediado por la cooperación entre las células presentadoras de antígeno y los linfocitos que muestran especificidad frente al antígeno. Esta

especificidad y capacidad de reacción permanece en el individuo con las células de memoria que responden rápidamente al identificar el antígeno previamente reconocido, incluso años después del segundo reto inmunológico.

Los antígenos son presentados por células que fagocitan la noxa y expresan fracciones procesadas de la misma en la membrana celular.

Estas células son: macrófagos, células dendríticas en folículos linfáticos, células de Langerhans y linfocitos B. (Ver Figura No. 1). Sistema Inmune Específico e Innato.

Existen dos tipos principales de linfocitos: Linfocitos B que se originan en médula ósea y posteriormente maduran a células plasmáticas productoras de anticuerpos y linfocitos T que se desarrollan en el timo. Los linfocitos T a su vez se subdividen en linfocitos T ayudadores, linfocitos T supresores y linfocitos T citotóxicos. Los primeros estimulan a los linfocitos B para que realicen amplificación clonal y maduren hasta células plasmáticas productoras de anticuerpos (Acs).

Los supresores enfrían la respuesta inmune, es decir, poseen una acción antagonista respecto de los anteriores.

Los citotóxicos poseen la capacidad de destruir la noxa por acción de perforinas, además estimulan la acción citotóxica de los macrófagos. Los linfocitos T ayudadores (Ta) activados, también producen factores que estimulan a linfocitos T citotóxicos y macrófagos para que realicen sus acciones antimicrobiales. Los fagocitos por excelencia incluyen, macrófagos, neutrófilos y varias células del sistema fagocítico mononuclear ampliamente distribuidas en el cuerpo. Los leucocitos Polimorfonucleares neutrófilos son la primera línea de defensa contra la infección bacteriana, son células que poseen un corto período de vida y constituyen cerca del 70% de los leucocitos de sangre periférica. Se producen en grandes cantidades en médula ósea y circulan por la sangre aproximadamente 4-5 días posteriormente pasan a los tejidos en donde fagocitan agentes infecciosos, degranulan y se lisan.

El área del surco/saco periodontal es una vía natural de salida de estas células. Los monocitos al contrario son células de largo período de vida; éstas pasan de la circulación general a los tejidos, en donde se diferencian en macrófagos que poseen elevadas funciones fagocíticas y juegan un rol importante en la presentación de



(Fig. N° 1)

antígenos. Otra célula mononuclear de importancia en la infección bacteriana periodontal es el osteoblasto.

Muchas otras células están envueltas en la respuesta inmune, algunas responden a factores solubles llamados citoquinas que son producidos por los linfocitos y fagocitos.

Estas células llamadas auxiliares, incluyen mastocitos, basófilos, eosinófilos y plaquetas, que participan activamente en los procesos inflamatorios. Los mastocitos y los basófilos pueden ser sensibilizados por Ig E, ante el contacto con un antígeno liberan su contenido de histamina y serotonina. Los Eosinófilos pueden ser activados por IL-5 y liberar mediadores inflamatorios. Las plaquetas expresan receptores para Ig G, que fijan complejos inmunes y producen la liberación de aminas vasoactivas y factor de crecimiento derivado de las plaquetas.

2) Moléculas de superficie celular con actividad regulatoria

Las interacciones entre las células del sistema inmune no sólo son reguladas a través de citoquinas e inmunoglobulinas sino, mediante un complejo conjunto de moléculas expresadas en la superficie de las células.

Las células del sistema inmune presentan cuatro clases de moléculas que son:

- 1) El Complejo Mayor de Histocompatibilidad o (CMH).
- 2) Los antígenos CD o agregados de diferenciación.
- 3) Los receptores de superficie celular.
- 4) Las adhesinas.

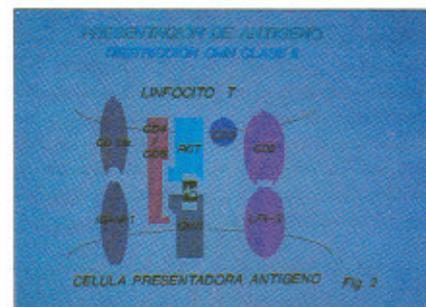
El complejo mayor de histocompatibilidad

Cuando un tejido es transplantado de un individuo a otro se presenta regular-

mente rechazo; esta reacción se debe a que los antígenos de las células del donante difieren de las del receptor. Esto presupone un reconocimiento de lo propio; estos antígenos se denominan de Histocompatibilidad. Pero las funciones del CMH, no son sólo rechazar lo extraño, también permiten la cooperación y comunicación entre las células con los linfocitos T; es decir, facilitan la presentación de antígenos foráneos en asocio con moléculas del CMH de la clase I o II. La abreviatura C.M.H. es un nombre genérico para los antígenos de Histocompatibilidad de los vertebrados, pero cada especie posee un nombre diferente, en los humanos se denomina HLA, por antígenos de los leucocitos humanos y en el ratón se denomina H2. En los humanos el HLA está codificado por genes que se encuentran en los cromosomas 6 y 15. El HLA está dividido en clases I y II, y a su vez en subclases alfa y beta. En los humanos los antígenos de la clase II y subclase alfa se designan por las letras DP, DQ, DR, DN. Los de la clase II, subclase Beta son DO, DP, DQ, DR. En general los antígenos de la clase I se expresan en casi todas las células nucleadas y los clase II aparecen en macrófagos, linfocitos T activados o linfocitos B.

Funciones fisiológicas de las moléculas del CMH

Cuando una célula presentadora de antígeno, enseña un antígeno a un linfocito T, lo hace en asocio de moléculas del complejo mayor de Histocompatibilidad. Este contexto se denomina restricción del CMH para la presentación de antígenos. (Figura 2). Los Linfocitos B pueden reconocer el antígeno solo. La naturaleza exacta de las interacciones entre estas moléculas es comprendida parcialmente en la actualidad, pero se conoce, que algunas combinaciones entre CMH y antígenos no producen una adecuada



(Fig. N° 2)

respuesta inmune, porque ciertos agregados son parcialmente reconocidos y otros no lo son. Los individuos que presentan estos tipos de combinaciones, serán malos respondedores inmunológicos, en últimas serán individuos con predisposición genética de sufrir ciertas enfermedades.

Entonces, el control de la respuesta inmune posee un fondo genético. En la actualidad no es sorprendente que existan asociaciones entre CMH y ciertas enfermedades. Un ejemplo es *Espondilitis Anquilosante*, en donde el 90% de los pacientes llevan el antígeno HLA-B27, mientras sólo un 10% de los sanos lo presentan. Otras enfermedades relacionadas con alelos HLA son: Diabetes mellitus insulino dependiente, artritis reumatoidea, síndrome de Bechet's, enfermedad de Hodgking's y Periodontitis Juvenil Localizada.

ANTIGENOS CD

Los antígenos CD son una familia de moléculas de superficie en los linfocitos humanos. Los anticuerpos que se pueden producir experimentalmente contra los CD o agregados de diferenciación sirven para clasificar una población de linfocitos. Los antígenos CD se usan para diferenciar las diversas células inmunes, por ejemplo los CD2 y CD3 están presentes en los linfocitos T, entonces el anticuerpo monoclonal contra CD3 sirve para diferenciar los linfocitos T de los B, el antígeno CD4, caracteriza los linfocitos T ayudadores y el CD8 a los citotóxicos/supresores.

CD21 es un receptor para el complemento y para el virus de Epstein Barr. CD4 es un co-receptor para las moléculas del CMH de la clase II, mientras CD8 lo es para las de la clase I.

Receptores de superficie celular

Están sobre la superficie de las células del sistema inmune y sirven para unir otras moléculas, los ligandos específicos. Como resultado de esta unión las células sufren diferenciación o producen citoquinas. Los linfocitos T expresan el receptor de células T (RCT), éste posee en sus cadenas terminales una amplia variedad de secuencias capaces de unir también una amplia variedad de antígenos, similares a los que se encuentran en la naturaleza. Existen dos tipos de receptores de células T, uno de ellos está formado por dos cadenas

heterodímeras alfa y beta y se expresa en el 90% de los linfocitos T ayudadores y citotóxicos. El otro receptor de células T está compuesto por dos cadenas heterodímeras delta y gamma. Cada cadena consiste en dos dominios extracelulares, uno transmembrana y otro citoplasmático. Los receptores de células T se expresan en asociación con el CD3. Los genes para el receptor de células T se encuentran en tres locos, alfa/delta, beta y gamma. Cada gene codifica para un fragmento de la molécula, los segmentos V, D para beta y delta, los segmentos J y C muestran la misma organización que le dan la variabilidad genética a las inmunoglobulinas.

Las células del sistema inmune también poseen otros tipos de receptores para las linfoquinas o citoquinas, o receptor para el complemento o la Fc de las inmunoglobulinas.

Adhesinas

Muchas interacciones celulares dependen de unión de sustratos o interacción de receptor con ligando. Existen cuatro tipos de moléculas de adhesión:

- 1) *Integrinas*.
- 2) *Moléculas de adhesión de la Superfamilia de las Inmunoglobulinas*.
- 3) *Moléculas de adhesión similares a Lectinas*.
- 4) *El CD44 o el grupo Hermes* que interactúa con ligandos tipo adhesinas en el endotelio vascular.

Las moléculas de adhesión están ampliamente distribuidas en el organismo.

Las integrinas

Entre las mismas tenemos: receptor para Fibronectina con cadena Beta 1, llamado VLA por "Very Late Antígenos"; receptor para el complemento cadena B2 y receptor para Vitronectina con cadena B3. Todos muestran la misma cadena alfa. Muchas Integrinas reconocen la secuencia RGD que corresponde a arginina, glicina y asparagina en los ligandos. Sin embargo, muchos ligandos son componentes de la matriz celular y se incluyen varias de las integrinas VLA. Colágeno para VLA2, laminina para VLA3, fibronectina para VLA4, vitronectina para VNR. Algunas otras integrinas varían en sus ligandos, C3B con CR3 y CR4; ICAM 1 y 2 (molécula intracelular de adhesión) con LFA (antígeno asociado a función del linfocito).

La afinidad de las integrinas al tripéptido RGD es variada y depende del tipo de matriz, resulta importante el núcleo

de la unión pero también la disposición espacial de los flancos de la molécula. Aparentemente la relación entre ICAMs y LFA es independiente de RGD.

Las Integrinas LFA B2 Y CR3-CR4 son importantes para controlar los movimientos celulares en los tejidos y contribuyen a la interacción del linfocito con otras células. Las integrinas B1 y B3 están implicadas con movimiento o retención celular en los tejidos.

Moléculas de adhesión de la superfamilia de las Inmunoglobulinas (Igs).

ICAM 1 y 2 son los ligandos para las integrinas B2 LFA. ICAM 1 y 2 se encuentra en el endotelio capilar, mientras que ICAM 1 se expresa en los linfocitos T y B que cooperan entre sí o cuando se relacionan con células presentadoras de antígenos.

ICAM 1 y 2 están formados por una cadena polipeptídica simple y un dominio similar a una inmunoglobulina. El ICAM 1 es importante para la migración trans- endotelial de células y puede ser inducido por el Factor de Necrosis Tumoral o TNF, la interleucina 1 o IL-1 e interferón gamma.

Selectinas

Son las moléculas denominadas MEL 14, GMP 140 y ELAM (molécula de adhesión del leucocito al endotelio), parecidas a lectinas. El ELAM es inducido en el endotelio por TNF o IL1, los PMNs se unen al ELAM para atravesar el endotelio.

Adhesinas vasculares y el receptor CD/44 Homing y sus ligandos

El CD44 encontrado en los linfocitos media la adhesión de los mismos a las vénulas capilares en nódulos linfáticos periféricos. El receptor para CD44 es llamado adhesina vascular o de residencia para los linfocitos. Estos 'homing' se encuentran en placas de Peyer's que facilitan el tránsito de linfocitos y fagocitos.

El Rol de las moléculas de adhesión se muestra en la figura 2 en donde una célula presentadora de antígeno coopera con un linfocito T en el contexto del CMH. En esta etapa el Linfocito se une al antígeno usando el receptor del linfocito T o RCT, que también se une al CMH de la célula presentadora, participando también otras

moléculas como CD4 o CD8. La célula presentadora de antígeno tiene LFA-3 e ICAM 1 en su superficie. LFA se une a CD2 e ICAM 1 a LFA-1, este es el caso de reconocimiento antigénico con participación de moléculas accesorias. Se conoce que el CD3 activa el linfocito T y no interviene en enlace de células, pero transmite señales al RCT o a otras moléculas.

Moléculas efectoras

El reconocimiento de antígenos provenientes de organismos invasores y células tumorales es el paso esencial para la eliminación de patógenos. Una vez reconocido algo como extraño, el sistema inmune se activa para removerlo.

El sistema efector consiste en células, fagocitos, células T citotóxicas y moléculas efectoras como inmunoglobulinas, complemento, citoquinas y otros mediadores como derivados del ácido araquidónico, factor activador plaquetario, aminas bioactivas como histamina, quininas, enzimas, heparina, proteoglicanos, etc.

Inmunoglobulinas (Igs)

Los inmunólogos notaron hace ya muchas décadas que cuando un animal era inyectado con un antígeno, se presentaba un aumento en la cantidad de proteínas séricas y esto correspondía en un patrón electroforético a la región de las Inmunoglobulinas, Igs. Estos anticuerpos poseen la capacidad de reaccionar específicamente contra los antígenos que los provocó. Las moléculas de Inmunoglobulina son de 5 clases:

Ig A, Ig G, Ig M, Ig D e Ig E.

La Ig G se subdivide en 4 subclases, desde Ig1 hasta 4 y la Ig A en dos, IgA1 e IgA2.

Las Inmunoglobulinas poseen dos cadenas pesadas y dos livianas, fracciones constantes y variables. La fracción constante denota la clase o subclase de Inmunoglobulina. La diversidad de anticuerpos es generada por la variabilidad de aminoácidos en los extremos hipervariables, por recombinación genética o por mutación somática. La diversidad recombinante es generada por combinaciones en las cadenas pesadas o livianas y parece que cada recombinación reconoce sólo un antígeno.

Las propiedades de unirse al antígeno por el fragmento de unión al antígeno o Fab, es una propiedad común de todos los anticuerpos, sin embargo las propiedades biológicas varían, según sea el tipo de

fracción cristalizable (Fc).

Inmunoglobulina A Secretoria

Esta inmunoglobulina aparece en saliva, lágrimas, calostro, mucosas intestinal, bronquial, de tracto genitourinario, y en secreción nasal. Está formada por la unión de dos monómeros unidos por una cadena J producida por las células plasmáticas. Además se le unen 4 cadenas polipeptídicas, denominadas el componente secretorio, producido por las células epiteliales. Los plasmocitos productores de esta Ig se encuentran en glándulas salivales mayores y en la capa basal debajo de superficies mucosas. La inducción de IgA secretoria está regulada a nivel central a través de placas de Peyer's en los intestinos, incluso esta estimulación produce anticuerpos en sitios distantes como saliva o leche. Al mismo tiempo la tolerancia de los antígenos ingeridos puede resultar en supresión de Ig G, Ig M e Ig E séricas.

Receptores para la fracción cristalizable (Fc)

Las Igs pueden unirse a las células a través del componente Fc, reaccionando con el receptor RFc, que lo poseen linfocitos, mastocitos, basófilos, neutrófilos, eosinófilos y plaquetas. Estas poseen receptores específicos para Ig G, Ig A, Ig M e Ig E. Existen 3 receptores para Ig G, el primero es predominante en macrófagos y monocitos, el segundo en neutrófilos, macrófagos y plaquetas, y el tercero en asesinas naturales, macrófagos, neutrófilos y eosinófilos. Los mastocitos y los basófilos poseen receptores para Ig E implicados en reacciones de hipersensibilidad o anafilaxis, mientras para Ig G en neutrófilos sirve para facilitar la fagocitosis de bacterias opsonizadas.

El complemento

Este sistema consiste en proteínas séricas que hacen el 10% del total de proteínas del suero. Posee variadas funciones, control de la reacción inflamatoria, eliminación de antígenos, activación de células y preparación de microorganismos o partículas extrañas para fagocitosis.

Existen 30 moléculas diferentes en el complemento y su activación sigue dos vías principales, la clásica, por complejos antígeno/anticuerpo, y la alterna a partir

de moléculas que facilitan el clivaje de otras.

La vía clásica es activada por complejos inmunes que poseen Ig G o Ig M, siendo las subclases 1 y 3 las más efectivas, la Ig 2, la menos efectiva, y la Ig4 no activa el complemento por la vía clásica. La vía alterna es activada por una variedad de moléculas sobre superficies, se mantiene un equilibrio en el consumo de los factores por esta vía, regulados por DAF (factor acelerante del desgaste) y el factor H. Ambas vías activan el C3, poco después la cascada se dispara hasta la formación del complejo de ataque a la membrana que causa la lisis. Los fragmentos C3a, C4a, C5a se denominan anafilotoxinas, porque causan contracción de músculo liso, incremento de la permeabilidad vascular y liberación de histamina, también son quimiotrayentes para PMNs y monocitos, aumentan su adherencia y degranulación externa.

El C5a aumenta el metabolismo del ácido araquidónico, estimula la producción de metabolitos tóxicos e incrementa la producción de interleucina 1 (IL1); por los monocitos, es también una de las tres más potentes anafilotoxinas responsables de destrucción tisular.

Las células accesorias del sistema inmune poseen receptores para varios componentes del complemento. Por ejemplo: el receptor para complemento CR1, se encuentra en PMNs/macrófagos y se une al C3b, este receptor CR1 se incrementa en las células fagocíticas después de exponerlas al C5a. Muchas bacterias se defienden del complemento por las cápsulas que previenen la adherencia de estos factores a la membrana.

Citoquinas y sus receptores

Son sustancias liberadas por las células del sistema inmune después de su activación, pero debe aclararse que no son inmunoglobulinas. Estas moléculas están envueltas en regulación de hematopoyesis o linfopoyesis. Las citoquinas son activas a muy bajas concentraciones y ellas pueden funcionar con estimulación autocrina o paracrina. Algunas se consideran hormonas. Las citoquinas son producidas durante un corto período porque los mRNA son altamente susceptibles a las nucleasas. Algunas citoquinas son antagonizadas por otras, en general poseen una amplia gama de funciones; tomemos como ejemplo la *Interleucina 1 (IL-1)*:

1) Activa los macrófagos, incrementa

su quimiotaxis, su actividad citolítica y la producción de prostaglandinas.

2) Incrementa la quimiotaxis de PMNs, los activa metabólicamente y produce neutrofilia.

Estimula los linfocitos B a proliferar y a reducir Acs.

4) Estimula a los linfocitos T a producir linfoquinas.

5) Estimula la proliferación de fibroblastos, la producción de colagenasas y prostaglandinas.

6) Estimula la formación de osteoclastos y la resorción de hueso y cartilago.

7) Estimula la proliferación de células endoteliales.

8) Estimula a los hepatocitos para producir ceruloplasmina, alfa 1 antitripsina, proteína C reactiva, fibrinógeno, amiloide, etc.

9) Estimula al cerebro y produce fiebre, anorexia y somnolencia.

10) Estimula a las células epiteliales a proliferar y a producir colágeno.

Muchas de estas reacciones son bidireccionales, por ejemplo: Los linfocitos B estimulados por IL-1 producen interferón gamma, que estimula a los macrófagos a producir más IL-1.

Interferón alfa es producido por los leucocitos, el beta por los fibroblastos y el gamma por los linfocitos. Otra linfoquina de gran importancia es el Factor de necrosis tumoral (TNF), que estimula la resorción ósea y la remodelación del cartilago.

Factores de crecimiento

Una variedad de factores de crecimiento pueden influenciar la respuesta inmune, entre éstos se incluyen (TGF-B) o factor de crecimiento de los timocitos, el factor de crecimiento epidérmico o EGF y los factores de crecimiento derivados de las plaquetas. TGF-B posee como funciones inhibir la proliferación de linfocitos T y suprimir la producción de inmunoglobulinas excepción de Ig A.

Los factores estimulantes de la formación de colonias actúan sobre las células madres de la médula ósea. Se han descrito: 1) GM-CSF o factor estimulante de las colonias granulocito/macrófago, estimula la proliferación de PMNs, eosinófilos y monocitos. 2) El GCSF o factor estimulante de las colonias de granulocitos, y 3) el MSCF o factor estimulante de las colonias de macrófagos. Debe resultar claro que estas citoquinas

juegan un papel central de muchos procesos del sistema inmune, hematopoyesis e inmuno-regulación. Ellas participan en la fisiopatología produciendo destrucción tisular o reparación; la producción de inflamación crónica podría generar daño tisular como sucede en las periodontitis.

Mediadores:

Son moléculas con diversas funciones biológicas. Se dividen en tres categorías: 1) Mediadores proteicos como enzimas y proteoglicanos activos biológicamente.

2) Mediadores peptídicos como quininas y anafilotoxinas.

3) Mediadores de bajo peso molecular como productos de ácido araquidónico y aminas biológicamente activas.

Como ejemplo de proteoglicano activo tenemos la heparina que es degranulada por los mastocitos y previene la coagulación sanguínea, como anafilotoxinas tenemos C3a, C4a y C5a. Como quininas, pequeñas fracciones peptídicas derivadas del quinínogeno que es una proteína plasmática. Una de ellas es la bradiquinina que causa contracción de músculo liso. Otras quininas producen aumento de la permeabilidad vascular y vasodilatación, inducen dolor y estimulan la síntesis del ácido araquidónico.

Metabolitos del ácido araquidónico

Cuando una célula es lesionada el ácido araquidónico es liberado de la membrana plasmática, esto ocurre por diversos estímulos como calor, trauma mecánico, químico o por estímulos específicos como bradiquinina, adrenalina, complejos antígeno/anticuerpo, etc. Este ácido puede ser metabolizado por dos vías, la de la Ciclooxygenasa que termina en síntesis de prostaglandinas, tromboxanos y prostaciclina, o por la vía de la Lipoxigenasa donde se generan Leucotrienos. Las prostaglandinas poseen como efectos biológicos, secreción gástrica, vasodilatación y causan dolor. Los leucotrienos causan contracción del músculo liso y es quimiotáctico para PMNs. El factor derivado de las plaquetas (PAF) es producido por leucocitos y proviene del glicerol, se une a mastocitos e induce la liberación de histamina. Cuando el PAF se une a las plaquetas causa agregación plaquetaria, su activación y degranulación.

Aminas biológicamente activas

Las dos más importantes son las histamina y la serotonina que afectan la permeabilidad y el diámetro de los vasos sanguíneos. La histamina es sintetizada a partir de la histidina y el serotonina del triptófano. La histamina se une a dos tipos de receptores en los tejidos H1 o H2 con variada función biológica. La histamina disminuye la citotoxicidad de los linfocitos y la producción de linfoquinas. Los PMNs poseen el receptor H2 que al ser estimulado causa degranulación externa con liberación de enzimas lisosomales. La serotonina posee efectos a nivel central como neurotransmisor principalmente.

Inmunidad innata

Es la resistencia natural a la infección y es inmediatamente activada después del contacto con los patógenos y difiere de la adquirida que necesita de días o semanas para ser efectiva. La inmunidad innata es la primera línea de defensa contra infecciones, incluye células, moléculas regulatorias de superficie, moléculas efectoras, etc. Los componentes celulares de este tipo de inmunidad son los fagocitos como PMNs, monocitos y macrófagos, células asesinas naturales y células del endotelio vascular. Las moléculas efectoras son el complemento, las citoquinas y los metabolitos del ácido araquidónico. (Figura No. 1).

En la enfermedad periodontal se presenta el fenómeno de migración y activación de PMNs en el sitio de la infección. Las bacterias son reconocidas por los macrófagos a través de interacciones con los componentes de superficie, carbohidratos y lipopolisacáridos bacterianos. Estos antígenos reaccionan con componentes de superficie de los macrófagos como con el receptor manosa/fucosa que reconoce carbohidratos bacterianos. El receptor C3b reconoce las bacterias opsonizadas por la vía alterna del complemento.

Los macrófagos estimulados por las bacterias o por el complemento liberan IL-1, TNF y factor quimiotáctico para PMNs o IL-8. Estos factores se difunden localmente y estimulan las células endoteliales. La IL-1 y el TNF inician la expresión de ELAM-1 y regulan la concentración de ICAM 1 y 2 en el endotelio vascular. La LFA-1 o adhesina de superficie del neutrófilo se une a las moléculas de ICAM, éste atraviesa el lumen

vascular y migra al sitio de infección. La IL-1, el TNF, el C5a, péptidos formyl derivados de bacterias y leucotrieno B4, funcionan también como quimiotácticos.

La muerte bacteriana sucede por la liberación de especies reactivas de oxígeno como el sistema de mieloperoxidasa, o por peroxidación de lípidos, o por mecanismos independientes del oxígeno como: 1) Lisosima, 2) Lactoferrina, 3) Enzimas hidrolíticas como Catepsina G, elastasa, proteinasas, o 4) proteínas catiónicas, también conocidas como defensinas.

Es adecuado insistir que los procesos de degranulación externa de estas sustancias se implican en la destrucción tisular. Una vez los patógenos son eliminados, hay resolución del proceso inflamatorio. El factor de crecimiento de los timocitos desactiva los macrófagos y prepara los tejidos para reparación y cicatrización.

Respuesta del huésped en enfermedad periodontal

Ha sido ampliamente reconocido que la encía adyacente a lesión periodontal se encuentra infiltrada con leucocitos mononucleares. Hace un tiempo se proponía que en la lesión inicial se encontraban linfocitos T y posteriormente linfocitos B y plasmocitos.^{9, 10, 11} Recientemente estos conceptos han sido reevaluados.^{12, 13} Se ha encontrado que los linfocitos T y B predominan en las lesiones pero la cantidad de células plasmáticas varía tremendamente.

Los estudios de la década del 80 mostraron que la proporción entre T ayudadores/T supresores era baja en lesiones periodontales, cuando se comparaba con periodonto sano o la proporción de sangre periférica.^{14, 15} Los pacientes con SIDA y periodontitis severa, también muestran una disminución en los linfocitos T ayudadores y un aumento en los linfocitos T supresores en los tejidos gingivales y en sangre periférica.¹⁶ En un reciente estudio, Taubman y colaboradores, encontraron que muchos de los linfocitos con marcador de superficie CD4 en lesiones periodontales, eran células de memoria y que los linfocitos supresores disminuían la producción de anticuerpos localmente.¹⁷

La respuesta inmune de los pacientes con periodontitis sólo se ha estudiado desde hace 20 años aproximadamente, los primeros estudios demostraron una activa

respuesta linfoproliferativa cuando se estimulaba con componentes de algunos microorganismos como *Actinomyces viscosus* o *Porphyromonas gingivalis*.^{18, 19} Los linfocitos de sangre periférica pueden proliferar espontáneamente in vitro. Incluso sin ayuda de estimulantes, como ocurre en la AMLR, o reacción autóloga de mezcla de linfocitos. Esta capacidad de reacción está disminuida en algunos pacientes con Periodontitis.^{20, 21} Sin embargo, después de la terapia, la reacción puede ser normal, sugiriéndose que la variación de la respuesta se debe al control de la infección periodontal. La activación policlonal de linfocitos B se produce como respuesta al reconocimiento de antígenos bacterianos por los linfocitos B y a la cooperación con los linfocitos T ayudadores.^{22, 23} Un 30% de los pacientes que sufren periodontitis severa no presentan esta reactividad.

Los monocitos de sangre periférica presentan elevada respuesta ante los lipopolisacáridos, (LPS) bacterianos como lo demostraron McFarlane, Garrison y Nichols.^{24, 25}

En estas investigaciones se comprobó que los pacientes con periodontitis poseen hiper-reactividad a los LPS y esto se manifiesta con producción por los macrófagos del IL-1B y PGE2.

Las hipótesis propuestas son, que los pacientes con esta tendencia muestran severa predisposición a sufrir episodios de destrucción periodontal. Los estudios de los pacientes con inmunodeficiencias han mostrado que éstos poseen más o menos la misma cantidad de enfermedad que los controles.^{26, 27, 28}

Sin embargo, los pacientes con desórdenes en el funcionamiento de PMNs neutrófilos, sufren de periodontitis severa, esto sugiere, que el efecto neto de estas células es protector.

Los pacientes con desórdenes en los neutrófilos como agranulocitosis, neutropenia cíclica, diabetes, síndrome de Down's, poseen severa destrucción periodontal.^{26, 27, 28, 29} Alteraciones en las funciones de los PMNs se han reportado en PJJ, gingivitis ulceronecrotizante, y periodontitis refractaria.^{27, 28, 29}

Estudios de moléculas regulatorias de superficie en Periodontitis.

Han sido estudiados tres aspectos principalmente:

- 1) El H.L.A. y la Enfermedad

Periodontal, 2) La densidad de receptores en neutrófilos en PJJ y 3) estudios de deficiencia en las moléculas de adhesión LFA en pacientes con periodontitis severa.

1) HLA y Periodontitis

Uno de los primeros estudios realizado en 39 pacientes con PJJ y 1969 controles, mostró que los pacientes tenían aumentados los alelos HLA-A9, A28 y BW15 cuando se comparaban con los controles.³⁰ Dos estudios más recientes no encontraron esta asociación.^{31, 32} Otros estudios muestran asociación entre periodontitis rápida progresiva, el HLA-DR4 y HLA-A9.^{33, 34} Sin embargo, hace falta establecer una asociación profunda entre tipos de HLA y características raciales para asegurar que esto sea un factor de riesgo para una cohorte a estudiar.

Estudios sobre receptores de superficie celular

Quizás los mejores estudios sobre este campo en el mundo, se han llevado a cabo en pacientes con PJJ. Se conoció desde el final de los años 70, que los pacientes con PJJ tenían defectos en los PMNs neutrófilos.^{35, 36, 37, 38} Habiéndose demostrado que dichas células, no responden a la estimulación in situ, 40.

Los defectos parecen transmitirse de forma vertical en la PJJ, afectando sólo a algunos de los integrantes de un grupo familiar. Se ha demostrado que hay una disminución en la densidad de algunos receptores para formyl-met-leu-phe.^{39, 40} como para la anafilotoxina C5a.⁴¹ Otra molécula de superficie, disminuida es el receptor glicoproteína(GP-110), que es esencial para quimiotaxis.^{42, 43}

Se sugiere que estos defectos se deben a una disminución de la actividad de la enzima protein kinasa C.

Estudios de las anomalías en las adhesinas en Periodontitis.

Muy pocos estudios han enfrentado este problema, los niños con infecciones recurrentes y periodontitis muestran una deficiencia en las adhesinas LFA, como lo demostró Springer y otros.^{44, 45, 46} La deficiencia de adherencia del leucocito es una rara enfermedad, autosómica recesiva, en donde los niños sufren de infecciones severas a repetición. Se ha iniciado la búsqueda de estas deficiencias en individuos con PJJ y diabetes, pero los

-Las bacterias periodontopatógenas disparan mecanismos inflamatorios en el huésped que llevan a la destrucción tisular.

-La columna vertebral del sistema defensivo del individuo contra la enfermedad periodontal lo constituye el complemento /los anticuerpos/ y los neutrófilos. Alteraciones en estos sistemas, hacen susceptibles a los individuos de sufrir periodontitis severa.

-Las Periodontitis son enfermedades de curso crónico con períodos de exacerbadción y de remisión; la detección de sustancias en FGC podrían dar una idea del período de evolución de la enfermedad para instaurar terapias preventivas.

La búsqueda de marcadores genéticos en la población permitirá establecer grupos de riesgo que puedan ser sometidos a una vigilancia para limitar el daño que puedan causar estas patologías.

SUMMARY

Understanding the role of the immune system against periodontal bacterial infections may provide the basis for better and more rational strategies for the treatment of periodontitis. In this review the advances in immunobiology are discussed. They offer many applications in the periodontic area and facilitate understanding of immunopathogenesis of periodontal diseases.

The followed topics are discussed: immune cells and their regulatory cell surface molecules, such as the Major Histocompatibility Complex (CMH), cluster of differentiation antigens (CD antigens), the effector systems set into motion such as phagocytes and cytotoxic cells and the effector molecules such as antibodies, complement and cytokines, the cell surface receptors as Integrins, Icams, Selectines, CD 44 homing, the mediators including the proteoglycans, the kinins, the anaphylatoxins, the products of araquidonic metabolism such as prostaglandins and leucotrienes, the biologically active amines as histamine and serotonin, the innate immunity and the host responses in periodontitis, focuses on studies that show correlation between HLA and neutrophil abnormalities up to recognition that the critical axis is neutrophil/antibody/complement for protection against periodontopathic bacteria. Abnormalities in those systems often lead to increased periodontal susceptibility.

The precise role of immune system in periodontitis remains to be elucidated, but

recent advances in these areas offer a predictable guide for the treatment of those diseases.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. SLOTS J, GENCO R J. Black pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: Virulence factors in colonization, survival and tissue destruction. *J. Dent. Res.* 64: 412-421, 1984.
2. SOCRANSKY SS., HAFFAJEE AD. Microbial risk factors for destructive periodontal diseases. In: Bader JD., ed *Risk Assessment in Dentistry*. Chapel Hill, NC: University of North Carolina. 79-90, 1990.
3. GENCO R J., ZAMBON J J., CHISTERSSON LA. The origin of periodontal infections. *Adv. Dent. Res.* 2: 245-259, 1988.
4. CONTRERAS A. Patogénesis de la Enfermedad Periodontal. *Estomatología* 2: 79-86, 1992.
5. SALLAY K., LISTGARTEN M.A., SANAVI F., et al. Bacterial invasion of oral tissues of immunosuppressed rats. *Infect Immun* 43: 1091-1094, 1984.
6. SANAVI F., LISTGARTEN M.A., BOYD F., et al. The colonization and establishment of invading bacteria in periodontium of ligature-treated immunosuppressed rats. *J. Periodontol* 56: 273-280, 1980.
7. MALE D., CHAMPION B., COOKE A., OWEN M. *Advanced Immunology* Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1991.
8. SLOTS J., TAUBMAN M. *Oral microbiology and Oral Immunology Contemporary*, Mosby Publisher. Year Book. Washington, 1992.
9. MACKLER B.F., FROSTAD K.B., ROBERTSON R.B., LEVY B.M. Immunoglobulin-bearing lymphocytes and plasma cells in human periodontal disease. *Lymphoid cells in periodontal disease. J. Periodont Res.* 12: 37-45, 1977.
10. SEYMUR G.J., CROUCH M.S., POWELL R.N., et al. The identification of lymphoid cell subpopulations in sections of human lymphoid tissue in gingivitis in children using monoclonal antibodies. *J. Periodont Res.* 17: 247-256, 1982.
11. SEYMUR G.J., POWELL R.N., COLE K.L., et al. Experimental gingivitis in humans. A histochemical and immunologic characterization of the lymphoid cell subpopulation. *J. Periodont Res.* 15: 375-385, 1982.
12. STOUFFI E.D., TAUBMAN M.A., EBERSOLE J.L., SMITH D.J., STASHENKO P.P. Phenotypic analysis of mononuclear cells recovered from healthy and diseased periodontal tissues. *J. Clin Immunol.* 7: 235-245, 1987.
13. JOHANNESSEN A.C., NILESEN R., KRISTOFFERSEN T., KUNDSEN G.E. Variation in the composition of gingival inflammatory cell infiltrates. *J. Clin Periodontol.* 17: 298-305, 1990.
14. OKADA H., KIDA T., YAMAGAMI H. Characterization of the immunocompetent cells in human advanced periodontitis. *J. Periodont Res.* 17: 472-473, 1982.
15. TAUBMAN M.A., STOUFFI E.D., EBERSOLE J.L., SMITH D.J. Phenotypic studies of cells from periodontal diseased tissues. *J. Periodont Res.* 19: 587-590, 1984.
16. WINKLER J.R.; MURRAY P.A. Periodontal disease. A potential intraoral expression of AIDS may be rapidly progressive periodontitis. *Canad. Dent. Assoc. J.* 15: 20-24, 1987.
17. TAUBMAN M.A., WANG H.Y., LUNDQVIST C.A., et al. The cellular basis of host responses in periodontal diseases. In: Hamada S. Holt SC. McGhee J.R., eds. *Periodontal disease: Pathogens in Host immune responses*. Tokyo: Quintessence Publishing Ltd. 199-208, 1991.
18. IVANYIL, LEHNERT. Stimulation of lymphocyte transformation by bacterial antigens in patients with periodontal disease. *Arch Oral Biol.* 15: 1059-1066, 1970.
19. PATTERS M.R., GENCO R.J., REED M.J., MASHIMO P.A. Blastogenic response of human lymphocytes to oral bacteria antigens: Comparison of individuals with periodontal diseases to normal edentulous subjects. *Infect Immun.* 14: 1213-1220, 1976.
20. SUSUKI J.B., PARK S.K., FALKER W.A. Immunologic profile of juvenile periodontitis. I. Lymphocyte blastogenesis and the autologous mixed lymphocyte response. *J. Periodontol* 55: 453-460, 1984.
21. SEYMUR G.J., BOYATZIS S., POWELL R.N. The autologous mixed lymphocyte reaction (AMRL) as a possible indicator of immunoregulation in chronic inflammatory periodontal disease. *J. Clin Periodontol.* 13: 630-645, 1986.
22. MacNULTY K., STONE R., HASTINGS G., et al. Immunoregulation of severe generalized periodontitis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 43: 84-93, 1985.
23. TEW J., ENGEL D., MANGAN D. Polyclonal B-cell activation in periodontitis. *J. Periodont Res.* 24: 225-241, 1989.
24. GARRISON S.W., NICHOLS E.C. LPS-elicited secretory responses in monocytes. Altered release of P.G. E. 2 but not IL-1B in patients with adult periodontitis. *J. Periodont Res.* 24: 88-95, 1989.
25. McFARLANE C.G., REYNOLDS J.J., MEIKLE M.M. The release of interleukin 1B and tumor necrosis factor alpha and interferon gamma by cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with periodontitis. *J. Periodont Res.* 25: 207-124, 1990.
26. WILSON M.E., GENCO R.J. The role of antibody, complement and neutrophil in host defense against *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Immunol Invest.* 18: 187-209, 1989.
27. GENCO R.J., SLOTS J. Host responses in periodontal diseases. *J. Dent. Res.* 63: 441-451, 1984.
28. VAN DIKE T.E., LEVINE M.J., GENCO R.J. Neutrophil function and oral disease. *J. Oral Pathol.* 14: 95-120, 1985.
29. GENCO R.J., VAN DIKE T.E., LEVINE M.J., et al. Molecular factors influencing neutrophil defects in periodontal disease. *J. Dent. Res.* 65: 1379-1391, 1986.
30. REINHOLTI, BAYI, SVEJGAARDA. Association between HLA antigens in periodontal disease. *J. Dent. Res.* 56: 1261-1263, 1977.
31. SAXEN L., KOSKIMIES S. Juvenile periodontitis no linkage with HLA antigens. *J. Periodont Res.* 19: 441-444, 1984.
32. CULLINAN M.P., SACHS J., WOLFE, SEYMUR G.J. The distribution of HLA-A and B antigens in patients and their families with periodontitis. *J. Periodont Res.* 15: 177-184, 1980.
33. KATZ J., GOULTSCHIN J., BENOLIEL R., BRAUTBAR C. Human leukocyte antigen (HLA) DR4, positive association with rapidly progressing periodontitis. *J. Periodontol.* 58:

- 607-610, 1987.
34. AMER A., SINGH G., DARKE C., DOLBY A.E. Association between HLA antigens and periodontal disease. *Tissue Antigens*. 3: 53-58, 1988.
 35. CLARK R.A., PAGE R.C., WILDE G. Defective neutrophil chemotaxis in juvenile periodontitis. *Infect Immun*. 18: 694-700, 1977.
 36. CIANCIOLA L.J., GENCO R.J., PATTERS M.R., et al. Defective polymorphonuclear leukocyte function in human periodontal disease. *Nature*. 265: 445-447, 1977.
 37. LAVINE W.S., MADERAZO E.G., STOLMAN J., et al. Impaired neutrophil chemotaxis in patients with juvenile and rapidly progressing periodontitis. *J. Periodon. Res.* 14: 10-19, 1979.
 38. VAN DIKE T.E., HOROSZEWICZ H.U., CIANCIOLA L.J., GENCO R.J. Neutrophil chemotaxis dysfunction in human periodontitis. *Infect immun*. 27: 124-132, 1980.
 39. SINH S., GOLUB L.M., IACONO V.J., et al. In vivo crevicular leukocyte response in humans to chemotactic challenge. Effects of periodontal disease. *J. Periodontol.* 55: 1-8, 1984.
 40. VAN DIKE T.E., LEVINE M.J., GENCO R.J. Neutrophil function and oral disease. *J. Oral Pathol.* 14: 95-120, 1984.
 41. VAN DIKE T.E., LEVINE M.J., TABAK L.A., GENCO R.J. Juvenile periodontitis as a model for neutrophil function: reduced binding of the complement chemotactic fragment C5a. *J. Dent. Res.* 62: 870-872, 1981.
 42. VAN DIKE T.E., WARBINGTON M., GARDNER M., OFFENBACHER S. Neutrophil surface protein markers as indicators of defective chemotaxis in L.J.P. *J. Periodontol.* 61: 180-184, 1990.
 43. PAGE R.C., BEATTY P., WALDROP T.C. Molecular basis for the functional abnormality in neutrophils from patients with generalized prepuberal periodontitis. *J. Perio. Res.* 22: 182-183, 1987.
 44. SPRINGER T.A., THOMPSON WS., MILLER L.J., et al. Inherited deficiency of the MAC-1, LFA-1, P150, 95 glycoprotein family and its molecular basis. *J. Exp. Med.* 160: 1901-1918, 1984.
 45. WALDROP T.C., ANDERSON D.C., HALLMON WW., et al. Periodontal manifestations of the heritable MAC-1, LFA-1 deficiency syndrome. Clinical, histopathologic, and molecular characteristics. *J. Periodontol.* 58: 408-416, 1987.
 46. PAGE R.J., SIMS T.J., GEISSLER F., ALTMAN L.C., BAAB D.A. Defective neutrophil and monocyte mobility in patients with early onset periodontitis. *Infect Immun* 47: 169-175, 1985.
 47. TEW J.G., MARSHALL D.R., MOORE WEC., et al. Serum antibody reactive with predominant organisms in the subgingival flora of young adults with generalized severe periodontitis. *Infect Immun* 48: 303-311, 1985.
 48. POWELL J., ALEXANDER D., SMALES F. Crevicular fluid (CF) IgG subclasses in health and periodontitis. *J. Dent Res.* 70 (Spec Issue): 353 (Abstr 700).
 49. BAHENI P.C., TSAI C.C., McARTHUR W.P., et al. Leukotoxic activity in different strains of the bacterium *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolated from juvenile periodontitis in man. *Arch. Oral Biol.* 26: 671-676, 1981.
 50. KALMAR J.R., ARNOLD R.R., VAN DIKE T.E. Direct interaction of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* with normal and defective (LPJ) neutrophils. *J. Periodon Res.* 22: 179-181, 1987.
 51. TSAI C.C., McARTHUR W.P., HAMMOND B.F., TAICHMAN NS. Serum neutralizing activity against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin in juvenile periodontitis. *J. Clin Periodontol.* 8: 338-348, 1981.
 52. BAKER P.J., WILSON M.E. Opsonic antibody against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 4: 98-105, 1989.
 53. SCHENKEIN H.A. The effect periodontal *Bacteroides* species on proteins of the human complement system. *J. Periodon. Res.* 23: 187-192, 1988.
 54. SCHENKEIN H.A. Failure of *Bacteroides gingivalis* W83 to accumulate bound C3 following opsonization with serum. *J. Periodon Res.* 24: 20-27, 1989.
 55. KILIAN M. Degradation of Immunoglobulins A1, A2 y G by suspected principal periodontal pathogens. *Infect Immun.* 34: 757-765, 1981.
 56. ISOGAI H., ISOGAI E., YOSHIMURA F., SUSUKI T., et al. Specific inhibition of an oral strain of *Bacteroides gingivalis* strain 381 to epithelial cells by monoclonal antibodies against bacterial fimbriae. *Arch. Oral Biol.* 33: 479-485, 1988.
 57. EVANS R.T., KLAUSEN B., BEDI G., et al. Reduced periodontal bone loss in rats immunized with *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *J. Dent Res.* 70 (Spec Issue) 409 (Abstr 1143).
 58. KONO Y., OGAWA T., BEAGLEY K.W., et al. Immunopathology of periodontal disease: studies with interleukins which mediate both immunoglobulin synthesis and inflammation in diseased gingiva. In: Hamada S. Holt SC, McGhee J.R. Eds. *Periodontal disease: Pathogens and host responses*. Tokyo: Quintessence Publishing Co., Ltd.: 209-222, 1991.
 59. OFFENBACHER S., ODLE B.M., VAN DIKE T.E. The use the crevicular fluid prostaglandin E2 levels as a predictor to periodontal attachment loss. *J. Periodon Res.* 21: 101-112, 1986.
 60. GOODSON J.M., DEWHIRST F.E., BRUNETTI A. Prostaglandin E2 levels in human periodontal disease. *Prostaglandins.* 6: 81-85, 1981.
 61. OFFENBACHER S., ODLE B.M., GRAY R.C., VAN DIKE T.E. Crevicular fluid prostaglandin E levels as a measure of the periodontal disease status of adult and juvenile periodontitis patients. *J. Periodon Res.* 19: 1-13, 1984.
 62. DERWHIRST F.E., STASHENKO P.P., MOLE J.E., TSURAMACHI T. Purification and partial sequence of human osteoclast activating factor: Identity with interleukin 1B. *J. Immunol.* 135: 2562-2686, 1985.
 63. BIRKEDAL H., WELLS B.R., LIN H.Y., COFFIELD P.W., TAYLOR B.E. Activation of keratinocyte mediated collagen (type I) breakdown by suspected human periodontal pathogens. Evidence of a novel mechanism of connective tissue breakdown. *J. Periodon Res.* 19: 645-650, 1984.
 64. LYONS J.G., LIN HY, SALOT T., et al. Expression of collagen-cleaving matrix metalloproteinases by keratinocytes. Effect of growth factors and cytokines and of microbial mediators. In: Hamada S. Holt SC, McGhee JR, eds. *Periodontal Disease: Pathogens in Host Immune Responses*, Tokyo: Quintessence Publishing Co. Ltd. 291-306, 1991.
 65. ZAMBON J.J., BOCHACKI V., and GENCO, R.J. Immunological Assays for putative Periodontal Pathogens. *Oral Microbiol Immunol* 1: 39-44, 1986.