

Estudio comparativo del patrón de expresión inmunohistoquímico de las células CD4+ y CD20+ en la enfermedad periodontal

Immunohistochemical comparative study of the expression of CD4 and CD20 cells in periodontal disease

Ruthinéia Diógenes Alves Uchôa Lins¹, Gustavo Pina Godoy¹,
 Cláudia Roberta Leite Vieira de Figueiredo³, Ericka Janine Dantas da Silveira²,
 Manuel Antonio Gordón-Núñez², Roseana de Almeida Freitas²

RESUMEN

Antecedentes y métodos: El papel de la respuesta inmune en la citopatogenia de la enfermedad periodontal constituye tema de estudio de diversos investigadores. El objetivo de éste trabajo fue investigar a través de inmunohistoquímica la densidad y el patrón de distribución de la células inflamatorias mononucleadas (linfocitos T helper e linfocitos B), utilizando los anticuerpos anti CD4 y anti CD20 en 17 casos de gingivitis crónica y 25 casos de periodontitis crónica. **Resultados:** Fue observada inmunopositividad para las células CD4 en un patrón difuso por todo tejido conectivo de todos los casos de gingivitis crónica. De los 25 casos de periodontitis crónica, 22 (88%) presentaron un patrón de distribución en pequeños focos aislados. Con relación a las células CD20, 16 casos de gingivitis crónica exhibieron positividad en un patrón focal de distribución tanto en posición yuxtaepitelial como en áreas distantes del epitelio (10 casos, 62,5%). En los casos de periodontitis crónica fue observada marcación positiva para el anticuerpo anti CD20 en 22 casos (88%), predominando el patrón focal en posición yuxtaepitelial y distante del epitelio (17 casos, 77,3%). El análisis estadístico no mostró diferencia significativa en la densidad de células CD4 y CD20 positivas entre los casos de gingivitis y periodontitis crónica. **Conclusión:** Fue concluido que a pesar de no ser constatada tal diferencia estadística, hubo una mayor densidad de linfocitos B en ambos grupos, sugiriendo una mayor participación de la respuesta inmune humoral en los diferentes estadios de la enfermedad periodontal.

Palabras clave: gingivitis crónica, periodontitis crónica, linfocito T, linfocito B, inmunohistoquímica.

SUMMARY

Introduction and objectives: the role of immunological reaction in periodontal disease has been described by several reports. The purpose of present research was to investigate by immunohistochemistry the density and distribution profile utilizing the antibodies anti-CD4 and anti-CD20 in 17 cases of chronic gingivitis and 25 of chronic periodontitis. **Results:** It was observed immunopositivity for CD4 cells in diffuse profile by all connective tissue in all chronic gingivitis cases. Out of the 25 cases of chronic periodontitis, 22 (88%) presented a focal profile distribution. In relation to the CD 20 cells, 16 cases of chronic gingivitis had shown positivity either juxtaepithelial position as in distant areas of the epithelia (10 cases, 62.5%). Immunopositivity for the anti-CD20 was observed in 22 chronic peritonitis cases (88%), predominantly in focal profile in juxtaepithelial and distant position of epithelium (17 cases, 77.3%). The statistical analysis demonstrated no differences in relation to the density of CD4 and CD20 cells between gingivitis and periodontitis cases studied. **Conclusion:** It was concluded that, although there was no statistical difference, a higher density of lymphocytes B was observed in both groups, suggesting the predominant participation of the humoral immunity response in different stages of the periodontal disease.

Key-words: chronic gingivitis, chronic periodontitis, lymphocyte T, lymphocyte B, immunohistochemistry.

Rev Esp Patología 2006; 39 (1): 19-25

Recibido el 6/12/05. Aceptado el 30/3/06.

¹ Facultad de Odontología de la Universidad Estatal de Campina Grande - PB, Brasil.

² Programa de Post Grado en Patología Oral, Departamento de Odontología de la Universidad Federal de Río Grande del Norte, Natal/RN, Brasil.

³ Universidad Federal de Paraíba, João Pessoa - PB, Brasil.

ruthinéia@bol.com.br

INTRODUCCIÓN

Microscópicamente, la enfermedad Periodontal se caracteriza especialmente por la presencia de diferentes poblaciones celulares inflamatorias en el tejido conectivo gingival entre los fibroblastos y componentes de la matriz extracelular. Inicialmente el discreto infiltrado inflamatorio es constituido por neutrófilos, macrófagos y algunos linfocitos. Con la progresión de la enfermedad, el infiltrado se torna más intenso, caracterizándose entonces, por un mayor número de linfocitos y plasmocitos (1-3).

Diversos estudios inmunohistoquímicos, utilizando una serie de marcadores fenotípicos, han sido realizados con el objetivo de evaluar los tipos celulares presentes en el infiltrado inflamatorio de lesiones periodontales (4). Es relatado que las diferentes poblaciones celulares inflamatorias se caracterizan por la expresión de antígenos celulares específicos que permiten su identificación y cuantificación a través de técnicas inmunohistoquímicas (5).

En los cortes histológicos coloreados por la técnica de la hematoxilina /eosina, los linfocitos T y B son indistinguibles a través de la microscopía de luz. Esta distinción es realizada a través de anticuerpos monoclonales que reconocen componentes específicos en la membrana citoplasmática de esas células (6). Los linfocitos T pueden ser identificados con una variedad de proteínas de membrana, tales como la molécula CD45 (presente en la superficie de todos los leucocitos), CD45RO (presente en la superficie de los linfocitos T), CD4 y CD8 (presentes en la superficie de sub poblaciones específicas de linfocitos T) (7,8).

Los linfocitos T presentan dos sub poblaciones celulares distintas, diferenciadas por su actividad funcional, desempeñando funciones immunorreguladoras opuestas y expresión de diferentes proteínas de membrana. Esas dos subpoblaciones son los linfocitos T CD4+ (ayudantes) y T CD8+ (citotóxico-supresor), los cuales expresan en su superficie las moléculas CD4 y CD8, respectivamente. Para la identificación de esas subpoblaciones de linfocitos T es imprescindible la utilización de anticuerpos monoclonales anti CD4 y anti CD8 (9-11).

Los linfocitos B son clásicamente reconocidos a través de glicoproteínas presentes en su superficie celular, denominadas CD19 y CD20 (7).

Es relatado que las proporciones relativas de los diferentes tipos de linfocitos, así como los plasmocitos, pueden variar en las diferentes formas y estadios de la enfermedad Periodontal, representando los linfocitos T el tipo celular inflamatorio predominante en lesiones periodontales precoces y estables y los linfocitos B junto con los plasmocitos predominan en las lesiones avanzadas y progresivas, como la periodontitis crónica (4,5,12,13).

Con el objetivo de verificar la densidad de marcación, el patrón de distribución celular y la localización de los

linfocitos T y B estadios de la enfermedad Periodontal, este estudio se propuso realizar un análisis inmunohistoquímico de la expresión de las células CD4+ y CD20+ en especímenes de gingivitis y periodontitis crónicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fueron utilizados 42 especímenes parafinados, diagnosticados clínicamente como gingivitis (17 casos) y periodontitis (25 casos) crónicas, pertenecientes a los archivos del Servicio de Anatomía Patológica de la disciplina de Patología Oral del Departamento de Odontología de la UFRN. Tales especímenes son oriundos de procedimientos quirúrgicos con finalidad estética y curativa realizados en consultorios particulares y en las Clínicas de Periodoncia y Cirugía Oral del Departamento antes mencionado.

Estudio inmunohistoquímico

Fueron obtenidos cortes histológicos de 3 micrómetros de espesor de los especímenes gingivales parafinados seleccionados, siendo seguidamente extendidos en láminas de vidrio preparadas con 3-aminopropyltriethoxsilano (*Sigma Chemical CO*, St Louis, MO, USA). Posteriormente los cortes fueron sometidos a la técnica inmunohistoquímica a través del método de la estreptavidina-biotina (SABC), utilizando los anticuerpos primarios anti CD4 y anti CD20, con las siguientes especificaciones: CD4 (*Novocastra laboratorios*), clon 1F6, específico para linfocitos T *helper*, con recuperación antigenica en *Steamer - 20°* (Ácido cítrico), dilución de 1:10, incubado por 120'; CD20 (*Novocastra laboratorios*), clon L26, específico para linfocitos B, con recuperación antigenica en *Steamer - 20°* (Ácido cítrico), dilución de 1:10, incubado por 120'.

Método de análisis de las células inmunomarcadas

Para la evaluación de la densidad de inmunomarcación celular en la lámina propia de los especímenes fueron establecidos valores variables de 0 a 3, de acuerdo con la metodología descrita por Mega y col (14) adaptada para este estudio, obedeciendo los siguientes parámetros: Valor 0 = ausencia de células positivas, valor 1 = reducido número de células positivas; valor 2 = moderado número de células positivas y valor 3 = elevado número de células positivas. Fue realizado también un análisis descriptivo de los hallazgos microscópicos referentes a la localización (yuxtaepitelial y/o distante del epitelio) y el patrón de distribución (focal y/o difusa) de las células CD4+ y CD20+ en el tejido conectivo gingival.

Análisis estadístico

Para la variable dependiente cuantitativa ordinal (densidad de células CD4+ y CD20+), considerando la ausencia de distribución normal de los datos verificada con el test de Kolmogorov-Smirnov y la propia característica de la variable, se optó por un análisis no paramétrico a través del test de Mann-Whitney.

Este estudio fue analizado y aprobado por el Comité de Ética en la Investigación de la Universidad Federal de Rio Grande del Norte.

RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICOS

Análisis cuantitativa del patrón de expresión de las células CD4+

Todos los casos de gingivitis crónica analizados exhibieron inmunorreactividad al anticuerpo anti CD4 a través de la marcación de células positivas distribuidas difusamente como células solitarias (fig. 1) ó en pequeños focos constituidos por escasas células (valor 1). En la mayoría de los casos (94,1%), las cuales CD4+ se localizaban tanto en posición yuxtaepitelial como a cierta distancia del epitelio.

De los 25 especímenes de periodontitis crónica examinados, 22 (88%) exhibieron positividad al marcador CD4, sin embargo, en esos especímenes fue observado un número reducido de células CD4+ (valor 1), distribuidas en pequeños focos o aisladamente de forma difusa (fig. 2). Del total de 22 casos inmunorreactivos, 19 (86,4%) mostraron células positivas en localización yuxtaepitelial y distante del epitelio. Solo 3 casos (13,6%) no exhibieron inmunorreactividad yuxtaepitelial para el anticuerpo anti CD4.

En la lámina propia de algunos casos de gingivitis y de periodontitis crónica fue común la localización de células CD4+ en posición perivascular, así como la presencia de esas células con morfología arredondeada y bastante voluminosa.

Análisis cualitativa del patrón de expresión de las células CD20+

Del total de 17 casos de gingivitis crónica evaluados, 16 (94,1%) fueron positivos al anticuerpo anti CD20, predominando el patrón focal de distribución de las células inmunomarcadas en posición yuxtaepitelial (fig. 3), así como también, en áreas mas distantes del epitelio (10 casos -62,5%). En 4 especímenes (25%) se verificaron focos de inmunomarcación exclusivamente a distancia del epitelio. Además de la marcación de células CD20+ distribuidas difusamente, principalmente en posición yuxtaepitelial.

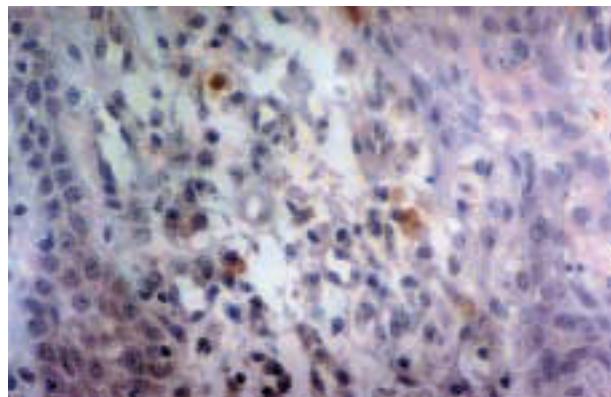


Fig. 1: Gingivitis crónica – presencia de células CD4+ solitarias en posición yuxtaepitelial/grado 1. (SABC x400).

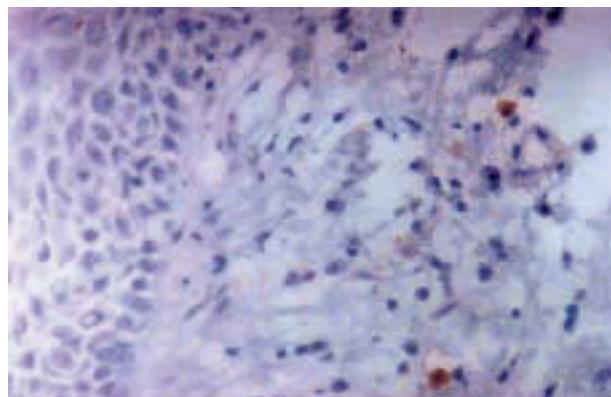


Fig. 2: Periodontitis crónica – células CD4+ distribuidas solitariamente en la lámina propia/grado 1. (SABC x400).

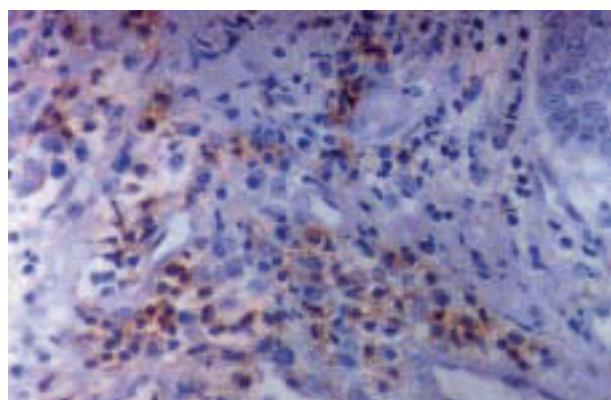


Fig. 3: Gingivitis crónica – presencia de células CD20+ solitarias próximas al epitelio/grado 2. (SABC x400).

El patrón de distribución focal de las células inmunomarcadas por el anticuerpo anti CD20 en los casos de gingivitis crónica se caracterizó por la presencia de focos de densidad variada, constituidos a veces por un número reducido de células (valor 1), otras por moderado número (valor 2) y también por elevado número de células positivas (valor 3), considerando ambos patrones de dis-

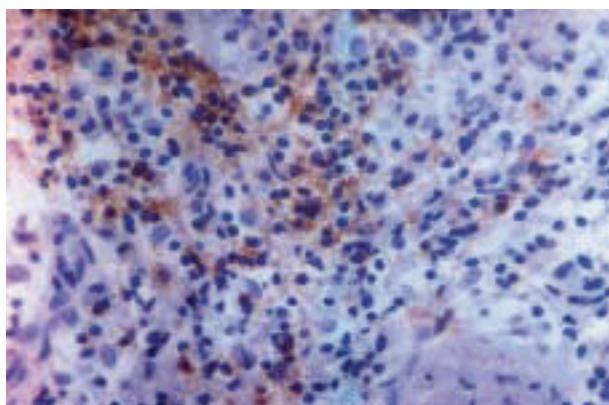


Fig. 4: Periodontitis crónica – células CD20+ en áreas distantes del epitelio/grado2. (SABC x400).

tribución celular (focal y difuso). En 11 especímenes, predominó el valor 2 y en sólo 5 casos predominó el valor 1.

De los 25 especímenes de periodontitis crónica analizados, 22 (88%) exhibieron marcación positiva para el anticuerpo anti-CD20, cuyo patrón de distribución fue predominantemente focal en posición yuxtaepitelial y también distante del epitelio (17 casos, 77,3%). Un caso (4,5%) mostró focos de células positivas sólo en posición yuxtaepitelial y 4 (18,2%) exhibieron focos de inmunomarcación distante del epitelio (fig. 4). De los 22 casos positivos al anticuerpo anti CD20, 10 (45,4%) presentaron inmunorreactividad difusa próxima al epitelio. Además del patrón de distribución celular focal.

Con relación a la densidad de células inmunopositivas al anticuerpo anti CD20, considerando todos los patrones de distribución celular evaluados, los valores 2 y 1 predominaron en 13 y 9 casos respectivamente, sin embargo, focos con elevado número de células CD20+ también fueron observados en esos especímenes. Un hallazgo común en algunos casos de gingivitis y periodontitis crónicas fue la presencia de células CD20+ en posición perivascular.

Resultados del análisis estadístico

La densidad de células CD20+ varió de 0,0 a 2,0 con mediana de 2,0 tanto en la gingivitis como en la periodontitis crónicas. Con el test no paramétrico de Mann-whitney no fue observada la presencia de diferencia estadísticamente significativa de la densidad de células CD20+ entre los dos grupos estudiados (gingivitis y periodontitis crónicas) (tabla 1). El anticuerpo anti CD4 no fue analizado estadísticamente debido a que todos los valores de uno de los grupos (Gingivitis crónica) fueron iguales, presentando por lo tanto, desvío estándar nulo.

DISCUSIÓN

En éste estudio, la inflamación evidenciada en la muestra se presentó de forma intensa en 94,1% de los especímenes de gingivitis crónica e en 88% de los casos de periodontitis crónica, distribuida tanto difusa como focalmente (en placas perivasculares). Tales hallazgos caracterizan una acentuada participación de la respuesta inmunológica ante la agresión bacteriana en la enfermedad Periodontal, representando un reflejo del aumento cualitativo y/o cuantitativo de las bacterias periodontopatogénicas en el interior de la biopelícula dental (12).

Una vascularización intensa también fue observada en 94,1% de los casos de gingivitis crónica y 100 % de los de periodontitis crónica. Tal característica morfológica, probablemente resulta de la elevada secreción de citoquinas y factores de crecimiento por las células inflamatorias presentes en el tejido conectivo gingival, substancias éstas que son dotadas de propiedades angiogénicas (10,15).

La localización perivascular de determinadas células inflamatorias en la lámina propia de los especímenes gingivales de éste estudio, probablemente resulta de la acción del LPS y de algunas citoquinas pro inflamatorias como la interleuquina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) las cuales aumentan la expresión de las moléculas de adhesión endotelio-leucocito (12). El factor transformante de crecimiento β (TGF- β), además de ejercer un potente efecto quimiotáxico sobre las células inflamatorias, también facilita la adhesión leucocitaria a la pared vascular y a los componentes de la matriz extracelular, debido a que aumenta la expresión de adesinas e integrinas leucocitarias, favoreciendo así el reclutamiento de las células inflamatorias para el local de la enfermedad (16).

La migración de los linfocitos T y B hacia los tejidos inflamados requiere la participación de quimiocinas como la IL-8, receptores de quimiocinas (CCR5) y moléculas de adhesión celular (1).

Para el reconocimiento de los diferentes tipos de linfocitos, en éste estudio, se optó por la utilización los marcadores inmunohistoquímicos anti CD4 y anti CD20, específicos para linfocitos T y B, respectivamente, debido a que tales células son indistinguibles a través de la microscopia de luz en los cortes histológicos tñijados con la técnica de la hematoxilina/eosina. Según algunos autores (6,8), la distinción entre los linfocitos T y B puede ser realizada a través del uso de anticuerpos monoclonales que reconocen glicoproteínas específicas en la membrana citoplasmática de esas células denominadas CDs (*Clusters of Differentiation*), siendo el anticuerpo anti CD20 el mejor marcador para las células B y el anti CD4 para las células T *helper*, las cuales representan un subgrupo específico de linfocitos T relacionados con la activación de las respuestas inmunológicas celular y humoral T dependientes (11).

Todos los especímenes de gingivitis crónica y 88% de la muestra de periodontitis crónica examinados en éste estudio exhibieron inmunorreactividad al anticuerpo anti CD4 a través de la marcación de células positivas distribuidas difusamente como células solitarias ó en pequeños focos constituidos por escasas células (grado 1).

En la mayoría de los casos de gingivitis crónica (94,1%) y de periodontitis crónica (86,4%), las células CD4 positivas se localizaban tanto en posición yuxtaepitelial, así como distante del epitelio, siendo la posición yuxtaepitelial, probablemente, asociada al hecho de que los linfocitos T *helper* interactúan con las células de *Langerhans* y células dendríticas presentes en la lámina propia papilar durante el proceso de presentación antigénica (9, 17).

En relación a la densidad de linfocitos T en la gingivitis crónica, los resultados de éste estudio no coinciden con la literatura, donde la mayoría de los autores relatan que tal célula constituye el principal tipo celular encontrado en el infiltrado inflamatorio de esa enfermedad gingival, especialmente en los estadios iniciales. Llevando en consideración que los linfocitos TCD4 positivos (*helper*) no representan toda la población linfocitaria T y que éste estudio se limitó a observar solo ese tipo de linfocito T, la reducida densidad de marcación de esas células puede estar asociada al hecho de no haber sido investigada tampoco la presencia de linfocitos TCD8 positivos (citotóxico/supresor), que parecen ser significativos en la enfermedad periodontal, especialmente en la gingivitis crónica (19).

En otro estudio (5) fue constado que 20 a 30% de los linfocitos aislados de los tejidos gingivales inflamados eran del tipo TCD4 y 10 a 20% del tipo TCD8, llamando la atención la presencia de éste último tipo de célula T en el infiltrado inflamatorio gingival.

Un hallazgo particular de éste estudio fue la predominancia del grado 1 en relación a la densidad de marcación de las células CD4 positivas de los especímenes de periodontitis crónica, corroborando datos de la literatura (9,20), afirmando que los linfocitos T representan menos de 6% de la población celular inflamatoria en la enfermedad periodontal avanzada, siendo esas células, especialmente las del tipo TCD4 (20). El hecho de éste experimento haberse restringido solo a la investigación de linfocitos TCD4, también parece contribuir con la reducida densidad de las células T positivas observadas en la muestra evaluada, ya que, a pesar de ser encontrados en pequeñas cantidades, los linfocitos TCD8 también están presentes en la periodontitis crónica y junto con los linfocitos B y los macrófagos son fuertemente asociados a ésta condición inflamatoria (5).

Enfatizando la participación de los linfocitos TCD8 en la enfermedad periodontal, un estudio *in vitro* (21) verificó inversión en la proporción CD4/CD8 de los linfocitos T específicos para *P gingivalis* después de la pre-

sentación antigenica realizada por los linfocitos B transformados, sugiriendo así, que a pesar de ocurrir apoptosis en todas las células, la reversión de la proporción CD4/CD8 no ocurre como consecuencia de la apoptosis de las células CD4 y sí, probablemente como consecuencia de la proliferación selectiva de los linfocitos TCD8, que podrían ser relevantes en la inmunopatología de la enfermedad periodontal inducida por el *P gingivalis*. Como los linfocitos TCD8 no fueron investigados en éste estudio, tal hecho también podría justificar la pequeña cantidad de linfocitos T encontrada en la muestra de periodontitis crónica.

Algunos autores (22) observaron una reducción de la proporción CD4/CD8 y, por consiguiente, del número total de linfocitos T, tanto en la sangre periférica como en los tejidos gingivales de pacientes con periodontitis crónica al ser comparados con muestras de gingivitis crónica. A pesar de que en el presente estudio sólo fue investigada la presencia de linfocitos TCD4, ninguna diferencia fue evidenciada con relación a la densidad de linfocitos T entre la gingivitis y la periodontitis crónica, ya que, todos los casos inmunorreactivos de ambos grupos exhibieron una densidad de marcación con store 1 para las células CD4 positivas, sin posibilidad ni necesidad de un análisis estadístico del patrón de expresión de esas células para verificar la ausencia de diferencia significativa entre los grupos estudiados.

Con relación al análisis cualitativo del patrón de expresión de las células CD20 positivas, indicativas de linfocitos B, la mayoría de los casos de éste estudio (94,1% de los casos de gingivitis crónica y 88% de los de periodontitis crónica), exhibieron inmunorreactividad al anticuerpo anti CD20, cuyo patrón de distribución fue predominantemente focal en posición yuxtaepitelial y también distante del epitelio. Es sugerido que la organización focal de las células CD20 positivas sea atribuida a un intento de esas células de imitar la formación de centros germinativos.

Con referencia a la densidad de células inmunopositivas al anticuerpo anti CD20, el grado 2 predominó tanto en la gingivitis como en la periodontitis crónicas y no fue verificada diferencia estadísticamente significativa de la densidad de linfocitos B entre ambos grupos. Estos hallazgos difieren de los relatados de la densidad de linfocitos B en la periodontitis de que en la gingivitis crónica. Considerando que, según esos relatos de la literatura, la gingivitis crónica presenta variaciones numéricas de linfocitos T y B de acuerdo con su estadio desarrollo, siendo los linfocitos T encontrado en mayor número en las gingivitis incipientes y los linfocitos B en las lesiones más avanzadas, esa semejanza de densidad de células CD20 positivas entre los dos grupos estudiados puede ser explicada por el hecho de que la mayoría de los casos de gingivitis crónica de la muestra de éste estudio eran gingivitis avanzadas y no incipientes.

La ausencia de áreas con densidad de marcación del grado 3 para el anticuerpo anti CD20 en los casos de periodontitis crónica y la presencia de densidad de marcación con grado 1 en muchos de los especímenes de gingivitis y periodontitis crónicas de la muestra de éste estudio sugieren que de hecho, las gingivitis crónicas pueden ser lesiones ya establecidas y las periodontitis crónicas lesiones más avanzadas, una vez que, según informaciones del fabricante del anticuerpo anti-CD20 utilizado en éste estudio, la molécula CD20 es expresada solamente en linfocitos B inmaduros, siendo perdida por éstas células en los estadios finales de su proceso de madurez, antes de su diferenciación para plasmocitos, por tal motivo no son encontrados, en lesiones periodontales de larga duración.

Es relatado que, para comprobar los diagnósticos antes citados, son imprescindibles las informaciones clínicas proporcionadas por el dentista, lo que no fue posible en éste estudio, ya que no tuvimos contacto directo con los pacientes, ni con los dentistas que los atendieron, toda la información clínica obtenida fue a través de los expedientes clínicos y los especímenes quirúrgicos fueron de archivos, lo que constituyó la limitación principal de éste estudio.

Partiendo de la premisa de que los linfocitos T y B se encuentran en el infiltrado inflamatorio de la mayoría de los especímenes evaluados e éste estudio, se puede inferir que las reacciones inmunológicas ejecutadas por esos dos tipos celulares, de hecho, participan en la patogénesis de la enfermedad periodontal. A pesar de que en éste estudio no fueron verificadas diferencias estadísticamente significativas en la densidad de esas células entre la gingivitis y la periodontitis crónicas, contrariando la mayoría de los estudios de la literatura, fue evidenciada una densidad mayor de linfocitos B que de Linfocitos T en los dos grupos de lesiones evaluadas, sugiriendo una participación mayor de la respuesta inmunológica humoral en los diferentes estadios de la enfermedad periodontal.

CONCLUSIONES

1. El patrón de distribución y la localización de las células CD4 positivas no muestran diferencias considerables entre la gingivitis y la periodontitis crónicas, siendo la distribución de esas células de forma aislada difusa ó en pequeños focos constituidos por escasas células, localizadas tanto en posición yuxtaepitelial como distantes del epitelio en los especímenes de ambos grupos.

2. El patrón de distribución de las células CD20 positivas se mostró de forma predominantemente focal en posición yuxtaepitelial y a distancia del epitelio en ambos grupos, sin diferencia estadísticamente significativa entre éstos.

3. No existe diferencia estadísticamente significativa en la densidad de células de células CD4 y CD20 positivas entre los grupos de lesiones evaluadas, sin embargo, se observó una densidad mayor de las células CD20 positivas en ambas lesiones, sugiriendo así, una mayor participación de la respuesta inmunológica humoral en los diferentes estadios de la enfermedad periodontal.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Characterization of cellular infiltrate, detection of chemokine receptor CCR5 and interleukin-8 and RANTES chemokines in adult periodontitis. *J Periodontal Res* 2001; 73: 591-6.
2. Murakami S, Hino E, Shimabukuro Y, Nozaki T, Kusumoto Y, Saho T, Hirano F, Hirano H, Okada H. Direct interaction between gingival fibroblasts and lymphoid cells induces inflammatory cytokine mRNA expression in gingival fibroblasts. *J Den Res* 1999; 78: 69-76.
3. Yamamoto M, Fujihashi K, Hiroi T, McGhee JR. Molecular and cellular mechanisms for periodontal diseases: role of Th1 and Th2 type cytokines in induction of mucosal inflammation. *J Periodontal Res* 1997; 32: 115-9.
4. Yamazaki K, Nakajima T, Hara K. Immunohistological analysis of T cell functional subsets in chronic inflammatory periodontal disease. *Clin Exp Immunol* 1995; 94: 384-91.
5. Seguier S, Godeau G, Brousse N. Immunohistological and morphometric analysis of intra-epithelial lymphocytes and Langerhans cells in healthy and diseased human gingival tissues. *Arch Oral Biol* 2000; 45: 441-52.
6. Ellis IO. Immunohistochemistry in diagnostic pathology. En: Brancroft JD, Stevens A, Turner DR. Theory and practice of histological techniques. New York: Churchill Livingstone; 1996. p. 471-89.
7. Peakman M, Vergani D. Basic and Clinical Immunology. London: Churchill Livingstone; 1997.
8. Melo ES, Alves VAF. Glossário dos principais marcadores imuno-histoquímicos. En: Alves VAF, Bacchi CE, Vassalo J. Manual de imuno-histoquímica. 1 ed: São Paulo. Sociedade Brasileira de Patologia; 1999. p. 220-70.
9. Marton JI, Dezso B, Radics T, Kiss C. Distribution of interleukin-2 receptor alpha-chain and cells expressing major histocompatibility complex class II antigen in chronic human periapical lesions. *Oral Microbiol Immunol* 1998; 13: 259-62.
10. Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998; 9: 248-66.
11. Stites DP, Terr AI. Imunología Básica. Rio de Janeiro: Prentice-Hall do Brasil; 1992.
12. Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol* 1996; 1: 821-78.
13. Mikhaleva LM, Barkhina TG, Shapovalov VD, Luss LV, Il'ina NI. Ultrastructure of cell populations of gingival soft tissue in chronic inflammatory processes. *Arch Patol* 2001; 63: 15-21.

14. Mega H, Jiang WW, Takagi M. Immunohistochemical study of oral lichen planus associated with hepatitis C virus infection, oral lichenoid contact sensitivity reaction and idiopathic oral lichen planus. *Oral Dis* 2001; 7: 296-305.
15. Murata M, Hara K, Saku T. Dynamic distribution of basic fibroblast growth factor during epulis formation: an immunohistochemical study in an enhanced healing process of the gingiva. *J Oral Pathol Med* 1997; 26: 224-32.
16. Wahl SM, Costa GL, Mizel DE, Allen JB, Skaleris U, Mangan DF. Role of transforming growth factor beta in the pathophysiology of chronic inflammation. *J Periodontol* 1993; 64: 450-5.
17. Cirrincione C, Pimpinelli N, Orlando L, Romagnoli P. Lamina propria dendritic cells express activation markers and contact lymphocytes in chronic periodontitis *J Periodontol* 2002; 73: 45-52.
18. Gemmell E, Seymour GJ. Cytokine profiles of cells extracted from humans with periodontal diseases. *J Dent Res* 1998; 77: 16-26.
19. Seguier S, Godeau G, Leborgne M, Pivert G, Brousse N. Immunohistologic and morphometric analysis of cytotoxic T lymphocytes in gingivitis. *J Periodontol* 1999; 70: 1383-91.
20. Kleinfelder JW, Lange DE, Bocker W. Some effects of non-surgical therapy on gingival inflammatory cell subsets in patients with adult and early-onset periodontitis. *J Periodontol* 2000; 71: 1561-6.
21. Gemmell E, Prajaneh S, Grieco DA, Taylor JJ, Seymour GJ. Apoptosis in *Porphyromonas gingivalis*-specific T-cell lines. *Oral Microbiol Immunol* 1999; 14: 331-8.
22. Gemmell E, Grieco DA, Yamazaki K, Nakajima T, Seymour GJ. Expression of receptor beta-chain variable region by T cells in human periodontal disease. *Arch Oral Biol* 1997; 42: 683-94.