



# Determinación de células T CD3+, CD4+, CD8+, receptor de la célula T familias V $\beta$ en biopsias de tejido gingival en pacientes con periodontitis crónica

María Angela Martínez,\* Gisela Gratz,\* Angélica Burgos,\* Gloria Inés Lafaurie,§  
Juliette de Ávila,§ Juan Carlos Munévar,§ Jaime Castellanos,§ Hernán Hurtado,§ María Consuelo Romero§

## RESUMEN

Las lesiones periodontales establecidas están caracterizadas por infiltraciones densas de LB, LT y macrófagos. Se considera entonces interesante definir nuevas vías y evaluar y localizar los tipos celulares en diferentes sitios en tejido epitelial y conectivo para establecer el comportamiento entre sitios del mismo paciente y entre sitios entre pacientes. Se evaluaron 10 biopsias de 2 pacientes con diagnóstico de periodontitis crónica, las cuales fueron procesadas para su análisis inmunohistoquímico (anti CD3, CD4, CD8, V $\beta$ 2, 5.1, 6.7, 8 y 12) e histomorfométrico. El comportamiento de los marcadores CD3, CD4 y CD8 tanto en epitelio como en tejido conectivo, fue uniforme entre pacientes, entre sitios del mismo paciente y entre sitios entre pacientes. Se observaron diferencias significativas únicamente para el tejido con alta expresión de los marcadores en el tejido conectivo. La mayor expresión de las familias V $\beta$  del TCR en los tejidos fue para V $\beta$ 6.7, V $\beta$ 8 y V $\beta$ 5.1, cuando se evaluaron en el tejido epitelial predominaron los marcadores V $\beta$ 8 y V $\beta$ 5.1 y en el tejido conectivo V $\beta$ 6.7, V $\beta$ 8. La expresión de TCR V $\beta$  fue variable intersitio e intrasitio, esto demuestra un comportamiento totalmente individual, lo que podría indicar que el sistema inmune responde de manera local.

## ABSTRACT

The established periodontal lesions are characterized by BL, TL and macrophage dense infiltrations. Its important to determine new ways, as well as to evaluate and localize the cellular types in different sites in epithelial and connective tissues to establish the behavior between different sites in the same patient and between sites of different patients. Ten biopsies with chronic periodontitis, were evaluated for immunohistochemistry for anti CD4, CD8, CD3, V $\beta$ 2, V $\beta$ 5.1, V $\beta$ 6.7, V $\beta$ 8, V $\beta$ 12. The first stains shown an uniform behavior in the epithelial and connective tissue between patients, between different sites in the same patient and between sites of different patients, demonstrating an homogeneous behavior. For all the variables, only significant differences were observed for the kind of tissue showing a strong expression in the connective tissue. The greater TCR expression of the variable families evaluated were to V $\beta$ 6.7, followed by V $\beta$ 8, V $\beta$ 5. The expression for all the TCR markers shows significant differences when the analysis was individualized through the epithelial tissue and the connective tissue. Although, V $\beta$ 8 y V $\beta$ 5.1 were predominant for epithelial tissue, and V $\beta$ 6.7 V $\beta$ 8 for connective tissue. The TCR V $\beta$  expression intrasite and intersite was variable. This finding was extremely interest because demonstrates a totally individual behavior which could indicate that the immune system responds of local manner.

**Palabras clave:** Enfermedad periodontal, linfocito T (LT), receptor célula T (TCR), región variable de cadena beta TCR V $\beta$ , superantígeno, linfocito B (LB).

**Key words:** Periodontal disease, T lymphocyte (TL), T cell receptor(TCR), variable region of beta chain TCR V $\beta$ , superantigen, B lymphocyte (BL).

## INTRODUCCIÓN

El linfocito T es una de las células encargadas de la especificidad de la respuesta inmunitaria del organismo, reconoce y distingue de manera específica los diferentes determinantes antigenicos a través de sus receptores (TCR) o moléculas de membrana de alta afinidad durante la etapa madura de su desarrollo.

Entre las subpoblaciones de éstas encontramos linfocitos T cooperadores cuyo fenotipo de superfi-

cie es: CD3+, CD4+, CD8- y linfocitos T citolíticos o citotóxicos LTC cuyo marcador de superficie es CD3+, CD4-, CD8+.

graphic.com

\* Residente de Periodoncia y Medicina Oral, Facultad de Odontología. Universidad El Bosque. Bogotá, Colombia.

§ Instituto, Unidad de Investigación Básica Oral, Facultad de Odontología. Universidad El Bosque. Bogotá, Colombia.

formado por una cadena  $\alpha$  glicoproteica ácida de 40 a 60 kD y la beta de 40 a 50 kD. Además, posee una porción terminal alterna que consta de regiones hipervariables, las cuales forman el punto de contacto para las uniones del complejo antígeno + molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). La región variable del receptor TCR puede estar presente tanto en el fenotipo CD4+ como en el CD8+.<sup>1</sup>

Se ha propuesto que la región variable de la cadena Beta (V $\beta$ ) del receptor de la célula T TCR  $\alpha\beta$  participa en el reconocimiento específico y muerte de las células infectadas por periodontopatógenos, además de la regulación de la respuesta vía citoquinas y producción de anticuerpos específicos por las células B.<sup>2</sup>

Hasta hace poco se creía que los linfocitos T sólo eran capaces de activarse en respuesta a pequeños péptidos procedentes de proteínas que previamente habían sido procesadas. Sin embargo, se sabe en la actualidad que determinados antígenos no requieren ningún procesamiento para poder estimular a los linfocitos T, este es el caso de algunas glicoproteínas especiales que reciben el nombre de "Superantígenos". A diferencia de un péptido normal, los superantígenos se unen o interactúan con las zonas laterales de las cadenas del TCR, especialmente en la porción V $\beta$  de la molécula. Así mismo, estos superantígenos se unen a las moléculas HLA clase II aunque de un modo nada convencional: no ocupan la hendidura de unión al péptido sino que se unen a la parte externa o lateral de la estructura de HLA clase II; esa forma tan especial de unirse tanto a las moléculas de clase II como a los TCR induce una activación de los linfocitos T de una forma muy eficiente, induciendo de esta manera una disfunción inmune. Existen hipótesis que señalan que la estimulación de los superantígenos constituye una de las principales vías de estimulación de las células en procesos agresivos y poco controlados.<sup>3</sup>

Se ha descrito en varias enfermedades la correlación de la activación de ciertas cadenas variables/beta (V $\beta$ ) de la célula T, como por ejemplo en la artritis reumatoide, enfermedad de Kawasaki, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, tuberculosis, síndrome de Sjögren, sarcoidosis pulmonar, SIDA y diabetes mellitus insulino-dependiente.<sup>4,5</sup> En estas enfermedades pero principalmente en artritis reumatoide, se ha descrito una hipótesis en la que los superantígenos producidos por un microorganismo activan y expanden a las células T V $\beta$ , las cuales serían responsables de la reacción cruzada y mecanismos de destrucción de esta enfermedad.<sup>4</sup> Canti-

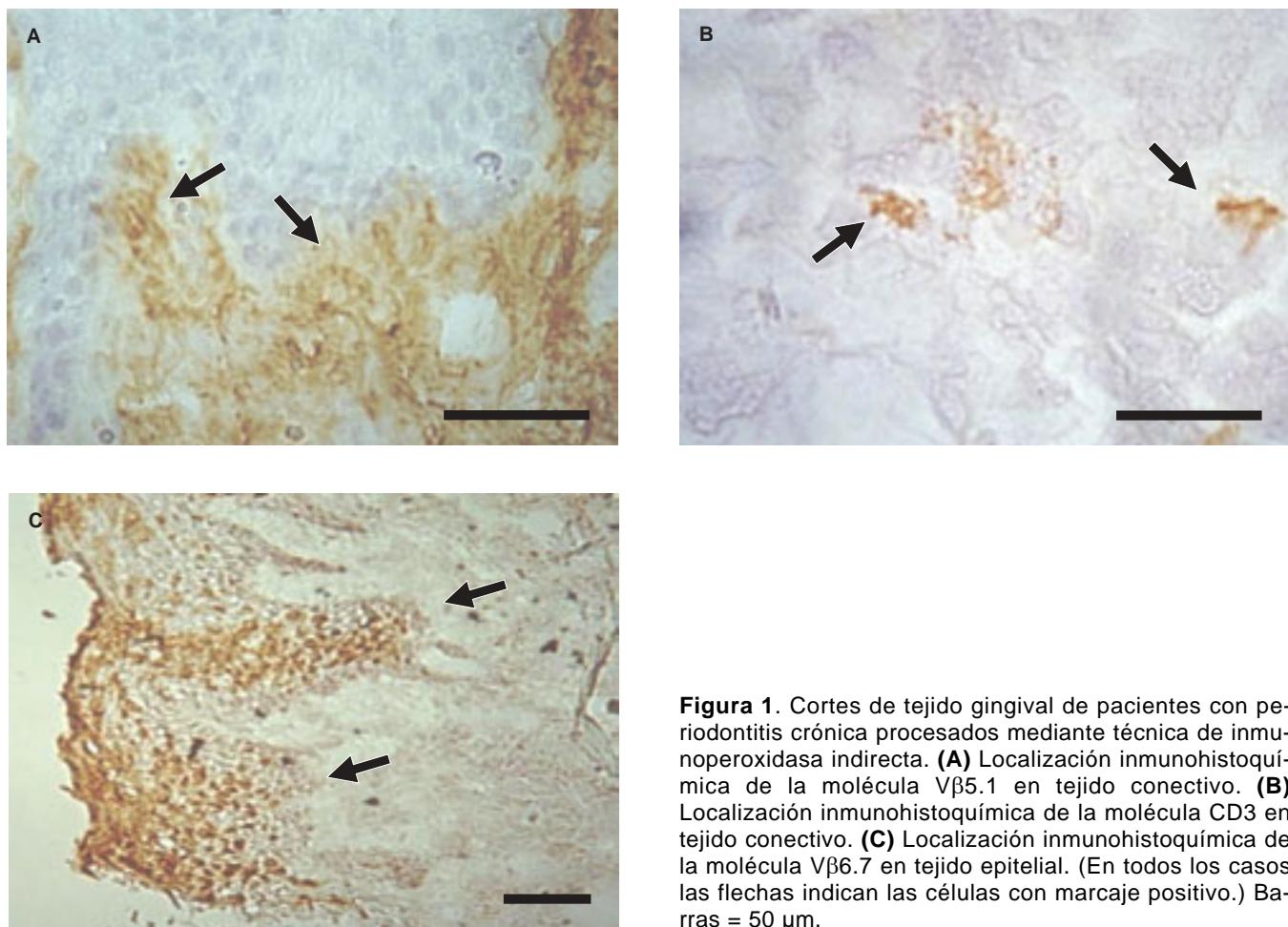
dades incrementadas de células T así como de células B y células plasmáticas se encuentran en lesiones periodontales avanzadas en humanos. Un análisis funcional y fenotípico de las células T en tejidos con periodontitis muestra un imbalance en mecanismos reguladores de las células T.

Las lesiones periodontales establecidas se caracterizan por infiltraciones densas de células plasmáticas, linfocitos CD4+, CD8+, macrófagos, entre otros. El papel de las células T CD8+ en la periodontitis crónica severa no es conocida, pero la disminución en la respuesta linfoproliferativa a ciertos microorganismos orales como *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Veillonella alcalescens* sugieren una función supresora y también un papel inmunorregulador debido a la secreción de citocinas. La relación CD4+/CD8+ en algunos casos se conserva para indicar inmunorregulación, pero en todo caso los resultados reportados no son consistentes.

Teniendo en cuenta que existen similitudes en el mecanismo de destrucción observado tanto en artritis reumatoide como en la enfermedad periodontal se sugieren mecanismos similares que podrían suceder en la patogénesis de ambas enfermedades ya que ciertas proteínas bacterianas han mostrado poseer propiedades superantígenicas en la enfermedad periodontal crónica que podría hacer pensar en un mecanismo similar al propuesto en otras enfermedades autoinmunes.

Existen pocos estudios que evalúan la presencia de células T CD3+, CD4+, CD8+ y TCR V $\beta$  en biopsias de tejido gingival analizados por inmunohistoquímica, que describan la localización y distribución de estas células tanto en epitelio gingival como en tejido conectivo.

Universalmente los estudios que evalúan estos tipos celulares utilizan pocas muestras tomando una biopsia de tejido al azar para cada paciente suponiendo una respuesta con un comportamiento homogéneo en los diferentes sitios; pero ninguno de los estudios ha evaluado la expresión celular en diferentes sitios del mismo paciente para explicar si la respuesta de la célula T y su activación depende de factores locales. El propósito de este estudio fue determinar la localización y distribución de la célula T CD3+, CD4+ y CD8+, y el receptor (TCR) V $\beta$ 2, V $\beta$ 5.1, V $\beta$ 6.7, V $\beta$ 8 y V $\beta$ 12 en epitelio y tejido conectivo de biopsias de pacientes con periodontitis crónicas para establecer su comportamiento en cada sitio evaluado, entre sitios del mismo paciente y entre sitios entre pacientes analizados por un sistema de histomorfometría cuantitativa.



**Figura 1.** Cortes de tejido gingival de pacientes con periodontitis crónica procesados mediante técnica de inmunoperoxidasa indirecta. **(A)** Localización inmunohistoquímica de la molécula V $\beta$ 5.1 en tejido conectivo. **(B)** Localización inmunohistoquímica de la molécula CD3 en tejido conectivo. **(C)** Localización inmunohistoquímica de la molécula V $\beta$ 6.7 en tejido epitelial. (En todos los casos las flechas indican las células con marcaje positivo.) Barras = 50  $\mu$ m.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Participaron en el presente estudio 2 pacientes adultos con diagnóstico clínico de periodontitis crónica severa. En los cuales se evaluaron 5 sitios con bolsas  $\geq 6$  mm obtenidos de cirugía periodontal para un total de 10 sitios analizados. Los sitios fueron tratados con terapia quirúrgica sin fase higiénica previa para no alterar la composición celular, lo cual fue explicado a los pacientes, quienes firmaron un consentimiento informado aprobado por el Comité Institucional de Ética. Los pacientes fueron sistémicamente sanos, no fumadores, no consumidores de alcohol y no habían sido tratados periodontalmente, ni habían recibido terapia antibiótica o AINES un año previo al estudio. Los tejidos gingivales fueron tomados de áreas interproximales mediante una técnica de Widman modificada, la cual fue estandarizada previamente en relación a la capacidad de conservar la es-

tructura de los tejidos a nivel histológico. Una vez obtenidas las muestras fueron embebidas en el medio de inclusión Tissue-tek, se llevaron a nitrógeno líquido para su congelación hasta su procesamiento. La muestra se descongeló y se orientó en sentido mesodistal y se procedió a realizar cortes de 6  $\mu$ m, por duplicado.

Uno de los cortes se sometió a tinción de hematoxilina-eosina para corroborar el diagnóstico histológico y la correcta orientación del tejido. Las muestras fueron fijadas con acetona a  $-20^{\circ}\text{C}$  grados y la actividad de la peroxidasa endógena se inactivó con peróxido de hidrógeno. Los sitios inespecíficos se bloquearon y a continuación se añadieron los anticuerpos monoclonales estandarizados previamente (anti CD3, CD4, CD8, anti TCR V $\beta$  2, 5.1, 6.7, 8, 12). Posteriormente se realizó la reacción con el anticuerpo secundario biotinilado anti IgG o IgM sometidos a reacción avidina-peroxidasa y revelado con diaminobenzidina, observándose al microscopio a 10 y 40x. Finalmente se

realizó la digitalización de imágenes y análisis histomorfométrico.

Las imágenes de las biopsias fueron capturadas con una videocámara SONY DXC 107A conectada a un microscopio triocular a una magnificación de 400X y fueron analizados de 15 a 30 campos para cada anticuerpo, donde las 5 primeras imágenes correspondieron a epitelio y las 10 restantes a tejido conectivo, tomando un total de 210 imágenes para cada anticuerpo rastreado en los dos pacientes.

Las imágenes digitalizadas fueron analizadas empleando un software Image PC (Scion corp), para cuantificar el área de inmunomarcaje en cada imagen. El dato de número de pixels se promedió para cada tejido. Posteriormente los resultados fueron analizados y se les aplicó el coeficiente de correlación intraclass, para evaluar la concordancia interexaminador, donde se obtuvo un rango entre 0.94 a 0.99, lo que indicó un bajo grado de variabilidad presentado por los datos del estándar de oro y cada examinador a cargo del análisis histomorfométrico. Para la calibración intraexaminador y poder determinar su precisión se analizaron los resultados y se les aplicó el coeficiente de variación obteniéndose un rango entre 6% a 15% de variación en el análisis intraobservador.

El análisis histomorfométrico arrojó datos del porcentaje de expresión para cada marcador (CD3, CD4 y CD8) el cual fue expresado en proporciones. Se sacó el promedio y la desviación estándar para cada sitio, para cada paciente, en cada tejido (epitelial y conectivo) y para cada muestra total; tanto para CD3, CD4, como para CD8. Se aplicó la prueba t Student para establecer diferencias entre los marcadores tanto en tejido epitelial como en tejido conectivo con una  $p \leq 0.05$ . Para establecer si existen diferencias significativas entre marcadores CD3, CD4, CD8 teniendo en cuenta sitios (muestra total), pacientes (total de sitios por pacientes en cada tejido) se utilizó la prueba T de Bonferroni para múltiples comparaciones con  $p \leq 0.0001$ .

Para el análisis del TCR del linfocito T V $\beta$ 2, V $\beta$ 5.1, V $\beta$ 6.7, V $\beta$ 8 y V $\beta$ 12 se utilizaron medidas de tendencia central; promedio y mediana y de variabilidad, desviación estándar, error estándar, rango máximo y mínimo y se evaluó la distribución normal mediante la prueba de Kolmogorov- Smirnov a un nivel de significancia del 5%. Para detectar si existían diferencias significativas entre los marcadores V $\beta$  entre pacientes, para cada paciente por sitio y por tejido se evaluaron los supuestos de variabilidad homogénea entre grupos mediante la prueba de Levene (nivel de significancia 5%). Se determinó si existían diferencias entre las

medianas y las varianzas mediante el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis a un nivel de significancia del 5%.

## RESULTADOS

En el presente estudio se evaluaron 10 biopsias de 2 pacientes con diagnóstico de periodontitis crónica para un total de veinte muestras, las cuales se digitalizaron para obtener un total de 750 campos (250 de epitelio y 500 de conectivo). Se estudiaron dos pacientes, uno de sexo femenino y otro de sexo masculino con edades de 31 y 49 años respectivamente con iguales características clínicas: Pérdida de inserción mayor de 5 mm, sangrado al sondaje, profundidad de bolsa mayor de 6 mm y ausencia de supuración excesiva. El diagnóstico clínico fue corroborado histológicamente, mediante tinción con hematoxilina-eosina. Se encontró un epitelio oral escamoso estratificado paraqueratinizado, con aumento en número y espesor de las crestas epiteliales que se proyectan dentro del tejido conectivo con solución de continuidad entre el tejido epitelial y el tejido conectivo. Se observó también un epitelio surcular escamoso estratificado con aumento marcado del número de crestas epiteliales, solución de continuidad bien establecida. En el tejido conectivo laxo se evidenció abundante edema intersticial, aumento de la vascularización e infiltrado inflamatorio crónico; y en tejido conectivo denso un excesivo infiltrado inflamatorio crónico, aumento en la vascularización, fibrosis y edema marcado.

El comportamiento de los marcadores CD3, CD4 y CD8 en el tejido epitelial y en el tejido conectivo, mostró ser uniforme entre pacientes, entre sitios del mismo paciente y entre sitios entre pacientes y para todos los marcadores los datos siguieron una distribución normal. Para los diferentes sitios evaluados en el tejido epitelial el marcador CD3 fue el que presentó la mayor variabilidad entre los sitios evaluados. El comportamiento de los marcadores CD4 y CD8 entre los diferentes sitios en el tejido epitelial mostró mayor homogeneidad que lo observado para CD3 sin observarse diferencias estadísticas significativas entre sitios del mismo paciente y entre sitios entre pacientes  $p > 0.05$ .

Para todas las variables de estudio (pacientes, tejidos y sitios), sólo se observaron diferencias significativas para el tipo de tejido, observándose una mayor expresión de los marcadores CD3, CD4 y CD8 en el tejido conectivo (prueba T de Bonferroni  $p < 0.001$ ). Al establecer una relación de los fenotipos

CD4/CD8 en el tejido epitelial se obtuvo un valor de 1.19 y en tejido conectivo de 0.95, es decir que en el primero predominó el marcador CD4 y en el segundo el CD8.

La técnica histomorfométrica permitió también analizar la expresión para cada una de las proteínas de superficie detectada por los anticuerpos monoclonales V $\beta$ 2, V $\beta$ 5.1, V $\beta$ 6.7, V $\beta$ 8 y V $\beta$ 12 tanto en tejido epitelial como en tejido conectivo. Para todos los marcadores evaluados, los datos obtenidos no siguieron una distribución normal (Prueba de normalidad Kolmogorov Smirnov  $p = 0.00$ ). La mayor expresión teniendo en cuenta la mediana de los datos en los tejidos evaluados fue para V $\beta$ 6.7, seguido por V $\beta$ 8, V $\beta$ 5.1, V $\beta$ 12, y V $\beta$ 2 teniendo en cuenta el marcaje tanto en tejido epitelial como el observado en tejido conectivo.

Al comparar las medianas de los marcadores entre el paciente 1 y 2, se encontraron diferencias significativas en V $\beta$ 5.1 y V $\beta$ 12 ( $p = 0.0000$  Kruskall-Wallis) y no se encontraron diferencias en V $\beta$ 2, V $\beta$ 6.7 y V $\beta$ 8 (Figura 1).

La expresión para todos los marcadores mostró diferencias significativas cuando se individualizó el análisis entre el tejido epitelial y el tejido conectivo, teniendo en cuenta las medianas (Kruskall-Wallis  $p < 0.05$ ). Sin embargo, cuando se evaluaron las diferencias para variabilidad solamente se observaron diferencias significativas para V $\beta$ 2 y V $\beta$ 8 (Test de Levene  $p < 0.05$ ). En el tejido epitelial predominaron los marcadores V $\beta$ 8 y V $\beta$ 5.1 seguido de V $\beta$ 2, con una menor expresión de V $\beta$ 12 y V $\beta$ 6.7 y en el tejido conectivo se observó un predominio de V $\beta$ 6.7, V $\beta$ 2 y V $\beta$ 8, con una menor expresión de V $\beta$ 5.1, V $\beta$ 12.

Al evaluar el marcaje obtenido en cada sitio evaluado tanto intra como entre pacientes se observaron diferencias significativas. Estas diferencias fueron independientes del tipo de tejido de acuerdo al análisis de varianza factorial para todos los marcadores.

Al analizar de manera individual cada sitio evaluado las diferencias de mayor contundencia fueron dadas por el V $\beta$ 2 y V $\beta$ 8 donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas tanto en la variabilidad como en la mediana tanto intra como inter pacientes evaluados y los que menos variabilidad presentaron fueron V $\beta$ 5 y V $\beta$ 12; mientras que en el comportamiento de V $\beta$ 5.1, V $\beta$ 6.7 y V $\beta$ 12 no se presentó diferencias en la variabilidad pero sí en sus medianas. Sin embargo, para V $\beta$ 6.7 en el sitio 2 del paciente 1 se encontró una diferencia estadísticamente significativa con todos los sitios del mismo paciente y la mayoría del paciente 2, la expresión

de este marcador fue observada en gran proporción en epitelio con marcaje específico como condición especial.

## DISCUSIÓN

La enfermedad periodontal es una enfermedad infecciosa, en la cual la respuesta del huésped susceptible frente al reto microbiológico genera un proceso inflamatorio que termina haciendo daño sustancial en el tejido de soporte dentario. Aunque muchos tipos celulares participan en esta respuesta inflamatoria se ha sugerido que el reto microbiológico en la lesión periodontal está dirigido hacia los linfocitos T los cuales llevan a cabo el reconocimiento antígenico.

Existen algunas hipótesis en donde las diferencias fenotípicas y funcionales de las células T pueden catalogar grupos de sujetos susceptibles a periodontitis crónica avanzada y no susceptibles con gingivitis.<sup>6</sup> Ya que en la respuesta inmune del huésped contra patógenos bacterianos en periodontitis, las células T se ha descrito pueden jugar un papel crucial en la dirección exitosa de la defensa. La presencia de células marcadas con CD3 en tejido conectivo demostró un aumento significativo con respecto al valor encontrado en epitelio, este fenotipo de células indica muy posiblemente que corresponde a linfocitos T con fenotipo CD4 o CD8, ya que esta proteína se encuentra expresada en el 100% de los linfocitos; T. Yamasaki y col en 1993 demuestran que la presencia de células CD3 en tejido conectivo son encontradas como tipo celular dominante en el infiltrado celular en individuos con periodontitis crónica.<sup>7</sup>

El hallazgo de células CD3 positivas en gran proporción en el tejido epitelial llama la atención, ya que esta proteína se asocia al receptor de antígeno de la célula T  $\alpha\beta$  el cual predomina en tejido conectivo, esto puede suponer que un segundo tipo de células T cuya expresión de la molécula CD3 sea positiva es el que podría estar presente en el tejido epitelial, pudiéndose pensar que sean células T cuyo TCR sean  $\gamma\delta$ , cuya expresión en epitelio característicamente corresponde a una pequeña subpoblación. Una hipótesis de trabajo para la función y especificidad de las células T que expresan CD3 positivo  $\gamma\delta$  es que pueden reconocer antígeno habitualmente al nivel de los límites epiteliales entre el huésped y el medio externo, de esta forma podrían iniciar respuestas inmunitarias frente a un pequeño número de microorganismos comunes en es-

tos lugares antes del reclutamiento de células T  $\alpha\beta$  más específicas.<sup>1</sup>

Las células T llegan a la lesión periodontal a través de la circulación, y es importante explorar las diferencias potenciales dadas por el número, subpoblación y reactividad de éstas en sujetos susceptibles y no susceptibles. Es concebible que diferencias en el número y proporción de células CD4, CD8 y CD3 positivas entre sujetos susceptibles y no susceptibles puedan ser indicativo de una alteración en la regulación inmune. Los marcadores CD4 y CD8 presentaron un comportamiento similar. Sin embargo, en este estudio a pesar de que no se encontraron diferencias significativas entre el marcador CD4 y CD8, hubo mayor valor para el antígeno CD8 en tejido conectivo. El papel de las células T CD8+ en la periodontitis crónica severa no es conocido, pero la disminución en la respuesta linfoproliferativa a ciertos microorganismos orales como *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Vellonella alcalescens* sugiere una función supresora. Recientes estudios han establecido que la célula T CD8+ no sólo cumple función citotóxica o supresora sino también un papel inmunorregulador activo debido a la producción de citoquinas.<sup>8</sup>

Existen varios hallazgos donde indican el predominio de las células T CD4 sobre la población CD8<sup>9</sup> y otros<sup>6</sup> que no encuentran diferencias significativas en la distribución de estas subclases de linfocitos T. Los resultados de la relación CD4/CD8 en el presente estudio, demuestran un predominio de linfocitos T CD4 en epitelio y un predominio de CD8 en tejido conectivo. Ambas células efectoras, tanto CD4 como CD8 pueden ser subdivididas sobre la base del perfil de citocinas. Para las células CD4 hay 4 grupos principales Th0, Th1, Th2 y Th3. Las Th1 secretan IL2, INF $\gamma$  y TNF $\alpha$  y  $\beta$  respuestas mediadas por células que son esenciales para la eliminación de patógenos celulares. Las células Th2 producen principalmente IL4, IL5, IL6, IL10 e IL13, las cuales promueven crecimiento y diferenciación de células B y los linfocitos Th3 que están mediando una respuesta supresora por la producción de TGF- $\beta$ .<sup>6</sup>

Para las células CD8 hay también propuesta una subdivisión basada en el perfil de citocinas que producen, los linfocitos T CD8 citotóxicos Tc1 secretan INF $\gamma$  y TNF $\alpha$ . La mayoría de CD8 son del subtipo Tc1, las Tc2 producen IL4 y son capaces de ayudar a la secreción de inmunoglobulinas.<sup>6</sup>

Seguier y colaboradores demostraron la presencia de dos subgrupos de células T CD8+ (tipo 1 y 2) aisladas de encía humana inflamada, los cuales fueron ca-

paces de actuar entre sí; un subgrupo produjo altos niveles de interferón gamma, además de actividad frente a fitohemaglutinina, y actividad citolítica medida por anti-CD3 siendo células CD28+. El otro subgrupo produjo altos niveles de IL-4 en combinación con IL-5 y no mostraron citotoxicidad y fueron CD28+, demostrando la posibilidad de activar diferentes perfiles celulares CD8 basados en la capacidad de síntesis de diversas citocinas.<sup>8</sup>

Generalmente un balance en la generación tanto de Th1 como de Th2 es necesario para que se produzca una respuesta inmune efectiva. Sin embargo, un perfil de citocinas de células T aberrantes podría ser factor de susceptibilidad para periodontitis, lo que podría llevar o no a la inhabilidad del huésped para montar una respuesta inflamatoria. La conversión de lesión con predominio de células T a células B puede ser destructiva, basados en esto la hipersensibilidad retardada y su respuesta mediada por células Th1 puede ser protectora y la activación por TH2 de las células B podría ser considerada destructiva.<sup>6</sup>

En la circulación periférica la mayoría de las células T reconocen antígenos a través de las cadenas  $\alpha\beta$  del TCR; Se ha observado que las células T infiltradas en la encía también expresan el TCR  $\alpha\beta$ <sup>10,11</sup> y son principalmente células de memoria.<sup>12,13</sup> Probablemente algunos subgrupos de células T habitan los tejidos gingivales y la variedad de TCR en la encía puede ser diferente de la sangre periférica.<sup>14</sup>

De acuerdo con Zadeh y col en 1996<sup>3</sup> la inmuno-modulación por bacterias periodontopáticas ha sido implicada en la patogénesis de la enfermedad periodontal inflamatoria. Una nueva clase de mitógenos para la célula T derivados de microorganismos referidos como "superantígenos" han sido implicados recientemente. Éstos son unos de los únicos que pueden inducir una gran activación y expansión de subclases de células T de una manera antígeno independiente causando disfunción inmune.

Al analizar de manera individual cada sitio evaluado las diferencias de mayor contundencia fueron dadas por el V $\beta$ 2 y V $\beta$ 8 donde se encontraron diferencias estadísticamente parecen indicar que el comportamiento de estos marcadores parece estar determinado por factores locales tales como dosis, tipo de antígeno, moléculas y células accesorias ubicadas en el sitio específico individual, que serían factores importantes que individualizan la participación del linfocito T dentro de la patogenia de la enfermedad periodontal y que permiten la expansión relativa de subgrupos de estas células con producción de diferentes citocinas y funciones efectoras distintas.

Los resultados de este estudio demuestran que los dos pacientes estudiados con periodontitis crónica, contienen posiblemente elevadas proporciones de una o varias subclases de células T, identificadas por su receptor V $\beta$ , con evidencia de una mayor expresión en tejido conectivo que en epitelio. La mayor expresión teniendo en cuenta tejido epitelial y conectivo fue para V $\beta$ 6.7 a 1 seguido por V $\beta$ 8, V $\beta$ 2, V $\beta$ 5.1, V $\beta$ 12. Resultados similares en biopsias de pacientes con periodontitis crónicas avanzadas han sido reportados por Zadeh y Kreutzer en el 96 con la técnica de citometría quienes identificaron V $\beta$ 6, V $\beta$ 8, V $\beta$ 12, Karimzadeh y col, de igual manera con la misma técnica encontraron expresión de V $\beta$ 6, Ohsawa y col con técnica PCR reportaron también expresión de V $\beta$ 6. Nakajima y col 1996 corroboraron la expresión de V $\beta$ 5 y V $\beta$ 6.7, pero no la expresión de V $\beta$ 8.<sup>3,15,16</sup>

Algunos antígenos bacterianos pueden activar selectivamente células T que expresen genes V $\beta$  en el receptor de la célula T. Mathur y Michalowics en 1995 estudiaron la expresión de cinco familias V $\beta$ 2, V $\beta$ 5, V $\beta$ 6, V $\beta$ 8 y V $\beta$ 12 con anticuerpos monoclonales en células T de sangre periférica de pacientes con periodontitis y sujetos sanos frente a cocultivos de *Actinobacillus actinomycetecomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia* para observar la magnitud del cambio en la expresión del V $\beta$ . El cocultivo con estas tres bacterias produjo cambios significativos en la expresión V $\beta$ , evidenciándose una expresión aumentada para V $\beta$ 2, V $\beta$ 5 y V $\beta$ 6 en el cultivo con *Prevotella*.<sup>15</sup> A pesar de las diferencias en las técnicas utilizadas, los estudios mencionados anteriormente muestran en común la expresión constante del receptor V $\beta$ 6.7 y V $\beta$ 8, en biopsias de tejido gingival de pacientes con periodontitis crónica avanzada, lo que es corroborado por el presente estudio.

Para el V $\beta$ 6.7 en el sitio 2 del paciente 1 se encontró una diferencia estadísticamente significativa con todos los sitios del mismo paciente y la mayoría del paciente 2, observando un comportamiento especial y la expresión de este marcador fue observada en gran proporción en epitelio con marcaje específico. Este hallazgo podría hacer pensar que el receptor presente sea de la célula T  $\gamma\delta$  el cual predomina en tejido epitelial, esto nos puede hacer suponer que la región variable identificada por el clon del linfocito T cuyo TCR sea  $\alpha\beta$  sea compartida por un clon de linfocito T cuyo TCR sea  $\gamma\delta$ , los cuales están compartiendo un posible epítope conservado, en una pequeña subpoblación o que sea un receptor  $\alpha\beta$  extrañamente ubicado en epitelio.

El diseño de este estudio no permite ver la repercusión en las variaciones de esta expresión en la actividad de la enfermedad periodontal, sin embargo planteamos un interesante modelo longitudinal para ver sus implicaciones en los cambios en los niveles de inserción ya que por las características de la enfermedad periodontal, cíclica y episódica, la expresión de estas proteínas podrían servir como marcadores individuales entre sitios que permanezcan estables y sitios que pierdan inserción.

## REFERENCIAS

1. Abbas A, Lichtman A. *Inmunología celular y molecular*. 5a. Ed. Madrid: Ediciones Harcourt S.A.; 2003: 126-154.
2. Barrios G. *Periodontia: Su fundamento biológico*. 1a Ed. Bogotá: OP Graficas LTDA.; 1989: 105-115.
3. Zadeh H, Kreutzer D. Evidence for involvement of superantigens in human periodontal diseases: Skewed expression of T-cell receptor variable regions by gingival T-cell. *Oral Microbiol Immunol* 1996; 11: 88-95.
4. Berglundh T, Liljenberg B, Tarkowski A, Lindhe J. Local and systemic TCR V gene expression in advanced periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 125-33.
5. Ohsawa Y, Yamazaki K, Nakajima T, Hara K. Clonal accumulation of T cells bearing VB6 T-cell receptor in chronic inflammatory periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* 2000; 15: 211-217.
6. Petit MDA, Hovenkamp E. Phenotypical and functional analysis of T cells in periodontitis. *J Periodontal Res* 2001; 36: 214-220.
7. Yamazaki K, Nakajima T, Aoyagi T, Hara K. Immunohistological analysis of memory lymphocytes and activated B lymphocytes in tissues with periodontal disease. *J Periodontal Res* 1993; 28: 324-334.
8. Seguier S, Godeau G. Immunohistological and morphometric analysis of cytotoxic T lymphocytes in gingivitis. *J Periodontal Res* 1999; 70: 1383-1391.
9. Yamamoto M, Fujihashi K, Hiroi T, McGhee JR, Van Dyke TE, Kiyono H. Molecular and cellular mechanisms for periodontal diseases: role of Th1 and Th2 type cytokines in induction of mucosal inflammation. *J Periodontal Res* 1997; 32: 115-119.
10. Gummel E, Seymour G. Gamma-Delta T lymphocytes in human periodontal disease tissue. *J Periodontol* 1995; 66: 780-785.
11. Karuko Kawahara, Masami Fukunaga. Immunohistochemical study of Gamma-delta T cell in human gingival tissues. *J Periodontol* 1995; 66: 775-79.
12. Gummel E, Seymour GJ. Cytokine profiles of cells extracted from humans with periodontal diseases. *J Dent Res* 1998; 77: 16-26.
13. Yamazaki K. Expression of receptor b-chain variable region by T cells in human periodontal disease. *Arch Oral Biol* 1997; 42: 683-694.
14. Zafiropoulos GGK, Flores-de-Jacoby L. Flow-cytometric analysis of lymphocyte subsets in patients with advanced periodontitis. *J Clin Periodontol* 1990; 17: 636-641.
15. Karimzadeh K, Zadeh H. Comparison of gingival and peripheral blood T cell among patients with periodontitis suggests skewing of the gingival T cell antigen receptor V $\beta$  repertoire. *J Periodontal Res* 1999; 34: 445-456.

16. Nakajima T, Yamazaki K, Hara K. Biased T cell receptor V gene usage in tissues with periodontal disease. *J Periodontal Res* 1996; 31: 2-10.
17. Mathur A, Michalowicz B, Yang C et al. Influence of periodontal bacteria and disease status on Vb expression in T cell. *J Periodontal Res* 1995; 30: 369-373.

Dirección para correspondencia:

**María Consuelo Romero**

Coordinadora Inmunogenética UIBO-Universidad  
El Bosque-Colombia

Correo electrónico:

romeromaria@unbosque.edu.co