

DetECCIÓN DE ANTICUERPOS SÉRICOS IgG, IgM E IgA DE PACIENTES CON ENFERMEDAD PERIODONTAL

Carlos Bermúdez-Jiménez¹, José Romero-Quintana², Maribel Aguilar-Medinar², Rosalío Ramos-Payan², Marisol Galván-Valencia¹, Jorge Ayala-Luján¹, Carmen Aceves-Medina¹, Luis Aguilera-Galavíz¹

Área de Ciencias de la Salud¹, Facultad de Ciencias Químico Biológicas²
Universidad Autónoma de Zacatecas¹, Universidad Autónoma de Sinaloa²
Zacatecas, Zac.¹; Culiacán, Sin.²; México
luisgalaviz_65@hotmail.com

Abstract— Periodontal disease (PD) is a chronic inflammatory response resulting in the destruction of tooth-supporting tissues. Chronic inflammation triggers loss of immune tolerance and autoimmune phenomenon. The purpose of this study was to evaluate the presence of serum IgG, IgM and IgA of 18 patients with PD against protein components of rabbit periodontal tissue by Western Blot. Recognition was observed for IgG, IgM and IgA in the different patient sera. The presence of autoreactive antibodies does not necessarily determine the existence of autoimmunity, however, may be the result of a synergistic effect between the stimulation of periodontal pathogens and genetic susceptibility.

Keyword— *periodontitis, antibody, inflammation, autoimmunity, autoreactivity, periodontal tissue.*

Resumen— La enfermedad periodontal (EP) es una respuesta inflamatoria crónica que resulta en la destrucción de los tejidos de sostén del diente. La inflamación crónica desencadena pérdida de la tolerancia inmunológica y fenómeno autoinmune. El propósito de este estudio fue evaluar la presencia de anticuerpos séricos IgG, IgM e IgA de 18 pacientes con EP contra componentes proteicos de tejido periodontal de conejo mediante Western Blot. Se observó reconocimiento por anticuerpos IgG, IgM e IgA en los distintos sueros de pacientes. La presencia de anticuerpos autorreactivos no necesariamente determina la existencia de autoinmunidad, sin embargo puede ser consecuencia de un efecto sinérgico entre el estímulo de los patógenos periodontales y la susceptibilidad genética.

Palabras claves— *periodontitis, anticuerpo, inflamación, autoinmunidad, autorreactividad, tejido periodontal.*

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad periodontal (EP) se caracteriza por la inflamación e infección localizada o generalizada de las estructuras de soporte del diente (tales como el hueso alveolar, ligamento periodontal, cemento y encía), producida principalmente por bacterias anaerobias Gram negativas. En la patogénesis de esta enfermedad participa de manera importante la respuesta inflamatoria crónica ejerciendo un efecto aditivo a los mecanismos de patogenicidad de los microorganismos y ocasionando la destrucción de los tejidos periodontales [1]. De progresar la enfermedad, puede llevar a la pérdida del órgano dentario [2].

La EP afecta principalmente a la población de 30 a 40 años de edad con hábitos de higiene oral insuficiente; la fase inicial denominada gingivitis presenta una prevalencia cercana al 80%, en población infantil, y más del 70% de la población adulta ha padecido de gingivitis, periodontitis o ambas [3] y según la OMS (2012) las enfermedades periodontales graves, que pueden desembocar en la pérdida de dientes, afectan a un 15%-20% de los adultos de edad media (35-44 años) [4]. Los esfuerzos en el cuidado de la salud han permitido la reducción en la pérdida de dientes e incrementado la conservación de los mismos por más años [5].

La periodontitis es responsable de un 30 a 35 % de todas las extracciones dentarias, mientras que la caries y sus secuelas representan un 50%. De la misma forma las enfermedades periodontales

contribuyen como un factor de riesgo para otras enfermedades sistémicas como diabetes, aterosclerosis, artritis reumatoide, entre otras [6, 7].

Desde el punto de vista genético, uno de los factores de riesgo, es que quienes presentan determinados genotipos de polimorfismos +4845 del gene de IL-1 α y +3954 de IL-1 β y fumadores que presentan mayor sangrado al sondeo [8].

Es por esto que algunos marcadores bioquímicos para evaluar la severidad de la EP se centran en la expresión de citocinas inflamatorias como PGE2, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β en el líquido crevicular, como parte de la respuesta local del huésped a la inflamación [9, 10].

La respuesta inflamatoria crónica puede generar un colapso de los mecanismos responsables de la tolerancia inmunológica e inducir una respuesta inmunitaria contra componentes propios [11]. Brandtzaeg and Kraus (1965) postularon la participación del fenómeno autoinmune en la patogénesis de la EP [12]. En pacientes con EP se han detectado anticuerpos de clase IgG que reconocen colágena de tipo I y II autóloga, DNA y componentes citoplasmáticos [13]. La autoinmunidad y el fenómeno autoinmune se produce por alguno de los siguientes mecanismos: Presentación amplificada de auto-antígenos, alteraciones en la función celular de los linfocitos Th y Ts, alteraciones en la expansión policlonal de células B, activación policlonal, mimetismo molecular y predisposición genética entre otras [13, 14]. En pacientes con enfermedad periodontal se han detectado anticuerpos de clase IgG que reconocen colágena de tipo I y III autóloga, DNA y componentes citoplasmáticos [13]. Específicamente la IgG reconoce colágena de tipo I y se encuentra en mayor proporción que la IgM, lo que sugiere un cambio de clase inducida por la estimulación antigénica. Algunos de los anticuerpos juegan un papel fisiológico en la eliminación de células muertas y de daño al tejido que ha aparecido durante la degradación del mismo [15]. Por otra parte el estímulo crónico producido por la biopelícula dental o por la liberación de componentes propios del tejido puede inducir algunas alteraciones en la respuesta inmune local o expresarse en forma generalizada [14, 16] ya que la interacción de los microorganismos con los tejidos propios del periodonto actúan como un factor estimulador para la respuesta inmune, produciendo anticuerpos hacia los microorganismos y en estados crónicos contra los componentes de los tejidos periodontales degenerados [16].

En las enfermedades autoinmunes la asociación de alelos del complejo principal de histocompatibilidad (HLA) es de gran relevancia, tal es el caso de artritis reumatoide con el HLA-DRw4, lupus eritematoso sistémico con HLA-DR3 y HLA-B8, en EP con antígenos de HLA de clase I [17-19].

Por otra parte el estímulo crónico derivado de la infección persistente, actúa como un factor estresantes de las células induciendo la síntesis de proteínas Choque Térmico (HSPs), muchas de ellas son altamente conservadas y con homologías a las expresadas en eucariotas, por lo que su liberación de los tejidos necróticos, pueden provocar una respuesta patológica debido al mimetismo antigénico [20-22].

En suero y líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide (AR), se ha encontrado ADN de bacterias periodontales y en el casos de Porphyromonas gingivalis, posee una enzima peptidylarginina desaminasa, que es el equivalente humano a la relacionada con la producción de péptidos citrulinados implicados en la formación de complejos inmunes observados en la inflamación y la destrucción articular [13-15, 23]. Algunas formas agresivas de periodontitis son importantes por su rápida progresión, y la aparición en adolescentes y personas jóvenes. En estos pacientes la presencia de anticuerpos contra componentes propios de la matriz extracelular puede estar asociados al mecanismo destructivo del tejido periodontal por lo que su presencia podría ser un factor coadyuvante en la destrucción tisular [24].

A pesar de los avances en el entendimiento de la respuesta inmunitaria en EP, aún no se conoce a detalle la participación del fenómeno autoinmune en la patogenia de esta enfermedad, por lo que en este trabajo se evaluó la presencia de anticuerpos en suero de pacientes con EP contra componentes del tejido periodontal de conejos.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

Individuos de Estudio: Se evaluaron clínicamente 356 individuos que asistieron a consulta al servicio de estomatología del Centro de Salud “Dr. Francisco Esparza Sánchez” de Guadalupe Zacatecas, México; se les informó sobre los objetivos del estudio aprobado por el comité de bioética del Área de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Zacatecas folio BIOÉTICA-ACS/UAZ AVAL Proy. No. 003 A/2015. A los participantes se les solicitó la firma de consentimiento informado y se recolectaron los datos demográficos y de relevancia clínica.

Sueros: Se obtuvieron 5 ml de sangre periférica por punción venosa de 18 pacientes con Enfermedad Periodontal Crónica, para separar el suero por centrifugación. Los pacientes fueron diagnosticados de acuerdo con los criterios del International Workshop 1999 de la American Association of Periodontology (AAP). Como criterios de inclusión se estableció que fueran mayores de 16 años, con periodontitis crónica y/o agresiva, con extracción indicada de uno o más dientes por enfermedad periodontal y sin enfermedades crónicas transmisibles y no transmisibles o procesos relacionados con enfermedades inflamatorias como Artritis reumatoide, Síndrome de Sjögren, Diabetes, Lupus eritematoso entre otras. Como control se utilizó el suero de personas sin manifestaciones clínicas y sintomatología de alguna enfermedad crónica trasmisible o no trasmisible o alguna relacionada con procesos inflamatorios.

Extracto Protéico: se seleccionaron tres conejos Nueva Zelanda de tres meses de edad, sin lesiones o procesos inflamatorios en la cavidad oral y sin signos clínicos de procesos infecciosos locales o generalizados. El tejido periodontal se obtuvo mediante disección, se lavó con PBS 1X (NaCl, 145 mM en buffer de fosfatos, 150 mM, pH 7.2 Sigma-Aldrich, Inc.) en varias ocasiones para eliminar los restos de sangre, detritus y cualquier contaminación por placa o restos de alimentos, posteriormente se resuspendió en 2ml de Buffer de lisis (PBS 1X, SDS 10% Sigma-Aldrich, Inc.) y PMSF 0.1 mM (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), se homogenizo en ciclos de 30 seg en cama de hielo, posteriormente se agregaron 100 µl de SDS al 10% (Bio-Rad Laboratories, Inc.), se continuo con la homogenización del tejido. La cantidad de proteína total se determinó por el método de Bradford y se llevó a una concentración final de 2.3 µg/µl [25].

Electroforesis en Geles de Poliacrilamida al 10% y Dodecil Sulfato: se realizó el corrimiento electroforético utilizando 30 µgr de proteína y 20µl de MPM (Invitrogene™ Thermo Fisher Scientific, Inc.), durante 20 min a 30 mAmp y 70 min a 15 mAmp. Se tiño con azul de comassie (Bio-Rad, Laboratories, Inc.) para documentar el patrón de bandas generado [26].

Electrotransferencia: Las proteínas fueron transferidos a membrana de nitrocelulosa (Amersham Hybond™ LFP) a 30 V durante 11 hrs, y posteriormente fueron teñidos con rojo de Ponceu (Sigma Aldrich Inc.) para verificar la transferencia. Las membranas fueron bloqueadas con solución de PBS 1X-Leche descremada 5% (Svelty™) por 12 h a temperatura ambiente, se lavó tres veces con PBS 1X-Polisorbato 80 (Tween® Bio-Rad, Laboratories, Inc.). Se incubó durante 12 h con el suero de los pacientes con EP a una dilución 1:20 en buffer de bloqueo, se realizaron tres lavados con PBS 1X-Polisorbato 80 y se incubo por separado con anticuerpos secundarios anti-IgG, anti-IgM y anti-IgA (Sigma Aldrich, Inc.) 1:3000, 1:5000 y 1:2000 respectivamente, la reacción se reveló utilizando diaminobencidina (Sigma Aldrich, Inc.) y H₂O₂ [26].

III. RESULTADOS

La distribución de la población de estudio fue la siguiente: 223 del sexo femenino y 123 de sexo masculino. De acuerdo con el diagnóstico de salud bucodental, 159 presentaron caries, 61 pulpitis irreversible, 32 pulpitis reversible, 21 absceso periapical, 15 alveolitis y 68 enfermedad periodontal (EP).

De los pacientes con EP crónica que aceptaron la evaluación clínica, sólo 18 cumplieron con los criterios de inclusión y aceptaron la toma de una muestra de sangre periférica para la obtención de anticuerpos del suero, como controles se utilizó el suero de personas sanas. En la Tabla I se observa el género y la edad de los sujetos de estudio. Participaron la misma cantidad de individuos en relación a género: 9 del sexo femenino y 9 masculinos. De acuerdo a la edad el porcentaje más alto fue de sujetos de 30 a 48 años en un 55%.

Tabla I. Género y edad de los sujetos de estudio.

Variables		Frecuencia	Porcentaje
Género	Femenino	9	50%
	Masculino	9	50%
Edad	X ± D.E. (Rango)		
	30 – 48	38 ± 5 (30 – 48)	55%
	49 - 70	63 ± 5 (56 – 70)	45%

Todos los pacientes incluidos presentaban profundidad de bolsa mayor a 4 mm, sangrado al sondaje y severidad localizada o generalizada. Las principales características clínicas o indicadores de la presencia de enfermedad periodontal se resumen en la Tabla II.

Tabla II. Características clínicas de los pacientes de acuerdo a el diagnóstico de enfermedad periodontal.

Índice	No. Pacientes
Índice Periodontal = 1	14
Índice Periodontal = 2	4
Índice Gingival = 1	11
Índice Gingival = 2	4
Profundidad de Bolsa = 5 mm	8
Profundidad de Bolsa = 6 mm	6
Nivel de Inserción = 3	8
Nivel de Inserción = 4	6
Nivel de Inserción = 5	4
EP Generalizada	11
EP Localizada	7

En la Tabla III se enlistan algunas proteínas periodontales reconocidas por anticuerpos de clase IgG de los sueros de los pacientes con EP. El 55% de los sueros reconocieron una banda de \approx 100 kDa, que posiblemente corresponde a periostina, dado su peso molecular; el 33% reconocen un péptido de 15 kDa no identificado en el estudio, 16% reconocen péptidos de 70 kDa y 40 kDa que corresponden posiblemente a gelatinasas y osteonectina, respectivamente.

Tabla III. Distribución de anticuerpos de clase IgG. Pesos Moleculares* [27].

No. De Pacientes	PM en kDa	* Péptido
10	100	Periostina
3	70	Gelatinasa
3	55	Colagenasa 1 y 8
3	40	Osteonectina
6	15	No identificada
3	-	No reconocen

En la Figura 1, se puede observar el patrón de reconocimiento por Western Blot de las IgGs contra proteínas del periodonto. Cabe señalar que los anticuerpos de algunos de los pacientes reconocen más de un péptido.

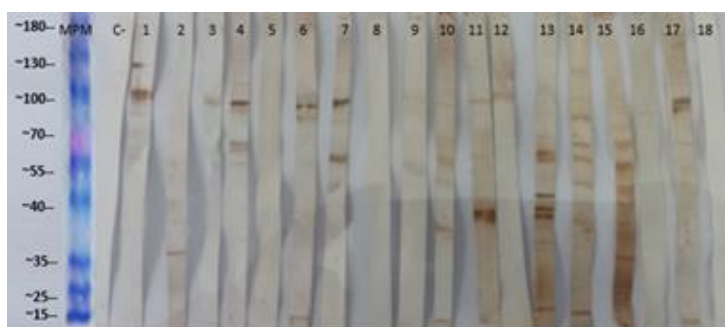


Fig. 1. Western Blot de péptidos reconocidos por anticuerpos de clase IgG en el suero de pacientes con EP crónica.

En el caso de los anticuerpos de clase IgM, dos de los sueros reconocieron un péptido antigénico de 100 kDa, el resto no presentaron anticuerpos de esta clase. (Tabla IV y Figura 2).

Tabla IV. Distribución de anticuerpos de clase IgM por Western Blot. Pesos Moleculares* [27].

No. De Pacientes	PM en kDa	* Péptido
2	70	Gelatinasa
1	55	Colagenasa 1 y 8
15	-	No reconocen

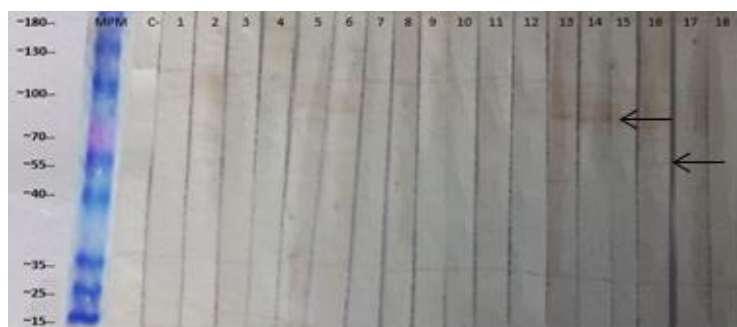


Fig. 2. Western Blot de péptidos reconocidos por anticuerpos de clase IgM en el suero de pacientes con EP crónica.

Las IgA (Tabla V y Figura 3) séricas de estos pacientes reconocieron péptidos principalmente de 40 kDa (osteonectina), 70 kDa (gelatinasa) y 55 kDa (colagenasa 1 y 8).

Tabla V. Distribución de anticuerpos de clase IgA por Western Blot. Pesos Moleculares*[27].

No. de Pacientes	PM en kDa	*Péptido
2	70	Gelatinasa
1	55	Colagenasa 1 y 8
15	-	No reconocen

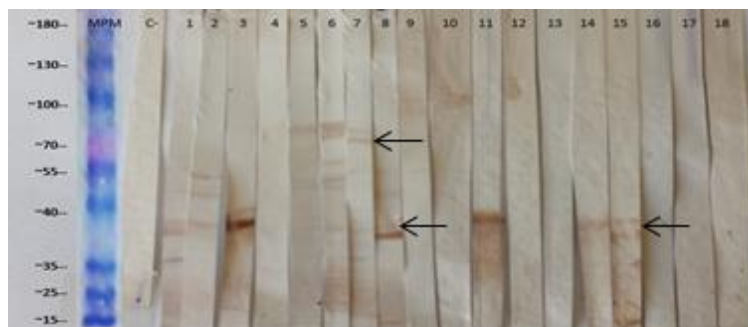


Fig. 3. Western Blot de péptidos reconocidos por anticuerpos de clase IgA en el suero de pacientes con EP crónica.

En la Tabla VI se resumen los datos que corresponden a la presencia de anticuerpos de cada clase contra tejido periodontal en valores absolutos y porcentajes. Trece pacientes presentaron anticuerpos de clase IgG, 10 de clase IgA y 2 de clase IgM.

Tabla VI. Detección de anticuerpos de clase IgG, IgM e IgA presentes en suero de pacientes con enfermedad periodontal.

Técnica	Inmunoglobulina	Negativo (%)	Positivo (%)
Western Blot	IgG	5 (27)	13 (72)
	IgM	16 (88)	2 (11)
	IgA	8 (44)	10 (55)

IV. DISCUSIÓN

La detección de anticuerpos que reconocen estructuras propias por sí misma no representa la presencia de una enfermedad autoinmune, ya que de acuerdo con los criterios establecidos por Milgron y Witebsky [28] y posteriormente por Noel Rose y Constantine Bonna, se requieren de tres elementos substanciales: la evidencia directa, es decir la transmisibilidad de las lesiones de humano a humano o de humano a animal, mediante la transferencia de los autoanticuerpos o Linfocitos T, la evidencia indirecta o la reproducción de la enfermedad en un modelo animal, y la evidencia circunstancial que tiene que ver con el historial familiar con la misma enfermedad o evidencia de la existencia de otros pacientes, además de otras características como: la presencia de infiltrado mononuclear que afecte el órgano o tejido, existencia de alelos de MHC de clase II relacionados, altas concentraciones de auto-anticuerpos de clase IgG y de depósitos de complejos inmunes, Ag-Ab que afecte el órgano o tejido y mejoría de los signos y síntomas de la enfermedad mediante el uso de supresores de la respuesta inmunitaria [29].

Nuestro trabajo se enfocó a determinar la presencia de anticuerpos en los pacientes con enfermedad periodontal, que reconocen estructuras propias. Se evaluaron 18 pacientes con enfermedad periodontal crónica. Se observaron anticuerpos con inmunorreactividad contra estructuras del tejido periodontal, principalmente de clase IgG, a diferencia del suero de los controles. Koutouzis T. y cols. (2009) demostraron, por inmunofluorescencia, la presencia de anticuerpos inmunorreactivos en pacientes con periodontitis agresiva localizada y periodontitis crónica, así como la presencia de células B autorreactivas [30]; esto es consistente con nuestros hallazgos ya que de acuerdo con nuestros resultados los componentes reconocidos por los anticuerpos autorreactivos son de pesos moleculares de 40 a 100 kDa, que coinciden con los de la periostina, gelatinasas, colagenasas 1 y 8 y osteonectina. Además se encontraron anticuerpos de clase IgM e IgA inmunorreactivos contra péptidos de 55 y 70 kDa.

Es importante resaltar que uno de los mecanismos fisiopatológicos sugeridos en EP se refiere a las alteraciones a nivel del tejido endotelial; en modelo murino se ha demostrado una relación entre la presencia de *P. gingivalis* y disfunción endotelial, con un incremento en el número de lesiones ateroscleróticas y la secreción de endotelina, que induce la proliferación, contracción y migración celular, e incluso un incremento en la respuesta vasoconstrictora utilizando antagonistas de los adrenorreceptores- α [31]. En nuestro estudio, la presencia de diferentes clases de inmunoglobulinas contra componentes propios del tejido periodontal puede estar relacionada con la respuesta inflamatoria y fenómenos de reacción cruzada, como consecuencia del estímulo permanente de los microorganismos periodontopáticos y la activación de la disfunción endotelial.

Finalmente, es necesario considerar que en la EP, los anticuerpos generados como producto del estímulo de los microorganismos pueden inducir un efecto protector, destructivo o irrelevante en la patogénesis, y que la presencia de anticuerpos autorreactivos no necesariamente determina la existencia de autoinmunidad, ya que la clase y subclase son importantes, o pueden ser anticuerpos preexistentes. De la misma forma, la presencia de anticuerpos anti citoplasma de neutrófilos en EP puede ser consecuencia de un efecto sinérgico entre el estímulo de los patógenos periodontales y la susceptibilidad genética [32, 33], por lo que es necesario continuar con este tipo de estudios.

V. CONCLUSIONES

Se demostró la presencia de anticuerpos autorreactivos, principalmente de clase IgG, en sueros de pacientes con EP. Este tipo de resultados pudiera ayudar a comprender la fisiopatología de la enfermedad y orientar la implementación de estrategias terapéuticas combinadas: inmunoterapia, quirúrgica, farmacológica, además de permitir un mejor pronóstico y control en el manejo del paciente crónico que desarrolló como un evento secundario la enfermedad periodontal.

REFERENCIAS

- [1] M. G. Newman, H. Takei, P. R. Klokkevold, and F. A. Carranza, *Carranza's Clinical Periodontology*: Elsevier Health Sciences, 2011.
- [2] N. O. Harris and F. García-Godoy, *Odontología preventiva primaria: El Manual Moderno*, 2005.
- [3] J. Castellanos, Díaz, L. , "Periodontitis crónica y enfermedad sistémica," *Revista ADM*, vol. 50:4, pp. 121-127, 2002.
- [4] W. H. Organization. (2012). *Oral Health*. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/en/>
- [5] C. W. Douglass and C. H. Fox, "Cross-sectional studies in periodontal disease: current status and implications for dental practice," *Adv Dent Res*, vol. 7, pp. 25-31, Jul 1993.
- [6] V. Baelum, O. Fejerskov, and T. Karring, "Oral hygiene, gingivitis and periodontal breakdown in adult Tanzanians," *J Periodontal Res*, vol. 21, pp. 221-32, May 1986.
- [7] V. Baelum, O. Fejerskov, and F. Manji, "Periodontal diseases in adult Kenyans," *J Clin Periodontol*, vol. 15, pp. 445-52, Aug 1988.

- [8] N. P. Lang, M. S. Tonetti, J. Suter, J. Sorrell, G. W. Duff, and K. S. Kornman, "Effect of interleukin-1 gene polymorphisms on gingival inflammation assessed by bleeding on probing in a periodontal maintenance population," *J Periodontal Res*, vol. 35, pp. 102-7, Apr 2000.
- [9] S. C. Offenbacher, John G.; Yalda, Behnaz; Haradon, Geoffrey, Amada, S. , Lehner, T. , Mcghee, J. , Mergenhausen, "Role of prostaglandins in high-risk periodontitis patients.," *Molecular Pathogenesis Of Periodontal Disease*, pp. 203-213, 1994.
- [10] R. C. Page, "Host response tests for diagnosing periodontal diseases," *J Periodontol*, vol. 63, pp. 356-66, Apr 1992.
- [11] S. Jiang and R. I. Lechler, "Regulatory T cells in the control of transplantation tolerance and autoimmunity," *Am J Transplant*, vol. 3, pp. 516-24, May 2003.
- [12] P. Brandtzaeg and F. W. Kraus, "Autoimmunity and Periodontal Disease," *Odontol Tidskr*, vol. 73, pp. 281-393, Jun 30 1965.
- [13] O. Anusaksathien and A. E. Dolby, "Autoimmunity in periodontal disease," *J Oral Pathol Med*, vol. 20, pp. 101-7, Mar 1991.
- [14] O. Anusaksathien, G. Singh, N. Matthews, and A. E. Dolby, "Autoimmunity to collagen in adult periodontal disease: immunoglobulin classes in sera and tissue," *J Periodontal Res*, vol. 27, pp. 55-61, Jan 1992.
- [15] M. Sugawara, K. Yamashita, H. Yoshie, and K. Hara, "Detection of, and anti-collagen antibody produced by, CD5-positive B cells in inflamed gingival tissues," *J Periodontal Res*, vol. 27, pp. 489-98, Sep 1992.
- [16] C. L. Hahn, H. A. Schenkein, and J. G. Tew, "Polyclonal B cell activators and in vitro induction of auto-antibody reactive with collagen," *J Periodontal Res*, vol. 32, pp. 608-13, Oct 1997.
- [17] J. A. Encinas and V. K. Kuchroo, "Mapping and identification of autoimmunity genes," *Curr Opin Immunol*, vol. 12, pp. 691-7, Dec 2000.
- [18] J. Klein and A. Sato, "The HLA system. Second of two parts," *N Engl J Med*, vol. 343, pp. 782-6, Sep 14 2000.
- [19] A. M. Denman, "Autoimmunity, Genetic, Immunologic, Virologic and Clinical Aspects," *Immunology*, vol. 38, pp. 204-205, 1979.
- [20] T. Ando, T. Kato, K. Ishihara, H. Ogiuchi, and K. Okuda, "Heat shock proteins in the human periodontal disease process," *Microbiol Immunol*, vol. 39, pp. 321-7, 1995.
- [21] F. Goulhen, D. Grenier, and D. Mayrand, "Oral microbial heat-shock proteins and their potential contributions to infections," *Crit Rev Oral Biol Med*, vol. 14, pp. 399-412, 2003.
- [22] J. Y. Lee, N. N. Yi, U. S. Kim, J. S. Choi, S. J. Kim, and J. I. Choi, "Porphyromonas gingivalis heat shock protein vaccine reduces the alveolar bone loss induced by multiple periodontopathogenic bacteria," *J Periodontal Res*, vol. 41, pp. 10-4, Feb 2006.
- [23] T. Berglundh, B. Liljenberg, A. Tarkowski, and J. Lindhe, "The presence of local and circulating autoreactive B cells in patients with advanced periodontitis," *J Clin Periodontol*, vol. 29, pp. 281-6, Apr 2002.
- [24] Y. Takeuchi, H. Yoshie, and K. Hara, "Expression of interleukin-2 receptor and HLA-DR on lymphocyte subsets of gingival crevicular fluid in patients with periodontitis," *J Periodontal Res*, vol. 26, pp. 502-10, Nov 1991.
- [25] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Anal Biochem*, vol. 72, pp. 248-54, May 7 1976.
- [26] H. Towbin, T. Staehelin, and J. Gordon, "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 76, pp. 4350-4, Sep 1979.
- [27] B. E. García Triana, Vicedo Tomey, Agustín, J. C. García Piñeiro, and A. Saldaña Bernabeu, "Enzimas proteolíticas relacionadas con la enfermedad periodontal inflamatoria," *Revista Cubana de Estomatología*, vol. 35, pp. 62-67, 1998.
- [28] F. Milgrom and E. Witebsky, "Autoantibodies and autoimmune diseases," *JAMA*, vol. 181, pp. 706-16, Aug 25 1962.

- [29] N. R. Rose and C. Bona, "Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited)," *Immunol Today*, vol. 14, pp. 426-30, Sep 1993.
- [30] T. Koutouzis, D. Haber, L. Shaddox, I. Aukhil, and S. M. Wallet, "Autoreactivity of serum immunoglobulin to periodontal tissue components: a pilot study," *J Periodontol*, vol. 80, pp. 625-33, Apr 2009.
- [31] R. B. Pereira, E. C. Vasquez, I. Stefanon, and S. S. Meyrelles, "Oral *P. gingivalis* infection alters the vascular reactivity in healthy and spontaneously atherosclerotic mice," *Lipids Health Dis*, vol. 10, p. 80, 2011.
- [32] C. Satoh, R. E. Ferrell, R. J. Tanis, N. Ueda, S. Kishimoto, J. V. Neel, *et al.*, "The frequency in Japanese of genetic variants of 22 proteins. III. Phosphoglucomutase-1, phosphoglucomutase-2, 6-phosphogluconate dehydrogenase, adenylate kinase, and adenosine deaminase," *Ann Hum Genet*, vol. 41, pp. 169-83, Oct 1977.
- [33] N. V. Rohini, A. R. Pradeep, and M. Faizuddin, "Antineutrophil cytoplasmic antibodies and adult periodontitis," *J Periodontal Res*, vol. 35, pp. 374-6, Dec 2000.