Downloaded from UvA-DARE, the institutional repository of the University of Amsterdam (UvA)
http://dare.uva.nl/document/161801

File ID	161801
Filename	Resumen

SOURCE (OR PART OF THE FOLLOWING SOURCE):

Type	Dissertation
Title	Periodontitis in twins : smoking, microbiological and immunological aspects
Author	G.L. Torres de Heens
Faculty	Faculty of Dentistry
Year	2010
Pages	146
ISBN	978-90-9025050-2

FULL BIBLIOGRAPHIC DETAILS:
http://dare.uva.nl/record/328470

Copyright

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other then for strictly personal, individual use.

UvA-DARE is a service provided by the library of the University of Amsterdam (http://dare.uva.nl)

Resumen y Discusión

Periodontitis es una enfermedad compleja, multifactorial y de caracter crónico, la cual afecta a los tejidos de soporte de los dientes y que a su vez se caracteriza por la inflamación y la destrucción del tejido conectivo y hueso alveolar (Pihlstrom et al. 2005). La manifestación de la enfermedad conlleva interacciones intrincadas entre la placa bacteriana y la respuesta inflamatoria por parte del sistema immune del huésped (Preshaw 2008). Ciertos individuos muestran mayor susceptibilidad a la enfermedad que otros (Loos et al. 2008), lo cual aparentemente es determinado por la respuesta inmunoinflamatoria que se genera en los tejidos periodontales como respuesta a la exposición crónica a la placa bacteriana (Preshaw 2008). La respuesta inmunoinflamatoria por combatir la placa bacteriana puede, por ende, ser considerada de "doble filo". Esto quiere decir que aunque la respuesta es protectiva por naturaleza y que provee de anticuerpos y neutrófilos polimorfos, que son responsables para el control de la infeccion bacteriana, en aquellos sujetos de alta susceptibilidad, resulta en una producción local de cantidades excesivas de enzimas destructoras y de substancias mediadoras de la inflamación que conducen a la destrucción periodontal que se aprecia clínicamente (Preshaw 2008). Resulta paradójico el hecho de que la respuesta inflamatoria frente al ataque bacteriano es también responsable de la destrucción de los tejidos periodontales blandos y duros. Aún cuando el asalto bacteriano inicia la inflamación en los tejidos, los factores genéticos y el estilo de vida, tal y como el uso del cigarrillo, pueden modular la respuesta inflamatoria y así determinar la progresión y el grado de severidad de la enfermedad, lo cual se traduce clínicamente como pérdida de hueso alveolar e inserción (Kornman 2008, Loos et al. 2008, Page et al. 1997, Palmer et al. 2005, Pihlstrom et al. 2005, Preshaw 2008).

La presente tesis fue diseñada inicialmente para examinar en qué medida la variación genética determina la variación del fenotipo de la periodontitis crónica moderada a severa. Una mejor comprensión de enfermedades de etiología compleja como es el caso de la periodontitis, amerita la evaluación de la interacción entre los factores genéticos y de estilo de vida, conjuntamente con las influencias bacteriana. Estudios en gemelos han representado una herramienta valiosa que aporta información acerca de la base genética de rasgos multifactoriales. Hasta el presente, resultados de estudios en

gemelos relacionados a la periodontitis crónica muestran resultados convergentes, los cuales sugieren el importante rol de la genética en esta enfermedad (Corey et al. 1993, Michalowicz 1994, Michalowicz et al. 1991a, Michalowicz et al. 1991b, Michalowicz et al. 2000, Michalowicz et al. 1999, Mucci et al. 2005). Sin embargo, los mismos tienen algunas limitaciones debido a que sus resultados estan fundamentados en observaciones obtenidas a través de cuestionarios mas no provenientes de mediciones clínicas (Corey et al. 1993, Mucci et al. 2005), y además, las poblaciones estudiadas presentan escasa destrucción periodontal (Michalowicz et al 1991a, Michalowicz et al. 1991b, Michalowicz et al. 2000). Hasta el presente, las investigaciones en gemelos han seleccionado los sujetos tomando como criterio el hecho de ser gemelos y no por la presencia de periodontitis moderada a severa. Por ende, sigue siendo cuestionado hasta qué medida los factores genéticos contribuyen al desarrollo de la periodontitis crónica moderada a severa. Como preludio a investigar este tema, y motivado por el hecho de que la interacción entre la configuración genética y el cigarrillo sería de gran importancia, nos decantamos a explorar como punto de partida el efecto del fumar cigarrillo sobre el sistema inmune, tanto innato como adquirido, de sujetos afectados con periodontitis. Este enfoque nos ayudaría potencialmente a explicar la variación fenotípica dentro de los gemelos idénticos.

Estudios han demostrado que en promedio un 50% de los pacientes que sufren de periodontitis son fumadores o ex-fumadores (Bergstrom 1989, Tonetti 1998, van der Weijden et al. 2001, Xu et al. 2002). Esta proporción es alta al ser comparada con el promedio de la población holandesa para dicho parámetro siendo aproximadamente un 27% de fumadores (Prevención del Tabaco Stivoro 2008). La mayoría de los periodoncistas consideraría a los fumadores como el grupo de pacientes de mayor demanda en cuanto al tratamiento (Johnson & Hill 2004, Kinane & Chestnutt 2000, Palmer et al. 2005, Tonetti 1998). Además, el fumar cigarrillo tiene grandes efectos en la respuesta immune del huésped (Graswinckel et al. 2004, Kinane & Chesnutt 2000, Loos et al. 2004, Palmer et al. 2005).

Los linfocitos T son muy importantes en la regulación inmunitaria dentro de la patogénesis de las enfermedades periodontales (Gemmell et al. 2007, Kinane & Lappin 2001, Seymour et al. 1996). Existe evidencia tanto histológica como proveniente del

análisis de las citokinas producidas por el tejido periodontal inflamatorio, que considera a la periodontitis como una enfermedad de tipo Th2 (T-helper-2, es decir, caracterizada por la proliferación de linfocitos T de ayuda del tipo 2) (Gemmell et al 2007). Sin embargo, aún no se ha investigado si este perfil Th2 en la enfermedad estaría potenciado por el cigarrillo, aspecto de interés debido al alto número de fumadores dentro de los pacientes. Esta presunción dió origen a nuestro primer estudio. En el *Capítulo 2*, hemos investigado la probable caracterización del tipo de linfocitos Th y por ende la respuesta establecida (Th1/Th2) a predecir a través de las citokinas generadas por los monocitos en experimentos *ex vivo*, en cultivos celulares en sangre completa (CCSC) de pacientes quienes han padecido periodontitis crónica, fumadores versus no-fumadores. Para tal fin se extrajo sangre venosa de 29 pacientes (18 no-fumadores y 11 fumadores), quienes para ese momento recibían tratamiento periodontal de mantenimiento, y se diluyó a razón de diez. Dichos cultivos fueron estimulados durante 18 horas con lipooligosacárido proveniente de *Neisseria meningitidis* (LOS) y extracto sonificado *de Porphyromonas gingivalis* (Pg-SE). La producción de las citokinas que diferencian los linfocitos T inmaduros bien sea en Th1 o Th2 fue medida. Es conocido que la interleukina (IL)-12p40 dirige la diferenciación de linfocitos inmaduros hacia el tipo 1, mientras que la IL-10 al tipo 2. En nuestros experimentos, se extendió la evaluación de las citokinas inflamatorias hacia la determinación de la IL-1β, IL-6 y la IL-8, cuya producción se midió en los supernatantes provenientes de los cultivos en estimulación. Estudios previos han dejado claro que los monocitos/macrófagos representan una fuente de las citadas citokinas (van der Pouw Kraan et al. 1997, van der Pouw Kraan et al. 1995). Nuestros resultados muestran que los pacientes afectados con periodontitis y fumadores tienen una proporción IL-12p40/IL-10, posterior a la estimulacion con LOS y Pg-SE, inferior a la que presentan sus contrarios no-fumadores, sugiriendo así una respuesta inmunne de tipo 2 más acentuada en los pacientes fumadores.

Aunque nuestros resultados ofrecen evidencia de que los pacientes fumadores con periodontitis tienen una respuesta Th2 más pronunciada (a saber por las citokinas generadas por los monocitos) nos vimos intrigados a confirmar este hallazgo en las citokinas producidas por los propios linfocitos en cuestión. En el *Capítulo 3*, hemos investigado la producción de citokinas por parte de los linfocitos, característica para las

respuestas de tipo 1 o 2, Th1 o Th2, en un grupo de pacientes con afección periodontal y otros periodontalmente sanos, ambos a su vez fumadores y no-fumadores. En los CCSC fueron estimulados específicamente los linfocitos T y la producción de interferón-gamma (IFN-γ) y IL-13 (típicas citokinas para evaluar la respuesta Th1 y Th2, respectivamente) fueron medidad en los supernatantes. Nuestros resultados muestran un mayor número de linfocitos en los fumadores, y altos niveles de IFN-γ y IL-13, independiente del hecho de que el sujeto padezca o no de periodontitis. Sin embargo, en un posterior análisis de multivariabilidad se ha encontrado que la alta producción de IFN-γ no era explicanle de forma significativa por el hecho de ser fumador, mientras que las altas cantidades de IL-13 sí fueron fuertemente explicables por esta variable. La secreción de IFN-γ y de IL-13 fueron independientes la una de la otra, lo cual demuestra que se trata de dos subpoblaciones celulares completamente independientes. Por lo tanto, sugerimos que este aumento en la actividad de las celular Th, y más específicamente en las células Th2 en los fumadores, constituye un riesgo para los pacientes fumadores, lo cual puede conducir una situación periodontal inestable y de progesion en la destrucción. Este estudio nos ha permitido confirmar nuestro previo hallazgo acerca del perfil de citokina generado por los monocitos en los pacientes fumadores. Este perfil Th2 medido en la respuesta monocítica de los pacientes fumadores es consistente con la respuesta generada por los linfocitos de este grupo de pacientes.

Nuestros resultados dejan testimonio de las diferencias entre pacientes afectados periodontalmente fumadores y no-fumadores con respecto a la producción de inmuno mediadores en los cultivos sanguíneos de estimulación. Las citokinas IL-12 e IL-10 desempeñan un papel central en la inmunidad innata con importantes efectos en la subsecuente inmunidad adquirida (Seymour & Gemmell 2001). Altos niveles de IL-12 contribuirían a una respuesta tipo 1 Th1, ya que ésta es inducida por la producción de IFN-γ (Tsai et al. 2005). Al contrario, IL-10 reduce la secreción de IFN-γ y tiene un rol potencial en la disminución de las respuestas mediadas por IFN-γ y por consiguiente en las respuestas Th1 (Lappin et al. 2001). Además, IL-1 está involucrada en el aumento en la producción de IFN-γ por parte de las celulas Th1 y a su vez de la disminución en la producción de IL-4 por parte de las celulas Th2 (Sandborg et al. 1995 Schmitz et al. 1993), lo cual que puede ser inhibido por el efecto del cigarrillo (Pabst et al. 1995). En

conjunto, la reducción en la proporción IL-12p40/IL-10 y la disminución en la producción de IL-1β observada en nuestro grupo de fumadores fue indicativo de una respuesta Th2 más pronunciada (*Capítulo 2*), lo cual fue confirmado posteriormente por un alto nivel de IL-13 producido por las celulas Th2 en los sujetos fumadores (*Capítulo 3*).

Es bien conocido que existe un cambio de una población celular predominantemente formada por linfocitos T a una de linfocitos B en la progresión de las lesiones de gingivitis a periodontitis. Resulta interesante especular que un cambio de una respuesta mediada por el infiltrado celular (Th1) hacia una respuesta humoral (Th2) ocurre durante el desarrollo de la enfermedad periodontal (Kinane & Lappin 2001). Parece evidente que en la gingivitis las células T probablemente exceden a las células B, mientras que en el sucesiva inflamación del tejido, conduciendo a la periodontitis, las celulas B sin duda son las predominantes (Kinane & Lappin 2001). El predominio de células B/células plasma en las lesiones periodontales avanzadas/progresivas sería indicativo del importante rol que las células Th2 desempeñan en estas lesiones. Las células Th1 y Th2 inducen la proliferación de las células B, pero las células Th2 son generalmente más eficientes que las Th1 en esta capacidad (Rothermel et al.1991). Además, las células B tienen la particularidad de contribuir a la ampliación y mantenimiento de la polarización establecida (Harris et al. 2000). Por consiguiente, es plausible que una respuesta Th2 más pronunciada en los individuos fumadores pudiera incrementar la proliferación de las celulas B, induciendo a su vez una más marcada respuesta humoral, que reforzaría la respuesta Th2 existente, por lo cual se aumentaría el riesgo de recurrencia de la destrucción periodontal en el paciente fumador.

Las células B tienen la capacidad de producir cytokinas con múltiples funciones, tal es el caso de IL-6 y el factor tumor necrosis alfa, las cuales regulan diversos aspectos en la absorción y aposición ósea en los procesos inflamatorios (Harris et al. 2000). Estas citokinas inducen absorción ósea directa e indirectamente al afectar la producción de factores de diferenciación osteoclástica (Boyce et al. 2005, Gemmell et al. 1997). Por consiguiente, se puede sugerir que estas citokinas de reabsorción ósea producidas por las células B activadas, pueden contribuir a la destrucción periodontal observada en los

pacientes fumadores. Además, la pronunciada estimulación de células B y su activación podría contribuir a la patogénesis de la enfermedad periodontal (Rajapakse & Dolby 2004). Un estudio reciente sugirió que el involucramiento de los anticuerpos en el serum serían capaces de dirigir componentes del matrix extracelular durante la patogénesis de la periodontitis crónica (De-Gennaro et al. 2006). Además, la producción local de anticuerpos hacia autoantígenos en los tejidos granulomatosos embebidos dentro de las lesiones periodontales han sido anteriormente descritos (Rajapakse & Dolby 2004). Por ello, los mecanismos autoinmunes provocados por un aumento en la activación de las células B pudiera contribuir a la destrucción periodontal en los sujetos fumadores. Los estudios anteriores acerca de la influencia del cigarrillo sobre la respuesta inmune en periodontitis proveen un importante marco de referencia para subsiguientes estudios que pretendan aclarar asuntos relacionados a la severidad de la destrucción periodontal observada en los pacientes. El propósito de estos sendos estudios fue el de aportar un marco de referencia válido que aplicar, en este específico aspecto, en el análisis de la población de gemelos.

Con la finalidad de determinar la contribución relativa de los genes, el medio-ambiente y factores en el estilo de vida (tal como el fumar cigarrillo) en la etiología de la periodontitis crónica moderada, se utilizó el método de estudios en gemelos. En el *Capítulo 4*, gemelos monozigotos (MZ) y dizigotos (DZ) criados juntos fueron seleccionados para evaluar la contribución de los genes, los patógenos periodontales y los factores de estilo de vida, con el fenotipo clínico. De recalcar en este proceso es el hecho de que los pares de gemelos fueron seleccionados en base de que al menos uno de cada par presentara pérdida de inserción periodontal interproximal de ≥5 mm en 2≥ dientes no adjacentes, este sujeto de cada par se denominó gemelo control, y su hermano/a sería el co-gemelo/a. El estudio incluyó 10 MZ y 8 DZ pares de gemelos, en los cuales fue evaluado la condición periodontal, presencia de patógenos, nivel de formación profesional, hábitos del uso de cigarrillo y el indice índice de masa corporal (IMC). El resultado más importante de este estudio es la discordancia encontrada en los gemelos MZ en relación al promedio de pérdida de inserción periodontal, número de dientes con pérdida de inserción ≥5 mm y el porcentaje de dientes con ≥30% de hueso alveolar. Los gemelos control del grupo de MZ padecían de periodontitis crónica moderada a severa,

mientras que sus co-gemelos (quienes no fueron seleccionados en función de la enfermedad periodontal) presentaron un grado de la enfermedad muy inferior. Este resultado fue sorpresivo al considerar previas investigaciones de similar naturaleza en las cuales se había encontrado un 50% de contribución genética al fenotipo de la enfermedad periodontal (Michalowicz et al. 2000), razón por la cual una discrepancia menor dentro de los MZ era esperada. Esta discrepancia no pudo ser explicada por factores como presencia de bacteria periodontopatogénica, uso del cigarrillo o el IMC. Sin embargo, es preciso puntualizar que la cantidad de participantes fue limitada, lo cual pudo haber imposibilitado el cálculo de diferencias estadísticas que sí estarían presentes al incrementar el número de participantes (por ejemplo en el caso de la presencia subgingival de *P. gingivalis*). En el grupo de MZ, 5 de los 10 sujetos control resultaron positivos para *P. gingivalis*, en contraposición a 2 de sus co-gemelos. Es muy factible que una muestra con más participantes pudiera haber arrojado resultados estadísticamente significativos a este respecto. La variable uso de cigarrrillo no puede ser explicativa de alguna diferencia observada en el grupo (en cuanto a afección periodontal) ya que ambos control y sus co-gemelos de los MZ fumaban aproximadamente la misma cantidad de cigarrillos diarios. Este aspecto en los DZ sí difería, explicando así un 45.6% de la diferencia de la destrucción periodontal en los DZ. En cuanto a la discrepancia en la enfermedad periodontal, esta fue mayor entre los DZ que en los MZ, lo cual es consistente con previos reportes en grupos de similitud y muestras de mayor escala.

La respuesta inmune ha sido considerada como muy relevante dentro de la etiopatogenesis de la enfermedad periodontal, razón por la cual el análisis de este aspecto constituiría un enfoque interesante para explicar la discrepancia encontrada en el grupo de gemelos idénticos (MZ). En el *Capítulo 5*, se investigó el nivel de similitud en la expresión de determinadas citokinas entre gemelos controles y sus co-gemelos para ambos grupos (MZ y DZ). Cuando se realizó el análisis de estos mediadores de la inflamación en los gemelos controles tanto de los MZ como de los DZ juntos se observó un alto número de la cantidad total de leucocitos y de producción en la citokina IL-12p40 en comparación con el de los co-gemelos juntos. Los altos números en leucocitos coinciden con previos hallazgos, que relacionan estos incrementos con un aumento de la severidad de la enfermedad (Loos 2005). Es bien sabido que bajos niveles de IL-12p40

favorece a la respuesta immune de tipo 2 (Th2), lo que a su vez suprime el desarrollo de la respuesta de tipo 1 (Th1). Nuestros resultados han mostrado un aumento de la pérdida de inserción periodontal, concomitante con baja producción de IL-12p40 en los gemelos control, al ser comparados con sus co-gemelos, lo cual deja en evidencia la respuesta Th2 característica en la periodontitis. Asímismo, los gemelos controles MZ segregaron mayores cantidades de IL-6 que sus co-gemelos, lo cual es congruente con observaciones previas que han relacionado altos niveles de esta citokina con aumento en la severidad de la enfermedad (Loos et al. 2000). IL-6 es una citokina multifuncional, con actividades biológicas tales como diferenciación de los linfocitos B, proliferación de los linfocitos T y estimulación de la secreción de inmunoglobulinas por parte de estos linfocitos (Hirano et al. 1990). De especial importancia es la habilidad de IL-6 de inducir reabsorción ósea, tanto por sí misma como cuando se conjuga con otros agentes de reabsorción ósea (Ishimi et al. 1990). Por consiguiente, se llegó a la conclusión de que la alta producción de IL-6 encontrada en el grupo de gemelos control MZ parece estar asociado a un aumento de la severidad de la destrucción periodontal exhibida en este grupo. La marcada discrepancia en la destrucción periodontal del grupo de gemelos idénticos (MZ) no pudo ser asociada a diferencias en cantidad de leucocitos, sin embargo, es interesante el hecho de que la baja producción de IL-12p40 y los altos niveles de IL-6 en este grupo pudieran ser considerados como indicadores de riesgo para la severidad de la periodontitis.

Basado en nuestros resultados provenientes del estudio en gemelos, sugerimos que el rol de los genes en la enfermedad periodontal puede haber sido sobreestimada. Factores genéticos, en conjunto con factores relacionados al estilo de vida, así como la respuesta inmune generada después de la estimulación celular, no pudieron explicar la carencia de concordancia en la manifestacion clínica de la periodontitis en el grupo de gemelos idénticos (MZ), lo cual fuertemente apunta a que otros factores interactuan para determinar el fenotipo periodontal. Tenemos algunas sugerencias para explicar dicho hallazgo. Es el caso de los factores nutricionales y de suplementación nutricional, los cuales en el pasado ya han sido relacionados con la respuesta inflamatoria y la severidad de la enfermedad (Amaliya et al. 2007, Rosenstein et al. 2003, Staudte et al. 2005). Una dieta baja en calorías puede suprimir la respuesta inflamatoria y reducir la destrucción periodontal asociada a la respuesta frente a los periodontopatógenos (Branch-Mays et al.

2008). Adicionalmente, la suplementación nutricional con aceite de pescado podría ofrecer efectos positivos en la prevención y tratamiento de la enfermedad periodontal (Bendyk et al. 2009). Otra posible razón para explicar la marcada discordancia observada en los gemelos idénticos podría ser la presencia, dentro de los tejidos periodontales, de agentes provenientes de infecciones concomitantes. Por ejemplo, infecciones por herpes virus podrían iniciar o acelerar la destruccción periodontal ya que estimulan la producción de citokinas, lo cual podria interferir con la respuesta inmune del huésped frente a los patógenos periodontales lo cual disminuiría las defensas contra las bacterias que causan la periodontitis (Contreras et al. 2000, Slots 2007).

Por otra parte, aunque los genes modulan la respuesta inflamatoria, está en ascenso la convicción de que los factores epigenéticos son críticos en la regulación de la respuesta inflamatoria (Offenbacher et al. 2008). Los eventos epigenéticos actúan a través de la remodelación de la estructura de la cromatina como resultado de la metilación del ADN o metilación-acetilación de histonas del ADN, lo cual puede selectivamente activar o inactivar los genes y así mismo determinar su expresión. En general, podrían causar un aumento en la metilación del ADN en las zonas del promotor del gen, silenciándolo de este modo (Franco et al. 2008). Los procesos epigenéticos, a través de la inducción de cambios en la producción de citokinas, pueden influenciar la patogénesis y determinar el progreso de muchas enfermedades infecciosas (Gómez et al. 2009). Por ejemplo, resultados preliminares han sugerido que el gen encargado de la síntesis de IL-6 (citokina involucrada en la diferenciación definitiva de las células B en células activas productoras de anticuerpos) sufre una disminución en su metilación en los tejidos de pacientes con periodontitis cuando ésto se compara a sujetos sanos. Lo cual sugiere que el gen para IL-6 podría estar sobreestimulado en la enfermedad periodontal (resultados por publicar, Offenbacher et al. 2008). Esta idea va en línea con nuestros resultados en donde los gemelos controles del grupo de gemelos idénticos segregaron concentraciones de IL-6 superiores a sus contrapartes y a su vez mostraron mayor destrucción periodontal. También se ha mostrado que procesos infectivos pueden conducir a cambios en los genes impresos (Bobetsis et al. 2007). Por consiguiente, infecciones previas sufridas por el gemelo control pudieran haber generado una variación genética lo cual a su vez pudiera haber conducido a un aumento de la severidad de la periodontitis en estos sujetos.

Desafortunadamente existe muy escasa información acerca de los cambios epigenéticos asociados a la periodontitis. Esperamos que investigaciones futuras nos puedan ayudar a entender la forma en la cual la exposición a factores sistémicos, como el cigarrillo, pudieran alterar los patrones epigenéticos y así afectar la expresión de la enfermedad periodontal (Barros & Offenbacher 2009). En resumen, las sugerencias mencionadas anteriormente podrían potencialmente influenciar la manifestación de la periodontitis por lo cual ofrecen una respuesta escasa concordancia en los parámetros estudiados en los gemelos idénticos.

La identificación de sujetos con alta susceptibilidad para desarrollar la enfermedad periodontal sigue siendo un gran reto en la atención odontológica. Es necesario una prevención a la medida, así como el diseño y aplicación de estrategias de tratamiento para este grupo de alto riesgo. Al respecto, estudios en gemelos en muestras de mayor escala, donde además de los indicadores clásicos de la enfermedad, también se evalúen otros factores de influencia, contribuirían a aclarar los procesos hasta hoy poco conocidos acerca de la etiología y progreso de la periodontitis. Basados en nuestros estudios y en algunos otros publicados recientemente podemos concluir y además especular que el análisis de la interacción de los factores genéticos y de los mecanismos epigenéticos, influenciados a su vez por los factores medioambientales, constituyen inequívocamente una novedosa e interesante línea de investigación dentro de nuestro campo.

References

Amaliya, Timmerman, M. F., Abbas, F., Loos, B. G., Van der Weijden, G. A., Van Winkelhoff, A. J., Winkel, E. G. & Van der Velden, U. (2007) Java project on periodontal diseases: the relationship between vitamin C and the severity of periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **34,** 299-304.

Barros, S. P. & Offenbacher, S. (2009) Epigenetics: connecting environment and genotype to phenotype and disease. *Journal of Dental Research* **88,** 400-408.

Bendyk, A., Marino, V., Zilm, P. S., Howe, P. & Bartold, P. M. (2009) Effect of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on experimental periodontitis in the mouse. *Journal of Periodontal Research* **44,** 211-216.

Bergstrom, J. (1989) Cigarette smoking as risk factor in chronic periodontal disease. *Community Dentistry and Oral Epidemiology* **17,** 245-247.

Branch-Mays, G. L., Dawson, D. R., Gunsolley, J. C., Reynolds, M. A., Ebersole, J. L., Novak, K. F., Mattison, J. A., Ingram, D. K. & Novak, M. J. (2008) The effects of a calorie-reduced diet on periodontal inflammation and disease in a non-human primate model. *Journal of Periodontology* **79,** 1184-1191.

Contreras, A., Nowzari, H. & Slots, J. (2000) Herpesviruses in periodontal pocket and gingival tissue specimens. *Oral Microbiology and Immunology* **15,** 15-18.

Corey, L. A., Nance, W. E., Hofstede, P. & Schenkein, H. A. (1993) Self-reported periodontal disease in a Virginia twin population. *Journal of Periodontology* **64,** 1205-1208.

De-Gennaro, L. A., Lopes, J. D. & Mariano, M. (2006) Autoantibodies directed to extracellular matrix components in patients with different clinical forms of periodontitis. *Journal of Periodontology* **77,** 2025-2030.

Gemmell, E., Yamazaki, K. & Seymour, G. J. (2007) The role of T cells in periodontal disease: homeostasis and autoimmunity. *Periodontology 2000* **43,** 14-40.

Gomez, R. S., Dutra, W. O. & Moreira, P. R. (2009) Epigenetics and periodontal disease: future perspectives. *Inflammation Research*.

Harris, D. P., Haynes, L., Sayles, P. C., Duso, D. K., Eaton, S. M., Lepak, N. M., Johnson, L. L., Swain, S. L. & Lund, F. E. (2000) Reciprocal regulation of

polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nature Immunology* **1,** 475-482.

Hirano, T., Akira, S., Taga, T. & Kishimoto, T. (1990) Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunology Today* **11,** 443-449.

Ishimi, Y., Miyaura, C., Jin, C. H., Akatsu, T., Abe, E., Nakamura, Y., Yamaguchi, A., Yoshiki, S., Matsuda, T., Hirano, T. & et al. (1990) IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *The Journal of Immunology* **145,** 3297-3303.

Johnson, G. K. & Hill, M. (2004) Cigarette smoking and the periodontal patient. *J Periodontol* **75,** 196-209.

Kinane, D. F. & Chestnutt, I. G. (2000) Smoking and periodontal disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* **11,** 356-365.

Kinane, D. F. & Lappin, D. F. (2001) Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. *Acta Odontologica Scandinavica* **59,** 154-160.

Kornman, K. S. (2008) Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. *J Periodontol* **79,** 1560-1568.

Lappin, D. F., MacLeod, C. P., Kerr, A., Mitchell, T. & Kinane, D. F. (2001) Anti-inflammatory cytokine IL-10 and T cell cytokine profile in periodontitis granulation tissue. *Clinical & Experimental Immunology* **123,** 294-300.

Loos, B. G. (2005) Systemic markers of inflammation in periodontitis. *Journal of Periodontology* **76,** 2106-2115.

Loos, B. G., Craandijk, J., Hoek, F. J., Wertheim-van Dillen, P. M. & van der Velden, U. (2000) Elevation of systemic markers related to cardiovascular diseases in the peripheral blood of periodontitis patients. *Journal of Periodontology* **71,** 1528-1534.

Loos, B. G., van der Velden, U. & Laine, M. L. (2008) Susceptibility. In: *Clinical Periodontology and Implant Dentistry.* 5th edition, eds. Lang, NP. & Lindhe, J. pp. 328-343. Oxford, UK.: Blackwell Publishing Ltd.

Michalowicz, B. S. (1994) Genetic and Heritable Risk Factors in Periodontal Disease. *Journal of Periodontology* **65,** 479-488.

Michalowicz, B. S., Aeppli, D., Virag, J. G., Klump, D. G., Hinrichs, J. E., Segal, N. L., Bouchard, T. J., Jr. & Pihlstrom, B. L. (1991a) Periodontal findings in adult twins. *Journal of Periodontology* **62,** 293-299.

Michalowicz, B. S., Aeppli, D. P., Kuba, R. K., Bereuter, J. E., Conry, J. P., Segal, N. L., Bouchard, T. J., Jr. & Pihlstrom, B. L. (1991b) A twin study of genetic variation in proportional radiographic alveolar bone height. *Journal of Dental Research* **70,** 1431-1435.

Michalowicz, B. S., Diehl, S. R., Gunsolley, J. C., Sparks, B. S., Brooks, C. N., Koertge, T. E., Califano, J. V., Burmeister, J. A. & Schenkein, H. A. (2000) Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *Journal of Periodontology* **71,** 1699-1707.

Mucci, L. A., Bjorkman, L., Douglass, C. W. & Pedersen, N. L. (2005) Environmental and heritable factors in the etiology of oral diseases--a population-based study of Swedish twins. *Journal of Dental Research* **84,** 800-805.

Offenbacher, S., Barros, S. P. & Beck, J. D. (2008) Rethinking periodontal inflammation. *Journal of Periodontology* **79,** 1577-1584.

Pabst, M. J., Pabst, K. M., Collier, J. A., Coleman, T. C., Lemons-Prince, M. L., Godat, M. S., Waring, M. B. & Babu, J. P. (1995) Inhibition of neutrophil and monocyte defensive functions by nicotine. *Journal of Periodontology* **66,** 1047-1055.

Page, R. C., Offenbacher, S., Schroeder, H. E., Seymour, G. J. & Kornman, K. S. (1997) Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontology 2000* **14,** 216-248.

Palmer, R. M., Wilson, R. F., Hasan, A. S. & Scott, D. A. (2005) Mechanisms of action of environmental factors--tobacco smoking. *Journal of Clinical Periodontology* **32 Suppl 6,** 180-195.

Pihlstrom, B. L., Michalowicz, B. S. & Johnson, N. W. (2005) Periodontal diseases. *Lancet* **366,** 1809-1820.

Preshaw, P. M. (2008) Host response modulation in periodontics. *Periodontology 2000* **48,** 92-110.

Rajapakse, P. S. & Dolby, A. E. (2004) Evidence for local production of antibodies to auto and non-self antigens in periodontal disease. *Oral Diseases* **10,** 99-105.

Rosenstein, E. D., Kushner, L. J., Kramer, N. & Kazandjian, G. (2003) Pilot study of dietary fatty acid supplementation in the treatment of adult periodontitis. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **68,** 213-218.

Rothermel, A. L., Gilbert, K. M. & Weigle, W. O. (1991) Differential abilities of Th1 and Th2 to induce polyclonal B cell proliferation. *Cellular Immunology* **135,** 1-15.

Sandborg, C. I., Imfeld, K. L., Zaldivar, F., Jr., Wang, Z., Buckingham, B. A. & Berman, M. A. (1995) IL-4 expression in human T cells is selectively inhibited by IL-1 alpha and IL-1 beta. *The Journal of Immunology* **155,** 5206-5212.

Schmitz, J., Assenmacher, M. & Radbruch, A. (1993) Regulation of T helper cell cytokine expression: functional dichotomy of antigen-presenting cells. *European Journal of Immunology* **23,** 191-199.

Seymour, G. J. & Gemmell, E. (2001) Cytokines in periodontal disease: where to from here? *Acta Odontologica Scandinavica* **59,** 167-173.

Seymour, G. J., Gemmell, E., Kjeldsen, M., Yamazaki, K., Nakajima, T. & Hara, K. (1996) Cellular immunity and hypersensitivity as components of periodontal destruction. *Oral Diseases* **2,** 96-101.

Slots, J. (2007) Herpesviral-bacterial synergy in the pathogenesis of human periodontitis. *Current Opinion in Infectious Diseases* **20,** 278-283.

Staudte, H., Sigusch, B. W. & Glockmann, E. (2005) Grapefruit consumption improves vitamin C status in periodontitis patients. *Br Dent J* **199,** 213-217, discussion 210.

Tabakspreventie, S. E. v. (2008).

Tonetti, M. S. (1998) Cigarette smoking and periodontal diseases: etiology and management of disease. *Annals of Periodontology* **3,** 88-101.

Tsai, I. S., Tsai, C. C., Ho, Y. P., Ho, K. Y., Wu, Y. M. & Hung, C. C. (2005) Interleukin-12 and interleukin-16 in periodontal disease. *Cytokine* **31,** 34-40.

van der Pouw Kraan, T. C., Boeije, L. C., de Groot, E. R., Stapel, S. O., Snijders, A., Kapsenberg, M. L., van der Zee, J. S. & Aarden, L. A. (1997) Reduced production of IL-12 and IL-12-dependent IFN-gamma release in patients with allergic asthma. *The Journal of Immunology* **158,** 5560-5565.

van der Pouw Kraan, T. C., Boeije, L. C., Smeenk, R. J., Wijdenes, J. & Aarden, L. A. (1995) Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. *Journal of Experimental Medicine* **181,** 775-779.

van der Weijden, G. A., de Slegte, C., Timmerman, M. F. & van der Velden, U. (2001) Periodontitis in smokers and non-smokers: intra-oral distribution of pockets. *Journal of Clinical Periodontology* **28,** 955-960.

Xu, L., Loos, B. G., Craandijk, J., Ritsema, E., Huffels, R. A. & van der Velden, U. (2002) Teeth with periodontal bone loss, cigarette smoking and plasma cotinine levels. *Journal of the International Academy of Periodontology* **4,** 39-43.