

# ASOCIACIÓN DE MAYORES NIVELES DE RANKL Y LINFOCITOS T CD4<sup>+</sup> EN PERIODONTITIS

*Rolando Vernal<sup>1</sup>*  
*Alejandra Chaparro<sup>1</sup>*  
*Nicolás Dutzan<sup>1</sup>*  
*Sabrita Chandía<sup>2</sup>*  
*Javier Puente<sup>2</sup>*  
*Augusto Silva<sup>3</sup>*  
*Jorge Gamonal<sup>1</sup>*

## RESUMEN

**Propósito:** La periodontitis es una enfermedad infecciosa que involucra una sobre-respuesta inmune del hospedero y se caracteriza por la destrucción de los tejidos de soporte del diente. Durante su desarrollo se establece un denso infiltrado celular mononuclear donde el 70% lo constituyen los linfocitos de tipo T, con la capacidad de secretar una serie de citoquinas que participan en los eventos patogénicos de la enfermedad, regulando la inflamación de los tejidos periodontales y la destrucción del hueso alveolar. El objetivo del presente estudio es determinar si en la periodontitis crónica se observan mayores niveles de RANKL y si estos se encuentran asociados a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> reclutados en los sitios con enfermedad periodontal.

**Material y Método:** En 20 individuos con periodontitis crónica y en 12 individuos controles voluntarios y periodontalmente sanos se determinaron los niveles de mRNA de RANKL mediante RT-PCR tiempo real, se aislaron células gingivales totales para inmunotipificar y cuantificar los leucocitos infiltrantes gingivales y los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> a través de citometría de flujo, en

sobrenadantes de cultivos celulares, sin estimular y estimulados con LPS, PHA, extracto bacteriano de *Pg* e inter-leuquinas 2 y 15, se detectaron los niveles de RANKL mediante ELISA, y se determinó la expresión de RANKL, de células T CD4<sup>+</sup> y se colocalizó inmunoreacción positiva para RANKL en linfocitos CD4<sup>+</sup> mediante inmunohistoquímica.

**Resultados:** Los pacientes con periodontitis mostraron mayores niveles de mRNA de RANKL (Ct y  $\Delta$ Ct) evaluado mediante RT-PCR ( $28,791 \pm 3,27$  vs.  $36,514 \pm 2,67$  y  $7,113 \pm 3,00$  vs.  $15,009 \pm 2,80$ , respectivamente) en comparación a individuos periodontalmente sanos, observándose mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  que la expresión de RANKL se incrementó en 238,3 (29,8-1903,4) veces con relación a los sujetos controles. Los individuos con periodontitis mostraron mayores niveles (%) de linfocitos totales ( $58,5 \pm 18,45$  vs.  $41,5 \pm 0,89$ ) y de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> ( $29,1 \pm 17,78$  vs.  $4,6 \pm 0,25$  y  $13,7 \pm 7,23$  vs.  $3,3 \pm 0,15$ , respectivamente), y en cultivos celulares se observaron mayores niveles de RANKL (pg/ml) espontáneos ( $18,4 \pm 5,79$  vs.  $8,0 \pm 1,34$ ) y estimulados con LPS y PHA ( $33,8 \pm 7,30$  vs.  $21,0 \pm 5,60$  y  $30,1 \pm 7,77$  vs.  $14,5 \pm 3,57$ , respectivamente), en compara-

1. Laboratorio de Biología Periodontal, Facultad de Odontología, Universidad de Chile.
  2. Laboratorio de Inmunobioquímica, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
  3. Departamento de Inmunología, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, España.
- Correspondencia: Dr. Jorge Gamonal Aravena, Escuela de Graduados, Facultad de Odontología, Santa María 0596, Comuna de Providencia, Santiago, Chile. Teléfono: 56-2-6781833 Fax: 56-2-6781815  
e-mail: jgamonal@uchile.cl

ción con los individuos periodontalmente sanos. Mediante inmunohistoquímica se observó una mayor inmunoreacción para RANKL y para CD4 en individuos con periodontitis y una clara colocalización de RANKL en linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

**Conclusión:** Estos datos demuestran que mayores niveles de RANKL se encuentran asociados a la periodontitis y que estos mayores niveles se pueden explicar en parte a la actividad de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en el sitio de la infección. La determinación de la asociación entre la periodontitis y la síntesis de RANKL constituye un interesante mecanismo molecular que contribuye a explicar en parte la destrucción tisular asociada y permite proyectar posibles nuevas estrategias terapéuticas, mediante la utilización de inhibidores de la actividad de RANKL, tal como osteoprotegerina (OPG), que ayudarían a controlar la pérdida de tejido característica de la enfermedad periodontal.

**Palabras clave:** Periodontitis; Hospedero; Linfocitos; Rankl.

## INTRODUCCIÓN

En el individuo adulto normal el tejido óseo maduro se encuentra en un constante balanceado, celularmente acoplado, y local y molecularmente controlado proceso de remodelación ósea (Hill y Orth, 1998; Sodek y McKee, 2000). En la mayoría de las enfermedades óseas existe un desbalance en los niveles fisiológicos de los factores osteomoduladores locales que provoca una mayor tasa de reabsorción ósea y la consecutiva pérdida de hueso (Boyce y cols., 1999; Greenfield y cols., 1999).

Aunque los reguladores moleculares de las distintas fases de vida y actividad de los osteoclastos no han sido completamente definidos, por décadas varios sistemas de citoquinas han sido sugeridos como importantes reguladores de la reabsorción ósea (Hofbauer y Heufelder, 2001; Boyle y cols., 2003; Greenfield y cols.,

1999). En la actualidad un nuevo sistema de citoquinas recientemente identificado como nuevos miembros de la superfamilia TNF (factor de necrosis tumoral) y TNFR (TNF-receptor), han sido propuestos como esenciales para la biología osteoclástica. Los compoKSe ha demostrado que RANKL estimula directamente la diferenciación y activación de osteoclastos, a través de la interacción con su receptor específico en la superficie de las células progenitoras del linaje osteoclástico y en los osteoclastos maduros RANK, también denominado TRANCE-R (Receptor de TRANCE), ODAR (Receptor de diferenciación y activación de osteoclastos) y TNFRSF11A. El ligando RANKL, también denominado TRANCE (Citoquina inductora de activación relacionada a TNF), OPG (Ligando de OPG), ODF (Factor de diferenciación de osteoclastos) y TNFSF11, es expresado en la superficie de células estromales, osteoblastos, células T, y/o liberado por acción de la enzima TACE (Metaloproteinasa desintegrina TNF $\alpha$  convertasa). La identificación del nuevo receptor OPG, también denominado OCIF (Factor inhibidor de la osteoclastogénesis) y TNFRSF11B, ha revelado un mecanismo regulador clave en la diferenciación y actividad de los osteoclastos (Lacey y cols., 1998; Yasuda y cols., 1998; Burgess y cols., 1999; Kwon y cols., 1999; Takahashi y cols., 1999; Hofbauer y Heufelder, 2001; Blaque y James, 2003).

Las periodontitis constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades periodontales que se manifiestan en respuesta a la infección bacteriana por patógenos específicos que colonizan el área del surco gingivodentario. Se caracterizan por presentar una variada historia natural, progresión y respuesta a la terapia, y por provocar la destrucción del aparato de inserción dentario, compuesto por ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar, que lleva finalmente a la pérdida del diente (Offenbacher, 1996).

Aunque la patogénesis de la enfermedad periodontal no está completamente dilucidada se sabe

que la interacción de los mecanismos defensivos del hospedero y los agentes bacterianos etiológicos son importantes en el inicio y progresión de la periodontitis (Offenbacher, 1996).

En los tejidos periodontales enfermos, en respuesta a la infección se constituye un denso infiltrado inflamatorio mononuclear caracterizado por la presencia de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos, macrófagos, plasmocitos y linfocitos de la serie B y T (Van Dyke y cols., 1993). En las lesiones periodontales activas, en los sitios que evidencian progresión de la enfermedad periodontal, 70% de las células mononucleares lo constituyen linfocitos del tipo T, con la capacidad de secretar una serie de citoquinas que participan en los eventos etiopatogénicos de la enfermedad (Seymour y cols., 1983A; Seymour y cols., 1983B; Johannessen y cols., 1990; Taubman y Kawai, 2001).

El presente trabajo analiza si RANKL se encuentra asociada a la periodontitis y si estos mayores niveles se encuentran asociados con los linfocitos T CD4<sup>+</sup> reclutados en los sitios con enfermedad periodontal.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Se estudió a 20 individuos mayores de 35 años de edad con diagnóstico clínico de periodontitis crónica con niveles de severidad de enfermedad moderada a avanzada, seleccionados y tratados en el Centro de Diagnóstico y Tratamiento Dra. Eloisa Díaz del Servicio de Salud Metropolitano Norte, Santiago, Chile.

La selección de los pacientes se realizó de acuerdo con los siguientes criterios de inclusión: Tener al menos 14 dientes, sin contabilizar los terceros molares, de los cuales al menos 10 tenían que ser dientes posteriores. Para el diagnóstico de periodontitis crónica al menos 5 a 6 dientes debían tener sacos periodontales de profundidad de sondaje  $\geq 5$  mm, pérdida de inserción clínica

$\geq 3$  mm y evidencia radiográfica de destrucción ósea alveolar. Los individuos no sufrían de enfermedades sistémicas, ni tenían antecedentes de terapia periodontal, no habían recibido terapia de antibióticos, anti-inflamatorios esteroidales o no esteroidales en el período de 3 meses previos al examen clínico inicial y su incorporación al estudio, y si era de género femenino no estar embarazada. Como grupo control se estudió a 12 individuos voluntarios periodontalmente sanos, determinado por la ausencia de sacos periodontales y de pérdida de inserción clínica asociada a infección. Todos los sujetos recibieron una clara explicación del protocolo de investigación y firmaron un consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

## **Evaluación clínica**

Todos los pacientes recibieron previo al examen clínico una profilaxis para remover el cálculo supragingival y permitir una correcta evaluación clínica.

Los parámetros clínicos fueron evaluados en todos los dientes, excluyendo los terceros molares, por un investigador entrenado y calibrado. Se realizaron mediciones replicadas de la profundidad de los sacos periodontales y del nivel de inserción clínica, y mediciones dicotómicas respecto de la presencia de placa bacteriana supragingival, sangramiento y supuración al sondaje, en 6 sitios por diente (mesiobucal, bucal, distobucal, distolingual, lingual, mesiolingual). Se utilizó una sonda periodontal de tercera generación (Florida Probe Corporation, Gainesville, FL, USA), de fuerza de sondaje controlada y registro automatizado, para reducir los errores asociados a la presión de sondaje y la subjetividad en el registro de los datos inherente a la técnica de sondaje manual.

De cada individuo del grupo con periodontitis se seleccionaron 2 sitios periodontalmente afectados en dientes posteriores, caracterizados por

presentar una profundidad de sondaje  $\geq 5$  mm y una pérdida de inserción clínica asociada a la infección  $\geq 3$  mm, para la toma de biopsias de tejido gingival. En los individuos periodontalmente sanos los sitios seleccionados fueron aquellos con indicación de cirugía periodontal para procedimientos de elongación coronaria por indicación protésica o de encía sana asociada a terceros molares con indicación de exodoncia.

### **Identificación de mRNA de RANKL mediante RT-PCR tiempo real en biopsias de encía**

La extracción de mensajeros de ácido ribonucleico (mRNA) totales fue desarrollada utilizando un kit específico para biopsias de tejido fijadas en formalina y embebidas en parafina de acuerdo a las instrucciones de fabricante (Optimun™ FEPP RNA Isolation Kit, Ambion Inc., TX, USA).

Con hoja de bisturí número 15 se obtuvo una biopsia de 4 mm<sup>2</sup> a nivel del margen gingival caracterizada por poseer epitelio y tejido conectivo gingival, se lavó con PBS para la eliminación de detritus y restos de sangre (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA.) y se fijó en forma inmediata en Formalina Buffer durante 24 h a 4°C. Luego la muestra fue procesada mediante procesamiento histológico estándar. Brevemente, la muestra se deshidrató con una gradiente ascendente de alcoholes y xylol, se incluyó en parafina histológica.

De cada biopsia se obtuvo 5 cortes en micrótomos de 10  $\mu$ m libres de RNAsas fueron desparafinizados en 1 ml xylol y posteriormente dos veces en 1 ml de alcohol 100% durante 10 seg. bajo agitación constante. Las muestras previamente desecadas al aire por 5 min. fueron incubadas en 110  $\mu$ l de proteinasa K bajo agitación frecuente a 37°C durante 4 h y el tejido disuelto fue sometido a extracción de RNA total en 200  $\mu$ l de amortiguador de extracción y 160  $\mu$ l de alcohol 100% en columnas filtro en dos etapas bajo centrifugación a 13000 rpm durante 10 seg.

Previo lavado 3 veces en 180  $\mu$ l de amortiguador de lavado proporcionado el RNA total extraído fue resuspendido en 30  $\mu$ l de agua libre de RNAsas DEPC (dietilpirocarbonato) 0,1% a 60°C, cuantificado en espectrofotómetro y almacenado a -80°C en una concentración de 250 ng/ $\mu$ l.

La primera cadena de ácido desoxiribonucleico complementario (cDNA) fue sintetizada usando 500 ng de RNA total utilizando el kit TaqMan® Reverse Transcription Reagents (Roche Molecular Systems Inc., NJ, USA). 30  $\mu$ l de reacción que contenía: 3  $\mu$ l de amortiguador RT 10x, 6,6  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 6  $\mu$ l de mezcla de dNTP, 1,5  $\mu$ l de Oligo d(T), 0,6  $\mu$ l de inhibidor de RNAsas, 0,75  $\mu$ l de enzima transcriptasa reversa Multi Scribe™, 9,55  $\mu$ l de agua libre de RNAsas DEPC 0,1% y 2  $\mu$ l de RNA total, fueron retrotranscritas en termociclador Primus 96 plus Thermal Cycler (MWG AG Biotech, Germany) bajo las siguientes condiciones: 10 min. a 25°C, 30 min. a 48°C y 5 min. a 95°C.

Para examinar la expresión de mRNA de RANKL, 83,3 ng de cDNA, en diluciones de 1x y 0,1x y en duplicado, fueron amplificadas por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) tiempo real utilizando en ensayo específico Assay-on-Demand™ Gene Expression Products (Applied Biosystems, CA, USA), que contiene partidores forward y reverse en concentraciones no limitantes y una sonda TaqMan® MGB 6-FAM fluorescentemente marcada, específicamente diseñada para detectar y cuantificar secuencias de cDNA del gen RANKL multixónico sin amplificar DNA genómico. 25  $\mu$ l de volumen de reacción que contenía: 12,5  $\mu$ l de TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1,25  $\mu$ l de Assay-on-Demand 20x, 6,23  $\mu$ l de agua libre de RNAsas DEPC 0,1% y 5  $\mu$ l de cDNA, fueron analizadas bajo las siguientes condiciones: Un primer paso de 2 min. a 50°C, un segundo paso de 10 min. a 95°C y 40 ciclos de 15 seg. a 95°C y 1 min. a 60°C, en un detector de PCR tiempo real ABI PRISM™ 7700 Sequence Detector System (Applied Biosystems). Como

control interno del ensayo 33,3 ng de cDNA fueron amplificados para determinar la expresión de mRNA de gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) utilizando un kit TaqMan® Pre-Developed Assay Reagent Human GAPDH (Applied Biosystems) en las mismas diluciones y condiciones que RANKL.

### **Inmunotipificación y cuantificación de los leucocitos infiltrantes y de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> obtenidos de biopsias gingivales**

Con hoja de bisturí número 15 se obtuvo una biopsia de 4 mm<sup>2</sup> a nivel del margen gingival caracterizada por poseer epitelio y tejido conectivo gingival, esta fue inmediatamente sumergida en un tubo Falcon con 5 µl de medio de cultivo completo RPMI 1640 estéril, suplementado con 50 µl/ml de penicilina, 50 µl/ml de estreptomina y L-glutamina 200 mM (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA.), manteniéndose a 4°C hasta el momento de su procesamiento (máximo 3 h).

Al momento de su procesamiento la biopsia se lavó con amortiguador PBS estéril para la eliminación de detritus y restos de sangre, fue pesada en balanza analítica y seccionada en fragmentos de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup> con hoja de bisturí número 11. Los fragmentos inmediatamente se incubaron durante 90 min. en baño termostático a 37°C sometido a agitación constante, en medio de digestión que contiene: RPMI 1640 suplementado con 50 µl/ml de penicilina, 50 µl/ml de estreptomina, L-glutamina 200 mM y 200 µl/ml de colagenasa clostridial tipo IV (GIBCO Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, USA.), en una relación de 1 ml de solución de digestión por cada 50 mg de tejido. La reacción se inactivó suspendiendo la población celular obtenida en medio de cultivo completo suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) (GIBCO Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, USA.). Se realizó el conteo celular en cámara de Neubauer mediante microscopio

de contraste de fase (Axiovert 100, Zeiss Co., Germany). La viabilidad celular se evaluó por exclusión del colorante azul de Trypan y fue igual o superior a 90%.

Para la inmunotipificación y cuantificación de los leucocitos infiltrantes y de las subpoblaciones celulares linfocitarias gingivales, se incubaron por separado 3 tubos para citometría de flujo por muestra (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, Ca, USA.) conteniendo 200.000 células en 50 µl de medio de cultivo, durante 30 min a temperatura ambiente y en la oscuridad, con 10 µl de los anticuerpos: Leucogate (CD45 FITC / CD14 PE), para la identificación de la población leucocitaria: Linfocitos, granulocitos y monocitos, y TriTEST CD4 FITC / CD8 PE / CD3 PerCP, para la identificación y cuantificación de las subpoblaciones de linfocitos T ayudadores (CD4<sup>+</sup>) y de linfocitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>) (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, Ca, USA.), dejando un tubo sin marcar como control negativo. Previo lavado en 1 ml de PBS y centrifugación a 2400 rpm durante 5 min a 4°C, las muestras se resuspendieron en 300 µl de PBS y se analizaron mediante citómetro de flujo FACSsort Becton Dickinson (Becton Dickinson Immunocytometry System, San José, Ca, USA.).

### **Niveles de RANKL evaluados mediante ELISA en cultivos celulares estimulados con LPS, PHA, Extracto Bacteriano de *Porphyromonas gingivales* e Interleuquinas 2 y 15**

Para medir los niveles de RANKL en cultivo celular una suspensión celular obtenida mediante digestión enzimática de biopsia gingival, como fue anteriormente descrito, se separó en placas de 96 pocillos previo ajuste de concentración celular a 10<sup>6</sup> células por ml de solución en 200 µl por pocillo y se cultivó a 37°C en un ambiente de 5% de CO<sub>2</sub> en medio de cultivo RPMI suplementado con 50 µl/ml de penicilina, 50 µg/ml de

estreptomycin, L-glutamina 200 mM y 10% de SBF. Los cultivos se estimularon incubándolos con 0,1 µg/ml de lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA.), 5 µg/ml de fitohemaglutinina (PHA), estímulo específico para linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany), extracto bacteriano de *Porphyromonas gingivalis* en una relación final de 1:1000 y con un perfil de interleuquinas IL-2 5 µg/ml e IL-15 2 µg/ml, durante 24 h; como control se utilizó cultivo sin estímulo. Se determinó la síntesis estimulada y espontánea de RANKL en 100 µg de sobrenadante mediante ELISA de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Alpco Diagnostics, NH, USA.).

#### **Identificación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y RANKL mediante inmunohistoquímica en biopsias de encía**

Se procesaron las biopsias previamente preparadas mediante procesamiento histológico convencional y utilizadas para la extracción de mRNA total y la cuantificación de mRNA de RANKL mediante RT-PCR tiempo real. En secciones de 5 µm obtenidas con micrótopo se identificó RANKL y linfocitos T CD4<sup>+</sup> mediante técnica PAP (peroxidasa y antiperoxidasa) e inmunofluorescencia, con anticuerpos monoclonales específicos anti-RANKL y anti-CD4 humanos.

Previo montaje en placas de vidrio para microscopía con poly-L-lysine y desparafinización en xylol y rehidratación en una gradiente descendente de alcoholes y agua destilada, se procedió a una digestión en pepsina 0,2% (Difco Lab., Detroit, MI, USA) durante 30 min a 37°C para el desmascaramiento antigénico. Para las preparaciones para inmunoperoxidasa la actividad de peroxidasa endógena fue bloqueada en 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en metanol durante 15 min a temperatura ambiente. Las muestras lavadas en PBS fueron bloqueadas con albúmina de bovino PBS BSA 3% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)

durante 30 min a temperatura ambiente, y el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-RANKL humano (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) diluido a 20 µg/ml en PBS BSA 3% y el anticuerpo policlonal de conejo anti-CD4 humano (NeoMarkers, Lab Vision Corporation, CA, USA) fueron incubados toda la noche a 4°C en cámara húmeda. En las muestras para inmunoperoxidasa el anticuerpo primario fue detectado el kit DAKO LSAB® + System HRP (Dako Corp., Carpinteria, CA, USA), consistente en un anticuerpo secundario biotinilado y un conjugado streptavidin-peroxidase, ambos incubados durante 15 min a temperatura ambiente, y un sustrato de diaminobenzidina (DAB), incubado durante 5 min a 4°C. Como tinción de contraste las muestras se tiñeron con Giemsa y finalmente se montaron en medio hidrofóbico para observación y análisis mediante microscopía de luz (Exioskop 20, Carl Zeiss, Germany). Para las muestras para inmunofluorescencia el anticuerpo primario anti-RANKL humano fue detectado usando un anticuerpo secundario ML Texas Red® conjugado de cabra anti-ratón y el anticuerpo anti-CD4 humano fue detectado usando un anticuerpo secundario ML Alexa Fluor 488® conjugado de cabra anti-conejo (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA), ambos diluidos a 5 µg/ml e incubados durante 1 h a 37°C en cámara húmeda. Previo montaje en un medio para fluorescencia (Dako Corp., Carpinteria, CA, USA) fueron observadas y analizadas mediante un microscopio de fluorescencia (Exioskop 20, Carl Zeiss, Germany).

Para la colocalización de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y RANKL se procedió a utilizar el protocolo recomendado por laboratorios Jackson InmunoResearch (Jackson InmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA). Primero fue incubado el anticuerpo primario de conejo anti-CD4 humano detectado con el anticuerpo secundario ML Alexa Fluor 488® conjugado de cabra anti-conejo y posteriormente el anticuerpo primario de ratón anti-RANKL humano detectado con el anticuerpo secundario ML Texas Red® conjugado de cabra

anti-ratón, todos en las concentraciones y condiciones antes descritas. Posterior a montaje en un medio para fluorescencia las muestras fueron observadas y analizadas mediante microscopio de fluorescencia confocal (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany). La colocalización fue posible ya que los anticuerpos primarios procedían de animales de distinta especie y los anticuerpos secundarios ML (multiple labeling), derivados de animales de la misma especie, no se reconocían el uno al otro, sólo reconocían su anticuerpo primario específico, sin reacción cruzada con el otro anticuerpo primario, y no reconocían inmunoglobulinas de otras especies animales ni inmunoglobulinas endógenas humanas presentes en el tejido gingival en estudio.

Como controles negativos fueron procesadas muestras gingivales en las que se omitió el anticuerpo primario, se omitió el anticuerpo primario y el secundario, y se preadsorbió el anticuerpo primario anti-RANKL mediante incubación en su proteína recombinante RANKL en una concentración 100 veces superior durante 3 horas a 37°C. Como control positivo se usaron cortes histológicos de incisivo de rata sometida a fuerza distal parafuncional, correlacionando la reacción anti-RANKL mediante inmunoperoxidasa con la reacción TRAP, marcador fenotípico de poblaciones celulares osteoclasticas.

### **Análisis de los datos**

Los datos se analizaron utilizando el software estadístico Stata® versión 7.0 (Statistics/Data Analysis Stata, Stata Co., Tx, USA). Los parámetros clínicos edad, profundidad de sondaje y nivel de inserción clínico y los niveles de RANKL sintetizados por cultivos celulares gingivales se analizaron utilizando las pruebas estadísticas t de Student no pareada y U-test Mann-Whitney. El Chi<sup>2</sup> se utilizó para analizar los parámetros clínicos género, placa bacteriana y sangramiento al sondaje, y las diferencias de los niveles de las poblaciones leucocitarias y linfocitarias CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> obtenidos de biopsias gingivales.

Un  $p < 0,05$  fue considerado como diferencia significativa mediante la prueba de Tukey. Los datos obtenidos por citometría de flujo fueron graficados como LeucoGATE dotplot y TriTEST CD4/CD8/CD3 contourplot utilizando en software WinMDI versión 2.8.

Los datos obtenidos de la técnica de detección de mRNA de RANKL y GAPDH mediante PCR tiempo real fueron analizadas mediante el software ABI PRISM™ Sequence Detector Systems versión 1.7a (Applied Biosystems). Los datos fueron graficados como la señal de fluorescencia  $\Delta Rn$  versus el número de ciclo de amplificación, utilizando la ecuación  $DRn = Rn^+ - Rn^-$ , donde  $Rn^+$  es la señal de fluorescencia del producto en un momento dado y  $Rn^-$  es la señal de fluorescencia durante la emisión background durante los ciclos 3 a 15. Un límite umbral arbitrario fue establecido mediante el método de los replicados. El valor Ct fue definido como el número de ciclo en el cual  $\Delta Rn$  cruza el límite umbral establecido. La relación entre RANKL y GAPDH en cada individuo fue definida como  $\Delta Ct$ , donde  $\Delta Ct = Ct_{RANKL} - Ct_{GAPDH}$ . Los valores Ct y  $\Delta Ct$  de RANKL y GAPDH son expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar y rango de datos, la prueba estadística t de Student no pareada fue utilizada para analizar las diferencias. La eficiencia de amplificación entre GAPDH y RANKL fue evaluada analizando la variación de DCt en diluciones seriadas en un rango de 1000 en 3 pacientes con periodontitis. Un gráfico de  $\Delta Ct$  versus el logaritmo en base 10 de la dilución de cDNA fue realizado y los datos fueron fijados utilizando análisis de regresión lineal. El número de veces de expresión de mRNA de RANKL relativas al control interno mRNA de GAPDH fue determinado utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001).

## **RESULTADOS**

### **Características clínicas**

Las características clínicas de los pacientes con

periodontitis y de los individuos periodontalmente sanos incluidos en este estudio se muestran en la Tabla 1 y en las Figuras 1A y 1B. En el grupo con periodontitis fueron estudiados 8 hombres y 12 mujeres, con un rango de edad entre 35 y 65 años ( $46,6 \pm 8,33$ ), y 3 hombres y 9 mujeres, con un rango de edad entre 35 y 57 ( $40,5 \pm 8,42$ ), en el grupo control. No se observaron diferencias significativas en la edad y el género, expresado como número de mujeres, entre ambos grupos en estudio. Los pacientes con periodontitis mostraron significativamente mayor porcentaje de sitios con presencia de placa bacteriana (74,1 vs. 35,6) y de sitios con sangramiento al sondaje periodontal (57,9 vs. 1,6), y mayor profundidad de sondaje y nivel de inserción clínico perdido ( $3,5 \pm 0,56$  vs.  $1,9 \pm 0,52$  y  $3,6 \pm 0,48$  vs.  $0,2 \pm 0,33$ , respectivamente) en comparación a los sujetos periodontalmente sanos.

### Identificación de mRNA de RANKL mediante RT-PCR tiempo real en biopsias de encía

Todos los pacientes con periodontitis mostraron niveles detectables de mRNA de RANKL, mientras, un 75% tenían niveles detectables en el grupo de individuos periodontalmente sanos. Los valores medios y el rango de los datos Ct para RANKL y GAPDH se muestran en la Tabla 2A. Los gráficos de amplificación de RANKL del menor de cada duplicado para ambos grupos se muestran en la Figura 2A. El Ct de GAPDH

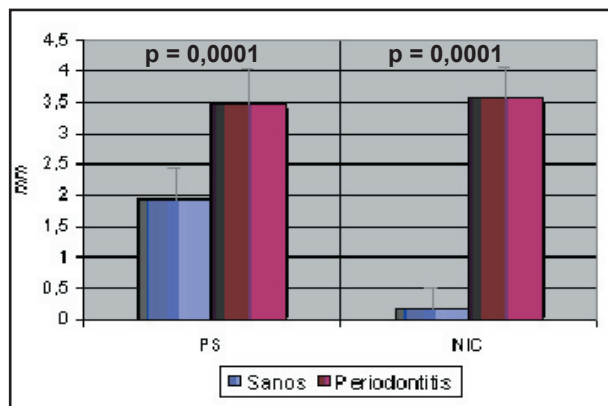


Figura 1A. Características clínicas de los individuos (promedio  $\pm$  DS). PS: Profundidad de sondaje (mm). NIC: Nivel inserción clínico (mm).

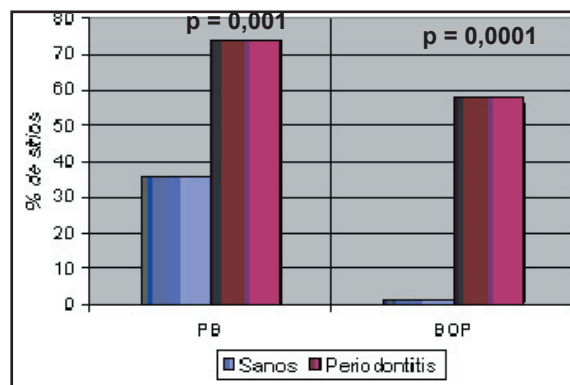


Figura 1B. Características clínicas de los individuos (promedio). PB: Placa bacteriana (% de sitios). BOP: Sangramiento al sondaje (% de sitios).

fue similar entre ambos grupos ( $21,678 \pm 1,62$  vs.  $21,505 \pm 0,86$ ), pero en Ct de RANKL fue significativamente más bajo en el grupo de individuos con periodontitis en comparación a los sujetos sanos ( $28,791 \pm 3,27$  vs.  $36,514 \pm 2,67$ ).

Tabla 1  
Características clínicas de los individuos estudiados (promedio  $\pm$  DS)

	Periodontitis	Sanos	p
Edad (años)	$46,6 \pm 8,33$	$40,5 \pm 8,42$	
Género	12	9	
PS (mm)	$3,5 \pm 0,56$	$1,9 \pm 0,52$	0,0001
NIC (mm)	$3,6 \pm 0,48$	$0,2 \pm 0,33$	0,0001
PB (% de sitios)	74,1	35,6	0,001
BOP (% de sitios)	57,9	1,6	0,0001

Género (número de mujeres). PS: Profundidad de sondaje. NIC: Nivel inserción clínico. PB: Placa bacteriana. BOP: Sangramiento al sondaje.



El  $\Delta Ct$  de RANKL y GAPDH se muestra en la Tabla 2B. El  $\Delta Ct$  fue significativamente más bajo en el grupo de individuos con periodontitis en comparación a los sujetos sanos ( $7,113 \pm 3,00$  vs.  $15,009 \pm 2,80$ ). La gráfica de eficiencia de amplificación de GAPDH y RANKL muestra una pendiente de 0,0752 (Figura 2B), así, la eficiencia de amplificación de ambos amplicones es similar y la cuantificación relativa de RANKL en relación con GAPDH puede ser determinada por el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Utilizando este método se determinó que en individuos con periodontitis la expresión de RANKL se incrementó en 238,3 veces con relación a los sujetos periodontalmente sanos, con un rango de error estimado de 29,8 – 1903,4 (Tabla 2B).

### Immunotipificación y cuantificación de los leucocitos infiltrantes y de linfocitos T CD4 y CD8 obtenidos de biopsias gingivales

Las células totales obtenidas por digestión enzimática de biopsias gingivales de sujetos con periodontitis e individuos periodontalmente sanos fueron inmunotipificadas mediante citometría de

flujo (Figura 3A). Anticuerpos específicos dirigidos a los marcadores de superficie CD3, CD4 y CD8 permitieron identificar ambas poblaciones celulares de linfocitos (Figura 3A). Los porcentajes de linfocitos, granulocitos, monocitos, linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y la razón linfocitos T CD4<sup>+</sup>/T CD8<sup>+</sup> se muestran en la Tabla 3 y en las Figura 3B. Se observa significativamente mayor porcentaje de linfocitos totales ( $58,5 \pm 18,45$  vs.  $41,5 \pm 0,89$ ) y linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> ( $29,1 \pm 17,78$  vs.  $4,6 \pm 0,25$  y  $13,7 \pm 7,23$  vs.  $3,3 \pm 0,15$ , respectivamente) en individuos con periodontitis en comparación a individuos periodontalmente sanos. Por otro lado, se observa mayor porcentaje de granulocitos en individuos periodontalmente sanos ( $49,5 \pm 2,73$  vs.  $34,9 \pm 19,10$ ), aunque esta diferencia no es significativa. No se observa diferencia en el porcentaje de monocitos ni en la relación linfocitos T CD4/CD8 ( $6,6 \pm 3,86$  vs.  $9,1 \pm 1,84$  y  $1,9 \pm 0,87$  vs.  $1,4 \pm 0,01$ , respectivamente).

### Niveles de RANKL evaluados mediante ELISA en cultivos celulares estimulados con LPS, PHA, extracto bacteriano de *Porphyromonas gingivales* e interleuquinas 2 y 15

**Tabla 2A**  
CtTabla de RANKL y GAPDH (promedio  $\pm$  DS y rango de datos)

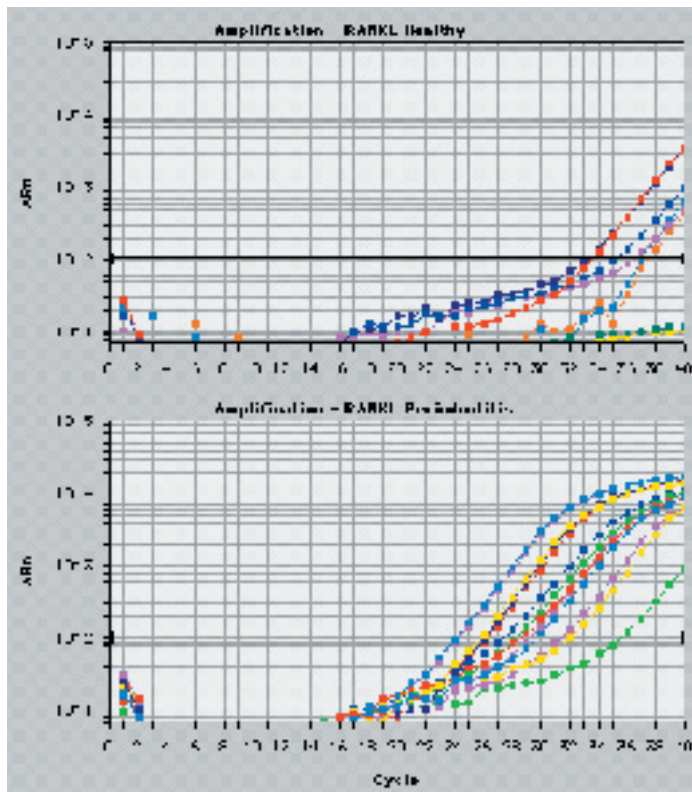
	Periodontitis	Sanos
Ct GAPDH	$21,678 \pm 1,62$ 19,026 – 24,072	$21,505 \pm 0,86$ 20,845 – 13,117
Ct RANKL	$28,791 \pm 3,27$ 24,189 – 35,644	$36,514 \pm 2,67$ 36,426 – 40,000

Ct: Ciclo umbral (número de ciclo)

**Tabla 2B**  
 $\Delta Ct$  de RANKL y GAPDH y cuantificación relativa de RANKL (promedio  $\pm$  DS)

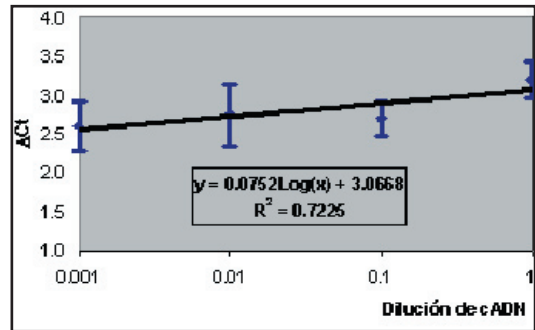
	Periodontitis	Sanos	p
$\Delta Ct$	$7,113 \pm 3,00$ §	$15,009 \pm 2,80$	0,000009
$2^{-\Delta\Delta Ct}$	238,3 (29,8 – 1903,4)	1,0 (0,1 – 7,0)	

$\Delta Ct = Ct_{RANKL} - Ct_{GAPDH}$ .  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  = Cuantificación relativa



**Figura 2A.** Gráfico de amplificación de RANKL mediante PCR tiempo real. El dato menor de cada duplicado de cada individuo fue graficado como la señal de fluorescencia DRn vs. el número de ciclo, usando la ecuación  $DRn = Rn^x - Rn$ . El límite umbral fue establecido mediante el método de los replicados. El valor Ct se define como el número de ciclo de amplificación en el cual DRn cruza este umbral.

La síntesis de RANKL espontánea y en cultivo celular estimulado con LPS 0,1  $\mu\text{g/ml}$ , PHA 5  $\mu\text{g/ml}$ , extracto bacteriano de *P. gingivalis* 1:1000 e IL-2 5  $\mu\text{g/ml}$  más IL-15 2  $\mu\text{g/ml}$ , de células gingivales totales extraídas por digestión enzimática tisular se muestran en la Tabla 4 y en la Figura 4. Se observan significativamente mayores niveles de RANKL en cultivos controles sin estimulación ( $18,4 \pm 5,79$  vs.  $8,0 \pm 1,34$ ) y en cultivos estimulados con LPS ( $33,8 \pm 7,30$  vs.  $21,0 \pm 5,60$ ) y PHA ( $30,1 \pm 7,77$  vs.  $14,5 \pm 3,57$ ) en los individuos con periodontitis en comparación a sujetos periodontalmente sanos. Además se observa que LPS y PHA estimulan en forma significativa la síntesis de RANKL en el grupo de pacientes con periodontitis ( $33,8 \pm 7,30$  y  $30,1 \pm 7,77$ , respectivamente, vs.  $18,4 \pm 5,79$ ) y en el grupo de individuos periodontalmente sanos ( $21,0 \pm 5,60$  y  $14,5 \pm 3,57$ , respectivamente, vs.  $8,0 \pm 1,34$ ).



**Figura 2B.** Eficiencia de amplificación de GAPDH y RANKL. Diluciones seriadas de cDNA fueron amplificadas y el  $\Delta\text{Ct}$  fue calculado para cada una ( $n=3$ ). La pendiente fue 0,0752, así, la eficiencia de amplificación fue similar y la cuantificación relativa de RANKL puede ser determinada mediante el método  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ .

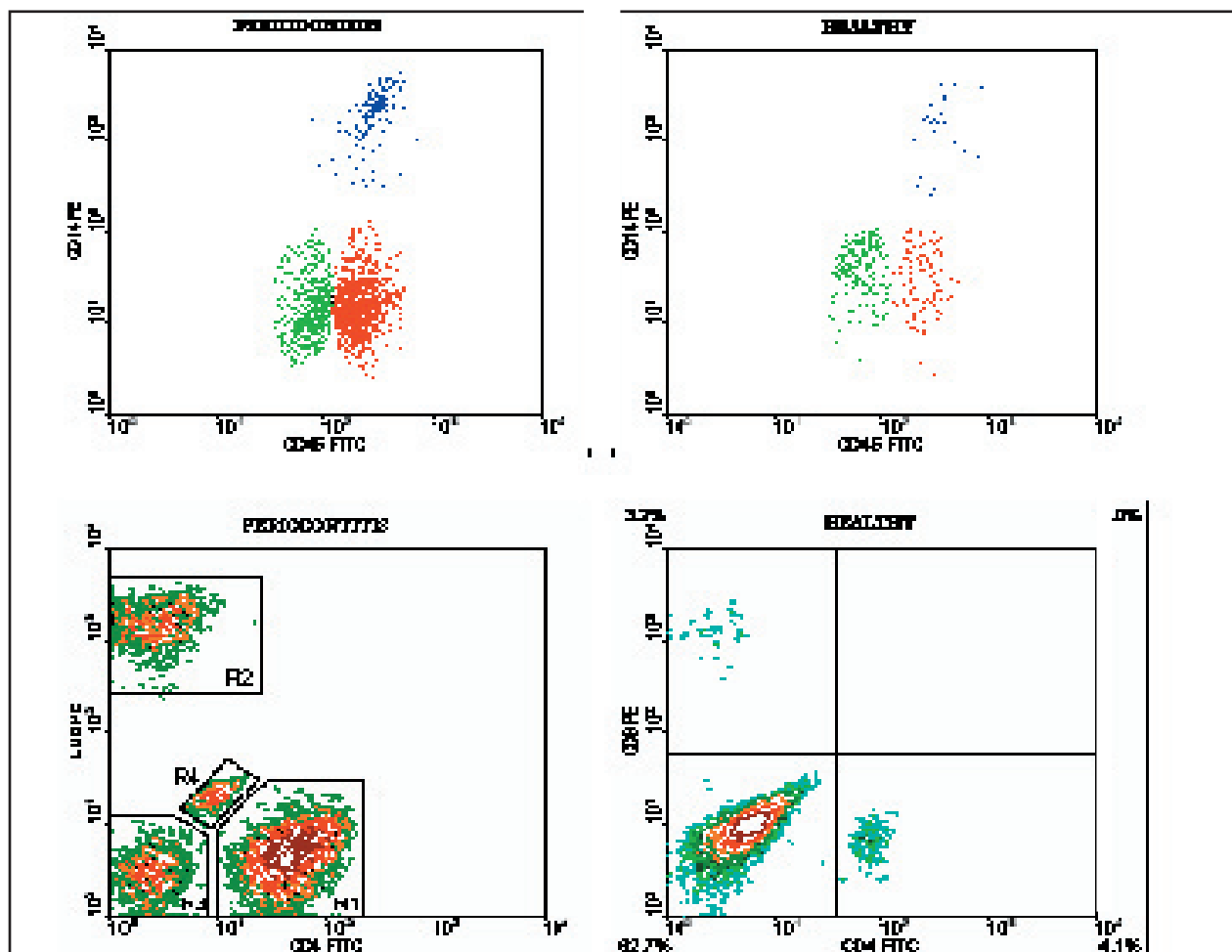
### Identificación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y RANKL mediante inmunohistoquímica en biopsias de encía

La Figura 5A-C corresponden a cortes histológicos transversales a nivel radicular medio de un incisivo central izquierdo de rata sometido a fuerza distal parafuncional utilizado como control positivo. La Figura 5A corresponde una imagen panorámica que muestra las zonas B y C ampliadas. La Figura 5B muestra una ampliación de los tejidos periodontales y se individualiza la reacción positiva anti-RANKL evaluada mediante inmunoperoxidasa. Se observa una clara inmunoreacción focalizada en el ligamento periodontal inmediatamente subyacente y en estrecha relación con el hueso alveolar (flechas verdes), además se observa inmunoreacción levemente difusa perivascular (flechas azules). Su correlación con la reacción TRAP, marcador fenotípico de poblaciones celulares osteoclasticas, se muestra en la Figura 5C. Se observa reacción positiva en células con fenotipo de osteoclasto en relación estrecha a lagunas reabsortivas en la superficie del hueso alveolar (flechas rojas).

**Tabla 3**  
**Leucocitos infiltrantes gingivales obtenidos por digestión enzimática de biopsias gingivales (promedio ± DS)**

	Periodontitis	Sanos	p
Linfocitos	58,5 ± 18,45	41,5 ± 0,89	0,03
Granulocitos	34,9 ± 19,10	49,5 ± 2,73	
Monocitos	6,6 ± 3,86	9,1 ± 1,84	
Linf T CD4	29,1 ± 18,78	4,6 ± 0,25	0,006
Linf T CD8	13,7 ± 7,23	3,3 ± 0,15	0,004
CD4/CD8	1,9 ± 0,87	1,4 ± 0,01	

Leucocitos infiltrantes gingivales (% de células). CD4/CD8: Relación entre Linf T CD4 y



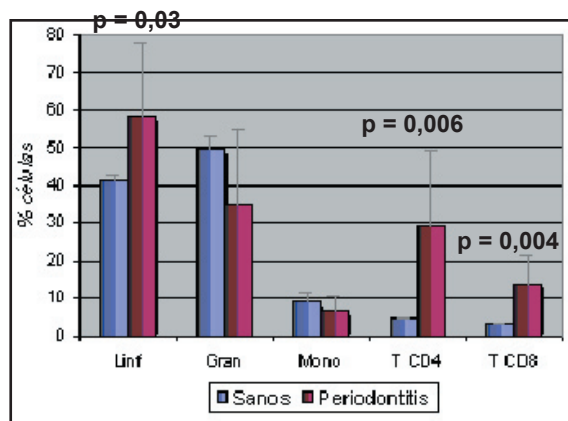
**Figura 3A.** Inmuntipificación por citometría de flujo de leucocitos infiltrantes gingivales obtenidos por digestión enzimática de biopsias gingivales de muestras representativas de un paciente con periodontitis y de un individuo periodontalmente sano (%). LeucoGATE dotplot (superiores): Rojo: linfocitos (55,8% vs. 40,6%). Verde: granulocitos (52,2% vs. 34,9%). Azul: monocitos (9,2% vs. 7,24%). TriTEST<sup>CD4/CD8/CD3</sup> contourplot (inf.): Periodontitis: CD4 56,7% y CD8 21,7%. Control sano: CD4 4,1% y CD8 3,2%.

**Tabla 4**  
**Síntesis espontánea y estimulada de RANKL en Cultivo Celular (promedio ± DS)**

	Periodontitis	Sanos
Control	18,4 ± 5,79 <sup>1,2,4</sup>	8,0 ± 1,34 <sup>1,3,5</sup>
IL-2 + IL-15	23,00 ± 6,08	13,35 ± 2,26
Pg	27,41 ± 11,86	11,88 ± 2,47
PHA	30,1 ± 7,77 <sup>6,2</sup>	14,5 ± 3,57 <sup>6,3</sup>
LPS	33,8 ± 7,30 <sup>7,4</sup>	21,0 ± 5,60 <sup>7,5</sup>

Síntesis *in vitro* de RANKL (pg/ml). Control: niveles espontáneos, sin estimulación, de síntesis de RANKL. IL-2: Interleuquina 2. IL-15: Interleuquina 15. Pg: extracto bacteriano de *P. gingivalis*. PHA: Fitohemaglutinina. LPS: Lipopolisacárido de *E. coli*.

1 Control	Periodontitis vs. Sanos	p = 0,002
2 Periodontitis	PHA vs. Control	p = 0,007
3 Sanos	PHA vs. Control	p = 0,044
4 Periodontitis	LPS vs. Control	p = 0,0007
5 Sanos	LPS vs. Control	p = 0,025
6 PHA	Periodontitis vs. Sanos	p = 0,002
7 LPS	Periodontitis vs. Sanos	p = 0,02



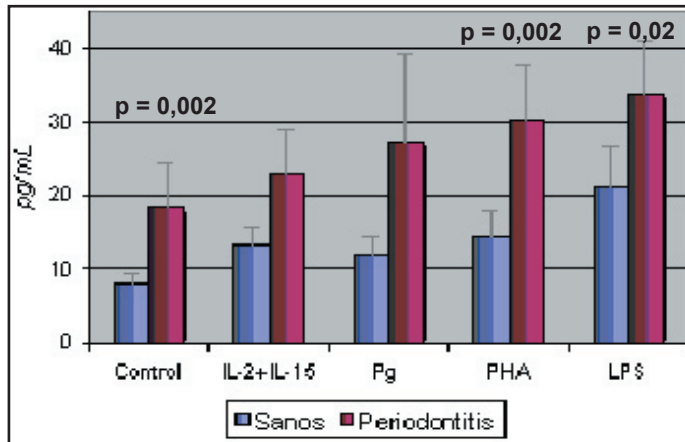
**Figura 3B. Inmunotipificación por citometría de flujo de leucocitos infiltrantes gingivales obtenidos por digestión enzimática de biopsias gingivales (% de células).**

La inmunoreacción positiva para RANKL y para CD4 mediante inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia y la colocalización entre inmunoreacción positiva para RANKL y CD4 en biopsias gingivales se muestran en las Figuras 6A-F. La Figura 6A muestra la inmunoreacción positiva para RANKL por inmunoperoxidasa en un individuo con periodontitis. Se observa una reacción positiva en forma difusa en todo el tejido conec-

tivo gingival con mayor intensidad de reacción en la profundidad de la lesión, principalmente relacionada a la periferia de capilares y vénulas gingivales. Una inmunoreacción positiva para CD4 por inmunoperoxidasa en periodontitis se muestra en la Figura 6B. Se observa una inmunoreacción marcada y dispersa en todo el tejido conectivo gingival. En las figuras 6C para periodontitis y 6D en un individuo sano se muestra inmunoreacción positiva para RANKL por inmunofluorescencia. En periodontitis sólo en el tejido conectivo gingival en estrecha relación a la pared blanda del saco periodontal muestra reacción RANKL<sup>+</sup>. La Figura 6E y 6F muestran colocalización de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y reacción positiva para RANKL en la profundidad del tejido conectivo gingival en la región próxima al foco de la infección.

## DISCUSIÓN

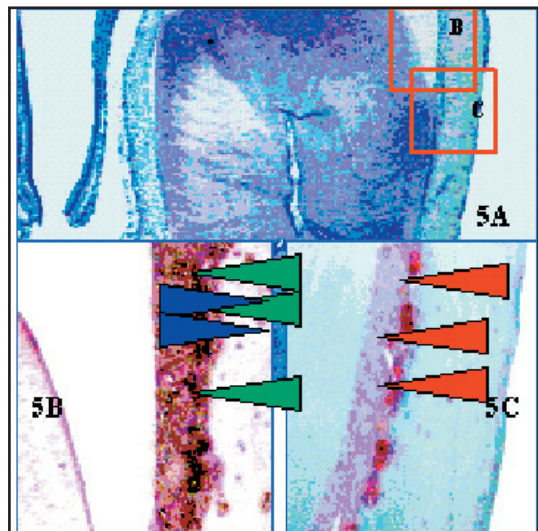
Aunque la periodontitis es una de las más prevalentes enfermedades humanas asociadas a la pérdida de hueso, el mecanismo de formación de osteoclastos y la destrucción de hueso durante



**Figura 4.** Síntesis espontánea y estimulada de RANKL en cultivo celular de células gingivales obtenidas por digestión enzimática tisular (promedio  $\pm$ DS).

esta enfermedad aún son pobremente comprendidos. Mientras, es ampliamente aceptado y corroborado en la literatura científica que citoquinas pro-inflamatorias que estimulan la reabsorción de hueso, tal como  $IL-1_{\beta}$ ,  $TNF_{\alpha}$ ,  $PGE_2$ ,  $INF_{\gamma}$  e  $IL-6$  (Ishihara y cols., 1997; Rasmussen y cols., 2000; Bickel y cols., 2001) están presentes en los tejidos periodontales en la periodontitis, el rol de los mediadores claves de la diferenciación y activación de osteoclastos, RANKL, RANK y OPG, aún no ha sido completamente determinado.

La citoquina RANKL, también conocida como ligando de OPG (OPGL), factor de diferenciación de osteoclastos (ODF) o citoquina inductora de activación relacionada a TNF (TRANCE), miembro TNFSF11 de la superfamilia de receptores y ligandos TNF, estimula directamente la diferenciación y activación de osteoclastos, a través de la interacción con su receptor específico RANK en la superficie de las células progenitoras del linaje osteoclástico y en los osteoclastos maduros. La unión de RANKL a osteoprotegerina (OPG) bloquea su acción en el receptor RANK, también denominado receptor de TRANCE (TRANCE-R), receptor de diferenciación y activación de osteoclastos (ODAR), miembro TNFRSF11A. OPG, también conocida como factor inhibidor de la osteoclastogénesis (OCIF), miembro TNFR SF11B, actúa como un receptor bloqueador de RANKL, provocando efectos opuestos a los de RANKL en el metabolismo óseo (Lacey y cols., 1998; Yasuda y cols., 1998; Burgess y



**Figura 5A.** Imagen panorámica de un corte transversal a nivel radicular medio de un incisivo de rata izquierdo sometido a fuerza distal parafuncional. **Figura 5B.** Inmunoreacción positiva anti-RANKL evaluada mediante inmunoperoxidasa (flechas rojas y verdes). **Figura 5C.** Reacción positiva TRAP asociada con células con fenotipo de osteoclasto (flechas rojas).

cols., 1999; Kwon y cols., 1999; Takahashi y cols., 1999; Hofbauer y Heufelder, 2001; Blaque y James, 2003).

En este estudio examinamos los niveles de mRNA de RANKL en los tejidos gingivales mediante RT-PCR en tiempo real. Nuestros datos demuestran que todos los pacientes con periodontitis mostraron niveles detectables de mRNA de RANKL y estos fueron significativamente mayores que los encontrados en sujetos periodontalmente sanos. Como RANKL es la señal final común esencial requerida para la completa diferenciación de los precursores celulares hematopoyéticos totipotenciales en osteoclastos multinucleados y la activación de ellos como células osteodestructivas (Lacey y cols., 1998; Nakagawa y cols., 1998; Burgess y cols., 1999; Kong y cols., 1999A y 1999B; Takahashi y cols., 1999), y a que ha sido demostrado que  $TNF_{\alpha}$ ,  $IL-1_{\beta}$ ,  $IL-6$

y PGE<sub>2</sub> aumentan los niveles de RANKL a nivel proteína y mRNA (Nakashima y cols., 2000), podría correlacionarse la presencia de mayores niveles de esta citoquina osteoclastogénica con la destrucción ósea alveolar y dar una explicación biológica comprensible a la pérdida de dientes consecutiva a la periodontitis. Estos resultados son concordantes con estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo donde demostramos que la proteína RANKL está presente en el FGC de pacientes adultos afectados por periodontitis crónica en niveles significativamente mayores a los observados en individuos periodontalmente sanos (Vernal y cols., 2004).

Nosotros demostramos que el Ct y el  $\Delta$ Ct de RANKL fueron menores en pacientes con periodontitis en comparación a individuos periodontalmente sanos. Dado que el Ct es inversamente proporcional a la cantidad de mRNA presente (Giulietti y cols., 2001), los niveles de mRNA de RANKL fueron mayores en el grupo de individuos con periodontitis en relación al grupo control. Al igual que en los hallazgos mediante análisis por RT-PCR semicuantitativo realizados por Liu y colaboradores (Liu y cols., 2003), todos los pacientes con periodontitis estudiados mostraron niveles detectables de mRNA de RANKL mediante RT-PCR en tiempo real. En nuestro estudio por RT-PCR cuantitativo, todos los sujetos con periodontitis mostraron un Ct de mRNA de RANKL más bajo que la Ct media del grupo control ( $36,514 \pm 2,67$ ), excepto un caso, con un Ct de 35,644 (Tabla 2A).

Nosotros estudiamos los niveles de mRNA de RANKL en los tejidos periodontales mediante RT-PCR en tiempo real porque esta técnica ha sido calificada como el método de elección para cuantificar citoquinas que expresan bajos niveles de mRNA (Giulietti y cols., 2001). Además, la expresión de mRNA de RANKL normalizado a GAPDH permite la cuantificación relativa de la expresión de RANKL en los tejidos periodontales (Giulietti y cols., 2001; Livak y Schmittgen,

2001). GAPDH fue seleccionado como control interno de la técnica debido a que es un gen housekeeping, sintetizado en niveles muy poco fluctuantes en todos los tipos celulares nucleados del organismo, dado que codifica para una enzima de la vía metabólica glicolítica, indispensable para la sobrevivencia celular (Thellin y cols., 1999). Numerosos estudios han mostrado que los genes housekeeping podrían expresarse en niveles variables en determinados estados metabólicos de las células. Nuestros resultados indican que no existen diferencias significativas en el nivel de expresión del gen GAPDH entre los individuos del grupo experimental y control, de esta forma, en este estudio GAPDH puede ser utilizado como estándar interno sin problemas metodológicos.

Utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001), que permite normalizar la expresión del gen blanco a la del housekeeping, dándole un valor uno en el grupo control, y posibilita la cuantificación en forma relativa a este referente, esto es, las veces que este gen blanco está sobre-expresado en el grupo experimental, nuestros datos muestran que en los individuos con periodontitis la expresión de RANKL se encuentra incrementada en 238,3 veces en comparación a los sujetos sanos, con un rango de error estimado de 29,8 a 1903,4 veces, indicando una sobre-expresión del gen RANKL en los tejidos periodontales asociados con destrucción ósea alveolar.

Biopsias de tejidos gingivales fueron sometidas a digestión enzimática tisular para el aislamiento de células periodontales totales. Mediante citometría de flujo se determinó que los pacientes con periodontitis mostraron un infiltrado de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, y una razón CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> significativamente mayor que en individuos periodontalmente sanos. Estudios clásicos han establecido un predominio de infiltrado linfocitario en especímenes gingivales humanos sometidos a lesión periodontal experimental a partir de una a dos semanas de interrumpida la

higiene oral (Zachrisson, 1968; Payne y cols., 1975). Seymour y colaboradores establecieron mediante inmunohistoquímica de muestras gingivales de estudiantes de odontología sometidos a lesiones periodontales experimentales que un predominio de linfocitos en el infiltrado inflamatorio se establecía al día 21 del período experimental (Seymour y cols., 1983A), observando que en todas las lesiones estudiadas alrededor del 70% correspondía al subtipo T (Seymour y cols., 1983B). En concordancia con esos trabajos, nuestro estudio estableció que en los individuos con periodontitis los linfocitos son el tipo celular predominante del foco inflamatorio establecido, con un predominio de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> sobre los CD8<sup>+</sup> (Seymour y cols., 1983A; Seymour y cols., 1983B; Johannessen y cols., 1990). Los individuos periodontalmente sanos mostraron niveles más bajos de células de naturaleza inflamatoria, con significativamente menores niveles de linfocitos y un predominio de granulocitos. Los individuos controles, definidos como periodontalmente sanos, se establecieron sobre la base de los parámetros clínicos establecidos en los criterios de inclusión del estudio. La presencia de células de naturaleza inflamatoria, como los polimorfonucleares neutrófilos, se consideran normales en tejidos gingivales clínicamente sanos, participan en la homeostasis de los tejidos, infiltrando el tejido conectivo gingival desde los plexos capilares fenestrados subepiteliales y migrando al surco gingivodentario a través del epitelio de unión, conformando la primera barrera defensiva del organismo ante la constante injuria bacteriana surcular (Darveau y cols., 1997; Denison y Van Dyke, 1997; Kornman y cols., 1997). Por otro lado, signos histológicos de inflamación pueden aparecer en respuesta a acumulación de placa bacteriana clínicamente no visible, sin manifestar signos clínicos de inflamación (Payne y cols., 1975; Schroeder y Lindhe, 1975).

En cultivos de células periodontales totales se determinó significativamente mayor síntesis de RANKL en cultivos controles sin estimulación

y en cultivos estimulados con LPS y PHA en los individuos con periodontitis en comparación a sujetos periodontalmente sanos. LPS ha sido ampliamente utilizado en la literatura científica como estimulante *in vitro* de la síntesis de citoquinas, así, fue seleccionado por nosotros como estímulo control positivo de la respuesta a estudiar (Andersson y cols., 1992; Kreutz y cols., 1997; Takeichi y cols., 1998; Dai y cols., 2003). PHA es una lectina vegetal que se une específicamente a ciertos residuos azúcares en el TCR y CD3 de los linfocitos T, induciendo una respuesta funcional policlonal celular, por lo que es comúnmente utilizado para la activación *in vitro* de células T (Abbas y cols., 2000). El extracto bacteriano de *P. gingivalis* fue seleccionado debido a que es un patógeno periodontal causal de la enfermedad (Darveau y cols., 1997; Zambon, 1996), y las interleuquinas 2 y 15 debido a que han sido ampliamente utilizadas para la estimulación *in vitro* de poblaciones celulares linfocitarias, específicamente células natural killer (NK) (Ross y Caligiuri, 1997). Nuestros resultados muestran que los niveles de RANKL estimulados con extracto bacteriano de *P. gingivalis* y con la mezcla de interleuquinas 2 y 15 también fueron mayores en los pacientes periodontalmente afectados en comparación a los sanos, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Una posible explicación puede encontrarse en el hecho que el extracto bacteriano de *P. gingivalis* estimula la respuesta inmune inespecífica, por lo que un proceso de presentación de antígenos previo a la activación de los linfocitos T es necesario. En condiciones en cultivo celular los mecanismos de comunicación intercelular no reflejan la realidad *in vivo*, así, el proceso de presentación de antígenos no ocurre favorablemente, y la estimulación de la respuesta inmune adquirida, en este caso de los linfocitos T, es incompleta.

Por otro lado, y en referencia a la síntesis de RANKL en cultivos celulares estimulados por interleuquinas 2 y 15, las diferencias no significativas pueden ser explicadas por el hecho que,

aunque IL-15 es un factor de crecimiento de células T, existen antecedentes que IL-2 limitaría la expansión clonal de los linfocitos T vía desregulación de la expresión de  $\gamma$ -c, induciendo incluso apoptosis *in vivo* (Li y cols., 2001). Nuestros datos muestran que LPS y PHA estimulan en forma significativa la síntesis de RANKL en el grupo de pacientes con periodontitis y en el grupo de individuos periodontalmente sanos, comparado con la síntesis espontánea, así, podemos suponer que esta mayor estimulación de síntesis de RANKL se debe principalmente a la acción de linfocitos T estimulados específicamente por PHA, y que los mayores niveles de RANKL en pacientes con periodontitis en comparación a individuos periodontalmente sanos puede encontrar claro fundamento biológico en el accionar de los linfocitos T predominantemente infiltrantes de los tejidos afectados.

Estos resultados son concordantes con nuestros hallazgos en donde en cultivos de células gingivales totales evidenciamos mayor síntesis espontánea y estimulada con PHA de IL-17 en pacientes con periodontitis en comparación a sujetos sanos, asociando esta mayor síntesis a la actividad de los linfocitos T (Vernal y cols., 2005).

Los mayores niveles de inmunoreacción para CD4 encontrados en nuestras muestras de tejido analizadas por inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia confirman nuestros hallazgos mediante citometría de flujo y los reportados anteriormente, con un predominio de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en los leucocitos infiltrantes gingivales de individuos afectados por periodontitis *versus* sujetos sanos (Zachrisson, 1968; Payne y cols., 1975; Seymour y cols., 1983A; Seymour y cols., 1983B; Johannessen y cols., 1990).

También mediante inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia confirmamos nuestros datos previos obtenidos mediante ELISA en FGC y en sobrenadantes de cultivos celulares gingivales y mediante RT-PCR en tiempo real, que mayores niveles de

RANKL se asocian a individuos con periodontitis sobre sujetos controles sanos. Datos semejantes fueron encontrados mediante inmunohistoquímica en tejido de granulación próximo a la zona de osteolisis en sujetos periodontalmente afectados (Crotti y cols., 2003). Una clara inmunoreacción positiva anti-RANKL fue detectada preferentemente en la profundidad del tejido conectivo gingival, en el foco inflamatorio-destructivo próximo al saco periodontal, lo que claramente responde a la principal fuente de RANKL por nosotros propuesta, la zona con predominio de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. A través de la colocalización de inmunoreacción positiva obtenida con anticuerpos monoclonales específicos anti-RANKL y anti-CD4, observados mediante microscopía confocal, claramente concluimos que linfocitos T CD4<sup>+</sup> infiltrantes de los tejidos periodontales de pacientes con periodontitis expresan en superficie RANKL unido a membrana, y como ha sido anteriormente propuesto, contribuirían al desbalance en los procesos celulares acoplados de la remodelación ósea a través de una pérdida de los niveles fisiológicos locales de RANKL, lo que provocaría una alteración en el número y actividad de los osteoclastos y resultaría en una inapropiada alta tasa de reabsorción ósea que excede la capacidad compensatoria de los osteoblastos (Schwartz y cols., 1997; Hofbauer y Heufelder, 2001; Taubman y Kawai, 2001).

Un papel fundamental de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en la patogenia de la enfermedad periodontal ha sido recientemente establecida por Baker y colaboradores. En un modelo de ratas knockout para la actividad de células T CD4<sup>+</sup> mediante la delección del complejo mayor de histocompatibilidad MHC tipo II se estableció en un 70% menor pérdida de hueso alveolar en respuesta a la infección oral por *P. gingivalis* en comparación con ratas inmunocompetentes (Baker y cols., 2001). Las células T no son requeridas para la homeostasis ósea normal, porque ratas deficientes en células T tienen estructura ósea normal y proceso normal de erupción dentaria (Kong y cols., 1999B), pero



en estados patológicos como la periodontitis la actividad de los linfocitos T resultante puede promover la reabsorción de hueso.

Tomados en conjunto nuestros datos nos permiten establecer que mayores niveles de RANKL se encuentran asociados con individuos afectados por periodontitis en comparación con sujetos control periodontalmente sanos, y que en ellos los linfocitos T CD4<sup>+</sup> juegan un papel fundamental en el desbalance del eje RANKL-RANK-OPG. Aunque algunos estudios no descartan que otros tipos celulares, tal como osteoblastos, macrófagos, fibroblastos y células tumorales, expresarían RANKL en condiciones patológicas (Huang y cols., 2000; Hasegawa y cols., 2002; Crotti y cols., 2003; Tay y cols., 2004), estudios adicionales son necesarios para resolver la real participación de ellos en la enfermedad. El mayor predominio de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en los sitios periodontales afectados por destrucción ósea y su actividad mediante la secreción de citoquinas proinflamatorias y pro-osteodestructivas, tal como RANKL, nos permite explicar, al menos en parte, los fenómenos etiopatogénicos que llevan a la destrucción de hueso alveolar y la consecutiva pérdida de dientes observada en la periodontitis.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and molecular immunology*. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders Co; 2000. p. 161-182.
2. Andersson J, Bjork L, Dinarello CA, Towbin H, Andersson U. Lipopolysaccharide induces human interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 production in the same cell. *Eur J Immunol* 1992; 22: 2617-2623.
3. Baker PJ, Garneau J, Howe L, Roopenian DC. T-cell contributions to alveolar bone loss in response to oral infection with *Porphyromonas gingivalis*. *Acta Odontol Scand* 2001; 59: 222-225.
4. Bickel M, Axtelius B, Solioz C, Attstrom R. Cytokine gene expression in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001; 28: 840-847.
4. Blaque S, James I. RANKL (Receptor Activator of NFκB Ligand). In: Thomson AW, Lotze MT (eds.). *The cytokine handbook*. Academic Press; 2003. p. 871-883.
5. Boyce BF, Hughes DE, Wright KR, Xing L, Dai A. Recent advances in bone biology provide insight into the pathogenesis of bone diseases. *Lab Invest* 1999; 79: 83-94.
6. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; 423: 337-342.
7. Burgess TL, Quian Y-X, Kaufman S, et al. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol* 1999; 145: 527-538.
8. Crotti T, Smith MD, Hirsch R, et al. Receptor activator NF κB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *J Periodont Res* 2003; 38: 380-387.
9. Dai Y, Datta S, Novotny M, Hamilton TA. TGFβ inhibits LPS-induced chemokine mRNA stabilization. *Blood* 2003; 102: 1178-1185.
10. Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol* 2000 1997; 14: 12-32.
11. Dennison DK, Van Dyke TE. The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease. *Periodontol* 2000 1997; 14: 54-78.
12. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 2001; 25: 386-401.
13. Greenfield EM, Bi Y, Miyauchi A. Regulation of osteoclast activity. *Lif Sci* 1999; 65: 1087-1102.
14. Hasegawa T, Yoshimura Y, Kikuri T, et al. Expression of receptor activator of NF-kappa B ligand and osteoprotegerin in culture of human periodontal ligament cells. *J Periodontol Res* 2002; 37: 405-411.
15. Hill PA, Orth M. Bone remodeling. *Br J Orthod* 1998; 25: 101-107.
16. Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor-κB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med*

- 2001; 79: 243-253.
17. Huang L, Xu J, Wood DJ, Zheng MH. Gene expression of osteoprotegerin ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF- $\kappa$ B in giant cell tumor of bone. Possible involvement in tumor cell-induced osteoclast-like cell formation. *Am J Pathol* 2000; 156: 761-767.
  18. Ishihara Y, Nishihara T, Kuroyanagi T, *et al.* Gingival crevicular interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist levels in periodontally healthy and diseased sites. *J Periodont Res* 1997; 32: 524-529.
  19. Johannessen AC, Nilsen R, Kristoffersen T, Knudsen GE. Variation in the composition of gingival inflammatory cell infiltrates. *J Clin Periodontol* 1990; 17: 298-305.
  20. Kong YY, Feige U, Sarosi I, *et al.* Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 1999(A); 402: 304-309.
  21. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, *et al.* OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999(B); 397: 315-323.
  22. Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000* 1997; 14: 33-53.
  23. Kreutz M, Ackermann U, Hauschildt S, *et al.* A comparative analysis of cytokine production and tolerance induction by bacterial lipopeptides, lipopolysaccharides and *Staphylococcus aureus* in human monocytes. *Immunology* 1997; 92: 396-401.
  24. Kwon B, Youn BS, Kwon BS. Functions of newly identified members of the tumor necrosis factor receptor/ligand superfamilies in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 340-345.
  25. Lacey DL, Timms E, Tan H-L, *et al.* Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; 93: 165-176.
  26. Li XC, Demirci G, Ferrari-Lacraz S, *et al.* IL-15 and IL-2: a matter of life and death for T cells in vivo. *Nat Med* 2001; 7: 114-148.
  27. Liu D, Xu JK, Figliomeni L, *et al.* Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: Possible involvement in bone destruction. *Int J Molec Med* 2003; 11: 17-21.
  26. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-DDCt</sup> method. *Methods* 2001; 25: 402-408.
  27. Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, *et al.* RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 253: 395-400.
  28. Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, *et al.* Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 275: 768-775.
  29. Offenbacher S. Periodontal Diseases: Pathogenesis. *Ann Periodontol* 1996; 1: 821-872.
  30. Payne WA, Page RC, Ogilvie AI, Hall WB. Histopathologic features of the initial and early stages of experimental gingivitis in man. *J Periodontal Res* 1975; 10: 51-64.
  31. Rasmussen L, Hanstrom L, Lerner U. Characterization of bone resorbing activity in gingival crevicular fluid from patients with periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000; 27: 41-52.
  32. Ross ME, Caligiuri MA. Cytokine-induced apoptosis of human natural killer cells identifies a novel mechanism to regulate the innate immune response. *Blood* 1997; 89: 910-918.
  33. Schroeder HE, Lindhe J. Conversion of established gingivitis in the dog into destructive periodontitis. *Arch Oral Biol* 1975; 10: 775-782.
  34. Schwartz Z, Goultschin J, Dean DD, Boyan, BD. Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. *Periodontol 2000* 1997; 14: 158-172.
  35. Seymour GJ, Powell RN, Aitken JF. Experimental gingivitis in humans. A clinical and histologic investigation. *J Periodontol* 1983(A); 54: 522-528.
  36. Seymour GJ, Powell RN, Cole KL, *et al.* Experi-

- mental gingivitis in humans. A histochemical and immunological characterization of the lymphoid cell subpopulations. *J Periodont Res* 1983(B); 18: 375-385.
37. Sodek J, McKee MD. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol 2000* 2000; 24: 99-126.
  38. Takahashi N, Udagawa N, Suda T. A new member of Tumor Necrosis Factor Ligand Family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 256: 449-455.
  39. Takeichi O, Saito I, Okamoto Y, Tsurumachi T, Saito T. Cytokine regulation on the synthesis of nitric oxide *in vivo* by chronically infected human polymorphonuclear leucocytes. *Immunol* 1998; 93: 275-280.
  40. Taubman MA, Kawai T. Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001; 12: 125-135.
  41. Tay JYY, Bay BH, Yeo JF, Harris M, Meghji S, Dheen ST. Identification of RANKL in osteolytic lesions of the facial skeleton. *J Dent Res* 2004; 83: 349-353.
  42. Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 1999; 75: 291-295.
  43. Van Dyke TE, Lester MA, Shapira L. The role of host response in periodontal disease progression: implications for future treatment strategies. *J Periodontol* 1993; 64: 792-806.
  44. Vernal R, Chaparro A, Graumann R, Puente J, Valenzuela MA, Gamonal J. Levels of cytokine receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand in gingival crevicular fluid in untreated chronic periodontitis patients. *J Periodontol* 2004; 75: 1592-1597.
  45. Vernal R, Dutzan N, Chaparro A, Puente J, Valenzuela MA, Gamonal J. Levels of interleukin-17 (IL-17) in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005; 32(4) (en prensa).
  46. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, *et al.* Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteo-protegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Aca Sci USA* 1998; 95: 3597-3602.
  47. Zambon JJ. Periodontal Diseases: Microbial factors. *Ann Periodontol* 1996; 1: 879-925.
  48. Zachrisson BU. A histologic study of experimental gingivitis in man. *J Periodont Res* 1968; 3: 293-302.