

UNIVERSIDAD DE VALENCIA



Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Estomatología. Unidad Docente de Médico-Quirúrgica

Programa de doctorado: Fisiopatología del Sistema Estomatognático

**IMPACTO DEL TRATAMIENTO
PERIODONTAL EN EL RATIO RANKL/OPG**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Andrés López Roldán

Dirigida por:

Prof. Dr. Francisco Alpiste Illueca

Prof. Dr. José Luis García Giménez

Valencia, 2015

IMPACTO DEL TRATAMIENTO PERIODONTAL EN EL RATIO RANKL/OPG

Memoria de investigación que presenta:

Andrés López Roldán

Para optar al Grado de Doctor en Odontología por la Universidad de Valencia.

Director:

Prof. Dr. Francisco Alpiste Illueca

Prof. Dr. José Luis García Giménez



Universidad de Valencia

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Estomatología (Unidad docente de Médico-Quirúrgica)

Programa de doctorado: Fisiopatología del Sistema Estomatognático

Valencia, 2015

UNIVERSIDAD DE VALENCIA



Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Estomatología.Unidad Docente de Médico-Quirúrgica

Programa de doctorado:Fisiopatología del Sistema Estomatognático

**IMPACTO DEL TRATAMIENTO
PERIODONTAL EN EL RATIO RANKL/OPG**

TESIS DOCTORAL

Andrés López Roldán

2015

Don Francisco Alpiste Illueca, profesor contratado doctor del Departamento de Estomatología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València.

Don José Luis García Giménez investigador post-doctoral del Centro de Investigación Biomédica en Red del Instituto de Salud Carlos III.

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral titulada “IMPACTO DEL TRATAMIENTO PERIODONTAL EN EL RATIO RANKL/ OPG”, de la que es autor don Andrés López Roldán, ha sido realizada en este departamento bajo la dirección y supervisión de ambos codirectores, reuniendo todos los requisitos para ser presentada y defendida para la obtención del Grado de Doctor en Odontología por esta Universidad.

Y para que conste, a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Valencia, a 5 del mes de Octubre de 2015.

Fdo. Francisco Alpiste Illueca

Fdo. José Luis García Giménez

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, al Prof. Dr. Francisco Alpiste Illueca, por su dedicación, esfuerzo e ilusión en este proyecto, por los importantes aportes, críticas y sugerencias en su elaboración, y, finalmente, por su apoyo y confianza personal.

A José Luís García Giménez, por su ejemplaridad como profesional de la investigación, por haber sacado tiempo para codirigirme este trabajo, por su ayuda siempre que se lo he pedido.

A todos los compañeros de la Unidad Docente de Periodoncia, agradecerles el apoyo durante todos los años que hemos compartido juntos.

A mis compañeros de master donde comenzó todo este proyecto hace unos años. Toni, Juan, Carla y M^a Salut gracias por la sinceridad, buen ambiente y buenos momentos que hemos compartido y que compartiremos.

A Javi Molina, antiguo alumno y ahora compañero por ayudarme al duro trabajo de campo de esta investigación.

A mis padres Ovidia y Andrés por la ilusión y confianza depositadas en mí, y por todo el esfuerzo que han dedicado a mi durante toda la vida, gracias por estar ahí.

ÍNDICE

ÍNDICE:

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Introducción	p. 10
2. Revisión Bibliográfica	p. 14
2.1. Definición y clasificación de la periodontitis	p.15
2.2.Histopatogenia de la periodontitis	p.17
2.3.Fisiologia del tejido óseo: Osteoclastogénesis	p.20
1. Componente celular	p.20
2. Componente molecular	p.21
1. Eje RANK/RANKL/OPG	p.21
2. Osteoinmunología	p.24
3. Citocinas reguladoras de la osteoclastogénesis	p.25
2.4 Papel del eje RANK/RANKL/OPG en la patogenia periodontal	p.33
2.5 Niveles de RANKL/OPG en función del grado de salud periodontal.	p.37
2.6 Tratamiento periodontal y valores de RANKL-OPG	p.50
2.7 Fluido crevicular	p.54
3. Justificación e hipótesis de trabajo	p.58
4. Objetivos	p.61

CAPITULO II:METODOLOGIA

5. Materiales y métodos	p.64
5.1 Diseño del estudio	p.65
5.2 Muestra	p.65
5.2.1 Tamaño muestral	p.65
5.2.2 Criterios de inclusión	p.66
5.2.3 Criterios de exclusión	p.67
5.2.4 Criterios de exclusión durante el estudio	p.67
5.3 Materiales	p.67
5.4 Registros clínicos	p.69

5.5 Registros de laboratorio	p.72
5.5.1 Cantidad de fluido crevicular	p.72
5.5.1.1 Calibrado del periotron	p.72
5.5.1.2 Toma y procesado del fluido crevicular	p.72
5.6 Ensayo Elisa para la detección de OPG y RANKL	p.74
5.6.1 Kit aplicado para detectar RANKL	p.76
5.6.2 Kit aplicado para detectar OPG	p.79
5.7 Intervención en individuos con periodontitis	p.82
5.8 Secuencia de desarrollo del estudio	p.82
5.9 Estudio estadístico	p.83

CAPITULO III: RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

6. Resultados	p.86
6.1 Resultados moleculares: objetivo principal	p.87
6.1.1 Resultados primer objetivo principal	p.87
6.1.2 Resultados segundo objetivo principal	p.99
6.2 Resultados clínicos: objetivo secundario	p.114
6.2.1 Profundidad de sondaje	p.114
6.2.2 Nivel de inserción clínica	p.116
6.2.3 Sangrado localizado	p.118
6.2.4 Sondaje medio	p.118
6.3 Resultados de calibración del periotron 8000 ®:Objetivo secundario	p.119
6.4 Volumen fluido crevicular: Objetivo secundario	p.122
6.5 Resumen	p.126
7. Discusión	p.128

CAPITULO IV: CONCLUSIONES FINALES

8. Conclusiones	p.140
-----------------	-------

CAPITULO V: BIBLIOGRAFÍA

9. Bibliografía	p.144
-----------------	-------

CAPITULO I:
INTRODUCCIÓN GENERAL

1. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades periodontales son un conjunto de cuadros clínicos que afectan a las estructuras de soporte del diente. Los dos grandes grupos clínicos son la gingivitis y la periodontitis (Armitage,1999).

La gingivitis es una inflamación localizada en los tejidos del periodonto marginal; sin embargo, la periodontitis es un proceso inflamatorio que se extiende a los tejidos de soporte del diente y se caracteriza por la migración apical del epitelio de unión y por la destrucción progresiva del ligamento periodontal y del hueso alveolar.

La importancia del estudio y tratamiento de estas enfermedades radica en la alta prevalencia y las consecuencias clínicas. La continua pérdida de soporte periodontal acaba con la pérdida dentaria, pero los efectos de esta patología no quedan circunscritos solamente al campo odontoestomatológico. Está ampliamente documentada la relación de la periodontitis como factor de riesgo de determinadas enfermedades sistémicas.

En las últimas décadas, ha habido grandes avances en el campo de la etiopatogenia de la patología periodontal, siendo ésta una entidad compleja donde intervienen factores como la microbiología, hábitos higiénicos, genética o factores modificantes sistémicos; por todas estas razones, actualmente se la considera una enfermedad multifactorial probabilística.

La investigación básica en periodoncia sigue un camino acorde a los avances que se producen en otros campos de la ciencia como en la medicina, biología, bioquímica, etc, de manera que, en la disciplina periodontal, se ha pasado en pocos años, de estudios basados en la anatomopatología, a hoy en día, donde el estudio de la patología se aborda cada vez más a nivel genético y molecular.

La principal característica diferenciadora de la periodontitis con respecto al resto de patologías periodontales es la pérdida de inserción periodontal lo que conlleva de forma explícita la resorción de hueso alveolar. En consecuencia, el objetivo básico del tratamiento es evitar que la pérdida de inserción siga progresando, pero incluso se plantea un objetivo mucho más ambicioso que consiste en recuperar mediante técnicas de regeneración el soporte periodontal perdido.

En cuanto al mecanismo de resorción ósea en la periodontitis, están implicados diversos factores asociados a la respuesta inmunoinflamatoria del hospedador así como innumerables señales paracrinas capaces de estimular o inhibir la pérdida ósea.

INTRODUCCIÓN

Pero, sin duda, un gran paso en el conocimiento del metabolismo óseo fue el descubrimiento, a finales de los años 90, de la ruta molecular RANK/ RANKL/ OPG, siendo ésta la piedra angular del proceso de osteoclastogénesis y, por tanto, el regulador de la resorción ósea (Simonet y cols., 1997, Yasuda y cols., 1998a, Lacey y cols., 1998, Yasuda y cols., 1998b).

El RANKL (Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand) es una proteína estimuladora de la diferenciación de los osteoclastos que ejerce su acción mediante la unión al receptor transmembrana RANK (Receptor Activator for Nuclear Factor κ B), presente en los preosteoclastos; en cambio la OPG (osteoprotegerina) actúa como ligando señuelo uniéndose al RANKL e inhibiendo su acción osteoclastogénica (Boyce,2007). Este descubrimiento ha supuesto un gran avance en el campo médico, con aplicaciones en múltiples enfermedades que cursan con alteraciones del metabolismo óseo, incluido el campo oncológico.

En el terreno concreto de la periodoncia, las primeras investigaciones surgen a principios del siglo XXI. Los resultados de estos estudios sugieren que la existencia de valores elevados de RANKL y niveles bajos de OPG pueden ser claves en la alteración de la homeostasis en el tejido óseo a nivel de los sitios afectados por periodontitis (Crotti y cols., 2003, Nagasawa y cols., 2002, Mogi y cols.,2004).

De todos los métodos utilizados para la detección y cuantificación de estas moléculas, los que pueden tener un mayor interés para su aplicación clínica futura son aquellos que valoran la concentración de estas moléculas a nivel del fluido crevicular, por ser una metodología no invasiva y sencilla de aplicar.

En la actualidad, es deseable obtener mayor y más clara información sobre los niveles de estos mediadores en el fluido crevicular (en situación de salud o de enfermedad periodontal y en sus condiciones de gravedad). De la misma manera sería deseable establecer protocolos claros en cuanto a la metodología de la toma de muestras y en el procesado del laboratorio, ya que ambas cuestiones dificultan la aplicación de estos conocimientos en la práctica clínica.

Aunque estas publicaciones han aportado conocimientos importantes y han planteado hipótesis muy sugerentes para entender mejor los mecanismos de regulación de la remodelación ósea del periodonto, los estudios que valoran la influencia de la terapia

INTRODUCCIÓN

periodontal básica sobre estos marcadores en el paciente con periodontitis son escasos y con una metodología dispar.

Nuevos estudios en esta dirección pueden aportar información que permitan usar la determinación de RANKL y OPG como posibles marcadores de la actividad destructiva de la periodontitis y su utilidad tanto en el diagnóstico, como en las implicaciones en el tratamiento y en la fase de terapia de soporte periodontal.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En este apartado se revisarán algunos conceptos básicos sobre la fisiología y la patología periodontal, ahondándose en los aspectos de mayor interés relacionados con el estudio de esta tesis.

2.1- DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LA PERIODONTITIS

Definición:

La periodontitis es un proceso inflamatorio de origen microbiano que afecta a los tejidos de soporte del diente y se caracteriza por un proceso progresivo de pérdida de hueso y ligamento periodontal (Page and Schroeder, 1976).

Clasificación

La nomenclatura de las enfermedades periodontales utilizadas en este trabajo de investigación es la adoptada en 1999, en el simposio internacional organizado por la Academia Americana de Periodoncia (Armitage, 1999) que clasificó las periodontitis en:

Periodontitis crónica:

Enfermedad infecciosa que causa inflamación de los tejidos de soporte del diente. Se caracteriza por una pérdida progresiva de la inserción periodontal y de hueso. Esta pérdida de inserción ocurre de forma lenta, pero pueden existir periodos de rápida evolución.

Clínicamente se asocia con placa (composición microbiológica variable) y cálculo. Se observan la formación de bolsas periodontales y/o recesiones gingivales. Es la más frecuente de las formas de la periodontitis y sustituye a la denominada periodontitis del adulto, ya que se la considera menos restrictiva en cuanto a la edad. Esta forma de enfermedad periodontal, pese a ser más frecuente en adultos, puede ocurrir en un amplio espectro de edades. La periodontitis crónica puede designarse como localizada o generalizada, según el porcentaje de sitios afectados (menores o mayores al 30%) en boca.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Periodontitis agresiva:

Se la considera un tipo específico de periodontitis identificable por los hallazgos clínicos y de laboratorio. Ocurre en personas sin ningún tipo de enfermedad salvo la periodontal.

Clínicamente se caracteriza por una pérdida rápida del soporte periodontal no relacionada normalmente con grandes cantidades de depósitos microbianos, y se asocia a una tendencia a la agregación familiar. Se han sugerido mecanismos patogénicos específicos como las alteraciones en los neutrófilos y, a nivel microbiológico, elevadas proporciones de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y, en algunas poblaciones, con *Porphyromonas gingivalis*. Este término reemplaza a los antiguos nombres de “periodontitis juvenil localizada” o “periodontitis de inicio temprano localizada”, ya que esta forma de enfermedad puede ocurrir a distintas edades y persistir en adultos. Del mismo modo que en las periodontitis crónicas, también se puede considerar generalizada o localizada. Así pues, la nueva denominación “periodontitis agresiva generalizada” reemplaza a “periodontitis juvenil generalizada” o a “periodontitis de inicio temprano generalizada”. Se descartó el término “periodontitis prepuberal” de la clasificación, y estas formas de periodontitis se incluyeron como periodontitis agresivas localizadas o generalizadas de aparición en la prepubertad (Armitage, 1999).

Formas de periodontitis asociadas a condiciones sistémicas:

El simposio determinó que ciertas condiciones sistémicas (como el tabaquismo o la diabetes) pueden modificar la periodontitis (crónica o agresiva) y que algunas condiciones sistémicas pueden causar una degradación del periodonto (que puede ser periodontitis o no, desde el punto de vista histopatológico); por ejemplo neutropenias o leucemias

Formas necrosantes de periodontitis:

La “gingivitis ulceronecrosante” (GUN) y la “periodontitis úlcero necrosante” (PUN) se han incluido en un mismo grupo denominado “enfermedades periodontales necrosantes”. En esta instancia hubo coincidencia en que la GUN y PUN eran tal vez diferentes estadios de la misma infección y no categorías de enfermedad diferentes. La

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

diferencia crucial entre GUN y PUN radica en saber si la enfermedad se limita a la encía o afecta también al resto del aparato de inserción.

Clínicamente se caracterizan por necrosis y ulceración de las papilas interdetales o del margen gingival, dolor, encía de enrojecida y con sangrado a la mínima manipulación; también pueden asociarse a halitosis y manifestaciones sistémicas.

Los pacientes en quienes se observa esta forma clínica suelen presentar situaciones de niveles elevados de estrés personal, fumadores y malnutrición (Flemmig, 1999).

2.2.- HISTOPATOGENIA DE LA PERIODONTITIS

Salud periodontal:

El término salud gingival ideal, o denominada histológicamente encía prístina, es aquella que tiene escaso o nulo infiltrado inflamatorio; sólo se puede obtener en condiciones de experimentación bajo un control diario minucioso de la placa bacteriana durante varias semanas.

Cuando hablamos de encía normal o clínicamente sana nos referimos a aquella que el paciente es capaz de conseguir mediante un procedimiento sistemático del control de la placa pese a que histológicamente presente rasgos de infiltrado inflamatorio en el tejido conectivo y en epitelio de unión.

A nivel macroscópico la encía normal se caracteriza por su color rosado, consistencia firme, margen gingival festoneado y a menudo un aspecto superficial en punteado.

Desde el punto de vista histológico se caracteriza por un infiltrado de células inflamatorias con predominio de neutrófilos asociados con el epitelio de unión y aparece un ligero infiltrado de linfocitos en el tejido conectivo subyacente (Page and Schroeder, 1976).

Cronología de la histopatología.

En un intento de describir cronológicamente la histopatogenia de la enfermedad periodontal, Page y Schoeder (1976) clasificaron la progresión de la inflamación periodontal en 4 fases: inicial, temprana, establecida y avanzada.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La fase inicial corresponde a una lesión por gingivitis en estadio precoz. Clínicamente la gingivitis se caracteriza por enrojecimiento gingival, edema y una tendencia aumentada al sangrado al sondaje. Este estadio de la enfermedad es totalmente reversible si se adoptan las medidas de control de placa eficaces como se describe en los estudios de gingivitis experimental de Løe (Løe y cols., 1965).

Después de 24 horas de acumulación de placa, se observan histológicamente cambios a nivel de las arteriolas, capilares y vénulas del plexo dentogingival que determinan un aumento de la presión hidrostática en su interior y produce un exudado de líquidos y proteínas hacia el tejido conectivo. Progresivamente hay un aumento del flujo del líquido crevicular diluyéndose las sustancias nocivas de los microorganismos tanto en el tejido como en el surco. Este mecanismo supone un intento de eliminar las bacterias y sus productos de los tejidos gingivales (Løe y cols., 1965).

Además de los cambios vasculares, se produce un aumento en la migración de polimorfonucleares (PMM) al tejido conectivo gingival gracias a la expresión de las moléculas ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular-1), ELAM-1 (molécula de adhesión leucocitaria al endotelio-1) y otras adhesinas, que permiten la unión de los PMM a las células endoteliales y su extravasación de los vasos sanguíneos (Kinane y cols., 1991). Gradualmente estas células migran, a través del tejido conectivo, hacia el epitelio de unión y la región del surco gingival.

Lesión temprana: esta fase se correspondería con un estadio de gingivitis tardío. Aparecería aproximadamente a la semana de la acumulación de placa. Histológicamente los vasos que transcurren por debajo del epitelio de unión permanecen dilatados y aumentan en número debido a la apertura de lechos capilares anteriormente inactivos. Esta lesión se caracteriza por un infiltrado leucocitario predominantemente compuesto por linfocitos y PMN.

Paulatinamente, en un intento de aislar el medio externo del medio interno, se produce una proliferación de las células basales del epitelio de unión y del surco, de manera que se observa la aparición de crestas epiteliales que invaden la porción coronaria de la lesión.

Tanto la lesión inicial como la lesión temprana corresponderían clínicamente a lo que entendemos por gingivitis. El tiempo que transcurre para pasar al estadio de lesión

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

establecida no está determinado en humanos. Es un proceso complejo de estudiar ya que está determinado por la variación en la susceptibilidad de cada individuo a la patología periodontal.

Histológicamente podemos observar que el epitelio del surco está ulcerado. Esta situación se puede mantener durante varios años sin que exista una pérdida de inserción clínica o bien una pérdida ósea evidente. Determinados individuos o sitios son capaces de mantener esta situación clínica de inflamación gingival y, sin embargo, en otros progresa hacia una periodontitis propiamente dicha. Entre los motivos que se han barajado está la disminución o disfunción de los neutrófilos, que puede generar rápidamente una periodontitis severa. Por otra parte, ciertos autores han determinado una cierta predisposición genética tanto para las periodontitis agresivas como para las periodontitis crónicas (Michalowicz y cols., 2000), (Hodge and Michalowicz, 2001).

Lesión establecida: según Page (Page and Schroeder, 1976) se caracteriza por la presencia de infiltrados de células plasmáticas. Sin embargo, otros autores como Brex demostraron que, aún después de 6 meses sin higiene bucal, la fracción celular plasmática en las muestras de biopsias humanas era tan sólo del 10% (Brex y cols., 1988).

En el desarrollo de esta fase se produce una continua pérdida de colágeno del tejido conectivo y una extensión del infiltrado leucocitario. El epitelio se vuelve más permeable, continúa proliferando, y las crestas epiteliales se extienden a mayor profundidad en el tejido conectivo, en un intento de impedir el paso bacteriano. El epitelio de unión ya no está íntimamente adherido a la superficie del diente, lo que provoca un aumento en la profundidad de sondaje dando lugar a una bolsa periodontal, que posee infiltrado leucocitario denso, con predominio de PMN.

Lesión avanzada: en esta fase del proceso la bolsa va adquiriendo mayor profundidad debido a la migración apical del epitelio y a la pérdida de su capacidad de adherencia. La placa bacteriana continúa su descenso apical creándose un nicho ecológico con características de anaerobiosis; a la vez el infiltrado de células inflamatorias se extiende lateral y apicalmente a la lesión.

En definitiva, la lesión avanzada tiene todas las características de la lesión establecida siendo la principal diferencia la pérdida de hueso alveolar, con daño a las fibras

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

colágenas de la unión dentogingival y la migración del epitelio de unión apicalmente al límite amelocementario (Grant and Mulvihill, 1972).

2.3. FISILOGIA DEL TEJIDO ÓSEO: OSTEOCLASTOGÉNESIS

El hueso es un tejido duro que está sometido a una remodelación continua para poderse adaptar a las demandas funcionales. Este proceso supone un equilibrio y acoplamiento entre la resorción por parte de los osteoclastos y la formación de matriz ósea por los osteoblastos. Como se ha descrito, el rasgo característico de la periodontitis es la pérdida de los tejidos de soporte del diente, lo que incluye una destrucción de hueso alveolar. En términos fisiopatológicos, se produce una alteración en la homeostasis del metabolismo óseo que conlleva un balance negativo.

En este apartado nos vamos a centrar en un aspecto muy concreto de la fisiología ósea: en la regulación molecular del proceso de resorción ósea y más específicamente en el proceso de osteoclastogénesis.

2.3.1. Componente celular

Los osteoblastos son las células responsables de la formación de la matriz ósea. Se originan a partir de las células madre estromales de la médula ósea y por tanto son de origen mesenquimal. A medida que el hueso se mineraliza, el osteoblasto deja de tener actividad de síntesis de material osteoide, se rodea de matriz ósea mineralizada y se convierte en osteocito, dejando de tener la capacidad de formación ósea (Lee y cols., 2008).

Los osteoclastos son células que tienen como principal función la resorción ósea. En un principio se pensaba que compartían los mismos precursores celulares que los osteoblastos; sin embargo los estudios de Walker, en los años 70, demostraron el origen hematopoyético de estas células (Walker, 1975). Dos décadas después, en los años 90, se determinó que los precursores osteoclásticos pertenecían a la familia de los monocitos/macrófagos y residían principalmente en la médula ósea (Udagawa y cols., 1990).

Los osteoclastos son células multinucleadas que se forman a partir de la fusión citoplasmática de precursores mononucleares. Estas células se anclan firmemente a la superficie ósea mediante unas formaciones circulares ricas en actina, llamadas podosomas,

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

creando un sellado en torno a la superficie ósea que va a ser resorbida. Posteriormente, la membrana de los osteoclastos de esta zona aumenta su rugosidad y comienza a secretar ácido hidrociorídrico y encimas proteolíticas (especialmente cathepsinas K) que, actuando sobre la superficie del hueso provocan la disolución del componente mineral y la degradación de la matriz orgánica (Teitelbaum and Ross, 2003).

2.3.2. Componente molecular

Uno de los primeros hallazgos de la influencia de señales moleculares sobre el remodelado óseo fue descrito por Horton (Horton y cols., 1972). Estos autores observaron cómo el sobrenadante de la phytohemaglutinina estimulada de los monocitos periféricos a los capilares era capaz de activar la resorción ósea. Años más tarde, este mismo compuesto pasó a denominarse factor activador de los osteoclastos (OAF) y posteriormente, gracias a los avances de la investigación molecular, se determinó que el componente principal del OAF era la citocina IL-1.

Actualmente se sabe que la IL-1 tiene una demostrada capacidad de estimular la formación osteoclástica, además de ser uno de los principales mediadores de las respuestas inflamatorias.

Progresivamente se han ido describiendo otros factores tanto estimuladores (IL-1, TNF- α , IL-6, IL-11, IL-5 y IL-17) como inhibidores (IL-4, IL-10, IL-13, IL-18 y IFN- γ) de la actividad osteoclastica (Lorenzo y cols., 2008). Las prostaglandinas, curiosamente, tienen capacidad de estimular o inhibir dependiendo de las condiciones en que actúen. Sin embargo, el mayor avance en el entendimiento de la osteoclastogenesis se produjo a finales de los años 90 con el descubrimiento de la ruta de señalización RANK/RANKL/OPG como principal regulador de la diferenciación y activación de los osteoclastos (Arron and Choi, 2000).

2.3.2.1. Ruta RANK/RANKL/OPG

Rodan y Martin postularon por primera vez que los osteoblastos podrían tener un papel regulador en la formación de los osteoclastos y más concretamente como responsables de la estimulación de la resorción ósea (Rodan and Martin, 1981).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Esta hipótesis se confirmó con los primeros estudios que se realizaron *in vitro* para el cultivo de osteoclastos, donde se observó que, para su formación, se requería de un contacto físico de las células precursoras con determinadas células mesenquimales como eran los osteoblastos, o bien células estromales de la médula ósea (Udagawa y cols., 1990). Este hallazgo, en un principio desconcertante, dio lugar años más tarde al descubrimiento de la ruta RANK/ RANKL/OPG, relacionado directamente con la regulación de la osteoclastogénesis.

El RANKL (*Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand*) es una proteína miembro de la superfamilia de los factores de necrosis tumoral (TNF), que en la literatura viene referida por diferentes términos debido a que cuatro grupos de investigadores las identificaron de forma independiente. El nombre de RANKL es el que se utiliza con mayor frecuencia. Fue adoptado por Anderson (Anderson y cols., 1997). Al pertenecer esta proteína al grupo de los TNF, otros autores utilizan el término TRANCE (*TNF-related activation induced cytokine*) para hacer referencia a la familia de proteínas a la que pertenece (Wong y cols., 1997). Por otra parte se ha comprobado que esta molécula se puede unir a la osteoprotegerina, lo que ha dado lugar al término OPG-L (*Osteoprotegerin Ligand*) (Lacey y cols., 1998). Finalmente, y debido a que su principal función es la de activación de la osteoclastogénesis, ha sido llamada ODF (*Osteoclast Differentiation Factor*) (Yasuda y cols., 1998a).

En realidad se trata de una proteína de tipo II homotrimérica que se expresa, bien unida a la membrana celular o bien como proteína soluble en el medio extracelular. El RANKL se encuentra principalmente en la superficie de la membrana celular de los osteoblastos y células estromales. Asimismo se expresa a nivel de los nódulos linfáticos, del timo y del pulmón. También se encuentra, aunque en niveles más bajos, en otros tejidos como el bazo o la médula ósea. En algunas situaciones de patologías, como en articulaciones afectadas por artritis, se produce una expresión elevada a nivel de las células sinoviales y de las células T activadas (Ferrer y cols., 2002).

La expresión de dicha proteína va a depender de los diversos factores estimuladores, entre los que encontramos las interleuquinas, interferones y prostaglandinas (Boyce and Xing, 2007).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El grupo de Ikeda identificó tres isoformas de RANKL: RANKL1, que posee tres cadenas proteicas, una intracelular, otra transmembrana, y otra extracelular; RANKL2, que solo tiene una cadena intracelular; y RANKL3, que carece tanto de cadena intra como extra celular y se cree que actúa como ligando soluble (Ikeda y cols., 2003, Ikeda y cols., 2001).

Al parecer el RANKL está codificado por un gen situado en el cromosoma 13q14. Su principal actividad en el hueso la realiza sobre los osteoclastos, provocando su estimulación en el aspecto de diferenciación y activación metabólica, e inhibiendo su apoptosis. Junto al factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) son los dos factores necesarios y suficientes para estimular la proliferación, fusión y maduración de los precursores y por lo tanto completar todo el ciclo de maduración de los osteoclastos (Ferrer y cols., 2002).

El receptor RANK (*Receptor Activador de NF- κ B*) es una proteína transmembrana expresada tanto en osteoclastos maduros como en sus progenitores. Está codificado por un gen del cromosoma 18q22.1 (Simonet y cols., 1997). Concretamente el RANK es un péptido de 616 aminoácidos que se encuentra esencialmente en células de la estirpe monocítica-macrófaga, preosteoclastos, células T, células B, células dendríticas y fibroblastos. Su activación mediante la unión al RANKL conlleva no sólo una reorganización en el citoesqueleto del osteoclasto y cambios funcionales para el proceso de resorción ósea, su activación, movilidad y fijación en la superficie ósea, sino que también desencadena una señal de supervivencia en el osteoclasto maduro (Ferrer y cols., 2002).

La OPG (Osteoprotegerina) es una proteína soluble que actúa como un receptor señuelo para el RANKL, teniendo este último más afinidad por la unión a la OPG que a la proteína RANK. Es decir, mediante el bloqueo del RANKL la OPG se convierte en un inhibidor paracrino de la formación de osteoclastos (Udagawa y cols., 2000). También es conocida con los términos de factor de inhibición de la osteoclastogénesis (OCIF) o como TNFRSF11B.

Se considera un nuevo miembro de la superfamilia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR), que, a diferencia de todos sus parientes, no permanece tras su síntesis como una proteína transmembrana con el cometido de elaborar señales de transducción entre distintas células, sino que es secretada al medio extracelular. Esta

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

proteína es codificada por un gen situado en el cromosoma 8q23-24. Fue descubierta simultáneamente, pero de manera totalmente independiente, por dos grupos de investigación: uno de ellos (Amgen, Inc. Group, USA), mientras estudiaba DNA en intestino de rata (Simonet y cols., 1997), y otro (Snow Brand Milk Group, Japon), mientras buscaban factores de inhibición y/o estimulación de los osteoclastos (Yasuda y cols., 1998b).

La OPG se sintetiza inicialmente como un propéptido de 401 aminoácidos y, tras la pérdida de un fragmento de 21 aminoácidos, queda como proteína madura con 380 aminoácidos, momento a partir del cual pierde sus dominios transmembrana y citoplasmáticos y es secretada como proteína soluble. El RNAm de la OPG, además de en el hueso, se expresa en numerosos tejidos (pulmón, corazón, riñones, hígado, intestino, estómago, cerebro, glándula tiroides y médula espinal). Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que la principal acción de la OPG es el bloqueo del RANKL y derivado de este efecto, se producen dos tipos de efectos, inhibiendo por una parte su proceso de maduración y por otra su activación (Ferrer y cols., 2002).

Actualmente se admite que la producción de RANKL y OPG por varios tipos de células es controlado por estímulos, ya sea locales o sistémicos, de hormonas, mediadores de la inflamación o de productos bacterianos (Lerner, 2006, Liu y cols., 2010).

De esta manera, el incremento de RANKL o la disminución de la expresión de OPG a nivel local produce resorción ósea; y la situación contraria resulta en un aumento de la formación ósea. El efecto de este juego de balanza entre RANKL - OPG está bien establecido en la patogénesis de algunas enfermedades óseas y del metabolismo mineral tales como la artritis reumática (Fardellone y cols., 2014), la osteoporosis (McClung, 2007) , la enfermedad de Paget (Whyte, 2006) y enfermedades óseas malignas como el mieloma múltiple (Sezer y cols., 2003). Sin embargo, necesitamos información más precisa sobre su impacto en la patogenia de la destrucción del hueso alveolar en la periodontitis.

2.3.2.2 Osteoinmunología

El término de osteoinmunología hace referencia a la interrelación entre los mecanismo de remodelado óseo y la respuesta inmunológica (Rauner y cols., 2007).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Se ha observado que en patologías que cursan con resorción ósea de origen inflamatorio, como es el caso de la periodontitis, parece que están en gran parte mediadas por la producción de RANKL originado en los linfocitos T activados. Asimismo las células del sistema inmune tienen la capacidad de producir otras moléculas (citocinas, interleucinas, monocinas...) que también modulan el metabolismo óseo principalmente a través de la regulación de la expresión del RANKL y de la OPG. Pero a su vez, tanto el RANKL como la OPG tienen una importante acción sobre el sistema inmunitario.

Estudios en ratones manipulados genéticamente han demostrado que, en situaciones en las que existe una deficiencia de RANKL y RANK, se produce una alteración importante tanto de las células de la inmunidad como en los órganos encargados de la producción de dichas células. Igualmente se ha observado que la celularidad y el tamaño de las células del timo disminuyen, que la diferenciación de los CD44-CD25' precursores a células CD44-CD25' son bloqueadas en el timo (Kong y cols., 1999).

Una influencia similar parece que ocurre con la maduración de los linfocitos B a nivel de la médula ósea, donde un déficit de RANKL determina una disminución de los pre-linfocitos B; del mismo modo, se produce una disminución en el tamaño de las Placas de Peyer. Sin embargo, cuando genéticamente se manipulan ratones para que sean deficientes en RANK, se observa que se produce un fenotipo similar, exceptuando que el timo es de tamaño normal y con la misma celularidad. Este último dato alienta la posibilidad de que el ligando RANKL actúe a nivel de otros receptores en el timo y no sólo sobre el RANK (Dougall y cols., 1999, Li y cols., 2007b).

Otros estudios muestran a su vez el papel del RANKL en la activación de las células T en modelos de periodontitis por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Taubman y cols., 2005, Teng y cols., 2000).

2.3.2.3 Citocinas reguladoras de las osteoclastogenesis

La regulación del remodelado óseo es tremendamente compleja, interviniendo numerosas moléculas capaces de activar o inhibir la osteoclastogénesis.

Las citocinas son proteínas responsables de la comunicación intercelular induciendo la activación de receptores específicos de membrana, los cuales inician una cascada de

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

transducción intracelular que hacen variar el patrón de expresión génica, de modo que se produce una determinada respuesta biológica. Intervienen en diferentes funciones celulares como la proliferación, diferenciación y crecimiento celular. También participan en los procesos de quimiotaxis y en la modulación de la secreción de inmunoglobulinas (Lorenzo y cols., 2008).

Estas moléculas están producidas por múltiples tipos celulares, principalmente del sistema inmune entre las que destacan los macrófagos y las células T colaboradoras.

Existen diversas clasificaciones de las citocinas, en función de la fase de inmunidad en la que participen (innata o específica), según la función biológica que desencadenan (hematopoyéticas, quimiotácticas, inmunoreguladoras, proinflamatorias, antiinflamatorias crecimiento y diferenciación), etc.

La nomenclatura utilizada para las citocinas, en un principio, se basó en las fuentes celulares que las producían. Por tanto, hablamos de monoquinas (monocitos y macrófagos), linfoquinas (linfocitos), interleuquinas (leucocitos)...etc. Sin embargo, actualmente se sabe que pueden ser producidas también por otros tipos de células distintos de estos. El grupo de las quimioquinas se caracterizan por ser un tipo de citocinas de pequeño tamaño molecular que intervienen en la respuesta inflamatoria y en la quimiotaxis de fagocitos.

Las principales características de las citocinas son: la redundancia (varias citocinas pueden ejercer el mismo efecto), pleiotropismo (una citocina puede tener diferentes funciones), sinergismo, antagonismo, promiscuas (pueden actuar sobre diversos receptores), y poliesperismo (una célula puede producir varias de ellas) (Martinez y cols., 2005).

Papel del TNF (Factor de necrosis tumoral)

Las citocinas proinflamatorias juegan un potente papel sinérgico junto a la acción del RANKL. Sin embargo, el papel del TNF- α como promotor de la diferenciación osteoclástica es controvertido. Autores como Lam y colaboradores, determinan que esta molécula es incapaz de inducir la formación osteoclástica sin unos niveles de RANKL adecuados (Lam y cols., 2000). Estudios posteriores *in vivo* han demostrado que no se consigue una diferenciación correcta en ratones modificados genéticamente con

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

deficiencias del RANKL. Sin embargo sí que existe una evidencia razonable de la capacidad de activar osteoclastos totalmente maduros de manera independiente a la vía del RANKL (Fuller y cols., 2002).

El TNF- α tiene un papel importante como citocina en la pérdida ósea periarticular, como es el caso de la artritis reumatoide mediante la activación y formación de RANKL a nivel de las células de la médula ósea y directamente estimulando la diferenciación de los precursores osteoclásticos (Kitaura y cols., 2004, Lam y cols., 2000). Según Lam, tanto el RANKL como el TNF- α tienen un papel sinérgico, de manera que mínimos niveles de cualquiera de estas dos moléculas determinan una marcada caída en la actividad osteoclastogénica del otro.

El TNF- α tiene la capacidad de unirse a dos receptores transmembrana, el tipo 1 (p55r) cuya activación confiere la actividad osteoclastogénica, y el receptor tipo 2 (p75r), que curiosamente determina una actividad antiosteoclástica. Sin embargo, la forma soluble del TNF- α tiene una mayor afinidad a unirse al receptor tipo p55r, lo que determina que la balanza se incline hacia la actividad osteoclástica.

Respecto al receptor tipo p55r, se ha observado que puede ser estimulado por los lipopolisacáridos liberados por las bacterias que provocan la inflamación periodontal (Abu-Amer y cols., 2000).

Otros miembros de la superfamilia de los TNF tienen también la competencia de actuar sobre el metabolismo óseo: el TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*), que tiene la capacidad de inducir la apoptosis de los osteoclastos, el CD40L (*CD40 ligand*), cuyo déficit determina fracturas espontáneas y osteopenia en determinados síndromes, y en pacientes con artritis reumatoide induce la expresión de RANKL por parte de las células sinoviales (Lorenzo y cols., 2008).

Otra función adjudicada a la familia de los TNF es la regulación de la abundancia de precursores osteoclásticos en la médula ósea, y lo realizan mediante el incremento de la expresión de c-fms que es el receptor de M-CSF (*Macrophage colony-stimulating factor*), (Lee y cols., 2008, Lorenzo y cols., 2008).

Por tanto, parece que los estudios coinciden en señalar a la familia de los TNF como estimuladores de la actividad osteoclástica; lo que no queda tan aclarado es el mecanismo concreto y específico por el cual actúan.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor)

Esta molécula es un potente estimulador de la expresión de RANK a nivel de la membrana de los precursores osteoclasticos, así como de su proliferación celular. Es decir, el M-CSF aumenta el número de células precursoras potencialmente estimulables por la presencia del RANKL. Además, otra de sus funciones es la regulación de la apoptosis de los osteoclastos de manera que prolonga la supervivencia de los osteoclastos maduros (Arai y cols., 1999, Fuller y cols., 1993, Jacquin y cols., 2006).

IL-1 (Interleuquina 1)

La IL-1 es un potente estimulador de la resorción ósea que actúa de forma directa sobre los propios osteoclastos e indirectamente aumenta la producción de RANKL (Suda y cols., 1999, Takayanagi, 2007). Se ha observado que, en cultivos celulares, se produce una estimulación de la osteoclastogénesis que es dependiente de la expresión de RANKL por parte de las células estromales y osteoblásticas. Incluso posee la capacidad de aumentar la síntesis de prostaglandinas en el tejido óseo, lo cual tiene una implicación directa sobre la actividad osteoclastica (Klein and Raisz, 1970).

También existen mayores cantidades de IL-1 en los cultivos de monocitos periféricos a los capilares en las mujeres con osteoporosis que en las mujeres sin osteoporosis. Del mismo modo, se observó que producía un incremento de IL-1 y TNF- α en los casos de menopausia sin tratamiento hormonal al compararlos con aquellos que recibían tratamiento hormonal. Por tanto, se demuestran los efectos de los estrógenos en la pérdida ósea mediada por la actividad de la IL-1 y el TNF- α (Lee y cols., 2008).

Citocinas de la familia IL-6

La IL-6 tiene la capacidad de regular el desarrollo de los osteoclastos maduros y directamente estimula la producción de RANKL y OPG RNAm así como protanglandinas a nivel de hueso. Aún así, los estudios *in vitro* muestran una acción variable dependiendo del sistema de ensayo utilizado. Existe un estudio que ha sugerido que la IL-6 estimula la osteoclastogénesis *in vitro* por una vía independiente al RANKL (Kudo y cols., 2003, Lorenzo y cols., 2008). También se ha demostrado la relación entre el incremento de IL-6

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

a nivel sérico, con diversas situaciones clínicas que cursan con osteolisis, como es el déficit de la producción hormonal de estrógenos, enfermedad de Paget's, enfermedad de Gorham-Stout, o la displasia poliostótica fibrosa (Lee y cols., 2008).

Denominamos la familia de las IL-6 a un grupo de citocinas que tienen la capacidad de estimular el receptor activador proteínico gp130. Dentro de esta familia se incluyen:

- La IL-11, que *in vitro* tiene la capacidad de estimular la formación osteoclástica así como la resorción ósea. En ratones deficientes de IL-11 se observa cómo se produce un incremento de la masa ósea trabecular, lo cual refleja una disminución en el recambio óseo, en la formación osteoclástica y en definitiva en la actividad osteoclástica (Sims y cols., 2005).

- El LIF (*Leucemia inhibitory factor*), es producido por las células óseas. En estudios *in vitro*, se ha demostrado un comportamiento contradictorio, estimulando o inhibiendo la resorción ósea. Concretamente, la estimulación la produce aumentando la expresión de determinadas prostaglandinas. Cuando se inocula localmente LIF en cultivos celulares se ha observado que tiene la capacidad de estimular el RANKL y la OPG, aumentando los parámetros tanto de la resorción ósea como de la formación ósea. En ratones modificados genéticamente LIF- se produce una reducción del volumen óseo y un incremento del número de osteoclastos (Lorenzo y cols., 1990, Palmqvist y cols., 2002, Reid y cols., 1990, Ware y cols., 1995).

- El Oncostatin M es el último de los componentes de la familia de citocinas IL-6. Los estudios al respecto dejan claro que tiene la capacidad de inhibir la formación osteoclástica y por tanto la resorción ósea (Lee y cols., 2008).

IL-7 (Interleuquina- 7)

Esta interleuquina tiene un efecto opuesto sobre la osteoclastogénesis dependiendo de si actúa a nivel sistémico o localmente. Cuando se administra sistémicamente, se observa cómo estimula la osteoclastogénesis mediante la expresión de las citocinas osteoclastogénicas por parte de las células T (Weitzmann y cols., 2000). Esto se ha corroborado en estudios animales realizados sobre ratones deficientes de células T, en los que al administrar IL-7 no se produce pérdida ósea (Toraldó y cols., 2003). Sin embargo,

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

cuando la IL-7 es sobreexpresada por los osteoblastos de manera local, se produce un aumento de la masa ósea trabecular, es decir, facilita la formación ósea (Aguila y cols., 2012).

Quimioquinas e IL-8 (Interleuquina 8)

La familia de las quimioquinas se dividen en cuatro grupos, según las secuencias de aminoácidos: CXC, CC, C y CX₃C.

La IL-8 y CXC son producidas por los osteoclastos, estimulan la osteoclastogénesis y la resorción ósea de forma independiente a la vía del RANKL. Los efectos de la IL-8 se basan en una sobre-expresión de la sintetasa de óxido nítrico de los propios osteoclastos (Bendre y cols., 2003, Sunyer y cols., 1996).

La CCL3 (*macrophage inflammatory proteina-1 α*) estimula directamente la osteoclastogénesis mediante la activación de los receptores CCR1 y CCR5 (Oba y cols., 2005).

La expresión de CCL9 (*péptidos-1 γ inflamatorio macrófago*) y el receptor CCR1, a nivel de los osteoclastos, es inducido por el RANKL; en este sentido se ha observado que la inyección de M-CSF en ratas con osteopetrosis (las cuales tienen ausencia de M-CSF) induce a la osteoclastogénesis, a la resorción ósea y a una rápida sobre-regulación de CCR1 Y CCL9 en el hueso. En otros estudios experimentales, se ha observado cómo el bloqueo del CCR1 previene la formación de precursores osteoclásticos y el bloqueo del CCL9 inhibe en parte la osteoclastogénesis inducida por RANKL (Ishida y cols., 2006, Yang y cols., 2006).

El CXCL12 (*factor-1 derivado de células estromales*) y su receptor CXCR4, facilitan la osteoclastogénesis, en células precursoras osteoclásticas, el CXCL12 facilita la migración y la osteoclastogénesis inducida por RANKL y M-CSF (Grassi y cols., 2003, Wright y cols., 2005).

El CCL2 (*proteína-1 quimioatrayente monocito*); recientemente se ha observado que cuando se tratan los osteoclastos con PTH aumenta el CCL2 y facilita la fusión de los preosteoclastos (Li y cols., 2007a).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

IL-10 (Interleuquina 10)

Esta interleuquina es producida por los linfocitos T y B activados. Produce una inhibición directa de la osteoclastogénesis y osteoblastogénesis. También tiene una acción indirecta sobre la osteoclastogénesis mediante la inhibición del RANKL y la facilitación de la producción de OPG (Liu y cols., 2006).

IL-12 (Interleuquina 12)

La acción de la IL-12 es la inhibición de la osteoclastogénesis; sin embargo, su mecanismo es controvertido. Existen estudios que señalan que actúa directamente inhibiendo la estimulación por parte del RANKL, pero es un mecanismo no del todo esclarecido (Amcheslavsky and Bar-Shavit, 2006).

IL-15 (Interleuquina 15)

Es un miembro de la superfamilia de IL-2. Se ha demostrado que en cultivos celulares aumenta las células progenitoras osteoclásticas. Además, la producción de IL-15 por parte de los linfocitos T incrementa la osteoclastogénesis y la destrucción ósea en pacientes con artritis reumatoide (Miranda-Carus y cols., 2006, Ogata y cols., 1999).

IL-17 y IL-23 (Interleuquinas 17 y 23)

La IL-17 esta formada por 6 miembros de IL-17(A-F). La IL-17A se ha observado que es capaz de aumentar la osteoclastogénesis mediante la estimulación de la secreción de prostaglandinas y de RANKL. La inhibición de la IL-17A disminuye la destrucción ósea que se produce en la artritis reumatoide así como la producción de RANKL, IL-1 β , TNF- α (Koenders y cols., 2005, Kotake y cols., 1999).

El RNAm de la IL-23 es producido en grandes cantidades en las células sinoviales de pacientes que sufren de artritis reumatoide, por lo que se ha implicado secundariamente en los mecanismos de resorción ósea (Sato y cols., 2006).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

IL-18 (Interleuquina 18)

Esta interleuquina pertenece a la superfamilia de la IL-1. Se ha observado que está aumentada en localizaciones con inflamación y, concretamente, en el caso de la artritis reumatoide. Es una molécula expresada por las células osteoblásticas, y tiene como función inhibir la osteoclastogénesis. Son diversos los mecanismos por los cuales actúa, entre ellos se ha señalado que tiene la capacidad de aumentar la expresión de la OPG. Pero sorprendentemente la IL-18 también posee la capacidad de estimular la osteoclastogénesis debido a los efectos que tiene sobre los linfocitos T (Dai y cols., 2004, Makiishi-Shimobayashi y cols., 2001).

IL-33 (Interleuquina 33)

Recientes estudios en animales han demostrado el papel de la IL-33 en la actividad osteoclástica cuando se induce en ratas una inflamación periodontal. Estos estudios demuestran que existen unos niveles elevados de dicha interleuquina, y que una de las vías por las que se produce el aumento de actividad osteoclástica es debido a un incremento del RANKL inducido por la IL-33 (Malcolm y cols., 2015, Köseoğlu y cols., 2014).

Interferones (IFN)

In vitro el IFN- γ se ha observado cómo tiene una acción inhibitoria de la resorción ósea. Concretamente parece que bloquea los mecanismos del receptor RANK. Sin embargo, no tiene la capacidad de impedir la resorción en los osteoclastos ya maduros. Curiosamente, también se ha documentado una acción estimuladora de la resorción ósea del IFN- γ , mediada por la capacidad de inducción de expresión del RANKL y de TNF- α a nivel de los linfocitos T. *In vivo* se puede observar una variabilidad en la acción sobre el metabolismo óseo, debido a los efectos contrapuestos que tiene el IFN- γ (Hattersley y cols., 1988, Takayanagi y cols., 2000).

Los IFN- α y IFN- β son moléculas típicamente producidas como respuesta a la invasión de patógenos. En ratones deficientes de receptores para ambos interferones se observa una reducción de la masa trabecular y un incremento de los osteoclastos. Sin embargo, *in vivo*, no se ha demostrado ninguna acción del IFN- α sobre el recambio óseo (Goodman y cols., 1999, Takayanagi y cols., 2002).

2.4. PAPEL DE LA RUTA RANK/RANKL/OPG EN LA PATOGENIA PERIODONTAL

En condiciones de salud, el RANKL es expresado en el periodonto por células de origen mesenquimal, principalmente por osteoblastos y células del ligamento periodontal (Kajiya y cols., 2010). Su implicación es de gran relevancia en la adaptación del periodonto a las fuerzas de la oclusión, durante la erupción del diente o durante el desplazamiento del diente al aplicar fuerzas de ortodoncia (Garlet y cols., 2007).

En el periodonto sano, la OPG es continuamente producida por los fibroblastos del tejido periodontal, y, potencialmente, también por las células endoteliales (Kobayashi-Sakamoto y cols., 2004); pero no por los queratinocitos del epitelio (Sakata y cols., 1999) ni por las células T (Kawai y cols., 2006).

En el contexto de la enfermedad periodontal, la destrucción del hueso alveolar se produce como consecuencia de la alteración en la homeostasis metabólica del tejido óseo y su inclinación hacia la faceta catabólica. Esta ruptura del equilibrio homeostático es provocada por la reacción inmuno-inflamatoria del hospedador frente a la infección bacteriana de la placa o biopelícula dental. Este proceso inmunoinflamatorio está regulado por la concentración de los diversos mediadores de la inflamación a nivel gingival, y su capacidad para alcanzar el tejido conectivo y el hueso alveolar.

La concentración mínima de mediadores inflamatorios para activar la resorción ósea va a depender de la expresión de citocinas proinflamatorias. Entre las citocinas estimuladoras de la resorción ósea se encuentran la IL-1, IL-6, IL-11, IL-17, TNF- α , LIF y oncostatin M. También las kininas, como la bradykinina y kallidina, y otras moléculas como la trombina y varias quimioquinas, tienen un efecto estimulador sobre la resorción ósea alveolar. Por el contrario, la expresión de determinadas citocinas antiinflamatorias y otros mediadores como la IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18 así como el IFN- β e INF- γ tienen un efecto inhibitorio de la resorción ósea (Lerner, 2006). Las citocinas presentes en el proceso inflamatorio a nivel gingival tienen la capacidad de estimular las células que componen los tejidos periodontales más profundos.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En situación de enfermedad periodontal, la fuente principal de RANKL proviene de las células Th1, Th17 y de los linfocitos B (Han y cols., 2006, Han y cols., 2009, Kawai y cols., 2006, Vernal y cols., 2006), sin embargo las células mesenquimales residentes también pueden expresar RANKL influenciadas por cambios en la microflora (Belibasakis y cols., 2007, Kajiya y cols., 2010). La producción de OPG en estado de enfermedad se deriva de las mismas células que la producen en situación de salud periodontal.

Osteoblastos y osteoclastos

En el hueso alveolar, los osteoblastos periósticos responden a estos mediadores de la inflamación con una mayor expresión de RANKL, tanto a nivel de la superficie de sus membranas como en su forma soluble (Kong y cols., 2000).

Los propios osteoclastos que forman parte del tejido óseo alveolar tienen capacidad de expresar RANKL en su superficie. Esto se ha demostrado en estudios animales mediante métodos de hibridación *in situ* que han determinado que los osteoclastos expresan RANKL RNAm. Estos datos podrían explicar una acción autocrina mediada por RANKL-RANK (Ogasawara y cols., 2004), esta hipótesis ya fue planteada anteriormente por Myers (Myers y cols., 1999).

Los osteoblastos y los fibroblastos del ligamento periodontal son dos de las principales células productoras de RANKL y, por tanto, estimuladoras del proceso de osteoclastogénesis en condiciones fisiológicas. Estas células disminuyen en número y función con la edad y, sin embargo, no hay un descenso remarcable de los osteoclastos durante la vida, por lo que este fenómeno explicaría la regulación autocrina de los osteoclastos (Ogasawara y cols., 2004).

Fibroblastos del ligamento periodontal y gingivales:

Kanzaki, en el 2001, fue el primero en determinar la acción de las células del ligamento periodontal como estimuladoras de la osteoclastogénesis. Este autor observó que, en un cultivo de preosteoclastos, células procedentes del ligamento periodontal tenían la capacidad de inducir la diferenciación final de los osteoclastos. En el mismo estudio se demuestra mediante técnicas de PCR que las células del ligamento periodontal tienen la capacidad de expresar RANKL RNAm. Por tanto, postularon que el RANKL expresado en

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

la membrana de las células del ligamento periodontal podía activar la osteoclastogénesis mediante el contacto célula a célula (Kanzaki y cols., 2001).

Nagasawa, en 2002, realiza un estudio donde demuestra que los fibroblastos del ligamento periodontal tienen capacidad de producir tanto OPG como RANKL, y que, por tanto, la inactivación que produce la OPG tendría un papel importante en la osteoclastogénesis. Estos resultados confirman los hallazgos de estudios anteriores en los que se había detectado OPG en las células del ligamento periodontal (Nagasawa y cols., 2002).

Estudios de Wada y cols., sugieren la capacidad de la IL-1 β o el TNF- α para inducir la expresión de OPG y RANKL a nivel de los fibroblastos del ligamento periodontal humano (FLPH). Para demostrarlo, trataron un cultivo de FLPH con IL-1 β o TNF- α y observaron que las células expresaban OPG y RANKL a partir de las 12 horas. Para corroborar estos resultados inhibieron IL-1 β o el TNF- α mediante anticuerpos, resultando una inhibición en la expresión de OPG y RANKL por parte de los fibroblastos (Wada y cols., 2001). Sin embargo, otros investigadores han demostrado que los fibroblastos periodontales tienen una capacidad baja de expresar RANKL y concretamente esta expresión está asociada a la estimulación por la toxina segregada por el *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Cytolethal Distending Toxin) (Lerner, 2006).

Estudios realizados sobre cultivos de fibroblastos de origen gingival que fueron estimulados por lipopolisacáridos (LPS) han destacado cómo se produce un aumento en la expresión de OPG, pero no de RANKL; lo que puede significar un mecanismo de control frente a la destrucción del hueso alveolar durante la inflamación periodontal (Nagasawa y cols., 2002).

Por lo tanto, parece que el comportamiento de los fibroblastos es diferente en función de su origen gingival o periodontal.

Linfocitos

Tanto los linfocitos B como T activados son células abundantes en el tejido gingival afectado por periodontitis. Vernal (Vernal y cols., 2006) describe cómo las T CD4⁺ son las células predominantes en los infiltrados inflamatorios de los tejidos periodontales cuando hay presente una periodontitis, y, además, estas células expresan

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

mayores cantidades de RANKL que las células estromales o los monocitos. En estudios similares de Kawai se observa que tanto las células T como las B, son las células mononucleares más predominantes en los tejidos periodontales que padecen periodontitis. En sus resultados encontraron que el porcentaje de células en una lesión de periodontitis se corresponde con un 45% de células T, un 50% de células B y sólo un 5% de monocitos. Asimismo observaron que en los tejidos periodontales afectados de periodontitis más del 50% de las células T y el 90% de las células B expresan RANKL. Sin embargo, en condiciones de salud periodontal menos del 20% entre células T y células B expresan RANKL (Kawai y cols., 2006).

Recientes estudios confirman, que la estimulación de linfocitos Th1 y Th17 por los serotipos de *P.gingivalis* K1 y K2, producen un incremento en la producción de RANKL lo que se traduce en una mayor reabsorción ósea (Vernal y cols., 2014).

Del mismo modo se ha confirmado que en zonas con actividad destructiva periodontal se produce un aumento en los niveles de RANKL e IL-17 debido a una sobreexpresión de las células Th17 (Dutzan y cols., 2009).

Estudios inmunohistoquímicos, realizados sobre tejidos de granulación extraídos de lesiones de pacientes afectados de periodontitis crónica, demuestran que la expresión de RANKL se produce principalmente en los linfocitos y macrófagos. En los macrófagos no está del todo claro si el RANKL marcado por los anticuerpos es el expresado como proteína transmembrana o bien el RANKL soluble que se ha unido a receptores localizados en la membrana celular (Crotti y cols., 2003).

Por consiguiente, igual que ocurre en otras patologías en las que se manifiesta una alteración del metabolismo óseo, en la enfermedad periodontal, el RANKL tiene un papel importante en los mecanismos de regulación de la resorción y formación ósea. No sólo hay que tener en cuenta las proporciones de RANKL, sino también las del receptor RANK, así como el receptor señuelo OPG. Por tanto, cuando el balance entre RANKL y OPG esté a favor del RANKL, se produce un aumento de la activación de los osteoclastos y también de la resorción ósea.

La unión del RANKL a los precursores osteoclasticos se produce justo en el momento en que las células madre hematopoyéticas se han diferenciado a partir de la unidad formadora de colonias de granulocitos y macrófagos (CFU-GM) a la unidad

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

formadora de colonia de macrófagos (CFU-M). Por esta razón, la unión del RANKL al RANK en CFU-M, en presencia del factor estimulador de la colonia de macrófagos, induciría la maduración de preosteoclastos a células multinucleadas y que posteriormente se convierten en osteoclastos (Bar-Shavit, 2008).

Sin embargo, cuando las concentraciones de OPG son más elevadas que las concentraciones de RANKL, la OPG se une al RANKL inhibiendo la unión al RANK, lo que determina, por una parte, la reducción de la formación de osteoclastos, y por otra, se produce la apoptosis de los osteoclastos preexistentes.

2.5. NIVELES DE RANKL/OPG EN FUNCIÓN DEL GRADO DE SALUD PERIODONTAL.

En la literatura hay poca información a este respecto; son pocos los artículos que han sido publicados, y, además, utilizan metodologías diferentes para determinar la concentración de RANKL y OPG en salud periodontal y en los diferentes estadios de afectación de la enfermedad periodontal.

Hemos clasificado los artículos publicados hasta la actualidad en dos tipos: aquellos que analizan RANK – OPG a nivel de estudios histológicos (TABLA nº 1) y aquellos que lo hacen a nivel del fluido crevicular (TABLA nº 2).

(TABLA nº 1). *Estudios que determinan las cantidades de RANKL y OPG a nivel histológico, ya sea con análisis de inmunohistoquímica o análisis del RNAm .*

ESTUDIO	MUESTRA	RESULTADOS
B o s t a n c i 2007b	Sanos= 9 Gingivitis= 8 P.Crónica= 11 P.Agresiva= 12 P. Crónica bajo tratamiento inmunosupresor=10	Los 3 grupos de pacientes con periodontitis tienen aumentada la concentración de RANKL y el ratio RAKL/OPG. Los pacientes con periodontitis agresiva presentan mayores proporciones de RANKL. En los pacientes con tratamiento inmunosupresor hay un incremento en la expresión de la OPG pero no del RANKL.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

W a r a - a s w a p a t i 2007	Sanos=15 P. Crónica= 15	En periodontitis crónica se detecta un aumento de RANKL RNAm y del ratio RANKL/OPG RNAm. Se observa un incremento de la expresión del RANKL asociado a la presencia de <i>P.gingivalis</i> en los pacientes con periodontitis.
Honda 2006	Gingivitis: 23 P.Crónica avanzada: 25	Los resultados muestran mayores cantidades de RNAm RANKL en las muestras con periodontitis que en las muestras con gingivitis, pero estas diferencias no son estadísticamente significativas.
Lu 2006	Sanos= 12 P. Inicial= 23 P. Moderada= 33 P.Severa= 27	Existe una cantidad significativamente mayor de RANKL en el conectivo inflamado en las zonas de encía con patología, comparado con las muestras de individuos sin enfermedad periodontal. Sin embargo, se encuentran escasas cantidades de OPG, tanto en las muestras de encía enferma como de sana.
Vernal 2006	P.Crónica= 33 Sanos= 20	Determina que los niveles de RNAm de RANKL son mayores en los pacientes con patología periodontal. Estudios de inmunohistoquímica determina que la mayor producción de RANKL en las lesiones de periodontitis crónica es producida por las células T CD4+
Kawai 2006	Sanos=12 P. Crónica= 32	Observan una expresión aumentada del RANKL con respecto al grupo de pacientes sanos; sin embargo, no detectan diferencias estadísticamente significativas en la expresión de OPG.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Garlet 2004	Sanos: 10 P. crónica: 20 P. agresiva: 16	Los resultados demuestran que la presencia de RANKL es más frecuente en el grupo de pacientes con periodontitis. Se observan niveles similares de RANKL entre periodontitis agresiva y crónica; pero la expresión de OPG es estadísticamente mayor en la crónica.
Crotti 2003	P. crónica severa= 9 Sanos= 5	Aumento significativo de la expresión de RANKL en los tejidos con afectación de periodontitis en relación a los tejidos gingivales sanos. Por otra parte, se observa una expresión de OPG significativamente disminuida en los tejidos con patología periodontal.
N a g a s a w a 2002	Sanos= 2 P. crónica= 30	La expresión de RANKL y de OPG se expresa en un 80% y un 25% respectivamente en los tejidos con afectación periodontal. También demuestra que la OPG expresada en los fibroblastos gingival es estimulada por los lipopolisacáridos.

(TABLA nº 2). *Estudios a nivel del fluido crevicular.*

ESTUDIO	MUESTRA	RESULTADOS
Baltacıoğlu 2014	Sanos: 28 P. Crónica: 30 P. Agresiva: 30	Niveles más elevados de RANKL en pacientes con periodontitis, pero no diferencia entre ellos. Concentraciones menores de OPG en pacientes con periodontitis en relación a sanos, pero tampoco diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Ratio RANKL/OPG más elevado en periodontitis y particularmente más elevado en periodontitis agresivas.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Silva 2008	P. Crónica: 56	Se observa que en las localizaciones con actividad destructiva periodontal existen unos valores más elevados de RANKL respecto a las localizaciones donde no existe actividad destructiva.
Sakellari 2008	Sanos = 38 P. Crónica = 38	Niveles más elevados de RANKL en los pacientes con enfermedad periodontal (no estudia niveles de OPG). Correlación positiva entre el RANKL y el nivel de los periodontopatógenos.
Bostanci 2007a	Sanos= 21 Gingivitis= 22 P.Crónica= 28 P.Agresiva= 25 P.Crónica bajo tratamiento inmunosupresor= 11	Niveles de RANKL bajos en el grupo de pacientes sanos o con gingivitis, y elevados en los 3 grupos de pacientes con enfermedad periodontal. No diferencias estadísticamente significativas entre periodontitis crónica y agresiva, si bien es más bajo en el grupo de pacientes tratados con inmunosupresores. Ratio RANKL/OPG elevado en pacientes con enfermedad periodontal en relación a los pacientes sanos o con gingivitis.
Lu 2006	Sanos= 12 P. Inicial= 23 P. Moderada= 33 P.Severa= 27	Los resultados indican que la presencia de RANKL en el fluido crevicular es mayor en los pacientes con enfermedad periodontal, sin embargo la detección de OPG se encuentra en niveles muy bajos; a veces, indetectables. Hay diferencias entre inicial-severa.
Vernal 2004	Sanos= 12 P. Crónica= 20	Se encuentra RANKL en un 85% de los pacientes con patología periodontal en relación al 46% de los pacientes sanos. La concentración de RANKL en los pacientes con patología periodontal es mucho más elevada que en los pacientes sanos.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Mogi 2004	Sanos= 28 P.Inicial= 27 P. Moderada=58 P. Avanzada= 47	RANKL indetectable en los pacientes sanos excepto en un caso. Mayores concentraciones de RANKL en los pacientes con enfermedad periodontal que en los pacientes sanos. La concentración de OPG es más elevada en el grupo control sano. EL ratio RANKL/OPG está más elevado en los pacientes con enfermedad periodontal.
-----------	---	--

A pesar de la diferente metodología empleada en los estudios, el factor común de todos ellos es que parece existir un ratio RANKL/OPG elevado en los casos con afectación periodontal. Este hallazgo sugiere el importante papel que puede tener el incremento de la expresión de RANKL en la patogénesis de la periodontitis como activador de la osteoclastogénesis.

En el estudio histológico de Nagasawa, en el grupo de pacientes con patología periodontal se detecta la presencia de RANKL RNAm en un 80% de las muestras, y OPG RNAm en un 25% de las muestras. En el grupo de pacientes sanos sin embargo se detecta en todas las ocasiones el OPG RNAm, y en ningún caso RANKL RNAm. Estos resultados demuestran, de forma descriptiva, la presencia de RANKL en los casos de enfermedad periodontal (Nagasawa y cols., 2002), aunque una aproximación molecular correcta debería de ser la determinación de los niveles de proteína existentes en los tejidos analizados, ya que son las proteínas las que ejecutan los procesos de resorción ósea.

Un año después, el grupo de Crotti (Crotti y cols., 2003) determina por primera vez, por análisis semicuantitativo de imágenes inmunohistoquímicas, la presencia de RANKL y OPG a nivel de tejidos con periodontitis; más concretamente analizan el tejido de granulación de 9 pacientes con periodontitis crónica severa, a los cuales se les realiza cirugía periodontal como parte del tratamiento. Las del grupo control son muestras de tejido gingival sano de 5 pacientes a quienes se les había realizado procedimientos de alargamiento coronario. Los resultados de este estudio inmunohistoquímico destacan una marcada presencia de RANKL en los linfocitos y macrófagos que forman el infiltrado inflamatorio del tejido de granulación de los pacientes con patología periodontal, y, por el

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

contrario, la expresión de RANKL es menor en los individuos sin afectación periodontal. La tinción positiva para la proteína RANKL estaba asociada especialmente con linfocitos T (CD3+) (aproximadamente el 30% de estas células) y aparecían, en menor número, macrófagos (CD68), mientras una tinción más débil aparecía en el conectivo extracelular; llamativamente apenas aparecían células CD3+ en las muestras de tejido sin periodontitis. En cuanto a la expresión de la OPG, se localizaba principalmente en las células endoteliales de ambos grupos, pero se observan en mayor cantidad en las muestras de los individuos sanos. El análisis semicuantitativo refleja que la expresión RANKL era significativamente mayor en los tejidos con periodontitis que en los tejidos sin periodontitis. Ocurre lo contrario con la expresión de OPG, donde era significativamente mayor en los tejidos sin periodontitis.

Liu, con técnicas de hibridación *in situ*, muestra que niveles altos del transcrito RNAm específico de RANKL se localizan en células inflamatorias que son en su mayoría linfocitos (Liu y cols., 2003).

Estos hallazgos son apoyados por otros trabajos que utilizan la qPCR (PCR cuantitativa a tiempo real) para estudiar la expresión genética de transcritos de RANKL y OPG en biopsias de tejido gingival (Bostanci y cols., 2007b, Garlet y cols., 2004, Honda y cols., 2006). El grado de detección de expresión de RANKL es de 0 a 40% en salud, del 25 a 80% en gingivitis, del 50 al 100% en periodontitis crónica, y del 75 al 100% en periodontitis agresiva. Mientras que para la OPG son del 70 al 100% en situación de salud, y del 100% en todas las demás formas de enfermedad (Belibasakis y cols., 2011, Bostanci y cols., 2007b, Garlet y cols., 2004); sin embargo, en el estudio de Wara-aswapati, la detección para RANKL y para OPG es del 100%, tanto en situación de salud como en periodontitis crónica (Wara-aswapati y cols., 2007).

Respecto a la medición de los niveles de expresión, RANKL es de 2,7 a 15,8 veces más alto en muestras de periodontitis crónica (PC) que en muestras sanas; y de 1,7 a 3 veces más altas en PC que en gingivitis. En cuanto a OPG y comparando muestras en salud con muestras de PC, los resultados son más variables yendo de 0,2 a 16 veces más bajos en los casos de PC (Belibasakis y cols., 2011, Bostanci y cols., 2007b, Garlet y cols., 2004, Honda y cols., 2006, Wara-aswapati y cols., 2007). Parece que esta variabilidad en los resultados puede estar relacionada con el momento en que se toma la muestra y el

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

grado de actividad de la enfermedad. En dos de estos estudios se maneja el ratio RANKL/OPG, mostrando un incremento de 2,2 veces en PC comparado con muestras sanas, e igualmente elevado en casos de PC y periodontitis agresiva con respecto a muestras sanas o con gingivitis.

Los resultados de estos estudios sobre la expresión genética y localización de estas moléculas mediante técnicas inmuno-histoquímicas demuestran la importancia del RANKL y la OPG y del ratio RANKL/OPG en la salud y en enfermedad periodontal, así como señalan el significativo papel de los linfocitos T activados en la osteoclastogénesis que se produce en la periodontitis.

El primero de los estudios que demuestra que tanto RANKL como OPG son detectables a nivel del fluido crevicular (FC) fue el realizado por el grupo de Mogi y cols., en el 2004 (Mogi y cols., 2004). En este trabajo se analizó la concentración de RANKL y OPG mediante la técnica de ELISA. Estos autores estudiaron dos grupos de individuos: una muestra control formada por 28 con salud periodontal, y un grupo estudio con PC que a su vez subdividieron, según el grado de afectación, en inicial (n= 27), moderada (n=58) y avanzada (n= 47). El RANKL en el grupo control sano estaba por debajo del límite de detección excepto en un caso; por el contrario, era fácilmente detectable en el grupo PC independientemente de su severidad. El nivel de RANKL era significativamente mayor en cualquiera de los grados de afectación periodontal si se compara con el grupo de individuos sanos. Por otra parte, no existían diferencias estadísticamente significativas entre la periodontitis inicial (180 pg/μl), donde las concentraciones de RANKL fueron mayores que en los grupos de periodontitis moderada y avanzada (30 pg/μl).

Por el contrario, cuando se valoraron las concentraciones de OPG se observó que fueron mayores en el grupo control (400 pg/μl), tres o cuatro veces más alto que en PC, independientemente de su severidad. Estos resultados determinan que el ratio RANKL/OPG sea significativamente mayor en el fluido crevicular del grupo de pacientes con enfermedad periodontal.

Sus resultados también establecen una relación entre la concentración de dichos marcadores y los parámetros clínicos de afectación periodontal (profundidad de sondaje, nivel de inserción clínica) e inflamación gingival (índice de sangrado al sondaje). Los datos parecen indicar que la concentración de RANKL disminuye conforme aumentan la

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

profundidad de bolsas periodontales y no observan relación con el sangrado al sondaje. Las concentraciones de OPG obtenidas no tienen una asociación estadísticamente significativa con las medidas clínicas ni la severidad de la enfermedad periodontal (Mogi y cols., 2004).

Vernal, en 2004, estudió el fluido crevicular en un grupo de pacientes con PC sin tratar y un grupo de individuos sanos periodontalmente. Al valorar los resultados se observó que en el grupo de pacientes PC, la cantidad de RANKL en valores absolutos fue de $115,53 \pm 78,18$ pg en relación a los $63,08 \pm 55,08$ pg del grupo control; sin embargo, estas diferencias estadísticamente significativas no lo fueron cuando compararon concentraciones de RANKL ($116,99 \pm 83,04$ pg/ μ l, y $188,07 \pm 1003,40$ pg/ μ l respectivamente). Según explican los autores esta situación es debida a que el volumen de FCV obtenido de los pacientes de la muestra control ($0,22 \pm 0,13$ μ l) es bastante inferior al del grupo estudio ($0,94 \pm 0,21$ μ l). Desde el punto de vista descriptivo destaca que en el grupo de PC se puede detectar RANKL en un 85% de los casos, mientras que en el grupo control es del 46% (Vernal y cols., 2004).

Dos años más tarde, el mismo grupo de investigadores realizó un estudio histológico sobre 33 pacientes con PC y 20 individuos sanos. Confirmaron de nuevo que en el grupo de PC había una mayor expresión de RNAm RANKL. Además, relacionaron esta mayor producción directamente con las células T CD4+ (Vernal y cols., 2006). Al igual que ocurre en la artritis reumatoide, donde se había demostrado que las células T CD4+ eran las principales responsables de la producción de RANKL (Kong y cols., 2000), en este estudio histológico también se observó que las células T eran el principal componente celular del infiltrado inflamatorio.

Bostanci, en 2007, realizó un estudio histológico en el que se analizó el RNAm que determina la expresión del RANKL y de la OPG en un grupo de pacientes con diferente afectación periodontal (sanos, gingivitis, periodontitis crónica y periodontitis agresiva), y también en pacientes con periodontitis crónica pero que recibían tratamiento inmunosupresor (Bostanci y cols., 2007b). Anteriormente se había observado cómo los fármacos inmunosupresores tienen la capacidad de inhibir la inflamación gingival y la progresión de la periodontitis, con el resultado de una significativa reducción de la pérdida ósea alveolar (Spolidorio y cols., 2004).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los resultados del estudio de Bostanci muestran que el RNAm de RANKL no se detecta en ninguno de los casos de zonas gingivales sanas, es detectado en un 25% en los pacientes que tienen gingivitis, en un 54% de los pacientes con PC, en un 75% de los de periodontitis agresiva generalizada, y en un 60% de los pacientes que reciben tratamiento inmunosupresor.

Desde el punto de vista cuantitativo, los niveles de RANKL en periodontitis agresiva generalizada son 10 veces mayores que en los pacientes con PC. En el caso de la OPG, la expresión es menor en todos los grupos con patología, pero esta diferencia sólo resulta estadísticamente significativa en el caso de la PC; los niveles de RNAm de OPG en PC son 16 veces menores que en el caso de periodontitis agresiva. En comparación con los tejidos sanos, el ratio RANKL/OPG es significativamente mayor en todos los grupos de periodontitis, pero no en el grupo de gingivitis; sin embargo, no se muestran diferencias estadísticamente significativas en el ratio entre PC y agresiva.

En el grupo de pacientes con periodontitis crónica y tratamiento inmunosupresor, la expresión de OPG es mayor en comparación con el grupo de pacientes con PC; sin embargo no existen diferencias en la expresión de RANKL ni en el ratio RANKL/OPG entre ambos grupos.

El análisis estadístico demuestra que existe una correlación positiva entre la expresión de RANKL y los parámetros clínicos de nivel de inserción clínica, profundidad de sondaje, sangrado al sondaje y presencia de placa. Lo mismo ocurre con el ratio RANKL/OPG en relación a los parámetros clínicos anteriormente mencionados, excepto con la presencia de placa. Sin embargo, la expresión de OPG no se correlaciona con ningún parámetro clínico (Bostanci y cols., 2007b).

Bostanci, paralelamente al estudio histológico, realizó una valoración de los niveles de RANKL y OPG a nivel del fluido crevicular con los mismos grupos de estudio. En este caso se estudiaron 21 individuos sanos periodontalmente, 22 pacientes con gingivitis, 28 pacientes con PC, 25 pacientes con periodontitis agresiva y 11 pacientes con PC y tratamiento inmunosupresor (Bostanci y cols., 2007a).

Los individuos sanos y con gingivitis demostraron tener unos niveles bajos de expresión de RANKL, siendo estos de $6,8 \pm 3,8$ y $9 \pm 5,7$ pg/ μ l respectivamente. Los niveles de RANKL en el grupo de pacientes con PC, periodontitis agresiva, y PC con

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

tratamiento inmunosupresor fueron significativamente más elevados ($370 \pm 54,7$ pg/ μ l, $387,5 \pm 42,8$ pg/ μ l y $168,1 \pm 36$ pg/ μ l, respectivamente). A la vista de estos resultados no existen diferencias estadísticamente significativas entre periodontitis agresiva y crónica, pero los niveles de RANKL son 2,2 veces más bajos en los pacientes PC que reciben tratamiento inmunosupresor.

Los niveles de OPG tiene una distribución inversa, es decir, los valores son significativamente mayores en el grupo de individuos sanos comparados con el resto de grupos de estudio (sanos: $408,1 \pm 36,6$ pg/ μ l; gingivitis: $167,6 \pm 20,6$ pg/ μ l; periodontitis crónica: $119,6 \pm 14,4$ pg/ μ l; periodontitis agresiva: $101,5 \pm 10,2$ pg/ μ l; periodontitis crónica con inmunosupresores: $61,2 \pm 12,3$ pg/ μ l). No se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de PC y agresiva, pero el grupo de pacientes con PC con tratamiento inmunosupresor tiene unos niveles más bajos en relación a los pacientes con PC (Bostanci y cols., 2007a).

En cuanto al ratio RANKL/OPG, se observó que el grupo de individuos sanos y el grupo de pacientes con gingivitis tenía un ratio significativamente más bajo que el grupo de pacientes con periodontitis ($0,017 \pm 0,008$ y $0,053 \pm 0,034$, respectivamente). Sin embargo, entre los pacientes con periodontitis no existían diferencias estadísticamente significativas (PC: $3,19 \pm 0,23$; periodontitis agresiva: $3,81 \pm 0,15$ y PC con inmunosupresores: $2,65 \pm 0,3$).

Por otra parte, la concentración de RANKL se correlacionaba positivamente con la pérdida de inserción clínica, la profundidad de sondaje y el índice de placa. La OPG se correlacionaba negativamente con la profundidad de sondaje, la pérdida de nivel de inserción clínica, el sangrado al sondaje y el índice de placa. Por último, el ratio RANKL/OPG se correlacionaba positivamente con la profundidad de sondaje, nivel de inserción clínica e índice de placa.

El estudio de Garlet (Garlet y cols., 2004) es el único que encuentra diferencias estadísticamente significativas en relación a la expresión de OPG en diferentes grados de enfermedad periodontal. Concretamente observa que las reacciones positivas a la OPG son mayores en los sitios analizados con PC con respecto a los sitios con periodontitis agresiva. Según el autor, esto explicaría la mayor severidad de la forma clínica agresiva.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El primero de los estudios histológicos que correlaciona los niveles de RANKL, OPG y el ratio relativo entre estos dos parámetros y la presencia del periodontopatógeno *Porphyromonas gingivalis* (P.g.) fue el realizado por Wara-aswapati en el 2007. Con este propósito estudió dos grupos, un grupo control formado por 15 individuos periodontalmente sanos y un grupo estudio formado por 15 pacientes con PC. A ambos grupos se les tomó una biopsia gingival y una muestra de la placa subgingival para realizar un análisis microbiológico (Wara-aswapati y cols., 2007).

El resultado de este estudio determinó que la expresión de RNAm RANKL en el grupo de pacientes con PC fue significativamente mayor que en el grupo control. Sin embargo, la diferencia de los niveles medios de RNAm de OPG, aunque son menores en el grupo de PC, no resulta estadísticamente significativa. El ratio RANKL/ OPG RNAm fue significativamente mayor en el grupo de pacientes con enfermedad periodontal. En conclusión, los pacientes con PC se asocian con un aumento del RANKL y del ratio RANKL/ OPG. Los resultados de la correlación microbiológica señalaron que existía una sobreexpresión del RNAm del RANKL en presencia de *Porphyromona gingivalis* (Wara-aswapati y cols., 2007).

Posteriormente, en 2008, Sakellari realizó un estudio con la intención de valorar el grado de correlación de RANKL, a nivel del fluido crevicular con diferentes patógenos en pacientes periodontales (Sakellari y cols., 2008).

Estudiaron un grupo de 25 pacientes con PC y un grupo control periodontalmente sanos de 38 individuos. Se realizó un análisis mediante métodos de ELISA para valorar la cantidad de RANKL soluble presente en el líquido crevicular. El análisis microbiológico se realizó mediante la técnica de hibridación DNA-DNA para los siguiente los patógenos periodontales: *Porphyromona gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola*.

Los resultados del estudio determinaron que los niveles de RANKL eran más elevados en los pacientes con PC que en los individuos controles. El análisis descriptivo determinó una cierta relación entre la cantidad de RANKL y todos los patógenos, pero la correlación fue estadísticamente significativa sólo para *T. Denticola* cuando se comparaba entre individuos, y para *T. denticola* y la *P. gingivalis* al compararlo entre sitios de toma de la muestra (Sakellari y cols., 2008).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Un estudio interesante es el realizado por el grupo de Silva en 2008 (Silva y cols., 2008). En este estudio la muestra total es de 56 pacientes con periodontitis crónica, y el estudio lo que buscaba fue valorar si existían diferencias entre zonas con actividad periodontal o sin actividad periodontal en un mismo paciente. Con este propósito estudió dos tipos de localizaciones: todas tienen que tener una profundidad de sondaje igual o mayor a 5 mm y con una pérdida de inserción igual o mayor de 3 mm. La diferencia en una zona activa es que tiene que haber una progresión en la pérdida de inserción de 2 mm o más en un periodo de dos meses. Se distinguieron por tanto localizaciones que cumplen este criterio de actividad periodontal, de localizaciones donde no existe esa progresión y por tanto se consideran sin actividad destructiva.

Los resultados demostraron que las zonas con actividad periodontal tienen unos valores más elevados de RANKL ($125,95 \pm 22,2$ pg) en comparación con las zonas que se consideran inactivas ($91,80 \pm 10,7$ pg.), siendo estas diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, este estudio no valoró los niveles de OPG.

Uno de los últimos estudios publicados, (Baltacioglu 2014), valoró los niveles de estas moléculas a nivel del fluido crevicular y en el suero de los individuos. Los autores analizaron el fluido crevicular y el suero de 30 sujetos con PC, 30 sujetos con periodontitis agresiva y 28 sujetos sanos (Baltacioglu y cols., 2014).

Los resultados determinaron que los niveles de RANKL, a nivel del fluido crevicular y en suero, fueron mayores en el grupo de individuos que padecen periodontitis que en sanos; y esa diferencia fue estadísticamente significativa, pero no entre los dos grupos de periodontitis. Los niveles de OPG fueron menores ($p < 0,05$) en los grupos de pacientes con periodontitis en relación al grupo de individuos control, pero tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de periodontitis. Cuando analizaron el ratio RANKL/OPG, los valores hallados fueron más elevados en los pacientes con periodontitis en relación al grupo control ($p < 0,05$); además, también encontraron diferencias estadísticamente significativas al contrastar el grupo de pacientes con periodontitis agresiva (valores más elevados) con el grupo de PC.

Estos autores destacan el gran valor que puede tener el ratio RANKL/OPG en el diagnóstico y tratamiento periodontal.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Una vez revisadas estas publicaciones y teniendo en cuenta sus resultados se podría concluir que en los pacientes con periodontitis se observa:

1°- Unos niveles elevados de RANKL tanto a nivel del fluido crevicular como en su identificación histológica.

2°- Bajos niveles de OPG.

3°- Un ratio RANKL/OPG aumentado en los sitios con periodontitis. Por el contrario cuando no hay afectación ósea, como en el caso de individuos sanos o con gingivitis, el ratio de estos marcadores moleculares es inferior.

4°- Los resultados de estos estudios parecen señalar a los linfocitos T activados como una de las principales células productoras de RANKL en situación de periodontitis.

Sin embargo hay discrepancias en cuanto a los niveles de estas moléculas en PC y periodontitis agresiva, en la gravedad de la periodontitis, y en las mediciones clínicas de profundidad de sondaje, pérdida de nivel de inserción clínica y grado de inflamación de la encía (sangrado al sondaje).

Se tiene muy poca información sobre el comportamiento de los niveles de estas moléculas en los episodios de actividad-remisión durante el curso evolutivo de la periodontitis.

Otro punto de interés, y dado que el tabaco es un factor de riesgo en la periodontitis, se ha planteado si éste pueda ejercer su efecto influyendo en la regulación RANKL-OPG. Estudios en suero, sugieren que en individuos fumadores con PC tienen menor concentración de OPG (Lappin y cols., 2007, Ozcaka y cols., 2010), y un estudio realizado en saliva mostró alta concentración de RANKL y baja de OPG (Buduneli y cols., 2008); otros estudios realizados también en saliva mostraron diferencias en una menor concentración de OPG y un mayor ratio RANKL / OPG cuando los fumadores excedían de 20 paquetes de cigarrillos al año (Tang y cols., 2009).

Algunas publicaciones apuntan también que otros factores de riesgo de la periodontitis pudieran intervenir en la ruta RANKL-OPG. Un estudio realizado en humanos con osteoporosis (Jabbar y cols., 2011) señalan una mayor concentración de RANKL y OPG a nivel de suero que en sujetos sin osteoporosis.

Los pacientes diabéticos parecen tener mayor concentración de OPG en plasma y menor ratio RANKL/OPG que en individuos sanos (Lappin y cols., 2009); sin embargo en

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

el caso de diabéticos mal controlados con PC, tanto a nivel del tejido de la encía como en fluido crevicular, muestran mayores concentraciones de RANKL y un mayor ratio RANKL/OPG (Duarte y cols., 2011, Ribeiro y cols., 2011, Santos y cols., 2010).

2.6. TRATAMIENTO PERIODONTAL Y VALORES DE RANKL – OPG.

En los últimos años han empezado a surgir los primeros estudios sobre el efecto del tratamiento periodontal (raspado y alisado radicular junto a medidas higiénicas) en los niveles de estas moléculas; si bien, como veremos a continuación, únicamente encontramos 2 estudios realizados a nivel de fluido crevicular, uno sobre biopsias y uno en saliva. En la tabla 3 podemos observar un resumen de los resultados.

(TABLA nº 3). Estudios donde se aplica tratamiento periodontal básico.

ESTUDIO	MUESTRA	RESULTADOS
B o s t a n c i 2011 (F l u i d o crevicular)	P. Crónica : 14 P.Agresiva: 13	El ratio RANKL/OPG no cambia después del tratamiento periodontal y no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.
B u d n e l i 2009 (f l u i d o crevicular)	P. Crónica: 20 (10 fumadores y 10 no fumadores)	Disminución estadísticamente significativa de OPG después del tratamiento periodontal básico. Pero no existen diferencias respecto al hábito tabáquico.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Dereka 2010 (Biopsia)	P. Avanzada (postratamiento): 14 Sanos:11 (INMUNOHISTOQUIMIA)	En el grupo de periodontitis post tratamiento los niveles de RANKL son más bajos que en el grupo control sano. Los niveles de OPG son mayores que en el grupo de periodontitis y estas diferencias son estadísticamente significativas. Hay una tendencia a un ratio RANKL/OPG más elevado en el grupo de periodontitis, pero no significativo.
Buduneli 2008 (saliva)	P. no tratada: 67 (34 fumadores) P. en mantenimiento: 44 (22 fumadores)	El tabaco se asocia a valores menores de OPG, lo que determina, al final, un ratio RANKL/OPG mayor en pacientes fumadores.

Uno de los primeros estudios donde se valoraron los niveles de RANKL y OPG en pacientes con periodontitis, tratados y no tratados, fue el de Buduneli, 2008. Estos autores analizaron un total de 111 pacientes con periodontitis crónica que ya completaron el tratamiento periodontal activo. Estos pacientes fueron divididos en los siguientes grupos: por una parte pacientes que seguían con tratamiento de mantenimiento (n= 44), de los cuales 22 eran fumadores; y por otra parte, un grupo de individuos que no cumplían con tratamiento de mantenimiento (n= 67, con 34 fumadores). En función del mantenimiento y del hábito tabáquico, los pacientes fueron divididos en 4 grupos. Se estudiaron parámetros clínicos periodontales y concentraciones de RANKL y OPG en saliva mediante técnicas de ELISA (Buduneli y cols., 2008).

A nivel de los parámetros clínicos, las únicas diferencias estadísticamente significativas que observaron en el grupo de pacientes que no recibieron tratamiento de mantenimiento y además eran fumadores; estos pacientes presentaron mayor pérdida de inserción y mayores profundidades de sondaje. Al analizar los resultados a nivel bioquímico salival, se concluyó que existían diferencias estadísticamente significativas en

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

algunos parámetros. Los niveles de OPG fueron más bajos en pacientes fumadores que en los no fumadores, tanto en los grupos de pacientes con y sin mantenimiento periodontal. Se observó que la concentración de RANKL en pacientes no fumadores era mayor en el grupo de pacientes sin mantenimiento que en el grupo de pacientes con mantenimiento. Finalmente se observó que el ratio de RANKL/OPG era más elevado en pacientes fumadores en Mantenimiento que en los no fumadores y en Mantenimiento.

En resumen, parece que el hábito tabáquico influye sobre los niveles de OPG en la saliva, de manera que en los pacientes fumadores el ratio RANKL/OPG es mayor que en pacientes no fumadores. De ser cierto, quedaría identificado un nuevo mecanismo de acción del tabaco sobre la salud periodontal.

Un año mas tarde, este mismo grupo de investigadores (Buduneli y cols., 2009) realizó un estudio sobre fluido crevicular, valorando la influencia que el hábito tabáquico tiene en el éxito del tratamiento periodontal básico.

Se estudió una muestra de 20 individuos, de los cuales 10 fumaban, y 10 no fumaban; se analizaron las concentraciones de RANKL y OPG inicialmente, es decir antes del tratamiento, y después de 4 semanas de acabada la fase básica de tratamiento. En los resultados, llama la atención que en ambos grupos, independientemente del hábito tabáquico, presentan unas concentraciones similares de RANKL y OPG antes del tratamiento periodontal. Después de las 4 semanas de terminada la fase básica, se observó una disminución estadísticamente significativa en la concentración de OPG en ambos grupos, pero no diferencias entre fumadores y no fumadores; mientras que para la concentración de RANKL no existían diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos. Por lo tanto, si bien el tratamiento periodontal produce cambios en las concentraciones, concretamente de OPG, la influencia del tabaco no está del todo clara.

Dereka, en el 2010, realizó un estudio determinando la presencia de RANKL y OPG con métodos basados en inmunohistoquímica en un grupo de 14 pacientes con periodontitis crónica avanzada, se les realizó fase básica e iban a ser sometidos a cirugía periodontal. El grupo control estaba compuesto por 11 individuos periodontalmente sanos que necesitaban cirugía de alargamiento coronario (Dereka y cols., 2010).

Los resultados fueron los siguientes: la expresión de RANKL RNAm en el grupo de pacientes con periodontitis fue menor que en el grupo de pacientes periodontalmente

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

sanos; por el contrario, la expresión de OPG RNAm en el grupo de individuos sanos fue mucho mayor; por lo tanto el ratio RANKL/OPG resultó ser mayor en el grupo de periodontitis; pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. En este estudio se señala que las principales células productoras de RANKL son aquellas que participan en el proceso inflamatorio.

El estudio de Bostanci 2011 es el primero que valoró, a nivel de fluido crevicular, la influencia del tratamiento periodontal sobre estas moléculas. Estos autores realizaron un estudio con una muestra compuesta por 14 pacientes con PC y 13 pacientes con periodontitis agresiva. Inicialmente se tomaron registros clínicos y muestras en el fluido crevicular, posteriormente fueron sometidos a tratamiento de raspado y alisado radicular; a los 2, 3 y 4 meses se volvieron a tomar registros (Bostanci y cols., 2011).

A nivel de registros clínicos obtuvieron una mejoría con respecto a los valores iniciales en todos los parámetros, en ambos grupos de pacientes, y en los tres momentos de evaluación; además, estas diferencias resultaron ser estadísticamente significativas.

En el grupo de individuos con PC, la concentración de RANKL aumentó después del tratamiento, pero esta diferencia sólo fue estadísticamente significativa a los 2 meses. En el grupo de periodontitis agresiva ocurrió la misma tendencia siendo este incremento estadísticamente significativo únicamente al 4º mes postratamiento. A su vez, no hubo diferencias significativas entre ambos grupos.

Respecto a la concentración de OPG, en el grupo de pacientes con periodontitis agresiva, se produjo un incremento de la concentración que fue estadísticamente significativa al 4º mes; de forma similar estos resultados se observaron en el grupo de pacientes con periodontitis crónica. En el caso de la OPG, sí resulta una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos, siendo mayor la concentración en el grupo de periodontitis crónica.

Finalmente, cuando los autores analizaron el ratio RANKL/OPG, sorprendentemente no encontraron ninguna diferencia que resultara ser estadísticamente significativa ni con respecto a los registros iniciales ni entre ambos grupos de periodontitis.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.7. FLUIDO CREVICULAR

Tanto los trabajos de Brill como de Egelberg parecen indicar que la producción de líquido crevicular es, principalmente, el resultado de un aumento en la permeabilidad de los vasos subyacentes a los epitelios de unión y del surco. Una teoría alternativa surgió del trabajo de Alfano y la hipótesis planteada por Pashley, quienes sugieren que el líquido crevicular inicial podía, simplemente, ser líquido intersticial que aparece en el surco gingival como consecuencia del gradiente osmótico. Este líquido inicial pre-inflamatorio se consideró un trasudado, pero que, ante diversos estímulos, tenía capacidad para cambiar su composición para convertirse en un exudado inflamatorio (Griffiths, 2003).

El fluido crevicular es una compleja mezcla de distintos componentes, de sustancias procedentes del suero, leucocitos, células estructurales del periodonto y de bacterias bucales. Todos estos componentes poseen un gran potencial como posibles indicadores tanto de actividad de enfermedad periodontal como de curación tras el tratamiento periodontal.

Entre las sustancias del líquido crevicular procedentes del hospedador se encuentran anticuerpos, defensinas, componentes del Sistema Complemento, sustancias de adhesión celular, citocinas, enzimas y diversos productos derivados del metabolismo celular así como de la degradación tisular.

Por lo tanto, el fluido crevicular, además de cumplir su importante función en la fisiopatología periodontal, puede ser utilizado por clínicos e investigadores como una fuente de información sobre los acontecimientos patológicos que ocurren en el interior de los tejidos periodontales.

La identificación de marcadores óseos específicos en su composición es un dato de gran valor, especialmente desde la investigación como primer paso a su aplicación en la práctica clínica. Los marcadores utilizados hasta el momento han sido fragmentos de telopéptidos de colágeno y osteocalcina, cuyo único valor clínico es reflejar la actividad de resorción ósea.

Es evidente que el fluido crevicular proporciona una oportunidad única para el estudio de la patología periodontal. La obtención de muestras es un procedimiento no invasivo y resulta relativamente sencillo.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En la década de 1950 ya se conocía el potencial del líquido crevicular en la detección precoz de la periodontitis y en la curación de los tejidos periodontales tras el tratamiento. Sin embargo, en la actualidad no se dispone de ningún indicador periodontal práctico y preciso basado en el líquido crevicular.

Se han desarrollado pruebas que tienen como objetivo revelar el estado metabólico del tejido periodontal. Algunas de estas han mostrado valores aceptables desde el punto de vista de la especificidad y sensibilidad, así como cierto potencial para pronosticar la progresión de la enfermedad. Sin embargo, los clínicos no disponemos de una prueba práctica que indique con precisión el momento en que se produce el inicio de la periodontitis, los periodos en que la enfermedad está activa, o cuando el proceso de curación resulta eficaz (Uitto, 2003).

2.7.1. Métodos de recolección de fluido crevicular

- Método de lavado gingival: se difunde una solución isotónica en el surco gingival y se recoge el fluido crevicular resultante del lavado, siendo una disolución del fluido crevicular, la cual contiene células y componentes moleculares. El problema es que es una técnica compleja que limita su uso prácticamente a la arcada superior; por otra parte, no se puede recuperar todo el fluido durante el proceso de aspiración (Griffiths, 2003).
- Capilaridad o micropipetas: después de un buen secado y aislamiento de la zona, las micropipetas se insertan en la entrada del surco gingival; por un proceso de capilaridad, el fluido crevicular migra al interior del tubo; debido a que se conoce el diámetro interno puede determinarse de forma precisa el volumen midiendo la cantidad de fluido que ha migrado al interior del tubo (Sueda y cols., 1969). La ventaja de esta técnica es que no se obtiene el fluido diluido; la principal desventaja es que, a no ser que exista inflamación gingival, el volumen de fluido crevicular es mínimo tardándose mucho en recoger el volumen necesario, lo que hace que sea una técnica traumática y, por sí misma, estimule la producción de exudado.
- Tiras de papel absorbente: son pequeñas bandas de celulosa que permiten recoger el fluido crevicular por capilaridad cuando son insertadas en el surco gingival o

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

cuando son colocadas en su entrada. La ventaja de esta técnica es que la metodología es rápida, sencilla y atraumática. Los métodos pueden dividirse en dos dependiendo de la inserción en el surco crevicular

- Extracrevicular: La tira se sitúa sobre el surco disminuyendo el trauma.
- Intracrevicular: Es el más utilizado en la mayoría de los estudios. A su vez puede dividirse en:
 - Técnica intrasurcular profunda. Insertar justo en la base del surco, durante 30 segundos hasta encontrar resistencia; esto introduce un grado de irritación al epitelio del surco que por sí mismo estimula el exudado.
 - Técnica intrasurcular superficial. Se inserta en la entrada del surco, con el fin de reducir al mínimo la irritación del surco. De este modo se capta el fluido que brota hacia fuera, aunque el epitelio del surco no quede en contacto con el papel (Griffiths, 2003).

2.7.2. Métodos de cuantificación de fluido crevicular

El primero de los métodos es medir la cantidad de fluido recogido en una tira absorbente, midiendo la zona empapada. Esto se realiza con una simple medida lineal con una grilla fijada en un microscopio. Una variante de esta técnica es teñir con diferentes sustancias la zona humedecida de la tira para poder realizar la medición. Para este fin se ha utilizado la tinción mediante ninhidrina. La zona donde se acumula el fluido crevicular adquiere un color morado ante la presencia de proteínas (Cimasoni, 1983).

También se ha utilizado fluoresceína, la cual se administra por vía oral al paciente, 2 horas antes de la recogida de la muestra, examinándola posteriormente con luz ultravioleta (Valazza y cols., 1972). Esta técnica se usa para detectar la presencia de fluido, no para calcular el volumen de fluido, pero aún así se demostró que la fluoresceína era 100 veces más sensible que el ninhidrina para la tinción de proteínas. Las técnicas de tinción tienen varias desventajas: en primer lugar no son fáciles de usar en el gabinete, debido a que por el tiempo que se emplea en su medida, hay variación en el volumen debido a la evaporación de la muestra. Además, la tinción de las tiras hace que no se puedan analizar

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

algunos otros componentes de fluido crevicular.

La segunda de las formas es determinando el peso del papel antes y después del muestreo. En este caso obtendremos una medida de peso en vez de volumen.

Sin embargo actualmente la mejor de las técnicas para determinar el volumen de fluido crevicular es mediante el equipo electrónico Periotron® 8000, que nos permite la determinación exacta del fluido crevicular y una posterior investigación de la composición de la muestra en el laboratorio. Este equipo mide los cambios en la tira humedecida y lo convierte en una lectura digital que puede correlacionarse con el volumen de FGC. Esta técnica es rápida y no afecta a la muestra del fluido crevicular. El Periotron® mide la corriente eléctrica del flujo de la zona mojada en la tira de papel. El aparato tiene dos “plataformas” metálicas que actúan como las placas de un condensador eléctrico. Lo primero que se realiza es colocar una tira seca entre las “plataformas”. La capacitancia se traduce a través del circuito eléctrico, y marcará cero en el lector ajustando así a 0 la medición. Al colocar una tira mojada posteriormente se incrementa la capacitancia en proporción al volumen del fluido.

Sin embargo, aunque se haya descrito como válido en la calibración un ajuste lineal para rangos muy pequeños de volumen, se han descrito otras forma de ajustes no lineal para los diferentes volúmenes que se midan (Bickel and Cimasoni, 1984, Chapple y cols., 1995, Preshaw y cols., 1996).

Podemos concluir, que en la actualidad existe la posibilidad de detectar las formas solubles del RANKL y la OPG a nivel del fluido crevicular, lo que hasta el momento ha aportado información en estado de patología periodontal pero relativamente poco con respecto a la respuesta del tratamiento periodontal básico. Por tanto el objetivo como veremos posteriormente es hallar información sobre el efecto que tiene nuestro tratamiento clínico en el paciente con patología periodontal sobre los niveles de RANKL y OPG a nivel del fluido.

3. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO

Desde el punto de vista experimental queda clara la importancia del RANKL, RANK y OPG en la regulación de la osteoclastogénesis, lo que ha permitido un mayor entendimiento del metabolismo óseo tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. En el campo de la medicina, el estudio de estas moléculas ha permitido obtener avances importantes tanto en el diagnóstico como en el tratamiento de diversas patologías que cursan con alteraciones del metabolismo óseo. Su interés clínico va desde el campo de la reumatología hasta el de la oncología.

El estudio de posibles determinantes de la actividad destructiva periodontal ha sido uno de los grandes temas de interés en el campo de la periodoncia. Existe gran cantidad de estudios que relacionan los niveles de determinadas citocinas y de otros mediadores moleculares con la actividad destructiva, pero, sin duda, el descubrimiento de la ruta molecular RANKL/RANK/OPG ha permitido entender cómo se integran las acciones de diversas moléculas implicadas en la remodelación ósea, porque es el paso final y determinante de la diferenciación y activación osteoclástica.

Las investigaciones publicadas hasta el momento parecen indicar que las concentraciones de RANKL son elevadas en los tejidos periodontales así como en el fluido crevicular de los pacientes con periodontitis. Sin embargo, tenemos poca información acerca de si la concentración de RANKL puede estar relacionada con el grado de severidad de la patología o con las fases de actividad y remisión, o si pudiera existir un perfil bioquímico diferente en las dos formas clínicas de periodontitis más frecuentes (agresiva o crónica).

En cuanto a las concentraciones de OPG, parece claro que los niveles de OPG son mayores en aquellos individuos periodontalmente sanos o que sólo padezcan gingivitis. En pacientes con periodontitis los niveles de OPG son menores, o incluso marcadamente menores en casos de periodontitis agresiva.

A la vista de los resultados de las investigaciones publicadas hasta el momento, entendemos que el ratio RANKL/OPG es más elevado en periodontitis que en gingivitis o en situación de salud. Según los conocimientos actuales, las células encargadas de la expresión del RANKL, a nivel del periodonto y en condiciones de salud, son los fibroblastos (gingivales y del ligamento periodontal), los osteoclastos y los osteoblastos; pero en presencia de periodontitis los principales encargados de la expresión del RANKL

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO

parecen ser los linfocitos T y B activados. Este hecho explicaría cómo el propio sistema defensivo del hospedador frente a los microorganismos del biofilm bacteriano dental sería el mecanismo mediador de la osteoclastogénesis (Osteoinmunología).

A pesar de la documentada implicación del RANKL y de la OPG en la enfermedad periodontal, aún quedan diversos interrogantes respecto al comportamiento de estos mediadores en la etiopatogenia de esta patología, así como en la utilidad clínica que pudieran tener como marcadores de enfermedad periodontal.

Con respecto a esta última cuestión, son escasos los trabajos publicados que hayan estudiado la respuesta que se produce en dichos mediadores moleculares cuando se realiza la terapia periodontal básica.

Nuestra hipótesis principal de trabajo contempla que el tratamiento periodontal básico (raspado y alisado radicular, más instrucciones en higiene oral) tiene efecto sobre la concentración de RANKL y OPG en el líquido crevicular de pacientes con patología periodontal, y se produce una disminución en el ratio RANKL/OPG, reduciendo los valores absolutos de RANKL y/o aumentando los de OPG.

4. OBJETIVOS

OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO PRINCIPAL

El objetivo general de este trabajo de investigación es estudiar el impacto del tratamiento periodontal básico sobre el ratio de RANKL/OPG en el fluido crevicular de pacientes con periodontitis crónica.

Los objetivos principales son los siguientes:

1º En el grupo de pacientes con periodontitis crónica pretendemos estudiar si el grado de salud periodontal esta relacionado con la concentración de RANKL y OPG en el fluido crevicular. Para ello planteamos dos objetivos concretos:

1. Valorar las diferencias entre localizaciones sanas y con periodontitis, en un paciente periodontal.
2. Estudiar el comportamiento de los niveles de estos mediadores moleculares después del tratamiento periodontal básico.

2º El segundo objetivo principal pretende estudiar las diferencias en los niveles de RANKL y OPG en el fluido crevicular entre un grupo de individuos periodontalmente sanos y el grupo de pacientes con periodontitis crónica. Para ello planteamos tres objetivos concretos:

1. Comparar los niveles medios de RANKL y OPG obtenidos en individuos sanos con los obtenidos en zonas enfermas de los pacientes periodontales.
2. Comparar los niveles de RANKL y OPG de individuos sanos con los niveles obtenidos en localizaciones sanas de enfermos con P.Crónica.
3. Contrastar los niveles de estos mediadores moleculares obtenidos en individuos periodontalmente sanos con los pacientes periodontales que han sido tratados con tratamiento periodontal básico.

OBJETIVOS

4.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

- 1.- Corroborar la mejora clínica tras el tratamiento periodontal de raspado y alisado radicular.
- 2.- Establecer una correcta curva de calibración individualizada del periotron 8000 ®
- 3.- Valorar los cambios de volumen de fluido crevicular tras el tratamiento periodontal básico.

CAPITULO II:
METODOLOGIA

5. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

En este estudio de tipo analítico planteamos dos diseños para poder estudiar los objetivos planteados.

En la primera parte del estudio se trata un diseño de ensayo clínico donde, en un mismo individuo con periodontitis, vamos a estudiar dos situaciones clínicas diferentes: zona sana y zona enferma, donde la sana se comportará como control. Es decir, la unidad de estudio será la localización concreta en un diente, a la cual aplicaremos el mismo tratamiento y veremos su evolución en el tiempo.

La aleatorización simple se realizará mediante un cuadro excel incluyendo todos los pacientes preseleccionados según los criterios de inclusión y exclusión.

El tipo de enmascaramiento al aplicar un sólo tratamiento hace que el sujeto sepa qué tratamiento es, al igual que el operador, pero sin embargo el explorador encargado de recoger las muestras, el técnico de laboratorio y el estadístico desconocen a qué grupo pertenecen.

La segunda parte del estudio será comparar los resultados obtenidos en la primera parte con un control externo. Debido a que no existe un valor de concentración de RANKL y OPG predeterminado en salud periodontal, para este objetivo se toma una muestra de individuos con ausencia de enfermedad periodontal para poder establecer una comparativa.

5.2. MUESTRA

5.2.1. Tamaño muestral

A la hora de la selección del tamaño muestral hay que tener en cuenta la variable principal a estudiar y qué variación consideramos clínicamente significativa. En este estudio la variable principal es la concentración de RANKL y OPG; hoy por hoy no existen unas concentraciones estimadas de dichos parámetros en condiciones de salud o patología periodontal, por lo que no podemos saber qué consideramos una variación clínicamente significativa. En este tipo de situaciones, para tomar el tamaño muestral se tiene en cuenta la bibliografía existente. En este caso se toman como referencia estudios donde se hayan encontrado diferencias estadísticamente significativas en la variación de estos parámetros. En este sentido sólo tenemos en la literatura dos estudios que analicen la

MATERIALES Y MÉTODOS

variación de la concentración de estos parámetros en el fluido crevicular en dos momentos después de tratamiento periodontal básico, Bostanci 2011 y Buduneli 2009 (Bostanci y cols., 2011, Buduneli y cols., 2009), en los que se estudian un total de 27 y 20 individuos respectivamente.

Por lo tanto, se opta por estudiar una muestra de 25 individuos, que fueron obtenidos del personal de la Facultad y de los pacientes que acuden a primeras visitas de la Unidad de Periodoncia de la Clínica Odontológica de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

Los 25 individuos se dividen en dos grupos de estudio :

- **Muestra control:** 10 individuos periodontalmente sanos
- **Muestra de estudio:** 15 pacientes con periodontitis.

5.2.2. Criterios de inclusión:

Para ser incluidos en el estudio, los individuos deben leer y firmar el documento de consentimiento, y se han de comprometer a cumplir fielmente el protocolo del estudio.

1.- Muestra control:

Se considerarán individuos sanos aquellos que clínicamente no presenten signos ni síntomas de enfermedad periodontal en sus dientes.

2.- Muestra estudio:

Para ser incluido en la muestra, cada paciente debe haber sido diagnosticado de periodontitis crónica moderada o avanzada basándose en el “ sistema de clasificación periodontal y condiciones” de Armitage de 1999, y, además, contar al menos con un diente unirradicular por cada una de las siguientes situaciones clínicas:

- *Diente sano:* Profundidades de sondaje menor a 3 mm., sin recesión y sin sangrado al sondaje.
- *Diente con periodontitis severa:* Pérdida de inserción igual o mayor de 6 mm.

MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.3. Criterios de exclusión:

- 1.- Pacientes con periodontitis agresiva (Armitage, 1999).
- 2.- Presencia de alteraciones sistémicas o toma de fármacos que alteran el metabolismo óseo (Moro Alvarez, 2001) como osteoporosis, artritis, tratamiento hormonal, bifosfonatos, antiinflamatorios, inmunosupresores...etc.
- 3.- Haber recibido tratamiento antibiótico, antiinflamatorio, anticonceptivo en los tres últimos meses, o toma de antiagregantes plaquetarios en los 7 últimos días.
- 4.- Trauma oclusal primario o secundario en alguno de los dientes incluidos para su estudio.
- 5.- Haber recibido algún tipo de tratamiento periodontal en los últimos 6 meses.
- 6.- Estar en tratamiento ortodóncico.
- 7.- Fumadores.
- 8.- Pacientes embarazadas o en periodo de lactancia.
- 9.- Pacientes que presenten en la localización estudio patologías bucales como absceso periapical activo o absceso periodontal.

5.2.4. Criterios de exclusión durante el estudio:

- 1.- Toma de cualquier fármaco que pueda alterar la respuesta al tratamiento periodontal (antiinflamatorios, antibióticos, colutorios antisépticos).
 - 2.- Toma de cualquier fármaco que pueda alterar el metabolismo óseo.
- De la misma manera será criterio de exclusión la imposibilidad, por parte del individuo, del cumplimiento estricto de las normas del protocolo.

5.3. MATERIAL:

- Sonda periodontal de Williams (PQ-OW 208 396: 10mm. Hu-Friedry ®,USA)
- Sistema de paralelización radiográfica O-Ring (Densply®)
- Sonda bifurcaciones Nabers (2N mango 7 Qulix 12 mm. Hu-Friedry ®, USA)
- Aparato de radiografías intraoral (E-wood®, Haigol-Dong, Korea)
- Perio paper strips ®: tiras de papel especiales para recoger volúmenes de fluido crevicular de 0-1,2 ml (Oraflow®, New York, USA)

MATERIALES Y MÉTODOS

- Periotron 8000®: micro-medidor de humedad electrónico especialmente diseñado para valorar el fluido crevicular, el fluido de la bolsa periodontal y el fluido salival (Oraflow®, New York, USA)
- Periotron professional: Software diseñado para pasar los valores dados por el Periotron 8000® a mililitros (Oraflow®, New York, USA)
- Viales de reacción 1,5 ml (Ependorff®, Germany, Europe)
- Pipetas de precisión calibradas de 10-1000 µl y puntas desechables (Ependorff®, Germany, Europe)
- Agua destilada o desionizada
- PBS (Fosfato buffer saline)
- Inhibidores de las proteasas (C.N. P8340 Sigma, Missouri, USA)
- Kit Elisa RANKL (BioVendor, Czech Republic, Europe) y OPG (Bender MedSystems, Austria, Europe)
- Lavador automático de placas
- Lector de ELISA con capacidad para leer absorbancias desde 450 nm a 620 nm.
- SONICflex 2003 ® / L y punta universal del nº 5. (KAVO®, Germany)
- Cureta Gracey modi#1/2 mango #6 (Hu-Friedry ®, USA)
- Cureta Gracey modi#7/8 mango #6 (Hu-Friedry ®, USA)
- Cureta Gracey modi#11/12 mango #6 (Hu-Friedry ®, USA)
- Cureta Gracey modi#13/14 mango #6 (Hu-Friedry ®, USA)
- Cureta Vision Curvette ½ mango #6 (Hu-Friedry ®, USA)
- Cureta Columbia #13/14 mango #6 (Hu-Friedry ®, USA)

MATERIALES Y MÉTODOS

5.4.- REGISTROS CLÍNICOS:

- Datos de la historia clínica:

- Edad del paciente
- Patologías sistémicas
- Medicación
- Hábitos higiénicos (material, frecuencia, técnica y tiempo)

- Exploración periodontal:

- Profundidad de sondaje: se define como la distancia en milímetros entre el margen gingival y el fondo de la bolsa periodontal; se medirá mediante una sonda periodontal manual Williams milimetrada (PQ-OW 208 396, Hu-Friedy ®, EEUU); se registrarán seis puntos por diente (disto-vestibular, medio-vestibular, mesio-vestibular, disto-palatino, medio-palatino y mesio-palatino). La presión aproximada sería entorno a los 20 gramos.
- Recesión: se medirá la distancia desde la línea amelocementaria al margen gingival y se registrarán en los mismos puntos citados anteriormente (disto-vestibular, medio-vestibular, mesio-vestibular, disto-palatino, medio-palatino y mesio-palatino).
- Nivel de inserción clínica: Sumando los parámetros anteriormente citados podemos hallar este parámetro por cada punto.
- Índice dicotómico de sangrado al sondaje “Gingival Bleeding Index”: La puntuación 0 sería ausencia de sangrado, y 1, hemorragia; se esperarán 10 segundos después del sondaje para ver si existe dicho sangrado. La descripción original de este índice es en cuatro puntos por diente, pero realizaremos una modificación valorando los 6 puntos por diente anteriormente mencionados. Al final se hallará el porcentaje de sangrado total de la boca (Ainamo and Bay, 1975).
- Índice de movilidad de Miller (Miller, 1938):
 - **Clase I:** Movilidad de hasta 1 mm de recorrido en dirección horizontal.

MATERIALES Y MÉTODOS

- **Clase II:** Movilidad mayor de 1 mm de recorrido en dirección horizontal.
 - **Clase III :**
El movimiento excesivo tanto en dirección horizontal como vertical
- Índice de placa (Silness and Løe, 1964):
 - Puntuación 0 = sin placa
 - Puntuación 1 = una película de placa adherida al margen gingival libre y al área adyacente del diente. La placa puede ser vista in situ sólo después de la aplicación de un revelador o mediante el uso de la sonda sobre la superficie del diente.
 - Puntuación 2 = acumulación moderada de depósitos blandos en la bolsa, en el diente o en el margen gingival, que puede ser visto con el ojo desnudo.
 - Puntuación 3 = abundancia de materia blanda dentro de la bolsa y / o sobre el diente y el margen gingival.
 - Índice de afectación furcal (Hamp y cols., 1975):
 - **Clase I:** El nivel de pérdida ósea permite la inserción de la sonda periodontal Nabers en la concavidad del tronco radicular. El defecto de furca es inferior a 3 mm en sentido horizontal.
 - **Clase II:** El nivel de pérdida ósea permite la inserción de una sonda periodontal Nabers en la zona de la

MATERIALES Y MÉTODOS

bifurcación entre las raíces. El defecto de furca es al menos de 3 mm en sentido horizontal (y por lo tanto, en general, supera la mitad del espesor vestibulolingual del diente), pero hay todavía algo de hueso interradicular unido en el ángulo de la bifurcación.

- **Clase III:** El nivel de pérdida de masa ósea permite atravesar con la sonda Nabers de parte a parte la furca. De vestibular a lingual en los molares inferiores. De vestibular a mesio-palatino y disto-palatino en los molares superiores. El defecto abarca toda la anchura del diente; no existe hueso unido al ángulo de la furcación.

Este parámetro clínico posteriormente no se analizará en el análisis estadístico, sin embargo, sigue el protocolo estándar de exploración periodontal por lo que lo describimos en este apartado.

- Exploración radiográfica:

- En el grupo casos (estudio), se realiza una serie radiográfica completa formada por 18 radiografías, de las cuales 14 son periapicales de incisivos, caninos, premolares y molares de todos los cuadrantes, y 4, aletas de mordida verticales de premolares y molares. Todas ellas se realizan con técnica radiográfica paralelizada mediante la utilización del sistema de paralelización O-Ring y aparato de rayos X intraoral con el sistema de Durr dental ® con placas de fósforo digitales.
- En el grupo control sólo se realizarán dos aletas de mordidas horizontales para confirmar la ausencia de pérdida de nivel de resta ósea.

MATERIALES Y MÉTODOS

5.5. REGISTROS DE LABORATORIO

5.5.1. Cantidad de fluido crevicular

5.5.1.1. Calibrado del Periotron 8000:

El Periotron® 8000, según hemos citado en el apartado de introducción es un aparato que nos permite la medición del volumen de fluido crevicular gingival, el cual es recogido mediante puntas de papel absorbentes (Periopaper®). Este aparato se debe calibrar correctamente antes de su utilización. En la pantalla aparece un número, definido como Unidad de Periotron; para poder extrapolar estas unidades a microlitros es necesario construir gráficas de calibración, utilizando cantidades de fluido conocidas.

Una vez encendido el equipo, se debe esperar durante 10 minutos. Se coloca una punta de papel seca y se ajusta el dial hasta que aparece el cero en la pantalla digital, lo que determina un nivel de conductancia 0. Posteriormente se van a ir colocando incrementos de volumen de líquido conocido mediante la utilización de una microjeringa de Hamilton (volumen máximo 2µl, con gradaciones de 0'02µl). El líquido utilizado para la calibración es suero humano, por ser parecido al fluido crevicular gingival tanto en viscosidad como en composición (Chapple y cols., 1995).

Las puntas se transfieren a los sensores del Periotron® (2-3 segundos) de forma rápida, para evitar errores de evaporación. Las puntas se posicionan de una forma estandarizada, con la línea naranja fuera de los sensores; a los 16 segundos de colocar las tiras aparecerán en la pantalla las unidades periotron. Finalmente, mediante una gasa humedecida en alcohol, se limpian los sensores del Periotron® entre cada muestra.

Se midió al menos tres veces cada volumen conocido, después de cada muestra, y se volvió a poner a cero. De esta forma obtenemos una serie de datos que nos permitirá obtener una curva de calibración.

5.5.1.2. Toma y procesado del fluido crevicular

El protocolo de toma y procesado de las muestras es siempre el mismo para todos los individuos de la muestra; sin embargo, en el caso de los individuos con patología periodontal merece una explicación más precisa en cuanto a la elección del diente y toma de muestra. En el grupo casos, se recogen 4 muestras de fluido crevicular, 2 por cada uno de los dientes uniradiculares con las 2 situaciones clínicas descritas en los criterios de

MATERIALES Y MÉTODOS

inclusión. En el grupo control se recogerán 2 muestras de una de las zonas de sondaje de un diente uniradicular.

Protocolo de toma de muestra:

- Eliminar la placa supragingival con una cureta estéril sin tocar la encía, lavar con abundante agua, aislar con rodillos de algodón y secar con aire para evitar la contaminación por saliva.



- Se inserta la punta de Perio Paper® hasta notar resistencia y dejarla durante 30 segundos. NOTA: Si el papel se mancha de sangre o de detritos la muestra está contaminada y hay que volver a tomarla.



- Medir mediante el Periotron 8000® y el software adecuado el volumen de cada una de las muestras.



- Colocar las puntas de papel en un tubo Eppendorf esterilizado, añadir a la muestra 100 microlitros de buffer (PBS junto a inhibidores de las proteasas) y se centrifuga a 15,000 rpm durante 5 min. Añadir otros 100 microlitros de buffer y volver a centrifugar a 15,000 rpm durante 5 min.



- Conservar los 200 microlitros de cada muestra a – 80°C hasta el momento de realizar el test ELISA.

MATERIALES Y MÉTODOS

5.6. ENSAYO ELISA PARA LA DETECCIÓN DE OPG Y RANKL

La técnica ELISA (Ezyme Linked Inmuno Sorbent Assay) es una técnica inmunoquímica analítica de laboratorio que se basa en la cuantificación de determinada sustancia mediante la utilización de complejos inmunes, es decir, los resultantes de la conjugación de anticuerpos y antígenos.

Concretamente se basa en la detección de un antígeno (Ag) o anticuerpo (Ac), inmovilizado sobre una fase sólida de un soporte inmunoabsorbente y que reaccionan directa o indirectamente con otros anticuerpos, inmunógenos o haptenos marcados con un enzima.

El producto coloreado de este enzima puede ser medido espectrofotométricamente.

Disponemos de varios tipos de ELISAS: directo, indirecto y sándwich. Todos ellos necesitan controles positivos y negativos.

En el método directo (no competitivo), la detección del antígeno se realiza mediante un anticuerpo marcado con una enzima.

En el método indirecto (competitivo), el antígeno reacciona con un anticuerpo primario contra el antígeno, y un anticuerpo secundario marcado contra el anticuerpo primario. Este anticuerpo secundario es el que está marcado enzimáticamente.

En el método tipo sándwich, la placa contiene un anticuerpo fijado (monoclonal ó policlonal) frente al antígeno problema; al unirse ambos, la reacción se pondrá en evidencia al añadir un segundo anticuerpo marcado con un enzima. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo.

Fases generales del ensayo ELISA:

1. Conjugación del anticuerpo o del antígeno con un enzima. Dicha unión anticuerpo-enzima o antígeno-enzima ha de producirse durante un determinado periodo de tiempo en aras de producir una solución coloreada y que pueda ser valorada visualmente o cuantificada mediante un espectrofotómetro. Si no transcurre el tiempo adecuado para que se dé la reacción, no se evidenciará ningún color,

MATERIALES Y MÉTODOS

interpretándose este resultado como un falso negativo, disminuyendo la sensibilidad de la técnica.

2. Unión del antígeno (o del anticuerpo) a los pocillos. La unión de anticuerpos o antígenos se realiza con facilidad a la superficie de plásticos tratados que tienen, gran afinidad por proteínas. Así, el procedimiento de recubrimiento de los pocillos debe realizarse cuidadosamente. Si se usa mucho antígeno, se pueden obtener falsos positivos. Por el contrario, si se usa poco antígeno, el exceso dará lugar a una reacción falsa negativa.
3. Formación de una o más capas de inmunocomplejos. En el caso del antígeno unido a la placa se puede detectar mediante un anticuerpo anti-antígeno marcado (ELISA directo), o empleando un anticuerpo primario anti-antígeno y un secundario anti primario marcado (ELISA indirecto). Este segundo método permite la amplificación de la señal al poderse unir uno o más anticuerpos secundarios a cada anticuerpo primario. En el caso del anticuerpo unido a la placa se incubaba con una mezcla de antígeno y antígeno marcado. Se ensayan diferentes relaciones de antígeno frente a una cantidad fija de antígeno marcado. Es el ensayo de competición del antígeno. En esta etapa es muy importante controlar los factores tiempo y temperatura de incubación para evitar la aparición de falsos negativos. En el caso del tiempo, si es inferior a 15 minutos, no ocurrirá la interacción antígeno-anticuerpo y el color no será evidente al final del ensayo, dando un falso negativo. Por su parte, si la temperatura de incubación es muy baja, la formación del complejo antígeno-anticuerpo tampoco se completará en el tiempo establecido, mientras que si es muy alta, las proteínas (antígeno y anticuerpo) se desnaturalizan y por tanto disminuyen su capacidad para interactuar, dando igualmente falsos negativos.
4. Revelado de la reacción enzimática. Después de un lavado para eliminar todas las moléculas marcadas no fijadas en forma de inmunocomplejos, se añade el sustrato enzimático en solución. Se deja reaccionar y se lee la densidad óptica (D.O.) mediante espectrofotometría (Segura, 1996).

MATERIALES Y MÉTODOS

Las especificaciones y detalles del proceso concreto de técnicas de ELISA dependerán concretamente de la casa comercial utilizada para el análisis de cada una de las moléculas a estudiar; en este caso para el RANKL, el kit comercializado “ RANKL (total Human ELISA BioVendor) y para la OPG “(Bender MedSystems)

5.6.1. Kit aplicado para detectar el RANKL (BioVendor)

Material contenido en el kit:

- Placa de 96 pocillos pre-recubiertos con anticuerpo Anti-RANK-L
- Cubre de placa adhesiva
- Anticuerpo biotinilado Anti-RANK-L
- Solución estándar
- Diluyente estándar
- Reactivo de estreptavidina-HRP
- Control positivo y negativo
- Tampón de lavado
- Solución de lavado concentrada (10X)
- Solución de sustrato TMB
- Solución de finalización
- Muestras

Todos los reactivos y las muestras deben estar a temperatura ambiente (20-25 °C) antes de usar.

Material necesario pero no proporcionado con el kit:

- Agua destilada
- Tubos de ensayo para la dilución de muestras 500 ml, Fischerbrand ® (Fisher Scientific ®)
- Un cilindro y una botella graduada de cristal para la solución de lavado
- Micropipeta (GILSON ®, Francia)

MATERIALES Y MÉTODOS

- Material absorbente, por ejemplo toallas de papel, para secar la microplaca después del lavado.
- Vortex TopMix FB15024 (Fisher Scientific ®)
- Agitador de microplacas orbital (300 rpm aproximadamente) (P-selecta Agimatic-S ®)
- Un cilindro y una botella graduada de cristal para la solución de lavado
- Espectrofotómetro (Spectra Max PLUS 384 ®)

Procedimiento:

- Preparar las diluciones para la curva estándar siguiendo las indicaciones del fabricante.
- Añadir 100 µL de la solución estándar en los pocillos por duplicado (relación de muestras), 100 µL de cada muestra en los pocillos por duplicado, cubrir la placa con el adhesivo e incubar a 2-8°C durante 16-20 horas sin agitación.
- Lavar 5 veces los pocillos con tampón de lavado (1x).
- Añadir 100 µL del anticuerpo Anti-RANK-L en los pocillos, cubrir la placa con el adhesivo e incubar a temperatura ambiente durante 1 hora en agitación a 300 rpm en un agitador orbital de microplaca.
- Lavar 5 veces los pocillos con tampón de lavado (1x).
- Añadir 100 µL de estreptavidina-HRP en cada uno de los pocillos, cubrir la placa con el adhesivo e incubar a temperatura ambiente durante 1 hora en agitación a 300 rpm en un agitador orbital de microplaca.
- Lavar 5 veces los pocillos con tampón de lavado (1x).
- Añadir 100 µL de la solución de sustrato a cada uno de los pocillos, guardar en oscuridad la placa a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- Finalizar la reacción añadiendo 100 µL de la solución de finalización a cada uno de los pocillos.
- Medir la absorbancia en espectrofotómetro a $\lambda=450$ nm.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cálculos :

Los resultados se calcularán extrapolando la absorbancia de las muestras en una recta patrón construida a partir de los valores de la curva estándar, o bien sustituyendo los valores de absorbancia en la ecuación de la recta patrón.

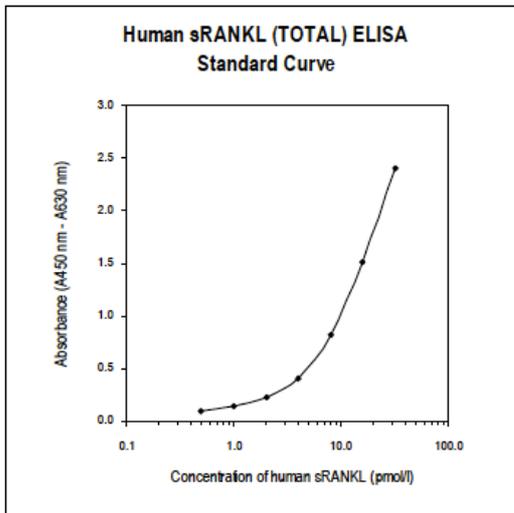


Figura 5.1: Curva estándar típica de RANK-L humana (Obtenido del manual de uso de Human RANK-L ELISA kit. BioVendor)

Características del ensayo:

Sensibilidad:

El límite de detección (LDD) se calcula a partir de los valores reales RANK-L humano en los pocillos y es 0,4 pmol / l.

Especificidad:

Los anticuerpos en el ELISA de RANK-L humano (total) son altamente específicos para RANK-L humano (AA140-AA317 de la proteína RANK-L) sin reactividad cruzada detectable a OPG humana, RANK y TNF-alfa, IL -6, IL-11 en 2 ng / ml.

Precisión:

Intraensayo (Within-Run, n=8)

Sample	Mean (pmo/l)	SD (pmo/l)	CV (%)
1	698.2	50.6	7.25
2	373.3	43.0	11.51

Tabla 5.1: Parámetros de precisión intra-ensayo de RANK-L humana (Obtenida del manual de uso de Human RANK-L ELISA kit. BioVendor)

MATERIALES Y MÉTODOS

Interensayo (Run-to-Run, n=4)

<i>Sample</i>	<i>Mean (pmo/l)</i>	<i>SD (pmo/l)</i>	<i>CV (%)</i>
1	141.82	15.90	11.21
2	310.17	39.61	12.77

Tabla 5.2: Parámetros de precisión inter-ensayo de RANK-Lhumana (Obtenida del manual de instrucciones de uso de Human RANK-L ELISA kit.BioVendor)

5.6.2. Kit aplicado para detección de OPG (Bender MedSystems)

Material contenido en el kit:

- Una bolsa de aluminio con las microplacas cubiertas por anticuerpo policlonal para OPG, biotina-conjugada (anticuerpo policlonal anti-OPG) y estreptavidina-HRP
- 2 bolsas con OPG humana para la realización de la curva estandar
- Diluyente estándar
- 2 placas adhesivas para cubrir
- Solución de lavado concentrada (20X)
- Solución de sustrato TMB (tetramethyl- benzine)
- Solución de finalización

Todos los reactivos y las muestras deben almacenarse a -20°

Material necesario pero no proporcionado con el kit:

- Agua destilada
- Tubos de ensayo para la dilución de muestras 500 ml, Fischerbrand ® (Fisher Scientific ®)
- Un cilindro y una botella graduada de cristal para la solución de lavado
- Micropipeta (GILSON ®, Francia)
- Material absorbente, por ejemplo toallas de papel, para secar la microplaca después del lavado
- Vortex TopMix FB15024 (Fisher Scientific ®)
- Agitador de microplacas orbital (300 rpm aproximadamente) (P-selecta Agimatic-S ®)

MATERIALES Y MÉTODOS

- Un cilindro y una botella graduada de cristal para la solución de lavado
- Espectrofotómetro (Spectra Max PLUS 384 ®)

Procedimiento

- Preparar las diluciones para la curva estándar siguiendo las indicaciones del fabricante.
- Añadir 50 μL de la solución estándar en los pocillos por duplicado (relación de muestras), 50 μL de cada muestra en los pocillos por duplicado; cubrir la placa con el adhesivo e incubar a temperatura ambiente (25°C), durante 3 horas en agitación a 100 rpm en un agitador orbital de microplaca.
- Lavar 4 veces los pocillos con tampón de lavado (1x), eliminar el exceso de tampón de lavado mediante papel absorbente no más de 15 min para no desecar la muestra.
- Añadir 100 μL del solución sustrato TMB en los pocillos, cubrir la placa con el adhesivo e incubar a temperatura ambiente durante 10 min sin exposición directa a la placa.
- Finalizar la reacción añadiendo 100 μL de la solución de finalización a cada uno de los pocillos.
- Medir la absorbancia en espectrofotómetro a $\lambda=450$ nm.

Cálculos:

Los resultados se calcularán extrapolando la absorbancia de las muestras en una recta patrón construida a partir de los valores de la curva estándar, o bien sustituyendo los valores de absorbancia en la ecuación de la recta patrón.

MATERIALES Y MÉTODOS

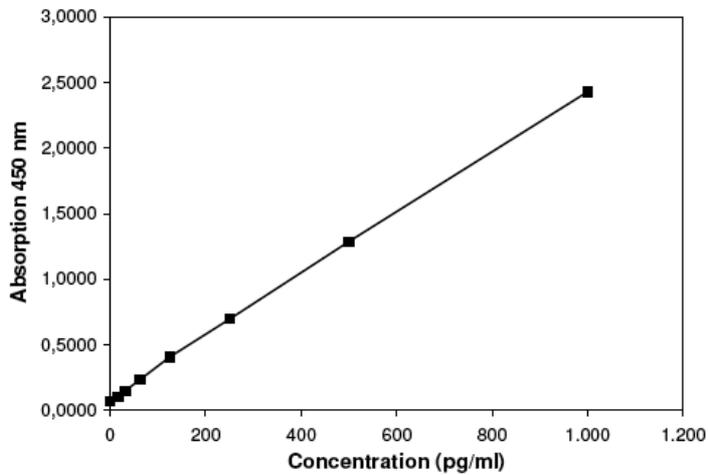


Figura 5.2: Curva estándar típica de OPG humana (Obtenida del manual de instrucciones de uso de Human OPG ELISA kit).

Características del ensayo:

Sensibilidad:

El límite de detección (LDD) se calcula a partir de los valores reales de OPG humano en los pocillos y es 2,5 pg/ml .

Intraensayo (Within-Run, n=8)

Sample	human Osteoprotegerin Concentration (pg/ml)	Coefficient of Variation (%)
1	1222	8.9
2	633	6.2
3	358	7.1
4	188	7.0
5	1168	7.5
6	601	5.3

Tabla 5.3: Parámetros de precisión intra-ensayo de OPG humana (Obtenida del manual de instrucciones de uso de Human OPG ELISA kit. Bender MedSystems)

MATERIALES Y MÉTODOS

Interensayo (Run-to-Run, n=3)

Positive Sample	Experiment	human Osteoprotegerin Concentration (pg/ml)	Coefficient of Variation (%)
1	1	1172	9
	2	1132	9
	3	1361	9
2	1	645	6
	2	603	4
	3	650	8
3	1	369	4
	2	354	9
	3	352	8
4	1	212	8
	2	163	4
	3	190	9
5	1	1099	8
	2	1038	5
	3	1368	9
6	1	522	6
	2	589	5
	3	692	5

Tabla 5.4: Parámetros de precisión interensayo de OPG humana (Obtenida del manual de instrucciones de uso de Human OPG ELISA kit Bender MedSystems)

5.7. INTERVENCIÓN EN LA MUESTRA CASOS:

En el grupo de pacientes pertenecientes a la muestra casos, después de haber recogido todos los datos clínicos, radiológicos y muestras de fluido crevicular, se realizará tratamiento periodontal básico. El tratamiento consta de raspado y alisado radicular de los 4 cuadrantes sin la utilización de antisépticos o antibióticos de acción local. Como parte del tratamiento, a los pacientes se les instruirá en higiene oral, tanto en técnicas de cepillado como en el uso de medidas de higiene interproximal. A las 4 semanas se les citará para reevaluar clínicamente y tomar nuevamente muestras del líquido crevicular.

5.8. SECUENCIA DEL DESARROLLO DEL ESTUDIO:

Día 0 .- Los individuos de la muestra estudio serán seleccionados de la lista de espera de pacientes de la facultad, de forma consecutiva. Los individuos del grupo control serán

MATERIALES Y MÉTODOS

alumnos de odontología de 4° curso seleccionados consecutivamente por orden alfabético. Seguidamente se realizará la anamnesis, y recogida de datos clínicos y radiológicos. Comprobación de adecuación a los criterios de inclusión y de exclusión del estudio. A los individuos que cumplan los requisitos, se les explica en qué consiste el estudio, el protocolo a seguir, y se le entrega consentimiento informado a cada paciente para que lo lea y firme.

Día 7.- Se tomarán las muestras de fluido crevicular de las zonas seleccionadas, y se realizará el procesado de las mismas.

Día 14.- Tratamiento periodontal (grupo casos): raspado y alisado radicular de 2 cuadrantes e instrucciones en higiene oral.

Día 21.- Tratamiento periodontal (grupo casos): raspado y alisado radicular de los 2 cuadrantes restantes e instrucciones en higiene oral.

Día 49.- Grupo casos: reevaluación periodontal, registros clínicos y toma de muestras de fluido crevicular. Procesado de las muestras. Fin del estudio.

5.9. ESTUDIO ESTADÍSTICO:

Las variables primarias de la investigación son las concentraciones de los indicadores moleculares OPG y RANKL. El ratio entre RANKL y OPG es, también, un indicador de la efectividad del tratamiento ya que integra la capacidad inhibitoria del OPG con la capacidad estimuladora del RANKL.

Los niveles de estas variables en los sujetos del grupo estudio se toman en dos momentos del tiempo: pre y postratamiento (al mes del último RAR).

Para los sujetos del grupo control, lógicamente, sólo se registra una medición que se considerará invariable a lo largo del seguimiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el grupo de sujetos enfermos, a su vez, como se ha descrito anteriormente, se toman las muestras de una localización sana y de una localización enferma, a efectos de que la primera sirva de control en las comparaciones intra-sujeto.

En primer lugar, se realizará un análisis descriptivo que nos proporciona los estadísticos más relevantes para cada uno de los parámetros: media, desviación estándar, mínimo, máxima y mediana. Los parámetros de media y desviación estándar se han utilizado en las representaciones gráficas.

Como el grupo de individuos enfermos es reducido, se estima un modelo de Brunner-Langer para datos longitudinales, donde tiempo y zona de la boca asumen el rol de factores intra-individuo. Los efectos principales de estos factores y la interacción entre ambos se evalúan mediante un test ATS tipo ANOVA propio del modelo.

Para la comparación de distribución de un parámetro entre el grupo control y el grupo test en una zona de la boca y tiempo específico, se utiliza el test de Mann-Whitney.

El objetivo de la calibración del periotron se ha abordado mediante modelos de ajuste no lineal de hasta cuarto grado polinómico, con la medida de periotron como variable dependiente, y las diferentes potencias del volumen en μl como independientes. Se atendió a los valores de los R^2 como indicadores de bondad del ajuste para determinar el modelo óptimo.

Dado que se dispone de 3 medidas consecutivas de periotron, se han obtenido indicadores de reproducibilidad descriptivos como son la D de Dahlberg y el coeficiente de variación.

Para la estimación del error del método se utiliza la *fórmula de Dahlberg*, que particularizada a las 7 mediciones del análisis actual se escribiría para una doble medición del parámetro X:

$$d = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^7 (X_{1i} - X_{2i})^2}{14}}$$

Se calculó, asimismo, una estimación del error relativo del método mediante la expresión:

$$\text{error relativo} = \frac{d}{\bar{x}} 100$$

MATERIALES Y MÉTODOS

Donde es la media de las dobles mediciones de una dimensión determinada. Este indicador permite comparar el error del método entre diferentes dimensiones.

El *nivel de significatividad* empleado en los análisis ha sido el 5% ($\alpha=0.05$).

El test estadístico del modelo de Brunner-Langer alcanza una potencia de 0,44 en el objetivo de detectar como significativa una diferencia de magnitud media (compatible con un tamaño de efecto $f=0,25$) asumiendo un nivel de confianza del 95%. Esta diferencia está referida a la comparación de un factor intra.

Para una prueba de Mann-Whitney, en las mismas condiciones, con un nivel de significatividad del 5%, y considerando un tamaño del efecto a detectar de 0,5 (medio), la potencia alcanzada es 0,20 para detectar diferencias entre controles y enfermos.

CAPITULO III: RESULTADOS Y
DESARROLLO ARGUMENTAL

6 RESULTADOS

RESULTADOS

6.1. RESULTADOS MOLECULARES: OBJETIVO PRINCIPAL

6.1.1. Resultado primer objetivo principal: la primera de las cuestiones es si en el grupo de pacientes con periodontitis existen diferencias en las concentraciones de RANKL y OPG, a nivel del fluido crevicular, dependiendo del grado de salud periodontal; y si estas concentraciones varían después del tratamiento. Para este objetivo del estudio responderemos a dos preguntas concretas:

La primera pregunta es: ¿Existen diferencias en la concentración de dichos parámetros moleculares entre los zonas sanas y zonas enfermas de pacientes diagnosticados de periodontitis crónica (grupo estudio)?

En la tabla 6.1 se muestran los estadísticos más importantes de la zona sana pretratamiento (RANKL_ZS_1), y de la zona enferma pretratamiento (RANKL_ZE_1)

Tabla 6.1 Estadísticos principales de las concentraciones de RANKL en el grupo de pacientes con periodontitis (grupo estudio), grupo zona sana (RANKL_ZS_1) y grupo zona enferma (RANKL_ZE_1) antes de realizado el tratamiento periodontal (la concentración expresada en pg/ml).

RANKL_ZS_1	N	15	0	15
	Media	56,543	.	56,543
	Desviación típica	13,478	.	13,478
	Mínimo	38,429	.	38,429
	Máximo	88,703	.	88,703
	Mediana	51,120	.	51,120
RANKL_ZE_1	N	15	0	15
	Media	95,537	.	95,537
	Desviación típica	13,821	.	13,821
	Mínimo	71,715	.	71,715
	Máximo	126,157	.	126,157
	Mediana	91,369	.	91,369

RESULTADOS

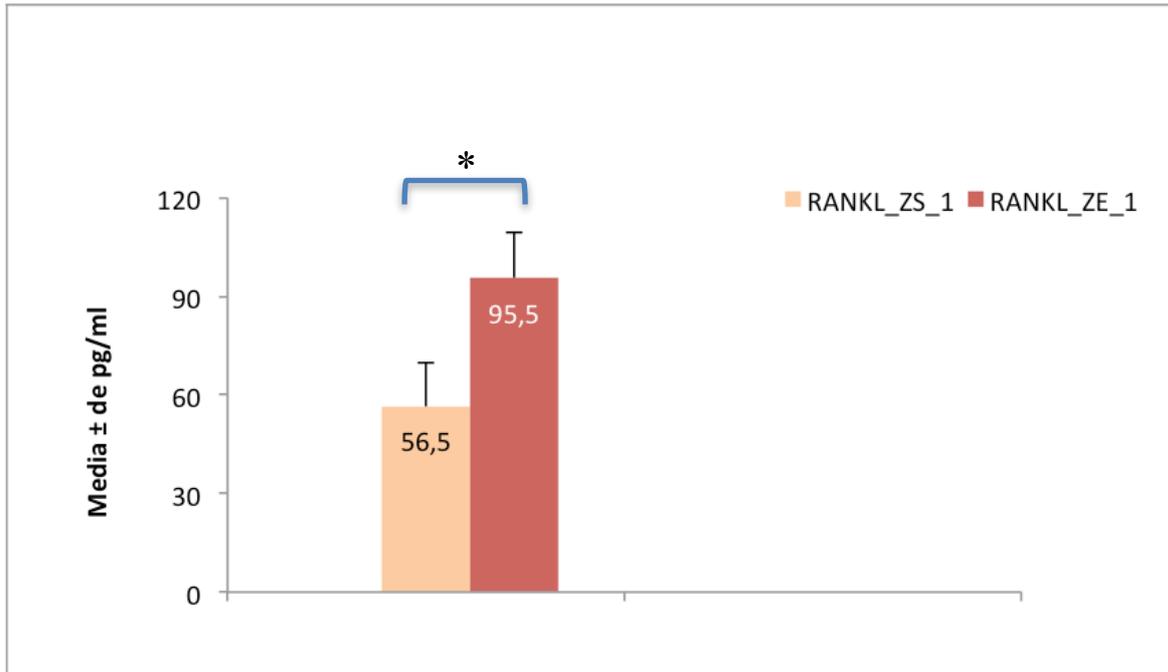


Figura 6.1 Concentración media RANKL y desviación típica (pg/ml) en el grupo de pacientes con periodontitis (grupo estudio), grupo zona sana pretratamiento (RANKL_ZS_1) y grupo zona enferma pretratamiento (RANKL_ZE_1). * diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

Los resultados de la figura 6.1 indican que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) entre ambas localizaciones antes del tratamiento, siendo más elevados los valores de RANKL en la zona con afectación periodontal. Para hallar este resultado se ha utilizado un test estadístico tipo ANOVA (ATS) basado en el modelo de Brunner-Langer.

En cuanto a la concentración de OPG, en la Tabla 6.2 se muestran los estadísticos más importantes en la localización sana (OPG_ZS_1) y de la zona enferma (OPG_ZE_1) antes de realizar el tratamiento periodontal. En la Figura 6.2 queda reflejado el nivel de significatividad.

RESULTADOS

Tabla 6.2 Estadísticos principales de las concentraciones de OPG (pg/ml) entre grupo zona sana pretratamiento (OPG_ZS_1) y grupo zona enferma pretratamiento (OPG_ZE_1),.

OPG_ZS_1	N	15	0	15
	Media	7,015	.	7,015
	Desviación típica	4,339	.	4,339
	Mínimo	1,561	.	1,561
	Máximo	18,878	.	18,878
	Mediana	5,829	.	5,829
OPG_ZE_1	N	15	0	15
	Media	3,054	.	3,054
	Desviación típica	2,088	.	2,088
	Mínimo	,805	.	,805
	Máximo	8,659	.	8,659
	Mediana	2,341	.	2,341

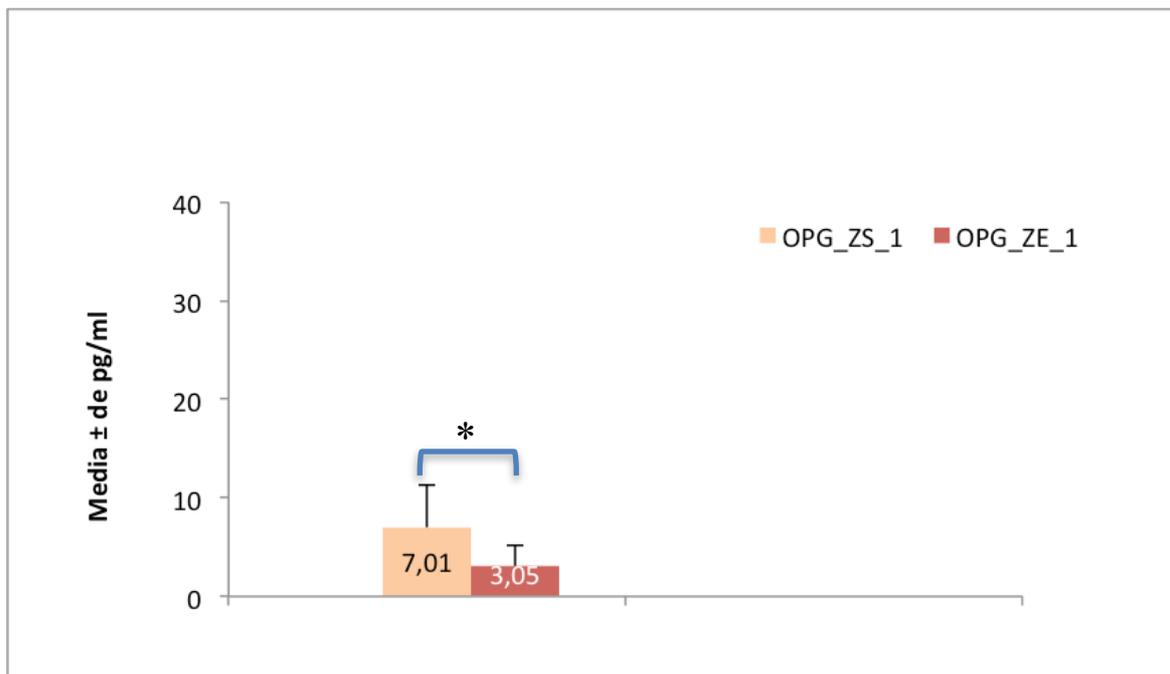


Figura 6.2 Concentración media OPG (pg/ml) en el grupo estudio, zona sana pretratamiento (OPG_ZS_1) y zona enferma pretratamiento (OPG_ZE_1). * diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

Los resultados mostrados en la figura 6.2 indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre localizaciones clínicamente sanas y enfermas en el momento pretratamiento ($p < 0,001$), de manera que los niveles de OPG son menores en la zona con periodontitis. Para hallar este resultado se ha utilizado un test estadístico tipo ANOVA (ATS) basado en el modelo de Brunner-Langer.

RESULTADOS

Estos resultados tienen un gran interés clínico puesto que aportan información sobre la situación de la salud periodontal. Es por ello, que además de los valores absolutos de RANKL y OPG se ha procedido a calcular el ratio RANKL/OPG en la zona sana y en la zona enferma antes del tratamiento periodontal (Ver Tabla 6.3 y Figura 6.3).

Tabla 6.3 Estadísticos principales del ratio RANKL/OPG en grupo zonas sanas (RANKL_OPG_ZS_1) y zonas enfermas antes de realizar el tratamiento periodontal (RANKL_OPG_ZE_1).

RANKL_OPG_ZS_1	N	15	0	15
	Media	10,804	.	10,804
	Desviación típica	6,792	.	6,792
	Mínimo	4,126	.	4,126
	Máximo	30,344	.	30,344
	Mediana	10,362	.	10,362
RANKL_OPG_ZE_1	N	15	0	15
	Media	45,125	.	45,125
	Desviación típica	24,742	.	24,742
	Mínimo	10,619	.	10,619
	Máximo	89,101	.	89,101
	Mediana	43,009	.	43,009

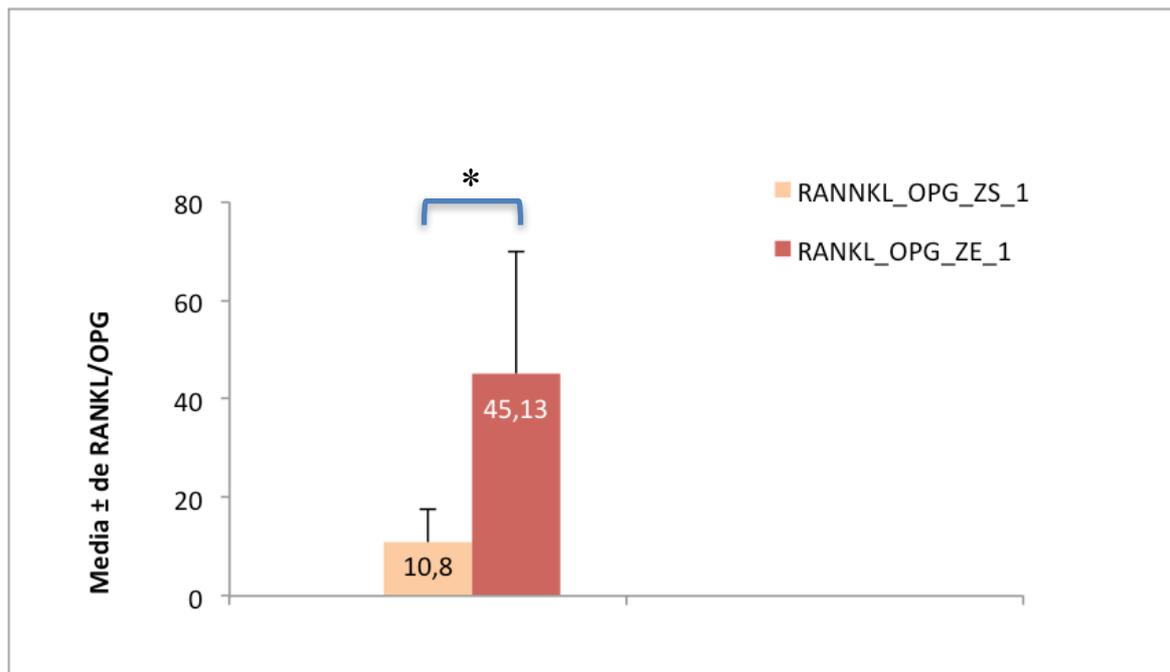


Figura 6.3 Media de ratio RANKL/OPG entre grupo zona sana pretratamiento (RANKL_OPG_ZS_1) y grupo zona enferma pretratamiento (RANKL_OPG_ZE_1). * diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, siendo mas elevado los valores en el grupo zona enferma sin tratar.

RESULTADOS

Las diferencias existentes en el ratio RANKL/OPG en la zona sana y enferma del grupo estudio antes de realizar el tratamiento periodontal son estadísticamente significativas ($p < 0,001$), siendo los valores del ratio mayores en la zona enferma. Para hallar este resultado se ha utilizado un test estadístico tipo ANOVA (ATS) basado en el modelo de Brunner-Langer.

Estos resultados señalan que ambas moléculas y el ratio de sus concentraciones están relacionadas con la destrucción ósea en el proceso patológico de la periodontitis.

RESULTADOS

La segunda de las preguntas que nos planteamos para terminar de responder a este primer objetivo es la siguiente: ¿Los valores de RANKL y OPG en el grupo de pacientes con periodontitis cambia después del tratamiento periodontal básico con raspado y alisado radicular? o dicho de otra manera: ¿Cual es el impacto del tratamiento periodontal básico sobre la concentración de estas moléculas en el Fluido Crevicular de pacientes con periodontitis crónica?

En la tabla 6.4 y gráfico 6.4 podemos ver los datos descriptivos más importantes del comportamiento del RANKL antes y después de tratamiento periodontal en el grupo estudio.

Tabla 6.4 Descripción de los estadísticos mas importantes de concentración RANKL (pg/ml) antes (T1) y después (T2) del tratamiento periodontal. En T1 tenemos los valores referentes a grupo zona sana pretratamiento (RANKL_ZS_1) y grupo zona enferma pretratamiento (RANKL_ZE_1). En T2 tenemos los valores de grupo zona sana postratamiento (RANKL_ZS_2) y los valores zona enferma postratamiento (RANKL_ZE_2).

	N	15	0	15
RANKL_ZS_1	Media	56,543	.	56,543
	Desviación típica	13,478	.	13,478
	Mínimo	38,429	.	38,429
	Máximo	88,703	.	88,703
	Mediana	51,120	.	51,120
		N	15	0
RANKL_ZE_1	Media	95,537	.	95,537
	Desviación típica	13,821	.	13,821
	Mínimo	71,715	.	71,715
	Máximo	126,157	.	126,157
	Mediana	91,369	.	91,369
		N	15	0
RANKL_ZS_2	Media	60,857	.	60,857
	Desviación típica	18,856	.	18,856
	Mínimo	37,812	.	37,812
	Máximo	101,922	.	101,922
	Mediana	53,163	.	53,163
		N	15	0
RANKL_ZE_2	Media	68,866	.	68,866
	Desviación típica	21,187	.	21,187
	Mínimo	40,933	.	40,933
	Máximo	117,429	.	117,429
	Mediana	61,433	.	61,433

RESULTADOS

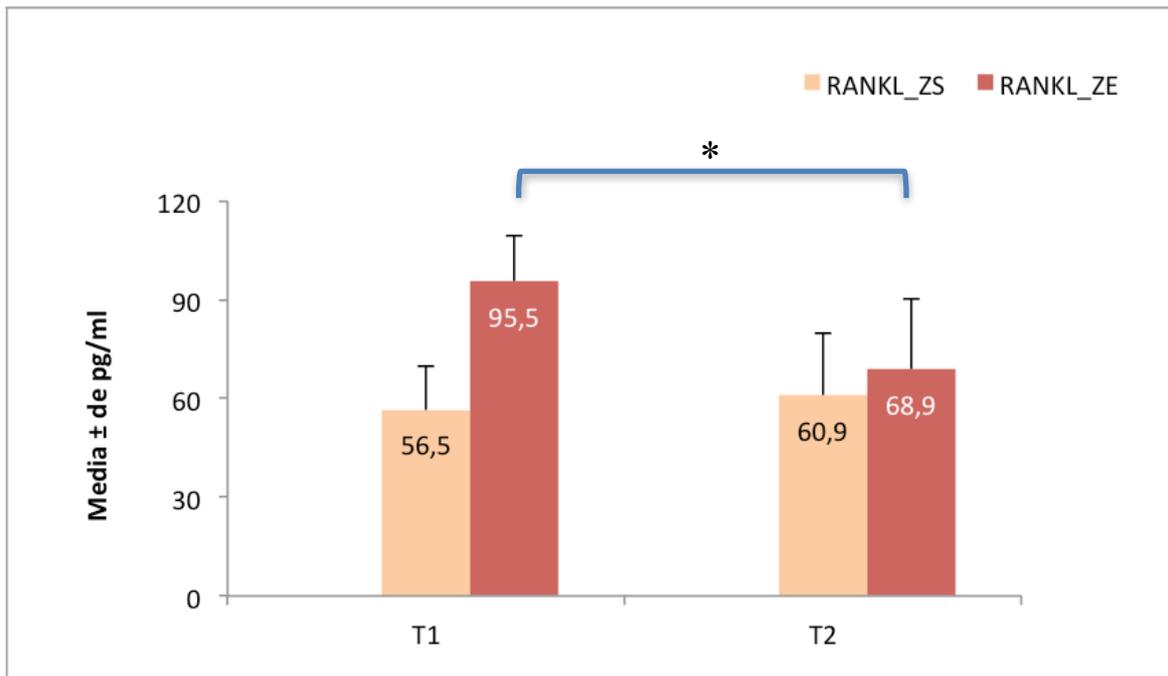


Figura 6.4 Concentración media de RANKL (pg/ml) antes (T1) y después del tratamiento peridontal básico (T2) en el grupo de zona sana de individuos con periodontitis (RANKL_ZS) y en el grupo de zona enferma de individuos con periodontitis (RANKL_ZE). * diferencias estadísticamente significativas en el grupo RANKL_ZE al realizar el tratamiento peridontal básico.

En la figura 6.4 se observa cómo el RANKL de los sujetos del grupo estudio se mantiene prácticamente invariable de T1 (pretratamiento) a T2 (postratamiento) en la zona sana; pero desciende significativamente en la zona enferma.

Se aplicó un modelo no paramétrico de Brunner-Langer en el grupo Test, con factores tiempo, zona de la boca e interacción.

La conclusión más importante es que existe un efecto de interacción entre tiempo y zona ($p < 0,001$). Es decir, la zona enferma y la zona sana de los pacientes del grupo test están evolucionando de forma totalmente distinta.

Se produce una disminución significativa de los valores RANKL de T1 a T2 en la zona enferma ($p = 0,005$) y ello indica que el tratamiento periodontal básico puede interferir esta vía molecular en la patogenia de la periodontitis. Estos resultados también indican que en la zona sana el nivel del parámetro RANKL no cambia después de ser tratada ($p=0,233$). Además, cuando se estudia en el tiempo T2,

RESULTADOS

correspondiente al tiempo postratamiento, no existe diferencia en los valores de RANKL entre ambas zonas (sana y enferma tratada) ($p= 0173$).

Por lo tanto, parece que el tratamiento periodontal básico en las zonas enfermas provoca una disminución en los niveles de RANKL , de forma que se igualan a los de las zonas sanas (antes o después del tratamiento).

Con respecto a los niveles de OPG en relación a los tiempos de medida y zona de la boca (zonas sanas y zonas enfermas) en los pacientes con periodontitis crónica, los resultados obtenidos quedan reflejados en la Tabla 6.5 y Gráfica 6.5 .

Tabla 6.5 Estadísticos más importantes de concentración OPG (pg/ml) antes (T1) y después (T2) del tratamiento periodontal básico. En T1 se muestran los valores referentes a grupo zona sana pretratamiento (OPG_ZS_1) y grupo zona enferma pretratamiento (OPG_ZE_1). En T2, los valores de grupo zona sana post-tratamiento (OPG_ZS_2) y los valores zona enferma pos-tratamiento (OPG_ZE_2).

OPG_ZS_1	N	15	0	15
	Media	7,015	.	7,015
	Desviación típica	4,339	.	4,339
	Mínimo	1,561	.	1,561
	Máximo	18,878	.	18,878
	Mediana	5,829	.	5,829
OPG_ZE_1	N	15	0	15
	Media	3,054	.	3,054
	Desviación típica	2,088	.	2,088
	Mínimo	,805	.	,805
	Máximo	8,659	.	8,659
	Mediana	2,341	.	2,341
OPG_ZS_2	N	15	0	15
	Media	6,694	.	6,694
	Desviación típica	3,897	.	3,897
	Mínimo	2,610	.	2,610
	Máximo	14,195	.	14,195
	Mediana	5,268	.	5,268
OPG_ZE_2	N	15	0	15
	Media	6,605	.	6,605
	Desviación típica	4,768	.	4,768
	Mínimo	1,341	.	1,341
	Máximo	20,049	.	20,049
	Mediana	4,659	.	4,659

RESULTADOS

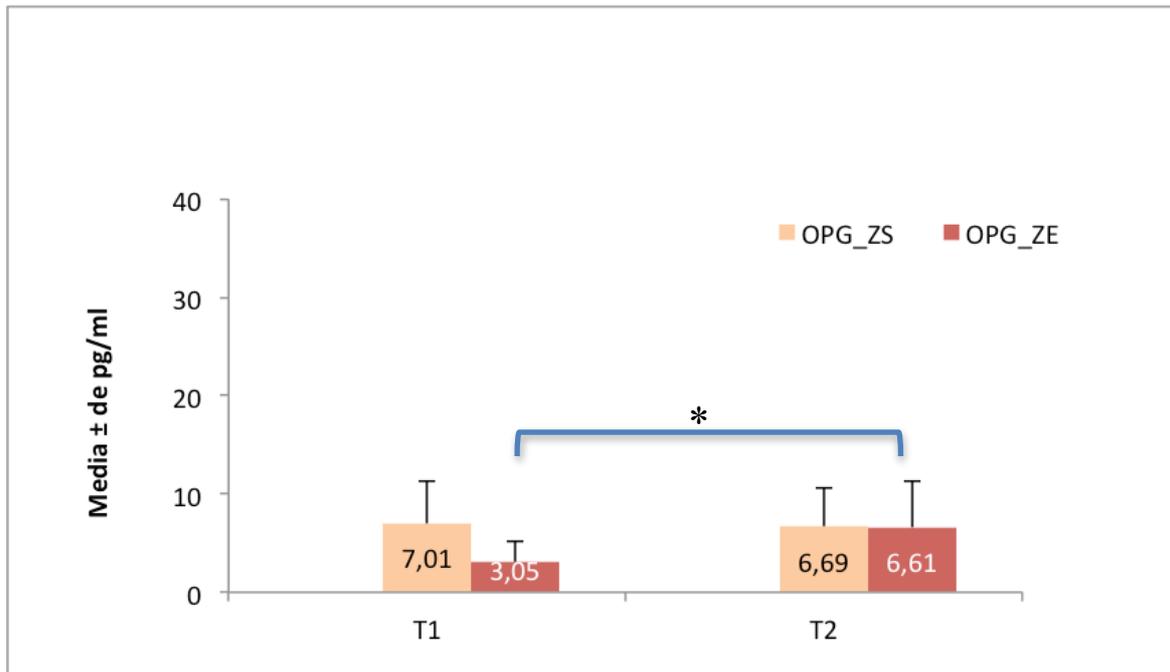


Figura 6.5 Evolución de la concentración media de OPG (pg/ml). Según tiempo: antes (T1) y después del tratamiento periodontal básico (T2). En función del grupo: de zona sana de individuos con periodontitis (OPG_ZS) y en el grupo de zona enferma de individuos con periodontitis (OPG_ZE). * diferencias estadísticamente significativas en el grupo OPG_ZE entre T1 y T2.

La situación se presenta similar a la que hemos observado con el parámetro RANKL. Los cambios parecen darse sólo en la zona enferma de la boca, en sentido ascendente; es decir, los niveles de OPG aumentan posteriormente al tratamiento en la zona enferma (Figura 6.5). Para confirmar estas observaciones descriptivas se realizaron pruebas mediante el método de Brunner- Langer.

Puede concluirse, que la evolución en el tiempo del OPG depende fuertemente de la zona que se esté analizando y no puede valorarse de forma independiente a la misma. Existe un incremento de pretratamiento (T1) a postratamiento (T2) en el grupo de zonas enfermas ($p=0,009$); pero en la zona sana hay una estabilidad de la OPG ($p=0,910$).

Finalmente, puede hablarse de una homogeneidad del nivel de OPG posteriormente al tratamiento (T2) entre ambos grupos, tanto en la zona enferma como no enferma ($p=0,955$).

Biológicamente este resultado puede significar que el tratamiento periodontal básico resulta en una mayor protección a la osteolisis.

RESULTADOS

Para terminar de responder esta pregunta, analizamos la interrelación entre los niveles de RANKL y OPG en forma de ratio RANKL/OPG. En la tabla 6.6 y la figura 6.6, donde se presentan los estadísticos básicos referidos al ratio .

Tabla 6.6 Estadísticos mas importantes de ratio RANKL/OPG antes (T1) y después (T2) del tratamiento periodontal básico. En T1 aparecen los valores referentes a grupo zona sana pretratamiento (RANKL_OPG_ZS_1) y a grupo zona enferma pretratamiento (RANKL_OPG_ZE_1). En T2 tenemos los valores de grupo zona sana postratamiento (RANKL_OPG_ZS_2) y los valores zona enferma postratamiento (RANKL_OPG_ZE_2).

RANKL_OPG_ZS_1	N	15	0	15
	Media	10,804	.	10,804
	Desviación típica	6,792	.	6,792
	Mínimo	4,126	.	4,126
	Máximo	30,344	.	30,344
	Mediana	10,362	.	10,362
RANKL_OPG_ZE_1	N	15	0	15
	Media	45,125	.	45,125
	Desviación típica	24,742	.	24,742
	Mínimo	10,619	.	10,619
	Máximo	89,101	.	89,101
	Mediana	43,009	.	43,009
RANKL_OPG_ZS_2	N	15	0	15
	Media	12,713	.	12,713
	Desviación típica	8,431	.	8,431
	Mínimo	2,664	.	2,664
	Máximo	31,828	.	31,828
	Mediana	11,622	.	11,622
RANKL_OPG_ZE_2	N	15	0	15
	Media	17,009	.	17,009
	Desviación típica	14,749	.	14,749
	Mínimo	2,042	.	2,042
	Máximo	60,962	.	60,962
	Mediana	12,081	.	12,081

RESULTADOS

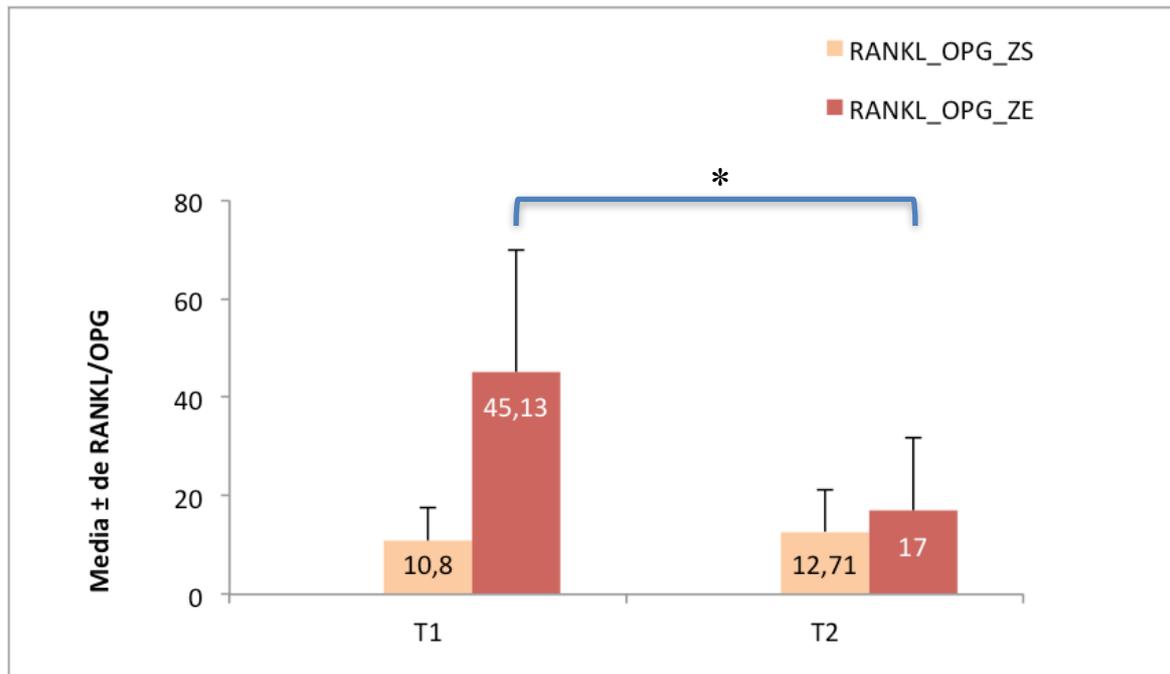


Figura 6.6 Evolución del ratio RANKL/OPG. Según tiempo: antes (T1) y después del tratamiento periodontal básico (T2). En función del grupo: de zona sana de individuos con periodontitis (RANKL_OPG_ZS) y en el grupo de zona enferma de individuos con periodontitis (RANKL_OPG_ZE). * diferencias estadísticamente significativas en el grupo RANKL_OPG_ZE entre T1 y T2.

Dado que las variaciones de T1 a T2 se producían en los dos parámetros medidos (RANKL y OPG) y en sentido contrario, es totalmente lógica la fuerte disminución observada para el ratio entre ambos parámetros analizados (RANKL/OPG). Esta tendencia descriptiva se comprueba mediante un modelo de Brunner-Langer.

La conclusión más importante es que existe un efecto de interacción entre tiempo y zona ($p < 0,001$). Es decir, la zona enferma y la zona sana de los pacientes del grupo test están evolucionando de forma totalmente distinta en lo que respecta al ratio evaluado RANKL/OPG.

Se produce una disminución significativa desde el ratio del momento pretratamiento (T1) al postratamiento (T2) en las zonas enfermas ($p = 0,005$) (Figura 6.6). Sin embargo, en la zona sana el nivel del parámetro no cambia ($p = 0,570$).

En el grupo de pacientes estudio, después del tratamiento de raspado y alisado radicular no se observan diferencias entre zona sana y zona enferma tratada ($p = 0,307$).

RESULTADOS

Este resultado sugiere que el tratamiento de raspado y alisado radicular en los enfermos periodontales es capaz de provocar cambios en los valores del ratio RANKL/OPG favorables hacia una mayor protección a la osteolisis, en el mismo grado que ocurre en las zonas sanas.

En resumen, en pacientes con periodontitis crónica:

- El RANKL y el ratio RANKL/OPG es mayor en las zonas enfermas que en las sanas, y lo contrario ocurre con la OPG.
- El tratamiento periodontal básico hace disminuir tanto el RANKL como el ratio RANKL/OPG, mientras que hace aumentar la OPG; por lo tanto tiene un efecto molecular de protección contra la osteolisis.

RESULTADOS

6.1.2. Resultado del segundo objetivo principal: el segundo de los objetivos planteados pretende buscar las diferencias en los niveles de RANKL y OPG en el fluido crevicular, entre el grupo de individuos periodontalmente sanos y el grupo de pacientes con enfermedad periodontal con diferentes grado de salud. Para ello nos plantemos tres preguntas que responderán a esta cuestión.

¿Existen diferencias en los niveles de RANKL y OPG en el fluido crevicular del surco de individuos sanos cuando los comparamos con los de localizaciones con afectación periodontal de los pacientes con periodontitis?

Con respecto al RANKL podemos ver en la siguiente tabla y figura (Tabla 6.7, Figura 6.7) cómo existen diferencias significativas siendo los valores de RANKL más bajos en individuos con salud periodontal.

Tabla 6.7 Estadísticos principales de concentración de RANKL (pg/ml) en función de grupo. Se muestra el grupo control (RANKL) formado por individuos periodontalmente sanos y el grupo zona enferma pretratamiento (RANKL_ZE_1) de individuos con patología periodontal.

RANKL	N	10	RANKL_ZE_1	N	15
	Media	63,128		Media	95,537
	Desviación típica	23,830		Desviación típica	13,821
	Mínimo	47,335		Mínimo	71,715
	Máximo	126,157		Máximo	126,157
	Mediana	53,452		Mediana	91,369

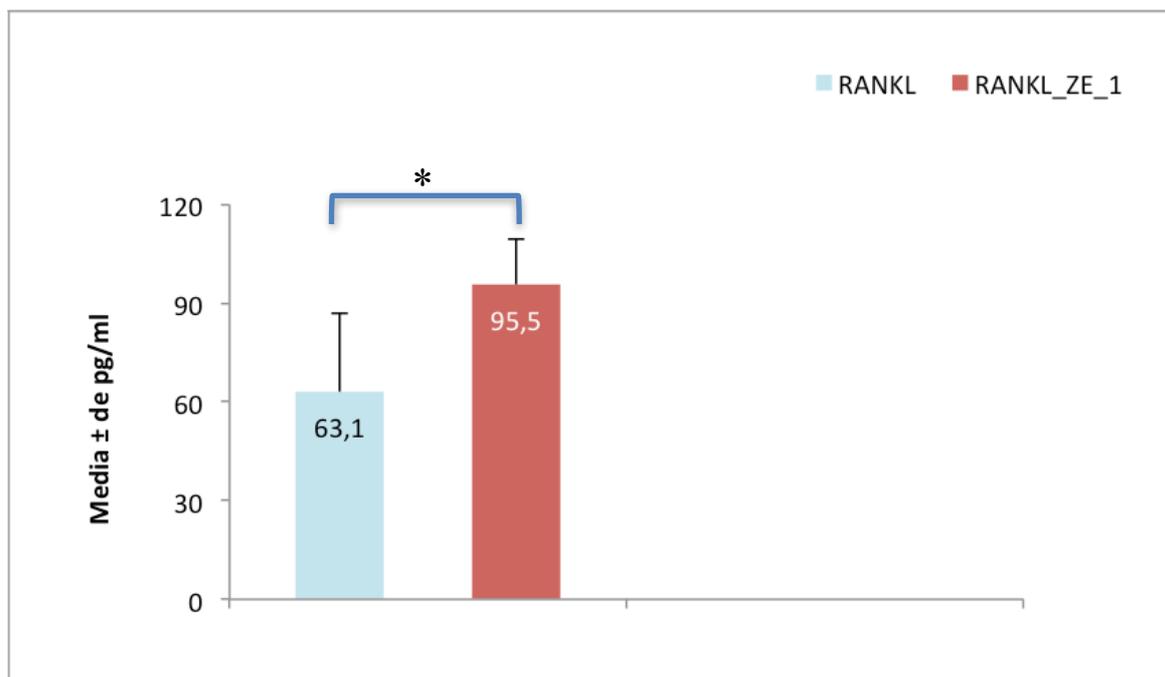


Figura 6.7 Valores medios de concentración RANKL (pg/ml) en función del grupo: grupo control (RANKL) y grupo zona enferma pretratamiento (RANKL_ZE_1) en individuos con periodontitis. * diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

Los resultados mostrados en la figura 6.7 indican que los niveles del ligando soluble RANKL fueron significativamente mayores en las zonas enfermas en aquellos individuos con periodontitis antes de la aplicación del tratamiento de raspado y alisado radicular. Lo que supondría una mayor actividad osteoclástica en las zonas con periodontitis. Estas diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0,001$). Se ha utilizado un test estadístico tipo ANOVA (ATS) basado en el modelo de Brunner-Langer.

En relación a la OPG, claramente se observa (Tabla 6.8 y Figura 6.8) que los valores de OPG son mucho más elevados en el surco gingival de sujetos sanos.

Tabla 6.8 Estadísticos principales de concentración de OPG (pg/ml) en función de grupo: Grupo control (OPG) formado por individuos periodontalmente sanos y el grupo zona enferma pretratamiento (OPG_ZE_1) de individuos con patología periodontal.

	N		N	
OPG	Media	31,102	Media	3,054
	Desviación típica	7,899	Desviación típica	2,088
	Mínimo	15,463	Mínimo	,805
	Máximo	44,171	Máximo	8,659
	Mediana	30,695	Mediana	2,341
		10		15
		OPG_ZE_1		

RESULTADOS

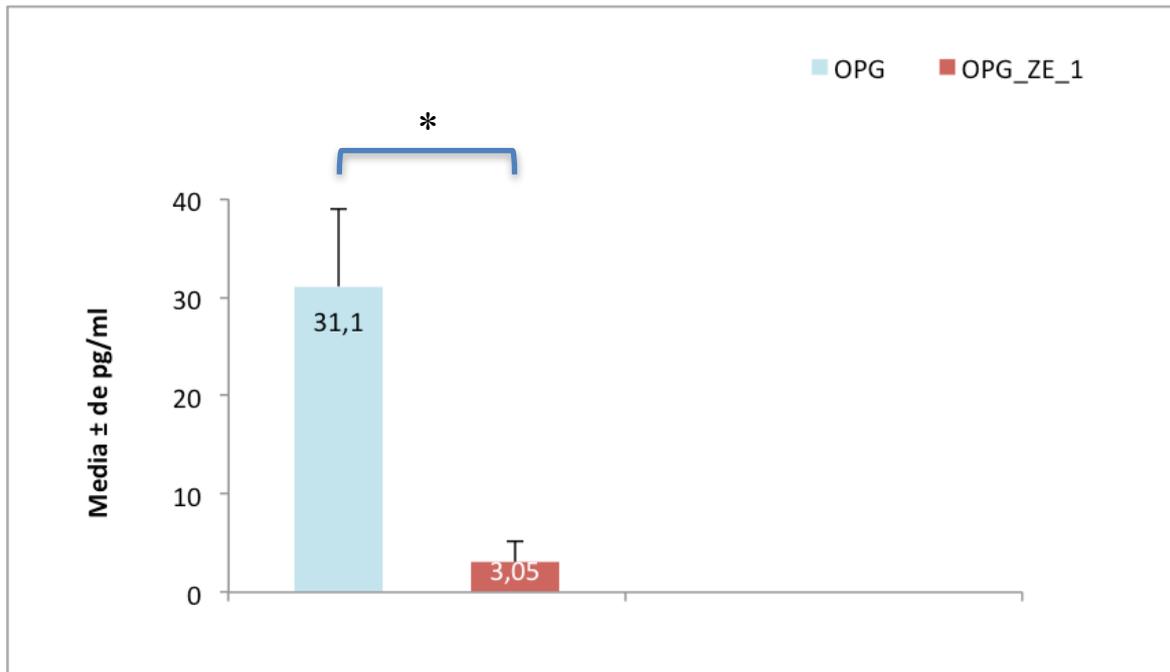


Figura 6.8 Valores medios de concentración OPG (pg/ml) en zonas de pacientes sin periodontitis (grupo control) y en zonas enfermas de individuos con periodontitis (grupo estudio) antes del tratamiento (color marrón). * diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

Es evidente que estas diferencias descriptivas en el plano estadístico son significativas, teniendo un p -valor $< 0,001$. Se ha utilizado un test estadístico de Mann-Whitney. Este resultado subraya que los niveles de OPG son más elevados en el grupo de individuos sanos que en la zona enferma de pacientes con periodontitis.

Por lo tanto los resultados mostrados en la figura 6.8 indican que los niveles de OPG están significativamente reducidos en las zonas enfermas en individuos con periodontitis cuando los comparamos con los niveles medios de OPG en los individuos sanos control.

Este hecho va a tener una consecuencia directa en el ratio RANKL/OPG.

Según los resultados que obtenemos para el ratio RANKL/OPG, queda claro que existen diferencias significativas entre ambas zonas (zonas sanas de individuos sanos control y zonas enfermas de pacientes con periodontitis). Observar en las tablas y figuras siguientes (Tabla 6.9 y Figura 6.9).

RESULTADOS

Tabla 6.9 Estadísticos principales de ratio RANKL/OPG en Grupo control (RANKL_OPG) formado por individuos periodontalmente sanos y el Grupo zona enferma pretratamiento de individuos con periodontitis (RANKL_OPG_ZE_1).

RANKL_OPG	N	10	RANKL_OPG_ZE_1	N	15
	Media	2,207		Media	45,125
	Desviación típica	1,129		Desviación típica	24,742
	Mínimo	1,171		Mínimo	10,619
	Máximo	4,245		Máximo	89,101
	Mediana	1,800		Mediana	43,009

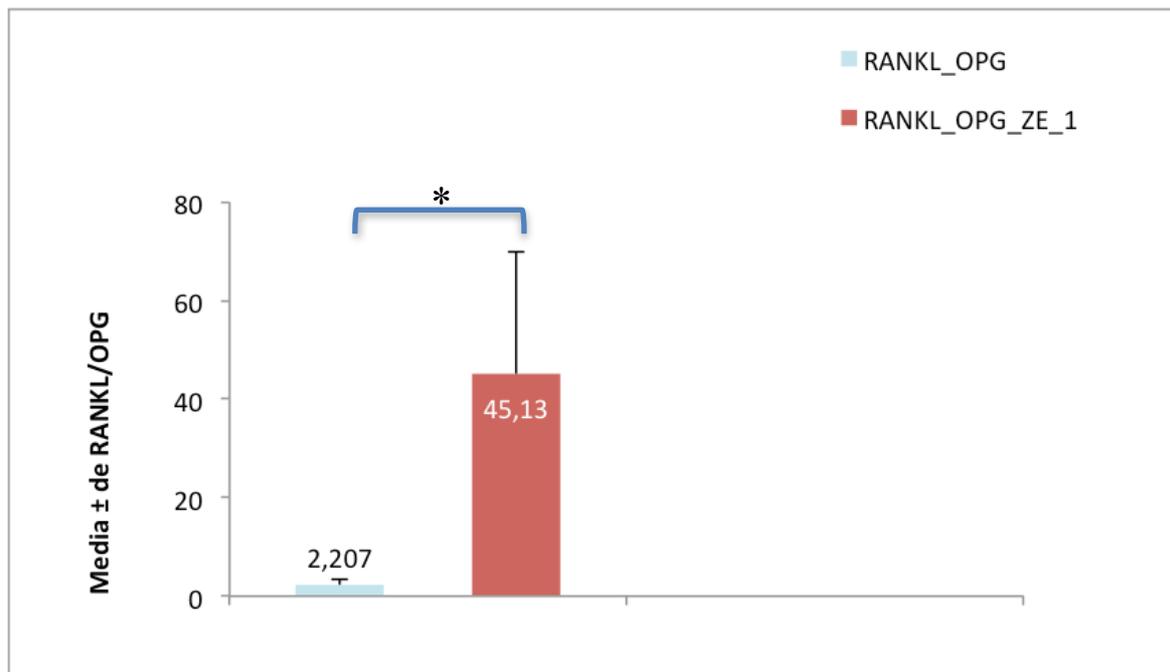


Figura 6.9 Valores medios de ratio RANKL/OPG en cada grupo: Grupo control (RANKL_OPG) y Grupo zona enferma pretratamiento en individuos con periodontitis (RANKL_OPG_ZE_1). * diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

Aplicado el test de Mann-Whitney las diferencias resultan estadísticamente significativas, con un p-valor <0,001. Estos resultados son acordes con lo esperado biológicamente, una mayor actividad destructiva ósea en la zona enferma y por tanto un mayor ratio RANKL/OPG.

RESULTADOS

¿Existen diferencias en los niveles de RANKL y OPG entre el fluido crevicular de individuos sanos con respecto al fluido de las zonas sanas de los pacientes con periodontitis (grupo estudio)?

Los datos sobre los niveles de RANKL se exponen en la tabla y figura 6.10,

Tabla 6.10 Estadísticos principales de concentración de RANKL (pg/ml) en función de grupo: grupo control (RANKL) formado por individuos periodontalmente sanos y el grupo zona sana pretratamiento (RANKL_ZS_1) de individuos con periodontitis.

RANKL	N	10	RANKL_ZS_1	N	15
	Media	63,128		Media	56,543
	Desviación típica	23,830		Desviación típica	13,478
	Mínimo	47,335		Mínimo	38,429
	Máximo	126,157		Máximo	88,703
	Mediana	53,452		Mediana	51,120

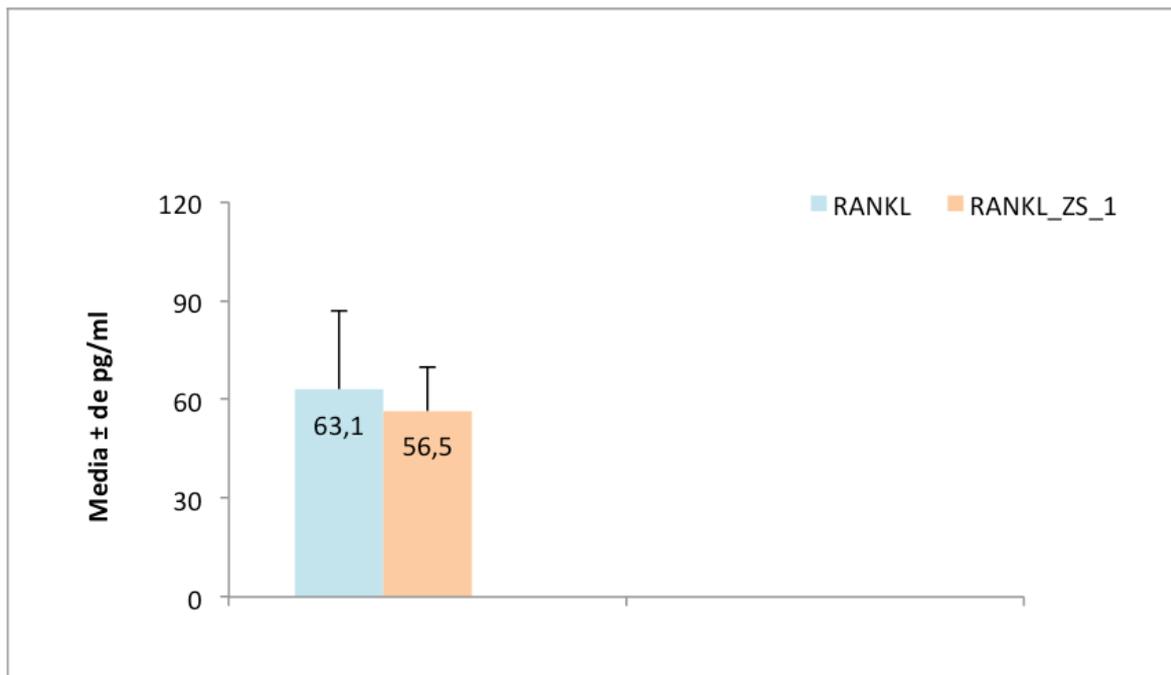


Figura 6.10 Valores medios de concentración RANKL (pg/ml) en función del grupo: grupo control (RANKL) y grupo zona sana pretratamiento (RANKL_ZS_1) en individuos con periodontitis.

Al aplicar la prueba estadística del test de Mann-Whitney, se obtuvo un valor p de 0,461, por lo tanto no aparecen diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de RANKL.

RESULTADOS

En cuanto al estudio de los niveles de OPG, se muestran los resultados en la tabla y figura 6.11.

Tabla 6.11 Estadísticos principales de concentración de OPG (pg/ml) en función de grupo: Grupo control (OPG) formado por individuos periodontalmente sanos y el grupo zona sana pretratamiento (OPG_ZS_1) de individuos con patología periodontal.

	N		N		
OPG	Media	31,102	OPG_ZS_1	Media	7,015
	Desviación típica	7,899		Desviación típica	4,339
	Mínimo	15,463		Mínimo	1,561
	Máximo	44,171		Máximo	18,878
	Mediana	30,695		Mediana	5,829

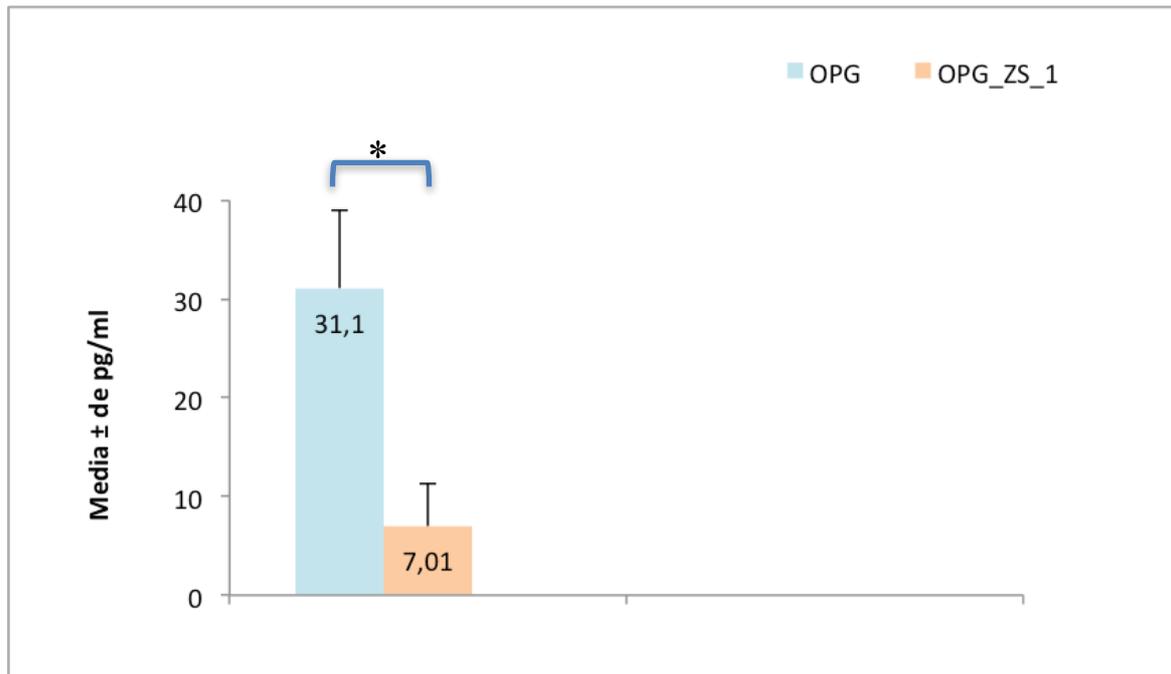


Figura 6.11 Valores medios de concentración OPG (pg/ml) en función del grupo: grupo control (OPG) y grupo zona sana pretratamiento (OPG_ZS_1) en individuos con periodontitis (grupo estudio). * diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

A la vista de las diferencias entre ambos niveles la prueba estadística de Mann-Whitney confirma que esa diferencia es estadísticamente significativa obteniéndose un p-valor $< 0,001$.

Estos resultados indican que los niveles de OPG son bajos en las zonas sanas de individuos que padecen periodontitis cuando los comparamos con los niveles

RESULTADOS

medios que encontramos en individuos sanos (sin periodontitis). Por lo tanto, podríamos pensar que el paciente con periodontitis tiene una menor protección ante el proceso de resorción ósea.

Finalmente analizamos la combinación de las concentraciones de ambos parámetros valorando el ratio RANKL/OPG (Tabla 6.12, Figura 6.12).

Tabla 6.12 Estadísticos principales de ratio RANKL/OPG en función de grupo: Grupo control (RANKL_OPG) formado por individuos periodontalmente sanos y el grupo zona sana pretratamiento (RANKL_OPG_ZS_1) de individuos con patología periodontal (grupo estudio).

	N		N
RANKL_OPG	10	Media	15
	2,207	Desviación típica	10,804
	1,129	Mínimo	6,792
	1,171	Máximo	4,126
	4,245	Mediana	30,344
	1,800		10,362
		RANKL_OPG_ZS_1	

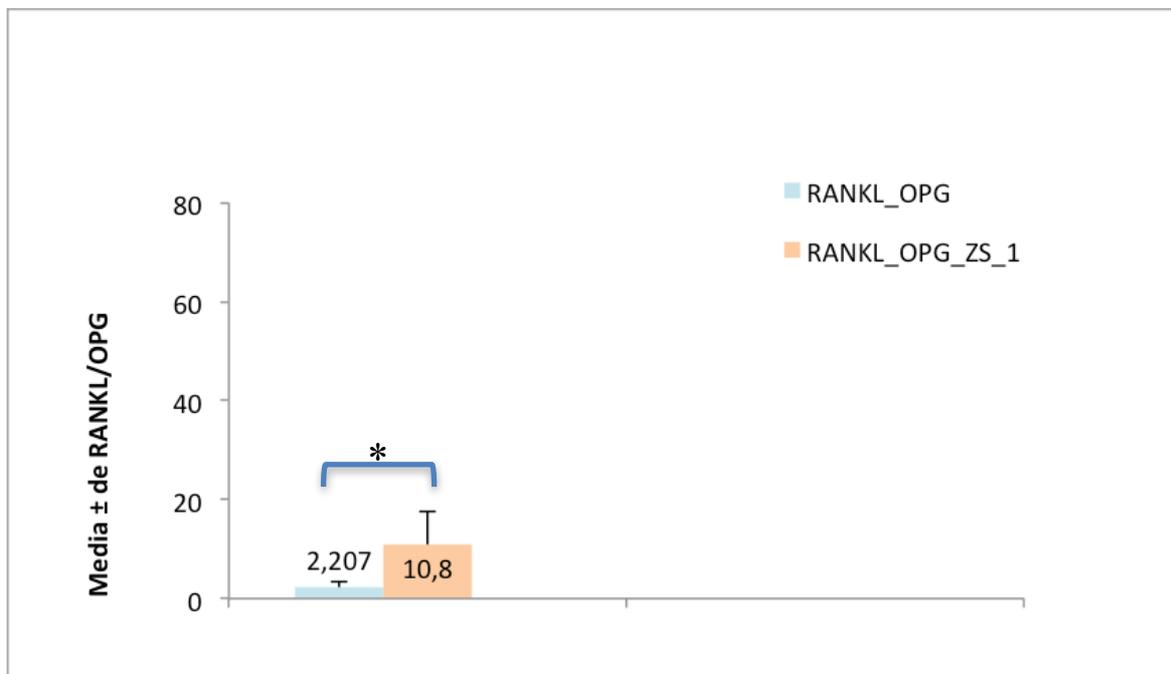


Figura 6.12 Valores medios de ratio RANKL/OPG en función del grupo: grupo control (OPG) y grupo zona sana pretratamiento (OPG_ZS_1) en individuos con periodontitis (grupo estudio). * diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

RESULTADOS

Tras el análisis estadístico mediante pruebas de Mann-Whitney , determinó que el ratio RANKL/OPG es significativamente más bajo en el grupo control sano que en la zona sana de los pacientes antes del tratamiento periodontal (p-valor <0,001). Este dato señala que la medida RANKL/OPG puede ser un parámetro analítico relevante en la valoración patogénica de la afectación periodontal en el fluido crevicular, y que cierta alteración basal de ratio RANKL/OPG pueda interpretarse como factor de susceptibilidad del individuo a la osteolisis.

En resumen: al comparar los niveles en individuos sanos con los de las zonas sanas de pacientes con periodontitis, se observa que la concentración de OPG es menor en estas últimas. Por lo tanto, aunque son zonas clínicamente sanas pero de pacientes que padecen periodontitis, están menos protegidas a la osteolisis ante un aumento de los niveles de RANKL.

RESULTADOS

La última de las cuestiones de este apartado es la siguiente: ¿Qué diferencias existen en las concentraciones de RANKL y OPG en fluido crevicular entre el grupo de individuos periodontalmente sanos y el grupo de pacientes después del tratamiento periodontal?, o expresada de otra manera: ¿El tratamiento periodontal básico provoca una situación de mayor protección molecular a la osteolisis?

El la tabla 6.13 y figura 6.13 se muestran los resultados obtenidos respecto al RANKL.

Tabla 6.13 Estadísticos mas importantes de concentración RANKL (pg/ml): en el Grupo control (individuos periodontalmente sanos (RANKL)); Grupo estudio (pacientes con periodontitis) antes (T1) y después (T2) del tratamiento periodontal básico. En T1 aparecen los valores referentes a grupo zona sana pretratamiento (RANKL_ZS_1) y grupo zona enferma pretratamiento (RANKL_ZE_1). En T2 se observan los valores de grupo zona sana pos-tratamiento (RANKL_ZS_2) y los valores zona enferma pos-tratamiento (RANKL_ZE_2).

		GRUPO		
		Total	Control	Estudio
RANKL	N	10	10	0
	Media	63,128	63,128	.
	Desviación típica	23,830	23,830	.
	Mínimo	47,335	47,335	.
	Máximo	126,157	126,157	.
	Mediana	53,452	53,452	.
RANKL_ZS_1	N	15	0	15
	Media	56,543	.	56,543
	Desviación típica	13,478	.	13,478
	Mínimo	38,429	.	38,429
	Máximo	88,703	.	88,703
	Mediana	51,120	.	51,120
RANKL_ZE_1	N	15	0	15
	Media	95,537	.	95,537
	Desviación típica	13,821	.	13,821
	Mínimo	71,715	.	71,715
	Máximo	126,157	.	126,157
	Mediana	91,369	.	91,369
RANKL_ZS_2	N	15	0	15
	Media	60,857	.	60,857
	Desviación típica	18,856	.	18,856
	Mínimo	37,812	.	37,812
	Máximo	101,922	.	101,922
	Mediana	53,163	.	53,163
RANKL_ZE_2	N	15	0	15
	Media	68,866	.	68,866
	Desviación típica	21,187	.	21,187
	Mínimo	40,933	.	40,933
	Máximo	117,429	.	117,429
	Mediana	61,433	.	61,433

RESULTADOS

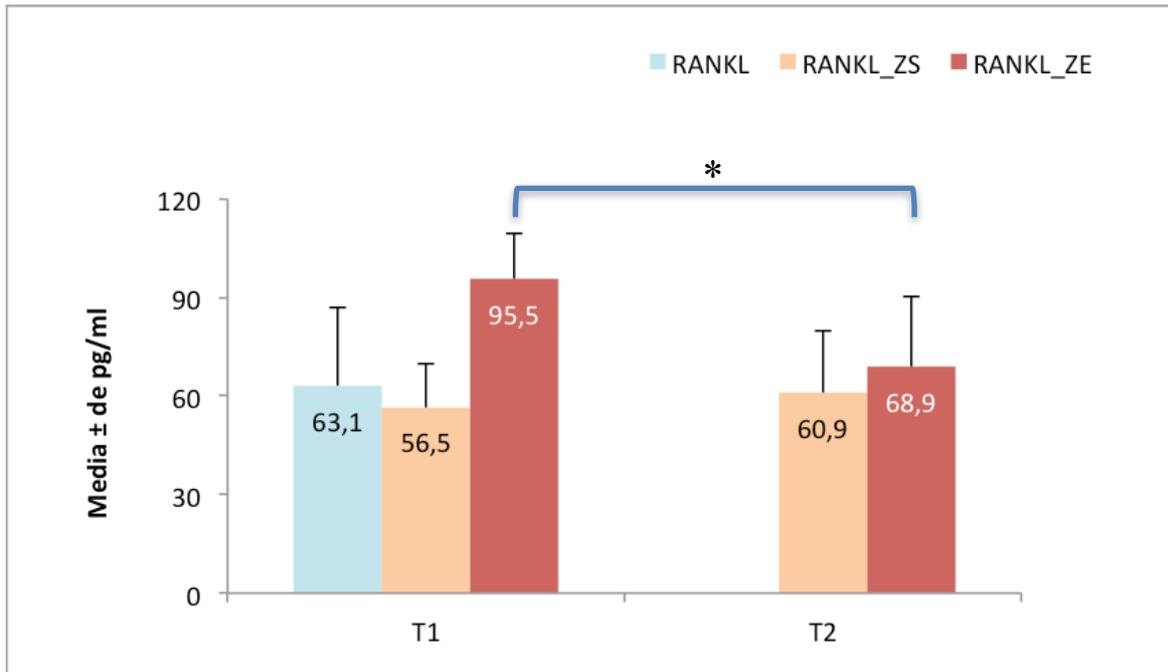


Figura 6.13 Concentración media de RANKL (pg/ml) en el grupo control (RANKL) y grupo estudio antes (T1) y después del tratamiento periodontal básico (T2) en el grupo de zona sana de individuos con periodontitis (RANKL_ZS) y en el grupo de zona enferma de individuos con periodontitis (RANKL_ZE). * diferencias estadísticamente significativas en el grupo RANKL_ZE al realizar el tratamiento periodontal básico.

Puesto que para el grupo control sólo existe una medición (independiente de los factores intra tiempo y zona de la boca), se compararon las distribuciones de RANKL a través de pruebas de Mann-Whitney.

Podemos observar que las concentraciones de RANKL en el grupo estudio antes de realizar el tratamiento periodontal, son más elevadas en la zona enferma que en la sana, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (p -valor $< 0,001$). Sin embargo, estos valores (zona sana de pacientes con periodontitis) no difieren (p -Valor = 0,461) a los valores obtenidos en el grupo control (individuos sin patología periodontal)

Una vez se realiza el tratamiento periodontal, se observa una importante disminución en la concentración de RANKL en la zona enferma de los pacientes periodontales, no existiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto a las zonas sanas de estos pacientes (p -valor = 0,367)

RESULTADOS

De estos datos podemos concluir que los niveles de RANKL en individuos sanos no difieren de los niveles en individuos con periodontitis una vez realizado el tratamiento periodontal, independientemente de que la zona fuera sana o con periodontitis.

Podemos por tanto concluir que los resultados en relación a la concentración de RANKL concuerdan con lo esperado biológicamente, produciéndose una disminución de los niveles de dicho mediador en la zona enferma después del tratamiento llegándose a alcanzar valores semejantes a los encontrados en el grupo control de individuos sanos.

Los datos de concentración de OPG se muestran en tabla 6.14 y figura 6.14.

Tabla 6.14: Estadísticos mas importantes de concentración OPG (pg/ml) en el grupo control (OPG) y el grupo estudio antes (T1) y después (T2) del tratamiento periodontal básico. En T1 tenemos los valores referentes a grupo zona sana pretratamiento (OPG_ZS_1) y grupo zona enferma pretratamiento (OPG_ZE_1). En T2 tenemos los valores de grupo zona sana postratamiento (OPG_ZS_2) y los valores zona enferma postratamiento (OPG_ZE_2).

		GRUPO		
		Total	Control	Estudio
OPG	N	10	10	0
	Media	31,102	31,102	.
	Desviación típica	7,899	7,899	.
	Mínimo	15,463	15,463	.
	Máximo	44,171	44,171	.
	Mediana	30,695	30,695	.
OPG_ZS_1	N	15	0	15
	Media	7,015	.	7,015
	Desviación típica	4,339	.	4,339
	Mínimo	1,561	.	1,561
	Máximo	18,878	.	18,878
	Mediana	5,829	.	5,829
OPG_ZE_1	N	15	0	15
	Media	3,054	.	3,054
	Desviación típica	2,088	.	2,088
	Mínimo	,805	.	,805
	Máximo	8,659	.	8,659
	Mediana	2,341	.	2,341
OPG_ZS_2	N	15	0	15
	Media	6,694	.	6,694
	Desviación típica	3,897	.	3,897
	Mínimo	2,610	.	2,610
	Máximo	14,195	.	14,195
	Mediana	5,268	.	5,268
OPG_ZE_2	N	15	0	15
	Media	6,605	.	6,605
	Desviación típica	4,768	.	4,768
	Mínimo	1,341	.	1,341
	Máximo	20,049	.	20,049
	Mediana	4,659	.	4,659

RESULTADOS

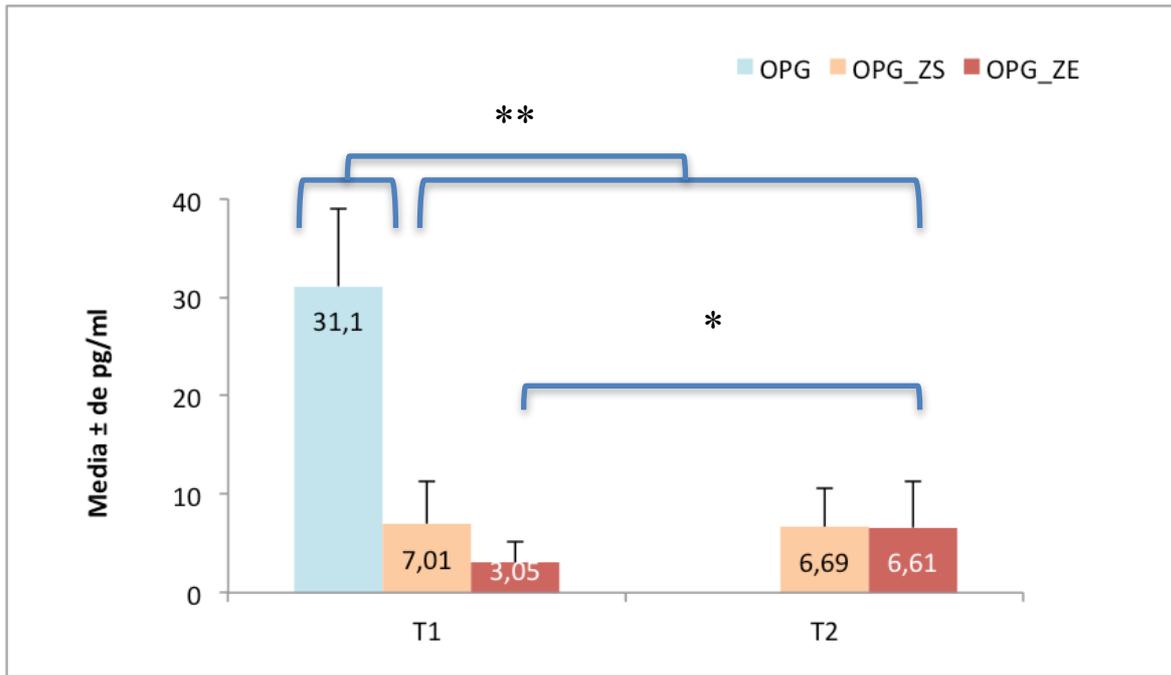


Figura 6.14 Concentración media de OPG (pg/ml) Según grupo y tiempo: grupo control (OPG) y grupo estudio antes (T1) y después del tratamiento periodontal básico (T2). En función del grupo: de zona sana de individuos con periodontitis (OPG_ZS) y en el grupo de zona enferma de individuos con periodontitis (OPG_ZE). * diferencias estadísticamente significativas en el grupo OPG_ZE entre T1 y T2. ** Diferencias estadísticamente significativas entre grupo control y el resto de grupos.

Para determinar las diferencias estadísticas entre diferentes grupos utilizaremos las pruebas para muestras independientes de Mann-Whitney. Los resultados mostrados en la figura 6.14 indican que los valores de OPG del grupo control (individuos periodontalmente sanos) son siempre significativamente más elevados que los de cualquier localización y/o tiempo en los pacientes del grupo estudio, con p-valores $<0,001$. Estos resultados confirman nuestras observaciones anteriores y demuestran que los pacientes periodontales van a tener menores niveles de OPG independientemente de la zona analizada en el momento de pretratamiento. Sin embargo, los niveles de OPG aumentan significativamente en la zona enferma de los pacientes periodontales tras la aplicación del tratamiento, llegando a ser comparables a los encontrados en la zona sana de estos mismos pacientes. Pero, tal y como se muestra en la figura 6.14, los niveles de OPG nunca consiguen llegar a niveles comparables a los de los individuos sanos.

En base a estos resultados podríamos pensar que los individuos periodontalmente sanos tienen unos niveles basales de OPG mayores que los

RESULTADOS

pacientes que padecen periodontitis, lo que estaría directamente ligado con la mayor o menor susceptibilidad (protección ante la resorción ósea). La otra de las explicaciones estaría relacionada con la edad de los pacientes, es decir el grupo control esta formado por individuos más jóvenes que el grupo estudio y podría ser que este parámetro influyese en los niveles basales de OPG.

En este punto, analizamos los datos del ratio RANKL/OPG como integración de ambos parámetros (Tabla 6.15 y Figura 6.15).

Tabla 6.15 Estadísticos más importantes de ratio RANKL/OPG según grupo y tiempo: grupo control (RANKL_OPG) y grupo estudio antes (T1) y después (T2) del tratamiento periodontal básico. En T1 tenemos los valores referentes a grupo zona sana pretratamiento (RANKL_OPG_ZS_1) y grupo zona enferma pretratamiento (RANKL_OPG_ZE_1). En T2 tenemos los valores de grupo zona sana postratamiento (RANKL_OPG_ZS_2) y los valores zona enferma postratamiento (RANKL_OPG_ZE_2)

		GRUPO		
		Total	Control	Estudio
RANKL_OPG	N	10	10	0
	Media	2,207	2,207	.
	Desviación típica	1,129	1,129	.
	Mínimo	1,171	1,171	.
	Máximo	4,245	4,245	.
	Mediana	1,800	1,800	.
RANKL_OPG_ZS_1	N	15	0	15
	Media	10,804	.	10,804
	Desviación típica	6,792	.	6,792
	Mínimo	4,126	.	4,126
	Máximo	30,344	.	30,344
	Mediana	10,362	.	10,362
RANKL_OPG_ZE_1	N	15	0	15
	Media	45,125	.	45,125
	Desviación típica	24,742	.	24,742
	Mínimo	10,619	.	10,619
	Máximo	89,101	.	89,101
	Mediana	43,009	.	43,009
RANKL_OPG_ZS_2	N	15	0	15
	Media	12,713	.	12,713
	Desviación típica	8,431	.	8,431
	Mínimo	2,664	.	2,664
	Máximo	31,828	.	31,828
	Mediana	11,622	.	11,622
RANKL_OPG_ZE_2	N	15	0	15
	Media	17,009	.	17,009
	Desviación típica	14,749	.	14,749
	Mínimo	2,042	.	2,042
	Máximo	60,962	.	60,962
	Mediana	12,081	.	12,081

RESULTADOS

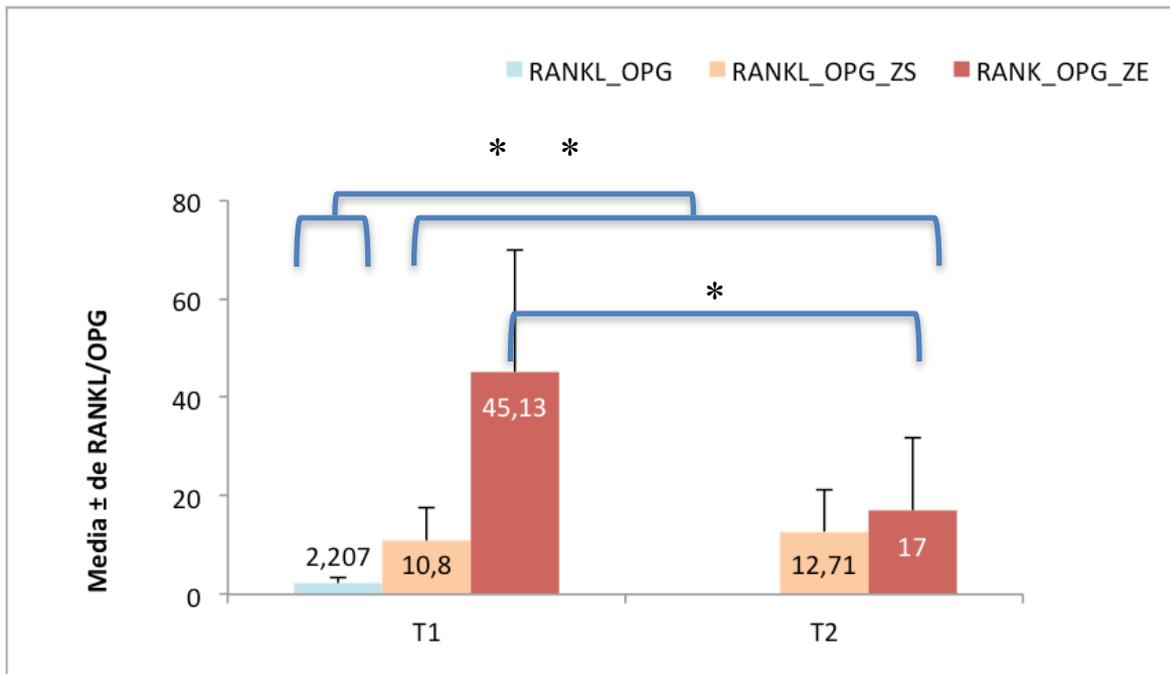


Figura 6.15 Evolución del ratio RANKL/OPG. Según grupo y tiempo: Grupo control (RANKL_OPG) y grupo estudio antes (T1) y después del tratamiento periodontal básico (T2). En función del grupo: de zona sana de individuos con periodontitis (RANKL_OPG_ZS) y en el grupo de zona enferma de individuos con periodontitis (RANKL_OPG_ZE). * diferencias estadísticamente significativas en el grupo RANKL_OPG_ZE entre T1 y T2. ** Diferencias estadísticamente significativas entre grupo control y el resto de grupos.

Para poder detectar si la variación en los niveles de ratio RANKL/OPG son estadísticamente significativas antes y después del tratamiento periodontal en el grupo estudio se ha realizado un estudio estadístico de tipo ANOVA (ATS).

Por una parte, la zona enferma después del tratamiento periodontal sufre una disminución de los niveles de ratio de forma significativa ($p = 0,005$), resultado que concuerda con lo que esperábamos. Esto significa que el ratio RANKL/OPG se ve influido por el tratamiento periodontal, disminuyéndose la actividad osteoclastica. Por otra parte, observamos que en la zona sana después del tratamiento no sufre un cambio significativo ($p = 0,570$) lo cual supone un resultado también acorde a nuestra hipótesis. Cuando comparamos los niveles del ratio RANKL/OPG entre la zona

RESULTADOS

enferma y zona sana después del tratamiento observamos que no existen diferencias significativas ($p= 0,307$).

Finalmente, para comparar el grupo control respecto al grupo estudio realizaremos pruebas estadísticas de Mann-Whitney. El resultado que se obtiene es que la distribución del ratio $RANKL/OPG$ de los sujetos controles siempre es significativamente inferior respecto a cualquier otro grupo de comparación.

Estos datos, como ya hemos comentado anteriormente, merecen un estudio más detallado considerando estos factores moleculares como marcadores de la susceptibilidad innata, propia del paciente a la osteolisis en el proceso de la patología periodontal.

RESULTADOS

6.2. RESULTADOS CLÍNICOS: OBJETIVO SECUNDARIO

El objetivo de este apartado es estudiar la respuesta clínica al tratamiento periodontal básico. Se realiza de dos maneras:

1º Se aborda como unidad de estudio la localización

2º Se considera el paciente como la unidad de estudio

6.2.1 Resultados Clínicos: Unidad de estudio la localización.

6.2.1.1.- Profundidad de sondaje

La tabla siguiente presenta los estadísticos básicos referidos al sondaje en los dos grupos de pacientes, tiempos de medida y zona de la boca:

Tabla 6.16: Estadísticos de profundidad de sondaje (mm) en función de grupo y tiempo. Grupo control (S) y grupo estudio: zona sana pretratamiento (S_ZS_1), zona enferma pretratamiento (S_ZE_1), zona sana postratamiento (S_ZS_2) y zona enferma postratamiento (S_ZE_2).

		GRUPO		
		Total	Control	Test
S	N	10	10	0
	Media	2,300	2,300	.
	Desviación típica	,483	,483	.
	Mínimo	2,000	2,000	.
	Máximo	3,000	3,000	.
	Mediana	2,000	2,000	.
S_ZS_1	N	15	0	15
	Media	2,533	.	2,533
	Desviación típica	,516	.	,516
	Mínimo	2,000	.	2,000
	Máximo	3,000	.	3,000
	Mediana	3,000	.	3,000
S_ZE_1	N	15	0	15
	Media	7,000	.	7,000
	Desviación típica	1,254	.	1,254
	Mínimo	6,000	.	6,000
	Máximo	10,000	.	10,000
	Mediana	7,000	.	7,000
S_ZS_2	N	15	0	15
	Media	2,267	.	2,267
	Desviación típica	,704	.	,704
	Mínimo	1,000	.	1,000
	Máximo	3,000	.	3,000
	Mediana	2,000	.	2,000
S_ZE_2	N	15	0	15
	Media	3,933	.	3,933
	Desviación típica	1,163	.	1,163
	Mínimo	3,000	.	3,000
	Máximo	7,000	.	7,000
	Mediana	4,000	.	4,000

RESULTADOS

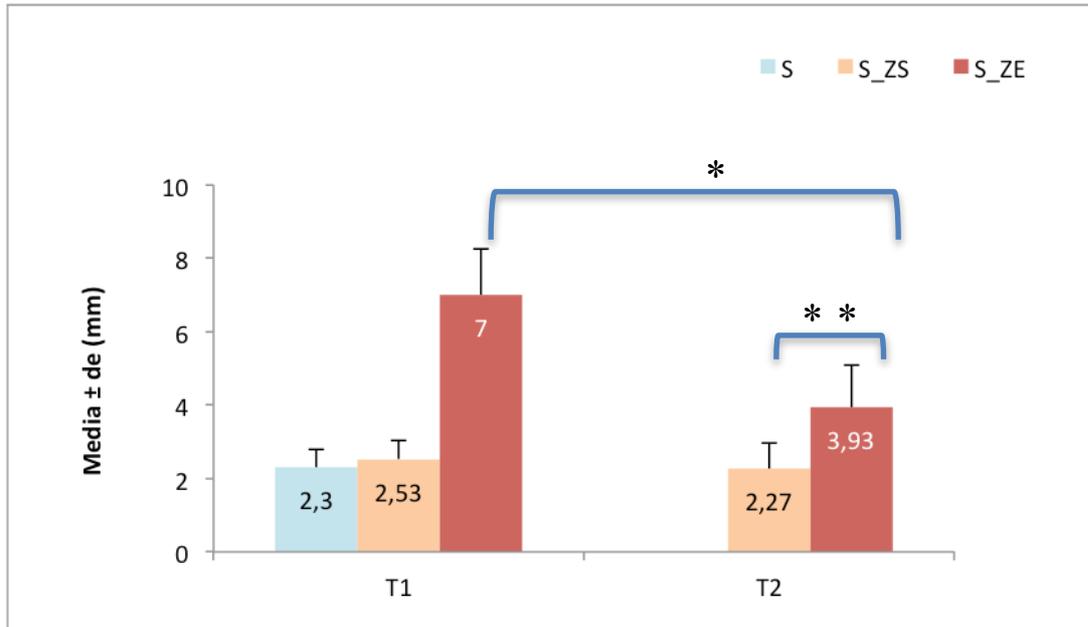


Figura 6.16 Evolución de la profundidad de sondaje media. Según grupo y tiempo: Grupo control (S) y grupo estudio antes (T1) y después del tratamiento periodontal básico (T2). El grupo estudio se divide en zona sana (S_ZS) y en el grupo de zona enferma (S_ZE). * diferencias estadísticamente significativas en el grupo S_ZE entre T1 y T2. ** Diferencias estadísticamente significativas entre S_ZS y S_ZE en T2.

La principal observación es la disminución de la profundidad del sondaje en la zona afectada del grupo estudio. Para corroborar esta apreciación descriptiva de forma estadística se estima un modelo no paramétrico de Brunner-Langer en el grupo Test. La profundidad media de la localización con periodontitis en el grupo estudio disminuye de forma significativa una vez se realiza el tratamiento de raspado y alisado radicular ($p < 0,001$); en la zona sana se ve una tendencia a la disminución pero no siendo estadísticamente significativa ($p = 0,046$).

A pesar de la disminución de la profundidad de sondaje en la zona enferma después del tratamiento no llega a igualarse a los niveles de la zona sana después del tratamiento existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$).

La prueba estadística aplicada cuando comparamos el grupo control con el grupo estudio es diferente puesto que para el grupo control sólo existe una medición (independiente de los factores intra tiempo y zona de la boca). Se comparan las distribuciones de sondaje a través de pruebas de Mann-Whitney.

La conclusión más evidente que sacamos es que la profundidad de sondaje media en la zona sana del grupo estudio no difiere con la del grupo control tanto antes

RESULTADOS

del tratamiento ($p < 0,338$) como después del tratamiento ($p < 0,978$).

En la zona enferma del grupo estudio a pesar de existir una disminución estadísticamente significativa de la profundidad de sondaje de T1 a T2, no llega a igualarse a los valores que encontramos en el grupo control existiendo por tanto, diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) como vemos en la figura 6.16.

6.2.1.2. Nivel de inserción clínica

Análogamente, se analiza el parámetro de nivel de inserción clínica:

Tabla 6.17: Estadísticos de nivel de inserción (mm) en función de grupo y tiempo. Grupo control (IC) y grupo estudio: zona sana pretratamiento (IC_ZS_1), zona enferma pretratamiento (IC_ZE_1), zona sana postratamiento (IC_ZS_2) y zona enferma postratamiento (IC_ZE_2).

		GRUPO		
		Total	Control	Test
IC	N	10	10	0
	Media	2,300	2,300	.
	Desviación típica	,483	,483	.
	Mínimo	2,000	2,000	.
	Máximo	3,000	3,000	.
	Mediana	2,000	2,000	.
IC_ZS_1	N	15	0	15
	Media	3,400	.	3,400
	Desviación típica	1,404	.	1,404
	Mínimo	2,000	.	2,000
	Máximo	7,000	.	7,000
	Mediana	3,000	.	3,000
IC_ZE_1	N	15	0	15
	Media	8,000	.	8,000
	Desviación típica	1,732	.	1,732
	Mínimo	6,000	.	6,000
	Máximo	13,000	.	13,000
	Mediana	8,000	.	8,000
IC_ZS_2	N	15	0	15
	Media	3,200	.	3,200
	Desviación típica	1,521	.	1,521
	Mínimo	1,000	.	1,000
	Máximo	7,000	.	7,000
	Mediana	3,000	.	3,000
IC_ZE_2	N	15	0	15
	Media	5,000	.	5,000
	Desviación típica	1,604	.	1,604
	Mínimo	3,000	.	3,000
	Máximo	10,000	.	10,000
	Mediana	5,000	.	5,000

RESULTADOS

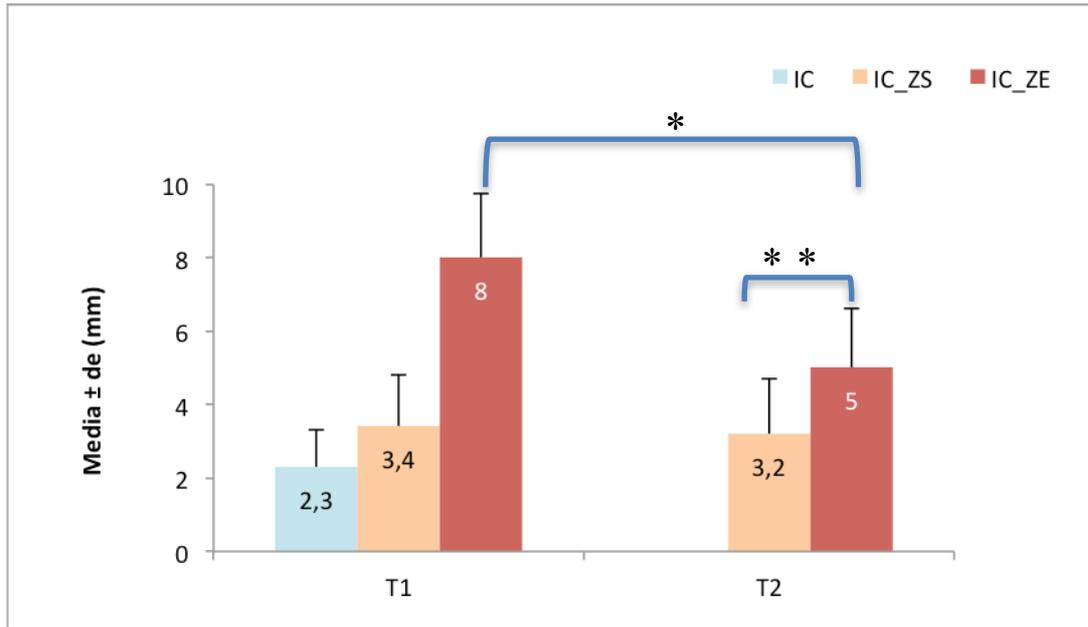


Figura 6.17 Evolución del nivel de inserción clínica medio. Según grupo y tiempo: Grupo control (IC) y grupo estudio antes (T1) y después del tratamiento peridontal básico (T2). El grupo estudio se divide en zona sana de individuos del grupo estudio (IC_ZS) y en el grupo de zona enferma de individuos del grupo estudio (IC_ZE). * diferencias estadísticamente significativas en el grupo IC_ZE entre T1 y T2. ** Diferencias estadísticamente significativas entre IC_ZS y IC_ZE en T2.

La situación es similar a la del sondaje y por tanto realizaremos las mismas pruebas estadísticas para valorar la significancia de los resultados.

Los resultados que encontramos son similares a los encontrados en la profundidad de sondaje; en la zona enferma del grupo estudio la ganancia de inserción clínica aumenta de forma significativa una vez se realiza el tratamiento de raspado y alisado radicular ($p < 0,001$); en la zona sana se ve una tendencia a la ganancia pero no siendo estadísticamente significativa ($p = 0,083$). Es obvio que después de realizar el tratamiento, la ganancia de inserción es mayor en la zona enferma que en la zona sana ($p = 0,004$).

Para contrastar estos datos respecto al grupo control se aplica el test de Mann-Whitney. Se observa que a pesar de la ganancia de inserción clínica en la zona enferma después del tratamiento, este valor no llega a igual a los niveles de la zona sana después del tratamiento ($p < 0,001$). Antes del tratamiento periodontal la zona sana ($p = 0,026$) y enferma ($p < 0,001$) presentan diferencias respecto a los valores del grupo control. Después de realizado el tratamiento periodontal sólo la zona sana

RESULTADOS

alcanza valores similares a los del grupo control ($p=0,026$).

6.2.1.3. Sangrado localizado

Analizamos el sangrado en la localización enferma de los pacientes con periodontitis (grupo estudio) y su evolución posterior al tratamiento periodontal de raspado y alisado radicular.

Para 25 individuos (10 controles y 15 individuos del grupo estudio) se ha realizado este análisis. Se produce una reducción de gran magnitud en el porcentaje de enfermos (grupo estudio) con sangrado localizado: Inicialmente sangran todos y después del tratamiento sólo lo hace un (7,7%).

Podemos observar que no existe sangrado en la zona sana antes del tratamiento ya que era un criterio de inclusión y por tanto no hay variación con el tratamiento. Al aplicar el test ATS concluye que el efecto del tratamiento sobre el sangrado localizado ha sido estadísticamente significativo ($p<0,001$), pasando en la zona enferma de un 100% a un 7,7%..

6.2.2. Resultados clínicos: Considerando la unidad de estudio el individuo.

Una vez analizadas las localizaciones donde se tomaron las muestras del estudio, se analizó también la respuesta clínica tomando como unidad de estudio el individuo, con ello se pretende valorar el impacto del tratamiento periodontal básico en el global de la boca.

Los resultados a nivel de la profundidad de sondaje media en el grupo estudio antes (T1) del tratamiento periodontal son de $4,08 \pm 0,48$ mm. y después (T2) del tratamiento periodontal de $2,98 \pm 0,43$ mm. Se realizaron en este caso las pruebas estadísticas de Brunner-Langer, para comprobar las diferencias en los pacientes test antes y después del tratamiento. Se concluye que es significativa la disminución del sondaje medio en los sujetos del grupo estudio tras el tratamiento periodontal básico ($p<0,001$).

RESULTADOS

Los valores de profundidad de sondaje media en el grupo control es de $2,51 \pm 0,21$ mm. Para valorar las diferencias entre el grupo control y el grupo estudio realizaremos pruebas de Mann-Whitney. En relación con el grupo control tanto en T1 ($p < 0,001$) como en T2 ($p = 0,005$), el sondaje medio del grupo estudio se presenta significativamente más elevado que los del grupo control.

En relación al porcentaje de sangrado en el grupo control es del 1,4% de media y en el grupo estudio antes del tratamiento (T1) es de 47,73% pasando después del tratamiento periodontal básico (T2) al 6,6%. Para valorar si las diferencias entre pretratamiento y post tratamiento son significativas se realiza un estudio de modelo de Brunner-Langer. Se concluye de nuevo con una reducción significativa del porcentaje de sangrado entre T1 y T2 en el grupo estudio ($p < 0,001$).

Para determinar la relación estadística con el grupo control se realiza pruebas de Mann-Whitney. Aunque el sangrado ha disminuido significativamente con el tratamiento, continúa más elevado en T2 respecto al valor del grupo de individuos periodontalmente sanos (grupo control). ($p = 0,002$).

6.3. RESULTADOS DE LA CALIBRACIÓN DEL PERIOTRON 8000 ®: **OBJETIVO SECUNDARIO**

En este primer apartado abordaremos el resultado de calibración del periotron 8000 que, a pesar de no estar incluido en el apartado de objetivos del estudio, es una parte fundamental en el material y métodos.

Se determinan, mediante el periotron 8000®, tres lecturas consecutivas de suero humano para una secuencia de 7 volúmenes posibles, para 0,04, y desde 0,10 a 0,60 en intervalos de 0,1 μ l.

A partir de las 3 lecturas de fluido, se obtiene la media (unidades periotron) y es éste el valor que se utiliza en las estimaciones de la calibración.

El objetivo es la obtención de una línea de calibración que ajuste al máximo posible la relación entre Volumen y Unidades Periotron.

El gráfico siguiente representa el ajuste proporcionado por un modelo lineal

RESULTADOS

(línea negra continua), cuadrático (trazo azul) y cúbico (trazo rojo):

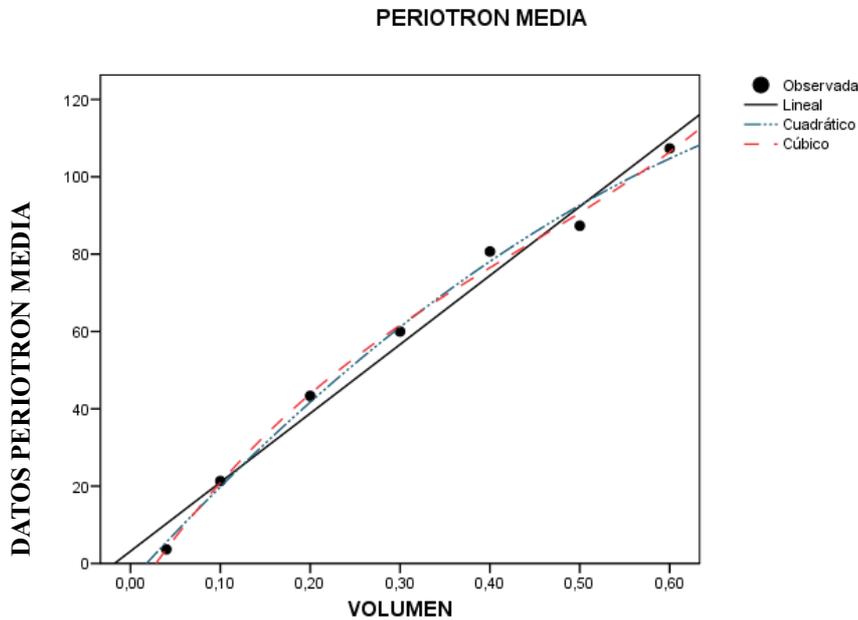


Figura 6.18 Gráfico de calibración del periotron ajustando los valores tomados a un modelo lineal, cuadrático o cúbico.

Gráficamente ya se advierte que el modelo lineal parece el menos adecuado, pues las observaciones no se ajustan exactamente a una recta. Existe un componente de orden mayor correspondiente a esa forma levemente curvada de los pares (V, P).

Tabla 6.18: Resultado de modelos de calibración

Ecuación	Resumen del modelo					Estimaciones de los parámetros			
	R ²	F	gl1	gl2	Sig.	Constante	b1	b2	b3
Lineal	,982	279,011	1	5	,000	3,177	178,238		
Cuadrático	,994	323,232	2	4	,000	-4,503	255,578	-122,588	
Cúbico	,996	254,793	3	3	,000	-9,466	348,154	-482,722	373,938

La estimación de los modelos proporciona los siguientes resultados:

El modelo cúbico es el de mayor ajuste (máximo R²). Puede interpretarse como que un 99,6% de la variabilidad subyacente a la medida de periotron se explicaría por el volumen utilizado; además, este modelo tiene la capacidad de

RESULTADOS

capturar el patrón de inflexión en torno al volumen 0,50.

Si sólo se pretende utilizar la ecuación de estimación cúbica en el rango 0,04-0,60, el modelo podría darse por válido para correlacionar los valores de periotron con el volumen. La ecuación sería la siguiente:

$$P = -9,466 + 348,15V - 482,72 V^2 + 373,94 V^3$$

Fuera de este rango, concretamente para volúmenes mayores de 0,60, la fórmula daría predicciones rápidamente crecientes.

El modelo cuadrático proporciona un ajuste igualmente muy elevado ($R^2=0,994$), totalmente comparable al cúbico, y que permitirá elegir entre uno u otro por motivos prácticos. La siguiente sería la ecuación para determinar la relación entre valores periotron y volumen:

$$P = -4,503 + 255,57V - 122,58 V^2$$

En este caso, el modelo también predice valores crecientes a partir de volumen 0,60; pero que progresivamente se van atenuando.

Por último, la aproximación lineal conseguiría explicar un 98,2% de la variabilidad residente en el periotron. Esta posibilidad se descarta, pues se aleja ya de los valores anteriores.

Se ha estimado, por último, un modelo de cuarto grado, obteniéndose un $R^2=0,996$ y las siguientes estimaciones de los 5 coeficientes implicados:

Tabla 6.19: Coeficientes de correlación

Parámetro	Estimación	Error típico
A	-6,897	4,928
B	-171,211	530633088
C	448,788	530633107
D	-795,590	526,390
E	917,943	742,456

La conclusión es que no es necesario un modelo de orden tan elevado, puesto que no mejora explicabilidad respecto al cúbico.

La elección óptima sería el modelo cúbico en el rango de volúmenes utilizado en las estimaciones (0,0-0,60 μ l).

RESULTADOS

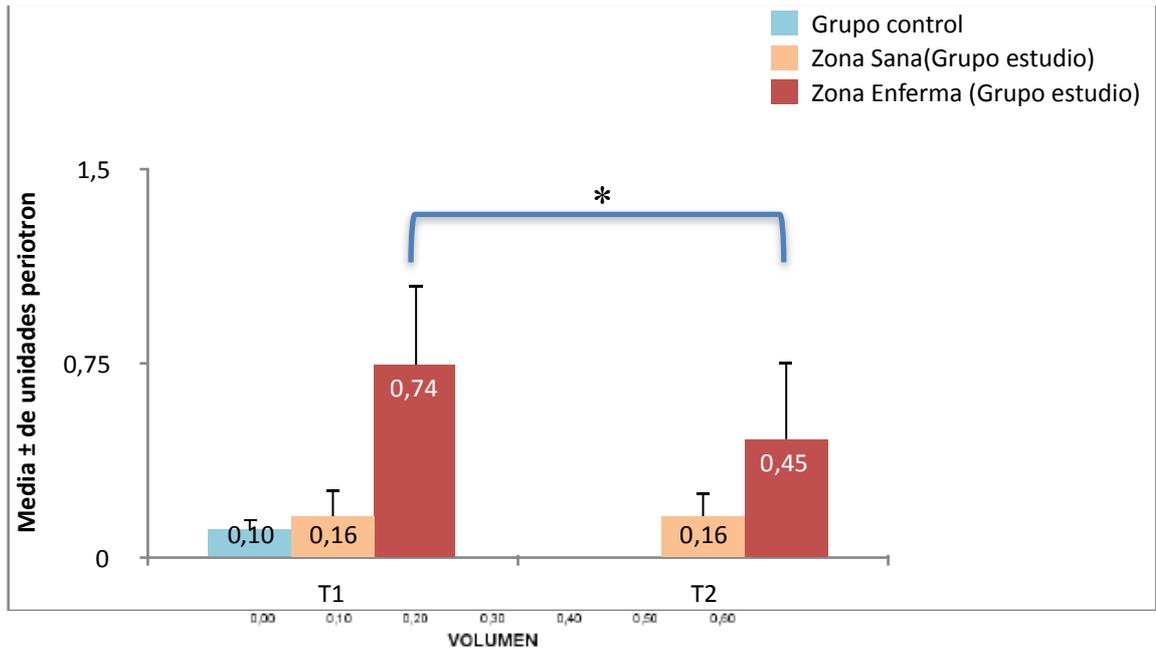


Imagen 6.19 Gráfico del la línea de ajuste cúbico a los datos obtenidos de periotron.

Reproducibilidad del instrumento

Dado que se obtuvieron 3 medidas de Periotron para cada volumen, es posible estudiar la reproducibilidad del instrumento. Se presentan, a continuación, los valores calculados de los indicadores de reproducibilidad d de Dahlberg y coeficiente de variación (CV):

La d de Dahlberg toma el valor 3,6, siendo sus unidades las originales de la medida del Periotron. Se interpreta como una estimación del error absoluto de medida.

Este error ha de relativizarse al orden de las medidas (media general 57,6), resultando un coeficiente de variación o error técnico del método de 6,24%. Se trata de un error interpretable como de magnitud moderada.

6.4. VOLUMEN DE FLUIDO CREVICULAR: OBJETIVO SECUNDARIO

A pesar de que el volumen de fluido crevicular no es un parámetro clínico clásico, se ha propuesto en la bibliografía, como un signo de mejora clínica. Debido a que la presencia de inflamación produciría un mayor volumen de fluido crevicular que disminuirá tras la desaparición de la inflamación.

RESULTADOS

La tabla siguiente presenta los estadísticos básicos referidos a los valores de periotron en los individuos sanos (PERI), en los individuos del grupo estudio en la zona sana pretratamiento (PERI_ZS_1) y postratamiento (PERIO_ZS_2). Finalmente en individuos del grupo estudio en la zona enferma pretratamiento (PERI_ZE_1) y postratamiento (PERI_ZE_2).

Tabla 6.18 Estadísticos más importantes del datos medios de volumen expresados en unidades periotron en función del grupo, zona y tiempo siendo los valores de periotron en los individuos sanos (PERI), en los individuos del grupo estudio en la zona sana pre tratamiento (PERI_ZS_1) y postratamiento (PERIO_ZS_2). Finalmente en individuos del grupo estudio en la zona enferma pretratamiento (PERI_ZE_1) y postratamiento (PERI_ZE_2).

		GRUPO		
		Total	Control	Test
PERI	N	10	10	0
	Media	20,100	20,100	.
	Desviación típica	9,061	9,061	.
	Mínimo	5,000	5,000	.
	Máximo	35,000	35,000	.
	Mediana	17,000	17,000	.
PERI_ZS_1	N	14	0	14
	Media	31,857	.	31,857
	Desviación típica	21,933	.	21,933
	Mínimo	2,000	.	2,000
	Máximo	71,000	.	71,000
	Mediana	29,500	.	29,500
PERI_ZE_1	N	14	0	14
	Media	122,821	.	122,821
	Desviación típica	45,322	.	45,322
	Mínimo	45,000	.	45,000
	Máximo	178,000	.	178,000
	Mediana	128,000	.	128,000
PERI_ZS_2	N	14	0	14
	Media	32,286	.	32,286
	Desviación típica	18,439	.	18,439
	Mínimo	4,500	.	4,500
	Máximo	75,000	.	75,000
	Mediana	32,500	.	32,500
PERI_ZE_2	N	14	0	14
	Media	81,393	.	81,393
	Desviación típica	46,965	.	46,965
	Mínimo	18,500	.	18,500
	Máximo	177,500	.	177,500
	Mediana	83,750	.	83,750

RESULTADOS

Mediante la ecuación cúbica obtenida en el apartado de calibración del Periotron, se calculan los valores de volumen de fluido crevicular correspondientes a las mediciones de Periotron.

Algunos valores de Periotron son extremadamente elevados fuera de los rangos de estimación de dicha ecuación, donde ésta deja de ser aplicable. Para estos casos puntuales, se asume un valor de volumen de 1,0.

La nueva variable volumen medio en ml se describe completamente en la siguiente tabla: volumen de fluido crevicular del grupo control (VOLP), en los individuos del grupo estudio en la zona sana pretratamiento (VOLP_ZS_1) y postratamiento (VOLP_ZS_2). Finalmente en individuos del grupo estudio en la zona enferma pretratamiento (VOLP_ZE_1) y postratamiento (VOLP_ZE_2).

Tabla 6.19 Estadísticos mas importantes del volumen de fluido crevicular medio en ml. Siendo el volumen de fluido crevicular del grupo control (VOLP), en los individuos del grupo estudio en la zona sana pretratamiento (VOLP_ZS_1) y postratamiento (VOLP_ZS_2). Finalmente en individuos del grupo estudio en la zona enferma pretratamiento (VOLP_ZE_1) y postratamiento (VOLP_ZE_2).

		GRUPO		
		Total	Control	Test
VOLP	N	10	10	0
	Media	,102	,102	.
	Desviación típica	,040	,040	.
	Mínimo	,038	,038	.
	Máximo	,168	,168	.
	Mediana	,088	,088	.
VOLP_ZS_1	N	14	0	14
	Media	,159	.	,159
	Desviación típica	,105	.	,105
	Mínimo	,026	.	,026
	Máximo	,356	.	,356
	Mediana	,143	.	,143
VOLP_ZE_1	N	14	0	14
	Media	,744	.	,744
	Desviación típica	,308	.	,308
	Mínimo	,216	.	,216
	Máximo	1,000	.	1,000
	Mediana	,923	.	,923
VOLP_ZS_2	N	14	0	14
	Media	,160	.	,160
	Desviación típica	,089	.	,089
	Mínimo	,036	.	,036
	Máximo	,381	.	,381
	Mediana	,157	.	,157
VOLP_ZE_2	N	14	0	14
	Media	,454	.	,454
	Desviación típica	,295	.	,295
	Mínimo	,094	.	,094
	Máximo	1,000	.	1,000
	Mediana	,437	.	,437

RESULTADOS

Figura 6.20 Evolución de las unidades periotron en función del grupo y tiempo, siendo pretratamiento T1 y postratamiento T2. Diferencias estadísticamente significativas en la zona enferma antes y después del tratamiento periodontal.

Gráficamente, se observa cómo el volumen de fluido crevicular en la zona enferma, en el grupo estudio, disminuye de forma evidente tras la realización del tratamiento periodontal básico, manteniéndose constante el de la zona sana.

Para confirmar estas impresiones descriptivas se estima un modelo no paramétrico de Brunner-Langer con factores tiempo, zona de la boca e interacción:

- La conclusión más importante es que existe un efecto interacción entre tiempo y zona ($p=0,021$). Es decir, la zona enferma y la zona sana de los pacientes están evolucionando de forma totalmente distinta.

Se produce una disminución significativa del volumen de T1 a T2 en la parte enferma ($p<0,001$); pero en la zona sana el nivel del parámetro no cambia ($p=0,819$). En cualquier caso, en el tiempo T2 sigue existiendo una diferencia significativa en el volumen de ambas zonas (enferma y sana) ($p<0,001$).

RESULTADOS

Las comparaciones respecto al grupo control se analizan mediante test de Mann-Whitney.

Tanto en T1 como en T2 el volumen en la zona enferma del grupo estudio se muestra significativamente más elevado que en el grupo control ($p < 0,001$).

Además, tanto en T1 ($p = 0,235$) como en T2 ($p = 0,074$) la distribución de valores de volumen en el grupo estudio en la zona sana puede aceptarse similar a la de los controles.

6.5. RESUMEN

1. Antes del tratamiento, los valores del RANKL en sujetos sanos (grupo control) y en la zona sana de sujetos enfermos (grupo estudio) son similares; pero no así respecto a la zona enferma donde aparece significativamente elevado.

El tratamiento produce un efecto significativo de normalización del parámetro molecular en las zonas enfermas hasta niveles propios de zonas sanas en el grupo estudio.

2. La OPG de los individuos sanos (grupo control) es significativamente superior a la de cualquier zona y tiempo de los pacientes. No obstante, puede hablarse de un incremento muy relevante de la OPG en las zonas enfermas tras el tratamiento periodontal de raspado y alisado radicular (grupo estudio).

3. A nivel del ratio entre ambos parámetros moleculares (RANKL/OPG), la situación es muy similar. Los controles mantienen siempre un nivel más bajo que los individuos del grupo estudio, en cualquiera de sus zonas, incluso tras el tratamiento.

Sin embargo, de la situación pretratamiento (T1) a la situación postratamiento (T2) se consigue una disminución significativa del ratio en las áreas afectadas en los individuos del grupo estudio.

RESULTADOS

4. Los parámetros clínicos experimentan una mejoría generalizada con el tratamiento. La mejora es especialmente marcada en las zonas enfermas de los individuos del grupo estudio, si bien se extiende también, y de forma más débil, a las partes no afectadas en el caso del sondaje y la pérdida de inserción. En cualquier caso, no puede hablarse de una normalización absoluta de estos parámetros. Tras el tratamiento continúan más elevados que en los controles.

7. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

En este último apartado se realiza un análisis crítico de todos los resultados comparándolos con estudios similares.

A la hora de seleccionar la muestra para el estudio, una de las principales cuestiones fue determinar el tamaño muestral para poder obtener una suficiente potencia estadística. En este sentido hay que tener en cuenta cuál es la variable principal y qué diferencia, consideramos clínicamente significativa en esta variable. Aquí nos encontramos la primera de las limitaciones, ya que la variable principal es la concentración de las proteínas RANKL y OPG, y en la actualidad no disponemos de la suficiente información para determinar qué variación en estos parámetros tiene una relevancia clínica.

Por tanto a la hora de determinar el tamaño muestral se toman como referencia estudios previos donde se analizan dichos factores moleculares, y se obtienen resultados estadísticamente significativos. En este sentido sólo tenemos en la literatura dos estudios que analicen la variación de la concentración de estos parámetros en el fluido crevicular en dos momentos, Bostanci 2011 y Buduneli 2009 (Bostanci y cols., 2011, Buduneli y cols., 2009), en los que se estudian un total de 27 y 20 pacientes respectivamente. Aparte de estos estudios longitudinales similares al nuestro, el resto de estudios son transversales, aunque el número de pacientes estudiados es similar.

Es importante, cuando trabajamos con un número de muestra reducido, seleccionar de forma cuidadosa la inclusión de los individuos a estudiar para evitar variables que puedan influir en los niveles de los parámetros de RANKL y OPG, de ahí que se tengan en cuenta factores que puedan modificar las concentraciones de estas moléculas. Claramente, hay medicación y patologías sistémicas que pueden influir sobre estos parámetros. De hecho, estudios recientes, realizados en fluido crevicular determinan que incluso el tabaquismo y la diabetes no controlada pueden afectar a los niveles de dichas moléculas en el fluido crevicular (Buduneli y cols., 2009, Ribeiro y cols., 2011).

La muestra estudiada en nuestro trabajo se basa en el estudio de Lu (Lu y cols., 2006), ya que este modelo nos permite hacer un estudio controlado. El grupo control está formado por individuos periodontalmente sanos, y el grupo estudio, por individuos con patología periodontal crónica, que a su vez se divide en dos subgrupos, según el grado de afectación descrito por la Asociación Americana de Periodoncia. Este diseño experimental esto nos permite valorar las diferencias en función al grado de afectación periodontal

DISCUSIÓN

dentro de un mismo paciente antes y después del tratamiento periodontal, lo que se puede interpretar como un control en el mismo grupo de individuos con patología periodontal. Este planteamiento nos permite un diseño de estudio no realizado hasta este momento para el análisis de dichos parámetros.

El motivo de estudiar un grupo de individuos con periodontitis crónica es debido a su alta prevalencia y por que la respuesta al tratamiento periodontal básico es predecible.

Del mismo modo se opta por tomar como unidad de estudio el diente uniradicular porque en la literatura existente es el que principalmente se utiliza en estos estudios por su fácil acceso y la mejor respuesta al tratamiento periodontal de raspado y alisado radicular.

En las publicaciones presentes, el estudio a nivel periodontal del RANKL y de la OPG se ha realizado principalmente con dos métodos: estudio histológico y análisis del fluido crevicular. Ambos han demostrado ser útiles para el estudio de este tipo de marcadores moleculares. Sin embargo, en este protocolo se ha optado por utilizar el método de análisis del fluido crevicular por tres motivos: es un método que detecta las formas solubles de RANKL y de OPG; es un procedimiento no invasivo, lo que permitiría en un futuro su aplicación clínica; y, por último, nos permite realizar un muestreo de las mismas zonas a lo largo del tiempo, lo que sería imposible con la toma de una biopsia.

Las limitaciones de utilizar el fluido crevicular como muestra son dos. En primer lugar no permite la detección de la fracción unida a membrana del RANKL y tampoco identifica las células responsables de la expresión de dichas moléculas.

La técnica de recogida de las muestras de fluido crevicular que se utilizó fue el uso de tiras de papel de filtro (perioaper ®), ya que permiten recolectar volúmenes muy pequeños en poco tiempo. Entre las formas de tomar la muestra existen diferentes variantes según dónde se coloque la tira de papel: método extracrevicular, método intracrevicular superficial y método intracrevicular profundo (Griffiths, 2003). En base al origen celular del RANKL y de la OPG optamos por la última de las técnicas ya que nos permite tomar la muestra del fondo de la bolsa periodontal que es la localización más cercana al proceso de osteoclastogénesis, aparte de que se trata de la técnica más empleada en todos los estudios de fluido crevicular.

En la literatura podemos observar el estudio de Mogi (Mogi y cols., 2004), donde utilizaba una técnica intracrevicular superficial y observó cómo las concentraciones de

DISCUSIÓN

RANKL disminuían conforme aumentaban la profundidad de bolsas periodontales, y uno de los posibles factores que pueden influir es la técnica que utilizaron. Por este motivo desestimamos utilizar la técnica intracrevicular superficial y optamos por utilizar la técnica intracrevicular profunda llegando con el papel absorbente al fondo del surco.

La determinación del volumen del fluido crevicular de la muestra es un proceso complejo debido a que las cantidades recogidas en el papel de filtro son ínfimas. Las primeras técnicas utilizadas se basaban en la tinción de las proteínas, de tal forma que se podía realizar medición lineal en una tira de fieltro; pero esta técnica tiene el inconveniente de que no mide realmente volúmenes e incapacita la muestra para posteriores análisis bioquímicos. Algunos investigadores optaron por pesar las tiras antes y después de la toma, técnica que ha funcionado con éxito. El problema es que se necesita una báscula de altísima precisión para detectar el cambio de peso y por otra parte, esta técnica es muy sensible al proceso de evaporación del fluido crevicular.

En nuestro estudio se ha optado por la utilización de un dispositivo electrónico de medición denominado Periotron[®], que permite la cuantificación exacta de volúmenes de fluido crevicular y su posterior procesado en el laboratorio, sin el inconveniente de la evaporación del líquido. Este dispositivo es sensible a las tiras de papel mojadas, transfiriendo diferente intensidad de corriente eléctrica en función del volumen del líquido. Consta de dos platinas metálicas que actúan a modo de placas, y de un condensador eléctrico. Si se coloca una tira seca entre las platinas, la capacitancia se transfiere a través del circuito eléctrico y se registra cero en la lectura numérica; por el contrario, una tira mojada incrementará la capacitancia proporcionalmente al volumen del líquido que contenga y que se reflejará por un aumento del valor registrado. La técnica es rápida y no parece influir sobre el volumen ni la composición de la muestra de líquido crevicular (Griffiths, 2003).

En esta tesis se han estudiado dos parámetros moleculares mediante técnicas ELISA. Una de las particularidades incorporadas en este diseño en el procesado de la muestra es la utilización de inhibidores de las proteasas para evitar la alteraciones del RANKL y OPG. Pese a ser una metodología poco utilizada en los estudios revisados, minimiza las posibles distorsiones en los resultados de la muestra, al evitar que las proteínas presentes en el periopaper puedan ser degradadas por la acción de proteasas. El

DISCUSIÓN

grupo de estudio de Mogi utiliza este procedimiento de forma sistemática en todas sus investigaciones (Mogi y cols., 2004), hecho que debe mejorar los resultados experimentales.

Tras haber obtenido la muestra de fluido crevicular y determinado el volumen, es necesario recuperar el líquido crevicular que se encuentra en la punta de papel. Según los resultados de los estudios publicados, la técnica de centrifugado permite una extracción de proteínas cercana al 100%, por eso es la técnica de elección.

Una vez extraída, la muestra se debe congelar hasta el momento de realizar el test ELISA. Existe gran variedad de opiniones acerca de la temperatura en grados centígrados a los que se debe que congelar. Los estudios van desde -20°C hasta los -80°C ; a nivel práctico la única diferencia es que se prolonga la estabilidad de las moléculas de las muestras almacenadas conforme disminuye la temperatura. Por tanto hay que tenerlo en cuenta a la hora de desarrollar la cronología del estudio y por ello fue la conservación de los periópapel a -80°C la condición elegida en el almacenamiento de las muestras.

La técnica utilizada por todos los estudios para determinar las concentraciones, tanto de RANKL como de OPG es mediante técnicas de ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay). Esta técnica se basa en la detección de un antígeno inmovilizado mediante anticuerpos sobre una fase sólida, que produce una reacción cuyo producto puede ser medido espectrofotométricamente. La técnica se ha simplificado de forma considerable al utilizar kits concretos para determinadas distintas moléculas.

Una vez realizado un análisis del método empleado en el estudio pasaremos a valorar de una forma crítica, y en relación a la literatura existente, los resultados obtenidos.

Antes de ver cómo el tratamiento periodontal afecta a los valores de RANKL y OPG, analizaremos los valores obtenidos en nuestro grupo control y estudio pretratamiento en relación a los estudios realizados hasta el momento.

En relación a las concentraciones de RANKL, podemos observar en los resultados obtenidos que en el grupo de individuos estudio, la zona enferma antes del tratamiento presenta unos niveles estadísticamente más elevados que en la zona sana del mismo grupo y en relación al grupo control. Estos resultados están de acuerdo con otros estudios similares (Baltacioglu y cols., 2014, Bostanci y cols., 2007a, Lu y cols., 2006, Mogi y cols., 2004, Sakellari y cols., 2008, Vernal y cols., 2004). En todos estos estudios, cuando

DISCUSIÓN

comparan los niveles en fluido crevicular de RANKL en individuos que presentan periodontitis, con individuos sin patología periodontal, se observa que los valores son estadísticamente mayores en los individuos con periodontitis. En el estudio de Lu (Lu y cols., 2006), además de estas diferencias entre pacientes sanos y enfermos, valoran, en un mismo paciente con enfermedad periodontal, diferentes grados de afectación y observan que los valores que existen de RANKL son más elevados de forma estadísticamente significativa en la zona con periodontitis severas que en las zonas sanas en un mismo paciente. Los resultados de este último estudio son equiparables a los que obtenemos en nuestro estudio. Así mismo cuando comparamos la zona sana del individuo con periodontitis y la zona sana del individuo control, podemos observar que no obtenemos diferencias estadísticamente significativas, del mismo modo que se observa en los estudios de Lu (Lu y cols., 2006).

Nuestros resultados en relación a la OPG, determinan que la concentración de este parámetro está más elevada de forma estadísticamente significativa, en el grupo control en relación al grupo estudio en ambas localizaciones en el momento de pretratamiento. Estos resultados concuerdan con los estudios de Baltacioglu, Bostanci y Mogi (Baltacioglu y cols., 2014, Bostanci y cols., 2007a, Mogi y cols., 2004). En todos ellos, los valores de OPG son más elevados en el grupo control con respecto a los individuos con periodontitis sin tratar. En el estudio de Lu (Lu y cols., 2006), los niveles de OPG son muy bajos tanto en el grupo de pacientes con periodontitis como en el grupo de individuos sanos y no existen diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de estos parámetros.

La relación entre las concentraciones de RANKL y OPG determinan el denominado ratio RANKL/OPG. La importancia de este ratio radica en que cuanto más elevado sea, más actividad osteoclastica podemos encontrar y viceversa. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en nuestro estudio, y comparando el grupo control con el grupo estudio pretratamiento, tanto en su zona enferma como en su zona sana, observamos que el ratio de RANKL/OPG es muy pequeño en el grupo de individuos sanos en comparación con el grupo estudio en ambas localizaciones. La diferencia es claramente significativa cuando comparamos individuos sanos con zonas enfermas con individuos con periodontitis. Estos resultados concuerdan con los estudios de Mogi y Bostanci (Bostanci y

DISCUSIÓN

cols., 2007a, Mogi y cols., 2004). En estos estudios los individuos con periodontitis tenían valores de ratio más elevados que en individuos sanos.

En nuestra investigación en el grupo estudio, vemos como hay una gran diferencia en los valores de ratio en función de la localización, siendo mucho más elevado el ratio a nivel de la localización enferma. Esta misma tendencia la podemos encontrar en el estudio de Lu 2006, donde el ratio es más elevado en una zona con periodontitis avanzada en relación a una zona sana en un grupo de pacientes con periodontitis, ya que es el único estudio donde se comparan diversas zonas con diferente afectación periodontal y se valoran el RANKL y OPG.

A modo de resumen antes de meternos en los efectos del tratamiento periodontal básico sobre las concentraciones moleculares de RANKL y OPG, podemos decir que los resultados que obtenemos están de acuerdo con la gran mayoría de estudios realizados y se llega a la conclusión de que las zonas enfermas de los individuos con periodontitis, los niveles de RANKL son mayores que en las zonas sanas y que en el grupo control; la OPG está enormemente elevada en el grupo control con respecto a los niveles en pacientes estudio. Por tanto, el ratio RAKL/OPG está muy elevado en las zonas enfermas de pacientes con periodontitis y los valores mínimos los encontramos en el grupo control. En definitiva, la concentración de estas dos proteínas en el fluido crevicular de estos parámetros es conforme a los conocimientos biológicos actuales sobre el comportamiento fisiológico en el proceso de osteoclastogénesis.

Un hecho que cabe destacar es que en nuestro estudio tenemos un grupo control y un grupo estudio donde, en este último, analizamos el comportamiento de diferentes zonas de afectación, y sólo encontramos un estudio, con similares características, que es el de Lu 2006 (Lu y cols., 2006).

El resto de artículos, que sí que incluyen en sus estudios un grupo control, no analizan los pacientes según el grado de afectación (Bostanci y cols., 2007a, Mogi y cols., 2004, Mogi y cols., 2007, Sakellari y cols., 2008, Vernal y cols., 2004). En estos estudios sólo analizan los niveles de RANKL y OPG los estudios de Mogi 2004 y Bostanci 2007a. Es decir, que la metodología para estudiar en profundidad el ratio RANK/OPG, en muchos casos, es deficiente bien porque no valoran los dos parámetros, bien porque no tienen en

DISCUSIÓN

cuenta diferentes zonas en un mismo paciente y finalmente, porque no son estudios controlados.

El otro apartado a analizar en la discusión y objeto de esta investigación es el comportamiento del ratio RANKL/OPG después del tratamiento periodontal básico. En este sentido sólo tenemos dos estudios que analizan esta cuestión a nivel del fluido crevicular, correspondientes a los trabajos de Bostanci y Budunelli (Bostanci y cols., 2011, Buduneli y cols., 2009).

Nuestros resultados muestran que el comportamiento de la OPG, en el grupo estudio después del tratamiento periodontal, experimenta un ligero aumento en la zona enferma después del tratamiento, y no varía en la zona sana; sin embargo estas diferencias no son estadísticamente significativas por lo que podemos considerar que los valores de OPG son prácticamente semejantes en ambos tiempos del estudio, si bien son considerablemente más bajos cuando los comparamos con el grupo control.

En relación al RANKL en el grupo estudio sí que observamos un descenso muy importante en la zona afectada cuando tratamos periodontalmente, llegándose a igualar al de la zona sana. No se observan prácticamente variaciones en la zona sana y prácticamente estos valores son similares a los que encontramos en el grupo control.

Teniendo en cuenta estos dos parámetros, el ratio RANKL/OPG, en el grupo estudio, disminuye de forma importante en la zona enferma después del tratamiento periodontal, igualándose al ratio de la zona sana. La zona sana no experimenta variación antes y después del tratamiento. Finalmente el grupo control tiene un ratio mucho más bajo que en el resto de muestras del grupo estudio, tanto antes como después de tratamiento periodontal.

Si buscamos analogías con lo estudios existentes, tenemos que analizar previamente la metodología y resultados de cada uno de ellos.

En el estudio de Budunelli, el objetivo principal es determinar si existen diferencias entre individuos fumadores que padecen periodontitis crónica antes y después del tratamiento periodontal. Para ello estudian un total de 20 individuos, de los cuales la mitad fuman y la otra mitad no. No tienen un grupo control ni valoran diferentes grados de afectación periodontal. Analizan el fluido crevicular antes del tratamiento y a las 4 semanas de haberlo realizado, y los resultados que obtienen sólo determinan que hay un

DISCUSIÓN

aumento estadísticamente significativo en las concentraciones de OPG después del tratamiento periodontal. Los propios autores del estudio confirman que es un resultado inesperado y que no concuerda con la gran mayoría de los estudios ni con el comportamiento biológico de estas moléculas en la patología periodontal (Buduneli y cols., 2009).

En el estudio de Bostanci del 2011 se valoran un total del 27 pacientes de los cuales 14 padecen periodontitis crónica y 13 periodontitis agresiva (Bostanci y cols., 2011). El objetivo es valorar los efectos del tratamiento periodontal básico sobre el ratio RANKL/OPG a los 2, 3 y 4 meses. Como podemos comprobar este estudio tampoco tiene un grupo control ni se valora el grado de afectación en cada paciente. En relación a la periodontitis crónica, estos autores sólo observan una diferencia estadísticamente significativa en el incremento de la concentración RANKL a los dos meses del tratamiento. Sin embargo, al final el ratio permanece prácticamente invariable antes y después del tratamiento en cada uno de los tiempos. Estos autores con dichos resultados sugieren que el tratamiento periodontal convencional no es capaz de modificar estos factores, y establecen que a pesar de que se reduzcan todos los parámetros clínicos, lo que indica una reducción de la inflamación no tiene por qué asociarse a una reducción del ratio. A pesar de estos resultados, estos autores siguen dando valor al ratio RAKL/OPG como potencial marcador de la periodontitis. En conclusión no pueden confirmar que el tratamiento periodontal de RAR (raspado y alisado radicular) reduzca el ratio y alientan a la investigación y uso de terapia moduladora a nivel molecular sobre el ratio RANKL/OPG, como es la utilización sistémica de fármacos bloqueadores de RANKL.

Como podemos observar es complicado establecer una comparativa entre los estudios ya que el diseño, método y los diferentes objetivos de cada uno lo hacen complicado.

Creemos que, a la hora de realizar un estudio sobre el comportamiento de estas moléculas es necesario tener un grupo control y valorar los diferentes grados de afectación periodontal, debido a que la unidad de estudio es la localización, y en un mismo individuo nos podemos encontrar en la boca diferentes zonas con actividad destructiva periodontal con un comportamiento diferente antes y después del tratamiento periodontal.

DISCUSIÓN

Esta división en grados de afectación, y la utilización de un grupo control nos permiten una riqueza de datos por lo que podemos concluir que los valores de OPG, es decir del factor inhibidor de la osteoclastogénesis, son estadísticamente más elevados en pacientes sanos en relación a los pacientes del grupo estudio tratados o no tratados. Por lo tanto podemos llegar a pensar que la periodontitis como factor local de inflamación, parece tener poca influencia en los niveles de OPG en el grupo de pacientes estudio, ya que los valores entre diferentes muestras son similares. Sin embargo, podemos introducir el término susceptibilidad. Estos valores pueden indicar que, posiblemente, los individuos que padecen periodontitis tienen unos niveles más bajos de OPG que pacientes sanos periodontalmente, por lo que podemos hipotetizar que posiblemente estos niveles estén determinados de una manera genética y que determinan que individuos susceptibles de periodontitis tengan unos niveles basales de OPG inferiores. Del mismo modo la misma conclusión podemos extraer de los pacientes sanos periodontalmente, en quienes los niveles de factor protector ante la osteoclastogénesis son más elevados de manera innata. En relación a este resultado podemos encontrar un estudio que apoyaría esta hipótesis de trabajo que es el de Mogi (Mogi y cols., 2004). Sin embargo, un factor que debemos tener en cuenta es que los individuos del grupo control en nuestro estudio son más jóvenes que los del grupo estudio, por lo que el factor edad podría influir en los niveles basales de OPG.

Respecto a los niveles de RANKL, en el grupo estudio en la localización con afectación periodontal no tratada es donde encontramos los valores más elevados y este resultado es estadísticamente significativo respecto al resto de muestras tanto en el grupo estudio como en el grupo control. Además, en todas las muestras, excepto en las zonas afectadas no tratadas, los niveles son semejantes y no existen diferencias estadísticamente significativas.

Por lo tanto, podemos concluir que, en una zona enferma periodontalmente y con características de ser una zona en la cual existe una actividad periodontal destructiva, los valores de sRAKL son más elevados, posiblemente, por una acción local de dicha inflamación sobre las células secretoras de este tipo de moléculas, lo que determina una mayor actividad osteoclástica. Estos datos están de acuerdo con los resultados de Kong, Vernal y Wada (Kong y cols., 2000, Vernal y cols., 2004, Wada y cols., 2001). Todos estos

DISCUSIÓN

estudios evidencian que la presencia de factores implicados en la inflamación producen un aumento de los niveles de RANKL.

Sin embargo, cuando este factor local inflamatorio no está presente, como es el caso del grupo control, en las zonas sanas en el grupo estudio antes del tratamiento, y en las dos zonas postratamiento, vemos que esos niveles de RANKL son más bajos y además semejantes. Si sacamos que el denominador común es la presencia de factor inflamatorio, podemos llegar a la determinación que el RANKL es una molécula estimulada por factores locales de inflamación, y que no parece tener tanta relación con unos niveles basales establecidos por la posible susceptibilidad, como encontrábamos en la molécula OPG.

Los análisis de los resultados del ratio RANKL/OPG, simplemente nos permiten afirmar y concretar todo lo que hemos comentado anteriormente, y que podemos resumir en las siguientes conclusiones:

- Los niveles de RANKL/OPG son muy bajos en el grupo control, principalmente por los niveles tan elevados de OPG que se presentan en estas muestras, lo que determina unos niveles protectores que se podrían asociar a individuos no susceptibles a resorción ósea en periodontitis.
- El ratio sRAKL/OPG presenta unos valores muy elevados en las zonas con periodontitis no tratadas, principalmente determinado por unos valores elevados de RANKL que parece estar asociado a la acción local de los factores inflamatorios en esas localizaciones.
- Los niveles de RANKL/OPG son bajos en las zonas sanas, en las zonas sanas tratadas y en las zonas enfermas tratadas en los paciente que padecen periodontitis. Entre estos grupos los niveles son muy semejantes. Sin embargo, estos niveles no serán tan bajos como los que encontramos en el grupo control donde encontramos los niveles más bajos de RANKL/OPG.

Los resultados obtenidos en este estudio así como la bibliografía existente, nos hace suponer que estos mediadores de destrucción ósea pueden tener importancia en la etiopatogenia de las enfermedades periodontales. Futuras líneas de investigación podrían abarcar el campo del diagnóstico utilizando estos mediadores, para ello habría que estudiar

DISCUSIÓN

en profundidad la sensibilidad y especificidad en estudios de pruebas diagnóstica. En el campo del pronóstico podrían ser de ayuda si se demuestran factores de susceptibilidad que influyan sobre el ratio RANKL/OPG. En el campo del tratamiento estos mediadores se podrían utilizar en un futuro para el tratamiento a nivel molecular de las enfermedades periodontales produciendo una modulación de la activación osteoclástica.

Este trabajo de investigación se ha centrado en el estudio del RANKL y OPG en el contexto del tratamiento periodontal básico de la periodontitis. Pero en la actualidad también se están estudiando como marcadores de periimplantitis hallándose correlaciones positivas entre la presencia de patología periimplantaria (Radik y cols., 2014, Radik y cols., 2013).

Pero, el estudio de estos mediadores no sólo abarca el campo de las patologías que cursan con pérdida ósea alrededor de los dientes o implantes, sino todas aquellas alteraciones patológicas que cursen con alteraciones del metabolismo óseo como es el caso de osteonecrosis por denosumab (You y cols., 2015) o tratamientos donde se induzcan cambio en la biología ósea como es el caso de la ortodoncia (Barbieri y cols., 2013).

La biología molecular y sus múltiples disciplinas, suponen gran parte de la investigación presente y futura de la odontología que con el transcurso del tiempo nos ayudarán al diagnóstico, prevención y tratamiento de nuestros pacientes.

CAPITULO IV:
CONCLUSIONES FINALES

8. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En el presente trabajo de investigación, teniendo en cuenta las limitaciones del estudio y en vista de los resultados proporcionados por el análisis estadístico realizado, podemos llegar a las siguientes conclusiones:

1º Conclusión al primer objetivo principal: en pacientes diagnosticados de periodontitis crónica, la salud periodontal está relacionada con la concentración de RANKL y OPG en el fluido crevicular. Al comparar zonas sanas con afectadas se obtiene que la concentración de OPG es mayor en las sanas, mientras que el RANKL lo es en las enfermas, resultando un ratio RANKL/OPG mayor en las enfermas. El tratamiento periodontal básico produce una mejora clínica clara, que se acompaña a nivel molecular por niveles bajos de RANKL y un aumento de OPG y una disminución del ratio, de forma que estos parámetros alcanzan valores similares a los de las zonas sanas.

2º Conclusión al segundo objetivo principal:

Cuando estos resultados los comparamos con los valores obtenidos en fluido crevicular de sujetos que no padecen periodontitis (controles), observamos que las diferencias con las zonas enfermas son todavía más evidentes en el RANKL, OPG (diez veces más bajos) y ratio RANKL/OPG (veinte veces más alto). Comparado con los resultados de las zonas sanas de pacientes con periodontitis no se observan diferencias con respecto al RANKL, mientras que la OPG es mucho menor, y por tanto el ratio es mucho mayor que en individuos sin periodontitis. Por último, al contrastar los valores obtenidos en individuos periodontalmente sanos con los de las localizaciones enfermas después de ser tratadas, se evidencia un mayor ratio en las zonas tratadas, lo que se deriva de una menor concentración de OPG mientras no hay diferencias en las de RANKL.

Por lo tanto la conclusión general de nuestro estudio es:

La concentración de estas moléculas en el fluido crevicular están relacionadas con la situación de salud o enfermedad en el periodonto, y que el tratamiento periodontal básico en la periodontitis crónica es capaz de revertir esta situación molecular, pero no de retornarla a los niveles que se obtienen en individuos sanos (que no padecen periodontitis).

CONCLUSIONES

3° Conclusión al primer objetivo secundario: Como era de esperar, existe una notable mejora clínica tras el tratamiento periodontal en todos los parámetros estudiados siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

4° Conclusión al segundo objetivo secundario: Según nuestros resultados la curva de calibración correcta para el Periotron 8000 resultaría de aplicar un modelo cúbico.

5° Conclusión al tercer objetivo secundario: Los niveles de fluido crevicular disminuyen en las zonas afectadas tras el tratamiento periodontal.

Analizado el comportamiento de estos parámetros moleculares, en las distintas situaciones de salud estudiadas en esta investigación, hace plantearnos nuevas hipótesis en las que seguir trabajando en este campo. El estudio de la concentración de OPG y RANKL y del ratio RANKL/OPG en el fluido crevicular nos lleva a pensar si la producción de estas moléculas puede considerarse como un factor marcador de la susceptibilidad innata (genética o adquirida) del individuo a la osteolisis alveolar y por tanto a la periodontitis, o si nuevos estudios sobre estos factores moleculares aportarán información para su aplicación clínica en el diagnóstico periodontal o en la valoración de la eficacia del tratamiento periodontal.

CONCLUSIONES

CAPITULO V:
BIBLIOGRAFIA

9. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

- ABU-AMER, Y., ERDMANN, J., ALEXOPOULOU, L., KOLLIAS, G., ROSS, F. P. & TEITELBAUM, S. L. 2000. Tumor necrosis factor receptors types 1 and 2 differentially regulate osteoclastogenesis. *The Journal of biological chemistry*, 275, 27307-27310.
- AGUILA, H. L., MUN, S. H., KALINOWSKI, J., ADAMS, D. J., LORENZO, J. A. & LEE, S. K. 2012. Osteoblast-specific overexpression of human interleukin-7 rescues the bone mass phenotype of interleukin-7-deficient female mice. *J Bone Miner Res*, 27, 1030-42.
- AINAMO, J. & BAY, I. 1975. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J*, 25, 229-35.
- AMCHESLAVSKY, A. & BAR-SHAVIT, Z. 2006. Interleukin (IL)-12 mediates the anti-osteoclastogenic activity of CpG-oligodeoxynucleotides. *J Cell Physiol*, 207, 244-50.
- ANDERSON, D. M., MARASKOVSKY, E., BILLINGSLEY, W. L., DOUGALL, W. C., TOMETSKO, M. E., ROUX, E. R., TEEPE, M. C., DUBOSE, R. F., COSMAN, D. & GALIBERT, L. 1997. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, 390, 175-179.
- ARAI, F., MIYAMOTO, T., OHNEDA, O., INADA, T., SUDO, T., BRASEL, K., MIYATA, T., ANDERSON, D. M. & SUDA, T. 1999. Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) receptors. *J Exp Med*, 190, 1741-54.
- ARMITAGE, G. C. 1999. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*, 4, 1-6.
- ARRON, J. R. & CHOI, Y. 2000. Bone versus immune system. *Nature*, 408, 535-536.
- BALTACIOGLU, E., KEHRIBAR, M. A., YUVA, P., ALVER, A., ATAGUN, O. S., KARABULUT, E. & AKALIN, F. A. 2014. Total oxidant status and bone resorption biomarkers in serum and gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *Journal of periodontology*, 85, 317-326.
- BARBIERI, G., SOLANO, P., ALARCÓN, J. A., VERNAL, R., RIOS-LUGO, J., SANZ, M., & MARTÍN, C. 2013. Biochemical markers of bone metabolism in gingival crevicular fluid during early orthodontic tooth movement. *The Angle Orthodontist*, 83(1), 63-69.
- BAR-SHAVIT, Z. 2008. Taking a toll on the bones: regulation of bone metabolism by innate immune regulators. *Autoimmunity*, 41, 195-203.
- BELIBASAKIS, G. N., BOSTANCI, N., HASHIM, A., JOHANSSON, A., ADUSE-OPOKU, J., CURTIS, M. A. & HUGHES, F. J. 2007. Regulation of RANKL and OPG gene expression in human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells by *Porphyromonas gingivalis*: a putative role of the Arg-gingipains. *Microb Pathog*, 43, 46-53.
- BELIBASAKIS, G. N., REDDI, D. & BOSTANCI, N. 2011. *Porphyromonas gingivalis* induces RANKL in T-cells. *Inflammation*, 34, 133-8.

BIBLIOGRAFIA

- BENDRE, M. S., MONTAGUE, D. C., PEERY, T., AKEL, N. S., GADDY, D. & SUVA, L. J. 2003. Interleukin-8 stimulation of osteoclastogenesis and bone resorption is a mechanism for the increased osteolysis of metastatic bone disease. *Bone*, 33, 28-37.
- BICKEL, M. & CIMASONI, G. 1984. Reliability of volume measurements with the new Periotron 6000. *Journal of periodontal research*, 19, 313-316.
- BOSTANCI, N., ILGENLI, T., EMINGIL, G., AFACAN, B., HAN, B., TOZ, H., ATILLA, G., HUGHES, F. J. & BELIBASAKIS, G. N. 2007a. Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: implications of their relative ratio. *J Clin Periodontol*, 34, 370-6.
- BOSTANCI, N., ILGENLI, T., EMINGIL, G., AFACAN, B., HAN, B., TOZ, H., BERDELI, A., ATILLA, G., MCKAY, I. J., HUGHES, F. J. & BELIBASAKIS, G. N. 2007b. Differential expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin mRNA in periodontal diseases. *Journal of periodontal research*, 42, 287-293.
- BOSTANCI, N., SAYGAN, B., EMINGIL, G., ATILLA, G. & BELIBASAKIS, G. N. 2011. Effect of periodontal treatment on receptor activator of NF-kappaB ligand and osteoprotegerin levels and relative ratio in gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol*, 38, 428-33.
- BOYCE, B. F. & XING, L. 2007. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis research & therapy*, 9 Suppl 1, S1.
- BREX, M. C., FROHLICHER, I., GEHR, P. & LANG, N. P. 1988. Stereological observations on long-term experimental gingivitis in man. *Journal of clinical periodontology*, 15, 621-627.
- BUDUNELI, N., BIYIKOGLU, B., SHERRABEH, S. & LAPPIN, D. F. 2008. Saliva concentrations of RANKL and osteoprotegerin in smoker versus non-smoker chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol*, 35, 846-52.
- BUDUNELI, N., BUDUNELI, E. & KUTUKCULER, N. 2009. Interleukin-17, RANKL, and osteoprotegerin levels in gingival crevicular fluid from smoking and non-smoking patients with chronic periodontitis during initial periodontal treatment. *Journal of periodontology*, 80, 1274-1280.
- CHAPPLE, I. L., CROSS, I. A., GLENWRIGHT, H. D. & MATTHEWS, J. B. 1995. Calibration and reliability of the Periotron 6000 for individual gingival crevicular fluid samples. *Journal of periodontal research*, 30, 73-79.
- CIMASONI, G. 1983. Crevicular fluid updated. *Monographs in oral science*, 12, III-VII, 1-152.
- CROTTI, T., SMITH, M. D., HIRSCH, R., SOUKOULIS, S., WEEDON, H., CAPONE, M., AHERN, M. J. & HAYNES, D. 2003. Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *Journal of periodontal research*, 38, 380-387.
- DAI, S. M., NISHIOKA, K. & YUDOH, K. 2004. Interleukin (IL) 18 stimulates osteoclast formation through synovial T cells in rheumatoid arthritis: comparison with IL1 beta and tumour necrosis factor alpha. *Ann Rheum Dis*, 63, 1379-86.

BIBLIOGRAFIA

- DEREKA, X. E., MARKOPOULOU, C. E., FANOURAKIS, G., TSELENI-BALAFOUTA, S. & VROTSOS, I. A. 2010. RANKL and OPG mRNA level after non-surgical periodontal treatment. *Inflammation*, 33, 200-6.
- DOUGALL, W. C., GLACCUM, M., CHARRIER, K., ROHRBACH, K., BRASEL, K., DE SMEDT, T., DARO, E., SMITH, J., TOMETSKO, M. E., MALISZEWSKI, C. R., ARMSTRONG, A., SHEN, V., BAIN, S., COSMAN, D., ANDERSON, D., MORRISSEY, P. J., PESCHON, J. J. & SCHUH, J. 1999. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes & development*, 13, 2412-2424.
- DUARTE, P. M., SANTOS, V. R., DOS SANTOS, F. A., DE LIMA PEREIRA, S. A., RODRIGUES, D. B. & NAPIMOGA, M. H. 2011. Role of smoking and type 2 diabetes in the immunobalance of advanced chronic periodontitis. *J Periodontol*, 82, 429-38.
- DUTZAN, N., GAMONAL, J., SILVA, A., SANZ, M. & VERNAL, R. 2009. Over-expression of forkhead box P3 and its association with receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand, interleukin (IL)-17, IL-10 and transforming growth factor-beta during the progression of chronic periodontitis. *Journal clinical of periodontology*.36 (5), 396-403.
- FARDELLONE, P., SÉJOURNE, A., PACCOU, J., GOËB, V. 2014. Bone remodelling markers in rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm*.15,1-5.
- FERRER, J., TOVAR, I. & MARTÍNEZ, P. 2002. Osteoprotegerina y Sistema RANKL/RANK: ¿ el futuro del metabolismo óseo? *Anales de Medicina Interna*, 19, 385-388.
- FLEMMIG, T. F. 1999. Periodontitis. *Ann Periodontol*, 4, 32-38.
- FULLER, K., MURPHY, C., KIRSTEIN, B., FOX, S. W. & CHAMBERS, T. J. 2002. TNFalpha potently activates osteoclasts, through a direct action independent of and strongly synergistic with RANKL. *Endocrinology*, 143, 1108-1118.
- FULLER, K., OWENS, J. M., JAGGER, C. J., WILSON, A., MOSS, R. & CHAMBERS, T. J. 1993. Macrophage colony-stimulating factor stimulates survival and chemotactic behavior in isolated osteoclasts. *J Exp Med*, 178, 1733-44.
- GARLET, G. P., MARTINS, W., JR., FONSECA, B. A., FERREIRA, B. R. & SILVA, J. S. 2004. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 31, 671-9.
- GARLET, T. P., COELHO, U., SILVA, J. S. & GARLET, G. P. 2007. Cytokine expression pattern in compression and tension sides of the periodontal ligament during orthodontic tooth movement in humans. *Eur J Oral Sci*, 115, 355-62.
- GOODMAN, G. R., DISSANAYAKE, I. R., GORODETSKY, E., ZHOU, H., MA, Y. F., JEE, W. S. & EPSTEIN, S. 1999. Interferon-alpha, unlike interferon-gamma, does not cause bone loss in the rat. *Bone*, 25, 459-63.

BIBLIOGRAFIA

- GRANT, P. R. & MULVIHILL, J. E. 1972. The fine structure of gingivitis in the beagle. 3. Plasma cell infiltration of the subepithelial connective tissue. *Journal of periodontal research*, 7, 161-172.
- GRASSI, F., PIACENTINI, A., CRISTINO, S., TONEGUZZI, S., CAVALLO, C., FACCHINI, A. & LISIGNOLI, G. 2003. Human osteoclasts express different CXC chemokines depending on cell culture substrate: molecular and immunocytochemical evidence of high levels of CXCL10 and CXCL12. *Histochem Cell Biol*, 120, 391-400.
- GRIFFITHS, G. S. 2003. Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontology 2000*, 31, 32-42.
- HAMP, S. E., NYMAN, S. & LINDHE, J. 1975. Periodontal treatment of multirooted teeth. Results after 5 years. *J Clin Periodontol*, 2, 126-35.
- HAN, X., KAWAI, T., EASTCOTT, J. W. & TAUBMAN, M. A. 2006. Bacterial-responsive B lymphocytes induce periodontal bone resorption. *J Immunol*, 176, 625-31.
- HAN, X., LIN, X., SELIGER, A. R., EASTCOTT, J., KAWAI, T. & TAUBMAN, M. A. 2009. Expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand by B cells in response to oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol*, 24, 190-6.
- HATTERSLEY, G., DOREY, E., HORTON, M. A. & CHAMBERS, T. J. 1988. Human macrophage colony-stimulating factor inhibits bone resorption by osteoclasts disaggregated from rat bone. *J Cell Physiol*, 137, 199-203.
- HODGE, P. & MICHALOWICZ, B. 2001. Genetic predisposition to periodontitis in children and young adults. *Periodontology 2000*, 26, 113-134.
- HONDA, T., DOMON, H., OKUI, T., KAJITA, K., AMANUMA, R. & YAMAZAKI, K. 2006. Balance of inflammatory response in stable gingivitis and progressive periodontitis lesions. *Clinical and experimental immunology*, 144, 35-40.
- HORTON, J. E., RAISZ, L. G., SIMMONS, H. A., OPPENHEIM, J. J. & MERGENHAGEN, S. E. 1972. Bone resorbing activity in supernatant fluid from cultured human peripheral blood leukocytes. *Science (New York, N.Y.)*, 177, 793-795.
- IKEDA, T., KASAI, M., SUZUKI, J., KUROYAMA, H., SEKI, S., UTSUYAMA, M. & HIROKAWA, K. 2003. Multimerization of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) isoforms and regulation of osteoclastogenesis. *The Journal of biological chemistry*, 278, 47217-47222.
- IKEDA, T., KASAI, M., UTSUYAMA, M. & HIROKAWA, K. 2001. Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology*, 142, 1419-1426.
- ISHIDA, N., HAYASHI, K., HATTORI, A., YOGO, K., KIMURA, T. & TAKEYA, T. 2006. CCR1 acts downstream of NFAT2 in osteoclastogenesis and enhances cell migration. *J Bone Miner Res*, 21, 48-57.
- JABBAR, S., DRURY, J., FORDHAM, J., DATTA, H. K., FRANCIS, R. M. & TUCK, S. P. 2011. Plasma vitamin D and cytokines in periodontal disease and postmenopausal osteoporosis. *J Periodontal Res*, 46, 97-104.

BIBLIOGRAFIA

- JACQUIN, C., GRAN, D. E., LEE, S. K., LORENZO, J. A. & AGUILA, H. L. 2006. Identification of multiple osteoclast precursor populations in murine bone marrow. *J Bone Miner Res*, 21, 67-77.
- KAJIYA, M., GIRO, G., TAUBMAN, M. A., HAN, X., MAYER, M. P. & KAWAI, T. 2010. Role of periodontal pathogenic bacteria in RANKL-mediated bone destruction in periodontal disease. *J Oral Microbiol*, 2.
- KANZAKI, H., CHIBA, M., SHIMIZU, Y. & MITANI, H. 2001. Dual regulation of osteoclast differentiation by periodontal ligament cells through RANKL stimulation and OPG inhibition. *Journal of dental research*, 80, 887-891.
- KAWAI, T., MATSUYAMA, T., HOSOKAWA, Y., MAKIHIRA, S., SEKI, M., KARIMBUX, N. Y., GONCALVES, R. B., VALVERDE, P., DIBART, S., LI, Y. P., MIRANDA, L. A., ERNST, C. W., IZUMI, Y. & TAUBMAN, M. A. 2006. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *The American journal of pathology*, 169, 987-998.
- KINANE, D. F., ADONOGIANAKI, E., MOUGHAL, N., WINSTANLEY, F. P., MOONEY, J. & THORNHILL, M. 1991. Immunocytochemical characterization of cellular infiltrate, related endothelial changes and determination of GCF acute-phase proteins during human experimental gingivitis. *Journal of periodontal research*, 26, 286-288.
- KITaura, H., SANDS, M. S., AYA, K., ZHOU, P., HIRAYAMA, T., UTHGENANT, B., WEI, S., TAKESHITA, S., NOVACK, D. V., SILVA, M. J., ABU-AMER, Y., ROSS, F. P. & TEITELBAUM, S. L. 2004. Marrow stromal cells and osteoclast precursors differentially contribute to TNF-alpha-induced osteoclastogenesis in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 173, 4838-4846.
- KLEIN, D. C. & RAISZ, L. G. 1970. Prostaglandins: stimulation of bone resorption in tissue culture. *Endocrinology*, 86, 1436-40.
- KOBAYASHI-SAKAMOTO, M., HIROSE, K., ISOGAI, E. & CHIBA, I. 2004. NF-kappaB-dependent induction of osteoprotegerin by *Porphyromonas gingivalis* in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 315, 107-12.
- KOENDERS, M. I., LUBBERTS, E., OPPER-S-WALGREEN, B., VAN DEN BERSSELAAR, L., HELSEN, M. M., DI PADOVA, F. E., BOOTS, A. M., GRAM, H., JOOSTEN, L. A. & VAN DEN BERG, W. B. 2005. Blocking of interleukin-17 during reactivation of experimental arthritis prevents joint inflammation and bone erosion by decreasing RANKL and interleukin-1. *Am J Pathol*, 167, 141-9.
- KONG, Y. Y., YOSHIDA, H., SROSI, I., TAN, H. L., CAPPARELLI, C., MONRONY, S., OLIVEIRA, A. J., VAN, G., ITIE, A., WAKEHAM, A., DUNSTAN, C. R., LACEY, D. L., MAK, T. W., BOYLE, W. J., PENNINGER, J. M. 1999. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*, 397, 325-23.
- KONG, Y. Y., BOYLE, W. J. & PENNINGER, J. M. 2000. Osteoprotegerin ligand: a regulator of immune responses and bone physiology. *Immunology today*, 21, 495-502.

BIBLIOGRAFIA

- KÖSEOĞLU, S., HATIPOĞLU, M., SAĞLAM, M., ENHOŞ, Ş., & ESEN, H. H. 2014. Interleukin-33 could play an important role in the pathogenesis of periodontitis. *Journal of periodontal research*, 50;4, 525-534.
- KOTAKE, S., UDAGAWA, N., TAKAHASHI, N., MATSUZAKI, K., ITOH, K., ISHIYAMA, S., SAITO, S., INOUE, K., KAMATANI, N., GILLESPIE, M. T., MARTIN, T. J. & SUDA, T. 1999. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest*, 103, 1345-52.
- KUDO, O., SABOKBAR, A., POCOCCO, A., ITONAGA, I., FUJIKAWA, Y. & ATHANASOU, N. A. 2003. Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism. *Bone*, 32, 1-7.
- LACEY, D. L., TIMMS, E., TAN, H. L., KELLEY, M. J., DUNSTAN, C. R., BURGESS, T., ELLIOTT, R., COLOMBERO, A., ELLIOTT, G., SCULLY, S., HSU, H., SULLIVAN, J., HAWKINS, N., DAVY, E., CAPPARELLI, C., ELI, A., QIAN, Y. X., KAUFMAN, S., SAROSI, I., SHALHOUB, V., SENALDI, G., GUO, J., DELANEY, J. & BOYLE, W. J. 1998. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 93, 165-176.
- LAM, J., TAKESHITA, S., BARKER, J. E., KANAGAWA, O., ROSS, F. P. & TEITELBAUM, S. L. 2000. TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *The Journal of clinical investigation*, 106, 1481-1488.
- LAPPIN, D. F., EAPEN, B., ROBERTSON, D., YOUNG, J. & HODGE, P. J. 2009. Markers of bone destruction and formation and periodontitis in type 1 diabetes mellitus. *J Clin Periodontol*, 36, 634-41.
- LAPPIN, D. F., SHERRABEH, S., JENKINS, W. M. & MACPHERSON, L. M. 2007. Effect of smoking on serum RANKL and OPG in sex, age and clinically matched supportive-therapy periodontitis patients. *J Clin Periodontol*, 34, 271-7.
- LEE, S. H., KIM, T. S., CHOI, Y. & LORENZO, J. 2008. Osteoimmunology: cytokines and the skeletal system. *BMB reports*, 41, 495-510.
- LERNER, U. H. 2006. Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post-menopausal osteoporosis. *Journal of dental research*, 85, 596-607.
- LI, X., QIN, L., BERGENSTOCK, M., BEVELOCK, L. M., NOVACK, D. V. & PARTRIDGE, N. C. 2007a. Parathyroid hormone stimulates osteoblastic expression of MCP-1 to recruit and increase the fusion of pre/osteoclasts. *J Biol Chem*, 282, 33098-106.
- LI, Y., TORALDO, G., LI, A., YANG, X., ZHANG, H., QIAN, W. P. & WEITZMANN, M. N. 2007b. B cells and T cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass in vivo. *Blood*, 109, 3839-3848.
- LIU, B., YU, S. F. & LI, T. J. 2003. Multinucleated giant cells in various forms of giant cell containing lesions of the jaws express features of osteoclasts. *J Oral Pathol Med*, 32, 367-75.

BIBLIOGRAFIA

- LIU, D., YAO, S. & WISE, G. E. 2006. Effect of interleukin-10 on gene expression of osteoclastogenic regulatory molecules in the rat dental follicle. *Eur J Oral Sci*, 114, 42-9.
- LIU, Y. C., LERNER, U. H. & TENG, Y. T. 2010. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. *Periodontology 2000*, 50, 163-206.
- LÖE, H., THEILADE, E. & JENSEN, S. B. 1965. Experimental Gingivitis in Man. *The Journal of periodontology*, 36, 177-187.
- LORENZO, J., HOROWITZ, M. & CHOI, Y. 2008. Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. *Endocrine reviews*, 29, 403-440.
- LORENZO, J. A., SOUSA, S. L. & LEAHY, C. L. 1990. Leukemia inhibitory factor (LIF) inhibits basal bone resorption in fetal rat long bone cultures. *Cytokine*, 2, 266-71.
- LU, H. K., CHEN, Y. L., CHANG, H. C., LI, C. L. & KUO, M. Y. 2006. Identification of the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand system in gingival crevicular fluid and tissue of patients with chronic periodontitis. *Journal of periodontal research*, 41, 354-360.
- MAKIISHI-SHIMOBAYASHI, C., TSUJIMURA, T., IWASAKI, T., YAMADA, N., SUGIHARA, A., OKAMURA, H., HAYASHI, S. & TERADA, N. 2001. Interleukin-18 up-regulates osteoprotegerin expression in stromal/osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 281, 361-6.
- MALCOLM, J., AWANG, R. A., OLIVER-BELL, J., BUTCHER, J. P., CAMPBELL, L., PLANELL, A. A. & CULSHAW, S. 2015. IL-33 Exacerbates Periodontal Disease through Induction of RANKL. *Journal of dental research*. 64, 968-75.
- MARTINEZ, H., JÍMENEZ, F., ANAYA, J. & M., Q. 2005. Citoquinas y quimioquinas. In: CABRERA, J. M. A. (ed.) *Autoinmunidad y enfermedad autoinmune*. Corporación para Investigaciones Biológicas.
- McCLUNG, M. 2007. Role of RANKL inhibition in osteoporosis. *Arthritis Res Ther*, 9, 1-3.
- 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.
- MILLER, S. C. 1938. *Textbook of Periodontia*, Philadelphia, Blakiston Company.
- MIRANDA-CARUS, M. E., BENITO-MIGUEL, M., BALSÀ, A., COBO-IBÁÑEZ, T., PEREZ DE AYALA, C., PASCUAL-SALCEDO, D. & MARTIN-MOLA, E. 2006. Peripheral blood T lymphocytes from patients with early rheumatoid arthritis express RANKL and interleukin-15 on the cell surface and promote osteoclastogenesis in autologous monocytes. *Arthritis Rheum*, 54, 1151-64.
- MOGI, M., OTOGOTO, J., OTA, N. & TOGARI, A. 2004. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *Journal of dental research*, 83, 166-169.
- MORO ALVAREZ, M. 2001. Fármacos que afectan el metabolismo del hueso. *Revista Española de Enfermedades Metabólicas Óseas*, 10, 56-64.

BIBLIOGRAFIA

- MYERS, D. E., COLLIER, F. M., MINKIN, C., WANG, H., HOLLOWAY, W. R., MALAKELLIS, M. & NICHOLSON, G. C. 1999. Expression of functional RANK on mature rat and human osteoclasts. *FEBS letters*, 463, 295-300.
- NAGASAWA, T., KOBAYASHI, H., KIJI, M., ARAMAKI, M., MAHANONDA, R., KOJIMA, T., MURAKAMI, Y., SAITO, M., MOROTOME, Y. & ISHIKAWA, I. 2002. LPS-stimulated human gingival fibroblasts inhibit the differentiation of monocytes into osteoclasts through the production of osteoprotegerin. *Clinical and experimental immunology*, 130, 338-344.
- OBA, Y., LEE, J. W., EHRLICH, L. A., CHUNG, H. Y., JELINEK, D. F., CALLANDER, N. S., HORUK, R., CHOI, S. J. & ROODMAN, G. D. 2005. MIP-1alpha utilizes both CCR1 and CCR5 to induce osteoclast formation and increase adhesion of myeloma cells to marrow stromal cells. *Exp Hematol*, 33, 272-8.
- OGASAWARA, T., YOSHIMINE, Y., KIYOSHIMA, T., KOBAYASHI, I., MATSUO, K., AKAMINE, A. & SAKAI, H. 2004. In situ expression of RANKL, RANK, osteoprotegerin and cytokines in osteoclasts of rat periodontal tissue. *Journal of periodontal research*, 39, 42-49.
- OGATA, Y., KUKITA, A., KUKITA, T., KOMINE, M., MIYAHARA, A., MIYAZAKI, S. & KOHASHI, O. 1999. A novel role of IL-15 in the development of osteoclasts: inability to replace its activity with IL-2. *J Immunol*, 162, 2754-60.
- OZCAKA, O., NALBANTSOY, A., KOSE, T. & BUDUNELI, N. 2010. Plasma osteoprotegerin levels are decreased in smoker chronic periodontitis patients. *Aust Dent J*, 55, 405-10.
- PAGE, R. C. & SCHROEDER, H. E. 1976. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 34, 235-249.
- PALMQVIST, P., PERSSON, E., CONAWAY, H. H. & LERNER, U. H. 2002. IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF-kappa B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappa B in mouse calvariae. *J Immunol*, 169, 3353-62.
- PRESHAW, P. M., KELLY, P. J. & HEASMAN, P. A. 1996. Quadratic calibration curves for the Periotron 6000. *Journal of periodontal research*, 31, 441-443.
- RAKIC, M., STRUILLOU, X., PETKOVIC-CURCIN, A., MATIC, S., CANULLO, L., SANZ, M., & VOJVODIC, D. 2014. Estimation of bone loss biomarkers as a diagnostic tool for peri-implantitis. *Journal of periodontology*, 85(11), 1566-1574.
- RAKIC, M., LEKOVIC, V., NIKOLIC - JAKOBA, N., VOJVODIC, D., PETKOVIC - CURCIN, A., & SANZ, M. 2013. Bone loss biomarkers associated with peri-implantitis. A cross-sectional study. *Clinical oral implants research*, 24(10), 1110-1116.
- RAUNER, M., SIPOS, W. & PIETSCHMANN, P. 2007. Osteoimmunology. *International archives of allergy and immunology*, 143, 31-48.

BIBLIOGRAFIA

- REID, L. R., LOWE, C., CORNISH, J., SKINNER, S. J., HILTON, D. J., WILLSON, T. A., GEARING, D. P. & MARTIN, T. J. 1990. Leukemia inhibitory factor: a novel bone-active cytokine. *Endocrinology*, 126, 1416-20.
- RIBEIRO, F. V., DE MENDONÇA, A. C., SANTOS, V. R., BASTOS, M. F., FIGUEIREDO, L. C. & DUARTE, P. M. 2011. Cytokines and bone-related factors in systemically healthy patients with chronic periodontitis and patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis. *J Periodontol*, 82, 1187-96.
- RODAN, G. A. & MARTIN, T. J. 1981. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption--a hypothesis. *Calcified tissue international*, 33, 349-351.
- SAKATA, M., SHIBA, H., KOMATSUZAWA, H., FUJITA, T., OHTA, K., SUGAI, M., SUGINAKA, H. & KURIHARA, H. 1999. Expression of osteoprotegerin (osteoclastogenesis inhibitory factor) in cultures of human dental mesenchymal cells and epithelial cells. *J Bone Miner Res*, 14, 1486-92.
- SAKELLARI, D., MENTI, S. & KONSTANTINIDIS, A. 2008. Free soluble receptor activator of nuclear factor-kappa ligand in gingival crevicular fluid correlates with distinct pathogens in periodontitis patients. *Journal of clinical periodontology*, 35, 938-943.
- SANTOS, V. R., RIBEIRO, F. V., LIMA, J. A., NAPIMOGA, M. H., BASTOS, M. F. & DUARTE, P. M. 2010. Cytokine levels in sites of chronic periodontitis of poorly controlled and well-controlled type 2 diabetic subjects. *J Clin Periodontol*, 37, 1049-58.
- SATO, K., SUEMATSU, A., OKAMOTO, K., YAMAGUCHI, A., MORISHITA, Y., KADONO, Y., TANAKA, S., KODAMA, T., AKIRA, S., IWAKURA, Y., CUA, D. J. & TAKAYANAGI, H. 2006. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med*, 203, 2673-82.
- SEGURA, J. M. G. 1996. *Técnicas instrumentales de análisis en bioquímica*, Síntesis.
- SEZER, O., HEIDER, U., ZAVRSKI, I., KÜHNE, CA., HOFBAUER, L.C. 2003. RANK ligand and osteoprotegerin in myeloma bone. *Blood*, 101, 2094-8.
- SILNESS, J. & LÖE, H. 1964. Periodontal disease in pregnancy II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontologica*, 22, 121-135.
- SILVA, N., DUTZAN, N., HERNANDEZ, M., DEZEREGA, A., RIVERA, O., AGUILLON, J. C., ARAVENA, O., LASTRES, P., POZO, P., VERNAL, R. & GAMONAL, J. 2008. Characterization of progressive periodontal lesions in chronic periodontitis patients: levels of chemokines, cytokines, matrix metalloproteinase-13, periodontal pathogens and inflammatory cells. *J Clin Periodontol*, 35, 206-14.
- SIMONET, W. S., LACEY, D. L., DUNSTAN, C. R., KELLEY, M., CHANG, M. S., LUTHY, R., NGUYEN, H. Q., WOODEN, S., BENNETT, L., BOONE, T., SHIMAMOTO, G., DEROSE, M., ELLIOTT, R., COLOMBERO, A., TAN, H. L., TRAIL, G., SULLIVAN, J., DAVY, E., BUCAY, N., RENSHAW-GEGG, L., HUGHES, T. M., HILL, D., PATTISON, W., CAMPBELL, P., SANDER, S., VAN, G., TARPLEY, J., DERBY, P., LEE, R. & BOYLE, W. J.

BIBLIOGRAFIA

1997. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 89, 309-319.
- SIMS, N. A., JENKINS, B. J., NAKAMURA, A., QUINN, J. M., LI, R., GILLESPIE, M. T., ERNST, M., ROBB, L. & MARTIN, T. J. 2005. Interleukin-11 receptor signaling is required for normal bone remodeling. *J Bone Miner Res*, 20, 1093-102.
- SPOLIDORIO, L. C., SPOLIDORIO, D. M. & HOLZHAUSEN, M. 2004. Effects of long-term cyclosporin therapy on the periodontium of rats. *Journal of periodontal research*, 39, 257-262.
- SUDA, T., TAKAHASHI, N., UDAGAWA, N., JIMI, E., GILLESPIE, M. T. & MARTIN, T. J. 1999. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev*, 20, 345-57.
- SUEDA, T., BANG, J. & CIMASONI, G. 1969. Collection of gingival fluid for quantitative analysis. *Journal of dental research*, 48, 159.
- SUNYER, T., ROTHE, L., JIANG, X., OSDOBY, P. & COLLIN-OSDOBY, P. 1996. Proinflammatory agents, IL-8 and IL-10, upregulate inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in avian osteoclast-like cells. *J Cell Biochem*, 60, 469-83.
- TAKAYANAGI, H. 2007. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol*, 7, 292-304.
- TAKAYANAGI, H., KIM, S., MATSUO, K., SUZUKI, H., SUZUKI, T., SATO, K., YOKOCHI, T., ODA, H., NAKAMURA, K., IDA, N., WAGNER, E. F. & TANIGUCHI, T. 2002. RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon-beta. *Nature*, 416, 744-9.
- TAKAYANAGI, H., OGASAWARA, K., HIDA, S., CHIBA, T., MURATA, S., SATO, K., TAKAOKA, A., YOKOCHI, T., ODA, H., TANAKA, K., NAKAMURA, K. & TANIGUCHI, T. 2000. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature*, 408, 600-5.
- TANG, T. H., FITZSIMMONS, T. R. & BARTOLD, P. M. 2009. Effect of smoking on concentrations of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and osteoprotegerin in human gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol*, 36, 713-8.
- TAUBMAN, M. A., VALVERDE, P., HAN, X. & KAWAI, T. 2005. Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. *Journal of periodontology*, 76, 2033-2041.
- TEITELBAUM, S. L. & ROSS, F. P. 2003. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nature reviews. Genetics*, 4, 638-649.
- TENG, Y. T., NGUYEN, H., GAO, X., KONG, Y. Y., GORCZYNSKI, R. M., SINGH, B., ELLEN, R. P. & PENNINGER, J. M. 2000. Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *The Journal of clinical investigation*, 106, R59-67.
- TORALDO, G., ROGGIA, C., QIAN, W. P., PACIFICI, R. & WEITZMANN, M. N. 2003. IL-7 induces bone loss in vivo by induction of receptor activator of

BIBLIOGRAFIA

- nuclear factor kappa B ligand and tumor necrosis factor alpha from T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 125-30.
- UDAGAWA, N., TAKAHASHI, N., AKATSU, T., TANAKA, H., SASAKI, T., NISHIHARA, T., KOGA, T., MARTIN, T. J. & SUDA, T. 1990. Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 7260-7264.
- UDAGAWA, N., TAKAHASHI N FAU - YASUDA, H., YASUDA H FAU - MIZUNO, A., MIZUNO A FAU - ITOH, K., ITOH K FAU - UENO, Y., UENO Y FAU - SHINKI, T., SHINKI T FAU - GILLESPIE, M. T., GILLESPIE MT FAU - MARTIN, T. J., MARTIN TJ FAU - HIGASHIO, K., HIGASHIO K FAU - SUDA, T. & SUDA, T. 2000. Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function.
- UITTO, V. J. 2003. Gingival crevice fluid--an introduction. *Periodontology* 2000, 31, 9-11.
- VALAZZA, A., MATTER, J., OGILVIE, A. & CIMASONI, G. 1972. Gingival fluid, gingival inflammation, pocket depth and bone loss. *Schweizerische Monatsschrift fur Zahnheilkunde = Revue mensuelle suisse d'odontostomatologie / SSO*, 82, 824-832.
- VERNAL, R., CHAPARRO, A., GRAUMANN, R., PUENTE, J., VALENZUELA, M. A. & GAMONAL, J. 2004. Levels of cytokine receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in gingival crevicular fluid in untreated chronic periodontitis patients. *Journal of periodontology*, 75, 1586-1591.
- VERNAL, R., DUTZAN, N., HERNANDEZ, M., CHANDIA, S., PUENTE, J., LEON, R., GARCIA, L., DEL VALLE, I., SILVA, A. & GAMONAL, J. 2006. High expression levels of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand associated with human chronic periodontitis are mainly secreted by CD4+ T lymphocytes. *Journal of periodontology*, 77, 1772-1780.
- VERNAL, R., DIAZ-ZUÑOGA, J., MELGAR-RODRIGUEZ, S., PUJOL, M., SILVA, A., SANZ, M. & GARCIA-SANZ, J.A. 2014. Activation of RANKL-induced osteoclast and memory T lymphocytes by *Porphyromonas gingivalis* is serotype dependant. *Journal Clinical of Periodontology*, 41(5), 451-459.
- WADA, N., MAEDA, H., TANABE, K., TSUDA, E., YANO, K., NAKAMUTA, H. & AKAMINE, A. 2001. Periodontal ligament cells secrete the factor that inhibits osteoclastic differentiation and function: the factor is osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor. *Journal of periodontal research*, 36, 56-63.
- WALKER, D. G. 1975. Bone resorption restored in osteopetrotic mice by transplants of normal bone marrow and spleen cells. *Science*, 190, 784-5.
- WARA-ASWAPATI, N., SURARIT, R., CHAYASADOM, A., BOCH, J. A. & PITIPHAT, W. 2007. RANKL upregulation associated with periodontitis and *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of periodontology*, 78, 1062-1069.

BIBLIOGRAFIA

- WARE, C. B., HOROWITZ, M. C., RENSHAW, B. R., HUNT, J. S., LIGGITT, D., KOBLAR, S. A., GLINIAK, B. C., MCKENNA, H. J., PAPAYANNOPOULOU, T., THOMA, B. & Y cols. 1995. Targeted disruption of the low-affinity leukemia inhibitory factor receptor gene causes placental, skeletal, neural and metabolic defects and results in perinatal death. *Development*, 121, 1283-99.
- WEITZMANN, M. N., CENCI, S., RIFAS, L., BROWN, C. & PACIFICI, R. 2000. Interleukin-7 stimulates osteoclast formation by up-regulating the T-cell production of soluble osteoclastogenic cytokines. *Blood*, 96, 1873-8.
- WHYTE, M. 2006. Paget's disease of bone and genetic disorders of RANKL/OPG/RANK/NF-kappa signaling. *Ann NY Acad Sci*, 1068, 143-64-
- WONG, B. R., RHO, J., ARRON, J., ROBINSON, E., ORLINICK, J., CHAO, M., KALACHIKOV, S., CAYANI, E., BARTLETT, F. S., 3RD, FRANKEL, W. N., LEE, S. Y. & CHOI, Y. 1997. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *The Journal of biological chemistry*, 272, 25190-25194.
- WRIGHT, L. M., MALONEY, W., YU, X., KINDLE, L., COLLIN-OSDOBY, P. & OSDOBY, P. 2005. Stromal cell-derived factor-1 binding to its chemokine receptor CXCR4 on precursor cells promotes the chemotactic recruitment, development and survival of human osteoclasts. *Bone*, 36, 840-53.
- YANG, M., MAILHOT, G., MACKAY, C. A., MASON-SAVAS, A., AUBIN, J. & ODGREN, P. R. 2006. Chemokine and chemokine receptor expression during colony stimulating factor-1-induced osteoclast differentiation in the toothless osteopetrotic rat: a key role for CCL9 (MIP-1gamma) in osteoclastogenesis in vivo and in vitro. *Blood*, 107, 2262-70.
- YASUDA, H., SHIMA, N., NAKAGAWA, N., MOCHIZUKI, S. I., YANO, K., FUJISE, N., SATO, Y., GOTO, M., YAMAGUCHI, K., KURIYAMA, M., KANNO, T., MURAKAMI, A., TSUDA, E., MORINAGA, T. & HIGASHIO, K. 1998b. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology*, 139, 1329-1337.
- YASUDA, H., SHIMA, N., NAKAGAWA, N., YAMAGUCHI, K., KINOSAKI, M., MOCHIZUKI, S., TOMOYASU, A., YANO, K., GOTO, M., MURAKAMI, A., TSUDA, E., MORINAGA, T., HIGASHIO, K., UDAGAWA, N., TAKAHASHI, N. & SUDA, T. 1998a. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 3597-3602.
- YOU, T., LEE, K. H., LEE, S. H., & PARK, W. 2015. Denosumab-related osteonecrosis of the jaw: a case report and management based on pharmacokinetics. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*, 120(5), 548-