



Universidad
Nacional
de Córdoba



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

ESCUELA DE POSGRADO

**“NIVELES DE RANKL Y OPG EN FLUIDO CREVICULAR DE
PACIENTES MUJERES CON OSTEOPOROSIS/OSTEOPENIA
POST-MENOPÁUSICA Y ENFERMEDAD PERIODONTAL”**

TESISTA:

OD. MARÍA EUGENIA VERDE

DIRECTOR:

PROF. DRA. MIRIAM GRENON

CÓRDOBA, 2014



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-
NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).



Universidad Nacional de Córdoba



Facultad de Odontología

Escuela de Posgrado

**TRABAJO DE TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO
DE DOCTOR EN ODONTOLOGÍA**

“Niveles de RANKL y OPG en fluido crevicular de pacientes mujeres con osteoporosis/osteopenia post-menopáusica y enfermedad periodontal”.

Tesista: Od. María Eugenia Verde

Director: Miriam Grenón

Córdoba, 2014

Argentina

Director de Tesis

Prof. Dra. Miriam Grenón

Asesor Científico

Prof. Dra. Adriana Gruppi

Comisión de Tesis

Prof. Dra. Raquel Vivian Gallará

Prof. Dra. María Cristina Pistoresi

Evaluador Externo

Prof. Dr. Facundo Caride

*“Lo que sabemos es una gota, lo que
ignoramos es un inmenso océano”.*

Newton

**El presente trabajo de tesis fue realizado con el apoyo financiero
de la Secyt-UNC mediante una beca de Doctorado tipo I y II.**

Las conclusiones de este trabajo de Tesis de Doctorado vuelven a actualizar la afirmación de Terence: “*No hay trabajo científico que no se pueda resolver con investigación*”, aspirando por cierto a que los resultados obtenidos por la estoica colaboración “tisular” de las pacientes de mi casuística puedan ser utilizados, obviamente ampliados y llevados a las prácticas diagnósticas y terapéuticas de aplicación directa que posibiliten dar más **CALIDAD DE VIDA A LA VIDA HUMANA.**

Por todo ello.

Muchas gracias.

Agradecimientos

A mis Maestros y Profesores

Miriam Grenón

Adriana Gruppi

Daniela Bermejo

Raquel Vivian Gallará

María Cristina Pistoresi

Mónica Ñanez de Lucino

A mis maestros que en este andar por la vida, influyeron con sus lecciones y experiencias en formarme como una persona de bien y preparada para los retos que pone la vida, a todos y cada uno de ellos les dedico cada una de estas páginas de mi Tesis.

A mis padres

Marta Ester Issaly

Ernesto Andrés Verde

Con todo mi cariño y mi amor para las personas que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento.

A mi esposo

Guillermo Zuliani

**A tu paciencia y comprensión, preferiste sacrificar tu tiempo para que yo pudiera perseguir mis sueños.
Por tu bondad y sacrificio me inspiraste a ser mejor, ahora puedo decir que esta tesis lleva mucho de ti, gracias por estar siempre a mi lado.**

CERTIFICADO DE COMITÉ DE BIOÉTICA

UNC - FCM
HOSPITAL UNIVERSITARIO DE MATERNIDAD Y NEONATOLOGÍA
CIEIS

Córdoba, 09 de Mayo de 2012

VISTO el Protocolo del trabajo de investigación "Efecto del Consumo de Bisfosfonatos en los Niveles del Ligando del Receptor Activador del Factor Nuclear Kappa-B (RANKL) y Osteoprotegerina (OPG) En Fluido Crevicular de Pacientes Post-Menopáusicas con Enfermedad Periodontal", presentado por la Dra. Verde ante el Comité de Ética en Investigación Clínica de este Hospital, el mismo decide su aprobación.

Se determina que se deberá informar el ingreso de los pacientes para realizar el seguimiento, y que cualquier modificación tanto en el protocolo como en el consentimiento informado deberá ser informada al Comité para su evaluación debiendo estar disponible el listado de las historias clínicas de los pacientes intervinientes en el estudio así como el número de teléfono o dirección para verificaciones ulteriores.

Se comunica a la Dirección del Hospital la Aprobación de este Protocolo para ser elevado ante la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Facultad de Ciencias Médicas (Secyt).

A su vez se informa que este protocolo fue enviado al Consejo de Evaluación Ética de la Investigación en Salud del Ministerio de Salud de la Provincia de Córdoba (COEIS)

[Handwritten signatures and initials]
Dr. P. Basso
P. Basso
P. Basso
P. Basso
P. Basso
P. Basso

[Handwritten signature]
Dra. GLADYS T. TROMBOTTO
GENÉTICA MÉDICA
M.R.11.097 - M.E.11.281

Coordinadora y Miembros del CIEIS
H.U.M.N.

Abreviaturas.....	9
Resumen.....	11
Abstract.....	13
Marco teórico / Introducción.....	15
1. <i>Sistema óseo</i>	
1.1 <i>Tejido óseo</i>	
1.2 <i>Componente celular del tejido óseo</i>	
1.3 <i>Remodelado óseo</i>	
2. <i>Osteoinmunología</i>	
3. <i>Sistema RANK-RANKL-OPG</i>	
3.1 <i>RANK</i>	
3.2 <i>RANKL</i>	
3.3 <i>OPG</i>	
4. <i>Osteoporosis post-menopáusica</i>	
4.1 <i>Osteoporosis postmenopáusica: concepto y patogenia</i>	
4.2 <i>Criterios de clasificación dela osteoporosis</i>	
4.3 <i>Medición de masa ósea</i>	
4.4 <i>Sistema RANK-RANKL-OPG y osteoporosis/osteopenia</i>	
<i>post-menopáusica</i>	
4.5 <i>Osteoporosis y bifosfonatos</i>	
5. <i>Enfermedad periodontal</i>	
5.1 <i>De la salud a la enfermedad periodontal</i>	
5.2 <i>Sistema RANK-RANKL-OPG y enfermedad periodontal</i>	
5.3 <i>Enfermedad periodontal y Bifosfonatos</i>	
6. <i>Osteoporosis/ osteopenia post-menopáusica y enfermedad</i>	
<i>periodontal</i>	
Objetivos.....	61
Materiales y métodos.....	62
7. <i>Selección de pacientes</i>	
7.1 <i>Criterios de inclusión</i>	
7.2 <i>Criterios de exclusión</i>	
8. <i>Diagnóstico de la patología ósea sistémica</i>	
9. <i>Diagnóstico periodontal</i>	
10. <i>Toma de muestras</i>	

11.	<i>Recolección de fluido gingival</i>	
12.	<i>Cuantificación de OPG y RANKL</i>	
13.	<i>Análisis estadístico</i>	
	Resultados	77
	Discusión.....	92
	Importancia de los resultados.....	99
	Conclusiones.....	103
	Bibliografía.....	105

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

BMP-2: Proteína morfogénica ósea 2

CPITN: Índice de Necesidades de Tratamiento Periodontal de la Comunidad

CT: Con tratamiento

DEXA: Absorciometría de Rayos X de Energía Dual

DMO: Densidad mineral ósea

FDA: Administración de Drogas y Alimentos

FG: fluido gingival

FGF: factor de crecimiento fibroblástico

IFN- γ : Interferón gamma

IL-1: Interleuquina-1

IL-6: Interleuquina-6

IL-11: Interleuquina-11

IL-17: Interleuquina-17

IL-13: Interleuquina-13

M-CSF: Factor estimulador de colonias de macrófagos

NIC: Nivel de inserción clínica

OCIF: Factor inhibidor de la osteoclastogénesis

ODAR: Receptor de diferenciación y activación de osteoclastos

ODF: Factor de diferenciación de osteoclastos

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPG: Osteoprotegerina

OPGL: Ligando de Osteoprotegerina

OSM: Oncostatin M

PGE2: Prostaglandina E2

PS: Profundidad de sondaje

PTH: Parathormona

RH: Registro de hemorragia

RPB: Registro de placa bacteriana

RANK: Receptor activador del factor nuclear kappa-B

RANKL: Ligando del Receptor activador del factor nuclear kappa-B

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa

ST: Sin tratamiento

TACE: enzima de conversión TNF-alfa

TGF- β 1: Factor de crecimiento transformante β 1

TGK- β : Factor de crecimiento inducido en los osteoblastos por los estrógenos

TMB: Tetrametilbenzidina

TNF: Factor de necrosis tumoral

TNFR: Receptor de Factor de necrosis tumoral

TNFRSF11: ligando de la superfamilia del factor de necrosis tumoral, miembro 11

TNFRSF11A: ligando de la superfamilia del factor de necrosis tumoral, miembro 11 A

TNFRSF11B: ligando de la superfamilia del factor de necrosis tumoral, miembro 11 B

TNFSF11: ligando de la superfamilia del factor de necrosis tumoral, miembro 11

TRAF6: Factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral

TRANCE: Factor de necrosis tumoral relacionado a la activación inducida por citoquinas

TRANCE-R: Receptor Factor de necrosis tumoral relacionado a la activación inducida por citoquinas

URO: Unidad de remodelado óseo

WHI: Iniciativa de Salud de la Mujer

La enfermedad periodontal es una afección inflamatoria de causa multifactorial donde el factor de riesgo ambiental más significativo lo constituyen las bacterias que residen en el biofilm. Sin embargo, en la manifestación y la progresión de dicha enfermedad periodontal influyen una amplia variedad de determinantes y factores de riesgo. Entre ellos la osteoporosis / osteopenia y la deficiencia de estrógeno.

El estudio del sistema RANK-RANKL-OPG ha favorecido la comprensión de los mecanismos intervinientes en el proceso de remodelación ósea y especialmente en la osteoporosis posmenopáusica y la enfermedad periodontal.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio transversal fue investigar los niveles de RANKL y OPG, así como su relación en fluido gingival de pacientes mujeres post-menopáusicas que padecen simultáneamente osteoporosis/osteopenia y periodontitis crónica y evaluar el efecto que ejerce el consumo de bifosfonatos en la patología periodontal.

Se estudiaron 81 sitios periodontalmente activos procedentes de 31 pacientes mujeres post-menopáusicas con edades comprendidas entre 45-70 años de edad con periodontitis crónica. Las muestras de fluido gingival se recogieron mediante tiras de papel y el test de ELISA fue realizado para determinar la concentración total de RANKL y OPG y posteriormente obtener los valores de la relación RANKL/OPG. Se analizaron: 66 muestras de fluido gingival de sitios periodontalmente activos obtenidas de 17 pacientes con osteopenia/osteoporosis y 15 muestras de fluido gingival de sitios periodontalmente activos obtenidas a partir de 14 pacientes controles con condición ósea normal.

Los análisis estadísticos fueron computarizados y analizados con el programa **GraphPad Software**. Para determinar si los datos correspondían a una distribución normal se utilizó el *Test D'Agostino-Pearson*. Los valores obtenidos de las citoquinas (RANKL y OPG) y su relación (RANKL/OPG) fueron comparados usando *t Test Mann-Whitney U*. También se realizó el *Análisis de correlación de Spearman* y el estadístico de *Regresión lineal* para determinar si existía alguna relación entre las variables analizadas. Se consideró como valor estadísticamente significativo $p \leq 0.05$.

Los resultados obtenidos demostraron que los niveles de RANKL y la relación RANKL/OPG fueron superiores en el grupo de estudio

(osteopenia/osteoporosis) respecto del grupo control, contrariamente a lo sucedido con los niveles de OPG.

Por otro lado, se concluyó que el consumo de bifosfonatos no afecta los niveles de concentración de RANKL, OPG y su relación RANKL/OPG. Y se demostró que la profundidad de sondaje (PS), registro de hemorragia (RH), registro de placa bacteriana (RPB) y la edad no se correlacionaron con los niveles de las citoquinas estudiadas. Mientras que los niveles de RANKL y los valores de la relación RANKL/OPG se correlacionaron positivamente con el nivel de inserción clínica (NIC).

Los resultados de este trabajo de tesis sugieren una correlación entre la pérdida de masa ósea sistémica y la pérdida de hueso alveolar. De manera tal que la osteoporosis/osteopenia postmenopáusica podría ser considerada como un indicador de riesgo de progresión de la enfermedad periodontal.

Palabras claves: *enfermedad periodontal, osteoprotegerina, Ligando del Receptor Activador del Factor Nuclear Kappa-B, bifosfonatos, fluido gingival.*

Periodontal disease is an inflammatory condition of multifactorial causes where the most significant environmental risk factor is bacteria residing in the biofilm. However, in the manifestation and progression of periodontal disease influence a wide variety of determinants and risk factors. Among them are osteoporosis / osteopenia and estrogen deficiency.

The study of the RANK-RANKL-OPG system has led to the understanding of the mechanisms involved in the bone remodeling process and especially in postmenopausal osteoporosis and periodontal disease.

Therefore, the aim of this cross-sectional study was to investigate RANKL and OPG levels and their ratio in gingival fluid of post-menopausal patients women suffering simultaneously osteoporosis/osteopenia, chronic periodontitis and evaluate the effect that consumption bisphosphonates in periodontal disease.

81 active periodontal sites from 31 postmenopausal patients aged 45-70 with chronic periodontitis women were studied. Samples of gingival fluid were collected with paper strips, and ELISA test was conducted to determine the total concentration of RANKL, OPG, and then to obtain the values of the RANKL/OPG ratio. It was analyzed 66 samples of gingival fluid obtained from periodontally active sites of 17 patients with osteopenia/osteoporosis and 15 gingival fluid samples obtained from periodontally active sites of 14 control patients with normal bone condition.

Statistical analyses were computed and analyzed using **GraphPad Software**. To determine if the data correspond to a normal distribution, the *D'Agostino-Pearson Test* was used. The values of cytokines (RANKL and OPG) and its ratio (RANKL/OPG) were compared using *Mann-Whitney U t Test*. It was also performed the *Analysis Spearman correlation* and *Linear Regression* statistic to determine whether there was any relationship between the variables analyzed. It was considered as statistically significant *p value* ≤ 0.05 .

The results showed that the levels of RANKL and RANKL/OPG ratio were higher in the study group (osteopenia/osteoporosis) compared to the control group, contrary to what happened with OPG levels.

Furthermore, it was found that the consumption of bisphosphonates did not affect the concentration levels of RANKL, OPG and ratio RANKL/OPG. And it was shown that probing pocket depths (PPD) bleeding index (BI), plaque

index (PI) and age did not correlate with the levels of the studied cytokines, while levels of RANKL and values of the RANKL/OPG ratio was positively correlated with clinical attachment loss (CAL).

The results of this thesis may suggest a correlation between systemic bone loss and loss of alveolar bone. Such that postmenopausal osteoporosis/osteopenia could be considered as an indicator of risk for progression of periodontal disease.

Keywords: *periodontal disease, Osteoprotegerin, Receptor Activator of Nuclear Factor-Kappa B Ligand, bisphosphonates, gingival crevicular fluid.*

“Si no conozco una cosa, la investigaré.”

Louis Pasteur

1. Sistema óseo

1.1 Tejido óseo

El sistema óseo juega un papel muy importante en el organismo tanto a nivel biomecánico como metabólico. Está formado por huesos y por tejido conectivo que permite la unión de estos.

El tejido óseo es un tejido conjuntivo especializado que se caracteriza por su rigidez y su resistencia tanto a la tracción, como a la compresión. Está formado por una matriz extracelular mineralizada (matriz ósea) y células.

La matriz extracelular ósea está constituida por dos componentes químicos principales: matriz orgánica y sales minerales. El componente proteico más abundante en la matriz es el colágeno tipo I con funciones estructurales y que representa un 90 %, mientras que el otro 10% está integrado por proteínas no estructurales como: osteocalcina, osteonectina, sialoproteínas, factores de crecimiento y proteínas séricas. El componente inorgánico fundamental son los cristales de hidroxapatita que se disponen sobre las fibras colágenas y entre ellas. Las propiedades biomecánicas del hueso derivan de la composición y la estructura de la matriz ósea. Así, las fibras colágenas proporcionan flexibilidad y resistencia a la tracción, en tanto que el componente mineral aporta dureza, rigidez y resistencia a la compresión.

El componente celular del tejido óseo comprende cuatro tipos de células especializadas: osteoblastos, osteoclastos, osteocitos y células de superficie.

Respecto a su organización estructural, se reconocen dos tipos de hueso: cortical y trabecular. Cada hueso está conformado por uno o ambos tipos de estructura. El hueso cortical es un hueso denso o compacto, con gruesas capas de osteoide calcificado, que se ubica en la diáfisis de huesos largos y en los platillos vertebrales. En contraste, el hueso trabecular está compuesto de numerosas espículas óseas que atraviesan las cavidades medulares de los huesos planos y metafisis de huesos largos y abunda en los cuerpos vertebrales.

1.2 Componente celular del tejido óseo

Como se mencionó previamente, en el tejido óseo podemos encontrar cuatro tipos de células especializadas: osteoblastos, osteocitos, células de superficie y osteoclastos.

Los osteoblastos son células osteoformadoras diferenciadas que se caracterizan por una elevada actividad en la síntesis y secreción de componentes orgánicos de la matriz ósea; estas células expresan el Ligando del receptor activador del factor nuclear Kappa B (RANKL) y la Osteoprotegerina (OPG) siendo ambos factores claves en la modulación de la osteoclastogénesis, pero con papel antagónico: el RANKL induce la osteoclastogénesis, en tanto que la OPG la inhibe. Además, estas células producen el Factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), requerido para la supervivencia de las células de la línea macrófago-osteoclástica.

Cuando los osteoblastos quedan completamente rodeados de la matriz ósea mineralizada que ellos mismos han formado, quedan depositados en lagunas y es aquí donde maduran y se transforman en osteocitos. Los osteocitos están unidos entre ellos mediante prolongaciones citoplasmáticas por las que intercambian iones y moléculas pequeñas. Los osteocitos se consideran células mecano-sensoriales cuya principal función es transmitir señales entre las células para controlar el remodelado óseo.

Las células de superficie son osteoblastos aplanados inactivos encargados de secretar colagenasas que degradan la capa de colágeno, exponiendo la matriz ósea mineralizada a la acción de los osteoclastos.

Los osteoclastos son células multinucleadas procedentes de la fusión de células mononucleares tipo macrófago-monocito y son los encargados de la resorción ósea. La osteoclastogénesis se produce normalmente por la acción de RANKL y M-CSF, sobre las células precursoras mononucleares. Una vez activados, los osteoclastos se unen a la superficie de la matriz, se polarizan y modifican su estructura presentando unos pliegues en la superficie que está en contacto con la matriz. Por estos pliegues, los osteoclastos secretan iones de hidrógeno que acidifican la zona y disuelven el componente mineral, de manera que se produce la resorción ósea con la formación de una excavación profunda denominada laguna de resorción.

1.3 Remodelado óseo

El hueso es un tejido metabólicamente activo que sufre un continuo proceso de remodelado. Este proceso supone la renovación del 3-4 % del hueso cortical y entre un 25-30 % del trabecular al cabo de un año, lo que en conjunto conlleva la renovación total del esqueleto al cabo de diez años. El remodelado no sólo mantiene la masa ósea, sino que confiere al esqueleto su capacidad regenerativa y de adaptación funcional.

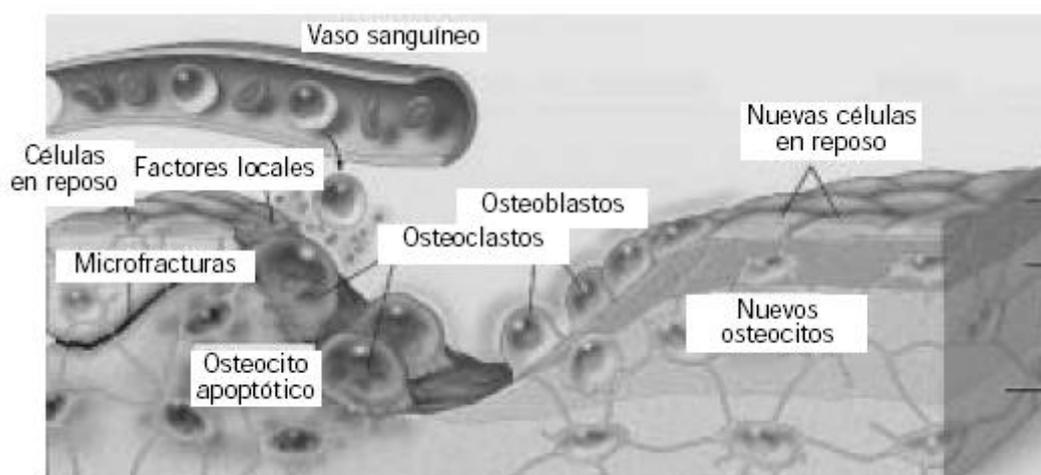


Fig. 1 Unidad de remodelamiento óseo. (Camozzi y cols., 2007).

La fisio-patología del remodelado óseo depende del acoplamiento y equilibrio entre dos grupos celulares antagónicos: los osteoblastos y los osteoclastos, ambos regulados por innumerables factores sistémicos y locales.

En los individuos jóvenes el remodelado mantiene la masa esquelética prácticamente invariable. El envejecimiento, la menopausia y distintas enfermedades alteran el balance del remodelado hacia un predominio de la resorción sobre la formación, lo que ocasiona una pérdida ósea y como consecuencia, osteoporosis. El hueso trabecular es más sensible a las alteraciones del balance óseo debido a su mayor superficie.

El proceso de remodelado tiene lugar en las unidades funcionales llamadas Unidades de remodelado óseo (URO), compuestas por osteoclastos, osteoblastos, osteocitos, tejido hematopoyético, células quiescentes o de superficie y células pluripotenciales. (Camozzi y cols., 2007) (Fig. 1). Este proceso se desarrolla de manera simultánea en múltiples unidades de

remodelado, lo que apoya su regulación por factores del microambiente óseo, como así también la influencia de factores hormonales, fuerzas mecánicas locales y cambios ocurridos en el hueso como consecuencia del envejecimiento o daños por fatiga (Manolagas y Jilka, 1995).

El remodelado óseo consta de cuatro fases sucesivas: activación, resorción, inversión y formación.

La fase de activación comienza con un estímulo como: microfracturas, la acción de citoquinas debido a la inflamación local, factores mecánicos específicos o bien por azar; lo que ocasiona que los osteocitos liberen mediadores de membrana que actúan activando las células del estroma pluripotenciales (Fig. 2 a).

En la fase de resorción, las células estromales activadas secretan M-CSF favoreciendo la diferenciación de células pluripotenciales a pre-osteoclastos y también pre-osteoblastos que expresan RANKL en su membrana. La unión de RANKL a su receptor (RANK), expresado en los pre-osteoclastos, activa el proceso de osteoclastogénesis (Boyle y cols., 2003). En respuesta a la activación del Receptor activador del factor nuclear kappa B (RANK) por su ligando específico (Muñoz-Torres y cols., 2004) el osteoclasto se polariza y sufre una serie de cambios en su estructura que lo preparan para el proceso de resorción, como el reordenamiento del citoesqueleto y la formación de una zona de sellado entre su membrana basal y la superficie de resorción. Los osteoclastos se encuentran en la superficie ósea sobre un lecho de células de superficie, que durante la resorción se retraen permitiendo la formación del borde rugoso del osteoclasto y la resorción de la zona expuesta. Los osteoclastos diferenciados liberan a la laguna de resorción distintas enzimas proteolíticas junto a hidrogeniones que favorecen la creación del pH ácido necesario para la activación de dichas enzimas. La acidificación del medio, además contribuye a la desmineralización de la matriz para su posterior degradación por las enzimas proteolíticas. La fase de resorción finaliza con la apoptosis osteoclástica (Fig. 2 b).

Una vez finalizada la resorción inicia la fase de inversión, donde los osteoclastos mueren por apoptosis y abandonan la laguna de resorción que será depurada de los restos de la resorción y se preparará la superficie para el anclaje osteoblástico a cargo de células de la estirpe monocito-macrófago, las cuales además liberarán señales de activación osteoblástica (Fig. 2 c).

En la fase de formación las células precursoras de osteoblastos son atraídas a la zona de resorción. Esta fase de formación integra a su vez dos

procesos: la síntesis de osteoide, tejido óseo nuevo sin mineralizar (Fig. 2 d), y la fase posterior de mineralización (Fig. 2 e).

Remodelado óseo

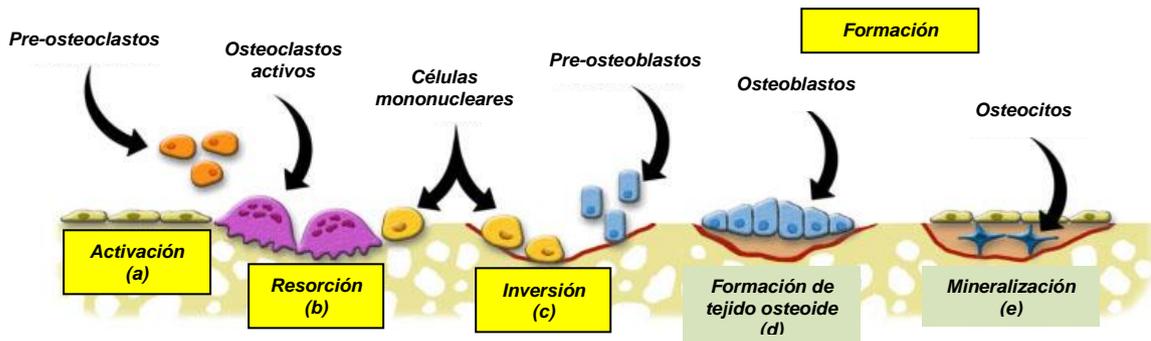


Fig. 2 Representación del remodelado óseo (Deal, 2009).

Se considera que tras completar este período la mitad de los osteoblastos mueren por apoptosis y los restantes se transforman en células de superficie que recubren el hueso recién formado o quedan incluidos en el tejido óseo transformándose en osteocitos. Los osteocitos conectan entre sí y con los osteoblastos y las células de superficie mediante una red de prolongaciones citoplasmáticas que forman un sistema canalicular.

Los procesos de apoptosis que afectan a las células óseas y que regulan su vida media son un importante determinante de la masa ósea y su resistencia. La disminución de la apoptosis de osteoclastos por déficit estrogénico tras la ovariectomía realizada en ratones produce una reducción de la masa ósea (Manolagas y Jilka, 1995).

El proceso de resorción llevado a cabo por los osteoclastos estimula la síntesis de hueso nuevo por los osteoblastos adyacentes. Este proceso se denomina acoplamiento y está regulado entre otras citoquinas por el sistema RANK-RANKL-OPG. La expresión coordinada de OPG y RANKL regula la resorción de manera tanto positiva como negativa controlando la activación de RANK en los osteoclastos (Udagawa y cols, 2000).

2. Osteoinmunología

La salud de nuestros huesos es consecuencia de los procesos de remodelado que en ellos se suceden a lo largo de toda la vida. El remodelado óseo se produce en unidades discretas en todo el esqueleto llamadas unidades multicelulares básicas (BMU) y consiste en un equilibrio dinámico entre la resorción ósea osteoclástica y la formación ósea osteoblástica (Vega y cols., 2007). Por lo tanto, un desequilibrio en el balance de estas unidades ocasionaría cambios en la estructura ósea.

El control de esta homeostasis está influenciado por una gran número de citoquinas, hormonas y factores de crecimiento, tanto en la puesta en escena de osteoblastos y osteoclastos, por diferenciación a partir de sus precursores inmaduros, como en cualquiera de las dos etapas del remodelado (Suda y cols., 1992; Manolagas y Jilka, 1995; Suda y cols., 1997; Roodman, 1996; Reddy y Roodman, 1998; Pacifici, 1996; Jilka, 1998).

El equilibrio entre la activación y la apoptosis de las células es la clave para mantener la masa ósea. La formación de hueso nuevo pasa por cinco estadios: la activación de los osteoclastos, la resorción ósea, la inhibición de los osteoclastos y la activación de los osteoblastos, y finalmente la formación de hueso (Trouvin y Goëb 2010).

La estructura ósea y el sistema inmune tienen moléculas reguladoras en común, como las citoquinas que actúan sobre los precursores inmaduros de osteoblastos y osteoclastos. Por lo tanto, los cambios en la fisiología y la patología de un sistema pueden afectar al otro (Takayanagi, 2005). En el caso de la enfermedad periodontal, por tratarse de una patología inmuno-inflamatoria, tanto la inflamación como la pérdida ósea se constituyen como sus marcadores.

En los últimos años se han realizado numerosas investigaciones para evaluar la relación entre la respuesta inmune y el metabolismo óseo en varias patologías óseas dando lugar a la denominada "osteoinmunología" (Takayanagi, 2005; Rauner y cols., 2007; Lorenzo y cols., 2008; Cochran, 2008). El estudio del sistema RANK-RANKL-OPG ha aumentado la comprensión de los mecanismos intervinientes en el proceso de remodelación ósea. Este sistema juega un papel central en los mecanismos fisiopatológicos de la osteoporosis posmenopáusica, la osteoporosis inducida por glucocorticoides, la artritis reumatoidea, los procesos osteolíticos involucrados

en el mieloma múltiple y el carcinoma de mama metastático, en raras enfermedades hereditarias del hueso y en el desarrollo de la aterosclerosis (Vega y cols., 2007). En diversos estudios, múltiples factores como hormonas, citoquinas y drogas se han descrito como intervinientes en el eje RANK-RANKL-OPG (Hofbauer y cols., 1999; Boabaid y cols., 2004); algunas de estas investigaciones se enfocaron en la enfermedad periodontal (Choi y cols., 2005; Liang y cols., 2008)

Desde el punto de vista periodontal, este nuevo campo de investigación intenta comprender los mecanismos patogénicos de la enfermedad periodontal, que aún permanece en discusión.

3. Sistema RANKL-RANK-OPG

El sistema de citoquinas identificado como nuevos miembros de la superfamilia del factor de necrosis tumoral -TNF- (denominado así por su actividad biológica, la necrosis de ciertos tumores) y receptor de TNF (TNFR), han sido propuestos como esenciales para la biología osteoclástica, ya que se identificaron como participantes claves en la regulación fisiológica y patológica del sistema óseo. Estas citoquinas se denominan osteoprotegerina (OPG), receptor activador del factor nuclear kappa-B (RANK) y el ligando de RANK (RANKL).

RANKL, su receptor RANK, y el receptor señuelo, OPG, son tres moléculas claves que regulan el reclutamiento y la función de los osteoclastos (Boyle y cols., 2003) (Fig. 3). La unión de RANKL a su receptor RANK proporciona la señal fundamental para impulsar el desarrollo de osteoclastos a partir de células progenitoras hematopoyéticas, como así también para activar los osteoclastos maduros. La OPG regula negativamente mediante la unión al RANKL, por lo tanto actúa inhibiendo la resorción ósea, impidiendo tanto la diferenciación celular como la función de los osteoclastos (Boyle y cols., 2003 y Wada y cols., 2006). El reclutamiento de osteoclastos depende del balance entre RANKL y su receptor OPG (Suda y cols., 1999). La ablación genética de RANKL en ratones conduce a osteopetrosis (Simonet y cols., 1997; Kong y cols., 1999 (B)), mientras que la supresión genética de OPG en ratones resulta en un alto recambio óseo y una osteoporosis severa (Bucay y cols., 1998; Mizuno y cols., 1998; Udagawa y cols., 2000).

Los factores que regulan RANKL y OPG incluyen hormonas esteroideas (glucocorticoides, 1,25 dihidroxivitamina D3 y 17β-estradiol), hormonas peptídicas (hormona paratiroidea y péptido intestinal vasoactivo), factores de crecimiento (TGFβ1, BMP-2, FGF básico y activina A), citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-11, TNFα, TNFβ y PGE2) y factores de transcripción involucrados en la diferenciación terminal de osteoblastos (cbfa-1), adipocitos (receptor activador proliferador de peroxisomas) y condrocitos (Indian hedgehog) (Hofbauer y Heufelder, 2001). Durante la respuesta inflamatoria, las citoquinas proinflamatorias, tales como IL-1β, -6, -11, y -17 y TNF-α, pueden inducir la osteoclastogénesis mediante un aumento de la expresión de RANKL mientras disminuye la producción de OPG en los osteoblastos (Nakashima y cols., 2002). Por el contrario, mediadores tales

como IL-13 y IFN- γ , pueden disminuir la expresión de RANKL y / o aumentar la expresión de OPG inhibiendo la osteoclastogénesis (Nakashima y cols., 2002).

Se ha establecido que la osteoclastogénesis requiere la activación de los osteoclastos a partir del factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) y RANKL. Ambos necesarios para activar la transcripción de genes permitiendo la diferenciación de osteoclastos (Lacey y cols., 1998). M-CSF y RANKL tienen actividades complementarias entre sí. M-CSF aumenta la cantidad y supervivencia de los pre-osteoclastos e induce la expresión de RANK en su membrana; mientras que RANKL se une a su receptor RANK, expresado en los pre-osteoclastos y osteoclastos maduros, aumentando la diferenciación, promoviendo la activación e inhibiendo la apoptosis de las células osteoclásticas (Kong y cols., 1999 (A)).

La regulación del sistema RANKL-OPG puede determinar salud o enfermedad, como ha sido demostrado en un número de enfermedades óseas destructivas como la artritis reumatoidea y enfermedad periodontal (Kong y cols., 1999 (C); Horwood y cols., 1999; Teng y cols., 2000; Sakurai y cols., 2003; Firestein, 2003; Crotti y cols., 2003; Liu y cols., 2003; Mogi y cols., 2004; Valverde y cols., 2004; Vernal y cols., 2004; Vernal y cols., 2005; Taubman y cols., 2005; Kawai y cols., 2006; Lu y cols., 2006; Wara-aswapati, 2007; Bostanci y cols., 2007(A); Bostanci y cols., 2007(B)). En ciertas condiciones óseas inflamatorias el balance entre resorción y formación ósea se encuentra alterado; como en lo ocurrido en la osteoporosis y enfermedad periodontal producido por una resorción ósea excesiva (Lerner, 2006 (A); Lerner, 2006 (B)).

La excesiva formación ósea puede ser atribuido a una abundancia de OPG o una reducción de la expresión de RANKL, determinando una disminución en la relación RANKL/OPG. A la inversa, una disminución relativa de las concentraciones de OPG o bien un incremento en la expresión de RANKL puede determinar un aumento en la relación RANKL/OPG favoreciendo el proceso de resorción ósea (Fig. 4).

De acuerdo con Hofbauer, los agentes osteotrópicos modulan la formación osteoclástica a partir de la regulación del cociente entre RANKL/OPG en lugar de aumentar o disminuir las citoquinas RANKL y/o OPG por sí solas (Hofbauer, 2001). El incremento en el cociente RANKL/OPG es una condición que favorecería la formación osteoclástica y viceversa.

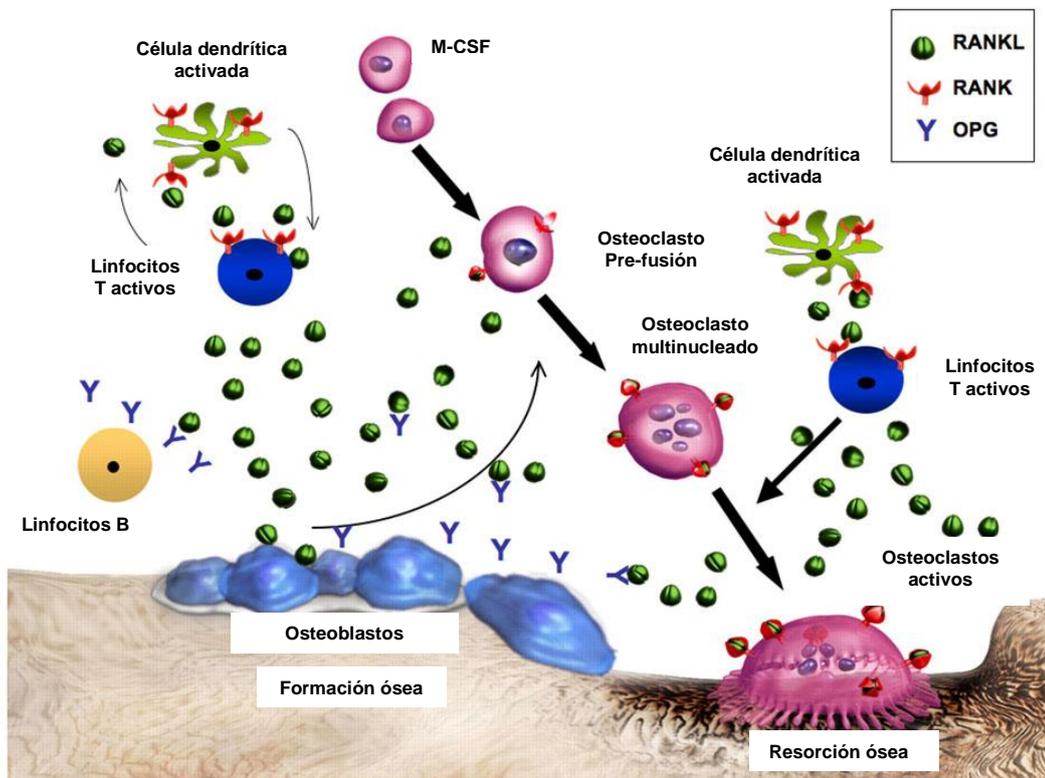


Fig 3. Diferenciación y activación de los osteoclastos (Boyle y cols, 2003).

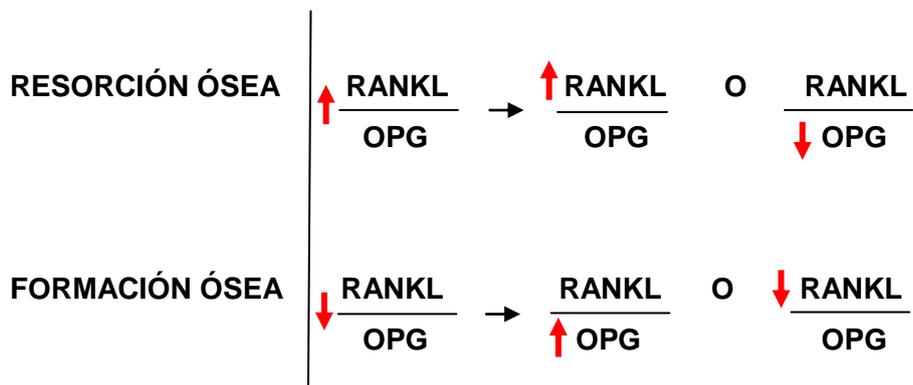


Fig. 4. La resorción o la formación ósea depende de la relación RANKL/OPG, que es una función de la expresión relativa de los niveles de RANKL y OPG.

3.1 RANK

Es el receptor celular específico que transduce la acción de RANKL. El receptor RANK (Receptor Activador de NF- κ B) también denominado TRANCE-R (Receptor de TRANCE), ODAR (Receptor de diferenciación y activación de osteoclastos) y ligando de la superfamilia del factor de necrosis tumoral, miembro 11 A (TNFRSF11A), es codificado por un gen del cromosoma 18q22.1 (Anderson y cols., 1997) y cuyo ARNm se expresa en osteoclastos maduros y en sus progenitores aislados de médula ósea (Fuller y cols., 1998). Es un péptido de 616 aminoácidos que se encuentra principalmente en células de la estirpe monocítica-macrófaga, preosteoclastos, células T y B, células dendríticas y fibroblastos (Anderson y cols., 1997; Lum y cols., 1999). Su activación conlleva no sólo una reorganización en el citoesqueleto del osteoclasto y cambios fundamentales para su activación, movilidad y establecimiento en la superficie ósea a resorber (Burgess y cols., 1999), sino que desencadena una señal de supervivencia en el osteoclasto maduro (Wong y cols., 1999).

3.2 RANKL

El ligando del Receptor activador del factor nuclear Kappa B (RANKL), también denominado TRANCE (citoquina inductora de activación relacionada a TNF), OPGL (ligando de OPG), ODF (factor de diferenciación de osteoclastos) y ligando de la superfamilia del factor de necrosis tumoral, miembro 11 (TNFSF11); se presenta de 3 formas diferentes: como péptido unido a membrana de 317 aminoácidos, como un ectodominio truncado formado a partir de la forma unida a membrana por acción enzimática de TACE en las posiciones 140 y 145, y en forma libre o soluble o secretada (Nakashima y cols. 2002; Hofbauer y Heufelder, 2001). La forma unida a membrana es la más común y se expresa en distintos tipos celulares esqueléticos y extraesqueléticos tales como: células estromales, osteoblastos, osteoclastos, células periostales mesenquimáticas, condrocitos y células endoteliales (Hofbauer y Heufelder, 2001; Blaque y James, 2003). La forma secretada primaria es limitada a células T (Takahashi y cols., 1999) y a las células B (Lacey y cols., 1998; Yasuda y cols., 1998; Burgess y cols., 1999; Kwon y cols., 1999; Takahashi y cols 1999; Hofbauer y Heufelder, 2001; Han y cols., 2006; Kawai y cols., 2006; Li y cols., 2007; Han y cols., 2009). Las formas que

se presentan solubles son más potentes en favorecer la osteoclastogénesis (Mizuno y cols. 2002).

En presencia de niveles adecuados de factor estimulante de colonias de macrófago (M-CSF), RANKL es necesario y suficiente para promover la diferenciación, fusión, adhesión a la superficie ósea, activación y supervivencia de osteoclastos (Anderson y cols., 1997; Hofbauer y Heufelder, 2001; Blaque y James, 2003).

3.3 OPG

La osteoprotegerina, también denominada OCIF (Factor inhibidor de la osteoclastogénesis) y ligando de la superfamilia del factor de necrosis tumoral, miembro 11 B (TNFRSF11B), ha revelado un mecanismo regulador clave en la diferenciación y actividad de los osteoclastos (Lacey y cols., 1998; Yasuda y cols., 1998; Burgess y cols., 1999; Kwon y cols., 1999; Takahashi y cols., 1999; Hofbauer y Heufelder, 2001; Blaque y James, 2003). Es un receptor TNF secretado, sin dominio transmembrana, que contiene 401 aminoácidos, con un péptido señal de 21 aminoácidos requeridos para la homodimerización y 4 pseudorepeticiones ricas en cisteína. Es expresada abundantemente por muchos tejidos y tipos celulares, y actúa como un receptor bloqueador de RANKL y del ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF (TRAIL), otro miembro de la superfamilia de ligandos TNF. Los efectos de OPG son opuestos a los de RANKL, e incluyen: Inhibición de la diferenciación, supervivencia y fusión de los precursores osteoclasticos, supresión de la activación de los osteoclastos y promoción de la apoptosis de los osteoclastos (Hofbauer y Heufelder, 2001).

El ARNm de la OPG se expresa en numerosos tejidos humanos (pulmón, corazón, riñones, hígado, intestino, estómago, cerebro, glándula tiroidea y médula espinal) además de en el hueso (Simonet y cols., 1997; Yasuda y cols., 1998), en el cual su principal función parece ser la inhibición de la maduración de los osteoclastos y de su activación, tanto *in vivo* como *in vitro* (Lacey y cols., 1998). Además se expresa en fibroblastos gingivales, células del ligamento periodontal, células de la pulpa dental y células endoteliales (Sakata y cols., 1999; Kobayashi-Sakamoto y cols., 2004; Nagasawa y cols., 2002).

Se ha comprobado que los osteoblastos maduros producen cantidades importantes de OPG, que bloquearía el transcurso de la osteoclastogénesis e

impediría la formación de osteoclastos, auténticos destructores de hueso, mientras que los osteoblastos inmaduros mediante descensos en la expresión de OPG e incrementos en de RANKL (Nagai y Sato, 1999) son capaces de reclutar a los osteoclastos que eliminarán el tejido óseo viejo en su lugar de acción.

4. Osteoporosis postmenopáusica

4.1 Osteoporosis postmenopáusica: concepto y patogenia

Menopausia literalmente significa "cese permanente de la menstruación", se debe a la pérdida de la función folicular ovárica y el diagnóstico se hace en forma retrospectiva después de un período de amenorrea de 12 meses. La menopausia llega con el período menstrual final (PMF) que sólo se reconoce con certeza retrospectivamente al cabo de un año o más. La edad de presentación de la menopausia espontánea se sitúa entre los 45 y 55 años, con una media en torno a los 50-51 años. El término perimenopausia debe incluir el período que precede inmediatamente a la menopausia y el primer año siguiente, mientras que la transición menopáusica corresponde al período que precede al PMF cuando suele aumentar la variabilidad del ciclo menstrual (OMS, 1994) (Fig. 5).

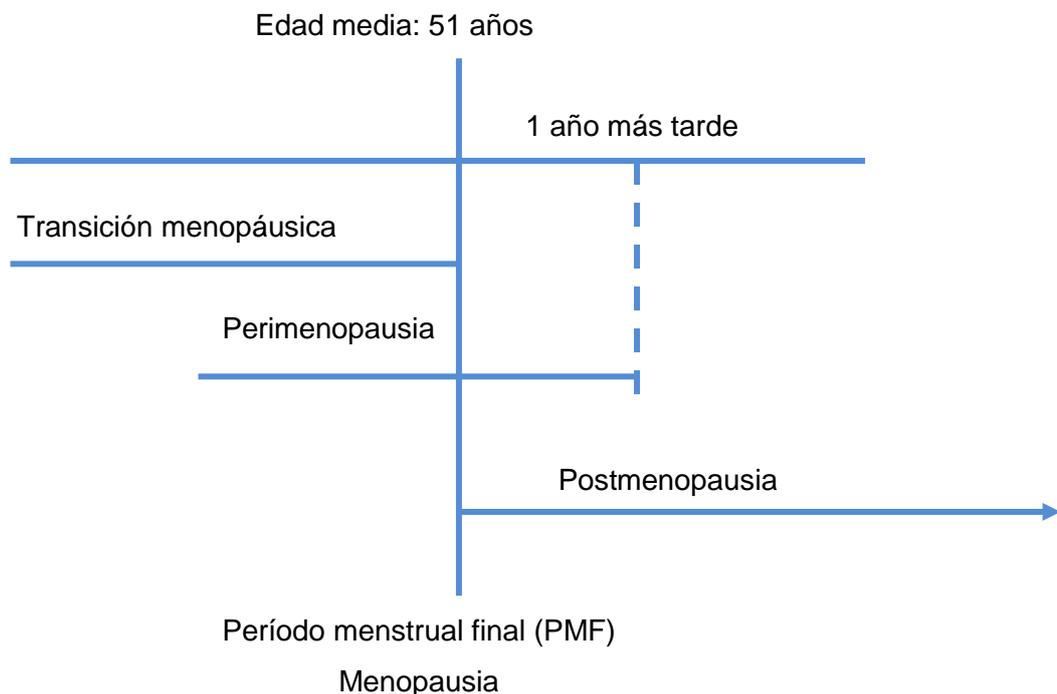


Fig. 5 Relación entre los distintos períodos de tiempo que rodean la menopausia. (OMS, 1994).

La postmenopausia se refiere al período que comienza a partir de la menopausia, sin embargo este momento no se puede determinar hasta que se hayan observado doce meses de amenorrea espontánea (OMS, 1994).

En la mujer, dos enfermedades se relacionan estrechamente con los cambios fisiológicos que se producen durante el climaterio, menopausia y postmenopausia: la osteoporosis y la enfermedad cardiovascular; y constituyen las principales causas de morbimortalidad en las mujeres después de la menopausia. Después de la enfermedad cardiovascular, la osteoporosis es el problema más significativo relacionado con la deficiencia de estrógenos.

La osteoporosis es una enfermedad crónica asintomática cuyo progreso permanece subclínico por décadas hasta que se producen fracturas en etapas avanzadas, de manera que las pacientes son diagnosticadas tardíamente para recibir una terapéutica efectiva. Es una enfermedad esquelética sistémica caracterizada por una baja densidad ósea y deterioro de la microarquitectura del tejido óseo, con el consiguiente aumento de la fragilidad del hueso (Consensus development conference: Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis, 1991). Esta patología es, principalmente, un resultado de la naturaleza dinámica del reemplazo óseo. La matriz y el mineral que otorgan al hueso su fuerza y elasticidad no son estáticos. En el interior del hueso, hay un ciclo constante, que comprende dos tipos de células diferentes, una que produce mineral nuevo, y otra que remueve el mineral viejo. Este ciclo de cambio es constante y crucial para la salud ósea. Si los huesos no pudieran remodelarse, no podrían repararse cuando accidentalmente aconteciera una fractura.

Durante los primeros veinte años de nuestra vida, aproximadamente, el equilibrio se inclina a favor de las células formadoras de hueso u osteoblastos. Pero la masa ósea alcanza un pico en la edad adulta temprana. Luego, el equilibrio comienza a inclinarse a favor de las células encargadas de remover hueso, osteoclastos, y comienza una pérdida gradual de mineral óseo, que continúa por el resto de nuestras vidas. La pérdida de masa ósea ocurre más tempranamente en las mujeres que en los varones y experimenta una aceleración al cesar la producción estrogénica. Inicialmente el ritmo de pérdida aumenta en la perimenopausia y en los primeros años después de la menopausia, para posteriormente disminuir e igualarse al de los varones (Ahlborg y cols., 2001).

Debido a que la remodelación ósea es un proceso dinámico, el equilibrio entre la formación ósea y resorción ósea puede alterarse fácilmente. Múltiples factores, además de la disminución de estrógenos, pueden acelerar la pérdida ósea y conducir a la osteoporosis.

4.2 Criterios de clasificación de la osteoporosis

En 1994 World Health Organization (WHO) publicó los criterios para la clasificación de la osteoporosis basados en la medición de la densidad mineral ósea (DMO) (Fig. 6). Estos criterios se han utilizado ampliamente para fijar el umbral a partir del cual diagnosticar y tratar la osteoporosis/osteopenia, sin tener en cuenta que, en realidad, se establecieron para la realización de estudios epidemiológicos y de investigación. Esto ha derivado en una confusión terminológica entre osteoporosis “densitométrica” ($DMO \leq -2,5$ DE, clasificada como osteoporosis según el criterio de la OMS), que es un factor de riesgo de futuras fracturas y la osteoporosis como enfermedad clínica, que es el proceso que predispone a la aparición de fracturas. En realidad la DMO baja es un factor de riesgo de fracturas, no un criterio diagnóstico de osteoporosis como enfermedad establecida, la relación entre la DMO y el riesgo de fracturas depende de la edad (WHO, 1994).

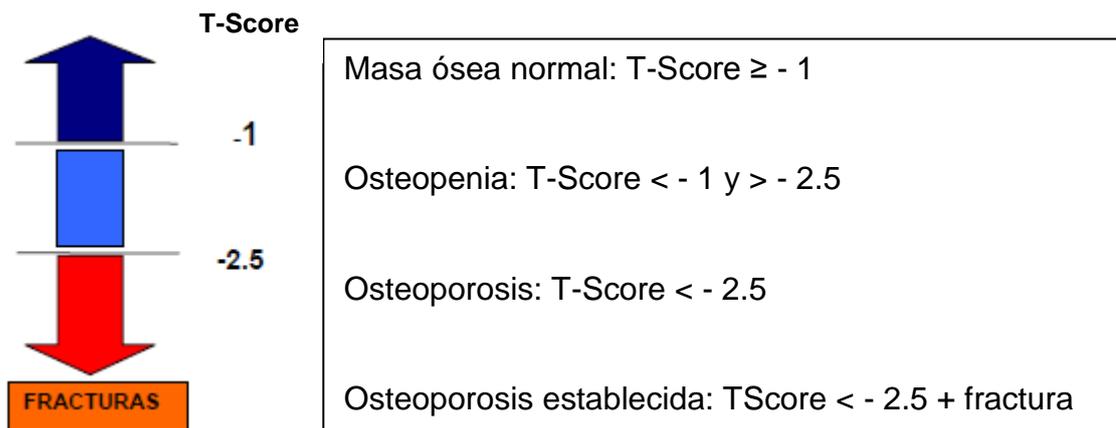


Fig. 6. Criterios de clasificación de la osteoporosis (WHO, 1994)

4.3 Evaluación del paciente con osteoporosis/osteopenia

Medición de masa ósea

Actualmente no existen métodos que permitan medir la calidad ósea independientemente de la densidad en la práctica clínica, por lo que a efectos prácticos el diagnóstico de osteoporosis se realiza en base a la medición de la masa ósea.

Existen varios métodos disponibles para la medición de la DMO, de los cuales el más utilizado es la absorciometría dual de rayos X (DEXA). La medición de la DMO por densitometría permite establecer la presencia de osteoporosis en función de los criterios de la OMS. En la práctica clínica diaria suele realizarse en dos localizaciones, columna lumbar y fémur proximal. La medición en columna vertebral analiza las vértebras L2 a L4 lumbares y refleja fundamentalmente el hueso trabecular. A nivel de fémur proximal se consideran a su vez varias regiones: cuello femoral, trocánter, triángulo de Ward y cadera total. Con fines diagnósticos se utilizan los valores en cuello femoral y cadera total ya que las otras dos medidas tienen menor precisión.

4.4 Sistema RANK-RANKL-OPG y osteoporosis/osteopenia post-menopáusica

La osteoporosis es una enfermedad que se caracteriza por una menor densidad y calidad de los huesos, lo cual implica debilitamiento del esqueleto y mayor riesgo de fractura. Numerosos estudios han establecido el papel central de la deficiencia de estrógeno en la patogénesis de la osteoporosis en mujeres post-menopáusicas.

Las citoquinas proinflamatorias juegan un papel esencial tanto en el proceso normal de remodelado óseo como en el desarrollo de la osteoporosis, principalmente a partir de la regulación de los niveles de RANKL. El papel de RANKL y OPG sobre el metabolismo óseo se confirma al aumentar la relación RANKL/OPG y como consecuencia, estimular la osteoclastogénesis. Además, estas citoquinas favorecen la diferenciación y apoptosis de los osteoblastos (Nakashima y cols., 2002).

Diversos estudios han demostrado que los estrógenos (Michael y cols., 2005; Hofbauer y cols., 1999) y el factor de crecimiento transformante beta TGF- β (Murakami y cols., 1998; Takai y cols., 1998), un factor de crecimiento

inducido en los osteoblastos por los estrógenos, incrementan la producción de OPG por los osteoblastos y células del estroma, lo cual neutralizaría a RANKL y controlaría en gran medida la osteoclastogénesis. Si tras la menopausia, la mujer se encuentra en un estado de deprivación estrogénica, perdería esta capacidad reguladora y el aumento de la actividad RANKL-RANK parecería ser la responsable de la pérdida ósea que se experimenta en esta etapa.

Los niveles de estrógeno residuales después de la menopausia se correlacionan con la densidad ósea y el riesgo de fractura, sin embargo, la relación de los niveles de estrógenos con los niveles de OPG en suero en mujeres post-menopáusicas han sido inconsistentes en diversos estudios. Algunos autores demostraron una débil relación (Rogers y cols., 2002) mientras que otros no encontraron relación alguna (Khosla y cols., 2002) o bien, otros encontraron una relación negativa (Trofimov y cols., 2004).

Yano y cols., han demostrado que la concentración de OPG en suero aumenta con la edad, y que las mujeres post-menopáusicas osteoporóticas tienen, pese a lo que cabría esperar, niveles de OPG algo mayores que las no osteoporóticas, lo cual concluyen podría ser reflejo o consecuencia de un efecto compensatorio orgánico en respuesta al aumento de la resorción ósea en estos sujetos (Yano y cols., 1999). Sin embargo, Arrighi y cols. no encuentran ese aumento de OPG en relación con la edad de las mujeres (Arrighi y cols., 1998).

Una correlación positiva entre los niveles séricos de estradiol y OPG se informó en un estudio realizado en mujeres y hombres (Szulc y cols., 2001).

Rogers y cols. encontraron una débil relación positiva entre los niveles circulantes de OPG y estradiol sérico, una débil asociación inversa entre los niveles séricos de OPG y los marcadores de recambio óseo, y una significativa relación positiva entre los niveles séricos de OPG y densidad mineral ósea (DMO) en todo el cuerpo, cadera y cuello femoral en un estudio de cohorte de una población de 180 mujeres post-menopáusicas (Rogers y cols., 2002).

Algunos estudios realizados en mujeres post-menopáusicas revelaron una correlación negativa entre la DMO y los niveles séricos de OPG (Yano y cols., 1999), siendo esto interpretado como un mecanismo regulador preventivo cuyo fin es evitar una mayor pérdida de hueso. Mientras que otros encontraron una relación positiva entre los niveles séricos de OPG y la DMO (Mezquita y cols., 2005; Rogers y cols., 2002) o bien no encontraron ninguna asociación (Khosla y cols., 2002).

Por otro lado, Kim y cols. demostraron que los bifosfonatos que contienen nitrógeno, como el alendronato y pamidronato, no alteraban la expresión de ARNm de RANKL y OPG a favor de la inhibición de la formación de osteoclastos. Aunque estos bifosfonatos inhiben la formación de osteoclastos y la resorción ósea en co-cultivos de células osteoblásticas de ratón y células de médula ósea, estos efectos inhibidores no parecen estar relacionados con la regulación de la expresión de ARNm de RANKL y OPG. En conjunto, se podría sugerir que RANKL y OPG podrían no ser los blancos principales de los bifosfonatos para inhibir la resorción ósea (Kim y cols., 2002).

También se han investigado los niveles séricos de RANKL en mujeres post-menopáusicas y se ha reportado que no están asociados con la menopausia o la DMO (Mezquita y cols., 2005). Sin embargo, en este estudio más de la mitad de las mujeres tenían concentraciones de RANKL indetectables.

Por otro lado, de acuerdo a lo informado por Gurban y Merdele, los niveles de RANKL son significativamente mayores en la osteoporosis post-menopáusica y es un marcador relevante de la resorción ósea. Mientras que la disminución de los niveles séricos de OPG es consecuencia de la apoptosis de los osteoblastos. Una relación de OPG/RANKL $<1,0$ se genera a través de la osteoclastogénesis por una disminución de la actividad de la OPG, debido al déficit de estrógenos presente durante la post-menopausia (Gurban y Merdele, 2011).

4.5 Osteoporosis y Bifosfonatos

Entre los numerosos fármacos para la osteoporosis, los bifosfonatos son los más comúnmente prescritos y los medicamentos de primera línea en la mayoría de los casos (Russell y Rogers, 1999)

Esta droga es un compuesto sintético análogo de la molécula de pirofosfato endógeno, en la que la estructura P-O-P ha sido sustituida por la P-C-P; y la presencia de este doble grupo fosfórico le confiere particular resistencia a la hidrólisis. El mecanismo de acción de los bifosfonatos consiste en la inhibición de la activación o reclutamiento de los osteoclastos mediado por la hormona paratiroidea (PTH), el calcitriol, las prostaglandinas y citoquinas (IL-1, TNF) (Fleisch, 1998).

Esta droga se utiliza para el tratamiento de trastornos hereditarios del esqueleto en niños, osteoporosis post-menopáusica e inducida por glucocorticoides y metástasis óseas en pacientes con neoplasias malignas. Los bifosfonatos tienen alta afinidad por el mineral óseo, ya que se unen a los cristales de hidroxiapatita, de manera que la retención esquelética de esta droga depende de la disponibilidad de hidroxiapatita en los sitios de unión; esta gran afinidad por el mineral óseo permite lograr una alta concentración en hueso y no en otros tejidos. Los bifosfonatos preferentemente se incorporan en sitios de remodelación ósea activa inhibiendo la calcificación, la disolución de hidroxiapatita, lo que suprime la resorción ósea y aquellos bifosfonatos que contienen nitrógeno promueven la apoptosis osteoclástica. La máxima supresión de la resorción ósea se produce en un plazo aproximado de 3 meses del inicio del tratamiento con bifosfonatos orales de consumo diario, semanal o mensual y se mantiene más o menos constante con la continuación del tratamiento a diferencia de la administración intravenosa donde la supresión de la resorción ocurre más rápido (Drake y cols., 2008).

Los bifosfonatos se han caracterizado por ser moduladores de la función osteoclástica y el metabolismo óseo (Tenenbaum y cols., 2002). Particularmente actúan a nivel de los tejidos disminuyendo el recambio óseo, reduciendo la resorción ósea y el número de nuevas unidades óseas multicelulares. Mientras que a nivel celular, reducen el reclutamiento de osteoblastos y osteoclastos, disminuyen la adherencia de los osteoclastos como así también la liberación de citoquinas por los macrófagos. En base a estas propiedades varias generaciones de bifosfonatos se han desarrollado con éxito en el tratamiento de la osteoporosis post-menopáusica, la osteopenia y la enfermedad de Paget. (Russell, 2007).

El risedronato es un bifosfonato que contiene nitrógeno aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) para la prevención y tratamiento de osteoporosis post-menopáusica y la osteoporosis inducida por glucocorticoides. El principal mecanismo de acción del bisfosfonato es la inhibición mecánica de la adhesión de los osteoclastos en el margen de hueso donde tiene lugar la resorción y a través de la apoptosis de los osteoclastos. También se conocen por actuar indirectamente sobre los osteoblastos, suprimiendo de este modo la diferenciación osteoclástica (Nishikawa y cols., 1996).

Viereck y cols. han demostrado que los bifosfonatos pamidronato y zolendronato aumentan la expresión de ARNm de OPG en osteoblastos humanos primarios (Viereck y cols., 2002).

Alvarez y cols., demostraron una disminución de OPG en respuesta al tratamiento con bifosfonatos (tiludronato) en pacientes con enfermedad de Paget, pero en el mismo estudio se observó que la OPG sérica no respondía al tratamiento con bifosfonatos en pacientes con osteoporosis (Alvarez y cols., 2003).

Pan y cols., demostraron que el ácido zoledrónico puede inhibir la resorción ósea reduciendo la expresión de transmembrana de RANKL y aumentando la secreción de OPG en células como los osteoblastos; afectando la relación RANKL/OPG (Pan y cols., 2004).

Dobnig y cols., mostraron un aumento significativo en los niveles séricos de OPG en pacientes tratados con aminobifosfonatos orales, mientras que los niveles de RANKL séricos se mantuvieron sin cambios durante todo el período de tratamiento; mientras que por otro lado encontraron una correlación positiva entre los cambios en los niveles de OPG sérico y la DMO (Dobnig y cols., 2006).

D'Amelio y cols., demostraron que el risedronato inhibe la formación *in vitro* de osteoclastos al reducir el número y el grado de diferenciación de precursores de osteoclastos y mediante la reducción de su vida media y la inhibición de la producción de citoquinas pro-osteoclastogénicas. Además, es capaz de reducir el reclutamiento de osteoclastos y que esto podría ser causado por la reducción en la producción de citoquinas. Por otro lado, observaron una reducción en los niveles de OPG y RANKL (soluble) en el suero durante el tratamiento con bifosfonatos (D'Amelio y cols., 2008).

Un estudio realizado por Kwak y cols., concluyó que el risendronato suprime la diferenciación de osteoclastos, además de suprimir la diferenciación osteoclástica inducida por RANKL. El estudio se realizó en osteoblastos cocultivados con células de la médula ósea seguido por tratamiento de risendronato, los resultados mostraron una supresión marcada en la diferenciación celular de los osteoclastos. Los osteoblastos expresan RANKL, esencial para la diferenciación de los osteoclastos, por ende los efectos del risendronato en la diferenciación de osteoclastos puede estar relacionado con una disminución de la expresión de RANKL o aumento de la expresión de osteoprotegerina (OPG) en los osteoblastos. Este estudio demostró que el

risendronato inhibe la diferenciación osteoclástica mediada por RANKL y M-CSF (Kwak y cols., 2009).

Los resultados contradictorios de los mencionados estudios demostraron que no se conoce con claridad la acción que ejercen los bifosfonatos en los niveles de RANKL y OPG.

5.1 De la salud a la enfermedad periodontal

Las bacterias colonizan una gran variedad de superficies del cuerpo humano, incluyendo el tracto digestivo, las vías respiratorias, la piel y la cavidad oral. Estos organismos pueden coexistir con el huésped de una manera mutuamente beneficiosa o como organismos comensales que ni lo benefician ni perjudican (Dalwai y cols., 2006).

La cavidad oral constituye un hábitat para un conjunto de microorganismos que colonizan distintas regiones bucales y donde establecen una relación simbiótica que da origen a los denominados biofilms bacterianos, en los cuales la diversidad bacteriana y las interrelaciones que se establecen aseguran el crecimiento y sustento de los microorganismos que lo componen. En estos ecosistemas microbianos, el desarrollo y maduración del biofilm dental está controlado por sistemas de comunicaciones químicas entre los microorganismos y la competencia del sistema inmune, intentando evitar desequilibrios que conducirían a la generación de patologías infecciosas. En un estudio *in vitro* se demostró que cuando se exponía el biofilm bacteriano a células epiteliales humanas se inducía a la apoptosis celular y a la producción de citoquinas pro-inflamatorias, siendo estas últimas inmediatamente degradadas por enzimas del biofilm. Esta interacción generaría una importante respuesta celular pro-inflamatoria del huésped y una simultánea subversión microbiana a los mecanismos de defensa del hospedador (Guggenheim y cols., 2009).

El biofilm ha sido definido como una matriz de poblaciones microbianas, adheridas unas a otras y/o a las superficies o interfaces. Éste se encuentra estructurado con canales que atraviesan su profundidad y crean un sistema circulatorio primitivo. Las especies que lo componen no son distribuidas al azar sino que están espacial y funcionalmente organizadas (Sanz y Quirynen, 2005) (Fig. 7).

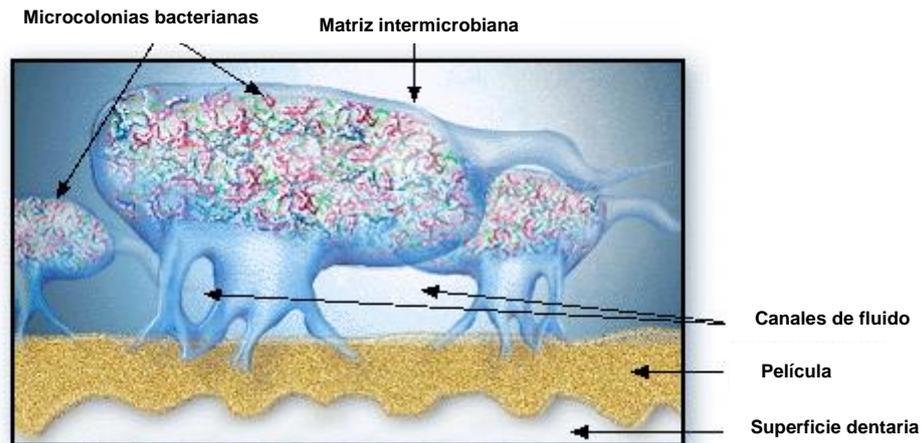


Fig. 7 Estructura del biofilm. (Overman P, 2000).

En la cavidad bucal, los tejidos periodontales poseen ciertas características que permiten la colonización y el desarrollo de casi 400 especies de microorganismos patógenos, gran cantidad de ellas relacionadas con la evolución de afecciones a nivel periodontal (Peña y cols., 2007).

El periodonto de inserción de los elementos dentarios está constituido por diferentes tejidos: el cemento radicular, el ligamento periodontal y el hueso alveolar, los cuales se encuentran protegidos del medio bucal por el periodonto de protección constituido por la encía. Para llevar a cabo la función de protección existen tejidos adaptados con características especiales. Entre cada elemento dentario y la encía existe un espacio virtual llamado surco gingival, que, en presencia de infección e inflamación, adquiere la denominación de bolsa periodontal. El epitelio de unión recubre la porción más apical de la vertiente interna del surco gingival, cuya estructura es bastante singular ya que no posee uniones estrechas sino que constituye una barrera transcelular adhesiva, permeable, altamente especializada que funciona como filtro (Offenbacher, 1996), de esta manera mantiene adherida la encía a la superficie del diente y participa activamente en la respuesta del huésped permitiendo, de forma selectiva, el paso de antígenos, células y una amplia gama de moléculas defensoras hacia el surco gingival (Fig. 8). El surco gingival no hospeda solamente bacterias periodontopatógenas sino también aloja un trasudado plasmático, denominado fluido gingival (FG), el cual irriga continuamente el surco gingival y proporciona componentes celulares y antimicrobianos del suero, como anticuerpos y enzimas, que pueden bañar las bacterias y el frente de placa subgingival que avanza (Delima y Van Dyke, 2004). El FG se

constituye, junto con la descamación de las células epiteliales, como la primera barrera de defensa contra los patógenos del periodonto y desempeña un papel esencial en el mantenimiento de la estructura del epitelio de unión (Uitto, 2003).

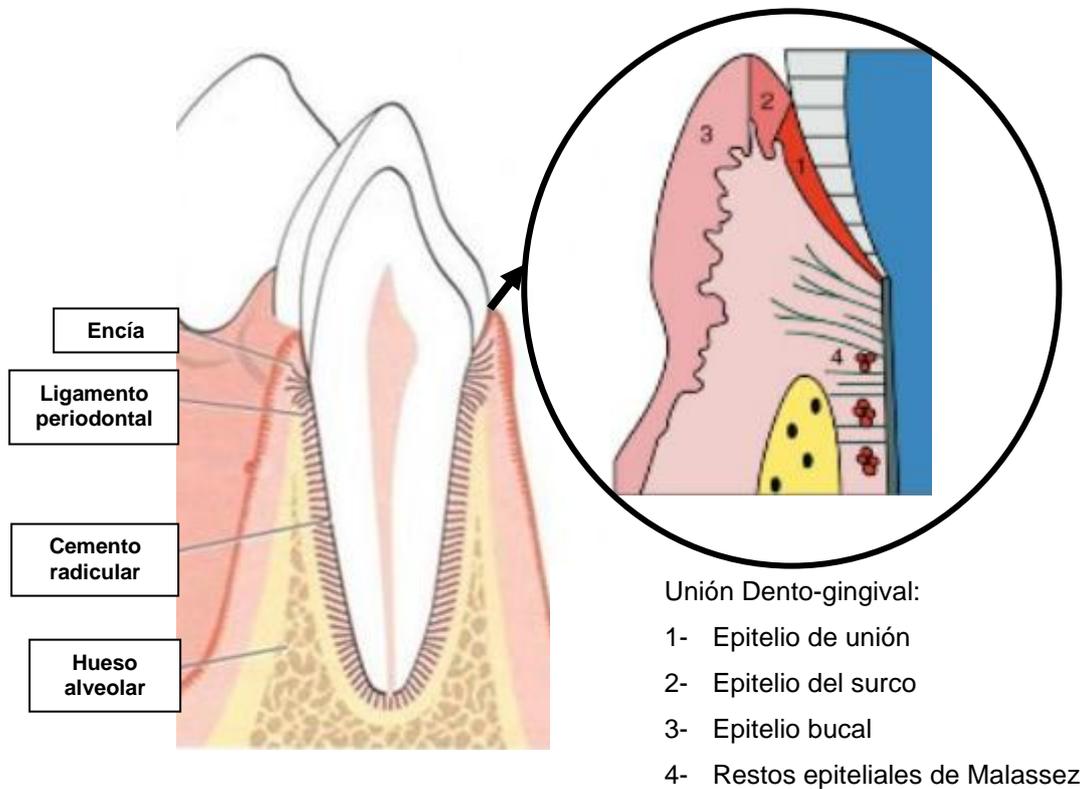


Fig.8 Esquema de la Unión dento-gingival constituida por: epitelio de unión, epitelio del surco, epitelio bucal y restos epiteliales de Malassez (Pöllänen y cols., 2003).

El biofilm bacteriano es natural y existe en armonía con el huésped en salud. El mantenimiento de la salud depende del equilibrio homeostático de la relación entre la exposición bacteriana y la respuesta del huésped. La patología periodontal se desarrolla a partir de un desequilibrio en esta relación, provocado por cualquier cambio en la magnitud o naturaleza microbiana o bien en la escala o adecuación de la respuesta del huésped (Socransky y cols. 1998). Es decir, cambios en el número o la naturaleza de las bacterias, como así también la inapropiada respuesta del huésped ocasionarían un estado mórbido.

Los neutrófilos y los anticuerpos protegen la integridad epitelial de la infección bacteriana. Los anticuerpos neutralizan las toxinas bacterianas u opsonizan las bacterias para su fagocitosis eficaz por los neutrófilos. Cuando

se interrumpe la integridad epitelial, la entrada de bacterias y/o productos bacterianos desencadenan una respuesta inflamatoria importante. Si bien la mayoría de los neutrófilos reclutados en los tejidos gingivales migran hacia el epitelio y el surco gingival, casi todas las células mononucleares persisten en el tejido conectivo y en las capas infrabasales del epitelio bucal y forman el infiltrado celular inflamatorio local. Estas células consisten en monocitos y macrófagos tisulares, linfocitos T y B y células plasmáticas, las cuales están presentes en las lesiones periodontales donde la patología inflamatoria se ha cronificado (Page y Schroeder, 1976).

Como se mencionó anteriormente, cuando se supera la barrera epitelial comienza a actuar la respuesta inmunitaria adaptativa, en la cual las citoquinas conforman el elemento clave. Estas son una serie de proteínas que median las interacciones complejas entre los linfocitos, las células inflamatorias y otras células del tejido conectivo, siendo su función asistir en la regulación y el desarrollo de células inmunitarias efectoras y establecer la comunicación entre una célula y demás funciones efectoras directas (autócrina-parácrina-endócrina). El desarrollo y la regulación de una respuesta inmunitaria dependen en gran parte de la producción local de cierta cantidad de citoquinas que pueden determinar si la respuesta será protectora o no (Gemmell y Seymour, 2005). Estas citoquinas son producidas por distintos tipos de células en el periodonto, tales como fibroblastos, células endoteliales, macrófagos, osteoclastos, células epiteliales, leucocitos polimorfonucleares, monocitos, linfocitos y mastocitos.

En las primeras etapas del proceso patológico, mientras el periodonto está clínicamente sano, la colonización bacteriana inicial, compuesta principalmente por microorganismos grampositivos, se encuentra confinada al margen gingival. En este estado, el fluido gingival es relativamente escaso y está constituido sobre todo por un trasudado de proteínas plasmáticas, que fluye de los tejidos gingivales hacia el surco gingival. Sin embargo, al cabo de 2-4 días de acumularse la placa bacteriana, empieza la lesión inicial de gingivitis (Page y Schroeder, 1976). A medida que el proceso inflamatorio continúa, la encía marginal empieza a mostrar cambios clínicos indicativos de inflamación simultáneamente con un avance apical del frente de placa y un aumento en su masa (Delima y Van Dyke, 2004). La gingivitis se caracteriza por un cambio en la composición de la placa microbiana, con un incremento de los microorganismos gramnegativos (Tonetti y cols., 1998). Estas bacterias gramnegativas desencadenan un aumento de la permeabilidad de los vasos

sanguíneos subepiteliales, con la consiguiente salida de plasma de la circulación, que ocasiona eritema, edema y pérdida del punteado en el tejido conectivo gingival y la formación de bolsas y sangrado al sondaje. A medida que este líquido escapa hacia el surco gingival, a través del epitelio de unión, se produce un aumento del flujo de líquido (Page y Schroeder, 1976). Este exudado es esencialmente un medio de crecimiento de sostén de las células y los tejidos del huésped pero también puede actuar como una excelente fuente de nutrientes para los gérmenes subgingivales y contiene factores que son necesarios para la proliferación de ciertas especies bacterianas patógenas (Page y Schroeder, 1976).

La gingivitis se produce de forma natural en la mayoría de los individuos, aunque su gravedad varía. Las manifestaciones histológicas consisten en cambios vasculares, con incremento de la permeabilidad y de la vasodilatación, y la presencia de un exudado de neutrófilos polimorfonucleares, que migran desde el tejido hacia el surco gingival (Page y Schoeder, 1976; Tsai y cols., 1998). Los neutrófilos poseen mecanismos antimicrobianos sumamente especializados que forman la primera línea de defensa frente a las bacterias. Los neutrófilos activados por las bacterias también producen mediadores quimiotácticos y vasoactivos que perpetúan la respuesta inflamatoria del huésped. Se cree que la gingivitis es una respuesta dominada por los neutrófilos, ya que la mayoría de los mediadores neutrófilos se identifican en el fluido gingival, entre ellos leucotrieno B₄, factor activador de las plaquetas, tromboxano B₂, elastasa y colagenasa metaloproteasa de la matriz 8 (Heasman y cols., 1996; Ebersole y cols., 2000; Gonzáles y cols., 2001; Jin y cols., 2000; Ronderos y cols., 2001). Tonetti y cols. demostraron que el aumento de la quimiotaxina neutrófila, interleuquina 8, en el fluido gingival es uno de los primeros cambios asociados a la transición de la salud a la gingivitis (Tonetti y cols., 1998). En la gingivitis se detectan en el fluido gingival niveles bajos de productos de los monocitos, como IL 1 o TNF, indicando un bajo nivel de activación de las células asociadas con la inflamación crónica.

En la periodontitis, la placa microbiana gramnegativa evoluciona y coloniza profundamente el surco gingival, dando lugar al crecimiento de un pequeño grupo de bacterias anaeróbicas predominantemente gramnegativas y espiroquetas, y promueve una respuesta inflamatoria crónica. A medida que la placa madura y se vuelve más patógena, la respuesta inflamatoria del huésped evoluciona de aguda a crónica. Estas bacterias, en conjunto con numerosas

especies en las biopelículas, se extienden a lo largo de la superficie apical de las raíces de los dientes para incitar a la formación de bolsas periodontales y la destrucción del hueso alveolar y fibras colágenas del ligamento periodontal (Page y cols., 1997).

Los microorganismos patógenos periodontales gramnegativos pueden evitar los mecanismos de respuesta del huésped (complemento, anticuerpos y neutrófilos) mientras liberan vesículas que contienen toxinas microbianas, proteasas y endotoxinas (lipopolisacáridos). Los lipopolisacáridos penetran en los tejidos y estimulan los monocitos, que secretan mediadores de la inflamación, como prostaglandina E₂, tromboxano B₂, IL 1, 6 y 8, TNF y colagenasa. Estos mediadores de la inflamación activan posteriormente las células musculares lisas, los fibroblastos, más monocitos y los osteoclastos para producir metaloproteasas de la matriz y estimular la reabsorción ósea. Esta cascada inflamatoria provoca inflamación clínica, pérdida de inserción y, finalmente, pérdida de dientes. Junto a la síntesis de los mediadores de la inflamación por los monocitos, también se produce la presentación de los antígenos. Este componente de la respuesta del huésped desencadena la respuesta inmunitaria de adaptación, con una respuesta inicial de los linfocitos T cooperadores de tipo 1 (proinflamatoria, IL-2, TNF e interferón γ) y un posterior cambio hacia una respuesta dominante de linfocitos T cooperadores de tipo 2 (antiinflamatorios, IL 4, 5, 6, 10 y 13 y producción de inmunoglobulinas) (Gemmell y Seymour, 2005). Por lo tanto, las citoquinas inflamatorias pueden detectarse en el fluido gingival y servir como indicador del estado inmunorregulador e inflamatorio local.

La evidencia de que las citoquinas desempeñan un papel crítico se demostró en un modelo primate. En este informe, la inhibición de la IL-1 y el TNF redujeron la progresión de la pérdida de hueso periodontal y la pérdida de inserción (Asumma y cols., 1998 y Delima y cols., 2001) que se atribuyó al reclutamiento de células inflamatorias (principalmente monocitos y linfocitos) hacia el hueso (Graves y cols., 1998). En los últimos años, varios modelos de ratón knock-out apoyaron la hipótesis de que las citoquinas son necesarias en el proceso de la enfermedad (Baker y cols., 1999; Garlet y cols., 2007; Kirkwood y cols., 2007).

Page y Schroeder demostraron que la resorción ósea cesa cuando se crea una zona de 2,5 mm entre el sitio de bacterias y el hueso. Concluyendo que las distancias de más de 2,5 mm son causadas por la invasión bacteriana al tejido conjuntivo gingival (Page y Schroeder, 1981): mientras más cerca del hueso se

encuentren las células del infiltrado inflamatorio, mayor es el número de osteoclastos formados y, por lo tanto, mayor la cantidad de hueso degradado (Rowe y Bradley, 1981; Schroeder y Lindhe, 1980).

La enfermedad periodontal se caracteriza por atravesar por períodos de:

- reposo o inactividad: caracterizado por una reacción inflamatoria reducida y escasa o nula pérdida de hueso o inserción de tejido conectivo.

- exacerbación o actividad: período donde acontece pérdida de inserción y hueso; puede durar días, semanas o meses y al final es seguido por un lapso de remisión o reposo (Goodson y cols., 1982). Histológicamente, en las lesiones periodontales activas se observan principalmente células mononucleares, de las cuales el 70% lo constituyen linfocitos del tipo T que tienen la capacidad de secretar una serie de citoquinas que participan en los eventos etiopatogénicos de la enfermedad (Seymour y cols., 1983 (A); Seymour y cols., 1983 (B); Taubman y Kawai, 2001). La acumulación de células plasmáticas y linfocitos en los tejidos periodontales sugiere que las citoquinas intervienen en los cambios patológicos del periodonto (Holt y Ebersole, 2005).

Durante los períodos de progresión de la enfermedad, la liberación de mediadores inflamatorios aumenta en todas las zonas de la boca del paciente, tanto estables como progresivas. Además, las zonas clínicamente sanas en pacientes con enfermedad progresiva son, probablemente, diferentes de las zonas sanas de pacientes sanos, que albergan diferente placa microbiana (Ximénez-Fyvie y cols., 2000) y exhiben una respuesta del huésped distinta (Tanner y cols., 1996). Aunque la enfermedad progresa de forma diferente en cada zona a causa de sus características específicas (Tanner y cols., 1996), la respuesta del huésped es más global y sigue el mismo patrón en todas las zonas del interior de la boca de cada individuo. Esto fue confirmado por Figueredo y cols. (Figueredo y cols., 1999), quienes constataron que los niveles de IL-1 en el fluido gingival aumentaban en las muestras de pacientes con periodontitis, independientemente de la gravedad de la enfermedad en la zona de muestreo.

Si bien, la enfermedad periodontal es una afección inflamatoria crónica causada por la infección de los tejidos de soporte que rodean a los elementos dentarios; evidencia actual indica que la enfermedad periodontal, una de las patologías más prevalentes en humanos, es una afección inflamatoria de causa multifactorial desencadenada por la respuesta inmune del huésped al

biofilm, donde no todos los factores tienen la misma importancia. El factor de riesgo ambiental más significativo para la enfermedad periodontal lo constituyen las bacterias que residen en el biofilm. La importancia de las bacterias junto con la respuesta tisular del huésped representan los componentes esenciales de este proceso inflamatorio.

La naturaleza y la extensión del ataque bacteriano está modulado y atenuado por la respuesta inmunitaria del huésped. Los antígenos microbianos y factores de virulencia provocan una respuesta inmediata inflamatoria e inmune en el huésped, mediante la producción de citoquinas, eicosanoides, quininas, productos de activación del complemento y metaloproteinasas de la matriz. Algunos de estos mediadores inflamatorios participan en la destrucción del ligamento periodontal y hueso alveolar (Shikawa, 2007).

Las bacterias son capaces de causar destrucción periodontal indirectamente activando varios componentes del sistema de defensa del huésped, el cual proporciona protección a costa de un cierto nivel de destrucción periodontal, incluyendo hueso alveolar, cemento radicular y ligamento periodontal (Offenbacher, 1996). De acuerdo con lo informado por Page y Kornman, las bacterias son esenciales pero no suficientes para causar enfermedad periodontal, mientras que factores relacionados al huésped, como la herencia, y factores ambientales, como el hábito de fumar o el consumo de determinados medicamentos, son importantes determinantes de la aparición y severidad de esta patología (Page y Kornman, 1997).

El estrecho equilibrio entre la homeostasia periodontal y la enfermedad depende de la adecuada respuesta cualitativa y cuantitativa del mecanismo de defensa del huésped a la infección del tejido periodontal. Las respuestas insuficientes o excesivas del huésped pueden llevar a la destrucción periodontal, y tal evolución puede ser en gran parte específica de cada individuo (Delima y Van Dyke, 2004). La forma en que el sistema inmune responde a las bacterias, ya sea en forma protectora o destructiva, se determina por la naturaleza y el control de las respuestas inmunitarias, tanto innatas como adaptativas (Taubman y cols., 2005). Una de las primeras evidencias sobre la importancia de la respuesta del huésped fue demostrado en un estudio sobre el efecto que ejercía un inhibidor de prostaglandinas sobre la pérdida ósea alveolar (Williams y cols., 1985).

Por lo tanto, la enfermedad periodontal es una patología multifactorial en la que, como mencionamos previamente, el biofilm bacteriano es el factor iniciador. Sin embargo, en la manifestación y la progresión de ésta influyen una

amplia variedad de determinantes, susceptibilidad del huésped y factores de riesgo. Entre ellos se encuentra la osteoporosis/osteopenia y la deficiencia de estrógeno, que constituyen factores de riesgo para la ocurrencia de pérdida ósea alveolar en pacientes post-menopáusicas con historia de enfermedad periodontal (Payne y cols., 1999).

5.2 Sistema RANK-RANKL-OPG y enfermedad periodontal

La resorción y la formación ósea están reguladas por las concentraciones relativas de RANKL expresadas por diversas células, así como el receptor RANK en las células precursoras de los osteoclastos y el receptor señuelo soluble denominado osteoprotegerina (OPG).

Por lo tanto, la regulación de la reabsorción ósea es orquestada por RANKL y su inhibidor, OPG. La desregulación del balance en la expresión de ambas citoquinas conduce a la pérdida de hueso, como se demostró en modelos experimentales de enfermedades óseas destructivas, incluyendo la enfermedad periodontal. (Teng y cols., 2000; Taubman y Kawai, 2001) (Fig. 9).

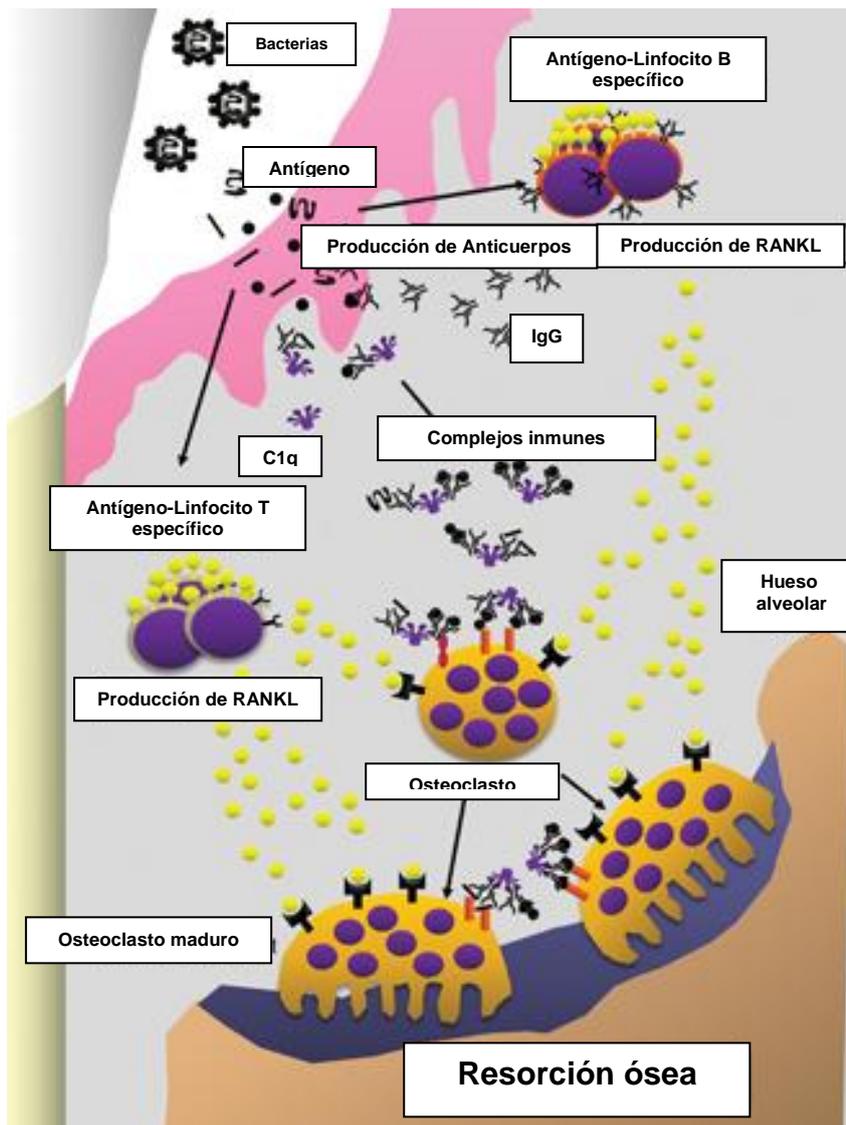


Fig. 9 Papel de las bacterias patógenas periodontales en la destrucción ósea mediada por RANKL en la enfermedad periodontal (Kajiya y cols., 2010).

Los últimos avances en la osteoimmunología llevaron a investigar el papel de RANKL y OPG en la patogenia de la enfermedad.

En la enfermedad periodontal, las células T y B activadas son las principales fuentes de RANKL en los sitios de resorción ósea (Kawai y cols., 2006). Por lo tanto, la activación de las células T en los tejidos gingivales parece desempeñar un papel clave en la producción de RANKL, provocando la resorción ósea periodontal (Kawai y cols., 2007).

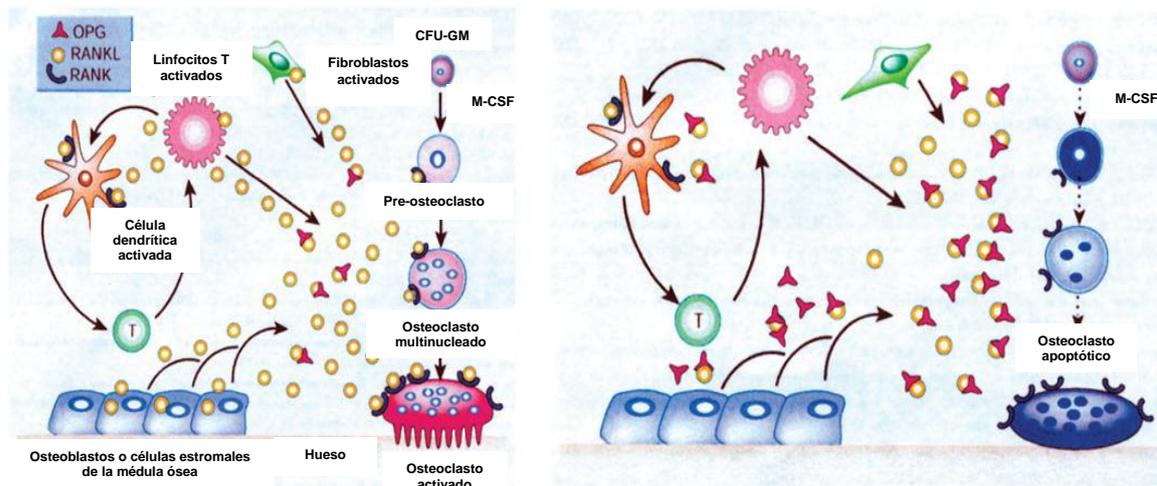


Fig. 10 Diferenciación y activación de los osteoclastos (Boyle y cols., 2003).

En las lesiones de periodontitis, los linfocitos, macrófagos y neutrófilos infiltran el tejido conjuntivo subepitelial e interactúan con las células del estroma (osteoblastos, fibroblastos del ligamento periodontal y fibroblastos gingivales). Los macrófagos y los linfocitos T producen mediadores inflamatorios, como IL-1, IL-6, TNF α y PGE $_2$, que pueden inducir la resorción ósea de forma indirecta, estimulando a los osteoblastos a producir RANKL (Taubman y Kawai, 2001) (Fig. 10). Los linfocitos T pueden favorecer también la diferenciación de los osteoclastos mediante la producción directa de RANKL. Por lo tanto, la resorción del hueso alveolar podría ser inducida de forma directa o indirecta por el infiltrado inflamatorio en las lesiones periodontales (Taubman y Kawai, 2001).

RANKL es la señal final común esencial requerida para la completa diferenciación de los precursores celulares hematopoyéticos totipotenciales en osteoclastos multinucleados y la activación de ellos como células osteodestructivas (Lacey y cols., 1998; Nakagawa y cols., 1998; Burgess y cols., 1999; Kong y cols., 1999(A) y 1999 (B); Takahashi y cols., 1999), y podría correlacionarse la presencia de mayores niveles de esta citoquina osteoclastogénica con la destrucción ósea alveolar y dar una explicación biológica comprensible a la pérdida de dientes consecutiva a la periodontitis.

Takayanagi y cols. informaron que los mecanismos moleculares de la regulación de la formación de los osteoclastos mediada por los linfocitos T se producen a través de la señalización cruzada entre RANKL e interferón y

(IFN- γ). La producción de IFN- γ por los linfocitos T suprime en gran medida la osteoclastogénesis, al interferir con la vía de señalización RANKL-RANK. El IFN- γ induce la rápida degradación de la proteína adaptadora de RANK, TRAF6 (factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral), que da lugar a una fuerte inhibición de la activación, inducida por RANKL, del factor de transcripción NF- κ B y de la cinasa N-terminal de c-Jun (Takayanagi y cols., 2000).

Numerosos estudios clínicos y algunos experimentales evaluaron la influencia del sistema RANK-RANKL-OPG en la patogenia de la enfermedad periodontal.

Crotti y cols. compararon la expresión de RANKL y OPG en el tejido granulomatoso adyacente a las zonas con pérdida de hueso alveolar de pacientes con periodontitis, con la existente en tejidos sin periodontitis, empleando inmunohistoquímica. En este estudio se expresaron concentraciones significativamente superiores de la proteína RANKL en el tejido con periodontitis, y se verificó una reducción significativa de OPG en dicho tejido. La proteína RANKL se asoció con los linfocitos y los macrófagos, mientras que OPG se asoció con las células endoteliales (Crotti y cols., 2003). El estudio de Crotti y cols. indicó que la pérdida de hueso, adyacente a la zona inflamada en la periodontitis, también puede estar regulada por los niveles de RANKL y OPG. Mientras que muchos estudios han demostrado que RANKL y OPG se expresan por distintos tipos de células de los tejidos gingivales, este es el primer estudio que demostró la presencia de RANKL y OPG en tejidos periodontales enfermos humanos (Crotti y cols., 2003).

Liu y cols. señalaron que la concentración de ARNm de RANKL determinado mediante una RT-PCR semicuantitativa fue mayor en los pacientes con periodontitis avanzada, respecto a los pacientes con periodontitis moderada o al grupo sano. Además, examinaron la localización de la expresión celular del ARNm de RANKL mediante hibridación in situ. El ARNm de RANKL se expresaba en células inflamatorias, principalmente linfocitos y macrófagos (Liu y cols., 2003). Además, el epitelio que proliferaba en la proximidad de las células inflamatorias expresaba concentraciones elevadas de ARNm de RANKL (Liu y cols., 2003).

Vernal y cols., examinaron los niveles de ARNm de RANKL en los tejidos gingivales mediante RT-PCR en tiempo real. Los datos demostraron que todos los pacientes con periodontitis presentaron niveles detectables de ARNm de RANKL y estos fueron significativamente mayores que los

encontrados en sujetos periodontalmente sanos. Este estudio les permitió establecer que mayores niveles de RANKL se encuentran asociados con individuos afectados por periodontitis en comparación con sujetos control periodontalmente sanos, y que en ellos los linfocitos T CD4+ juegan un papel fundamental en el desbalance del eje RANKL-RANK-OPG (Vernal y cols., 2004). Además, demostraron que RANKL está presente en el fluido gingival de pacientes adultos con periodontitis crónica en niveles significativamente mayores que en los sujetos sanos, lo que permitiría correlacionar esta proteína osteoclastogénica con la pérdida de hueso alveolar y la pérdida de elementos dentarios. También estudiaron la relación entre los niveles de RANKL y los parámetros clínicos de diagnóstico y severidad de la enfermedad y no encontraron asociación significativa. Además, para establecer si existía asociación entre los niveles de RANKL en fluido gingival y la actividad de enfermedad, adicionalmente analizaron los niveles de RANKL en sitios periodontales activos e inactivos, determinados mediante el método de la tolerancia (Haffajee y cols., 1983), los resultados mostraron que los niveles de RANKL son significativamente mayores en sitios activos versus inactivos, sugiriéndolo como un marcador de la progresión de actividad (Vernal y cols., 2004; Vernal y cols., 2005A). La actividad de la enfermedad periodontal es generalmente aceptada como pérdida de inserción de tejidos del diente; un cambio en el nivel de inserción clínica puede representar un verdadero cambio en el nivel inserción (Jeffcoat y Reddy, 1991). La pérdida de inserción periodontal episódica puede estar asociada con variaciones en la población de células inflamatorias supracrestales donde se observan un mayor número de mastocitos, monocitos/macrófagos y células plasmáticas en sitios activos en comparación con los inactivos (Zappa y cols., 1990). La presencia de RANKL en fluido gingival en sitios con pérdidas episódicas de tejido conectivo implica un posible papel en los mecanismos de destrucción de los tejidos asociada con la periodontitis (Vernal y cols., 2004).

Mogi y cols. examinaron la concentración de RANKL y OPG en el fluido gingival de pacientes con periodontitis y de individuos sanos. Se detectó un aumento en la concentración de RANKL y un descenso en la de OPG en el fluido gingival de los pacientes con periodontitis. El cociente entre la concentración de RANKL y la de OPG en el fluido gingival fue significativamente superior en los pacientes con enfermedad periodontal respecto a los individuos sanos. Estos resultados indicaron que el aumento en la producción de RANKL podría asociarse con la resorción del hueso alveolar,

y que los linfocitos son una de las principales células que expresan RANKL en el tejido con periodontitis (Mogi y cols.2004).

Garlet y cols., en un estudio experimental observaron como las concentraciones relativas de RANKL y OPG se modificaban durante la progresión de enfermedad periodontal instalada en ratas a las cuales se inoculó *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. En esta investigación se observó que la pérdida de hueso se correlacionaba con un patrón de expresión en el que RANKL aumentaba en relación con OPG sobre la primera parte del período de estudio, coincidente con un rápido aumento de la pérdida de hueso (día 0 a 15). Durante la última parte del período de estudio (días 30 a 60), donde la tasa de pérdida ósea disminuyó, se observó una marcada reducción en la concentración de RANKL, mientras que la concentración de OPG estaba en su punto más alto (Garlet y cols., 2006).

Lu y cols. identificaron y cuantificaron OPG y RANKL en el fluido gingival y el tejido conectivo de los pacientes con periodontitis y se compararon los resultados con un grupo control de pacientes sanos. Además se intentó aclarar las posibles correlaciones con la severidad de la enfermedad y la interleuquina-6 (IL-6) y oncostatin M (OSM). Los niveles de RANKL, OPG, IL-6 y OSM en fluido gingival fueron determinados mediante test de ELISA. Mientras que en las muestras de tejido conectivo se determinaron los niveles de RANKL y OPG mediante inmunohistoquímica. El análisis del fluido gingival estableció que los niveles de RANKL, pero no OPG, fueran elevados en pacientes con periodontitis. Si bien no fue posible determinar una correlación entre RANKL-OPG y la severidad de la patología periodontal, se pudo establecer una correlación significativa entre los niveles de RANKL en fluido gingival con IL-6 y OSM. La tinción inmunohistoquímica mostró que las células RANKL-positivas se distribuyeron de manera significativa en la zona de tejido conectivo inflamatorio de la encía enferma, en comparación con los de las muestras de personas sin patología. Sin embargo, algunas células OPG-positivas se encontraron en biopsias de tejido conectivo gingival ya sea sano o enfermo (Lu y cols., 2006).

Bostanci y cols. compararon los niveles de expresión del ARNm de RANKL y OPG expresados como la relación entre ambas citoquinas en los tejidos gingivales en pacientes con gingivitis, periodontitis crónica y periodontitis agresiva generalizada, pacientes con periodontitis crónica bajo tratamiento inmunosupresor y pacientes sanos. En este estudio se empleó la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR)

cuantitativa. En comparación con individuos sanos, se detectó que los niveles de RANKL y la relación RANKL/OPG eran mayores en los tres grupos de periodontitis estudiados (asignando el valor más elevado al grupo que presentaba periodontitis agresiva generalizada), a diferencia de los valores obtenidos en el grupo que presentaba gingivitis. Además, la expresión de OPG fue menor en los pacientes con periodontitis crónica. Cuando los pacientes con periodontitis crónica y periodontitis generalizadas fueron comparados, estos últimos mostraron mayor expresión de RANKL, mientras que el primer grupo exhibió una débil expresión de OPG, y con respecto a la relación RANKL/OPG no existieron diferencias en su proporción. Al momento de comparar los pacientes con periodontitis crónica con pacientes con periodontitis crónica que recibían tratamiento inmunosupresor, la OPG, pero no RANKL, tuvo una expresión más fuerte en este último grupo (Bostanci y cols., 2007 (B)). De esta manera, demostraron que la expresión genética de RANKL y OPG son regulados diferencialmente en los tejidos gingivales dependiendo de la forma de la enfermedad periodontal, y que un aumento en la expresión de la relación RANKL/OPG en los tejidos puede indicar la ocurrencia de la periodontitis (Bostanci y cols. 2007(B)).

En otro estudio Bostanci y cols. compararon los niveles de RANKL, OPG y la relación entre ambas citoquinas en fluido gingival en pacientes con gingivitis, periodontitis crónica y periodontitis agresiva generalizada, pacientes con periodontitis crónica bajo tratamiento inmunosupresor y pacientes sanos. En este estudio los niveles de RANKL fueron bajos en los grupos sanos y en aquellos que presentaron gingivitis, pero elevados en los tres grupos de periodontitis. Además, los niveles de OPG fueron elevados en los pacientes sanos a diferencia de los grupos restantes. Con respecto a la relación RANKL/OPG se observó una importante diferencia entre los tres grupos de periodontitis y los grupos sanos y con gingivitis. No existieron diferencias en los niveles de RANKL y OPG en los grupos con periodontitis crónica y periodontitis agresiva generalizada, mientras que en el grupo de periodontitis crónica bajo tratamiento inmunosupresor los niveles fueron menores (Bostanci y cols., 2007 (A)).

Wara-aswapati y cols., demostraron que el ARNm de RANKL era superior en los tejidos con periodontitis en comparación con el grupo control, mientras que el ARNm de OPG mostró una tendencia a ser disminuido, pero los resultados no fueron estadísticamente significativos, quizás debido a las marcadas diferencias con respecto a la edad y el género. Los resultados

demonstraron que el incremento de ARNm de RANKL y el aumento de la relación ARNm RANKL/OPG sugiere que el balance de estos dos factores es crítico para regular la destrucción ósea en la periodontitis. (Wara-aswapati, 2007).

Por lo tanto, estos hallazgos refuerzan aún más el valor diagnóstico de la relación RANKL/OPG, ya que indican que pueden asociarse con la progresión de la destrucción periodontal.

5.3 Enfermedad periodontal y Bifosfonatos.

Podemos decir que aunque la etiología de la osteoporosis postmenopáusica y la periodontitis son diferentes, la pérdida de masa ósea en ambas patologías comparten varias características, una de ellas a través de interacción entre los componentes del sistema RANK-RANKL-OPG. De manera que, la terapéutica utilizada para la osteoporosis puede ser considerada de valor para el tratamiento de la enfermedad periodontal.

Por este motivo, numerosos estudios realizados en modelos animales han evaluado el efecto de los bifosfonatos en el periodonto. En un estudio realizado en perros con enfermedad periodontal, los bifosfonatos no prevenían la pérdida de inserción periodontal, pero el grupo tratado con bifosfonatos demostró un incremento óseo respecto del grupo control tratado con placebo (Reddy y cols., 1995). En otros estudios realizados en monos con periodontitis inducida se observó que los bifosfonatos reducían la pérdida de inserción y prevenían la pérdida de densidad ósea (Brunsvold y cols., 1992; Weinreb y cols., 1994). Mientras que otros estudios han demostrado que los bifosfonatos no incrementan o bien no tiene efecto sobre la producción de OPG en los fibroblastos gingivales (Viereck y cols., 2002; Pan y cols., 2004).

Por otro lado, Kim y cols. demostraron que los bifosfonatos que contienen nitrógeno, como el alendronato y pamidronato, no alteraban la expresión de ARNm de RANKL y OPG a favor de la inhibición de la formación de osteoclastos. Aunque estos bifosfonatos inhiben la formación de osteoclastos y la resorción ósea en co-cultivos de células osteoblásticas de ratón y células de médula ósea, estos efectos inhibidores no parecen estar relacionadas con la regulación de la expresión de ARNm de RANKL y OPG. En conjunto, se podría sugerir que RANKL y OPG podrían no ser el blanco principal de los bifosfonatos para inhibir la resorción ósea (Kim y cols., 2002).

Tipton y cols., demostraron que la acción del alendronato y pamidronato en fibroblastos gingivales humanos, a través de la alteración de la producción de RANKL y OPG, parece contribuir a un microambiente que favorece la inhibición de la resorción ósea y por ende ambos bifosfonatos reducían claramente la relación RANKL/OPG, debido a un aumento general, o ningún cambio, en los niveles de OPG, y una disminución en la producción de RANKL (Tipton y cols., 2011).

6. Osteoporosis/osteopenia post-menopáusica y enfermedad periodontal

Existen múltiples contactos anatómicos y vasculares, así como diferentes mecanismos moleculares y celulares, que permiten la interacción permanente entre el tejido óseo y el sistema inmune, de tal forma que podemos considerarlos como un conjunto funcional integrado denominado sistema osteoinmune (Geusens y Lems, 2011). Las células de ambos sistemas comparten orígenes comunes, ya que los osteoclastos proceden de células madre hematopoyéticas y comparten su linaje con los monocitos y los macrófagos, mientras que las células madre mesenquimales son las precursoras de los osteoblastos que, a su vez, desempeñan un papel central en la diferenciación de las células madre hematopoyéticas en los nichos adyacentes a la superficie endóstica (Calvi y cols., 2003). Por otro lado, la estructura ósea y el sistema inmune tienen una gran variedad de moléculas reguladoras en común procedentes de linfocitos, células dendríticas y macrófagos, que actúan sobre las células del remodelado óseo (osteoblastos y osteoclastos) por diferenciación a partir de sus precursores inmaduros, tanto en su vertiente resortiva, generalmente a través de la vía RANK-RANKL-OPG, como en su vertiente osteoformadora (Monroe y cols., 2012). De manera que cambios en la fisiología y la patología de un sistema pueden afectar al otro (Takayanagi, 2005).

La etiología bacteriana de la enfermedad periodontal está demostrada. Sin embargo, asociar la pérdida de hueso alveolar con la pérdida sistémica de la densidad de hueso producido por la osteoporosis nos lleva a pensar que existen huéspedes susceptibles a la destrucción periodontal ocasionada por las bacterias. Los factores de riesgo comunes en ambas patologías, entre otras razones, nos llevan a asociar estas dos enfermedades. Al ser la osteoporosis una alteración con características comunes con la enfermedad periodontal por su cronicidad, por afectar a personas de avanzada edad y por provocar una pérdida ósea, se ha planteado la posibilidad de que la primera potencie a la segunda y de que, de otro modo, la aparición de la segunda pueda ser un signo de alerta respecto al padecimiento de la primera.

Diversos autores han planteado la posibilidad de que la osteoporosis favorezca la evolución de la enfermedad periodontal, ya que su curso transcurre con la destrucción del hueso alveolar y, en un sustrato que se

encuentra con una resistencia disminuida, la progresión podría ser más rápida y agresiva que en aquellas personas que presentan un hueso sano.

Numerosas investigaciones de varios estudios prospectivos apoyan la asociación de la osteoporosis con el inicio y la progresión de la enfermedad periodontal en humanos.

Women's Health Initiative (WHI), encontraron que las mujeres con osteoporosis tenían más de tres veces la cantidad de pérdida de altura del hueso alveolar que las mujeres que no tenían osteoporosis, con independencia de que también tenían periodontitis. Estos hallazgos sugieren que el estado óseo sistémico puede influir en la progresión de la pérdida de hueso alveolar de forma independiente.

La osteoporosis, aunque no es la causa inicial de la periodontitis, se ha intentado demostrar que es un indicador de riesgo que puede contribuir a la progresión de la enfermedad periodontal. Algunos estudios han intentado correlacionar osteoporosis con la enfermedad periodontal obteniendo resultados significativos (Von Wowern y cols., 1994; Mohammad y cols., 1997; Payne y cols., 1999; Tezal y cols., 2000; Inagaki y cols., 2005), mientras que otros no (Elders y cols., 1992; Klemetti y cols., 1994).

Kribbs y cols., fueron los primeros en abordar la relación de las mujeres con osteoporosis con un estudio que evaluó el calcio corporal total por análisis de activación de neutrones, y encontraron una asociación con la densidad de la mandíbula cuando se medía por análisis cuantitativo en las radiografías intraorales (Kribbs y cols., 1983). En 1989, otro estudio realizado por el mismo autor en 85 mujeres post-menopáusicas, observó que el calcio corporal total, la masa ósea en el radio y la densidad ósea en la columna se correlacionaban con la masa ósea mandibular (Kribbs y cols., 1989). Mientras que en 1990, realizaron una comparación de 85 pacientes osteoporóticas y 27 mujeres normales, y demostraron que el grupo de pacientes osteoporóticas tenían menos masa y densidad ósea mandibular y una cortical más delgada en el gonion que en el grupo normal (Kribbs, 1990).

Jacobs y cols., en un estudio longitudinal de 69 mujeres que recibían terapia de reemplazo hormonal, evaluaron la densidad mineral ósea (DMO) de columna lumbar mediante absorciometría dual fotónica. Durante el período de observación de un promedio de cinco años, se observó un efecto positivo de la terapia de reemplazo de estrógenos sobre la masa ósea de la mandíbula y la columna lumbar (Jacobs y cols., 1996).

Streckfus y cols. utilizaron mediciones cuantitativas de radiografías aleta de mordida vertical y radiografías de la mano en pacientes con periodontitis activa. Los resultados de este estudio mostraron que las mujeres post-menopáusicas con terapia de estrógenos tenían más pérdida de hueso alveolar, más dientes perdidos y más reducción de la densidad ósea alveolar y del segundo metacarpiano que las mujeres pre-menopáusicas. También las densidades óseas alveolares estaban fuertemente correlacionadas con las densidades de segundo metacarpiano (Streckfus y cols., 1997).

Southard y cols., en un estudio en 41 mujeres caucásicas dentadas de edades entre 20-78 años evaluaron ambos maxilares utilizando radiografía intraoral cuantitativa y las densidades óseas sistémicas determinadas por absorciometría de energía dual de rayos x. La densidad del hueso del proceso alveolar maxilar se relacionó significativamente con la densidad del proceso alveolar mandibular, columna lumbar, cadera y radio en mujeres sanas y de la densidad del hueso del proceso alveolar maxilar disminuyó con la edad (Southard y cols., 2000).

Shrout y cols. realizaron un estudio en 45 mujeres post-menopáusicas sanas o con enfermedad periodontal leve (profundidad de sondaje menor de 5 mm), utilizando mediciones morfológicas a partir de imágenes digitalizadas de radiografías aleta de mordida y se correlacionó con la DMO lumbar y femoral. La complejidad del patrón trabecular se correlacionó débilmente con la DMO de la columna lumbar y femoral (Shrout y cols., 2000).

Otras investigaciones utilizaron una variedad de parámetros para evaluar la gravedad de la enfermedad periodontal en pacientes con disminución de la densidad mineral ósea, encontrando en la mayoría de los casos una asociación entre la reducción de la densidad mineral ósea y el aumento de gravedad de la enfermedad periodontal. (Civitelli y cols., 2002; Jeffcoat y cols., 2000; Tezal y cols., 2000; Von Wowern y cols., 1994). Sin embargo, varios informes que estudiaron la relación entre la pérdida de dientes y la DMO y los resultados fueron contradictorios.

En un informe de Elders y cols., se compararon la DMO lumbar y el grosor de la cortical metacarpiana con la altura del hueso alveolar en las radiografías de aleta de mordida y los parámetros clínicos de la periodontitis. En este estudio no se observó una relación significativa entre las mediciones de la masa ósea y la altura del hueso alveolar y los parámetros periodontales. Sin embargo, la edad media en este grupo fue relativamente joven entre 46-55

años de edad, lo que podría haber contribuido a la falta de correlación (Elders y cols., 1992).

Von Wower y cols. en un estudio realizado en 12 mujeres osteoporóticas con historia de fracturas y tras evaluar la osteoporosis con el contenido mineral óseo en la mandíbula y el antebrazo, encontraron una disminución del contenido mineral óseo en la mandíbula en comparación con 14 mujeres normales que constituían el grupo control; además demostraron una importante pérdida de inserción en mujeres osteoporóticas cuya edad promedio oscilaba en los 68 años (Von Wower y cols., 1994).

Payne y cols., en un estudio longitudinal de dos años, estudiaron cambios en la altura y la densidad ósea alveolar en 21 mujeres con osteoporosis / osteopenia, en comparación con 17 mujeres con DMO de columna normal (grupo control). Los resultados demostraron que las mujeres osteoporóticas/osteopénicas exhiben una gran frecuencia de pérdida en altura del hueso alveolar y relativa pérdida de densidad ósea crestral y subcrestral en relación con mujeres con densidad de masa ósea normal. Estos datos sugieren que la osteoporosis u osteopenia es un factor de riesgo para la pérdida de densidad ósea alveolar en las mujeres post-menopáusicas con antecedentes de periodontitis (Payne y cols., 1999).

Birkenfeld y cols., demostraron una correlación positiva entre la masa ósea sistémica y la osteoporosis sistémica con la reabsorción del hueso alveolar (Birkenfeld y cols., 1999).

Reinhardt y cols., estudiaron un grupo de 59 pacientes mujeres con diagnóstico de periodontitis moderada / avanzada y 16 sujetos controles sanos, dentro de cinco años después de la menopausia. Al inicio del estudio los sujetos fueron estratificados en base a los niveles séricos de estradiol. La pérdida de inserción se evaluó durante un período de dos años y se correlacionó con la DMO y los niveles séricos de estradiol. Los niveles de estradiol en suero no influyeron en el porcentaje de los sitios que perdieron inserción, ya sea para los grupos con periodontitis como los sanos. El grupo con deficiencia de estradiol tenía una tendencia hacia una mayor frecuencia de sitios con pérdida de inserción mayor o igual a 2 mm (Reinhardt y cols., 1999).

En otro estudio focalizado en una población de 70 mujeres caucásicas post-menopáusicas de 51 a 78 años de edad, se evaluó la densidad mineral ósea sistémica (mediante DEXA) conjuntamente con la pérdida de inserción y la pérdida ósea alveolar interproximal, que representaban la severidad de la enfermedad periodontal. Los resultados encontrados demuestran una

significativa correlación entre la pérdida ósea alveolar y la densidad ósea sistémica además de una tendencia a la correlación entre los niveles de inserción y la densidad ósea mineral (Tezal y cols., 2000).

Ronderos y cols., estudiaron la correlación de la altura del hueso alveolar y la densidad mineral ósea, los resultados mostraron que los pacientes con osteopenia y osteoporosis presentan mayor incidencia de enfermedad periodontal y sugirieron que la periodontitis se asoció con disminución de la densidad mineral ósea en la región coxofemoral (Ronderos y cols., 2000).

Inagaki y cols., observaron que la pérdida de densidad mineral ósea metacarpal está asociada con la periodontitis en las mujeres japonesas y con la pérdida de dientes después de la menopausia (Inagaki y cols., 2001).

Por otro lado, Lundstörn y cols., en un estudio realizado en mujeres de 70 años de edad, 15 sujetos con osteoporosis se compararon con 21 sujetos con DMO normal, mostraron que no existe ninguna diferencia estadísticamente significativa en el sangrado gingival, profundidad de sondaje, recesión gingival y el nivel óseo marginal entre las mujeres con osteoporosis y las mujeres con densidad mineral ósea normal (Lundstörn y cols., 2001).

Yoshihara y cols., sugiere que existe una relación significativa entre la enfermedad periodontal y la densidad mineral ósea sistémica (Yoshihara y cols., 2004).

Numerosos de estos estudios en el afán de establecer relaciones entre la osteoporosis y la enfermedad periodontal, han asociado la baja densidad mineral ósea mandibular con una mayor pérdida de piezas dentarias, pero cabe destacar que a menudo se desconoce la razón por la cual se ha perdido un elemento dentario de manera que sería posible establecer asociaciones erróneas. Por lo tanto, no es posible utilizar la variable de pérdida de elementos dentarios como medición de la magnitud de destrucción periodontal en el análisis de la relación entre la osteoporosis y la enfermedad periodontal (Ñañez y Grenón, 2006).

Por otro lado, cabe destacar que los estudios transversales tienen limitaciones. No hay información acerca de las enfermedades estudiadas antes del examen. Aunque tanto la osteoporosis y periodontitis son enfermedades crónicas, es incorrecto suponer que estas enfermedades podrían haber estado presentes antes del examen, por lo tanto, para evaluar mejor esta relación, se han realizado estudios longitudinales prospectivos.

El estudio de Women's Health Initiative en la Universidad de Alabama en Birmingham fue diseñado para determinar si existe una asociación entre la

osteoporosis sistémica y la pérdida ósea oral. Se incluyeron 58 mujeres postmenopáusicas. La densidad ósea de la cadera se confirmó con DEXA al inicio del estudio y permitió clasificar a los sujetos en 2 grupos: con y sin osteoporosis. Los sujetos también fueron estratificados sobre la base de la pérdida ósea alveolar como una medida de la condición de la enfermedad periodontal al inicio del estudio. Un sujeto se consideró que padecía periodontitis cuando se midió una disminución de 3 mm o más de la altura del hueso alveolar al inicio del estudio. Se vincularon los antecedentes y exámenes médicos completos con los resultados de los exámenes orales y las radiografías intraorales digitales. Se tomaron radiografías de aleta de mordida vertical estandarizadas al inicio del estudio y a los tres años siguientes. La altura del hueso alveolar se midió utilizando el software Periovision. Las mediciones se realizaron en los sitios mesiales y distales de los dientes posteriores. Los sujetos con enfermedad periodontal al inicio del estudio mostraron mayores cantidades de pérdida ósea alveolar que los sujetos sin enfermedad periodontal. La mayor cantidad de pérdida ósea alveolar se encontró en el grupo de sujetos que padecían enfermedad periodontal y osteoporosis. Esto indicaría que la osteoporosis o la baja densidad ósea sistémica pueden considerarse como un factor de riesgo para la progresión de la enfermedad periodontal (Geurs y cols., 2003).

Por otro lado, considerando otra línea de investigación, datos presentados por unos estudios (Liang y cols. 2008; Shu y cols., 2008) sugieren que el estrógeno desempeña un papel importante ejerciendo efectos antirresortivos en hueso alveolar, al menos en parte, mediante el aumento de la expresión de los niveles de OPG frente a la expresión de RANKL en las células del ligamento periodontal (Liang y cols., 2008; Shu y cols., 2008). Mientras que Srivastava y cols., demostraron que el estrógeno reprime la formación de osteoclastos a partir de la disminución de la capacidad de respuesta de los precursores osteoclásticos al RANKL (Srivastava y cols., 2011). Si bien diversas investigaciones han reportado que la pérdida de sustancia ósea en los maxilares es el reflejo que lo mismo está sucediendo en otros huesos del cuerpo los resultados no fueron del todo concluyentes; y algunos demostraron ser contradictorios.

Considerando que ambas enfermedades tienen como denominador común el remodelado óseo anormal que condiciona una pérdida de masa ósea, y en éste se encuentra involucrado el sistema RANK-RANKL-OPG; se decidió estudiar ambas patologías desde el análisis de estas citoquinas.

Objetivo general:

- Evaluar la relación entre RANKL/OPG y sus variaciones en fluido gingival en pacientes mujeres post-menopáusicas con osteoporosis/osteopenia y enfermedad periodontal.

Objetivos específicos:

- Evaluar los niveles de concentración de RANKL, OPG en fluido gingival en pacientes mujeres post-menopáusicas que padecen enfermedad periodontal y osteoporosis/osteopenia.
- Evaluar el efecto que ejerce el consumo de bifosfonatos en los niveles de concentración de RANKL, OPG y la relación RANKL/OPG.
- Evaluar la asociación entre los niveles de concentración de RANKL, OPG y su relación RANKL/OPG sobre los parámetros clínicos (edad, nivel de inserción clínica, profundidad de sondaje, registro de placa bacteriana y registro de hemorragia)
- Evaluar la asociación de los niveles de la relación RANKL/OPG sobre el nivel de inserción clínica como indicador de riesgo periodontal.

*“Usa el método científico: probando
varias veces, llegarás a la verdad.”*

Marco Tulio Cicerón

7. Selección de pacientes

Se estudiaron 81 sitios periodontales activos procedentes de 31 pacientes mujeres post-menopáusicas con edades comprendidas entre 45-70 años de edad con periodontitis crónica derivadas del consultorio de día del Departamento de Ginecología del Hospital Universitario de Maternidad y Neonatología. La metodología para la incorporación de los pacientes fue la siguiente:

1. Admisión: en ese momento se confeccionó la historia clínica y se firmó el consentimiento informado el cual ha sido avalado y aprobado previamente por el Comité de Bioética del Hospital Universitario de Maternidad y Neonatología (asignándole como n° de Repis: 001) donde se llevó a cabo el reclutamiento de los pacientes.

2. Obtención de la muestra de fluido gingival.

3. Confección de la ficha periodontal

4. Diagnóstico de enfermedad periodontal, posteriormente se realizó la orientación terapéutica y derivación de la paciente al consultorio externo de la Cátedra "A" de Periodoncia – Facultad de Odontología- UNC para recibir la atención adecuada a la patología que presente.

7.1 Criterios de inclusión

Se establecieron como criterios de inclusión para esta investigación:

- Pacientes mujeres post-menopáusicas entre 45-70 años de edad (teniendo en consideración el estatus hormonal) con y sin consumo de bifosfonatos (risedronato o ibandronato 150mg 1 comprimido por mes, por un período mayor a los 3 meses del inicio de tratamiento) y que no se encuentren consumiendo ningún otro medicamento, excepto calcio.

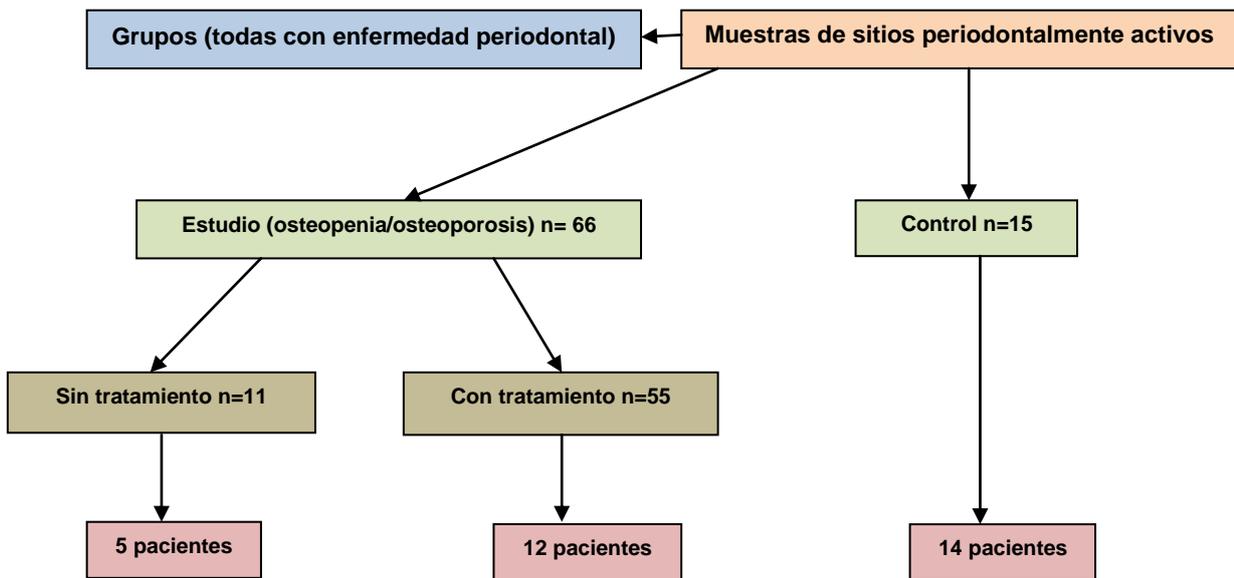
- Pacientes eutiroides.

- Pacientes con enfermedad periodontal en 5 o más sitios, con un registro de profundidad de sondaje con un mínimo de 3 mm y un mínimo de pérdida de inserción de 1 mm.

- Pacientes con Absorciometría de Rayos X de Energía Dual (DEXA).

7.2 Criterios de exclusión

- Pacientes con condiciones médicas agudas o crónicas.
- Pacientes periodontalmente sanas.
- Pacientes con antecedentes de periodontitis agresivas.
- Pacientes que recibieron tratamiento terapéutico con antibióticos o antiinflamatorios o glucocorticoides durante un período de 6 meses previos al inicio del estudio.
- Pacientes que recibieron tratamiento periodontal durante un período de 6 meses previos al inicio de la investigación.
- Pacientes fumadoras



Observaciones: grupo estudio (n= muestras de fluido gingival de sitios periodontalmente activos obtenidos de pacientes con osteoporosis/osteopenia y enfermedad periodontal) con/sin tratamiento con bifosfonatos; grupo control (n= muestras de fluido gingival de sitios periodontalmente activos obtenidos de pacientes con condición ósea sistémica normal y enfermedad periodontal)

8. Diagnóstico de la patología ósea sistémica

La Absorciometría de Rayos X de Energía Dual (DEXA) puede diagnosticar una osteoporosis densitométrica, no la osteoporosis como enfermedad sistémica establecida. En 1994 la OMS publicó los criterios para la clasificación de la osteoporosis basados en la medición de la densidad mineral ósea (DMO). Estos criterios se han utilizado ampliamente para fijar el umbral a partir del cual diagnosticar y tratar la osteoporosis/osteopenia, sin tener en cuenta que, en realidad, se establecieron para la realización de estudios epidemiológicos y de investigación. Esto ha derivado en una confusión terminológica entre osteoporosis "densitométrica" ($DMO \leq -2,5$ DE, clasificada como osteoporosis según el criterio de la OMS), que es un factor de riesgo de futuras fracturas y osteoporosis como enfermedad clínica, que es el proceso que predispone a la aparición de fracturas. En realidad la DMO baja es un factor de riesgo de fracturas, no un criterio diagnóstico de osteoporosis como enfermedad establecida, la relación entre la DMO y el riesgo de fracturas depende de la edad.

DEXA es el método para evaluar el contenido mineral de todo el esqueleto, así como de lugares específicos, incluidos los más vulnerables a las fracturas (Genant y cols., 1996). El término "contenido mineral del hueso" describe la cantidad de mineral escaneado en un sitio específico del hueso, en la que un valor de la DMO se puede derivar dividiendo el contenido mineral del hueso por el área o el volumen medido.

De las muchas técnicas desarrolladas para evaluar la masa ósea, contenido mineral óseo u otros aspectos relacionados con la masa o la estructura del esqueleto, la técnica más desarrollada y bien validada biológicamente es la DEXA. Esta técnica es utilizada para el diagnóstico-pronóstico de la osteoporosis y seguimiento de la historia natural de la enfermedad, como así también para evaluar la respuesta al tratamiento.

La masa ósea y la densidad se mantienen relativamente constantes una vez que haya finalizado el crecimiento, hasta aproximadamente los 50 años de edad en las mujeres y 65 años en los hombres (Bonjour y Rizzoli, 1996). Los valores individuales de la densidad ósea se expresan en relación a una población de referencia en unidades de desviación estándar, esto reduce los efectos de las diferencias en la calibración entre los instrumentos. Unidades de desviación estándar utilizadas en relación a la población joven y sana se llaman T-score.

Un Grupo de Estudio de la World Health Organization (WHO) sobre la base de mediciones por DEXA propuso las siguientes categorías generales de diagnóstico para mujeres (WHO, 1994):

- Normal. Un valor de DMO dentro de 1 desviación estándar de la referencia media de los jóvenes adultos (T-score ≥ -1).
- Masa ósea baja (Osteopenia). Un valor de DMO de más de 1 desviación estándar por debajo de la media de un joven adulto, pero menos de 2 desviaciones estándar por debajo de este valor (T-score < -1 y $> -2,5$).
- Osteoporosis. Un valor de DMO 2.5 desviaciones estándar o más por debajo de la media de un joven adulto (T-score $< -2,5$).
- Osteoporosis severa (Osteoporosis establecida). Un valor de DMO 2.5 desviaciones estándar o más por debajo de la media de un adulto en presencia de una o más fracturas por fragilidad.

Las técnicas estándares DEXA utilizan una proyección en dos dimensiones por lo tanto miden la densidad más superficial (g/cm²) y no (g/cm³). Por lo tanto, el tamaño del hueso afecta la densidad aparente ya que la relación entre el área y el volumen es no lineal. Las inexactitudes sistemáticas con DEXA se producen particularmente en la columna vertebral ya que las vértebras son irregulares en forma y aparente densidad, y el contenido mineral dependerá, en parte, en el algoritmo utilizado para la detección de bordes. Este error sistemático en la medición de la DMO cuando se utilizan diferentes máquinas puede ser parcialmente evitado usando el T-score (WHO, 2000).

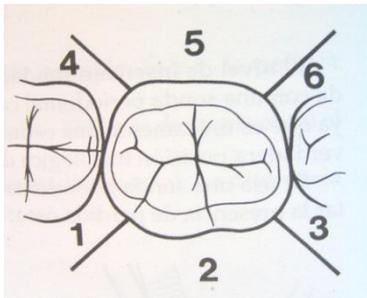
El Z-score se utiliza a menudo para conseguir una mejor interpretación de los resultados. Z representa diferencia de la medida de la densidad mineral ósea de acuerdo a la población apropiada en unidades de desviación estándar. La puntuación Z se relaciona con la raza, edad y sexo de la misma población.

Por lo anteriormente expresado, DEXA fue el método utilizado para evaluar la densidad mineral y determinar la condición ósea sistémica.

9. Diagnóstico periodontal

Este se realizó mediante registros clínicos dicotómicos de hemorragia (RH) y de placa bacteriana o biofilm (RPB), profundidad de sondaje (PS) y nivel de inserción clínica (NIC) expresados en mm. Las piezas dentarias fueron examinadas en seis sitios por elemento dentario utilizando una sonda tipo Marquis (mesiobucal, bucal, distobucal, linguobucal, lingual, distolingual) para los registros de NIC y PS y en cuatro sitios (mesial, vestibular, distal y lingual) para los registros de RH y RPB. Además se realizaron estudios radiográficos para confirmar diagnóstico clínico periodontal y descartar otras patologías.

Todos los registros fueron realizados por el mismo investigador.



Se consideró como:

Pacientes con enfermedad periodontal: 1 o + sitios con $PS \leq 4$ mm y $NIC \leq 4$ mm. Academia Americana de Periodoncia (AAP, 2000).

Sitios enfermos (o periodontalmente activos): sitios con hemorragia (+)

Lang y cols. (1986), opinan que los sitios que sangran repetidamente están sometidos a un alto riesgo de futuras pérdidas de inserción (Lang y cols., 1986). Pese a la baja sensibilidad de este parámetro clínico para identificar la progresión de la enfermedad periodontal, Lang y cols. (1990) observaron que en un grupo de pacientes monitorizados por un período de dos años y medio, tras recibir tratamiento periodontal, los sitios que no sangraron durante las reevaluaciones permanecían estables, concluyendo que la ausencia de hemorragia al sondaje se presentó como un parámetro bastante específico. Así, la hemorragia después de un suave sondeo representa un parámetro objetivo de inflamación y ha sido incorporado en los diversos sistemas de indexación para la evaluación de las condiciones periodontales, dado que los sitios saludables no sangran (Lang y cols., 1990).

Profundidad de sondaje (PS)

Se considera profundidad de bolsa a la distancia del margen gingival al fondo de la bolsa, se mide por medio de una sonda graduada en milímetros (Lang y cols. 2003).

Nivel de inserción clínica (NIC)

Es la distancia desde el límite cemento-adamantino hasta el fondo de la bolsa se mide con una sonda graduada en milímetros. Nos indica los milímetros perdidos de inserción periodontal (Lang y cols. 2003).

Ficha Periodontal

	18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28		
	X																%	Registro Placa Bacteriana
	X																%	Registro Hemorragia
M	/																P.S.	Profundidad de sondaje Nivel de Inserción Clínica
V	/																N.I.C.	
D	/																N.I.C.	
M	/																P.S.	Profundidad de sondaje Nivel de Inserción Clínica
P	/																N.I.C.	
D	/																N.I.C.	
																		Diagnóstico*

Imagen 1. Ficha periodontal en la cual se asentaron los registros de PS, NIC, RH y RPB de cada sujeto evaluado.

El nivel de inserción clínica se considera una medida más precisa que la profundidad de sondaje, éste es aceptado como el estándar de oro para la gravedad de la enfermedad y la progresión. Sin embargo, el uso del nivel de inserción clínica por sí solo podría incluir erróneamente algunos sitios

periodontalmente sanos, porque la pérdida de inserción puede acompañarse de una recesión gingival no inflamatoria.

Debe señalarse que las mediciones de la profundidad del sondaje, siempre que no se usen como el criterio principal para establecer la gravedad de la periodontitis, son una pieza útil de información, porque el margen gingival no es un punto de referencia fijo desde el que se puede medir. El margen gingival puede, con el tiempo, desplazarse apical o coronalmente con respecto a la línea amelocementaria y, por lo tanto, no es un buen punto de referencia para valorar los cambios longitudinales de la inserción clínica. Sin embargo, la profundidad del sondaje tiene gran importancia porque proporciona una valoración útil de la localización y el tamaño del principal hábitat (bolsas periodontales) de las bacterias subgingivales.

El uso de profundidad de sondaje solo probablemente resultaría en una subestimación de la prevalencia, especialmente en las personas mayores. La profundidad de sondaje y el nivel de inserción clínica son medidas equivalentes de la periodontitis en edades más jóvenes. Después de la mediana edad, el nivel de inserción clínica sigue avanzando, sin embargo, la profundidad de sondaje ralentiza debido a la recesión gingival, y ya no tiene una alta correlación con el nivel de inserción.

Por otro lado, aunque en una periodontitis de mayor severidad los parámetros clínicos de profundidad de sondaje y nivel de inserción clínica son mayores, esto asociado a una mayor historia de pérdida de hueso alveolar acumulada, no necesariamente significa que un individuo con periodontitis severa esté sufriendo un mayor proceso de activa destrucción ósea en comparación a uno con severidad de enfermedad menor, en un momento determinado. Uno de los modelos clínicos actualmente más aceptado que explica la historia natural de la periodontitis la define como una enfermedad sitio-específica de progresión episódica. Esto es, que la pérdida de hueso alveolar asociada a la infección no sigue un curso lineal de destrucción, sino que, responde a un proceso cíclico de episodios cortos, únicos o múltiples, de activa destrucción del tejido periodontal, seguido de largos períodos de latencia en los que no hay evidencia de destrucción e incluso puede existir regeneración de los tejidos perdidos (Becker y cols., 1979; Haffajee y cols., 1983; Lindhe y cols., 1983; Goodson y cols., 1982). Durante los períodos de progresión de la enfermedad, la liberación de mediadores inflamatorios aumenta en todas las zonas de la boca del paciente, tanto estables como progresivas. Además, las zonas clínicamente sanas en pacientes con

enfermedad progresiva son, probablemente, diferentes de las zonas sanas de pacientes sanos, que albergan diferente placa microbiana (Ximénez-Fyvie y cols., 2000) y exhiben una respuesta del huésped distinta (Tanner y cols., 1996). Aunque la enfermedad progresa de forma diferente en cada zona a causa de sus características específicas (Tanner y cols., 1996), la respuesta del huésped es más global y sigue el mismo patrón en todas las zonas del interior de la boca de cada individuo. Esto fue confirmado por Figueredo y cols. (Figueredo y cols., 1999), quienes constataron que los niveles de interleuquina 1 en el fluido gingival aumentaban en las muestras de pacientes con periodontitis, independientemente de la gravedad de la enfermedad en la zona de muestreo.

Estas observaciones proporcionan un fuerte argumento para el uso de ambos registros, profundidad de sondaje y nivel de inserción clínica, en la determinación de las condiciones periodontales (Beck, 1992) y de la influencia de las citoquinas en este proceso.

10. Toma de muestras

El fluido gingival (FG), transudado proveniente de los vasos del plexo crevicular, es una puerta de entrada para la enfermedad periodontal. Se compone de sustancias derivadas del suero, leucocitos, bacterias, células epiteliales activadas, células de tejido conectivo y células óseas; la destrucción del tejido durante la inflamación periodontal da como resultado la producción de fragmentos de tejido y la liberación de factores de crecimiento procedentes de los depósitos tisulares (Brill y Krasse 1958). Todas estas sustancias reflejan el proceso de enfermedad periodontal, y existe la posibilidad de utilizarlas como indicadores de la patología periodontal. La obtención del fluido gingival es un procedimiento mínimamente invasivo y el análisis de los constituyentes específicos del fluido gingival proporciona un indicador bioquímico cuantitativo para la evaluación del metabolismo celular local que refleja el estado de salud periodontal de cada persona (Champagne y cols., 2004).

La pérdida de inserción periodontal episódica puede estar asociada con variaciones en la población de células inflamatorias supracrestales donde se observan un mayor número de mastocitos, monocitos/macrófagos y células plasmáticas en sitios activos en comparación con los inactivos (Zappa y cols., 1990). La presencia de RANKL en fluido gingival en sitios con pérdidas episódicas de tejido conectivo implica un posible papel en los mecanismos de destrucción de los tejidos asociada con la periodontitis (Vernal y cols., 2004). Los resultados de un estudio realizado por Vernal y cols. mostraron que los sitios periodontales activos presentan significativamente mayores niveles de RANKL en comparación a los sitios inactivos (Vernal y cols., 2005). Por este motivo, la toma de la muestra en esta investigación se realizó de sitios periodontalmente activos.

La toma de la muestra de fluido gingival se efectuó mediante paper-strips (Periopaper, Oraflow INC, NY) realizando 2 determinaciones por paciente correspondiente a cada citoquina (RANKL y OPG). Previo a la recolección de la muestra, se removió cuidadosamente la placa supragingival, sin tocar la encía, para reducir al mínimo la contaminación de las muestras. Los elementos dentarios se lavaron con agua, con mucha suavidad, y los sitios de estudio se aislaron con rollos de algodón y fueron secados suavemente con la jeringa de aire.

De cada muestra se determinó la concentración de RANKL y OPG mediante el Test de ELISA (Kinpara y cols., 2000). De estas citoquinas actualmente se desconocen los rangos normales por lo cual se buscan desbalances en la relación RANKL/OPG. Las muestras fueron conservadas a -80°C.

11. Recolección de fluido gingival

Con los conocimientos generales sobre la técnica de ELISA se decidió experimentar con distintos instrumentos para la obtención de la muestra. Se realizaron pruebas con microcapilares, que miden hasta 10 microlitros, papeles de filtro, micropipetas-microtips y periopapers. Se efectuaron numerosas experiencias con cada uno de los distintos materiales seleccionados, para ello se empleó una citoquina (Interleuquina-1 -IL1- de ratón) y conociendo previamente las concentraciones de cada muestra se intentó evaluar la efectividad del método utilizado con la curva testigo. Esta experiencia determinó que la utilización de periopapers es el método más eficaz para la obtención de fluido gingival.

Los métodos de recolección mediante tiras de papel pueden dividirse en dos grandes grupos: las técnicas intracreviculares y las extracreviculares. En las primeras, la tira se introduce en el interior del surco gingival, mientras que en las segundas se coloca encima de la región gingival para intentar minimizar el traumatismo. Las técnicas intracreviculares son las más utilizadas y pueden subdividirse según si la tira se inserta justo en la entrada del surco o bolsa periodontal (Brill, 1962) o se introduce hasta la base de la bolsa o «hasta percibir una mínima resistencia» (Loe y Holm-Pedersen, 1965), siendo esta última la utilizada en esta investigación.

La recolección de fluido gingival (FG) se realizó mediante tiras de papel.

Se analizaron: 81 muestras de FG de sitios periodontalmente activos obtenidas de 31 pacientes con osteopenia/osteoporosis (55 muestras procedentes de 12 pacientes bajo tratamiento con bifosfonatos y 11 muestras procedentes de 5 pacientes sin tratamiento) y 15 muestras de FG de sitios periodontalmente activos obtenidas a partir de 14 pacientes controles con condición ósea normal.

Después de la recolección del FG, las tiras se colocaron en Eppendorf y las muestras se almacenaron a -80 ° C antes del análisis de laboratorio.

Los papeles de filtro de cada participante fueron agrupados, y el fluido gingival fue extraído y el contenido de RANKL y OPG fue analizado. FG fue extraído de los papeles de filtro mediante un buffer (50mM buffer fosfato, pH 7.2, conteniendo un inhibidor de proteasas), y se recogió luego de la centrifugación a 15000 g a 4°C durante 10 minutos (Imagen 2).

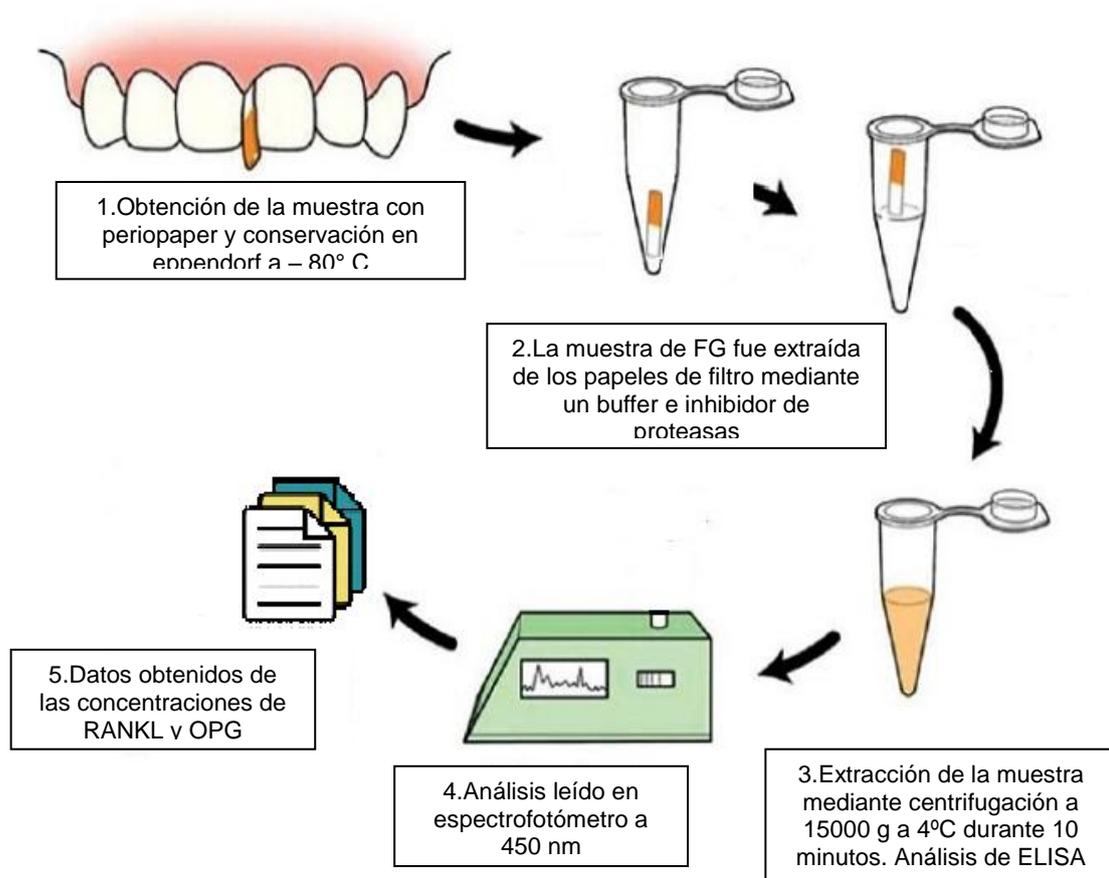


Imagen 2. Proceso de obtención y análisis de las muestras

12. Cuantificación de OPG y RANKL

Un ensayo de ELISA comercial se utilizó para determinar la concentración de RANKL (Antigenix America, NY) y de OPG (Antigenix America, NY), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Brevemente, placas de 96 reservorios cubiertas con anti-human RANKL o anti-OPG fueron incubadas con una dilución del fluido crevicular durante toda la noche a 4°C y luego de los lavados adecuados se incubó con otro anticuerpo policlonal marcado con biotina anti-human RANKL u OPG que reconoce epítopes diferentes al anticuerpo de captura biotinilado. La reacción fue revelada con el agregado de estreptavidina unida a peroxidasa la cual fue visualizada con el agregado de un reactivo de color que cambia en presencia de la enzima (3,3'-5,5'tetrametilbenzidina, TMB). La reacción fue frenada, antes que los blancos tomaran color, con el agregado de ácido sulfúrico y leída en un espectrofotómetro a 450 nm. Para determinar la concentración, la densidad óptica de las muestras fue referida a las curvas realizadas con RANKL u OPG de referencias de concentración conocida.

Una vez realizado el análisis, las muestras se descartaron, a través de los servicios de residuos patógenos de la Facultad de Ciencias Químicas – UNC.

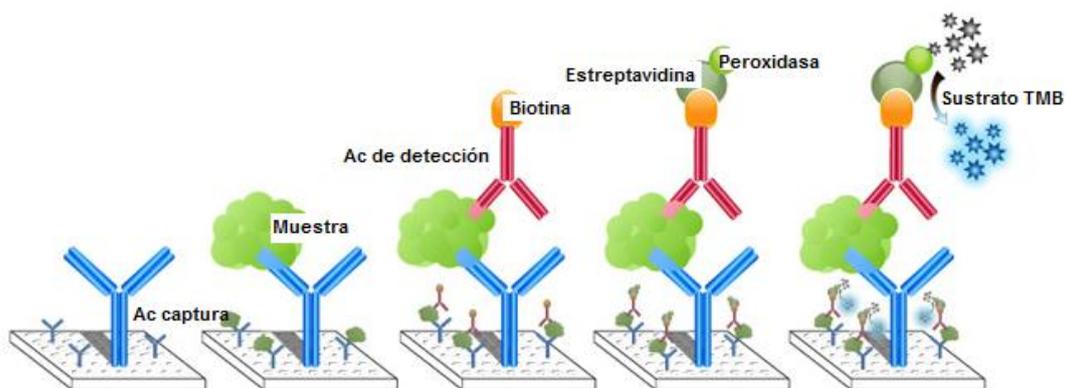


Imagen 3. Esquema realización del Test Elisa sandwich

13. Análisis estadístico

Los datos se presentan como media \pm desviación estándar.

Se empleó para evaluar la distribución de los datos el *Test D'Agostino-Pearson* para determinar si los datos correspondían a una distribución normal. Los valores obtenidos de las citoquinas (RANKL y OPG) y su relación (RANKL/OPG) fueron comparados usando *t Test Mann-Whitney U*. El *Análisis de correlación de Spearman* y el estadístico de *Regresión lineal* se utilizó para determinar la relación entre las variables analizadas mediante el programa **GraphPad Software**. Se consideró como valor estadísticamente significativo $p \leq 0.05$.

“Existe un principio que se resiste a toda información, que se resiste a toda investigación, que nunca deja de mantener al hombre en una ignorancia perenne. . . Es el principio de desestimar lo que no se ha investigado.”

Herbert Spencer

En el proceso de envejecimiento de la mujer se dan una serie de circunstancias fisiológicas que determinan cambios degenerativos en varias localizaciones del cuerpo. Entre estas alteraciones se encuentra la osteoporosis que, como consecuencia, puede provocar la aparición de fracturas patológicas con el consiguiente deterioro de la calidad de vida y desarrollo de complicaciones asociadas.

Tanto la periodontitis y la osteoporosis representan los principales problemas de salud, especialmente en las mujeres de edad avanzada. La relación entre las dos enfermedades y la pérdida de hueso oral es importante considerando el impacto que tiene en la salud pública la prevención de estos trastornos.

Actualmente está aceptado que la enfermedad periodontal es, en lo que respecta a su etiopatogenia, una enfermedad multifactorial causada por microorganismos. La destrucción de los tejidos periodontales que conlleva depende tanto de las bacterias del biofilm y de sus productos como de la respuesta defensiva del huésped.

Diversos autores han planteado la posibilidad de que la osteoporosis favorezca la evolución de la enfermedad periodontal, ya que su curso transcurre con la destrucción del hueso alveolar y, en una estructura ósea que se encuentra con una resistencia disminuida, la progresión podría ser más rápida y agresiva que en aquellas personas que presentan un hueso sano. No obstante, los resultados obtenidos en estas investigaciones fueron contradictorios y poco concluyentes.

En este estudio transversal se tuvo como objetivo investigar la posible asociación entre la osteoporosis/osteopenia y la enfermedad periodontal en mujeres postmenopáusicas evaluando los niveles de RANKL, OPG y su relación RANKL/OPG.

Análisis de las características clínicas entre el grupo de estudio y grupo control

Las características clínicas de los pacientes con osteoporosis/osteopenia y de los individuos con condición ósea normal, ambos grupos con enfermedad periodontal, incluidos en este estudio se muestran en la Tabla 1. En el grupo estudio fueron estudiados 66 sitios periodontalmente activos provenientes de 17 pacientes mujeres post-menopáusicas con osteoporosis/osteopenia y enfermedad periodontal con un rango de edad $56,21 \pm 8,864$. Mientras que en el grupo control se analizaron 15 sitios periodontalmente activos de 14 mujeres post-menopáusicas con condición ósea sistémica normal y enfermedad periodontal, con un rango de edad $53,07 \pm 3,770$. Siendo en el caso de los registros clínicos como: PS y NIC un promedio de los sitios activos medidos, mientras que el RH y RPB es un promedio de toda la cavidad bucal.

No se observaron diferencias significativas en las características clínicas (edad, profundidad de sondaje, nivel de inserción clínica, registro de placa bacteriana y registro de hemorragia) entre ambos grupos.

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

Características clínicas	Control (n=15)	Osteoporosis/osteopenia (n= 66)	p valor
Edad (años)	53,07 \pm 3,770	56,21 \pm 8,864	0,1835
PS (mm sitio)	3,267 \pm 1,163	3,288 \pm 1,134	0,9482
NIC (mm sitio)	3,333 \pm 1,447	3,030 \pm 1,301	0,4273
RPB (%)	54,54 \pm 24,72	62,31 \pm 35,17	0,4206
RH (%)	58,71 \pm 26,14	67,11 \pm 29,18	0,3086

Test-T $p \leq 0.05$

Edad (años). **PS**: Profundidad de sondaje. **NIC**: Nivel de inserción clínica. **RPB**: Registro de placa bacteriana. **RH**: Registro de hemorragia al sondaje.

Relación entre los niveles de RANKL y OPG en fluido gingival en pacientes mujeres post-menopáusicas que padecen enfermedad periodontal y osteoporosis/osteopenia con consumo de bifosfonatos.

Los bifosfonatos han demostrado inhibir la progresión de la osteoporosis resultado de la reducción de la pérdida ósea. Los mismos se han caracterizado por ser moduladores de la función osteoclástica y el metabolismo óseo (Tenenbaum y cols., 2002).

Debido a lo antes mencionado, se decidió observar en un primer momento si existían cambios significativos entre el grupo control (pacientes con condición ósea sistémica normal) y el grupo con osteoporosis/osteopenia bajo tratamiento con bifosfonatos, ambos grupos con enfermedad periodontal.

En este estudio se observaron elevados niveles de RANKL en fluido gingival de 55 sitios periodontalmente activos obtenidos de 12 sujetos con osteoporosis/osteopenia bajo tratamiento con bifosfonatos y enfermedad periodontal, en relación con el grupo control (15 sitios periodontalmente activos obtenidos de 14 sujetos con condición ósea normal y enfermedad periodontal) $p < 0.01$, cuyos valores fueron $26,81 \pm 18,66$ y $9,133 \pm 10,20$ pg/ml respectivamente (Fig. R1). RANKL se detectó en el fluido gingival de todos los sitios periodontalmente activos del grupo osteoporosis/osteopenia bajo tratamiento con bifosfonatos y enfermedad periodontal, sin embargo sólo se detectó en quince de las veinte muestras obtenidas del grupo control –sujetos con condición ósea normal y enfermedad periodontal-.

A diferencia de RANKL, OPG se detectó en todas las muestras de fluido gingival (Fig. R2). Los niveles de OPG fueron menores en el grupo con osteoporosis/osteopenia bajo tratamiento con bifosfonatos y enfermedad periodontal ($0,04587 \pm 0,01666$ pg/ml) comparado a los niveles observados en los sujetos control, sujetos con condición ósea normal y enfermedad periodontal, ($0,3470 \pm 0,5687$ pg/ml) $p < 0.01$ (Fig. R2).

También se calculó la relación RANKL/OPG. El grupo control –sujetos con condición ósea normal y enfermedad periodontal- exhibió una relación RANKL/OPG, que fue de $208,9 \pm 171,8$ pg/ml (Fig. R3). Sin embargo, esta relación fue mayor y estadísticamente significativa en el grupo osteoporosis/osteopenia bajo tratamiento con bifosfonatos y enfermedad periodontal ($693,5 \pm 561,3$ pg/ml) $p < 0.01$ (Fig. R3).

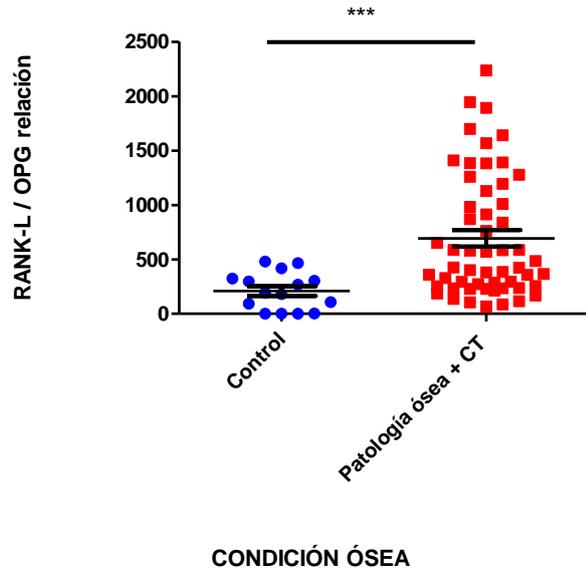


Fig. R3. Distribución de los niveles de la relación entre Ligando del Receptor activador del NF-kB (RANKL)/Osteoprotegerina (OPG) en fluido gingival (FG) de sitios periodontalmente activos de sujetos control (n=15) y con patología ósea con tratamiento con bifosfonatos -CT- (n=55). Los valores individuales representan los valores en FG para la relación RANKL/OPG [RANKL total (pg)/(ml)/OPG total (pg)/(ml)] en cada sujeto.

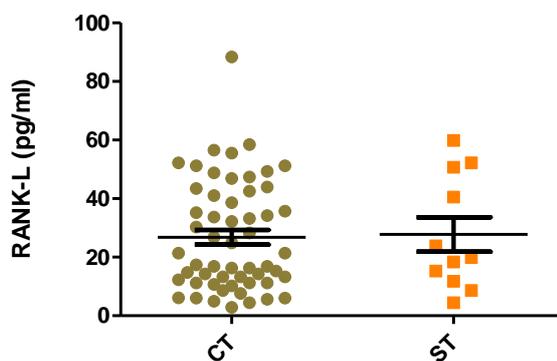
Interesantemente se observó que el consumo de bifosfonatos aparentemente no ejercería ningún efecto en los niveles de RANKL, OPG y su relación. Por ello, fue necesario esclarecer la influencia de los bifosfonatos en los niveles de las citoquinas evaluadas a través de la incorporación de un grupo de pacientes mujeres post-menopáusicas que padecen enfermedad periodontal y conjuntamente osteoporosis/osteopenia sin tratamiento con bifosfonatos ni ninguna otra droga.

Análisis de los niveles de RANKL, OPG y el cociente RANKL/OPG en fluido gingival en pacientes mujeres post-menopáusicas que padecen enfermedad periodontal y osteoporosis/osteopenia respecto al consumo de bifosfonatos.

Los sitios periodontalmente activos obtenidos de sujetos con osteoporosis/osteopenia bajo tratamiento con bifosfonatos y enfermedad periodontal (n=55) no mostraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de RANKL en relación con el grupo con osteoporosis/osteopenia sin tratamiento con bifosfonatos y enfermedad periodontal (n=11), $p= 0,8758$, cuyos valores fueron $26,81\pm 18,66$ y $27,78\pm 19,50$ pg/ml respectivamente (Fig. R4).

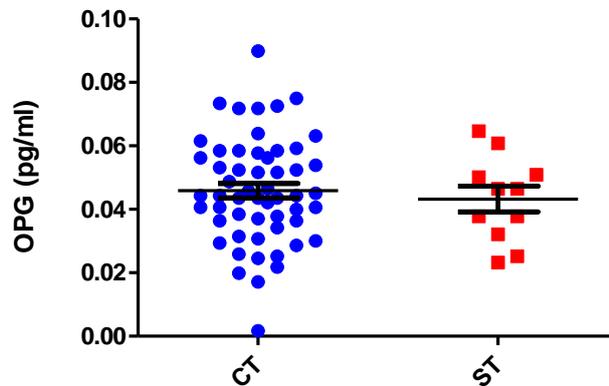
OPG mostró similar comportamiento que RANKL, se detectó que los niveles de OPG entre los dos grupo (con y sin tratamiento con bifosfonatos) no presentaron diferencias estadísticamente significativas, $p= 0,6236$, cuyos valores fueron $0,04587\pm 0,01666$ pg/ml en los sujetos bajo tratamiento y $0,04323\pm 0,01343$ pg/ml en los sujetos sin tratamiento (Fig. R5).

La relación RANKL/OPG no fue diferente entre ambos grupos $p=0,9300$. El grupo con tratamiento con bifosfonatos exhibió una relación RANKL/OPG, que fue de $693,5\pm 561,3$ pg/ml, mientras que el grupo sin tratamiento con bifosfonatos $677,7\pm 437,6$ pg/ml (Fig. R6).



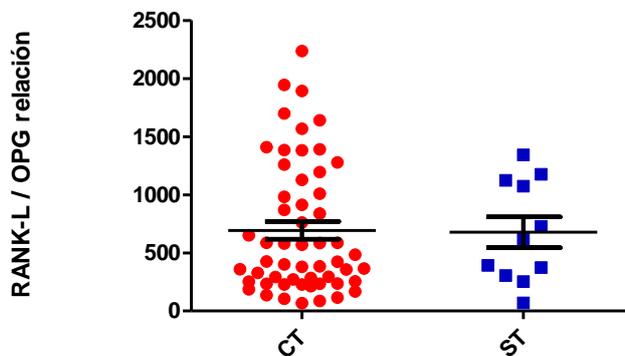
CT: Con tratamiento con bifosfonatos. ST: Sin tratamiento

Fig. R4. Distribución de los niveles de Ligando del Receptor activador del NF-kB (RANKL) en fluido gingival (FG) de sitios periodontalmente activos de sujetos con patología ósea con tratamiento -CT- (n=55) y sin tratamiento -ST- (n=11). Los valores individuales representan la concentración en FG de RANKL [RANKL total (pg)/(ml)] en cada sujeto.



CT: Con tratamiento con bifosfonatos. ST: Sin tratamiento

Fig. R5. Distribución de los niveles de Osteoprotegerina (OPG) en fluido gingival (FG) de sitios periodontalmente activos de sujetos con patología ósea con tratamiento-CT- (n=55) y sin tratamiento -ST- (n=11). Los valores individuales representan la concentración en FG de OPG [OPG total (pg)/(ml)] en cada sujeto.



CT: Con tratamiento con bifosfonatos. ST: Sin tratamiento

Fig. R6. Distribución de los niveles de Ligando del Receptor activador del NF- κ B (RANKL)/Osteoprotegerina(OPG) en fluido gingival (FG) de sitios periodontalmente activos de sujetos con patología ósea con tratamiento -CT- (n=55) y sin tratamiento -ST- (n=11). Los valores individuales representan la concentración en FG de la relación RANKL/OPG [RANKL total (pg)/(ml)/OPG total (pg)/(ml)] en cada sujeto.

Análisis de los niveles de concentración de RANKL, OPG y su relación en fluido gingival de pacientes mujeres post-menopáusicas con enfermedad periodontal y osteoporosis/osteopenia.

Al ser la osteoporosis una alteración con características comunes con la enfermedad periodontal por su cronicidad, por afectar a personas de avanzada edad, por provocar pérdida ósea, y además de que en ambas patologías está involucrado el sistema RANK-RANKL-OPG se ha planteado como objetivo: evaluar la relación entre los niveles de concentración de RANKL, OPG y su relación RANKL/OPG en fluido gingival en pacientes mujeres post-menopáusicas con osteoporosis/osteopenia y enfermedad periodontal.

En este estudio, los sitios periodontalmente activos de sujetos estudio (grupo con osteoporosis/osteopenia y enfermedad periodontal $n=66$) demostraron elevados niveles de RANKL en relación con el grupo control (grupo con condición ósea sistémica normal y enfermedad periodontal $n=15$), $p<0.01$, cuyos valores fueron $26,97\pm 18,65$ y $9,133\pm 10,20$ pg/ml respectivamente (Fig. R7). RANKL se detectó en el fluido gingival de todos los sitios periodontalmente activos del grupo osteoporosis/osteopenia, sin embargo sólo se detectó en quince de las veinte muestras obtenidas del grupo control.

A diferencia de RANKL, OPG se detectó en todas las muestras de fluido gingival (Fig. R8). Entre los dos grupos, los niveles de OPG fueron menores en los sitios de sujetos con osteoporosis/osteopenia ($0,04543\pm 0,01610$ pg /ml) mientras que los valores fueron significativamente más elevados en los sitios de sujetos control ($0,3470\pm 0,5687$ pg/ml) $p<0.01$ (Fig. R8).

Por otro lado, el grupo control exhibió una relación RANKL/OPG, que fue de $208,9\pm 171,8$ pg/ml (Fig. R9). Sin embargo, esta relación fue mayor y estadísticamente significativa en el grupo osteoporosis/osteopenia ($690,9\pm 539,7$ pg/ml) $p<0.01$ (Fig. 9).

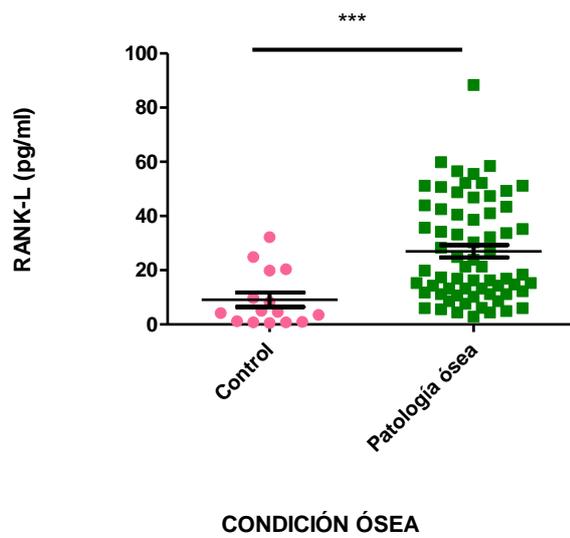


Fig. R7. Distribución de los niveles de Ligando del Receptor activador del NF-kB (RANKL) en fluido gingival (FG) de sitios periodontalmente activos de sujetos control (n=15) y con patología ósea (n=66). Los valores individuales representan la concentración en FG de RANKL [RANKL total (pg)/(ml)] en cada sujeto.
 *** ($p < 0,01$)

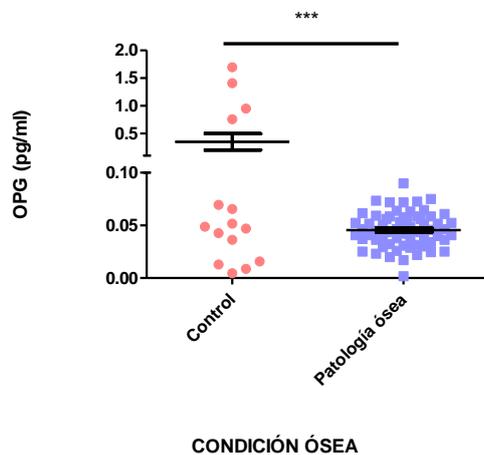


Fig. R8. Distribución de los niveles de Osteoprotegerina (OPG) en fluido gingival (FG) de sitios periodontalmente activos de sujetos control (n=15) y con patología ósea (n=66). Los valores individuales representan la concentración en FG de OPG [OPG total (pg)/(ml)] en cada sujeto.
 *** ($p < 0,01$)

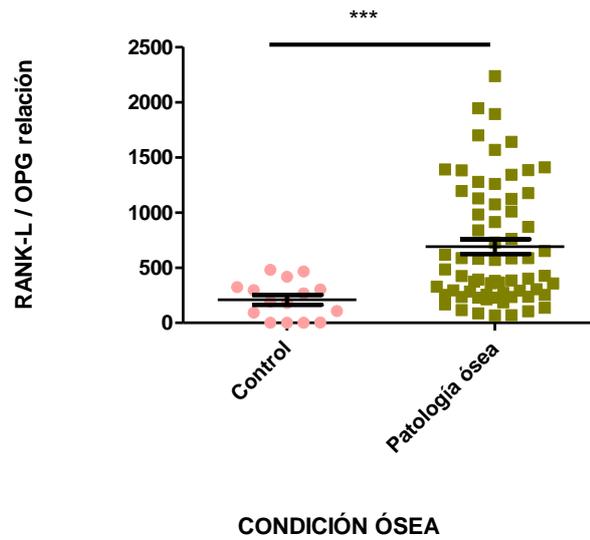


Fig. R9. Distribución de los niveles de la relación entre Ligando del Receptor activador del NF- κ B (RANKL)/Osteoprotegerina (OPG) en fluido gingival (FG) de sitios periodontalmente activos de sujetos control (n=15) y con patología ósea (n=66). Los valores individuales representan los valores en FG para la relación RANKL/OPG [RANKL total (pg)/(ml)/OPG total (pg)/(ml)] en cada sujeto.
 *** ($p < 0,01$)

Correlación de los niveles de RANKL, OPG y su relación con los parámetros clínicos

La correlación de los niveles de RANKL, OPG y su relación con los parámetros clínicos fue investigada mediante el *Análisis de correlación de Spearman* (Tabla 2). Los niveles de RANKL y la relación RANKL/OPG se correlacionaron positivamente con NIC ($p \leq 0.05$) no así con los demás parámetros (edad, PS, RPB y RH), mientras que OPG no se correlacionó con ningún parámetro clínico.

Tabla 2

Correlación entre RANKL, OPG y su relación con los parámetros clínicos.

Características clínicas	RANKL	OPG	RANKL/OPG
PS (mm sitio)	0,2175216	-0,002292314	0,2026135
NIC (mm sitio)	0,2332602 *	-0,02897567	0,2273469 *
RPB (%)	0,01096337	-0,07624722	0,04908371
RH (%)	-0,03965574	-0,1392129	-0,01420181
Edad (años)	0,1915942	0,120808	0,04659154

*Análisis de correlación de Spearman * $p \leq 0.05$*

Edad (años). **PS**: Profundidad de sondaje. **NIC**: Nivel de inserción clínica. **RPB**: Registro de placa bacteriana. **RH**: Registro de hemorragia al sondaje. **OPG**: Osteoprotegerina. **RANKL**: Ligando del Receptor activador del factor nuclear kappa B.

Análisis de la relación entre la edad y los niveles del cociente RANKL/OPG en pacientes mujeres post-menopáusicas que padecen enfermedad periodontal

El modelo de *Regresión lineal* empleado para evaluar la correlación entre la edad de los sujetos estudiados y los niveles de la relación RANKL/OPG se muestra en la Fig. R10. Se puede observar que no existen diferencias en los niveles de la relación RANKL/OPG con respecto a la edad.

REGRESION LINEAL RANKL/OPG VS EDAD

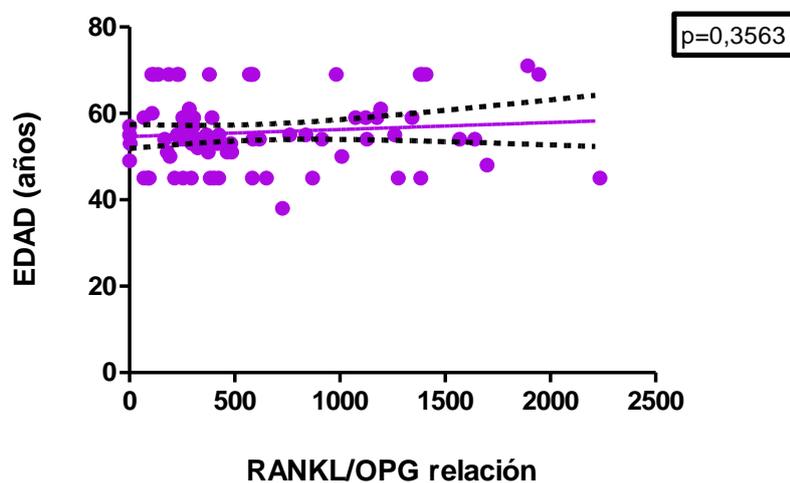


Fig. R10. Distribución de los niveles de la relación entre Ligando del Receptor activador del NF-kB (RANKL)/Osteoprotegerina (OPG) en fluido gingival (FG) de sitios periodontalmente activos en relación a la edad. Los valores individuales representan los valores en FG para la relación RANKL/OPG [RANKL total (pg)/(ml)/ OPG total (pg)/(ml)] en cada sujeto y las edades de cada sujeto expresados en años. ($p > 0,05$) No se observa una correlación entre las variables analizadas.

Análisis de la relación entre el NIC y los niveles del cociente RANKL/OPG en pacientes mujeres post-menopáusicas que padecen enfermedad periodontal de acuerdo a la condición ósea sistémica

El modelo de *Regresión lineal* empleado para evaluar la correlación entre el NIC y los niveles de la relación RANKL/OPG en sitios periodontalmente activos de pacientes mujeres post-menopáusicas que padecen enfermedad periodontal de acuerdo a la condición ósea sistémica se muestra en la Fig. R11. Se observa que solo el grupo estudio, grupo con osteoporosis/osteopenia y enfermedad periodontal, (n=66) demuestra una correlación positiva entre los valores de NIC y los niveles de la relación RANKL/OPG, $p=0.0146$.

En las Fig. R12 y Fig. R13 se analizó por separado la correlación entre las variables estudiadas, NIC y relación RANKL/OPG. En la Fig. 12 se puede observar que no hay relación entre las variables analizadas en el grupo control, grupo con condición ósea sistémica normal y enfermedad periodontal, $p=0.2444$. Mientras que la Fig. R13 demuestra que existe una correlación positiva entre el NIC y los niveles de la relación RANKL/OPG, $p=0.0146$; lo que indicaría que a mayor NIC mayor será el nivel de RANKL/OPG.

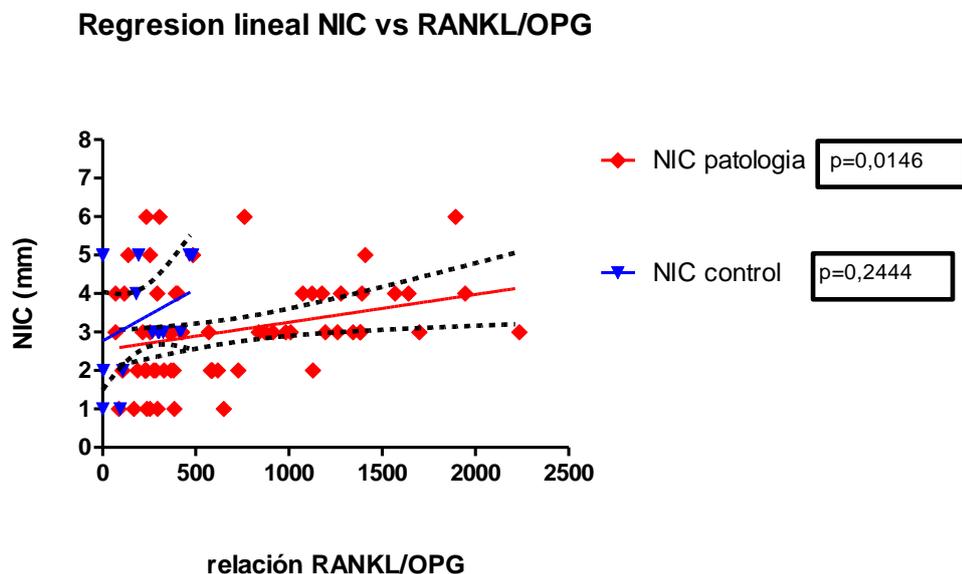


Fig. R11. Distribución de los niveles de la relación entre Ligando del Receptor activador del NF- κ B (RANKL)/Osteoprotegerina (OPG) en fluido gingival (FG) de sitios periodontalmente activos en relación al nivel de inserción clínica (NIC). Los valores individuales representan los valores en FG para la relación RANKL/OPG [RANKL total (pg)/(ml)/OPG total (pg)/(ml)] en cada sujeto (grupo de estudio n=66 y grupo control n=15) y los valores de NIC expresados en mm.

($p > 0,05$) No se observa una correlación entre las variables analizadas.

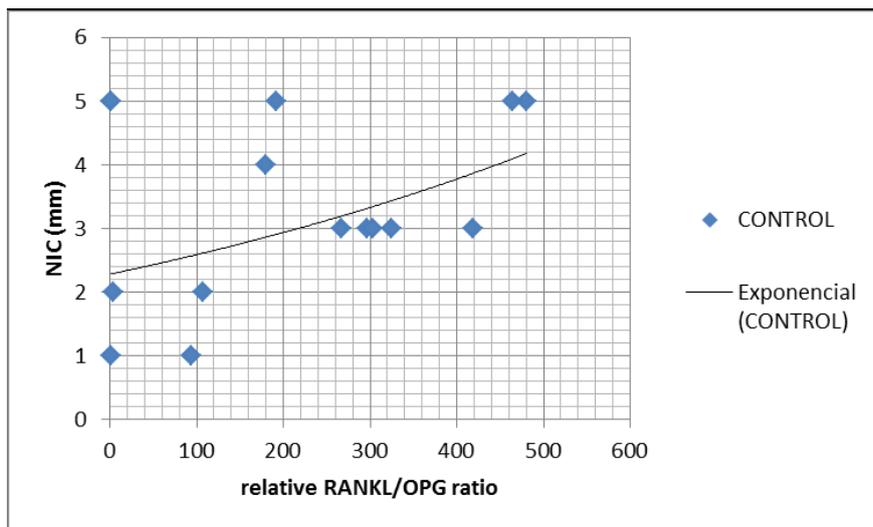


Fig. R12. Gráfico de dispersión de la distribución de los niveles de la relación entre Ligando del Receptor activador del NF-kB (RANKL)/Osteoprotegerina (OPG) en fluido gingival (FG) de sitios periodontalmente activos en relación al nivel de inserción clínica (NIC). Los valores individuales representan los valores en FG para la relación RANKL/OPG [RANKL total (pg)/(ml)/ OPG total (pg)/(ml)] en cada sujeto del grupo control n=15 (grupo con condición ósea sistémica normal y enfermedad periodontal) v los valores de NIC expresados en mm.

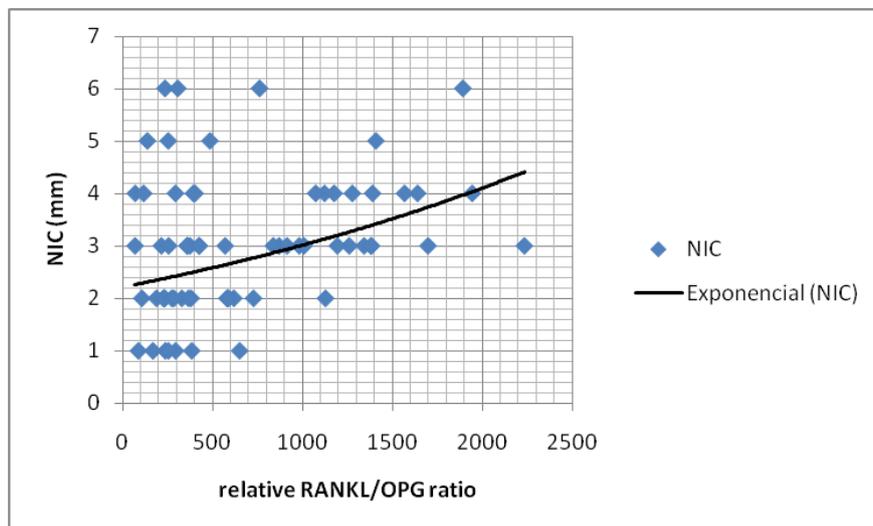


Fig. R13. Gráfico de dispersión de la distribución de los niveles de la relación entre Ligando del Receptor activador del NF-kB (RANKL)/Osteoprotegerina (OPG) en fluido gingival (FG) de sitios periodontalmente activos en relación al nivel de inserción clínica (NIC). Los valores individuales representan los valores en FG para la relación RANKL/OPG [RANKL total (pg)/volumen (ml)/OPG total (pg)/(ml)] en cada sujeto del grupo de estudio n=66 (grupo osteoporosis/osteopenia) y los valores de NIC expresados en mm.

** ($p < 0,05$) Se observa que los niveles de RANKL/OPG se incrementan a medida que el NIC aumento su valor.

“La ciencia son hechos; de la misma manera que las casas están hechas de piedras, la ciencia está hecha de hechos; pero un montón de piedras no es una casa y una colección de hechos no es necesariamente ciencia.”

Henri Poincaré

La enfermedad periodontal es una patología inflamatoria que se caracteriza por la pérdida de tejido conectivo y hueso alveolar. En su inicio, progresión y respuesta al tratamiento influyen los denominados factores de riesgo entre los cuales se encuentra la osteoporosis (Payne y cols., 1999; Jeffcoat y cols., 2000).

Aunque la etiología de la osteoporosis post-menopáusica y la enfermedad periodontal son diferentes, la pérdida ósea que se produce en ambas enfermedades comparten varias características (Lerner, 2006 -A). Como los receptores de estrógeno se expresan en el tejido óseo y en las células inmunes sustentan la hipótesis de que la deficiencia de estrógenos puede influir en los procesos de remodelación ósea en los sitios con inflamación (Lerner, 2006 -B).

La inquietud de muchos investigadores por dilucidar la relación existente entre la osteoporosis y la enfermedad periodontal ha sido fuente de muchos estudios realizados en las últimas décadas. Algunos de ellos obtuvieron resultados significativos (Kribbs, 1990; Aström y cols., 1990; Von Wowern y cols., 1994; Mohammad y cols., 1997; Streckfus y cols., 1997; Payne y cols., 1999; Jeffcoat y cols., 2000; Ronderos y cols., 2000; Tezal y cols., 2000; Shrout y cols., 2000; Inagaki y cols., 2001; Civitelli y cols., 2002; Geurs y cols., 2003; Yoshihara y cols., 2004; Inagaki y cols., 2005; Gomes-Filho y cols., 2007), y otros no (Elders y cols., 1992; Klemetti y cols., 1994; Mohammad y cols., 1997; Weyant y cols., 1999; Reinhardt y cols., 1999; Lundström y cols., 2001; Taguchi y cols., 2005; Sultan y Rao, 2011).

Dado que los resultados en la literatura son controversiales, en el presente estudio se consideró solucionar los problemas de diseño asociado con otras publicaciones.

En primer lugar, las pacientes actualmente fumadoras fueron excluidas de este estudio a diferencia otras investigaciones (Inagaki y cols., 2001; Civitelli y cols., 2002; Inagaki y cols., 2005; Gomes-Filho y cols., 2007). Fumar es una variable potencialmente confusa, ya que se asocia con la pérdida de hueso oral (Bergström y Eliasson, 1987) y sistémica (Hopper y Seeman, 1994).

En segundo lugar, todos los sujetos de este estudio se encontraban en un rango de edad desde los 45 a los 70 años de edad cuya media fue de $56,21 \pm 8,864$, involucrando sólo a una paciente de 45 años con un tiempo de menopausia mayor a 5 años, mientras que en los estudios de Elders y cols. y Klemetti y cols., el rango de edad de los sujetos analizados es entre los 46 a

los 55 años de edad con una media de 50.4 ± 2.6 en el primero y un rango de 48 a 56 años en el segundo (Elders y cols., 1992; Klemetti y cols., 1994). Por lo tanto, el grupo de pacientes en esta investigación fue relativamente homogéneo y se encontraban dentro de la ventana de tiempo (5-10 años) cuando es más significativa la pérdida de hueso después de que la menopausia ocurre (Sultan y Rao, 2011).

En tercer lugar, todos los sujetos de este estudio eran de raza caucásica, siendo éstos más susceptibles a los efectos de la osteoporosis/osteopenia (Farmer y cols., 1984).

En cuarto lugar, la selección de métodos para evaluar el estado periodontal en esta investigación se basó en registros como RPB, RH, PS y NIC en concordancia a otros estudios (Streckfus y cols., 1997; Weyant y cols., 1999; Gomes-Filho y cols., 2007). En cambio, algunos autores utilizaron el índice epidemiológico de necesidad de tratamiento (CPITN), que si bien es una herramienta empleada para realizar un examen periodontal básico y de esta manera identificar los pacientes que necesitan tratamiento periodontal no representa un método adecuado para establecer un diagnóstico (Klemetti y cols., 1994; Streckfus y cols., 1997; Inagaki y cols., 2001; Inagaki y cols., 2005; Ferreira Lopes y cols., 2008). La pérdida de piezas dentarias (Kribbs, 1990; Aström y cols., 1990; Streckfus y cols., 1997; Inagaki y cols., 2001; Inagaki y cols., 2005) no es un método confiable de determinación del estado periodontal porque no siempre es posible precisar el factor causal, de manera que sería posible establecer asociaciones erróneas.

En quinto lugar, el diagnóstico de osteoporosis se estableció mediante DEXA (Elders y cols., 1992; Klemetti y cols., 1994; Weyant y cols., 1999; Civitelli y cols., 2002; Gomes-Filho y cols., 2007), a diferencia de otras investigaciones que se valieron de radiografías metacarpales (Elders y cols., 1992; Inagaki y cols., 2001; Inagaki y cols., 2005), ultrasonido (Yoshihara y cols., 2004) o absorciometría dual de fotones (Elders y cols., 1992). Siendo que la DEXA, según la OMS, es el método más ampliamente usado en el mundo por su mayor precisión y una muy baja dosis de radiación, que permite mediciones seriadas en condiciones radiofísicas seguras (WHO, 2004).

En sexto lugar, se excluyeron de este estudio los factores que podrían alterar las condiciones analizadas como: tratamiento periodontal, antibiótico o antiinflamatorio seis meses previos al inicio del estudio; antecedentes de periodontitis agresivas y la presencia de trauma oclusal.

El sistema RANK-RANKL-OPG se ha demostrado que desempeña un importante papel en la patogenia de la osteoporosis post-menopáusica (Gurban y Merdele, 2011) y en la enfermedad periodontal (Kawai y cols., 2006; Wara-aswapati, 2007; Crotti y cols., 2003; Liu y cols., 2003; Mogi y cols., 2004; Vernal y cols., 2004; Vernal y cols., 2005; Bostanci y cols., 2007; Lu, 2006) por este motivo se decidió investigar las variaciones de este sistema de citoquinas en pacientes donde convergen ambas patologías.

En este estudio se analizaron los niveles de RANKL y OPG así como su relación RANKL/OPG en fluido gingival en sitios con enfermedad periodontal de mujeres post-menopáusicas con osteoporosis/osteopenia y un grupo control con condición ósea sistémica sana. Los niveles de RANKL fueron significativamente elevados en el grupo estudio respecto del grupo control, mientras que los niveles de OPG fueron significativamente menores en el grupo estudio.

Los grupos analizados en esta investigación no reúnen las mismas características de otros estudios por tratarse exclusivamente de pacientes mujeres post-menopáusicas con enfermedad periodontal y osteoporosis/osteopenia o bien condición ósea normal, y algunos de ellos difieren en los métodos de obtención y análisis de la muestra, ya que en esta investigación se trabajó con fluido gingival y para el posterior análisis de las citoquinas se realizó Test de Elisa (Vernal y cols. 2004; Mogi y cols. 2004; Bostanci y cols., 2007 (A); Bostanci y cols., 2011.) a diferencia de otras que trabajaron con biopsias y el posterior análisis con hibridación in situ (Crotti y cols. 2003; Liu y cols. 2003), RT-PCR (Liu y cols., 2003; Vernal y cols., 2004; Vernal y cols., 2005; Wara-aswapati, 2007; Bostanci y cols., 2007(B)) citometría de flujo y microscopio confocal (Vernal y cols., 2004) o bien realizando un estudio en base a un diseño experimental (Garlet y cols., 2004; Kawai y cols., 2006). Sin embargo, a pesar de las diferencias metodológicas, los datos obtenidos demuestran resultados similares (Crotti y cols., 2003; Liu y cols., 2003; Mogi y cols., 2004; Vernal y cols., 2004; Garlet y cols., 2004; Vernal y cols., 2005; Kawai y cols., 2006; Lu y cols., 2006; Wara-aswapati, 2007; Bostanci y cols., 2011), ya que aunque las concentraciones exactas de RANKL y OPG variaron de un estudio a otro, la tendencia fue generalmente la misma; determinando que la relación RANKL/OPG sea mayor en los individuos con periodontitis.

Los resultados obtenidos demostraron mayores valores de la relación RANKL/OPG en el grupo que padece osteoporosis/osteopenia y enfermedad

periodontal en comparación con el grupo control. Las alteraciones de los niveles individuales de RANKL y OPG reflejan cambios en su relación RANKL/OPG en fluido gingival, determinando que esta relación sea significativamente mayor en el grupo con osteoporosis/osteopenia, lo cual nos podría indicar que la pérdida de hueso, adyacente a la zona inflamada en la periodontitis, se haya influenciada por la patología ósea sistémica.

Los datos analizados en conjunto identifican al eje RANK-RANKL-OPG como un posible objetivo para la regulación de la destrucción ósea en la enfermedad periodontal en casos de pacientes que sufren osteoporosis/osteopenia post-menopáusica y al análisis del fluido gingival (trasudado rico en componentes celulares y mediadores bioquímicos que reflejan el estado metabólico de los tejidos periodontales) como una técnica no invasiva que tiene como principal ventaja encontrarse próximo al sitio de destrucción lo que proporcionaría información de los marcadores presentes en el plasma, que tienen gran potencial como indicadores de enfermedad periodontal y de curación tras el tratamiento (Uitto, 2003).

Cuando evaluamos el efecto que ejerce el consumo de bisfosfonatos sobre los niveles de RANKL, OPG y su relación en pacientes que padecen conjuntamente osteoporosis/osteopenia y enfermedad periodontal, observamos que los bifosfonatos que contienen nitrógeno, como risendronato e ibandronato, no alteran los niveles de concentración de las citoquinas estudiadas en el fluido gingival. Aunque estos bifosfonatos demostraron en varios estudios inhibir la formación de osteoclastos y la resorción ósea (Nishikawa y cols., 1996; D'Amelio y cols., 2008; Kwak y cols., 2009) no parecen estar relacionados con la regulación de estas citoquinas en fluido gingival. Por lo tanto, se podría reafirmar los resultados de Kim y cols. (Kim y cols., 2002), que aseguran que RANKL y OPG podrían no ser el blanco principal de los bifosfonatos para inhibir la resorción ósea, a pesar que éste investigó otra variedad de bifosfonatos que contienen nitrógeno, como alendronato y pamidronato.

También se demostró una correlación positiva entre los niveles de RANKL y de la relación RANKL/OPG con el nivel de inserción clínica en fluido gingival de pacientes mujeres post-menopáusicas que padecen enfermedad periodontal y osteoporosis/osteopenia respecto del grupo control, acordando con los descriptos en otros estudios (Vernal y cols. 2004; Bostanci y cols., 2007). La actividad de la enfermedad periodontal es generalmente aceptada como pérdida de inserción de tejidos del diente; un cambio en el registro del

nivel de inserción clínica puede representar un verdadero cambio en la pérdida de inserción (Jeffcoat y Reddy, 1991). La pérdida de inserción periodontal episódica puede estar asociada con variaciones en la población de células inflamatorias supracrestales donde se observa un mayor número de mastocitos, monocitos/macrófagos y células plasmáticas en sitios activos en comparación con los inactivos, células que están involucradas en la liberación de numerosas citoquinas proinflamatorias (Zappa y cols., 1990). La presencia de RANKL en fluido gingival en sitios con pérdidas episódicas de tejido conectivo implica un posible papel en los mecanismos de destrucción de los tejidos asociada con la periodontitis (Vernal y cols., 2004). Por lo tanto, estos hallazgos refuerzan aún más el valor diagnóstico de la relación RANKL/OPG, ya que indican que pueden asociarse con la progresión de la destrucción periodontal de una manera más certera que el estado de inflamación periodontal y la pérdida de inserción clínica.

No se observaron correlaciones con el registro de hemorragia y placa bacteriana, posiblemente porque el estado de la higiene oral es dictada por muchos otros factores como los hábitos dietéticos, socioeconómicos y el nivel educativo de un individuo. Tampoco se encontró una correlación con la profundidad de sondaje a diferencia de resultados informados por otros autores (Vernal y cols. 2004; Bostanci y cols., 2007), probablemente porque este último registro no necesariamente se relaciona con sectores en que la enfermedad periodontal esté activa o que sufrirán pérdidas en un futuro próximo sino más bien se asocia a zonas favorables al crecimiento de bacterias periodontopatógenas (Greenstein, 1997).

Los niveles de OPG no se correlacionaron con ninguno de los parámetros clínicos analizados en esta investigación, como PS, NIC, RPB, RH y edad, en concordancia con otros estudios realizados (Mogi y cols., 2004; Bostanci y cols., 2007). Esto podría deberse a que la mayor parte de la forma soluble de RANKL en fluido gingival se origina a partir de linfocitos T activados y en menor medida por otras células de los tejidos periodontales, especialmente osteoblastos. Mientras que OPG se encuentra en osteoblastos, fibroblastos gingivales y células del ligamento periodontal (Sakata y cols., 1999).

En esta tesis doctoral también se ha podido corroborar, que la edad del individuo no altera los niveles de las citoquinas analizadas, y que la mayor prevalencia de periodontitis y de destrucción ósea alveolar en individuos adultos y adultos mayores no se asocia a la edad *per se*, sino a una

acumulación del daño a través del tiempo como fue expuesto en numerosas investigaciones realizadas en humanos y en animales que si bien han revelado un descenso en las respuestas inmunes con el envejecimiento, afirman que existen características del huésped que influyen en su salud, su conocimiento, las creencias, los valores y comportamientos (Kiyak y cols., 1998; Locker y cols., 1998).

En la presente investigación se ha podido detectar una asociación significativa entre la osteoporosis y la enfermedad periodontal pese a los estrictos criterios de exclusión establecidos, que determinaron un reducido número de casos analizados, teniendo en cuenta el hábito de fumar y a que el envejecimiento se acompaña de un aumento de la morbilidad por las enfermedades crónicas.

La periodontitis es una enfermedad multifactorial para la cual se requiere la presencia de bacterias patógenas y ésta sola no es suficiente para provocarla. La respuesta inmunitaria e inflamatoria del huésped frente al ataque microbiano es determinante de la vulnerabilidad para desarrollar la enfermedad destructiva, bajo la influencia de múltiples factores de comportamiento, ambientales y genéticos. Aunque se ha demostrado que la progresión de la enfermedad es de naturaleza episódica a nivel de la zona del diente, se puede asumir que el riesgo de desarrollar la enfermedad periodontal depende principalmente del paciente más que de la zona, convirtiendo así a la osteoporosis/osteopenia post-menopáusica como un indicador de riesgo de progresión de la enfermedad periodontal.

Existiendo la posibilidad de que la osteoporosis potencie a la enfermedad periodontal y de que la aparición de esta última pueda ser un signo de alerta respecto al padecimiento de la osteoporosis/osteopenia, nos obliga a requerir el diagnóstico de osteoporosis en nuestras pacientes periodontales post-menopáusicas, valiéndonos de los marcadores bioquímicos de recambio óseo que proporcionan un medio para evaluar la dinámica ósea en complemento a las mediciones estáticas (DEXA, radiografías periapicales).

En conclusión, la osteopenia/osteoporosis post-menopáusica, aunque no es la causa inicial de la periodontitis crónica, se demostró que es un indicador de riesgo que puede contribuir a la progresión de la enfermedad periodontal.

“La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y la fuente de vida de todo progreso”.

Louis Pasteur

Un cuidadoso diagnóstico periodontal reviste máxima importancia en el manejo posterior de la enfermedad periodontal del paciente. Un diagnóstico preciso es a menudo el primer paso hacia el desarrollo de un plan de tratamiento apropiado cuya aplicación conduce a la resolución de la infección periodontal.

Actualmente, el diagnóstico periodontal convencional alcanzado a partir de la profundidad de sondaje y el nivel de inserción clínica, utilizando una sonda periodontal calibrada, constituyen mediciones indirectas de la pérdida ósea. Existen numerosos factores, como los cambios inflamatorios, el epitelio de unión largo y la presión aplicada a la sonda, que pueden afectar la medición periodontal, generando imprecisiones en el registro de la verdadera situación periodontal o estado periodontal. El nivel de inserción clínica y la profundidad de sondaje de la bolsa periodontal reflejan la extensión de la enfermedad previa, pero no necesariamente la actual. Puesto que los daños del tejido periodontal se acumulan con el paso del tiempo.

Como auxiliares del diagnóstico clínico se usan en la actualidad las radiografías periapicales que tienen grandes limitaciones como mostrar sólo dos caras de elemento dentario y fundamentalmente son pocos sensibles para detectar lesiones óseas tempranas, ya que requiere de muchos meses –y hasta años- para revelar alteraciones en la densidad ósea. Por otro lado, procedimientos como el raspaje radicular eliminan al agente iniciador que desencadena la inflamación, de tal modo que contrarresta la enfermedad. Sin embargo, muchos procedimientos no ofrecen la completa resolución de la inflamación para restaurar la homeostasis de los tejidos (Van Dyke, 2008), ni se dispone de pruebas prácticas basadas en las enzimas, productos de degradación tisular o citoquinas, que indiquen con precisión el momento en que se produce el inicio de la periodontitis, los períodos en que la enfermedad está activa o cuándo el proceso de curación resulta eficaz.

Numerosas investigaciones han estudiado la relación que existe entre RANKL/OPG expresado como cociente dado que se desconocen los valores normales de estas citoquinas en fluido gingival. Este conocimiento que nos aproxima cada vez más a comprender con mayor detalle la etiopatogenia de la enfermedad periodontal y evaluar la posibilidad de utilizar RANKL y la OPG como indicadores del estado de salud-enfermedad periodontal.

Aunque ciertos parámetros clínicos, como la profundidad del sondaje, el nivel de inserción, el sangrado en el sondaje, el índice de placa y la valoración radiográfica de la pérdida de hueso alveolar, proporcionan información acerca

del daño producido y las secuelas irreversibles ocasionadas por la patología periodontal, no miden la actividad de la enfermedad, mientras que los marcadores bioquímicos (como RANKL) permitirían determinar si la enfermedad se encuentra en etapa de reposo o de actividad. Por otro lado, el análisis del fluido gingival (trasudado rico en componentes celulares y mediadores bioquímicos que reflejan el estado metabólico de los tejidos periodontales) constituye una técnica no invasiva que tiene como principal ventaja encontrarse próximo al sitio de destrucción y esto podría proporcionar más información que los marcadores presentes en el plasma ya que las sustancias que posee tienen un gran potencial como indicadores de enfermedad periodontal y de curación tras el tratamiento (Uitto, 2003). Varios componentes del fluido gingival reflejan claramente el estado periodontitis. Dado que la respuesta del huésped es un determinante clave en la patogenia de la enfermedad periodontal, la medición de los niveles de mediadores de la inflamación en el fluido gingival se ha utilizado para evaluar el «riesgo»: el riesgo de que un diente o, con mayor exactitud, una zona, pierda la inserción clínica y el hueso alveolar o el riesgo de que un individuo desarrolle la enfermedad periodontal (Champagne y cols., 2004). Por lo tanto, el análisis de los mediadores de la inflamación puede ser especialmente beneficioso para diagnosticar el estado periodontal actual y evaluar el efecto del tratamiento periodontal. Por otra parte, la identificación de nuevos marcadores puede contribuir a esclarecer nuevos mecanismos que pueden estar involucrados en la periodontitis.

El tratamiento actual de la periodontitis a menudo se basa en procedimientos mecánicos y descuida las células inmunes. Los nuevos tratamientos para las enfermedades periodontales deben hacer frente a la importante contribución de las células inmunitarias a la resorción de hueso periodontal. Por lo tanto, un importante énfasis en las nuevas terapias debe incluir el desarrollo y la evaluación de las estrategias terapéuticas para tratar la enfermedad periodontal mediada por células inmunitarias.

El inicio en el estudio de la línea de trabajo de citoquinas y enfermedad periodontal podría conducir o se espera que conduzca al diseño de nuevas metodologías, utilización de fármacos y/o estrategias tendientes a modular la respuesta inmune a fin de controlar la infección periodontal y minimizar las secuelas locales y consecuencias sistémicas de ésta.

Y si bien los estudios bioquímicos no son actualmente herramientas de uso general en el consultorio, en un futuro el desarrollo y la aplicación de estas

pruebas diagnósticas rápidas y sencillas basadas en factores inmunológicos del huésped facilitarían la detección temprana de los pacientes con riesgo de sufrir enfermedades periodontales.

Si bien se conoce que las bacterias constituyen el factor iniciador de la enfermedad periodontal, son los factores de riesgo los que pueden determinar el inicio, la progresión y la respuesta al tratamiento de esta patología. Por lo tanto, familiarizarse con los factores de riesgo podría ayudar a identificar individuos vulnerables y favorecer un diagnóstico precoz para evitar y/o reducir los efectos deletéreos de la enfermedad periodontal instaurada, como así también establecer una intervención adecuada, que disminuiría la necesidad de un tratamiento tan invasivo y mejoraría la respuesta al tratamiento periodontal.

Esta investigación aporta datos importantes para definir nuevos métodos diagnósticos de gran utilidad tanto para la detección temprana de cambios a nivel óseo, monitoreo de la progresión, severidad de la enfermedad y respuesta al tratamiento. Además nos permite comprender cómo afecta la osteoporosis/osteopenia post-menopáusica las condiciones a nivel bucal en pacientes con patología periodontal ya instaurada.

La observación de que las enfermedades periodontales más destructivas afectan un determinado porcentaje de individuos, lo que nos indica que no todas las personas tienen igual riesgo ante esta enfermedad. Por lo tanto, es importante establecer quién está en situación de riesgo y qué características pueden utilizarse para identificar a estos individuos situados en los grupos de mayor riesgo.

Los aportes que se hicieron en esta TESIS DOCTORAL serán transferidos a la clínica para elaborar con mayor certeza el diagnóstico, desarrollar estrategias preventivas más efectivas y de tratamientos de la periodontitis con mayor precisión, que redundarán en menor tiempo y costos.

*“Duda siempre de ti mismo, hasta que
los datos no dejen lugar a dudas.”
Louis Pasteur*

Los resultados de esta tesis sugieren una correlación entre la pérdida de hueso alveolar y pérdida de masa ósea sistémica debido al incremento de RANKL o la disminución de los niveles de OPG en fluido gingival de mujeres post-menopáusicas que padecen osteoporosis/osteopenia y periodontitis crónica en relación a los niveles de estas citoquinas presentes en individuos con enfermedad periodontal y condición ósea normal. Esta situación favorecería el incremento en el cociente RANKL/OPG, siendo ésta una condición que predispone a la formación osteoclástica.

Estos hallazgos fortalecen aún más el valor diagnóstico de la relación RANKL/OPG en fluido gingival, ya que indican que puede asociarse con la destrucción periodontal en pacientes que padecen osteoporosis/osteopenia y podría ser utilizada para pruebas diagnósticas rápidas y sencillas basadas en factores inmunológicos del huésped facilitando la detección temprana de los pacientes con riesgo de enfermedad periodontal y posiblemente otras patologías óseas.

Los resultados obtenidos demuestran que los bifosfonatos que contienen nitrógeno, como risendronato e ibandronato, no alteran los niveles de concentración de RANKL, OPG y su relación RANKL/OPG en el fluido gingival de pacientes que padecen conjuntamente osteoporosis/osteopenia y enfermedad periodontal, probablemente porque estas citoquinas podrían no ser el blanco principal de los bifosfonatos para inhibir la resorción ósea.

Al correlacionar los niveles de concentración de RANKL, OPG y su relación RANKL/OPG con las características clínicas (PS, NIC, RH, RPB y edad) se pudo demostrar que la PS, RH, RPB no se correlacionaron con los niveles de las citoquinas estudiadas, mientras que los niveles de RANKL y los valores de la relación RANKL/OPG se correlacionaron positivamente con el NIC, sugiriendo que conocer los niveles de RANKL y la relación RANKL/OPG podrían anticipar los riesgos de progresión de la enfermedad periodontal en pacientes con osteoporosis/osteopenia. Además, se corroboró, que la edad del individuo no es un factor de riesgo de la enfermedad, y que la mayor prevalencia de periodontitis y de destrucción ósea alveolar en individuos adultos y adultos mayores no se asocia a la edad *per se*, sino que a una acumulación del daño a través del tiempo.

*“El científico no tiene por objeto un resultado inmediato.
Él no espera que sus ideas avanzadas sean fácilmente aceptadas.
Su deber es sentar las bases para aquellos que
están por venir, y señalar el camino”.*

Nikola Tesla

- AAP - American Academy of Periodontology (2000). Parameter on chronic periodontitis with slight to moderate loss of periodontal support. *J Periodontol.* 71: 852-855.
- Alvarez L, Peris P, Guanabens N, Vidal S, Ros I, Pons F, Filella X, Monegal A, Munoz-Gomez J, Ballesta AM. (2003). Serum osteoprotegerin and its ligand in Paget's disease of bone: relationship to disease activity and effect of treatment with bisphosphonates. *Arthritis Rheum* 48:824–828.
- Ahlborg HG, Johnell O, Nilsson BE, Jeppsson S, Rannevik G, Karlsson MK. (2001). Bone loss in relation to menopause: a prospective study during 16 years. *Bone* 28: 327-331.
- Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, 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.
- Arrighi HM, Hsieh A, Wong H, Khoo H, Reyes A, Asbury D y cols. (1998). Osteoprotegerin serum levels in healthy volunteers. *Bone* 23 (Suppl 1) T411.
- Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT. (1998). IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol* 160: 403-409.
- Aström J, Bäckström C, Thidevall G. (1990). Tooth loss and hip fractures in the elderly. *J Bone Joint Surg Br.* 72: 324-325.
- Baker PJ, Dixon M, Evans RT, Dufour L, Johnson E, Roopenian DC. (1999). CD4 (+) T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice. *Infect Immun* 67: 2804-2809.
- Beck JD. (1992). Attachment loss trends in community dwelling older blacks and whites over 3 years. *J Dent Res* 72: 264.
- Becker W, Berg L, Becker BE. (1979). Untreated periodontal disease. *J Periodontol* 67: 1123-1137.
- Bergström J, Eliasson S. (1987). Cigarette smoking and alveolar bone height in subjects with a high standard of oral hygiene. *J Clin Periodontol* 14: 466–469.
- Blaque S, James I. (2003). RANKL (Receptor Activator of NFκB Ligand). In: The Cytokine Handbook. Thomson AW, Lotze MT, *Academic Press* 871- 883.

- Birkenfeld L, Yemini M, Kase NG, Birkenfeld A. (1999). Menopause-related oral alveolar bone resorption: a review of relatively unexplored consequences of estrogen deficiency. *Menopause* 6: 129-133.
- Brill N. (1962). The Gingival Pocket Fluid: Studies of Its Occurrence, Composition, and Effect. *Acta odontol Scand* 20: suplement 32.
- Boabaid F., Berry JE, Koh AJ, Somerman MJ, McCauley LK. (2004). The role of parathyroid hormone-related protein in the regulation of osteoclastogenesis by cementoblasts. *J Periodontol* 75: 1247-1254.
- Bonjour JP, Rizzoli R. (1996). Bone acquisition in adolescence. In: Marcus R, Feldman D, Kelsey J, eds. *Osteoporosis*. San Diego, CA, *Academic Press* 465–476.
- Bostanci N, Ilgenli T, Emingil G, Afacan B, Han B, Töz H, Atilla G, Hughes FJ, Belibasakis GN. (2007). Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: implications of the relative ratio. *J Clin Periodontol* 34:370-376. (A)
- Bostancı N, Ilgenli T, Emingil G, Afacan B, Han B, Töz H, Berdeli A, Atilla G, McKay IJ, Hughes FJ, Belibasakis GN. (2007). Differential expression of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin mRNA in periodontal diseases. *J Periodont Res* 42: 287–293. (B).
- Bostanci N, Saygan B, Emingil G, Atilla G, Belibasakis GN. (2011). Effect of periodontal treatment on receptor activator of NF- κ B ligand and osteoprotegerin levels and ratio in gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol* 38: 428–433.
- Boyle, W. J., Simonet, W. S. & Lacey, D. L. (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423: 337–342.
- Brill, N., Krasse, B. (1958). The passage of tissue fluid into the clinically healthy gingival pocket. *Acta Odontol Scand* 6: 233-245.
- Brunsvold MA, Chaves ES, Kornman KS, Aufdemorte TB, Wood R. (1992). Effects of a bisphosphonate on experimental periodontitis in monkeys. *J Periodontol*. 63: 825-830.
- Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, *y cols.* (1998). Osteoprotegerindeficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 12: 1260-1268.
- Burgess TL, Qian Y-X, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C, Kelley M, Hsu H, Boyle WJ, Dunstan CR, Hu S, Lacey DL. (1999). The

ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol* 145: 527-538.

- Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, y cols. (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425: 841-846.

- Camozzi V, Tossi A, Simoni E, Pagani F, Francucci CM, Moro L. (2007). Role of biochemical markers of bone remodelling in clinical practices. *J Endocrinol Invest* 30: 13-17.

- Champagne C.M., Buchanan W, Reddy M.S., Preisser J.S., Beck J.D., Offenbacher S. (2004). El futuro de las mediciones de líquido crevicular gingival como factor pronóstico del riesgo a padecer enfermedades periodontales. *Periodontology 2000* (Ed Esp) 6: 167-180.

- Choi B-K, Moon S-Y, Cha J-H, Kih K-W, Yoo Y-J. (2005). Prostaglandin E2 Is a Main Mediator in Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand-Dependent Osteoclastogenesis Induced by *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Treponema socranskii*. *J Periodontol* 76:813-820.

- Civitelli R, Pilgram T K, Dotson M, Muckerman J, Lewandowski N, Armamento-Villareal R, Yokoyama-Crothers N, Kardaris E E, Hauser J, Cohen S, Hildebolt C F. (2002). Alveolar and Postcranial Bone Density in Postmenopausal Women Receiving Hormone/Estrogen Replacement Therapy. *Arch Intern Med.* 162: 1409-1415.

- Cochran D L. (2008). Inflammation and Bone Loss in Periodontal Disease. *J Periodontol* 79:1569-1576.

- Consensus development conference: Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis. (1991). *American Journal of Medicine* 90:107–110.

- Crotti T, Smith MD, Hirsch R, Soukoulis S, Weedon H, Capone M, Ahern MJ, Haynes D. (2003). Receptor Activator NF κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *J Periodont Res* 38; 380–387.

- Dalwai F, Spratt DA, Pratten J. (2006). Modeling Shifts in Microbial Populations Associated with Health or Disease. *Appl Environ Microbiol.* 72: 3678–3684.

- D'Amelio P, Grimaldi A, Di Bella S, Tamone C, Brianza SZM, Ravazzoli MGA, Bernabei P, Cristofaro MA, Pescarmona GP, Isaia G. (2008). Risedronate Reduces Osteoclast Precursors and Cytokine Production in Postmenopausal Osteoporotic Women. *J Bone Miner Res* 23: 373–379.

- Deal C. (2009). Potential new drug targets for osteoporosis. *Nature Reviews Rheumatology* 5: 20-27.
- Delima AJ, Oates T, Assuma R, y cols. (2001). Soluble antagonists to interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) inhibit loss of tissue attachment in experimental periodontitis. *J Clin Periodontol* 28 : 233-240.
- Delima J. Van Dyke T E. (2004). Origen y función de los componentes celulares del líquido crevicular gingival. *Periodontology 2000* (Ed Esp) 6: 55-76.
- Dobnig H, Hofbauer LC, Viereck V, Obermayer-Pietsch B, Fahrleitner-Pammer A. (2006). Changes in the RANK ligand/osteoprotegerin system are correlated to changes in bone mineral density in bisphosphonate-treated osteoporotic patients. *Osteoporos Int* 17: 693–703.
- Drake MT, Clarke BL, Khosla S. (2008). Bisphosphonates: Mechanism Of Action And Role In Clinical Practice. *Mayo Clin Proc.* 83: 1032-1045.
- Ebersole JL, Cappelli D, Holt SC, Singer RE, Filloon T. (2000). Gingival crevicular fluid inflammatory mediators and bacteriology of gingivitis in nonhuman primates related to susceptibility to periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 15: 19-26.
- Elders PJ, Habets LL, Netelenbos JC, van der Linden LW, van der Stelt PF. (1992). The relation between periodontitis and systemic bone mass in women between 46 and 55 years of age. *J Clin Periodontol.* 19: 492-496.
- Farmer ME, White LR, Brody JA, Bailey KR. (1984). Race and sex differences in hip fracture incidence. *Am J Public Health* 74: 1374–1380.
- Ferreira Lopes F, Furtado Loureiro FH, Coêlho Alves CM, Vasconcelos Pereira AF, Figueiredo de Oliveira AE. (2008). Densidade mineral óssea sistêmica vs situação clínica periodontal: estudo transversal em mulheres na pós-menopausa. *Rev Assoc Med Bras* 54: 411-414
- Firestein GS. (2003). Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 423: 356– 361.
- Fleisch H. (1998). Biphosphonates: mechanisms of action. *Endocr Rev* 19: 80-100.
- Fuller K, Wong B, Fox S, Choi Y, Chambers TJ. (1998). TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J Exp Med* 188: 997-1001.

- Garlet GP, Martins W Jr, Fonseca BA, Ferreira BR, Silva JS. (2004). Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 31: 671–679.
- Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, y cols. (2006). Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiol Immunol* 21: 12-20.
- Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, y cols. (2007). The dual role of p55 tumour necrosis factor-alpha receptor in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced experimental periodontitis: Host protection and tissue destruction. *Clin Exp Immunol* 147: 128-138.
- Gemmell E, Seymour G J. (2005). Control inmunorregulador de los perfiles funcionales de las citoquinas Tc1/Tc2 en la enfermedad periodontal *Periodontology 2000* (Ed Esp) 10: 21-41.
- Genant HK y cols. (1996). Non invasive assessment of bone mineral and structure: state of the art. *Journal of Bone and Mineral Research*. 11: 707–730.
- Geurs NC, Lewis CE, Jeffcoat MK. (2003). Osteoporosis and periodontal disease progression. *Periodontol 2000*. 32: 105–10.
- Geusens P, Lems WF. (2011). Osteoimmunology and osteoporosis. *Arth Res Ther*. 13: 242-258.
- Gomes-Filho IS, Passos Jde S, Cruz SS, Vianna MI, Cerqueira Ede M, Oliveira DC, y cols. (2007). The association between postmenopausal osteoporosis and periodontal disease. *J Periodontol*. 78: 1731-1740.
- Gonzáles JR, Herrmann JM, Boedeker RH, Francz PI, Biesalski H, Meyle J. (2001). Concentration of interleukin-1beta and neutrophil elastase activity in gingival crevicular fluid during experimental gingivitis. *J Clin Periodontol*. 28: 544-549.
- Goodson JM, Tanner AC, Haffajee AD, Sornbenger GC, Socransky SS. (1982). Patterns of progression and regression of advanced destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol* 9: 72-81.
- Graves DT, Delima AJ, Assuma R, Amar S, Oates T, Cochran D. (1998). Interleukin-1 and tumor necrosis factor antagonists inhibit the

progression of inflammatory cell infiltration toward alveolar bone in experimental periodontitis. *J Periodontol* 69: 1419-1425.

- Greenstein G (1997). Contemporary interpretation of probing depth assessments: diagnostic and therapeutic implications. A literature review. *J Periodontol*. 68:1194-1205.
- Guggenheim B, Gmür R, Galicia JC, Stathopoulou PG, Benakanakere MR, Meier A, Thurnheer T, Kinane DF. (2009). *In vitro* modeling of host-parasite interactions: the 'subgingival' biofilm challenge of primary human epithelial cells. *BMC Microbiology* 9: 280.
- Gurban CV, Merdele O. (2011). The OPG/RANKL system and zinc ions are promoters of bone remodeling by osteoblast proliferation in postmenopausal osteoporosis. *Rom J Morphol Embryol* 52:1113–1119.
- Haffajee AD, Socransky SS, Goodson JM. (1983). Comparison of different data analyses for detecting changes in attachment level. *J Clin Periodontol* 10: 298-310.
- Han, Xiaozhe, Kawai, Toshihisa, Eastcott, Jean W., Taubman, Martin A. (2006). Bacterial-Responsive B Lymphocytes Induce Periodontal Bone Resorption. *J Immunol* 176: 625-631.
- Han X, Lin X, Seliger A R, Eastcott J, Kawai T, Taubman M A. (2009). Expression of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand by B cells in response to oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol*. 24: 190–196.
- Heasman PA, Collins JG, Offenbacher S. (1993). Changes in crevicular fluid levels of interleukin-1 beta, leukotriene B4, prostaglandin E2, thromboxane B2 and tumour necrosis factor alpha in experimental gingivitis in humans. *J Periodontal Res*. 28: 241-247.
- Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL. (1999). Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* 140: 4367-4370.
- Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S. (1999). Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology* 140: 4382-4389.
- Hofbauer LC, Heufelder AE. (2001). Role of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med* 79: 243-253.

- Holt SC, Ebersole JL. (2005). *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: The “red complex,” a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol 2000* 38: 72-122.
- Hopper JL, Seeman E. (1994). The bone density of female twins discordant for tobacco use. *N Engl J Med* 330: 387–392.
- Horwood NJ, Kartsogiannis V, Quinn JM, Romas E, Martin TJ, Gillespie MT. (1999). Activated T lymphocytes support osteoclast formation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 265: 144–150.
- Inagaki K, Kurosu Y, Kamiya T, Kondo F, Yoshinari N, Noguchi T, Krall EA, Garcia RI. (2001). Low metacarpal bone density, tooth loss, and periodontal disease in Japanese women. *J Dent Res*. 80: 1818-1822.
- Inagaki K, Kurosu Y, Yoshinari N, Noguchi T, Krall EA, Garcia RI. (2005). Efficacy of periodontal disease and tooth loss to screen for low bone mineral density in Japanese women. *Calcif Tissue Int*. 77: 9-14.
- International Position Paper on Women’s Health and Menopause: A comprehensive Approach. *National Institutes of Health*, 2002.
- Jacobs R, Ghyselen J, Koninckx P, van Steenberghe D. (1996). Long-term bone mass evaluation of mandible and lumbar spine in a group of women receiving hormone replacement therapy. *Eur J Oral Sci*. 104: 10–16.
- Jeffcoat MJ, Reddy MS. (1991). Progression of probing attachment loss in adult periodontitis. *J Periodontol* 62: 185- 189.
- Jeffcoat MK, Lewis CE, Reddy MS, Wang CY, Redford M. (2000). Post-menopausal bone loss and its relationship to oral bone loss. *Periodontol 2000* 23: 94–102.
- Jilka RL. (1998). Cytokines, bone remodeling, and estrogen deficiency: a 1998 update. *Bone* 23: 75-81.
- Jin L, Söder B, Corbet EF. (2000). Interleukin-8 and granulocyte elastase in gingival crevicular fluid in relation to periodontopathogens in untreated adult periodontitis. *J Periodontol*. 71: 929-939.
- 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 O, Izumi Y, Taubman M A. (2006). B and T Lymphocytes Are the Primary Sources of RANKL in the Bone Resorptive Lesion of Periodontal Disease. *Am J Pathol*. 169: 987–998.

- Kawai T, Paster BJ, Komatsuzawa H, Ernst CWO, Goncalves RB, Sasaki H, Ouhara K, Stashenko PP, Sugai M, Taubman MA. (2007). Cross-reactive adaptive immune response to oral commensal bacteria results in an induction of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)-dependent periodontal bone resorption in a mouse model. *Oral Microbiol Immunol* 22: 208–215.
- Kim YH, Kim GS, Jeong-Hwa B. (2002). Inhibitory action of bisphosphonates on bone resorption does not involve the regulation of RANKL and OPG expression. *Exp Mol Med*. 34: 145-151.
- Kinpara K, Mogi M, Kuzushima M, Togari A. (2000). Osteoclast differentiation factor in human osteosarcoma cell line. *J Immunoassay* 21:327-340.
- Kirkwood KL, Li F, Rogers JE, y cols. (2007). A p38alpha selective mitogen-activated protein kinase inhibitor prevents periodontal bone loss. *J Pharmacol Exp Ther* 320: 56-63.
- Kiyak HA, Persson RE, Persson GR. (1998). Influences on the perceptions of and responses to periodontal disease among older adults. *Periodontol* 2000 16: 34-43.
- Klemetti E, Collin HL, Forss H, Markkanen H, Lassila V. (1994). Mineral status of skeleton and advanced periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 21: 184-188.
- Kobayashi-Sakamoto M, Hirose K, Isogai E, Chiba I. (2004). NF- κ B-dependent induction of osteoprotegerin by *Porphyromonas gingivalis* in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 315: 107-112.
- Kong Y.Y, Boyle W J, Penninger J M. (1999). Osteoprotegerin ligand: A common link between osteoclastogenesis, lymph node formation and lymphocyte development. *Immunology and Cell Biology* 77, 188–193 (A).
- Kong, Y. Y., Yoshida, H., Sarosi, I., Tan, H. L., Timms, E., Capparelli, C., Morony, S., Oliveira-dos-Santos, A. J., Van, G., Itie, A., Khoo, W., Wakeham, A., Dunstan, C. R., Lacey, D. L., Mak, T. W., Boyle, W. J. & Penninger, J. M. (1999). OPG is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 397: 315–323 (B).
- Kong YY, Feige U, Sarosi I y cols. (1999). Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 402: 304–309 (C).

- Khosla S, Arrighi HM, Melton LJ III, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Dunstan CR, Riggs BL (2002). Correlates of osteoprotegerin levels in women and men. *Osteoporos Int* 13:394-399.
- Kribbs PJ, Smith DE, Chestnut CH., (1983). 3rd Oral findings in osteoporosis, Part II: Relationship between residual ridge and alveolar bone resorption and generalized skeletal osteopenia. *J Prosthet Dent.* 50: 719–724.
- Kribbs PJ, Chestnut CH, 3rd, Ott SM, Kilcoyne RF. (1989). Relationship between mandibular and skeletal bone in an osteoporotic population. *J Prosthet Dent.* 62: 703–707.
- Kribbs PJ, Cestnut CH, 3rd, Ott SM, Kilcoyne RF. (1990). Relationship between mandibular and skeletal bone in a population of normal women. *J Prosthet Dent.* 63: 86–89.
- Kribbs PJ. (1990). Comparison of mandibular bone in normal and osteoporotic women. *J Prosthet Dent.* 63: 218-222.
- Kwak HB, Kim JY, Kim JY y cols., (2009). Risedronate directly inhibits osteoclast differentiation and inflammatory bone loss, *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 7:1193–1198.
- Kwon B, Youn BS, Kwon BS. (1999). Functions of newly identified members of the tumor necrosis factor receptor/ligand superfamilies in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 11: 340-345.
- Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. (1998). Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93: 165-176.
- Lang NP, Mombelli A, Attstrom R. (2003). Capítulo 3 Placa y sarro dental. *Periodontología Clínica e implantología odontológica*. Lindhe J, Thorkild K, Lang N. Editorial Medica Panamericana, S.A. Madrid, España, pp 102-134.
- Lang NP, Joss A, Orsanic T, Gusberti FA, Siegrist BE. (1986). Bleeding on probing. A predictor for the progression of periodontal disease? *J Clin Periodontol.* 13: 590-596.
- Lang NP, Adler R, Joss A, Nyman S. (1990). Absence of bleeding on probing. An indicator of periodontal stability. *J Clin Periodontol.* 17: 714-721.

- Lerner UH. (2006). Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. *J Dent Res*. 85: 584-595 (A).
- Lerner UH. (2006). Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of postmenopausal osteoporosis. *J Dent Res* 85: 596- 607(B).
- Li Y, Toraldo G, Li A, Yang X, Zhang H, Qian W-P, Weitzmann M N. (2007). 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.
- Liang L., Yu J., Wang Y., Ding Y. (2008). Estrogen regulates expression of osteoprotegerin and rankl in human periodontal ligament cells through estrogen receptor beta. *J Periodontol* 79:1745-1751.
- Lindhe J, Haffajee AD, Socransky SS. (1983). Progression of periodontal disease in adult subjects in the absence of periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 10: 433-442.
- Liu D, Xu JK, Figliomeni L y cols. (2003). Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction. *Int J Mol Med* 11: 17–21.
- Locker D, Slade GD, Murray H. (1998). Epidemiology of periodontal disease among older adults: a review. *Periodontol 2000* 16: 16-33.
- Loe H, Holm-Pedersen P. (1965). Absence and presence of fluid from normal and inflamed gingivae. *Periodontics*. 149: 171-177.
- Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y. (2008). Osteoimmunology: Interactions of the Bone and Immune System. *Endocrine Reviews* 29: 403-440.
- Lu H-K, Chen Y-L, Chang H-C, Li C-L, Kuo MY-P. (2006). Identification of the OPG/RANKL system in gingival crevicular fluid and tissue of patients with chronic periodontitis. *J Periodont Res* 41: 354–360.
- Lum L, Wong BR, Josien R, Becherer JD, Erdjument-Bromage H, Schlondorff J. y cols. (1999). Evidence for a role of a tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *J Biol Chem* 274: 13613-13618.
- Lundström A, Jendle J, Stenström B, Toss G, Ravald N. (2001). Periodontal conditions in 70-year-old women with osteoporosis. *Swed Dent J*. 25: 89-96.

- Manolagas SC, Jilka RL. (1995). Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med* 332: 305-11.
- Mezquita-Raya P, De la Higuera M, Fernandez Garcia D, Alonso G, Ruiz-Requena ME, de Dios Luna J, Escobar-Jimenez F, Munoz-Torres M. (2005). The contribution of serum osteoprotegerin to bone mass and vertebral fractures in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 16: 1368–1374.
- Michael H, Harkonen PL, Vaananen HK, Hentunen TA. (2005). Estrogen and testosterone use different cellular pathways to inhibit osteoclastogenesis and bone resorption. *J Bone Miner Res* 20: 2224–2232.
- Mizuno A, Amizuka N, Irie K, y cols. (1998). Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/ osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun* 247:610-615.
- Mizuno, A., Kanno, T., Hoshi, M., Shibata, O., Yano, K., Fujise, N., Kinosaki, M., Yamaguchi, K., Tsuda, E., Murakami, A., Yasuda, H. & Higashio, K. (2002). Transgenic mice overexpressing soluble osteoclast differentiation factor (sODF) exhibit severe osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. 20: 337–344.
- Mogi M., Otogoto J., Ota N., and Togari A. (2004). Differential expression of RANKL and Osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Dent Res* 83:166-169.
- Mohammad AR, Brunsvold M, Bauer R. (1996). The strength of association between systemic postmenopausal osteoporosis and periodontal disease. *Int J Prosthodont*. 9: 479-483.
- Mohammad AR, Bauer RL, Yeh CK. (1997). Spinal bone density and tooth loss in a cohort of postmenopausal women. *Int J Prosthodont*. 10: 381-385.
- Monroe DG, McGee-Lawrence M, Oursler MJ, Westendorf JJ. (2012). Update on Wnt signaling in bone cell biology and bone disease. *Gene*. 492: 1-18.
- Muñoz-Torres M, de la Higuera Lopez-Frías M, Fernández García D. (2004). Avances en la biología del osteoclasto: el sistema osteoprotegerina-ligando de RANK. *Med Clin* 122: 75-77.
- Murakami T, Yamamoto M, Ono K, Nishikawa M, Nagata N, y cols. (1998). Transforming growth factor-beta1 increases mRNA levels of osteoclastogenesis inhibitory factor in osteoblastic/stromal cells and inhibits the

survival of murine osteoclast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 252: 747-752.

- Nagai M, Sato N. (1999). Reciprocal gene expression of osteoclastogenesis inhibitory factor and osteoclast differentiation factor regulates osteoclast formation. *Biochem Biophys Res Commun* 257: 719-723.

- Nagasawa T, Kobayashi H, Kiji M, y cols. (2002). LPS-stimulated human gingival fibroblasts inhibit the differentiation of monocytes into osteoclasts through the production of osteoprotegerin. *Clin Exp Immunol* 130: 338- 344.

- Nakashima K, Giannopoulou C, Andersen E, y cols. (1996). A longitudinal study of various crevicular fluid components as markers of periodontal disease activity. *J Clin Periodontol* 23: 832-838.

- Nakashima, T., Kobayashi, Y., Yamasaki, S., Kawakami, A., Eguchi, K., Sasaki, H. & Sakai, H. (2002). Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochemistry and Biophysics Research Communication*. 275: 768–775.

- Nishikawa M, Akatsu T, Katayama Y, Yasutomo Y, Kado S, Kugal N, Yamamoto M, Nagata N. (1996). Bisphosphonates act on osteoblastic cells and inhibit osteoclast formation in mouse marrow cultures. *Bone*. 18: 9-14.

- Ñañez ML, Grenón MS. Salud buco-dental en el climaterio: modificaciones y manejo odontológico. En: Asociación Argentina para el Estudio del Climaterio. *Climaterio*. Córdoba: agosto 2006. Editorial Ascune Hnos, ISBN: 950-9124-43-5. Pág.782-793.

- Offenbacher S. (1996). Periodontal Diseases: Pathogenesis. *Ann Periodontol* 1:821-878.

- OMS. Grupo científico de la OMS (1994: Ginebra, Switzerland). Investigaciones sobre la menopausia en los años noventa. Reporte del Grupo científico de la OMS. *Organización Mundial de la Salud*, Serie de Informes técnicos, N° 866.

- Overman P. (2000). Biofilm: A new view of plaque. *J Contemp Dent Pract*, 1: 1-7.

- Pacifici R. (1996). Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 11: 1043-1051.

- Page RC, Schroeder HE (1976). Pathogenesis of inflammatory periodontal disease: a summary of current work. *Laboratory Invest* 3: 235-249.
- Page RC, Schroeder HE. (1981). Current status of the host response in chronic marginal periodontitis. *J Periodontol* 52: 477-491.
- Page R C, Kornman K S. (1997). The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology* 2000, 14: 9-11.
- Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. (1997). Advances in the pathogenesis of periodontitis: Summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol* 2000 14: 216-248.
- Pan B, Farrugia A, To L y cols. (2004). The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, influences RANKL expression in human osteoblast-like cells by activating TNF-alpha converting enzyme (TACE). *J Bone Miner Res* 19:147–154.
- Payne JB, Reinhardt RA, Nummikoski PV, Patil KD. (1999). Longitudinal alveolar bone loss in postmenopausal osteoporotic/osteopenic women. *Osteoporos Int.* 10: 34-40.
- Peña R T, Delgado R A, Martínez A. Nociones actuales sobre la flora microbiana del surco gingival. *Rev Cubana Estomatol* [online]. 2007; vol. 44, n.3. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072007000300012&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0034-7507.
- Pöllänen MT, Salonen JI, Uitto VJ. (2003) Structure and function of the tooth-epithelial interface in health and disease. *Periodontol* 2000; 31: 12-31.
- Rauner M, Sipos W, Pietschmann P. (2007). Osteoimmunology. *International Archives of Allergy and Immunology.* 143: 31-48.
- Reddy MS, Weatherford TW 3rd, Smith CA, West BD, Jeffcoat MK, Jacks TM. (1995). Alendronate treatment of naturally-occurring periodontitis in beagle dogs. *J Periodontol.* 66: 211-217.
- Reddy SV, Roodman GD. (1998). Control of osteoclast differentiation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 8: 1-17.
- Reinhardt RA, Payne JB, Maze CA, Patil KD, Gallagher SJ, Mattson JS. (1999). Influence of estrogen and osteopenia/osteoporosis on clinical periodontitis in postmenopausal women. *J Periodontol.* 70: 823–828.

- Rogers A, Saleh G, Hannon RA, Greenfield D, Eastell R. (2002). Circulating estradiol and osteoprotegerin as determinants of bone turnover and bone density in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4470-4475.
- Ronderos M, Jacobs DR, Himes JH, Pihlstrom BL. (2000). Associations of periodontal disease with femoral bone mineral density and estrogen replacement therapy: cross-sectional evaluation of US adults from NHANES III. *J Clin Periodontol*. 27: 778-786.
- Ronderos M, Pihlstrom BL, Hodges JS. (2001). Periodontal disease among indigenous people in the Amazon rain forest. *J Clin Periodontol*. 28: 995-1003.
- Roodman GD. (1996). Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocr Rev* 17: 308-332.
- Rowe DJ, Bradley LS. (1981). Quantitative analyses of osteoclasts, bone loss and inflammation in human periodontal disease. *J Periodontal Res* 16: 13-19.
- Russell RG, Rogers MJ. (1999). Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again. *Bone*. 25: 97 - 106.
- Russell G. (2007). Bisphosphonates: Mode of Action and Pharmacology. *Pediatrics* 119: 150-162.
- Sanz M., Quirynen M. (2005). Advances in the aetiology of Periodontitis. *J Clin Periodontol* 32: 54–56.
- Sakata M, Shiba H, Komatsuzawa H, y cols. (1999). Expression of osteoprotegerin (osteoclastogenesis inhibitory factor) in cultures of human dental mesenchymal cells and epithelial cells. *J Bone Miner Res* 14: 1486-1492.
- Sakurai A, Okahashi N, Nakagawa I y cols. (2003). *Streptococcus pyogenes* infection induces septic arthritis with increased production of the receptor activator of the NF-kappaB ligand. *Infect Immun* 71: 6019– 6026.
- Schroeder HE, Lindhe J. (1980). Conditions and pathological features of rapidly destructive, experimental periodontitis in dogs. *J Periodontol* 51: 6-19.
- Seymour GJ, Powell RN, Aitken JF. (1983). Experimental gingivitis in humans. A clinical and histologic investigation. *J Periodontol* 54: 522-528. (A)

- Seymour GJ, Powell RN, Cole KL, y cols. (1983). Experimental gingivitis in humans. A histochemical and immunological characterization of the lymphoid cell subpopulations. *J Periodont Res.* 18: 375-385. (B).
- Shikawa I. (2007). Host responses in periodontal diseases: a preview. *Periodontology 2000* 43: 9–13.
- ShROUT MK, Hildebolt CF, Potter BJ, Brundsen TK, Pilgram TK, Dotson M, y cols. (2000). Comparison of morphological measurements extracted from digitized dental radiographs with lumbar and femoral bone mineral density measurements in postmenopausal women. *J Periodontol.* 71: 335–40.
- Shu L., Guan S-M, Fu S-M, Guo T, Cao M, Ding Y. (2008). Estrogen Modulates Cytokine Expression in Human Periodontal Ligament Cells. *J Dent Res* 87:142-147.
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R y cols. (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89: 309-19.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C. & Kent, R. L. Jr. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology* 25: 134–144.5.
- Southard KA, Southard TE, Schlechte JA, Meis PA. (2000). The relationship between the density of the alveolar process and that of the post-cranial bone. *J Dent Res.* 79: 964–969.
- Srivastava S, Toraldo G, Weitzmann MN, Cenci S, Ross FP, Pacifici R. (2001). Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL)-induced JNK activation. *J Biol Chem.* 276: 8836-8840.
- Streckfus CF, Johnson RB, Nick T, Tsao A, Tucci M. (1997). Comparison of alveolar bone loss, alveolar bone density and metacarpal density, salivary and gingival crevicular fluid interleukin-6 concentrations in healthy premenopausal and postmenopausal women on estrogen therapy. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 52: 343–51.
- Suda T, Takahashi N, Martin TJ. (1992). Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr Rev* 13: 66-80.
- Suda T, Nakamura I, Jimi E, Takahashi N. (1997). Regulation of osteoclast function. *J Bone Miner Res* 12: 869-879.

- Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ (1999). Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 20: 345–357.
- Sultan N, Rao J. (2011). Association between periodontal disease and bone mineral density in postmenopausal women: A cross sectional study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 16:440-447.
- Szulc P, Hofbauer LC, Heufelder AE, Roth S, Delmas PD. (2001). Osteoprotegerin serum levels in men: correlation with age, estrogen, and testosterone status. *J Clin Endocrinol Metab* 86:3162-3165.
- Taguchi A, Sueti Y, Ohtsuka M, Nakamoto T, Lee K, Sanada M, y cols. (2005). Relationship between self-reported periodontal status and skeletal bone mineral density in Japanese postmenopausal women. *Menopause*. 12: 144-148.
- Tanner A, Kent R, Maiden MF, Taubman MA. (1996). Clinical, microbiological and immunological profile of healthy, gingivitis and putative active periodontal subjects. *J Periodontal Res*. 31:195-204.
- Takai H, Kanematsu M, Yano K, Tsuda E, Higashio K, y cols. (1998). Transforming growth factor-beta stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *J Biol Chem* 273: 27091-27096.
- Takahashi N, Udagawa N, Suda T. (1999). A new member of Tumor Necrosis Factor Ligand Family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. *Biochem Biophys Res Commun* 256: 449-455.
- 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 γ . *Nature* 30: 535–536.
- Takayanagi, H. (2005). Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. *J Periodont Res* 40: 287–293.
- Taubman MA, Kawai T. (2001). Involvement of T- lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med* 12: 125-135.

- Taubman T A, Valverde P, Han X, Kawai T. (2005). Immune Response: The Key to Bone Resorption in Periodontal Disease *J Periodontol* 76: 2033-2041.
- Tenenbaum HC, Shelemay A, Girard B, Zohar R, Fritz PC. (2002). Bisphosphonates and periodontics: Potential applications for regulation of bone mass in the periodontium and other therapeutic/ diagnostic uses. *J Periodontol* 73:813–822
- Teng YT, Nguyen H, Gao X y cols. (2000). Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *J Clin Invest* 106: 59–67.
- Tezal M, Wactawski-Wende J, Grossi SG, Ho AW, Dunford R, Genco RJ. (2000). The relationship between bone mineral density and periodontitis in postmenopausal women. *J Periodontol* 71: 1492–1498.
- Tipton DA, Seshul BA, Dabbous MKh. (2011). Effect of bisphosphonates on human gingival fibroblast production of mediators of osteoclastogenesis: RANKL, osteoprotegerin and interleukin-6. *J Periodont Res* 46: 39–47.
- Tonetti MS, Imboden MA, Lang NP. (1998). Neutrophil migration into the gingival sulcus is associated with transepithelial gradients of interleukin-8 and ICAM-1. *J Periodontol*. 69: 1139-1147.
- Trofimov S, Pantsulaia I, Kobylansky E, Livshits G (2005) Circulating levels of receptor activator of nuclear factor-κB ligand/osteoprotegerin/macrophage-colony stimulating factor in a presumably healthy human population. *Eur J Endocrinol* 150: 305–311.
- Trouvin A-P, Goëb V. (2010). Receptor activator of nuclear factor-κB ligand and osteoprotegerin: maintaining the balance to prevent bone loss. *Clinical Interventions in Aging*. 5 345–354.
- Tsai CC, Hong YC, Chen CC, Wu YM. (1998). Measurement of prostaglandin E2 and leukotriene B4 in the gingival crevicular fluid. *J Dent*. 26:97-103.
- Udagawa N, Takahashi N, Yasuda H, y cols. (2000). Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology* 141: 3478-3484.
- Uitto V-J. (2003). Líquido crevicular gingival: Introducción. *Periodontology 2000* 31: 9-11.

- Valverde P, Kawai T, Taubman MA. (2004). Selective blockade of voltage-gated potassium channels reduces inflammatory bone resorption in experimental periodontal disease. *J Bone Miner Res* 19:155–164.
- Van Dyke, TE. (2008). The Management of inflammation in periodontal disease. *J. Periodontol* 79:1601-1608.
- Vega D, Maalouf N M, Sakhaee K. (2007). The Role of Receptor Activator of Nuclear Factor-B (RANK)/RANK Ligand/Osteoprotegerin: Clinical Implications. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 92: 4514-4521.
- Vernal R, Dutzan N, Hernández M, Chandía S, Puente J, León R, García L, Del Valle I, Silva A, and 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. *J Periodontol* 77: 1772-1780.
- Vernal R, Chaparro A, Dutzan N, Chandía S, Puente J, Silva A, Gamonal J. (2004). Asociación de mayores niveles de RANKL y linfocitos T CD4+ en periodontitis. *Revista Estomatología* 12: 5-23 (A).
- Vernal R, Chaparro A, Graumann R, Puente J, Valenzuela MA, Gamonal J. (2004). Levels of cytokine receptor activator of nuclear factor KB ligand in gingival crevicular fluid in untreated chronic periodontitis patients. *J Periodontol* 75: 1586-1591(B).
- Vernal R, Dutzan N, Chaparro A, Puente J, Valenzuela MA, Gamonal J. (2005). Levels of interleukin-17 (IL-17) in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 32: 383-389.
- Vernal R, Puente J, Silva A, Gamonal J. (2005). RANKL y su Asociación a los Linfocitos T CD4+ en la Periodontitis Crónica *Rev Chil Periodon Oseoint* 2: 13-23.
- Viereck V, Emons G, Lauck V y cols. (2002). Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulated osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 291: 680–686.
- Von Wowern N, Klausen B, Kollerup G. (1994). Osteoporosis: a risk factor in periodontal disease. *J Periodontol.* 65: 1134-1138.
- Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger J M. (2006). RANKL–RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Molecular Medicine* 12: 17-25.

- Wara-aswapati N, Surarit R, Chayasadam A, Boch JA, Pitiphat W. (2007). RANKL upregulation associated with periodontitis and *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol* 78: 1062-1069.
- Weinreb M, Quartuccio H, Seedor JG, Aufdemorte TB, Brunsvold M, Chaves E, Kornman KS, Rodan GA. (1994). Histomorphometrical analysis of the effects of the bisphosphonate alendronate on bone loss caused by experimental periodontitis in monkeys. *J Periodontal Res.* 29: 35-40.
- Weyant RJ, Pearlstein ME, Churak AP, Forrest K, Famili P, Caucey JA. (1999). The association between osteopenia and periodontal attachment loss in older women. *J Periodontol.* 70: 982-991.
- WHO Study Group. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO scientific group. *World Health Organization*, 1994 (WHO Technical Report Series, No. 843).
- WHO Scientific Group on the Prevention and Management of Osteoporosis (2000: Geneva, Switzerland) Prevention and management of osteoporosis: report of a *WHO scientific group*. (WHO technical report series; 921)
- Williams RC, Jeffcoat MK, Kaplan ML, Goldhaber P, Johnson HG, Wechter WJ. (1985). Flurbiprofen: A potent inhibitor of alveolar bone resorption in beagles. *Science* 227: 640-642.
- Wong BR, Besser D, Kim N, Arron JR, Vologodskaja M y cols. (1999). TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src. *Mol Cell.* 4: 1041-1049.
- Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. (2000). Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol.* 27: 648-657.
- Yano K, Tsuda E, Washida N, Kobayashi F, Goto M, Harada A, Ikeda K, Higashio K, Yamada Y. (1999). Immunological characterization of circulating osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor: increased serum concentrations in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 14:518-527.
- Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N y cols. (1998). 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-I, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. (1998). Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteo-protegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Aca Sci USA* 95: 3597-3602.

- Yoshihara A, Seida Y, Hanada N, Miyazaki H. (2004). A longitudinal study of the relationship between periodontal disease and bone mineral density in community-dwelling older adults. *J Clin Periodontol*. 31: 680-684.

- Zappa U, Simona C, Schappi P, Graf H, Espeland M. (1990). Episodic probing attachment loss in human histologic association. *J Periodontol* 61: 420-426.