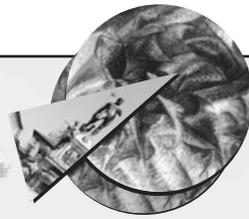


SIdP



## ESPRESSIONE DELL' mRNA DI RANKL E OPG NELLE PARODONTITI E PERIIMPLANTITI E LORO COINVOLGIMENTO NEL RIASSORBIMENTO OSSEO.

### STUDIO SPERIMENTALE - RICERCA DI BASE

G. Villano\*, S. Matarasso\*, F. Aniello§, A. Donizetti§, C. Cafiero\*

\*Dipartimento di Scienze Odontostomatologiche e Maxillo-Facciali dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II"; § Dipartimento di Biochimica e Biologia molecolare della Università degli Studi di Napoli "Federico II"

Atti della Sessione di ricerca Premio "HM Goldman" - XV Congresso Nazionale SIdP - Bologna 6-7-8 Marzo 2008

## RIASSUNTO

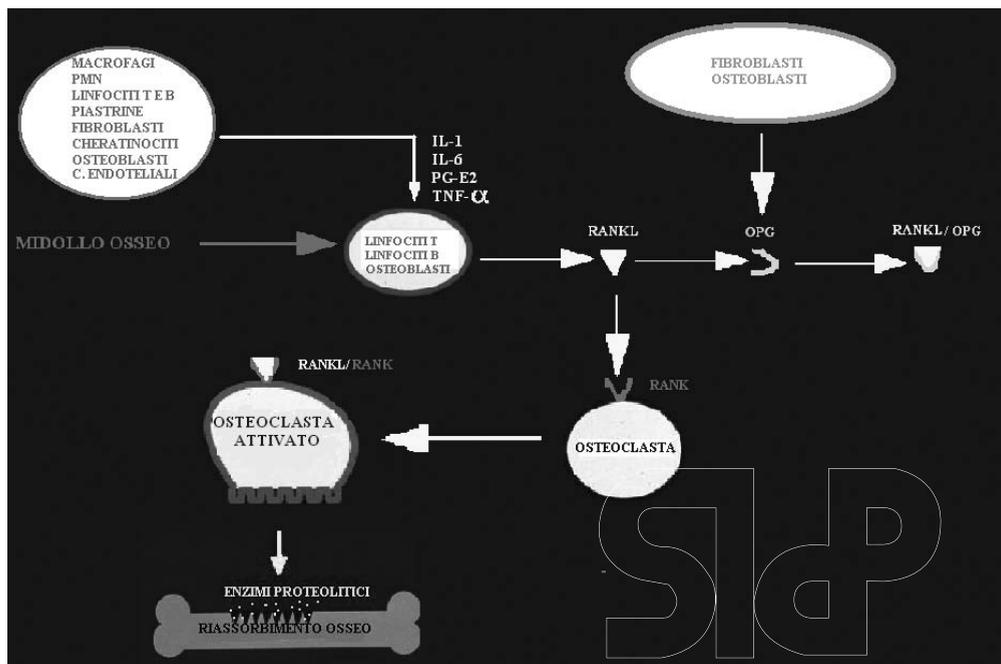
Il riassorbimento osseo è regolato dalla espressione di due proteine, RANKL secreto da Linfociti T, B ed osteoblasti e OPG secreto da fibroblasti ed osteoblasti. Il presente lavoro sperimentale ha avuto per oggetto l'espressione dell' mRNA di queste proteine nei soggetti sani, in corso di parodontite e di perimplantite.

## INTRODUZIONE

Il meccanismo che regola il riassorbimento osseo è comune sia a condizioni fisiologiche (omeostasi tra riassorbimento e neo-apposizione ossea), sia a condizioni patologiche (riassorbimento infiammatorio) (Yasuda *et al.*, 1998 ; Udagawa *et al.*, 2002).

In condizioni fisiologiche, infatti, l'equilibrio tra riassorbimento e neoapposizione ossea è regolato dalla espressione di due proteine, RANKL (Ligando del Recettore Attivatore di NF- $\kappa$ B, secreto da linfociti T e B attivati e dagli osteoblasti) ed OPG (osteoprotegerina, secreta dai fibroblasti del legamento parodontale ed osteoblasti) (Lu *et al.*, 2006). La maggior parte di RANKL secreto viene ad essere saturato da OPG, il quale costituisce un falso bersaglio per RANKL, mentre una piccola frazione di RANKL va ad interagire con il suo recettore naturale RANK (Recettore Attivatore di NF- $\kappa$ B) presente sui precursori osteoclastici con conseguente maturazione dell'osteoclasta e riassorbimento osseo. In sintesi OPG sottrae RANKL dal legame con il suo vero recettore (RANK), creando una vera e propria inibizione competitiva, impedendo la differenziazione da pre-osteoclasta in osteoclasta e successivo riassorbimento osseo (Crotti *et al.*, 2003).

In presenza di infiammazione (Fig. 1), la secrezione di citochine infiammatorie (IL- 1, IL-6, PGE<sub>2</sub> e TNF $\alpha$ ) da parte di macrofagi, PMN, linfociti T e B, inducono i linfociti T e B attivati e gli osteoblasti a produrre massive quantità di RANKL.



In tali condizioni, una up-regulation di RANKL è associata con una down-regulation di OPG che verrà prodotta in quantità minime (Boyce B.F. & Xing L., 2007). Il RANKL prodotto pertanto andrà a legare il RANK presente sui precursori osteoclastici, con conseguente massivo riassorbimento osseo (Liu *et al.*, 2002).

## SCOPO DELLA RICERCA

Lo scopo della ricerca è stato quello di esaminare i livelli di espressione dell'RNA messaggero che codifica per le due proteine RANKL e OPG in pazienti sani, con parodontite cronica o con perimplantite (Bostanci *et al.*, 2007).

## MATERIALI E METODI

Presso il Reparto di Parodontologia del Dipartimento di Scienze Odontostomatologiche e Maxillo-Facciali dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II" sono stati selezionati tre gruppi di pazienti: un gruppo controllo (CG) costituito da 10 pazienti sani che non presentavano nessuna evidenza radiografica di riassorbimento osseo, presentavano sondaggio parodontale fisiologico (PD  $\leq 3$  mm) in tutti i siti e necessitavano di estrazione dentaria per motivi ortodontici; un gruppo test1 (TG1) costituito da 10 pazienti affetti da parodontite cronica che presentavano evidenza radiografica di riassorbimento osseo orizzontale e con profondità di tasche  $\geq 6$  mm in almeno un sito per ciascun sestante; un gruppo test2 (TG2) costituito da 10 pazienti con perimplantite che presentavano evidenza radiografica di riassorbimento osseo perimplantare e profondità di tasca perimplantare  $\geq 6$  mm in almeno un sito. Da ciascun paziente è stato effettuato un prelievo di tessuto molle di circa 2 mm. Per quanto riguarda i pazienti del gruppo CG è stato prelevato tessuto gengivale sano, mentre campioni della parte più apicale del tessuto granulomatoso sono stati prelevati nei pazienti dei gruppi TG1 e TG2.

I campioni prelevati sono stati lavati in soluzione fisiologica e quindi sommersi in contenitori sterili con *RNA solution* (Triazol®, Invitrogen Corporation, California, U.S.A.) e conservati a -40°C.

Tali campioni sono stati analizzati presso il laboratorio di Biochimica e Biologia molecolare della Università degli Studi di Napoli "Federico II" per l'estrazione dell'RNA totale, seguendo il protocollo descritto da Sprenger et al. (1995) di seguito qui sintetizzato. I tessuti prelevati sono stati omogeneizzati con un omogeneizzatore Ultra-Turrax®. L'RNA totale è stato estratto dall'omogenato con soluzione fenolo-cloroformio (5:1), ne è stata determinata la concentrazione mediante lettura dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 260 nm in uno spettrofotometro. L'integrità dell'RNA totale è stata valutata dopo corsa elettroforetica tramite la visualizzazione dell'integrità degli RNA ribosomiali 18S e 28S. L'RNA estratto è stato retro trascritto in cDNA (DNA copia) mediante l'enzima Reverse Transcriptase (RT, 200 U/μl, Invitrogen Corporation, California, U.S.A.) a 42°C per 50 min. Una aliquota del cDNA ottenuto è stato amplificato mediante PCR (Polimerase Chain Reaction) utilizzando specifici oligonucleotidi sonde. Tali oligonucleotidi sono stati disegnati sulle sequenze genomiche note di RANKL (senso 5'-GCCAGTGGGAGATGTTAG-3', antisenso 5'-TTAGCTGCAAGTTTTCCC-3') e OPG (senso 5'-GCTAACCTCACCTTCGGG-3', antisenso 5'-TGATTGGACCTGGTTACC-3') al fine di amplificare una regione codificante per RANKL e OPG ed analizzare il loro livello di espressione. I prodotti di amplificazione della PCR per RANKL e OPG sono rispettivamente di 486 e 324 bp. I campioni amplificati dei geni RANKL e OPG sono stati caricati su gel di agarosio con bromuro di etidio (EtBr) e dopo corsa elettroforetica visualizzati ai raggi UV e quantificati con software di analisi dell'immagine (Quantity One®, Bio-Rad Laboratories, Inc. California, USA).

## RISULTATI

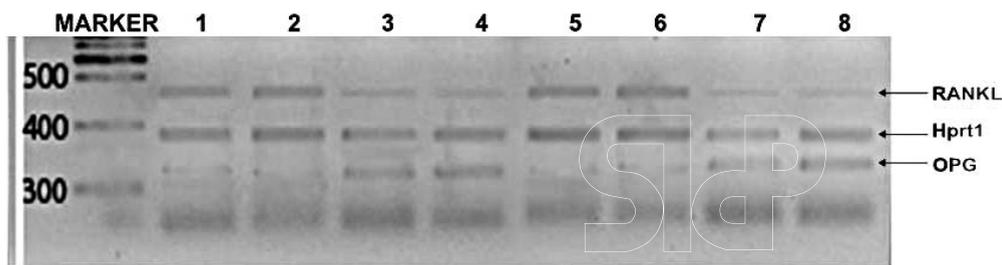
I livelli di intensità del segnale di espressione di RANKL ed OPG sono stati confrontati con il gene *Hprt1*, espresso costituzionalmente in tutte le cellule.

L'mRNA di *Hprt1* è stato usato al fine di escludere possibili differenze individuali nei livelli di espressione genica di RANKL e OPG che potrebbero essere dovute a variazioni intrinseche del singolo soggetto.

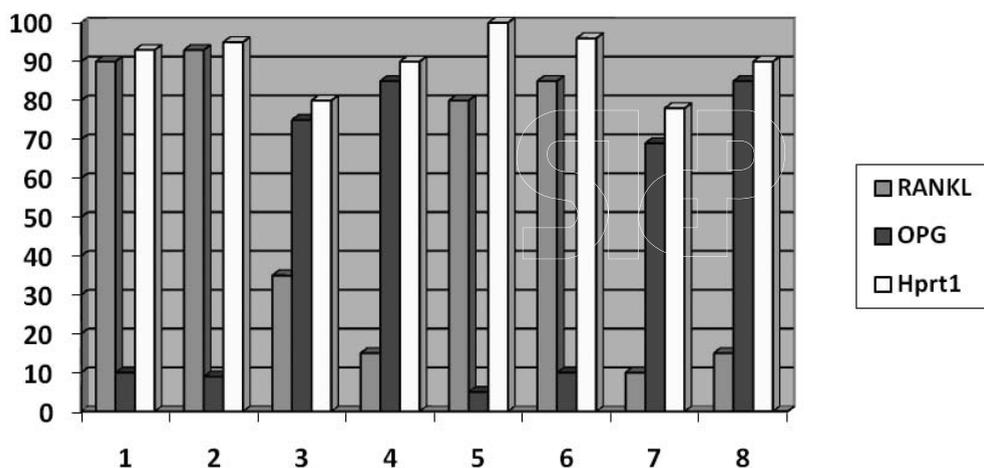
I risultati ottenuti dopo corsa elettroforetica (Fig. 2), mostrano chiaramente che l'intensità del segnale di espressione di RANKL è alta nei pazienti con parodontite cronica (gruppo test TG1) e perimplantite (gruppo test TG2) mentre è di bassa intensità nei pazienti sani appartenenti al gruppo controllo CG. Al contrario l'intensità del segnale dell'mRNA di OPG è alta nei campioni dei pazienti sani (gruppo controllo CG) e di bassa intensità in quelli con parodontite cronica (gruppo test TG1) e perimplantite (gruppo test TG2), stando ad indicare una minima espressione di tale gene in questi ultimi soggetti (Fig. 3).

## DISCUSSIONE

Alla luce dei lavori esaminati e dei risultati ottenuti, RANKL assume un ruolo chiave nella regolazione della differenziazione osteoclastica. La regolazione del riassorbimento osseo è diretta dalla modulazione positiva (up-regulation) di RANKL e quella negativa (down-regulation) di OPG che agisce quale falso recettore bersa-



**Fig. 2.** Semi-quantitativa RT-PCR di RANKL e OPG in soggetti sani e con parodontite cronica. Il gene *Hprt1* espresso costitutivamente è usato come controllo interno per i tessuti gengivali campioni al fine di escludere possibili differenze nei livelli di espressione genica di RANKL e OPG che potrebbero essere dovute a variazioni intrinseche del campione individuale. I prodotti di PCR sono rimossi dal termoamplificatore dopo 35 cicli di amplificazione e caricati su gel di agarosio all'1% con EtBr per corsa elettroforetica. L'intensità della fluorescenza dei prodotti di amplificazione (RANKL, OPG e *Hprt1*) sono visualizzati sotto raggi UV con software di analisi dell'immagine (Quantity One®, Bio-Rad Laboratories, Inc. California, USA). I campioni 2 e 5 sono casi di parodontite cronica; i campioni 1 e 6 sono casi di perimplantite; i campioni 3, 4, 7 e 8 sono appartenenti a soggetti sani. I livelli di intensità dei segnali di espressione di RANKL e OPG sono stati misurati rispetto ai livelli di espressione del gene controllo *Hprt1* per ogni singolo soggetto. L'intensità del segnale dell'mRNA di RANKL è alta nei campioni con parodontite cronica (2 e 5) ed in quelli con perimplantite (1 e 6), mentre di bassa intensità in quelli sani (3, 4, 7, 8). L'intensità del segnale dell'mRNA di OPG è alta nei campioni di soggetti sani e di bassa intensità in quelli con parodontite cronica e perimplantite, stando ad indicare una minima espressione di tale gene in questi ultimi soggetti. La lunghezza dei prodotti di PCR di RANKL, OPG e *Hprt1* sono rispettivamente di 486, 324 e 380 paia di basi.



**Fig. 3.** Rappresentazione grafica dei livelli di intensità del segnale di espressione per i geni RANKL, OPG e *Hprt1*. L'intensità del segnale dell'mRNA di RANKL è alta nei campioni con perimplantite (1 e 6) e con parodontite cronica (2 e 5), mentre di minima intensità in quelli sani (3, 4, 7, 8). Al contrario, l'intensità del segnale dell'mRNA di OPG è alta nei campioni di soggetti sani (3, 4, 7, 8) e di bassa intensità in quelli con perimplantite (1, 6) e con parodontite cronica (2, 5), stando ad indicare una minima espressione di tale gene in questi ultimi soggetti.

glio per RANKL. Il presente studio ha analizzato i livelli dell'espressione dell'mRNA di RANKL e OPG in campioni di tessuto gengivale di soggetti sani, parodontopatici e con perimplantite mediante RT-PCR (Reverse Transcriptase – Polimerase Chain Reaction) semiquantitativa. L'espressione di mRNA di RANKL è aumentata nei soggetti con parodontite cronica e con perimplantite rispetto all'espressione dello stesso in soggetti sani. Al contrario, l'mRNA di OPG è espresso in tutti i tessuti dei pazienti sani, ed i suoi livelli decrescono marcatamente in soggetti con parodontite cronica e con perimplantite. La presente ricerca dimostra gli alti livelli di espressione di RANKL ed i bassi livelli di espressione di OPG in tessuti gengivali di pazienti con parodontite e perimplantite rispetto a quelli sani. La differenza di espressione di RANKL e OPG riflette la variazione nel loro rapporto (RANKL/OPG), il quale è significativamente aumentato nei parodontopatici e nei soggetti con perimplantite, rispetto ai pazienti appartenenti al gruppo sano. L'aumento del rapporto RANKL/OPG è pertanto indicativo di riassorbimento osseo in fase di attività della malattia. In conclusione il presente studio conferma il coinvolgimento del rapporto RANKL e OPG nel riassorbimento osseo delle parodontiti e, come risultato originale, propone un meccanismo analogo nella patogenesi delle perimplantiti. Queste informazioni potrebbero servire ad identificare marker diagnostici (come RANKL) nella progressione delle parodontiti e perimplantiti. È ipotizzabile l'utilizzo di OPG come presidio terapeutico per un nuovo approccio farmacologico contro il riassorbimento osseo nelle parodontiti, controllando o inibendo l'azione di RANKL.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bostanci N, Ilgenli T, Emingil G, Afacan B, Han B, Berdeli A. Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: implications of their relative ratio. *J. Clin. Periodontol.*, 2007°; 34: 370-376.
2. Bostanci N, Ilgenli T, Emingil G, Afacan B, Han B, Berdeli A. Differential expression of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand and osteoprotegerin mRNA in periodontal diseases. *J. Periodont. Res.* 2007b; 42: 287-293.
3. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Research & Therapy.* 2007; 9(Suppl 1): *Review*.
4. Crotti T, Smith MD, Hirsh R, Soukoulis S, Weedon H, Capone M. Receptor activator NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *J. Periodont. Res.* 2003; 38: 380-387.
5. Liu D, Xu JK, Figliomeni L, Huang L, Pavlos NJ, Rogers M, Tan A. Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: Possible involvement in bone destruction. *International Journal of Molecular Medicine* 2002; 11: 17-21.
6. Lu H-K, Chen Y-L, Li C-L, Kuo M.Y-P. Identification of the osteoprotegerin / receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand system in gingival crevicular fluid and tissue of patients with chronic periodontitis. *J. Periodont. Res.* 2006; 41: 354-360.
7. Sprenger H, Konrad L, Rischkowsky F, Gemsa D. RNA extraction from gastrointestinal tract and pancreas by a modified Chomczynski and Sacchi metod. *Biotechniques* 1995; 19: 340-343.
8. Udagawa N, Kotake S, Kamatani N, Takahashi N, Suda T. The molecular mechanism of osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2002; 4: 281-289.
9. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE / RANKL. *Cell Biology* 1998; 95: 3597-3602.