

Diferencia en la Expresión del Ligando de Receptor Activador para el Factor Nuclear κ B, en Tejido Tumoral Frente a la Infección por Diferentes Patógenos Periodontales

Difference in Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Expression
in Tumoral Tissue by Different Periodontal Pathogens

Anushiravan Maher¹; David Nicolás Muñoz¹; María Francisca Pavicic²; Mario González³;
Pamela Ehrenfeld^{2,4}; Diego Halabí^{1,4,5}; Alejandra Muñoz-Kramm⁶ & Helmuth Muñoz^{1,5}

MAHER, A.; MUÑOZ, D. N.; PAVICIC, M. F.; GONZÁLEZ, M.; EHRENFELD, P.; HALABÍ, D.; MUÑOZ-KRAMM, A. & MUÑOZ, H. Diferencia en la expresión del ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B, en tejido tumoral frente a la infección por diferentes patógenos periodontales. *Int. J. Morphol.*, 41(2):431-436, 2023.

RESUMEN: La enfermedad periodontal es una de las principales causas de pérdida dentaria. Clínicamente, esta patología, mediada por la desregulación del sistema inmune producto de una disbiosis ocurrida en el surco gingival, inicia con la inflamación de la encía y evoluciona con el daño irreversible de los tejidos que rodean el diente. El hueso alveolar es uno de los tejidos afectados esta patología, esto debido a la activación de osteoclastos por la sobreexpresión de la proteína RANKL en el huésped. El propósito de este trabajo es determinar el nivel de sobreexpresión de RANKL, en un modelo de células tumorales U2OS, frente a la infección con *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia*. Para identificar el nivel de RANKL, se definieron cuatro grupos: Un grupo control, no tratado; Grupo PG, tratado con *P. gingivalis*; Grupo PI, tratado con *P. intermedia*; y un grupo PG+PI, tratado con ambas bacterias. El nivel relativo de la proteína RANKL fue determinado en el sobrenadante y en los extractos celulares de manera independiente, mediante la técnica Western blot. En sobrenadantes, el grupo PG mostró mayores niveles de RANKL comparados con PI ($p < 0,05$). En extractos celulares los niveles fueron mayores en el grupo PG+PI ($p < 0,05$). El grupo PI mostró los niveles más bajos de RANKL. La infección polimicrobiana resulta en una mayor expresión de RANKL en células tumorales U2OS, mientras que frente a la infección *P. gingivalis*, se observó mayor cantidad de RANKL soluble.

PALABRAS CLAVE: Reabsorción de hueso; Enfermedad periodontal; Ligando RANK; Bacterias anaeróbicas.

INTRODUCCIÓN

En humanos, la homeostasis del hueso involucra un ciclo continuo de remodelación. La reabsorción, mediada por osteoclastos, y la aposición de nuevo tejido mineralizado, por parte de osteoblastos, son los mecanismos que mantienen la estructura y función ósea (Karsenty & Wagner, 2002). Bajo ciertas condiciones patológicas, es posible observar un desequilibrio entre la aposición y reabsorción de minerales. Artritis, osteoporosis, periodontitis, entre otras, son patologías en las que este desequilibrio favorece la reabsorción prevalente por sobre la aposición de hueso nuevo (Rodan, 2000).

Para que exista un aumento en la reabsorción ósea, se requiere de la diferenciación de osteoclastos. La diferenciación de este tipo celular es inducida por una proteína soluble conocida como, ligando del receptor activador del factor nuclear κ B (RANKL).

RANKL es una proteína de 20-kDA compuesta por 324 aminoácidos, perteneciente a la familia de citoquinas TNF, que se encuentra codificada en el gen TNFSF11 en humanos. Esta puede expresarse en la membrana celular y

¹ Escuela de Odontología, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

² Laboratorio de Patología Celular, Instituto de Anatomía, Histología y Patología, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

³ Instituto de Microbiología Clínica, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

⁴ Centro Interdisciplinario de Estudios del Sistema Nervioso (CISNe), Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

⁵ Laboratorio de Odontología Preventiva, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

⁶ Unidad de Pacientes Críticos, Hospital Base Valdivia, Valdivia, Chile

mantenerse unida a esta, o bien ser liberada al medio como proteína soluble (Walsh *et al.*, 2013).

La diferenciación y reclutamiento de osteoclastos se produce por la unión de RANKL al receptor activador del factor nuclear κ B (RANK) (Suda *et al.*, 1999; Udagawa *et al.*, 1999). Esta situación es necesaria para la reabsorción del tejido óseo en condiciones fisiológicas o patológicas (Kong *et al.*, 1999).

RANKL juega un papel fundamental en las enfermedades relacionadas con pérdida ósea. Enfermedades metabólicas como osteoporosis o disbiosis microbianas como periodontitis se ven influenciadas por el aumento de RANKL, aumentando el daño sobre los tejidos (Arron & Choi, 2000).

En periodontitis, la alteración en la microbiota gatilla la respuesta exagerada por sistema inmune del hospedero (Lerner, 2004; Hernández *et al.*, 2011), que se caracteriza, entre otras cosas, por la sobreexpresión de RANKL en linfocitos T, fibroblastos, osteoblastos, así como en otros tipos celulares presentes en el sitio afectado (Teng *et al.*, 2000). Es por lo tanto la disbiosis de la microbiota la principal responsable de la pérdida de hueso en esta patología (Listgarten *et al.*, 1991).

Las bacterias asociadas a enfermedad periodontal, aisladas desde placa subgingival, fueron clasificadas en diferentes grupos por Socransky *et al.* (1998). Este agrupamiento permite asociar a las bacterias involucradas en la periodontitis con las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Es así que se ha definido que distintas especies de microorganismos son más o menos abundantes dependiendo de la severidad de la periodontitis (Boutin *et al.*, 2017). En etapas de mayor severidad se encuentra mayor abundancia de *Porphyromonas gingivalis*, bacilo anaerobio Gram negativos, como agrupada en el complejo complejo rojo (Socransky *et al.*, 1998). Por otra parte, *Prevotella intermedia*, que se presentan en mayor abundancia en etapas menos severas de la enfermedad, pertenece al complejo naranja (Socransky *et al.*, 1998).

Estos actúan como señalizadores que inducen modificaciones en el metabolismo óseo. En periodontitis, el aumento de RANKL, y la consecuente diferenciación de osteoclastos es inducido por patrones moleculares asociados a patógenos (Suda *et al.*, 1999; Kawai & Akira, 2007). Sin embargo, el mecanismo a través del cual el sistema inmune responde frente a especies bacterianas diferentes no ha sido completamente descrito (Belibasakis *et al.*, 2007).

El propósito de nuestro estudio es determinar la diferencia en la expresión de RANKL, en cultivos celulares,

frente a la presencia de *P. gingivalis* y *P. intermedia*, especies representativas de los complejos rojo y naranja (Socransky *et al.*, 1998).

MATERIAL Y MÉTODO

Para determinar la diferencia en la expresión de RANKL frente a la presencia de dos patógenos periodontales diferentes, se utilizó un modelo *in vitro*, con cultivo celular de osteosarcoma humano U2OS HTB-96 (ATCC, Rockville, MA, USA). Las especies bacterianas utilizadas fueron cepas wild type de *P. gingivalis* ISP A20-2006 y *P. intermedia* ISP A149-2013, de la colección de cultivo del Instituto de Salud Pública de Chile.

Métodos de cultivo bacteriano. *P. gingivalis* y *P. intermedia* fueron cultivadas en Agar Sangre Anaeróbico (BD, Cockeysville, Maryland, USA), suplementado con Agar Tripticasa de Soya (BD, Cockeysville, Maryland, USA), 100 mg de kanamicina (BD, Cockeysville, Maryland, USA) y 10 mg de vitamina K (BD, Cockeysville, Maryland, USA), en condiciones de anaerobiosis utilizando el sistema GasPak™ EZ Anaerobe Container. (BD, Cockeysville, Maryland, USA), la temperatura de cultivo fue de 37° Celsius \pm 2 durante dos días.

Cultivo celular U2OS. Las células U2OS fueron cultivadas en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) 1X (Gibco, Grand Island, New York, USA), suplementadas con un 10 % de suero fetal bovino (FBS) (Gibco, Grand Island, New York, USA), 2 % de penicilina (Gibco, Grand Island, New York, USA), 2 % de streptomycin (Gibco, Grand Island, New York, USA) y un 1 % de anfotericina B (Gibco, Grand Island, New York, USA). Las células fueron cultivadas durante 3 días en 13 ml de medio de cultivo a 37 ° C, 1 atmósfera de presión y 5 % de CO₂. Al tercer día todos los cultivos fueron testeados para descartar contaminación por *Mycoplasma* sp. (Young *et al.*, 2010). Una vez alcanzado un 90 % de confluencia se aplicó Trypsina-EDTA 0,25 % durante cinco minutos. Posteriormente, fueron centrifugados durante 5 min a 3900 rpm. El sobrenadante fue descartado y los pellets fueron resuspendidos en DMEM 1X FBS 10 % conservando la concentración de suplementos antimicrobianos. Se realizó el conteo celular con un hemocitómetro, utilizando 10 μ l de azul de tripano (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA). Se sembraron 1,6 x 10⁶ células en placas de 60 mm de diámetro (TPP, Saint Louis, Missouri, USA). Inmediatamente antes de la inoculación, las células fueron lavadas con PBS. 24 horas previas a la inoculación fueron mantenidas en DMEM con 1 % de anfotericina B.

Los cultivos celulares fueron divididos en 4 grupos, un grupo libre de bacterias (GC); un grupo inoculado con *P. gingivalis* (PG); un grupo inoculado con *P. intermedia* (PI); y un grupo inoculado con ambas bacterias en igual proporción (PG+PI). Todos los grupos fueron tratados con un MOI de 100, el que fue alcanzado utilizando cultivo en caldo con concentración bacteriana de $2,1 \times 10^8$ CFU/mL. Se agregó 350 μ L de suspensiones bacterianas a una turbidez de 2 McFarland (6×10^8 CFU/mL). Los cultivos fueron analizados a las 0, 2, 8 y 24 horas en triplicado (n=12). Las proteínas totales fueron extraídas, concentradas y analizadas mediante Western Blot.

Determinación concentración relativa de RANKL. Luego de la inoculación, los estímulos fueron detenidos con 110 μ L de buffer RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 % Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA) y un mix inhibidor (250 μ g/ml par-nitrofenilfosfato, 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 1 μ g/ml apronitina, leupeptin and pepstatin, 1 mM NaF, and 1mM Na_3VO_4).

Las células fueron raspadas y tratadas con ultrasonido, las proteínas totales fueron medidas utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976). El sobrenadante fue recuperado, centrifugado a 1000 rpm y las proteínas fueron reprecipitadas con ácido tricloroacético al 20 % (Mejia *et al.*, 2015).

Las proteínas obtenidas fueron sometidas a una electroforesis en gel y electrotransferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Las membranas de PVDF fueron incubadas en anticuerpos anti RANKL (C-20): sc-7627 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) en dilución 1:1000 en albúmina de suero bovino (BSA). Como control se utilizó anticuerpo anti β -actina (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), en dilución 1:2000. Los anticuerpos fueron identificados mediante ECL Western Blotting Substrate Thermo Scientific™ Pierce™ (Pierce, Rockford IL, USA).

Análisis estadístico. La concentración de RANKL en sobrenadantes y extractos celulares fue comparada entre grupos y tiempos utilizando el análisis Anova dos vías (post-hoc Tukey), y las diferencias fueron determinadas como significativas con un valor de $p < 0,05$.

Todos los datos fueron analizados con R 3.4.2 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Los datos fueron graficados utilizando GraphPad Prism version 6.01 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

RESULTADOS

Los cultivos celulares de la línea U2OS fueron inoculados con *P. gingivalis* y *P. intermedia*, dos microorganismos representativos del complejo rojo y naranja (Socransky *et al.*, 1998). Todos los grupos fueron analizados en diferentes tiempos; 0, 2, 8 y 24 horas. Estos tiempos fueron medidos a partir de la inoculación con bacterias (T=0) hasta que se detuvo el cultivo con buffer RIPA. Los niveles de RANKL fueron medidos en sobrenadante y en extractos celulares mediante Western Blot. Todos los extractos celulares expresaron un nivel basal de RANKL antes de aplicar los estímulos.

Los resultados de la medición en extractos celulares muestran que el grupo PG presentó niveles más altos de expresión de RANKL ($p < 0,001$, Anova dos vías y Tukey) en comparación con el grupo PI (Tabla I). Sin embargo, el grupo inoculado con ambas bacterias demostró ser el que más expresó la proteína ($p < 0,001$, Anova dos vías y Tukey) (Figs. 1A-C). Estos resultados son concordantes con el carácter polimicrobiobiano de la periodontitis, y con el rol central que cumple *P. gingivalis* como patógeno periodontal en etapas avanzadas de la enfermedad. En el mismo grupo, se observa una disminución en la expresión a las 24 horas. La disminución fue de 2,5 veces, de 4069,9575 a las 2 horas a 1567,7945 a las 24 horas. Como era esperable, los resultados del Western Blot para el sobrenadante y los extractos celulares mostraron niveles basales de RANKL similares en los grupos control a las 2, 8 y 24 horas (Tabla II).

Tabla I. Nivel relativo de RANKL de extractos celulares.

Horas	Grupo Control	PI	PG	PG + PI
2	1067,5375	2155,533	2491,296	4069,9575
8	1087,7085	2918,347	4930,2795	6304,901
24	996,129	1222,0225	1307,033	1567,7945

El nivel de RANKL soluble (RANKLs) fue medido en sobrenadante en todas las muestras, en todos los puntos horarios. El grupo PG presentaba concentraciones significativamente más altas, en comparación con los demás grupos, en todos los puntos horarios de control ($p < 0,001$, Anova dos vías y Tukey). En este grupo se observaron concentraciones mayores a las que se apreciaban en el grupo que combinaba ambas especies bacterianas (Figs. 2A-C).

Las concentraciones de RANKL, de extractos celulares del grupo PG+PI no presentaron marcadas diferencias con el grupo PI, situación que se observó en todos los puntos horarios.

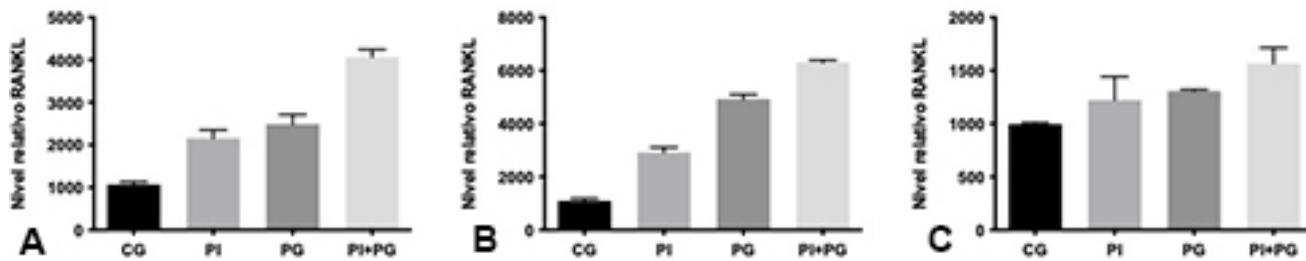


Fig. 1. Inoculación y nivel relativo de RANKL de extractos celulares de U2OS en grupo GC, PG+PI, PI, Y PG. (A) 2 horas de exposición. (B) 8 horas de exposición. (C) 24 horas de exposición. ($p < 005$). Se incluye b-actina como proteína housekeeping para control de la técnica de Western blot.

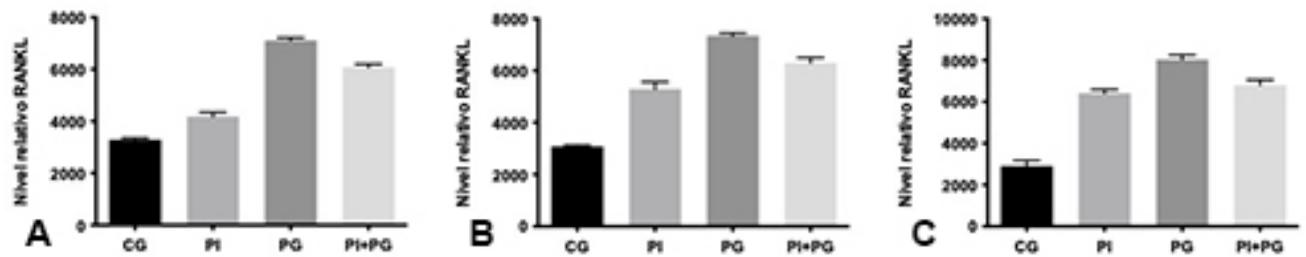


Fig. 2. Inoculación y nivel relativo de RANKL de sobrenadantes de U2OS en grupo GC, PG+PI, PI, Y PG. (A) 2 horas de exposición. (B) 8 horas de exposición. (C) 24 horas de exposición. ($p < 005$). Se incluye b-actina como proteína housekeeping para control de la técnica de Western blot.

Tabla II. Nivel relativo de RANKL en sobrenadante.

Horas	Grupo Control	PI	PG	PG + PI
2	3283,477	4183,1145	7114,376	6073,78
8	3083,805	5292,079	7345,604	6298,215
24	2900,784	6413,6185	8037,4365	6804,755

DISCUSION

La enfermedad periodontal es el resultado de una respuesta exacerbada del sistema inmune a la disbiosis del microambiente del surco gingival. El efecto de esta respuesta produce la destrucción de los tejidos de soporte del diente, incluido el hueso alveolar (Taubman & Kawai, 2001). Entre las especies bacterianas que aumentan su población en este proceso, produciendo la disbiosis del sitio afectado, se encuentran *P. gingivalis* y *P. intermedia* (Socransky *et al.*, 1998).

Frente al desbalance en la ecología microbiana del surco gingival, las células de los tejidos periodontales aumentan la síntesis de RANKL, aumentando la diferenciación de osteoclastos a nivel local, y por consecuencia la reabsorción ósea (Mogi *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2006). Sin embargo, existe escasa evidencia que permita establecer la diferencia, en términos de pérdida ósea, entre bacterias del complejo rojo en contraste con aquellas pertenecientes al complejo naranja, como *P. gingivalis* y *P. intermedia* respectivamente.

Con el propósito de evaluar las diferencias en la expresión de RANKL, en el presente trabajo realizamos la inoculación de células U2OS con ambas especies bacterianas, de forma independiente y en un cultivo de ambos microorganismos.

Los resultados obtenidos de los extractos celulares de la línea celular U2OS, confirmamos que RANKL se expresa en este tipo celular. Al mismo tiempo, fue confirmada expresión de RANKL en el sobrenadante, por lo tanto podemos inferir que parte de las células están secretando la proteína de manera soluble al medio, situación que fue coincidente con lo reportado por Mogi & Kondo (2013).

Los cultivos celulares inoculados con un mix de ambas especies bacterianas mostraron un aumento en las concentraciones de RANKL, por sobre los valores obtenidos en los cultivos sin estímulos, evidenciando un efecto de los microorganismos en la secreción del ligando, como ha sido reportado previamente (Mogi & Kondo, 2013).

Los niveles de RANKL, medidos en extractos celulares, aumentaron de manera similar a lo reportado en un estudio que utilizó cultivos celulares de U2OS y *Porphyromonas endodontalis*, microorganismo asociado a periodontitis apical (Chen *et al.*, 2009). Por otra parte, nuestros experimentos demostraron que la concentración de RANKL en sobrenadante aumentó al mantener los estímulo-

los bacterianos por mayor tiempo. Sin embargo, a las 24 horas se detectó una caída en los niveles de RANKL, contrario a lo demostrado en el trabajo citado anteriormente, en el que se utilizó una cepa de *P. endodontalis*, y en cuyos experimentos los niveles de RANKL mostraron la mayor concentración a las 24 horas (Chen *et al.*, 2009). La sobreexpresión de RANKL frente a un microorganismo del género *Porphyromonas*, es coincidente con los resultados de nuestros cultivos celulares, ya que, al comparar los cultivos de UO2S inoculados con ambas bacterias por separado y con el grupo control, se observaron mayores niveles de RANKLs en el grupo utilizó *P. gingivalis* como estímulo. Estos resultados tienen relación con la clasificación de los patógenos periodontales propuesta por Socransky *et al.* (1998).

Por otra parte, al analizar los pellets obtenidos luego de la centrifugación de los cultivos ya infectados, se puede confirmar que RANKL es una proteína que se expresa de forma constitutiva en células U2OS, sin embargo, aumenta su expresión frente a una infección bacteriana. Es así que el grupo PG+PI mostró mayor cantidad de RANKL, independiente de punto horario analizado, distinto a lo encontrado en el sobrenadante. Mediante este modelo no es posible identificar el mecanismo que explique dicha diferencia, sin embargo, estos resultados son coincidentes con el carácter polimicrobiano de la enfermedad periodontal.

En próximos estudios, sugerimos utilizar diferentes técnicas de detección y cuantificación de la proteína de interés, lo que permitiría realizar una comparación cuantitativa de las diferencias expresadas. Además, es importante conocer cual es la respuesta de otros microorganismos propios de la enfermedad periodontal, de tal forma que sea posible identificar su potencial de patogenicidad.

La infección polimicrobiana resulta en una mayor expresión de RANKL en células tumorales U2OS, mientras que frente a la infección *P. gingivalis*, se observó mayor cantidad de RANKL soluble.

AGRADECIMIENTOS. El presente estudio fue financiado por el proyecto DID UACH S-2016-28 de la Universidad Austral de Chile.

MAHER, A.; MUÑOZ, D. N.; PAVICIC, M. F.; GONZÁLEZ, M.; EHRENFELD, P.; HALABÍ, D.; MUÑOZ-KRAMM, A. & MUÑOZ, H. Difference in receptor activator of nuclear factor k B expression in tumoral tissue by different periodontal pathogens. *Int. J. Morphol.*, 41(2):431-436, 2023.

SUMMARY: Periodontal disease is one of the main causes of tooth loss. Clinically, this pathology, mediated by the

deregulation of the immune system due to a dysbiosis occurred in the gingival sulcus, begins with the inflammation of the gum and evolves with the irreversible damage of the tissues that surround the tooth. Alveolar bone is one of the most affected tissues by this disease, due to the activation of osteoclasts by the upregulation of RANKL in the host. The aim of this study is to determine the increase of RANKL, in a U2OS tumor cells model, inoculated with *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*. To identify the level of RANKL, four groups were defined: A control group, not treated; PG group, treated with *P.gingivalis*; PI group, treated with *P. intermedia*; and a PG+PI group, treated with both bacteria. The relative level of RANKL was determined in the supernatant and cell extracts independently, using the Western blot technique. In supernatants, the PG group showed higher RANKL levels compared to PI ($p < 0.05$). In cell extracts the levels were higher in the PG+PI group ($p < 0.05$). The PI group showed the lowest levels of RANKL. Polymicrobial infection results in a greater expression of soluble RANKL was observed.

KEY WORDS: Bone resorption; Periodontal disease; RANK ligand; Anaerobic bacteria.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arron, J. & Choi, Y. Bone versus immune system. *Nature*, 408(6812):535-6, 2000.
- Belibasakis, G. N.; Bostanci, N.; Hashim, A.; Johansson, A.; Aduse-Opoku, J.; Curtis, M. & Hughes, F.J. Regulation of RANKL and OPG gene expression in human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells by *Porphyromonas gingivalis*: a putative role of the Arg-gingipains. *Microb. Pathog.*, 43(1):46-53, 2007.
- Boutin, S.; Hagenfeld, D.; Zimmermann, H.; El Sayed, N.; Höpker, T.; Greiser, H. K.; Becher, H.; Kim, T. S. & Dälpke, A. H. Clustering of subgingival microbiota reveals microbial disease ecotypes associated with clinical stages of periodontitis in a cross-sectional study. *Front. Microbiol.*, 8:340, 2017.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-54, 1976.
- Chang, Y. C.; Ho, Y. C.; Chou, L. S. S.; Chou, M. Y. & Huang, F. M. Signal transduction pathways involved in the stimulation of tissue type plasminogen activator by interleukin-1 α and *Porphyromonas gingivalis* in human osteosarcoma cells. *J. Periodontal. Res.*, 41(5):374-80, 2006.
- Chen, S. C.; Huang, F. M.; Lee, S. S.; Li, M. Z. & Chang, Y. C. The upregulation of receptor activator NF-kB ligand expression by interleukin-1 α and *Porphyromonas endodontalis* in human osteoblastic cells. *Int. Endod. J.*, 42(4):375-80, 2009.
- Hernández, M.; Dutzan, N.; García-Sesnich, J.; Abusleme, L.; Dezerrega, A.; Silva, N.; González, F. E.; Vernal, R.; Sorsa, T. & Gamonal, J. Host-pathogen interactions in progressive chronic periodontitis. *J. Dent. Res.*, 90(10):1164-70, 2011.
- Karsenty, G. & Wagner, E. F. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev. Cell*, 2(4):389-406, 2002.
- Kawai, T. & Akira, S. TLR signaling. *Semin. Immunol.*, 19(1):24-32, 2007.
- 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.; *et al.* OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*, 397(6717):315-23, 1999.
- Lerner, U. H. New molecules in the tumor necrosis factor ligand and receptor superfamilies with importance for physiological and pathological bone resorption. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 15(2):64-81, 2004.

- Listgarten, M. A.; Slots, J.; Nowotny, A. H.; Oler, J.; Rosenberg, J.; Gregor, B. & Sullivan, P. Incidence of periodontitis recurrence in treated patients with and without cultivable *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, and *Porphyromonas gingivalis*: a prospective study. *J. Periodontol.*, 62(6):377-86, 1991.
- Mejia, A. J.; Matus, C. E.; Pavicic, F.; Concha, M.; Ehrenfeld, P. & Figueroa, C. D. Intracellular signaling pathways involved in the release of IL-4 and VEGF from human keratinocytes by activation of kinin B1 receptor: functional relevance to angiogenesis. *Arch. Dermatol. Res.*, 307(9):803-17, 2015.
- Mogi, M. & Kondo, A. The presence of RANKL-OPG complex in human osteosarcoma U2OS. *J. Immunoassay Immunochem.*, 34(4):356-64, 2013.
- Mogi, M.; Otogoto, J.; Ota, N. & Togari, A. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J. Dent. Res.*, 83(2):166-9, 2004.
- Rodan, G. A. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science*, 289(5484):1508-14, 2000.
- Socransky, S. S.; Haffajee, A. D.; Cugini, M. A.; Smith, C. & Kent, R. L. Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin. Periodontol.*, 25(2):134-44, 1998.
- Suda, T.; Takahashi, N.; Udagawa, N.; Jimi, E.; Gillespie, M. T. & Martin, T. J. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr. Rev.*, 20(3):345-57, 1999.
- Taubman, M. A. & Kawai, T. Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.*, 12(2):125-35, 2001.
- Teng, Y. T.; Nguyen, H.; Gao, X.; Kong, Y. Y.; Gorczynski, R. M.; Singh, B.; Ellen, R. P. & Penninger, J. M. Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *J. Clin. Invest.*, 106(6):R59-67, 2000.
- Udagawa, N.; Takahashi, N.; Jimi, E.; Matsuzaki, K.; Tsurukai, T.; Itoh, K.; Nakagawa, N.; Yasuda, H.; Goto, M.; Tsuda, E.; *et al.* Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor. *Bone*, 25(5):517-23, 1999.
- Walsh, N. C.; Alexander, K. A.; Manning, C. A.; Karmakar, S. K.; Wang, J. F.; Weyand, C. M.; Pettit, A. R. & Gravallesse, E. M. Activated human T cells express alternative mRNA transcripts encoding a secreted form of RANKL. *Genes Immun.*, 14(5):336-45, 2013.
- Young, L.; Sung, J. & Masters, J. R. Detection of mycoplasma in cell cultures. *Nat. Protoc.*, 5(5):929-34, 2010.

Dirección para correspondencia:
Helmuth Muñoz
Escuela de Odontología
Universidad Austral de Chile
Rudloff 1640
Valdivia
CHILE

E-mail: helmuth.munoz@uach