



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGÍA CONSERVADORA  
ÁREA DE PERIODONCIA  
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA ORAL  
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL  
CRANEOFACIAL**

**“EXPRESIÓN DE LOS GENES *OSM*, *IL27* E *IL11* EN TEJIDOS  
GINGIVALES DURANTE PERIODONTITIS EXPERIMENTAL”**

**Nicolás Andrés Maldonado Duarte**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN REQUISITO  
PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
CIRUJANO DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL:**

**Dr. Nicolás Raúl Dutzan Muñoz**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Dra. Marion Elizabeth Arce Paniagua**

**Dra. Loreto Andrea Abusleme Ramos**

**ASESORES**

**Dr. Marcelo Rodríguez Peña**

**Adscrito a Proyecto FONDECYT Iniciación 11180389**

**Santiago – Chile**

**2022**

## **Agradecimientos**

A mi familia, por ser un pilar fundamental a lo largo de mi vida, por quererme, aguantarme, apoyarme y por siempre inculcarme la importancia de la educación y del esfuerzo

A mi polola Javiera, por su amor, su cariño, sus palabras y su apoyo en los momentos difíciles de esta carrera. También a su familia por acogermme como uno más y hacerme sentir muy feliz y cómodo desde el principio

A mis amigos del colegio, gracias por mantener nuestra amistad por tanto tiempo, espero poder mantenerla por muchos años más.

A mis amigos que conocí en la universidad, con los que pasamos por momentos de mucho estrés pero que también nos unieron mucho, a mis “implacables”, y a todos con quienes compartí durante mi paso por la universidad.

A mi tutor principal de tesis: Dr. Nicolás Dutzan, por su disposición, su paciencia y su apoyo a lo largo de todo este trabajo de investigación.

A mis tutoras asociadas y asesor: Dra. Marion Arce, Dra. Loreto Abusleme y Dr. Marcelo Rodríguez, también por su apoyo en todo momento y buena disposición.

A mis compañeros tesisistas que siempre me ayudaron.

# Índice

1. RESUMEN:.....	4
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	5
I. Enfermedad periodontal y su importancia.....	5
II. Periodontitis y respuesta inmune.....	6
III. STAT3 y su rol en la activación de Th17.....	7
IV. Activación de STAT3 mediante GP130.....	8
V. Planteamiento del Problema.....	12
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	13
I. HIPÓTESIS.....	13
II. OBJETIVO GENERAL.....	13
III. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
4. METODOLOGÍA.....	14
5. RESULTADOS.....	20
I. Expresión génica relativa de <i>IL11</i> .....	20
II. Expresión génica relativa de <i>IL27</i> .....	21
III. Expresión génica relativa de <i>Osm</i> .....	22
IV. Comparativa de expresión génica en tejidos gingivales no ligados..	23
V. Comparativa de expresión génica en periodontitis inducida por ligadura.....	24
6. DISCUSIÓN.....	25
I. Aumento de la expresión génica relativa de <i>IL11</i> en periodontitis inducida por ligadura.....	26
II. Expresión génica relativa de <i>IL27</i> en periodontitis inducida por ligadura.....	27
III. Aumento de la expresión génica relativa de <i>Osm</i> en periodontitis inducida por ligadura.....	29
7. CONCLUSIONES.....	31
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
9. ANEXOS.....	40

## 1. RESUMEN:

**INTRODUCCIÓN:** La periodontitis es una enfermedad oral crónica inflamatoria prevalente a nivel mundial mediada por el sistema inmune. Se ha demostrado que la señalización de citoquinas mediante el receptor GP130 activa la vía mediada por STAT3 en los linfocitos Th17, los cuales producen IL17, promoviendo una respuesta inmuno-inflamatoria. Se han realizado diversas investigaciones respecto a IL6, una interleuquina que participa activamente en la activación de STAT3, sin embargo, existe información limitada sobre algunas citoquinas pertenecientes a la familia de IL6, las cuales señalizan a través del receptor GP130 tales como IL11, IL27 y OSM.

**OBJETIVOS:** Evaluar la expresión de los genes *Il11*, *Il27* y *Osm*, que codifican para citoquinas que señalizan mediante GP130.

**METODOLOGÍA:** Se obtuvieron muestras de tejido gingival sano y con periodontitis inducida utilizando el método de ligadura de ratones C57BL6. La expresión génica de las muestras fue determinada por RT-qPCR. Para calcular los niveles relativos de expresión génica se utilizó el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas si el valor de  $p < 0,05$ .

**RESULTADOS:** En tejido gingival murino, encontramos un aumento significativo en los niveles de expresión de los genes *Il11* y *Osm* entre periodontitis experimental y salud. No encontramos una variación significativa en los niveles de expresión de *Il27*.

**CONCLUSIÓN:** Nuestros datos revelan que los genes que codifican para las citoquinas IL11 y OSM se encuentran sobreexpresados en periodontitis inducida por ligadura en comparación con tejidos gingivales no ligados.

**PALABRAS CLAVES:** Periodontitis, citoquinas, STAT3.

**FINANCIAMIENTO:** FONDECYT iniciación 11180389

## **2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

### **I. Enfermedad periodontal y su importancia**

La enfermedad periodontal se encuentra dentro de las enfermedades con mayor prevalencia a nivel mundial (Vos et al., 2016). En Chile un 93.45% de los adultos entre 35 y 44 años y un 97.58% de los adultos mayores entre 65 y 74 años presentan signos de destrucción periodontal (Morales et al., 2020). Esta enfermedad, junto a la caries dental, representan la mayor causal de pérdida dentaria en la población adulta, lo cual afecta directamente en la nutrición, calidad de vida y autoestima de quienes la padecen (Tonetti MS, Jepsen S, Jin L, 2017). De acuerdo con el fondo internacional monetario, se ha estimado que las enfermedades periodontales han generado un gasto de 442 billones de dólares en el año 2010, sea por causa directa o indirecta (Listl et al., 2015).

La periodontitis se caracteriza por la desregulación de la respuesta inmune, la cual está asociada con una disbiosis de la microbiota subgingival (Hajishengallis & Lamont, 2012), desencadenando una respuesta inflamatoria exacerbada por parte del hospedero dando como resultado la destrucción de los tejidos de inserción de los dientes. (Newman, M., Takeji, H., Klokkevold, P., & Carranza, 2019).

Esta enfermedad, en sus etapas más avanzadas, ha sido relacionada con otras enfermedades sistémicas, debido a la diseminación de bacterias y/o sus subproductos a través del torrente sanguíneo, así como la diseminación de los mediadores inflamatorios generados en el periodonto (Tonetti MS, Jepsen S, Jin L, 2017). Por consiguiente, se ha relacionado a la periodontitis con enfermedades tales como diabetes mellitus, hipertensión arterial, enfermedad cardiovascular, enfermedad pulmonar, accidente cerebrovascular y resultados adversos en el embarazo (Baeza et al., 2020; Pihlstrom et al., 2005).

## II. Periodontitis y respuesta inmune

La respuesta inmune innata se activa cuando patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) en el periodonto. Este reconocimiento genera la liberación de citoquinas proinflamatorias (Garlet, 2010; Kinane et al., 2011), y reclutamiento de células inmunes como fagocitos, células presentadoras de antígenos, plasmocitos y linfocitos T (Kantarci et al., 2003; Taubman et al., 2005). Dentro de estas células inmunes, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> o linfocitos colaboradores, han sido descritos como un importante componente inflamatorio en periodontitis (Baker et al., 1999; Dutzan et al., 2016).

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> pueden diferenciarse en los subconjuntos de linfocitos T colaboradores (del inglés *helper*) efectores (Th), células T colaboradores foliculares (Thf) o T reguladores (Tregs) (Silva et al., 2015). Quienes poseen funciones únicas en la inmunidad protectora contra enfermedades infecciosas, así como autoinmunes o trastornos inflamatorios (Kane et al., 2014). Cada uno de estos subtipos celulares se caracteriza por la secreción de diferentes clases de citoquinas que modulan la respuesta inmune.

Los linfocitos Th, han sido estudiados en sitios de barrera tales como la piel, el tracto gastrointestinal y recientemente, la mucosa oral (Dutzan et al., 2017). Este subtipo celular tiene un papel clave tanto en la vigilancia inmune como en la mantención de la integridad de las mucosas. Sin embargo, en condiciones específicas, estos linfocitos Th17 participan en procesos destructivos (Dutzan et al., 2018). Las principales citoquinas efectoras que producen los linfocitos Th17 son la interleuquina 17A (IL17A), interleuquina 17F (IL17F) e interleuquina 21 (IL21) (Kane et al., 2014). Los Linfocitos Th17 junto con IL17A se han descrito como moduladores cruciales en la patogénesis de la periodontitis. Se ha evidenciado que una respuesta descontrolada de células Th17, promueve el daño tisular en el periodonto con la consecuente pérdida de hueso alveolar, esto debido a la participación de IL17A en

el reclutamiento de neutrófilos y la activación indirecta de osteoclastos (Adibrad et al., 2012; Dutzan et al., 2018)

### III. STAT3 y su rol en la activación de Th17

Estudios en modelos animales, han demostrado que, en condiciones patológicas, los linfocitos Th17 necesitan para su diferenciación la participación de citoquinas como interleuquina 6 (IL6) e Interleuquina 23 (IL23). Estas citoquinas activan las diferentes cascadas de señalización, donde participan tirosina-quinazas del tipo quinazas de Jano (JAK) y la familia de factores de traducción de Señales y Activador de Transcripción (STAT), particularmente STAT3 (Figura 1) (Kane et al., 2014).

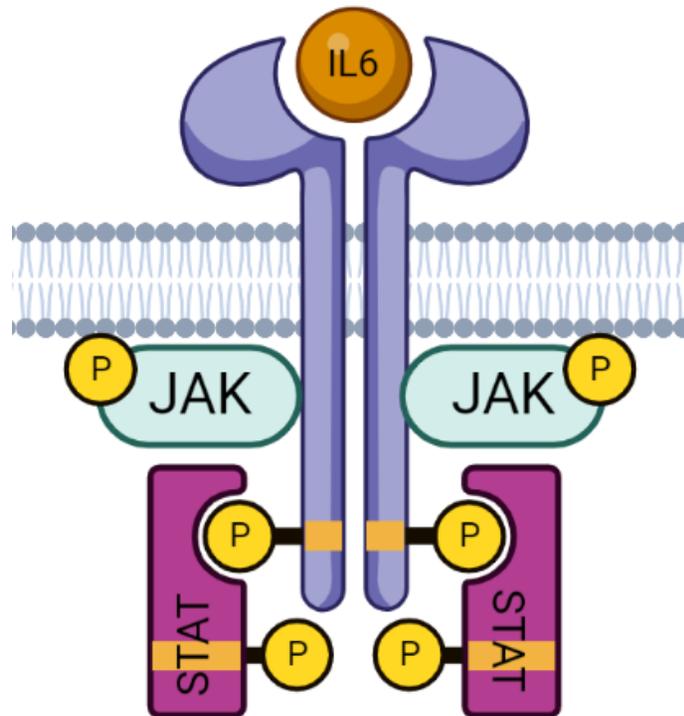


Figura 1: Esquema en el cual se observa la activación de JAK/STAT en presencia de IL6

Se han identificado cuatro JAKs (JAK1, JAK2, JAK3, Tyk2) y siete factores STATs (STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b, 6) (Kane et al., 2014; O'Shea et al., 2013). Específicamente, los STATs, son proteínas que actúan en el núcleo celular como transductores de

señales y factores de transcripción, participando en procesos de proliferación, inmunidad y diferenciación celular (O'Shea et al., 2015).

STAT3 juega un rol fundamental en la generación de linfocitos Th17 promoviendo la expresión de genes claves en la diferenciación y desarrollo de Th17, tales como, el factor de transcripción ROR $\gamma$ t y citoquinas efectoras como IL17A (Figura 2) (Kane et al., 2014; Levy & Lee, 2002). Estudios señalan que cuando la vía STAT3 se inhibe en los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, no hay diferenciación de células Th17 (Harris et al., 2007).

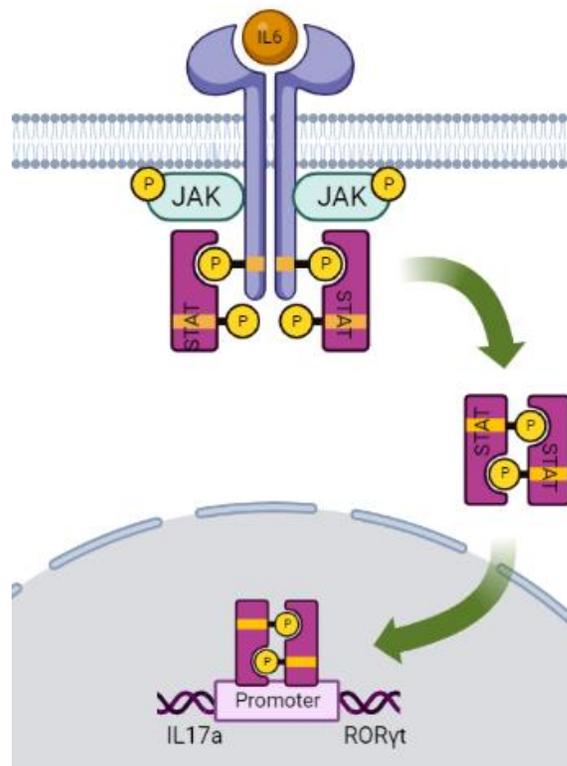


Figura 2: El esquema muestra que, tras la activación de STAT3, este se une formando dímeros y viaja hacia el núcleo, donde promueve la expresión de factores clave para la diferenciación de Th17, como ROR $\gamma$ t e IL17a.

#### IV. Activación de STAT3 mediante GP130

El receptor glicoproteína 130 (GP130) es una proteína transmembrana que se clasifica dentro de la familia de los receptores de citoquina tipo I, siendo esta proteína la subunidad común para los receptores de la familia de citoquinas IL-6. Esta proteína se encuentra ubicua en diferentes células del cuerpo humano y consta de 6 dominios: un dominio N-terminal (D1), 2 módulos de unión a citoquinas (D2, D3) y 3 dominios contiguos de fibronectina tipo III (D4-D6). GP130 es clave para la señalización intracelular del receptor del IL6 y su familia, la que produce la fosforilación y activación de STAT3 (Xu et al., 2010).

Dentro de la familia de IL6 se han descrito clásicamente 8 citoquinas: IL6, Interleuquina 11 (IL11), factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor inhibitorio de leucemia (LIF), oncostatina M (OSM), cardiotrofina 1 (CT1), citoquina similar a la cardiotrofina (CLC) e Interleuquina 27(IL27). Se han descrito para esta familia de citoquinas múltiples funciones, tales como la estimulación de células B, la inducción de proteínas de fase aguda a nivel hepático y otras funciones a nivel neuronal y metabólico.

Algunos miembros de la familia de citoquinas IL6 han sido estudiadas respecto al rol que cumplen durante periodontitis, dentro de estas, la citoquina más estudiada es IL6 (Rose-John, 2018). De los otros miembros, a algunos no se les han descrito funciones en tejidos denominados barrera como la piel o mucosas. CNTF cumple funciones en el sistema nervioso, CT1 y CLC cumplen funciones en patologías cardiacas y LIF cumple funciones en la diferenciación temprana de células inmunes (S. A. Jones & Jenkins, 2018). Por otro lado, se ha visto que IL11, IL27 y OSM modulan de distintas maneras la respuesta inmune y la inflamación a nivel periodontal, sin embargo, al realizar una búsqueda en de la bibliografía actual nos encontramos con que la cantidad de estudios de estas citoquinas a nivel oral es limitada, y con resultados controversiales entre ellos, por lo cual su estudio podría entregar conocimientos y aportar más acerca de la función de estas citoquinas tanto en salud como en periodontitis.

IL11 es una citoquina producida mediante la expresión del gen *IL11*, ubicado en el cromosoma 19 en humanos en la ubicación 19q13.42, mientras que, en ratones, este gen se encuentra en el cromosoma 7, en la ubicación 7 A1; 7 2.76 cM.

IL11 es una citoquina multifuncional cumpliendo funciones tales como hematopoyesis, formación ósea y carcinogénesis (Adibrad et al., 2012; de Molon et al., 2018). Se ha descrito que pacientes con periodontitis de progresión rápida presentan mayores valores de IL-11 que pacientes con periodontitis de progresión más lenta (Shaker & Ghallab, 2012; Yetkin Ay et al., 2009). Por otro lado, otros estudios arrojan resultados que catalogan a IL-11 como un factor protector contra la enfermedad periodontal (Yücel et al., 2008). Estudios *in vitro* han determinado que IL-11 promueve la diferenciación de células del ligamento periodontal en células osteoblásticas además de promover la síntesis de colágeno tipo I y la inhibición de metaloproteinasas (Leon et al., 2007). IL-11 inhibe la producción de importantes citoquinas proinflamatorias a nivel periodontal tales como factor necrótico tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), IL-6 e IL-1 $\beta$  (Prasad, 2015; Vos et al., 2016). También se ha visto que su producción se ve disminuida en sitios periodontales mayores a 6 mm (Johnson et al., 2004) y que su concentración va disminuyendo a medida que aumenta la profundidad al sondaje.

Por lo tanto, IL11 estaría relacionada principalmente tanto a estadios de salud como estadios iniciales de periodontitis mientras que su expresión se vería disminuida a medida que la enfermedad progresa.

Por otro lado, OSM es una citoquina traducida desde el gen *OSM* el cual se encuentra en el cromosoma número 22 en humanos, específicamente en la ubicación 22q12.2. En ratones, este gen se localiza en el cromosoma 11, en la ubicación 11 A1; 11 2.94 cM.

Dentro de sus funciones de OSM se destacan la modulación de la respuesta inflamatoria y la formación de tumores (Chen & Benveniste, 2004). A Nivel periodontal, estudios han evidenciado que OSM presenta un aumento de sus

niveles en fluido crevicular gingival (FCG) (Lin et al., 2005; Thorat et al., 2010). También se ha visto que OSM activa citoquinas tales como CXCL-10 y Molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) las cuales a su vez activan los linfocitos T-helper 1 (Th1), los que a su vez han sido documentados como promotores en la exacerbación de la inflamación periodontal. (Y. Hosokawa et al., 2010)

Con estos estudios podemos concluir que OSM podría exacerbar la respuesta inflamatoria en los tejidos periodontales. La evidencia sin embargo se basa principalmente en estudios *in vitro*, por lo cual futuros estudios *in vivo* son necesarios para aportar solidez y corroborar las conclusiones anteriormente expuestas.

IL27 es otra citoquina que pertenece a la familia de IL6, y a la familia de IL12. Esta citoquina es un heterodímero y sus subunidades son traducidas desde el gen *EBI3*, el cual es un gen común con la citoquina IL35 y desde el gen *IL27*. *EBI3* se encuentra en el cromosoma humano 19, específicamente en la posición 19p13.3. En ratones, *EBI3* se encuentra en el cromosoma 17, específicamente en la posición 17 D; 17 29.08 cM. *IL27* está ubicado en el cromosoma humano 16, específicamente en la posición 16p12.1-p11.2., mientras que, en ratones, este gen se encuentra en el cromosoma 7, específicamente en la ubicación 7 F3.

Esta citoquina presenta funciones tanto proinflamatorias como inhibitorias, sin embargo, al analizar la evidencia se observa la principal función de esta Interleuquina como inhibidora de la respuesta inmune. Al respecto, se ha visto que IL27 utiliza GP130 como receptor en conjunto con el receptor WSX-1 (Dario A.A. Vignali, 2014). Dentro de sus funciones en tejidos periodontales, se ha evidenciado como un potencial factor protector de la periodontitis. Un estudio en particular ha reportado un aumento de los niveles de IL27 en FCG posterior al tratamiento periodontal (Babaloo et al., 2018). Pese a que su papel en periodontitis se mantiene incierto, se ha documentado que podría regular la migración leucocitaria en periodontitis modulando la producción de quimiocinas de las células del epitelio oral (Y. Hosokawa et al., 2017).

Estas 3 citoquinas están presentes en los tejidos periodontales y han sido asociadas tanto a estados de salud como de periodontitis. Sin embargo, el número de estudios es limitado y con resultados disímiles, por lo que se necesitan más trabajos para aportar a la bibliografía actual y poder acercarnos a dilucidar el rol de estas citoquinas en la modulación de la periodontitis.

## **V. Planteamiento del Problema**

La periodontitis es una enfermedad que debe ser estudiada dado su alto impacto a nivel global en términos tanto de salud como económicos. Su alta prevalencia y su relación estrecha con otras enfermedades crónicas la posicionan como una patología relevante, de la cual es necesaria generar un mayor conocimiento de su patogénesis. El entendimiento de la etiología y progresión de la periodontitis nos permitiría a futuro una mejor comprensión respecto a cómo se articula la respuesta inmune a nivel periodontal, lo que nos podría dirigir a elaborar nuevas estrategias de tratamiento para dicha patología.

Las citoquinas son el principal mecanismo de comunicación del sistema inmune, el estudio de estas ha ayudado a comprender los diversos mecanismos fisiológicos como patológicos.

La familia de IL6 consta de 8 miembros que señalizan a través de un receptor común (GP130) clave en la activación de cascadas intracelulares que incluyen a las quinasas JAK y a los factores de transcripción STAT, particularmente STAT3, el cual es indispensable para la diferenciación de linfocitos Th17, quienes tienen un rol fundamental en la patogénesis de la periodontitis. Dentro de la familia de IL6, las citoquinas IL11, IL27 y OSM se han descrito que modulan la respuesta inmune en tejidos barrera como mucosas y piel. Sin embargo, existen en la actualidad pocos estudios que impliquen estas citoquinas en la patogénesis de la periodontitis y los

estudios realizados presentan resultados contradictorios en el contexto de enfermedad o salud periodontal. Los estudios de estas citoquinas, en otros tejidos mucosos, en piel e *in vitro*, nos lleva a pensar que los genes de *Il27* e *Il11* disminuirían su expresión durante periodontitis, mientras que el gen *Osm* aumentaría su expresión durante esta patología de los tejidos periodontales.

El estudio de estas citoquinas nos ayudaría a comprender de mejor forma los estados fisiológicos y patológicos periodontales, colaborando en la obtención de una visión global del conjunto de citoquinas participantes de estos procesos.

### **3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **I. HIPÓTESIS**

Los genes *Il11* e *Il27*, que codifican para las citoquinas IL11 e IL27, disminuyen su expresión durante periodontitis experimental, respecto del estado de salud. Por otro lado, el gen *Osm* que codifica para la citoquina OSM aumenta su expresión durante periodontitis experimental, respecto del estado de salud.

#### **II. OBJETIVO GENERAL.**

Evaluar la expresión de los genes *Il11*, *Il27* y *Osm* en tejido gingival murino sano e inflamado obtenido de un modelo de periodontitis experimental.

#### **III. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

Obtener tejidos gingivales murinos sanos e inflamados obtenido de un modelo de periodontitis experimental.

Extraer y cuantificar el ARN mensajero de los genes *Il11*, *Il27* y *Osm* en tejido gingival murino sano e inflamado.

#### **4. METODOLOGÍA.**

El presente anteproyecto se encuentra adscrito al proyecto FONDECYT Iniciación 11180389 (Anexo 1).

##### **I. Animales:**

Las muestras de tejido gingival que se analizaron en esta tesis provienen de experimentos que se realizaron en ratones *Mus musculus*, cepa C57BL/6. El manejo de éstos y todas las intervenciones se realizaron con la aprobación del Comité institucional de cuidado y uso de animales (CICUA) (Anexo 2), Universidad de Chile. Se obtuvieron ratones C57BL/6 libres de patógenos específicos de la Plataforma Experimental de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Los animales se utilizaron entre las 10 y las 15 semanas de edad. Los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo con los protocolos aprobados por el CICUA.

##### **II. Modelo de periodontitis inducida por ligadura (PIL):**

Para inducir la periodontitis experimental, nos basamos en el procedimiento desarrollado por Abe y Hajishengallis (Abe y Hajishengallis, 2013), en el cual se situó una ligadura (seda 5-0) alrededor del segundo molar superior izquierdo de los ratones, de esta manera la ligadura promovió la acumulación de placa con la subsecuente inflamación gingival, obteniendo 6 muestras. Posteriormente fueron sometidos a eutanasia al día 7 procediendo a recolectar la mucosa gingival para su posterior análisis. Adicionalmente, se obtuvieron 6 muestras provenientes de ratones sometidos a eutanasia sin colocar ligadura con el fin de obtener muestras de tejido gingival sano

El tejido gingival inflamado y no inflamado fue diseccionado de forma estandarizada con un bisturí de hoja 15, obteniendo el tejido que rodea los molares y la ligadura. Una vez obtenidas las muestras fueron congeladas en RNAlater (ThermoFisher Scientific, USA) y mantenidas a -80° C hasta su procesamiento.

### III. Extracción de ARN:

Las muestras fueron descongeladas a una temperatura de 4°C realizando posteriormente la extracción de ARN total de los tejidos gingivales usando reactivos de aislamiento de ARN "TRIzol" (Thermo Fisher Scientific, USA). Se colocó 1ml de reactivo "TRIzol™" en los tubos de homogenización para luego agregar las muestras de tejido cuidadosamente. Posteriormente fueron colocadas en el homogeneizador *BeadBug* (Benchmark Scientific, USA) a máxima velocidad (4000rpm). Luego los tubos fueron colocados durante 3 minutos en hielo para repetir el proceso de homogeneización a máxima velocidad por 15 segundos. Posteriormente las muestras fueron incubadas durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación completa del complejo núcleo proteico. Luego se añadió 0,2 ml de cloroformo en cada tubo y se agitaron. Se incubaron las muestras por 2 a 3 minutos para luego ser centrifugadas durante 15 minutos a 12.000 rpm a 4°C, donde se obtuvo una fase acuosa que contenía el ARN la cual se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf libre de RNasas (1,5ml) teniendo cuidado de inclinar el tubo en 45° antes de pipetear la solución. Se agregó un volumen de cloroformo equivalente a la fase acuosa de cada tubo, después se agitó por 30 segundos en el vórtex y se centrifugó durante 2 minutos a 14.000 rpm. Con cuidado se transfirió la nueva fase acuosa a un nuevo tubo Eppendorf evitando transferir cualquier capa orgánica o de interfaz al momento de pipetear. Luego se añadieron 0,5ml de Isopropanol en cada tubo por cada ml de "TRIzol™" añadido al inicio. Luego se volvieron a incubar durante 10 minutos a 4°C y centrifugar por 10 minutos a 12.000 rpm a 4°C. De esta solución obtenida se deshecho el sobrenadante con una micropipeta y se resuspendió el sedimento en 1 mL de etanol al 75% para luego agitar las muestras brevemente en el Vórtex y centrifugar durante 5 minutos 7500 rpm a 4°C para luego volver a desechar el sobrenadante con una micropipeta y dejar cada uno de los tubos Eppendorf boca abajo para secar al aire el sedimento de ARN durante 5 a 10 minutos. Finalmente se suspendió el sedimento de ARN en 20µl de

agua libre de ARNasas pipeteando hacia arriba y abajo para homogeneizar la solución para luego incubar en Thermo block a 60°C durante 10 minutos. Los 13 tubos fueron depositados en hielo para inmediatamente proceder a la cuantificación del ARN.

#### **IV. Cuantificación de ARN:**

Con la finalidad de evaluar la pureza y cantidad de ARN extraído se realizó la cuantificación de ARN con el Espectrofotómetro “NanoDrop” (ThermoFisher Scientific, USA) evaluando la absorbancia a 260 nm y con el coeficiente 260/230 respectivamente. Se utilizó 1µl de cada muestra para determinar la concentración y pureza del ARN, el lector del espectrofotómetro fue limpiado con agua libre de ARNasas (ThermoFisher Scientific, USA) entre muestras. Las concentraciones fueron registradas en el Software NanoDrop para posteriormente ser analizadas. Para calcular la mínima concentración de ARN requerida para ser utilizada en un proceso de transcripción reversa efectiva, de las muestras obtenidas se verificó cuál fue la muestra con menor concentración. En base a esos datos se decidió utilizar una concentración 15 ng/µl de ARN. Al finalizar el proceso de cuantificación las muestras fueron guardadas en el refrigerador a -80°C.

#### **V. Transcripción reversa:**

El ARN fue transcrito a ADNc usando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems, USA) utilizando una solución con Buffer RT, Primers Oligo(dT), Primers aleatorios, la enzima de transcriptasa reversa “MultiScribe™” (Applied Biosystems, USA) e inhibidores de ARNasas según las indicaciones del fabricante “Applied Biosystems”. Para esto se realizó una dilución en 13 tubos (Libre de ARNasas) con agua libre de nucleasas de las 13 muestras previamente descongeladas en hielo, con el fin de obtener una solución de 30ul por muestra a una concentración de 15 ng/µl de ARN. Las muestras diluidas fueron dejadas en hielo. Posteriormente los reactivos del kit de transcripción reversa se descongelaron en hielo y se preparó en un tubo Eppendorf de 1,5ml el Master Mix

de Transcripción reversa al 2X pipeteando 76ul de RT Buffer al 10X, 30,4 µl de dNTP Mix al 25X (100mM), 76 ul de Primers aleatorios para RT al 10X, 38 µl de enzima de transcripción reversa “MultiScribe™” (Applied Biosystems, USA) y 159,6 µl de agua libre de nucleasas para obtener un total de 380 µl de Master Mix 2X. Luego se pipeteo 30µl de Master Mix 2X en cada uno de los 13 tubos PCR libre de ARNasas previamente rotulados con el número de muestra. Después se colocaron los 30µl de cada muestra diluida en los tubos de PCR con Master mix 2X correspondientes. para luego colocar los tubos en el termociclador (Axygen® MaxyGene II, USA) el cual fue configurado con un primer ciclo a 25°C por 10 minutos, el segundo ciclo a 37°C por 120 minutos, el tercer ciclo a 85°C por 4 minutos y finalmente un ciclo a 4°C hasta que sean retirados, además se configuró el volumen final por tubo de PCR a 60µl.

Finalmente se realizó una verificación de la eficiencia de la transcripción reversa a través de la cuantificación de 1µl de cada muestra de ADN complementario (ADNc) en el espectrofotómetro “NanoDrop” (ThermoFisher Scientific, USA) evaluando la absorbancia a 260 µm y el coeficiente 260/280 y se guardaron las muestras de ADNc en el refrigerador a -20° C.

## **VI. PCR en tiempo real (RT-qPCR):**

El RT-qPCR se llevó a cabo en el termociclador (StepOnePlus; Applied Biosystems, USA). Los primers TaqMan correspondientes a los genes de interés a identificar, se descongelaron en hielo (Tabla 3). En 3 tubos Eppendorf de 1,5 ml (Libre de Rnasas) se preparó una solución con 280 µl de Master Mix para PCR Universal TaqMan, 28 µl de primer TaqMan específico para el gen de interés y 196ul de agua libre de nucleasas. Luego en una placa de 96 pocillos se organizaron las muestras del tejido gingival de ratones con ligadura y sin ella. Dentro de estas, en 26 pocillos fueron colocados 18µl de la solución PCR Master Mix del gen de interés. Debido a que el proceso de amplificación se realizó con duplicados de cada una de las 13 muestras, 24 pocillos fueron utilizados para este procedimiento y 2 fueron usados cómo control de la solución PCR Master Mix, Luego se colocaron 2µl de

ADNc de cada una de las muestras en cada uno de los pocillos con PCR Master Mix. Después la placa de 96 pocillos fue sellada con una membrana adhesiva libres de DNasa, RNasas e inhibidores de PCR para en consiguiente hacer un Spin de 30 segundos a 10.000 xg en la microcentrífuga (ThermoFisher Scientific, USA) con rotor para placa de 96 pocillos con el fin de eliminar burbujas. Finalmente se colocó la placa en el termociclador para qPCR, el cual fue configurado para correr con una curva estándar y con el método de sondas TaqMan. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo de la siguiente manera: Primero el paso de desnaturalización a 95°C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C durante 3 segundos y a 60°C por 30 segundos. La muestra se normalizó utilizando el gen *Hprt* como control.

<b>Tabla 1 – Primers TaqMan (Ensayos de expresión génica TaqMan, Applied Biosystems).</b>		
<b>Gen Objetivo</b>	<b>ID de ensayo</b>	<b>Longitud del amplicón</b>
<b><i>IL11</i></b>	Mm00434162_m1	130
<b><i>IL27</i></b>	Mm00461162_m1	55
<b><i>Osm</i></b>	Mm01193966_m1	82

## **VII. Análisis Estadístico:**

Para el análisis de la expresión génica se utilizó el método de cuantificación relativa  $2^{-\Delta\Delta CT}$  en donde se utilizó el gen *Hprt* como gen de expresión constitutiva o “housekeeping” para normalizar los datos obtenidos de los tejidos ligados y no ligados. En base al método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  se realizó un análisis estadístico comparativo para determinar si hubo variaciones significativas entre los niveles de expresión de *IL11*, *IL27* y *OSM* entre salud gingival y periodontitis experimental. Adicionalmente se utilizó la fórmula  $2^{-\Delta CT}$  para determinar la expresión génica total en tejidos gingivales ligados y no ligados (Schmittgen y Livak, 2008). La distribución de los datos se

determinó por la prueba Shapiro-Wilk. Para datos con distribución paramétrica, se utilizó la prueba t de Student con corrección de Welch la comparación de los resultados entre el grupo con periodontitis experimental y el control se realizó utilizando la prueba t de Student con corrección de Welch, mientras que para los datos no paramétricos se utilizó las prueba de Mann-Whitney.

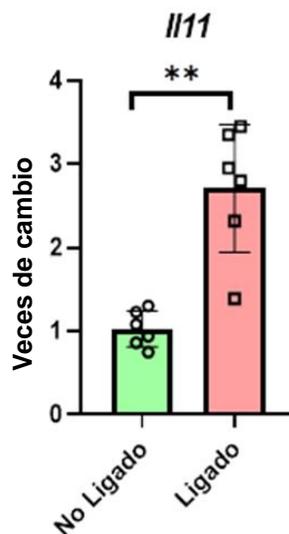
Para comparar todos los genes en conjunto para el grupo con PIL y tejidos sanos no ligados se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis.

Para detectar una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de animales experimentales y lograr una potencia estadística del 80% y una seguridad del 95%, se utilizó un tamaño de muestra de al menos 6 ratones por grupo. Los animales utilizados son singénicos y consideramos que la eficacia de la PIL es cercana al 100%. El tamaño de la muestra se calculó con el método propuesto por Charan y Kanthariaen en 2013, realizando el ajuste recomendado (Charan y Kanthariaen, 2013). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas si el valor de  $p < 0,05$ . Los datos se analizaron utilizando el software Prism 9 (GraphPad Software, Inc).

## 5. RESULTADOS

### I. Expresión génica relativa de *IL11*

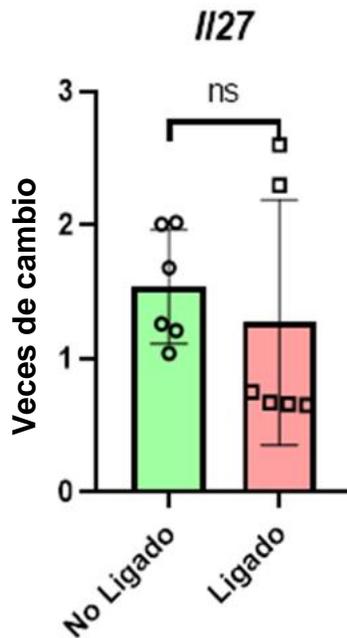
Primero, evaluamos la expresión génica relativa (*veces de cambio*) de *IL11* mediante un análisis cuantitativo con el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  entre las muestras no ligadas y ligadas. Como se observa en el gráfico 1, las muestras de tejido ligado (representada en la barra de color rojo), presentaron un aumento estadísticamente significativo en la expresión génica relativa de *IL11* la cual fue aproximadamente 3 veces mayor comparada con las 6 muestras de tejidos no ligados.



**Gráfico 1: Aumento en la expresión de *IL11* en periodontitis inducida por ligadura.** El RT-PCR en tiempo real muestra que la expresión de *IL11* aumenta significativamente en los tejidos ligados. La expresión de ARNm se normalizó con el gen *housekeeping Hprt*. Las barras representan el promedio de los niveles relativos de expresión génica y las líneas verticales el error estándar de 6 muestras del grupo ligado en comparación a las 6 muestras del grupo no ligado. Diferencias significativas \*\* ( $p < 0,01$ ) respecto al grupo control.

## II. Expresión génica relativa de *Il27*

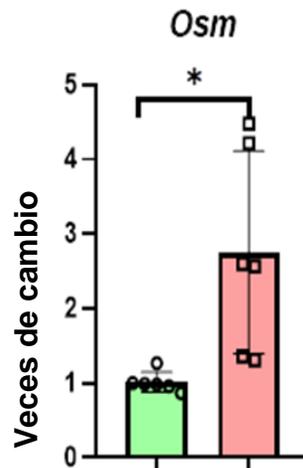
Adicionalmente, evaluamos la expresión génica relativa de *Il27* mediante el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  para observar los cambios de expresión génica relativa entre las muestras no ligadas y ligadas. Como se observa en el gráfico las muestras de tejido ligado (representada en la barra de color rojo), no presentó diferencias significativas en la expresión génica relativa de *Il27* respecto a los tejidos sanos.



**Gráfico 2 Disminución en la expresión de *Il27* en periodontitis inducida por ligadura.** El RT-PCR en tiempo real muestra que la expresión de *Il27* no muestra una diferencia significativa en los tejidos ligados en comparación con las muestras no ligadas. La expresión de ARNm se normalizó con el gen housekeeping *Hprt*. Las barras representan el promedio de los niveles relativos de expresión génica y las líneas verticales el error estándar de 6 muestras del grupo ligado en comparación a las 6 muestras del grupo no ligado.

### III. Expresión génica relativa de *Osm*

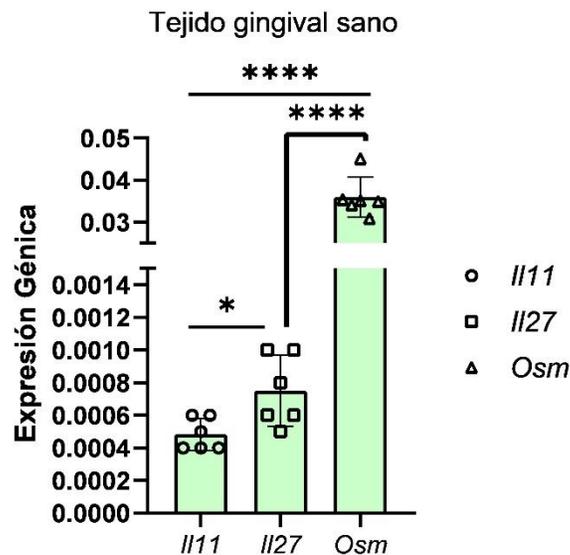
Por otro lado, evaluamos la expresión génica relativa (*veces de cambio*) de *Osm* mediante un análisis cuantitativo con el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  entre las muestras no ligadas y ligadas. Como se observa en el gráfico 3, las muestras de tejido ligado (representada en la barra de color rojo), presentaron un aumento estadísticamente significativo en la expresión génica relativa de *Osm* la cual fue aproximadamente 2.5 veces mayor comparada con las 6 muestras de tejidos no ligados.



**Gráfico 3: Aumento en la expresión de *Osm* en periodontitis inducida por ligadura.** El RT-PCR en tiempo real muestra que la expresión de *Osm* aumenta significativamente en los tejidos ligados. La expresión de ARNm se normalizó con el gen housekeeping *Hprt*. Las barras representan el promedio de los niveles relativos de expresión génica y las líneas verticales el error estándar de 6 muestras del grupo ligado en comparación a las 6 muestras del grupo no ligado. Diferencias significativas \* ( $p < 0,05$ ) respecto al grupo no ligado.

#### IV. Comparativa de expresión génica en tejidos gingivales no ligados

Paralelamente realizamos un análisis comparativo de la expresión génica de todos los genes dependientes de STAT3 en las 6 muestras de tejidos gingivales no ligados, para determinar cuál era la diferencia de expresión entre cada uno de ellos. Para esto utilizamos los datos obtenidos por RT-PCR en tiempo real y determinamos la expresión génica mediante la comparación de la expresión normalizada con el gen housekeeping *Hprt* mediante la fórmula  $2^{-\Delta CT}$ . Como se observa en el gráfico 4 cada una de las barras identificadas con el color verde representa el promedio de la expresión génica de todos los genes de interés. Mediante este análisis, determinamos que *Osm* fue el gen que más se expresó en muestras de tejido no ligado, presentando una diferencia significativa respecto a todos los genes de expresados. Adicionalmente observamos que *Il11* fue el gen con menor expresión génica comparado a las citoquinas dependientes de GP130 en tejidos gingivales no ligados, presentando una diferencia significativa con el resto de los genes.

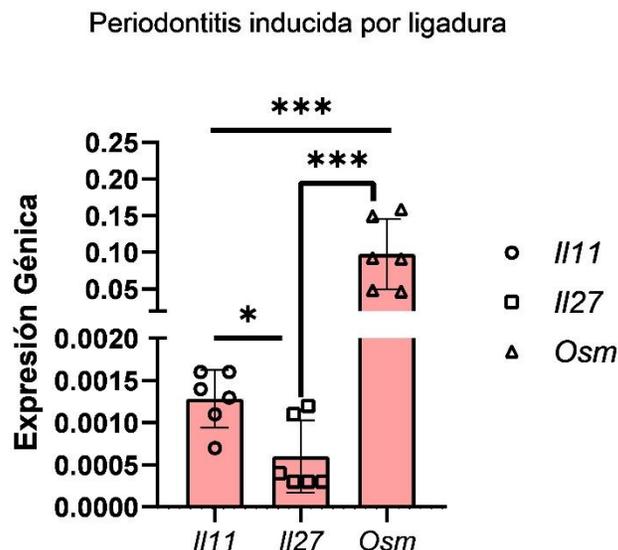


**Gráfico 4: Comparación de la expresión génica de *Il11*, *Il27* y *OSM* en tejidos gingivales no ligados.** La expresión de ARNm se normalizó con el gen housekeeping *Hprt*. Las barras representan

el promedio de los niveles de expresión génica y las líneas verticales el error estándar de 6 muestras por grupo de genes. Diferencias significativas \* ( $p < 0,05$ ), \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ).

## V. Comparativa de expresión génica en periodontitis inducida por ligadura

Finalmente realizamos un análisis comparativo de la expresión génica de todos los genes dependientes de STAT3 en las 6 muestras de tejidos gingivales ligados y se determinó la diferencia de expresión entre cada uno de nuestros genes de interés. Para este estudio de expresión génica los datos obtenidos por RT-PCR en tiempo real se cuantificaron mediante la fórmula  $2^{-\Delta CT}$ . Como se observa en el gráfico 5 cada una de las barras identificadas con el color rojo representa el promedio de la expresión génica de todos los genes dependientes de STAT3 en tejidos gingivales de muestras ligadas. Determinamos que *Osm* fue el gen que más se expresó en periodontitis experimental presentando una diferencia significativa respecto a todas las citoquinas con actividad proinflamatoria. Mientras que, el gen *Il27* presentó los menores niveles de expresión, presentando diferencias estadísticamente significativas con el resto de los genes.



**Gráfico 5: Comparación de la expresión génica de *Il11*, *Il27* y *Osm* en tejidos gingivales con periodontitis inducida por ligadura.** La expresión de ARNm se normalizó con el gen housekeeping *Hprt*. Las barras representan el promedio de los niveles de expresión génica y las líneas verticales el error estándar de 6 muestras por grupo de genes. Diferencias significativas \* ( $p < 0,05$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ ).

## 6. DISCUSIÓN

En la actualidad se han logrado grandes avances en el conocimiento de la patogénesis de la periodontitis gracias investigaciones realizadas en modelos experimentales, las cuales se han enfocado en conocer los mecanismos que participan en la respuesta inmune a nivel periodontal, modulando progresión de esta enfermedad (Dutzan et al., 2016; Hajishengallis, 2015). En el presente estudio, hemos evaluado la expresión génica de 3 citoquinas en el tejido gingival durante PIL y tejidos sanos. Estas citoquinas al unirse a su receptor activan cascadas de señalización que llevan a la fosforilación de STAT3. Al analizar los datos obtenidos determinamos que los genes de interés *Il11* y *Osm* presentaron un aumento significativo en la expresión génica relativa en PIL en comparación con las muestras no ligadas. Mientras que, por otro lado, observamos que el gen de interés *Il27* presentó una disminución no significativa en PIL, en comparación con muestras no ligadas. Estos resultados indican que durante los procesos de destrucción de tejidos periodontales se expresan citoquinas que activan a STAT3, reforzando las observaciones de nuestro grupo de estudio que han demostrado mayor fosforilación de STAT3 durante nuestro modelo de periodontitis experimental en comparación con los tejidos sanos.

Estudios recientes han indagado acerca de la participación de STAT3 como una molécula moduladora de la respuesta inmune en los tejidos periodontales, a través de la inducción de genes (Durant et al., 2010). Específicamente, el incremento en la activación de STAT3 y la gran cantidad de citoquinas proinflamatorias como IL6, que utilizan este receptor para su señalización, permitiría la diferenciación de los linfocitos Th17 y con esto la producción y liberación de citoquinas efectoras como IL17A, potenciando reacciones inflamatorias y favoreciendo la progresión de la

enfermedad periodontal. De esta forma, se hace pertinente el estudio de aquellas citoquinas pertenecientes a la familia de IL6 con el objetivo de evaluar si estas citoquinas poseen propiedades similares a IL6 y si son capaces de generar un aumento en mediadores proinflamatorios y en la modulación y progresión de la periodontitis.

### **I. Aumento de la expresión génica relativa de *IL11* en periodontitis inducida por ligadura**

Al realizar una revisión a la literatura actual disponible, nuestros resultados obtenidos respecto a *IL11* son asociables con resultados obtenidos en otras investigaciones. Específicamente, en el año 1995 Suda y colaboradores ya categorizaban a *IL11* como uno de los factores locales en la diferenciación de osteoclastos, células que están implicadas en la resorción ósea y, por ende, en la progresión de la periodontitis (Suda et al., 1995). Asimismo, Johnson y colaboradores el año 2004 observaron en tejido gingival un humano un aumento en los niveles de *IL11* en tejidos gingivales inflamados al compararlos con tejidos gingivales sanos (Johnson et al., 2004). Adicionalmente un estudio realizado por Becerik y colaboradores el año 2012 evaluó a 80 individuos y observaron que aquellos pacientes con periodontitis tenían mayores niveles, no solo de *IL11*, sino que también de *OSM* (Becerik et al., 2012).

En contraparte, estudios tales como los realizados por Martuscelli y colaboradores el año 2000, Yücel el año 2008 y Shaker el año 2012 identificaron a *IL11* como una citoquina con mayor presencia en salud en comparación con periodontitis (Martuscelli et al., 2000; Shaker & Ghallab, 2012b; Yücel et al., 2008), sin embargo, los estudios de Martuscelli y Shaker no evaluaron niveles de *IL11* en gingivitis. Yücel en cambio sí realizó una evaluación de esto último, ya que evaluó niveles de *IL11* en fluido gingival crevicular humano, tanto en salud como en gingivitis y periodontitis. Sus resultados si bien indicaron que en salud existe mayor concentración de *IL11* que en periodontitis, también observó que en gingivitis es cuando los niveles de concentración de *IL11* son mayores. Esto nos podría indicar

que IL11 podría estar relacionada a procesos inflamatorios que no impliquen la destrucción de los tejidos de soporte del diente, lo cual es la principal diferencia entre la gingivitis y la periodontitis. Por lo tanto, a medida que la enfermedad periodontal progresa, sus niveles se verían disminuidos. Futuras investigaciones podrían orientar su estudio en este campo y evaluar los niveles de esta interleuquina tanto en gingivitis como en periodontitis.

Al realizar una comparación entre nuestros resultados obtenidos con la bibliografía disponible, observamos que existe una variedad de resultados respecto al rol de IL11, en el cual algunos autores la describen como una citoquina con características proinflamatorias, mientras otros estudios la describen como una interleuquina antiinflamatoria. Respecto a esto, nuestros resultados arrojan que existe un aumento de *IL11* en nuestro modelo de PIL, sin embargo, observamos algunos estudios en los cuales los niveles de IL11 fueron menores en periodontitis que en salud. Es importante recalcar que estos estudios fueron realizados en humanos. Por consiguiente, es necesaria la realización de más estudios e investigaciones acerca de esta interleuquina, con el objetivo de poder comprender su rol en la patogénesis de la inflamación periodontal. Adicionalmente, nuestro estudio fue realizado en un modelo experimental murino, futuras investigaciones en tejido humano son necesarias para poder realizar un acercamiento más certero al funcionamiento de esta interleuquina en periodontitis

Al evaluar nuestra hipótesis, podemos observar que contrario a lo esperado, existe un aumento de *IL11* en periodontitis, esto se debe a que, si bien existen estudios que observan una disminución de IL11 en periodontitis, la bibliografía más actualizada sugiere que IL11 es una interleuquina implicada en procesos proinflamatorios tales como la periodontitis, por lo cual sus niveles en enfermedad son mayores a sus niveles en salud.

## **II. Expresión génica relativa de *IL27* en periodontitis inducida por ligadura**

Respecto a IL27, existe evidencia limitada respecto a su función en el proceso de inflamación en enfermedad periodontal. Ho y colaboradores realizaron un estudio el año 2021 en el cual observaron que IL27 poseía niveles reducidos a niveles local y sistémico en pacientes con periodontitis (Ho et al., 2021). Por otro lado, Hosokawa y colaboradores el 2019 investigaron la función de IL27 y observaron que IL27 podría estar involucrado en la reducción de migración celular de neutrófilos y linfocitos TH17, lo cual reduciría la inflamación periodontal, sin embargo, sus resultados no son concluyentes (Hosokawa et al., 2019). Por otro lado, Babaloo y colaboradores el año 2018 realizaron un estudio en el cual evaluaron los niveles de IL27 antes y después de realizar tratamiento periodontal. Observaron que, ya fuese realizando un tratamiento en una sesión o realizándolo por cuadrantes se observaban niveles aumentados de IL27 posterior al tratamiento (Babaloo et al., 2018). Estos estudios se correlacionan de manera positiva con los resultados obtenidos en nuestra tesis, ya que se observa una tendencia a la disminución de IL27 en PIL al compararse con tejido gingival sano.

Estos estudios se relacionan con otros realizados de IL27, pero en ámbitos no odontológicos. Al respecto, estudios realizados por Sasaoka y colaboradores el año 2010 y McLean y colaboradores el año 2017 evidencian a IL27 como un factor atenuante en colitis experimental (McLean et al., 2017; Sasaoka et al., 2011). Por otro lado, Niedbala y colaboradores el año 2008 investigaron el rol de IL27 en la artritis inducida por colágeno y observaron que su administración a corto plazo reducía la severidad de la enfermedad al compararse con grupos control, por lo cual se podría estudiar como un agente terapéutico contra artritis reumatoide (Niedbala et al., 2008).

Al realizar una comparación de nuestros resultados con los resultados disponibles en la literatura, encontramos una relación entre ellos, ya que ambos proponen a IL27 como un posible mediador antiinflamatorio, con características protectoras ante la periodontitis.

Con respecto a la hipótesis planteada respecto a esta interleuquina, observamos

que *IL27* no presenta cambios significativos en su expresión PIL

### **III. Aumento de la expresión génica relativa de *Osm* en periodontitis inducida por ligadura**

Respecto a *Osm*, diversos autores han estudiado y evidenciado su rol en la progresión de la periodontitis. Pradeep y colaboradores en el año 2010 observaron en sus estudios que los niveles de OSM eran indetectables a nivel de salud oral, mientras que aumentaban en pacientes con periodontitis a los cuales se les realizó tratamiento periodontal y alcanzaban sus mayores niveles en pacientes con periodontitis sin tratamiento (Pradeep et al., 2010). Esto nos podría indicar una relación directa entre los niveles de OSM y la severidad de la enfermedad periodontal. En relación con esto último, un estudio realizado por Tsai y colaboradores realizó una investigación de OSM en lesiones periapicales, en el cual se observó que esta citoquina estaba expresada en el 93.3% de las células inflamatorias, en comparación a un 53.3% en células epiteliales. Además, observaron que los niveles de OSM eran significativamente mayores en lesiones periapicales epitelializadas con altos niveles de infiltrado inflamatorio (Tsai et al., 2008). Esto nos permite concluir que OSM es una interleuquina asociada a inflamación, donde además la cronicidad de la inflamación aumenta sus niveles, lo cual podríamos asociar con la periodontitis, ya que esta se caracteriza por ser una enfermedad inflamatoria crónica.

Por otra parte, Thorat y colaboradores obtuvieron resultados similares, donde observaron que grupo con mayores niveles de OSM era aquel con periodontitis crónica sin tratamiento (Thorat et al., 2010). Por otro lado, Lin y colaboradores en el año 2005 ya observaban una relación entre los niveles de OSM en fluido crevicular gingival humano y la severidad de la enfermedad periodontal (Lin et al., 2005).

Finalmente, un estudio reciente realizado el año 2020 por Jones y colaboradores observó que el patobionte *Treponema denticola* (*T. denticola*) aumenta la expresión y posterior liberación de OSM tanto en neutrófilos como en macrófagos (M. M. Jones

et al., 2020). Este resultado es muy interesante ya que nos muestra una vía directa en la cual se expresa esta interleuquina, la cual podría tener una posible implicancia clínica al nosotros poder medir los niveles de *T. denticola* para evaluar de esta forma la presencia de OSM.

Al comparar la bibliografía asociada con nuestros resultados, podemos observar una similitud entre estos, debido a que observamos un aumento de *Osm* en nuestro modelo de periodontitis experimental.

Con respecto a nuestra hipótesis podemos observar que, de acuerdo con lo esperado *Osm* presenta un aumento de su expresión en PIL, validando así la hipótesis propuesta.

Es importante recalcar que todas las citoquinas estudiadas en esta tesis pertenecen a la familia de IL6. En la actualidad, un reciente estudio realizado por Hu y colaboradores el año 2021, en el cual utilizaron una molécula inhibidora de STAT3 fosforilado (p-STAT3) determinaron que el grupo tratado presentó una disminución significativa en la expresión génica de *Il6* en células mononucleares periféricas comparado con el grupo ligado no tratado. Este estudio demostró que la PIL genera un aumento de *Il6* que puede verse aliviado gracias a la inhibición de p-STAT3 (Hu et al., 2021). Esto último es muy interesante ya que futuras investigaciones podrían abordar a la familia de IL6 respecto a la activación del complejo JAK/STAT y, específicamente a STAT3, mientras que por otro lado la inhibición de pSTAT3 reduce la expresión génica de IL6, generándose una retroalimentación positiva entre ambas partes. Esto último debe ser mayormente documentado en esta y otras interleuquinas tales como las pertenecientes a la familia de IL6 con el fin de entender de mejor manera la regulación de este sistema JAK/STAT.

Finalmente, es muy importante continuar con el estudio de las citoquinas que modulan la vía STAT3, con el objetivo de comprender de mejor manera la patogénesis y progresión de la enfermedad periodontal

## 7. CONCLUSIONES

En nuestra investigación, se realizó el análisis de los genes de actividad proinflamatoria (*Il11* y *Osm*) e inhibitoria (*Il27*) moduladores de STAT3 en tejidos gingivales de ratones obtenidos en un modelo de PIL. Los resultados obtenidos en esta tesis mostraron un aumento significativo de todos los genes evaluados con actividad proinflamatoria y una disminución de los genes de actividad inhibitoria en este modelo de periodontitis experimental. Además, al realizar el análisis comparativo de expresión génica determinamos que *Osm* fue el gen que más se expresó en los tejidos gingivales tanto sanos como enfermos. También observamos que *Il27* fue el gen que menor expresión presentó tanto en tejidos gingivales sanos como enfermos, y que fue también la única citoquina que redujo su expresión (de manera no significativa) en PIL.

Por lo tanto, nuestros datos concluyen que los genes que codifican para las citoquinas IL11 y OSM se encuentran sobreexpresados en PIL en comparación con tejidos gingivales no ligados.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Adibrad, M., Deyhimi, P., Ganjalikhani Hakemi, M., Behfarnia, P., Shahabuei, M., & Rafiee, L. (2012). Signs of the presence of Th17 cells in chronic periodontal disease. *Journal of Periodontal Research*, 47(4), 525–531. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2011.01464.x>
- Babaloo, A., Rahbar, M., Babaloo, Z., Ghasemi, S., & Amini, A. (2018). Evaluation of clinical periodontal indices and serum interleukin-27 by one-stage full-mouth disinfection and quadrant scaling and root planing in periodontitis. *Journal of Contemporary Dental Practice*, 19(8), 997–1004. <https://doi.org/10.5005/JOURNAL-10024-2372>
- Baeza, M., Morales, A., Cisterna, C., Cavalla, F., Jara, G., Isamitt, Y., Pino, P., & Gamonal, J. (2020). Effect of periodontal treatment in patients with periodontitis and diabetes: Systematic review and meta-analysis. *Journal of Applied Oral Science*, 28, 1–13. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2019-0248>
- Baker, P. J., Dixon, M., Evans, R. T., Dufour, L., Johnson, E., & Roopenian, D. C. (1999). CD4+ T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice. *Infection and Immunity*, 67(6), 2804–2809. <https://doi.org/10.1128/iai.67.6.2804-2809.1999>
- Becerik, S., Öztürk, V. Ö., Atmaca, H., Atilla, G., & Emingil, G. (2012). Gingival Crevicular Fluid and Plasma Acute-Phase Cytokine Levels in Different Periodontal Diseases. *Journal of Periodontology*, 83(10), 1304–1313. <https://doi.org/10.1902/jop.2012.110616>
- Chen, S. H., & Benveniste, E. N. (2004). Oncostatin M: A pleiotropic cytokine in the central nervous system. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 15(5), 379–391. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2004.06.002>
- Dario A.A. Vignali, V. K. K. (2014). IL-12 Family Cytokines: Immunological Playmakers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(8), 722–728. <https://doi.org/10.1038/ni.2366>

- de Molon, R. S., Park, C. H., Jin, Q., Sugai, J., & Cirelli, J. A. (2018). Characterization of ligature-induced experimental periodontitis. *Microscopy Research and Technique*, 81(12), 1412–1421. <https://doi.org/10.1002/jemt.23101>
- Durant, L., Watford, W. T., Ramos, H. L., Laurence, A., Vahedi, G., Wei, L., Takahashi, H., Sun, H. W., Kanno, Y., Powrie, F., & O’Shea, J. J. (2010). Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. *Immunity*, 32(5), 605–615. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.003>
- Dutzan, N., Abusleme, L., Bridgeman, H., Greenwell-Wild, T., Zangerle-Murray, T., Fife, M. E., Bouladoux, N., Linley, H., Brenchley, L., Wemyss, K., Calderon, G., Hong, B. Y., Break, T. J., Bowdish, D. M. E., Lionakis, M. S., Jones, S. A., Trinchieri, G., Diaz, P. I., Belkaid, Y., ... Moutsopoulos, N. M. (2017). On-going Mechanical Damage from Mastication Drives Homeostatic Th17 Cell Responses at the Oral Barrier. *Immunity*, 46(1), 133–147. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.12.010>
- Dutzan, N., Kajikawa, T., Abusleme, L., Greenwell-Wild, T., Zuazo, C. E., Ikeuchi, T., Brenchley, L., Abe, T., Hurabielle, C., Martin, D., Morell, R. J., Freeman, A. F., Lazarevic, V., Trinchieri, G., Diaz, P. I., Holland, S. M., Belkaid, Y., Hajishengallis, G., & Moutsopoulos, N. M. (2018). A dysbiotic microbiome triggers TH17 cells to mediate oral mucosal immunopathology in mice and humans. *Science Translational Medicine*, 10(463). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat0797>
- Dutzan, N., Konkel, J. E., Greenwell-Wild, T., & Moutsopoulos, N. M. (2016). Characterization of the human immune cell network at the gingival barrier. *Mucosal Immunology*, 9(5), 1163–1172. <https://doi.org/10.1038/mi.2015.136>
- Garlet, G. P. (2010). Critical reviews in oral biology & medicine: Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: A re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *Journal of Dental Research*, 89(12), 1349–1363. <https://doi.org/10.1177/0022034510376402>

- Hajishengallis, G. (2015). Periodontitis: From microbial immune subversion to systemic inflammation. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 15, Issue 1, pp. 30–44). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri3785>
- Hajishengallis, G., & Lamont, R. J. (2012). Beyond the red complex and into more complexity: The polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Molecular Oral Microbiology*, 27(6), 409–419. <https://doi.org/10.1111/j.2041-1014.2012.00663.x>
- Harris, T. J., Grosso, J. F., Yen, H.-R., Xin, H., Kortylewski, M., Albesiano, E., Hipkiss, E. L., Getnet, D., Goldberg, M. v., Maris, C. H., Housseau, F., Yu, H., Pardoll, D. M., & Drake, C. G. (2007). Cutting Edge: An In Vivo Requirement for STAT3 Signaling in T H 17 Development and T H 17-Dependent Autoimmunity . *The Journal of Immunology*, 179(7), 4313–4317. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.7.4313>
- Ho, J. Y., Yeo, B. S., Yang, X. L., Thirugnanam, T., Hakeem, M. F., Sahu, P. S., & Pulikkotil, S. J. (2021). Local and Systemic Expression Profile of IL-10, IL-17, IL-27, IL-35, and IL-37 in Periodontal Diseases: A Cross-sectional Study. *Journal of Contemporary Dental Practice*, 22(1), 73–79. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-3034>
- Hosokawa, I., Hosokawa, Y., Ozaki, K., & Matsuo, T. (2019). Carnosic Acid Inhibits CXCR3 Ligands Production in IL-27-Stimulated Human Oral Epithelial Cells. *Inflammation*, 42(4), 1311–1316. <https://doi.org/10.1007/s10753-019-00991-6>
- Hosokawa, Y., Hosokawa, I., Ozaki, K., & Matsuo, T. (2017). IL-27 Modulates Chemokine Production in TNF- $\alpha$ -Stimulated Human Oral Epithelial Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 43(3), 1198–1206. <https://doi.org/10.1159/000481760>
- Hosokawa, Y., Hosokawa, I., Ozaki, K., Nakae, H., & Matsuo, T. (2010). Oncostatin M synergistically induces CXCL10 and ICAM-1 expression in IL-1 $\beta$ -stimulated-human gingival fibroblasts. *Journal of Cellular Biochemistry*, 111(1), 40–48. <https://doi.org/10.1002/jcb.22648>

- Hu, Y., Zhang, X., Zhang, J., Xia, X., Li, H., Qiu, C., Liao, Y., Chen, H., He, Z., Song, Z., & Zhou, W. (2021). Activated STAT3 signaling pathway by ligature-induced periodontitis could contribute to neuroinflammation and cognitive impairment in rats. *Journal of Neuroinflammation*, *18*(1).  
<https://doi.org/10.1186/s12974-021-02071-9>
- Johnson, R. B., Wood, N., & Serio, F. G. (2004). Interleukin-11 and IL-17 and the Pathogenesis of Periodontal Disease. *Journal of Periodontology*, *75*(1), 37–43.  
<https://doi.org/10.1902/jop.2004.75.1.37>
- Jones, M. M., Vanyo, S. T., Ibraheem, W., Maddi, A., & Visser, M. B. (2020). *Treponema denticola* stimulates Oncostatin M cytokine release and de novo synthesis in neutrophils and macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, *108*(5), 1527–1541. <https://doi.org/10.1002/JLB.4MA0620-072RR>
- Jones, S. A., & Jenkins, B. J. (2018). Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer. *Nature Reviews Immunology*, *18*(12), 773–789. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0066-7>
- Kane, A., Deenick, E. K., Ma, C. S., Cook, M. C., Uzel, G., & Tangye, S. G. (2014). STAT3 is a central regulator of lymphocyte differentiation and function. *Current Opinion in Immunology*, *28*(1), 49–57.  
<https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.01.015>
- Kantarci, A., Oyaizu, K., & Dyke, T. E. van. (2003). Neutrophil-Mediated Tissue Injury in Periodontal Disease Pathogenesis: Findings from Localized Aggressive Periodontitis. *Journal of Periodontology*, *74*(1), 66–75.  
<https://doi.org/10.1902/jop.2003.74.1.66>
- Kinane, D. F., Preshaw, P. M., & Loos, B. G. (2011). Host-response: Understanding the cellular and molecular mechanisms of host-microbial interactions - Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology*, *38*(SUPPL. 11), 44–48.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2010.01682.x>
- Leon, E. R., Iwasaki, K., Komaki, M., Kojima, T., & Ishikawa, I. (2007). Osteogenic effect of interleukin-11 and synergism with ascorbic acid in human periodontal

- ligament cells. *Journal of Periodontal Research*, 42(6), 527–535.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2007.00977.x>
- Levy, D. E., & Lee, C. K. (2002). What does Stat3 do? *Journal of Clinical Investigation*, 109(9), 1143–1148. <https://doi.org/10.1172/JCI0215650>
- Lin, S. J., Chen, Y. L., Kuo, M. Y. bin, Li, C. L., & Lu, H. K. (2005). Measurement of gp130 cytokines - Oncostatin M and IL-6 in gingival crevicular fluid of patients with chronic periodontitis. *Cytokine*, 30(4), 160–167.  
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2004.12.018>
- Listl, S., Galloway, J., Mossey, P. A., & Marcenes, W. (2015). Global economic impact of dental diseases. *Journal of Dental Research*, 94(10), 1355–1361.  
<https://doi.org/10.1177/0022034515602879>
- Martuscelli, G., Fiorellini, J. P., Crohin, C., & Howell, T. H. (2000). The Effect of Interleukin-11 on the Progression of Ligature-Induced Periodontal Disease in the Beagle Dog\*. In *J Periodontol* (Vol. 71).
- McLean, M. H., Andrews, C., Hanson, M. L., Baseler, W. A., Anver, M. R., Senkevitch, E., Staniszewska, A. K., Smith, C., Davies, L. C., Hixon, J., Li, W., Shen, W., Steidler, L., & Durum, S. K. (2017). Interleukin-27 Is a Potential Rescue Therapy for Acute Severe Colitis Through Interleukin-10-Dependent, T-Cell-Independent Attenuation of Colonic Mucosal Innate Immune Responses. *Inflammatory Bowel Diseases*, 23(11), 1983–1995.  
<https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000001274>
- Morales, A., Jara, G., Werlinger, F., Cabello, R., Espinoza, I., Giacaman, R., Lee, X., Carvajal, P., Arteaga, O., Cavalla, F., Corral, C., Baeza, M., Rodríguez, G., León, S., Gambetta, K., & Gamonal, J. (2020). Sinopsis de la Situación de Salud Oral en Chile - Parte II: Diagnósticos Poblacionales de Salud Oral. *International Journal of Interdisciplinary Dentistry*, 13(2), 88–94.  
<https://doi.org/10.4067/s2452-55882020000200088>
- Newman, M., Takei, H., Klokkevold, P., & Carranza, F. (2019). *Newman and Carranza's clinical periodontology*. Elsevier Ltd.

- Niedbala, W., Cai, B., Wei, X., Patakas, A., Leung, B. P., McInnes, I. B., & Liew, F. Y. (2008). Interleukin 27 attenuates collagen-induced arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *67*(10), 1474–1479.  
<https://doi.org/10.1136/ard.2007.083360>
- O’Shea, J. J., Holland, S. M., & Staudt, L. M. (2013). JAKs and STATs in Immunity, Immunodeficiency, and Cancer. *New England Journal of Medicine*, *368*(2), 161–170. <https://doi.org/10.1056/nejmra1202117>
- O’Shea, J. J., Schwartz, D. M., Villarino, A. v., Gadina, M., McInnes, I. B., & Laurence, A. (2015). The JAK-STAT pathway: Impact on human disease and therapeutic intervention. *Annual Review of Medicine*, *66*, 311–328.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-med-051113-024537>
- Pihlstrom, B. L., Michalowicz, B. S., & Johnson, N. W. (2005). Periodontal diseases. *Lancet*, *366*(9499), 1809–1820. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67728-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67728-8)
- Pradeep, A. R., Thorat Manojkumar, S., Garima, G., & Raju, A. (2010). Serum levels of oncostatin M (a gp 130 cytokine): An inflammatory biomarker in periodontal disease. *Biomarkers*, *15*(3), 277–282.  
<https://doi.org/10.3109/13547500903573209>
- Prasad, R. (2015). Interleukin-11 - its role in the vicious cycle of inflammation, periodontitis and diabetes: A clinicobiochemical cross-sectional study. *J Indian Soc Periodontology*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4439624/>
- Rose-John, S. (2018). Interleukin-6 family cytokines. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *10*(2), 1–18.  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028415>
- Sasaoka, T., Ito, M., Yamashita, J., Nakajima, K., Tanaka, I., Narita, M., Hara, Y., Hada, K., Takahashi, M., Ohno, Y., Matsuo, T., Kaneshiro, Y., Tanaka, H., & Kaneko, K. (2011). Treatment with IL-27 attenuates experimental colitis through the suppression of the development of IL-17-producing T helper cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *300*, 568–576.  
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00329.2010.-Inflamma>

- Shaker, O. G., & Ghallab, N. A. (2012a). IL-17 and IL-11 GCF levels in aggressive and chronic periodontitis patients: Relation to PCR bacterial detection. *Mediators of Inflammation*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/174764>
- Shaker, O. G., & Ghallab, N. A. (2012b). IL-17 and IL-11 GCF levels in aggressive and chronic periodontitis patients: Relation to PCR bacterial detection. *Mediators of Inflammation*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/174764>
- Silva, N., Abusleme, L., Bravo, D., Dutzan, N., Garcia-Sesnich, J., Vernal, R., Hernández, M., & Gamonal, J. (2015). Host response mechanisms in periodontal diseases. *Journal of Applied Oral Science*, 23(3), 329–355. <https://doi.org/10.1590/1678-775720140259>
- Suda, T., Udagawa, N., Nakamura, I., Miyaura, C., & Takahashi, N. (1995). *Modulation of Osteoclast Differentiation by Local Factors* (Vol. 17, Issue 2).
- Taubman, M. A., Valverde, P., Han, X., & Kawai, T. (2005). Immune Response: The Key to Bone Resorption in Periodontal Disease. *Journal of Periodontology*, 76(11-s), 2033–2041. <https://doi.org/10.1902/jop.2005.76.11-s.2033>
- Thorat, M. K., Pradeep, A. R., & Garg, G. (2010). Correlation of levels of oncostatin M cytokine in crevicular fluid and serum in periodontal disease. *International Journal of Oral Science*, 2(4), 198–207. <https://doi.org/10.4248/IJOS10077>
- Tonetti MS, Jepsen S, Jin L, O.-C. J. (2017). Impact of the global burden of periodontal diseases on health, nutrition and wellbeing of mankind: A call for global action. *J Clin Periodontol*.
- Tsai, C. H., Huang, F. M., & Chang, Y. C. (2008). Immunohistochemical localization of oncostatin M in epithelialized apical periodontitis lesions. *International Endodontic Journal*, 41(9), 772–776. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2008.01430.x>
- Vos, T., Allen, C., Arora, M., Barber, R. M., Brown, A., Carter, A., Casey, D. C., Charlson, F. J., Chen, A. Z., Coggeshall, M., Cornaby, L., Dandona, L., Dicker, D. J., Dilegge, T., Erskine, H. E., Ferrari, A. J., Fitzmaurice, C., Fleming, T., Forouzanfar, M. H., ... Zuhlke, L. J. (2016). Global, regional, and national

incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet*, 388(10053), 1545–1602.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31678-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31678-6)

Xu, Y., Kershaw, N. J., Luo, C. S., Soo, P., Pocock, M. J., Czabotar, P. E., Hilton, D. J., Nicola, N. A., Garrett, T. P. J., & Zhang, J. G. (2010). Crystal structure of the entire ectodomain of gp130: Insights into the molecular assembly of the tall cytokine receptor complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 285(28), 21214–21218. <https://doi.org/10.1074/jbc.C110.129502>

Yetkin Ay, Z., Sütçü, R., Uskun, E., Bozkurt, F. Y., & Berker, E. (2009). The impact of the IL-11:IL-17 ratio on the chronic periodontitis pathogenesis: A preliminary report. *Oral Diseases*, 15(1), 93–99. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2008.01497.x>

Yücel, Ö. Ö., Berker, E., Gariboğlu, S., & Otlu, H. (2008). Interleukin-11, interleukin-1 $\beta$ , interleukin-12 and the pathogenesis of inflammatory periodontal diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(5), 365–370. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01212.x>

## 9. ANEXOS.

### El presente anteproyecto se encuentra adscrito al proyecto FONDECYT Iniciación 11180389



N° 018/FONDECYT/518

Programa  
Fondecyt

Santiago, 30 de Octubre del 2018  
Ref.: Proyecto N° 11180389

Señor  
NICOLAS DUTZAN MUÑOZ

Estimado señor DUTZAN:

Por encargo de los Consejos Superiores de Ciencia y Desarrollo Tecnológico, informamos a usted que su proyecto postulado al Concurso de Iniciación en Investigación 2018, ha sido aprobado. Reciba nuestras sinceras felicitaciones por el éxito de su postulación.

En esta convocatoria concursaron 1.233 proyectos y se financiaron 363 (29,4%). Su propuesta fue evaluada en el Consejo de CIENCIA y calificada con 4.470 puntos, ubicándose en el lugar N° 5 del Grupo de Estudio de MEDICINA G1 - CS. BIOMÉDICAS. En este Grupo concursaron 49 proyectos, se evaluaron 39 y aprobaron 12 (24,5%). La calificación del último proyecto financiado en este Grupo fue de 3.960 puntos.

Adjuntamos un informe del proceso de evaluación, así como las calificaciones y comentarios que el Panel realizó al proyecto.

En el sistema de evaluación, donde se encuentra disponible la presente carta, podrá acceder al presupuesto asignado a su proyecto y a un informe con el detalle de las certificaciones y/o autorizaciones aprobatorias, que deberá presentar como uno de los requisitos para la transferencia de recursos al proyecto, de acuerdo a lo establecido en el numeral 6.2.1. de las bases concursales.

Tenga presente que los recursos asignados por concepto de honorarios serán revisados anualmente, ajustándose a los montos máximos establecidos en las bases correspondientes, por participación en proyectos FONDECYT en calidad de Investigadores(as) Responsables y Coinvestigadores(as), si aplica. Si el presupuesto otorgado ha sido modificado en relación a lo solicitado, usted puede redistribuir anualmente los recursos, de acuerdo a las necesidades de ejecución del proyecto, si lo estima pertinente.

El convenio de financiamiento que deberán suscribir usted y el(la) Representante Legal de la Institución Patrocinante de su proyecto será enviado a esta última a la brevedad.

Saludan atentamente a usted,

EDGAR VOGEL GONZÁLEZ  
Presidente  
Consejo Superior de Ciencia

MARIO HAMUY WACKENHUT  
Presidente  
Consejo Superior de Desarrollo Tecnológico

Santiago, a 24 de enero de 2019

Certificado n°: **19227-ODO-UCH**

### CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica que en el Protocolo **FOUCH 181113**, del Proyecto de Investigación titulado: **"Estudiando el rol de STAT3 en periodontitis y su potencial uso terapéutico"**, del Investigador Responsable **Dr. Nicolás Raúl Dutzan Muñoz**, Profesor Asistente, Departamento de Odontología Conservadora, Facultad de Odontología, Universidad de Chile, no se plantean acciones en sus procedimientos que contravengan las normas de Bioética de manejo y cuidado de animales, así mismo la metodología experimental planteada satisface lo estipulado en el Programa Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.

El Investigador se ha comprometido a la ejecución de este proyecto dentro de las especificaciones señaladas en el protocolo revisado y autorizado por el CICUA, a mantener los procedimientos experimentales planteados y a no realizar ninguna modificación sin previa aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación para el uso de un total de **96** ratones, *Mus musculus*, C57BL/6, provenientes de la Plataforma Experimental Bioterio, Facultad de Odontología, Universidad de Chile, desde marzo de 2019 a enero de 2022, tiempo estimado de ejecución del estudio, el cual será financiado por **Proyecto Fondecyt de Iniciación Nro. 11180389**.

*El CICUA de la Universidad de Chile, forma parte de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, y está constituido por 53 miembros: 5 médicas veterinarias, 39 académicos (12 de ellos médicas veterinarias), y 9 miembros no asociados a la academia o investigación, y que cuentan con experiencia en bioética relacionada a mantención y uso de animales. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del "Protocolo de Manejo y Cuidado de Animales" después de un estudio acucioso y de la acogida de los investigadores de las observaciones exigidas por el Comité.*



Ronald Vargas Casanova  
Director  
CICUA – VID  
Universidad de Chile



Dr. Emilio Herrera Videla  
Presidente  
CICUA - VID  
Universidad de Chile

Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA)  
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo (VID) – Universidad de Chile  
www.uchile/cicua.cl email: coordinador.cicua@uchile.cl