



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGÍA CONSERVADORA
ÁREA DE MICROBIOLOGÍA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA ORAL

“Efecto de la inhibición de las células Th17 en el microbioma subgingival durante periodontitis experimental”

Mariana Solange Hinojosa Aedo

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Asistente Dra. Loreto Abusleme Ramos

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Asistente Dr. Nicolás Dutzan Muñoz

Prof. Asistente Dra. Anilei Hoare Teuche

Adscrito a Proyecto FONDECYT de Iniciación 11180505
Santiago - Chile
2020



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGÍA CONSERVADORA
ÁREA DE MICROBIOLOGÍA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA ORAL

“Efecto de la inhibición de las células Th17 en el microbioma subgingival durante periodontitis experimental”

Mariana Solange Hinojosa Aedo

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

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Asistente Dra. Loreto Abusleme Ramos

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Asistente Dr. Nicolás Dutzan Muñoz

Prof. Asistente Dra. Anilei Hoare Teuche

Adscrito a Proyecto FONDECYT de Iniciación 11180505
Santiago - Chile
2020

DEDICATORIA

Le dedico este trabajo y el logro que significa a mi madre, quien me enseñó a perseverar en la vida pese a la adversidad.

Fuiste un ejemplo de fortaleza y esfuerzo, te agradezco profundamente todo lo que hiciste por nosotros.

A pesar de que ya no estés en este mundo siempre seguirás presente en mi vida...

AGRADECIMIENTOS

A mi padre, que me acompañó y me apoyó incondicionalmente durante todo este proceso. Gracias por tu cariño, tu comprensión y tu paciencia. Sin ti, esto no hubiera sido posible

A mi familia, a todos los miembros de mi familia que me apoyaron de una u otra forma durante toda la carrera.

A mis amigos, que me acompañaron durante este camino, me contuvieron cuando era necesario y llenaron mi vida de momentos alegres y felices.

A mi tutora principal, la Dra. Loreto Abusleme Ramos, quien me guio en esta última etapa. Gracias por su gran dedicación, su paciencia y su apoyo en todo momento.

A mis tutores asociados, el Dr. Nicolás Dutzan Muñoz y la Dra. Anilei Hoare Teuche.

Al laboratorio de Microbiología Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Al Proyecto FONDECYT de Iniciación 11180505.

ÍNDICE

1) RESUMEN	1
2) MARCO TEÓRICO	3
Generalidades de periodontitis	3
Papel de la microbiota subgingival en el desarrollo de la periodontitis	4
Secuenciación masiva del gen 16s rDNA.....	5
Desregulación de la respuesta inmune del hospedero.....	7
Inmunidad y eje Th17/IL-17.	9
Papel de las células Th17 durante periodontitis.	10
Potencial de la inhibición de células Th17 durante periodontitis.....	11
3) HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	14
4) MATERIALES Y MÉTODOS	15
Animales y modelo experimental de Periodontitis Inducida por Ligadura	15
Extracción de ADN y secuenciación basada en el gen 16S rDNA.....	16
Análisis Bioinformático	16
5) RESULTADOS	20
a) Diversidad en las comunidades subgingivales.	20
b) Estructura de las comunidades.	22
c) Abundancia relativa de especies bacterianas en las comunidades.	23
6) DISCUSIÓN	25
7) CONCLUSIONES	30
8) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
9) ANEXOS Y APÉNDICES	36

1) RESUMEN:

Introducción

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria caracterizada por la disbiosis del microbioma subgingival, en la cual se produce un aumento selectivo de las células Th17. La inhibición de estas células durante periodontitis experimental demostró que tienen un papel crítico en la pérdida de hueso alveolar. Sin embargo, los efectos de la inhibición de las células Th17 en las comunidades microbianas durante la periodontitis aún no han sido evaluados.

Objetivos

Determinar si la inhibición de las células Th17 durante periodontitis experimental previene cambios disbióticos en el microbioma subgingival.

Materiales y métodos

Utilizamos un modelo murino en el cual el factor de transcripción STAT3, crítico para la diferenciación de las células Th17, ha sido genéticamente eliminado (*Cd4^{cre}Stat3^{fl/fl}*). Se usaron ratones de la misma camada como control (*Stat3^{fl/fl}*). Estos fueron sometidos al modelo de periodontitis inducida por ligadura (PIL). Cinco días después se retiraron las ligaduras y se aisló el ADN para la secuenciación masiva del gen 16S rDNA para el estudio de las comunidades microbianas asociadas a las ligaduras. Posterior al preprocesamiento de las secuencias, éstas se agruparon en Unidades Operacionales Taxonómicas (OTUs), definidas con un 3% de disimilitud. Las diferencias en la abundancia relativa fueron determinadas mediante análisis LEfSE, mientras que las diferencias en la diversidad alfa y beta se evaluaron usando la prueba t no pareada y el Análisis de Varianza Molecular (AMOVA), respectivamente.

Resultados

Observamos que las comunidades microbianas de los ratones *Cd4^{cre}Stat3^{fl/fl}* y de los controles después de PIL se caracterizan por una diversidad microbiana similar. Asimismo, no hubo diferencias significativas en la estructura global de las comunidades. El perfil microbiano general de los grupos *Cd4^{cre}Stat3^{fl/fl}* y control fue semejante, con sólo un aumento de dos OTUs (*Staphylococcus* sp. y *Lachnospiraceae* sp.) en el grupo control.

Conclusiones

Los perfiles del microbioma subgingival son similares a pesar de la inhibición de las células Th17, lo que sugiere que otras respuestas inflamatorias podrían estar contribuyendo en mayor medida a la disbiosis microbiana durante la periodontitis.

2) MARCO TEÓRICO:

Generalidades de la periodontitis

La periodontitis afecta a las estructuras de soporte de los dientes, específicamente al periodonto de inserción, el cual está compuesto por el ligamento periodontal, el cemento radicular y el hueso alveolar; y se caracteriza por la acumulación de placa bacteriana subgingival en conjunto con la formación de un infiltrado inflamatorio que resulta en la destrucción de los tejidos periodontales, incluyendo al hueso alveolar, lo que puede causar la pérdida dentaria (Hernández y cols., 2011). El inicio y la progresión de la periodontitis están relacionados con múltiples factores etiológicos y de riesgo, siendo los más importantes la microbiota local y la respuesta inmune del hospedero (Pan y cols., 2019).

La periodontitis es una de las enfermedades inflamatorias más prevalentes, teniendo importantes consecuencias en la salud pública (Eke y cols., 2015). Esta patología es frecuente en adultos, pero también puede presentarse en niños y adolescentes, generalmente la cantidad de destrucción de tejido es proporcional a los niveles de placa bacteriana, las defensas del hospedero y los factores de riesgo relacionados (Kinane y cols., 2017). Las primeras etapas de la periodontitis son, a menudo, sin síntomas y un número significativo de pacientes afectados no buscan atención profesional. Al aumentar la severidad de la enfermedad, con la concomitante destrucción de una cantidad importante de tejido de inserción periodontal, la enfermedad se complica por una serie de signos y síntomas que afectan aún más la calidad de vida de los individuos. Estos incluyen la migración dental, hipermovilidad dental, pérdida de dientes y finalmente un aumento en los niveles de disfunción masticatoria (Tonneti y cols., 2017). La severidad de la periodontitis depende tanto del ambiente (p. ej., fumar) como de los factores de riesgo del hospedero (p. ej., susceptibilidad genética) (Dahlen y cols., 2019). Además, esta patología ha demostrado tener un gran impacto en la salud sistémica del individuo, esto debido a la diseminación de las bacterias orales y de los mediadores proinflamatorios propios de esta enfermedad hacia el torrente sanguíneo, lo cual constituye un factor de riesgo para otras enfermedades de gran prevalencia tales como diabetes, efectos adversos en el embarazo, cáncer, enfermedades cardiovasculares y pulmonares (Cardoso y cols., 2018).

Actualmente se considera la sexta patología más frecuente en todo el mundo, con una prevalencia global del 11,2%, que afecta a aproximadamente 743 millones de personas (Tonetti y cols., 2017). En Chile, el 97% de los adultos mayores (65 a 74 años) y el 93% de los adultos jóvenes (35 a 44 años) tienen una pérdida de inserción clínica ≥ 3 mm en uno o más sitios, mientras que un 69% de adultos mayores y un 38% de adultos jóvenes presentan una pérdida de inserción severa ≥ 6 mm en uno o más sitios (Gamonal y cols., 2010).

La periodontitis es la principal causa de pérdida de dientes en la población adulta en todo el mundo. Los pacientes con esta patología tienen riesgo de presentar pérdida dentaria múltiple, edentulismo y disfunción masticatoria, afectando su calidad de vida, su nutrición y autoestima, además de tener un gran impacto socioeconómico y sanitario (Tonetti y cols., 2017).

Papel de la microbiota subgingival en el desarrollo de la periodontitis

La etiología de la periodontitis es multifactorial, aunque se reconoce que la microbiota que habita en el área subgingival tiene un papel crítico (Socransky y Haffajee, 2005; Kornman, 2008). Sin embargo, su sola presencia no es suficiente para explicar el inicio y la progresión de la enfermedad (Hernández y cols., 2011). La destrucción de los tejidos periodontales está mediada por una desregulación de la respuesta inmune del hospedero y, por lo tanto, la interacción entre las comunidades microbianas subgingivales y las respuestas inmunes locales es lo que finalmente conduce a la pérdida ósea y del tejido conectivo (Diaz y cols., 2016).

Las bacterias que colonizan los tejidos duros y blandos de la cavidad oral influyen profundamente en la salud y la enfermedad. Estudios microbiológicos han identificado más de 700 especies de microorganismos en la cavidad oral, incluido un gran número de especies que aún no han sido cultivadas (~ 50%), más de 400 se han detectado en el área subgingival, las especies restantes se han identificado en otros hábitats orales como la lengua, las mucosas orales y las lesiones cariosas (Wei y cols., 2019).

En salud, los aerobios facultativos predominan en el microbioma gingival, con una alta representación de *Streptococcus* spp. y *Actinomyces* spp., mientras que, durante la enfermedad, en el microbioma existe un aumento en géneros anaerobios bacterianos con

sobrerrepresentación de especies asociadas a periodontitis. Estos cambios producidos en el microbioma son el resultado de la interacción y de la adaptación de la comunidad microbiana a un entorno en presencia de inflamación (Gaffen y Moutsopoulos, 2020). Se ha demostrado que los microorganismos periodontales no sólo se limitan al medioambiente subgingival, sino que también las superficies de la mucosa bucal pueden ser colonizadas por dichos microorganismos, que pueden servir como reservorios para la infección o reinfección de los tejidos periodontales y merecen atención terapéutica (Wei y cols., 2019).

Secuenciación masiva del gen 16s rDNA

Históricamente, las especies bacterianas que han sido más asociadas a esta enfermedad son *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* y *Porphyromonas gingivalis*, las que conforman el denominado “Complejo Rojo” (Socransky y cols., 1998), el cual ha concentrado gran parte del estudio de la microbiota asociada a periodontitis. En la actualidad, la utilización de técnicas moleculares con mayor resolución, como la secuenciación masiva del gen que codifica para la subunidad ribosomal 16S (16S rRNA), ha permitido tener una visión más completa del microbioma subgingival y de la gran complejidad de los cambios microbianos durante la periodontitis (Griffen y cols., 2012). Desde el advenimiento de la secuenciación masiva, las secuencias del gen 16S amplificadas por PCR, generalmente se han agrupado en función de la similitud para generar Unidades Operacionales Taxonómicas (abreviadas “OTUs”) y para inferir la taxonomía probable de estas OTUs, se ha utilizado las secuencias representativas de éstas en comparación con las bases de datos de referencia (Johnson y cols., 2019). El desarrollo de la secuenciación de alto rendimiento basada en el gen 16S rDNA, abrió una nueva era en microbiología periodontal, al permitir una visión global de las especies bacterianas en una muestra, convirtiéndose en el nuevo “gold standard” (Diaz y cols., 2016).

Se han identificado nueve regiones del gen 16S rDNA de alta variabilidad de secuencia (denominadas regiones hipervariables V1-V9) y se han desarrollado partidores para amplificarlas (Watts y cols., 2017). Las regiones hipervariables del gen 16S rDNA varían en longitud y conservación, por lo tanto, en la densidad de información, lo que resulta en una capacidad para distinguir entre bacterias diferentes. Además de las diferencias evolutivas entre especies, la secuencia del gen 16S rDNA puede variar dentro del mismo genoma ya

que la mayoría de las especies tienen múltiples copias e incluso puede variar entre cepas de la misma especie (Watts y cols., 2017). Por lo tanto, es posible caracterizar simultáneamente la composición del microbioma subgingival de muchas muestras, con un costo relativamente bajo, en un corto período de tiempo y obteniendo miles de secuencias por muestra para garantizar la detección de la mayoría de las especies presentes. Así, el proceso de evaluación de comunidades subgingivales a través de la secuenciación de alto rendimiento del gen 16S rDNA se ha vuelto preciso, rentable y accesible para la mayoría de los investigadores (Diaz y cols., 2016).

Existen múltiples estudios que han realizado una caracterización integral de los cambios producidos en el microbioma subgingival durante la periodontitis, a pesar de que algunas técnicas difieren en estos estudios, todos informan un profundo cambio tanto en la estructura como en la diversidad de las comunidades y muestran una tendencia hacia niveles más altos de microorganismos Gram negativo en periodontitis y una asociación clara de las especies del “complejo rojo” (Diaz y cols., 2016). Al caracterizar los cambios ecológicos producidos en el microbioma subgingival durante periodontitis en comparación con salud, tenemos que durante la enfermedad existe mayor riqueza (diversidad alfa), es decir, existe un aumento en el número total de especies bacterianas. A su vez, estas nuevas especies se vuelven dominantes en las comunidades subgingivales o, dicho de otra forma, aumenta la abundancia relativa de especies asociadas con la enfermedad, lo cual conlleva a un cambio total en la estructura de las comunidades del microbioma subgingival durante periodontitis (Abusleme y cols., 2021). Estas alteraciones en las comunidades microbianas se denominan “disbiosis” y, por consiguiente, se postula que la periodontitis es inducida por comunidades polimicrobianas disbióticas y no por microorganismos individuales (Griffen y cols., 2012; Abusleme y cols., 2013).

Durante la periodontitis, existe un aumento en la biomasa bacteriana. Este aumento en la biomasa no solo se explica por la mayor superficie de los sacos periodontales, sino que probablemente es el resultado de una combinación de una acumulación continua de biopelícula, debido a la falta de una higiene oral adecuada y de un aumento de la capacidad de crecimiento de las comunidades (Abusleme y cols., 2013). Lo anterior, representa un estímulo microbiano al que el hospedero susceptible responde con un aumento en la

inflamación (Bartold y Van Dyke, 2013). La inflamación resultante ejerce una presión ambiental que selecciona especies más eficaces en la utilización de recursos nutricionales derivados del suero y otros factores de la respuesta inmune del hospedero. A esto se suma, la reducción en la cantidad de oxígeno disponible en el ambiente, promoviendo el crecimiento de comunidades disbióticas que se benefician de la inflamación (Marsh, 2003; Diaz y cols., 2016). En efecto, estudios previos en pacientes con periodontitis, mostraron un aumento significativo en la carga bacteriana de sitios con periodontitis que se encontraban con mayor inflamación (medida como sangrado al sondaje) (Abusleme y cols., 2013). En consecuencia, los sacos periodontales contienen una microbiota dominada por bacterias Gram negativo, anaeróbicas, proteolíticas y móviles, ya que son favorecidas y adaptadas a los cambios producidos en el entorno (Dahlen y cols., 2019).

De acuerdo a los antecedentes presentados, existe evidencia de que la inflamación actúa como un determinante ecológico clave para la microbiota subgingival. En este contexto, resulta fundamental analizar aquellas respuestas inmunes del hospedero exacerbadas en la enfermedad y que amplifican la inflamación, con el fin de caracterizar su influencia en las comunidades bacterianas durante la periodontitis.

Desregulación de la respuesta inmune del hospedero

La homeostasis ósea a nivel del hueso alveolar depende de un equilibrio dinámico entre las actividades de los osteoblastos como formadores de hueso y los osteoclastos causando reabsorción ósea, este equilibrio está estrechamente controlado por varios mecanismos reguladores, como el sistema endocrino y la respuesta inmune (Hernández y cols., 2011). Como se mencionó anteriormente, la periodontitis es una enfermedad caracterizada por la disbiosis de la microbiota oral y los eventos proinflamatorios que involucran tanto células como mediadores de la inmunidad innata y adaptativa (Cardoso y cols., 2017). La interacción de la inmunidad innata y adaptativa representan un sistema complejo. Son igualmente necesarios para establecer y mantener la salud de los tejidos y ambos comprenden componentes de inmunidad celular y humoral. La inflamación desencadenada por patógenos, lesiones tisulares o traumatismos suele ser autolimitada. Sin embargo, una alteración de la respuesta inmune sostenida en el tiempo puede resultar en la persistencia de la inflamación aguda, su transición a inflamación crónica, e incluso podría inducir reacciones autoinmunes

en individuos susceptibles (Bunte y Beikler, 2019). En el caso de la periodontitis, esta respuesta inflamatoria crónica severa conduce a la reabsorción ósea alveolar por osteoclastos y a la degradación de las fibras del ligamento periodontal por metaloproteinasas de matriz y posteriormente a la formación de tejido de granulación. Esta situación fisiopatológica persiste hasta que se pierde el diente o hasta que la biopelícula microbiana es eliminada terapéuticamente con éxito (Kinane y cols., 2017).

En salud, en los tejidos gingivales encontramos un predominio de células T, una cantidad mínima de células B, una gran presencia de granulocitos/neutrófilos, células presentadoras de antígenos (APC) y una pequeña población de células linfoides innatas (ILC) que controlan la barrera gingival (Dutzan y cols., 2016). Las células T representan uno de los componentes principales de la respuesta inmune contra el estímulo microbiano constante a nivel del surco gingival. De hecho, estas células controlan las actividades funcionales de la inmunidad innata y adaptativa. Después de la estimulación antigénica de las células T CD4⁺, éstas se activan, proliferan y se diferencian en distintos subconjuntos de células efectoras caracterizadas por sus perfiles específicos de producción de citoquinas, los linfocitos T “helper” (Th) 1 se caracterizan por la secreción de interferón (IFN) - γ , IL-2, IL-12, TNF- α y TNF- β , y están involucrados en la erradicación de patógenos intracelulares e inflamación. Por el contrario, las células Th2 se caracterizan por la secreción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 e IL-13, y están involucradas fundamentalmente en respuestas alérgicas y en la eliminación de parásitos extracelulares (Zhu y cols., 2010). Más recientemente, se han caracterizado dos nuevos subconjuntos de células T CD4⁺: las células Th17 y T reguladoras (Treg). El subtipo Th17 muestra actividad proinflamatoria a través de la secreción de IL-6, IL-21, IL-22, IL-23, y fundamentalmente IL-17, además de RANKL, ambas involucradas en la diferenciación/activación de osteoclastos y reabsorción ósea (Patel y Kuchroo, 2015).

La polarización de las células T CD4⁺, progenitoras implica mecanismos específicos de transducción de señales, factores de transcripción distintos y perfiles de citoquinas locales para cada linaje de células T CD4⁺. La diferenciación de células Th17 es inducida por el transductor de señal y activador de transcripción 3 (STAT3) y el receptor nuclear huérfano relacionado con el ácido retinoide γ t (ROR γ t) que funcionan sinérgicamente entre sí (Bunte y Beikler, 2019). Las mutaciones de STAT3 resultan en la pérdida casi completa de la

diferenciación Th17, apoyando el papel crucial de STAT3 en la diferenciación Th17 y han resaltado su participación en la eliminación de infecciones fúngicas (Patel y Kuchroo, 2015). En periodontitis, se ha documentado un aumento en las respuestas mediadas por IL-17. La citoquina IL-17 se considera impulsora de la pérdida ósea inflamatoria, a través de la regulación positiva de RANKL y la activación de la osteoclastogénesis como se muestra en la artritis y en modelos animales de periodontitis (Dutzan y cols., 2016).

Inmunidad y eje Th17/IL-17

El eje Th17/IL-17 realiza funciones importantes para la vigilancia protectora de la mucosa, ya que estimula el reclutamiento de neutrófilos, promueve la producción de péptidos antimicrobianos y regula la expresión de proteínas de unión estrecha (“tight junctions”) en el epitelio (Abusleme y cols., 2017). La función fisiológica protectora de las células Th17 es especialmente evidente en la mucosa oral, donde defectos en las células Th17 y en la señalización de citoquinas IL-17 conllevan a una susceptibilidad a la infección por *Candida* spp. tanto en modelos murinos como en humanos (Dutzan y cols., 2018). Comúnmente, las células Th17 están involucradas en la respuesta inflamatoria, aunque un número menor de ellas residen en tejidos como la piel y las mucosas, contribuyendo a mantener la integridad de los epitelios. Las funciones inflamatorias de las células Th17 dependen de las diferentes combinaciones de citoquinas expresadas en el entorno local. Por ejemplo, se demostró que IL-23 reduce los niveles de expresión de IL-10 (citoquina antiinflamatoria) en células Th17 en desarrollo e induce células Th17 proinflamatorias productoras de IL-17. Además, se han utilizado diferentes subconjuntos de TGF para inducir funciones distintas en las células Th17, las células Th17 inducidas por el factor de crecimiento transformante beta 3 (TGFβ-3) presentaron funciones altamente patógenas (Bunte y Beikler, 2019).

La función principal de las células Th17 es la regulación de las respuestas que conducen a la eliminación de patógenos extracelulares que incluyen bacterias y hongos. Además, tienen la capacidad de inducir inflamación tisular (Patel y Kuchroo, 2015). El receptor de IL-17 se expresa en una amplia gama de células, incluidos osteoblastos, células endoteliales, células epiteliales, sinoviocitos similares a fibroblastos, condrocitos, fibroblastos, queratinocitos y macrófagos. Aunque la IL-17 es producida predominantemente por las células Th17, también puede expresarse por las células T “natural killer” (NKT), las células T γδ, las células

inductoras de tejido linfoide, los neutrófilos y las células linfoideas de la inmunidad innata (Bunte y Beikler, 2019).

Papel de las células Th17 durante periodontitis

Numerosos estudios han demostrado que la periodontitis humana es asociada con mayores niveles de IL-17 en comparación con el tejido periodontal sano. Los niveles de linfocitos Th17 y de IL-17 se correlacionan directamente con la gravedad de la enfermedad y con los parámetros clínicos de destrucción periodontal (Cardoso y cols., 2009; Moutsopoulos y cols., 2012; Shaker y Ghallab, 2012; Behfarnia y cols., 2013; Patel y Kuchroo, 2015; Zenobia y Hajishengallis, 2015; Xiao y cols., 2017; Dutzan y cols., 2018; Huang y cols., 2020). De hecho, un aumento exagerado en respuestas mediadas por las células Th17 ha sido consistentemente asociado con enfermedades autoinmunes e inflamatorias, entre ellas la periodontitis (Gaffen y cols., 2014; Abusleme y Moutsopoulos, 2017). En efecto, las células Th17 e IL-17 no solo se han asociado a tejidos de individuos con diagnóstico de artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad intestinal inflamatoria y síndrome de Sjögren, sino que se ha demostrado que cumplen un papel importante en la patogénesis de estas enfermedades (Patel y Kuchroo, 2015).

Por otra parte, se ha demostrado que la señalización excesiva de IL-17 conduce a un aumento de la producción de RANKL en osteoblastos y fibroblastos, lo cual conlleva a pérdida ósea (Huang y cols., 2020). Más aún, un estudio reciente ha demostrado que las células Th17 son suficientes para inducir la reabsorción ósea alveolar durante la periodontitis experimental, lo que implica que estas células tienen un papel clave en la enfermedad (Tsukasaki y cols., 2018).

La IL-17 por sí sola es un inductor débil de inflamación; sus potentes efectos inflamatorios se derivan de sus funciones sinérgicas con otras citoquinas y su capacidad para reclutar y mantener células inflamatorias, como los neutrófilos. La regulación positiva de neutrófilos por IL-17 puede conducir a una activación y movilización excesiva de éstos, además de un aumento en la diapédesis de neutrófilos, lo que intensifica el daño tisular (Bunte y Beikler, 2019). Los neutrófilos liberan niveles elevados de enzimas y sustancias destructivas en los tejidos, como las especies reactivas de oxígeno, lisozima, colagenasas y elastasa. Además,

producen citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, las cuales aumentan aún más la inflamación; estos mediadores inmunes se filtran en la circulación y se añaden a los efectos proinflamatorios sistémicos que produce la periodontitis. Los neutrófilos también pueden contribuir a la destrucción ósea a través de la estimulación de la actividad osteoclástica, en particular cuando están cerca del hueso alveolar (Loos y Van Dyke, 2020).

Si bien existe una acumulación fisiológica con la edad de las células Th17 en la mucosa oral producida por la estimulación mecánica continua, que es dependiente de IL-6 e independiente de la microbiota (Dutzan y cols., 2017), el aumento de células Th17 en periodontitis depende de la presencia de una microbiota local disbiótica. Además, en la encía, durante salud, las células Th17 dependen únicamente de IL-6 para su diferenciación, sin embargo, durante la periodontitis su acumulación requiere tanto IL-6 como IL-23 (Dutzan y cols., 2018).

Respecto a la influencia de la microbiota en el aumento de las células Th17 durante la periodontitis, un estudio reciente demuestra que la reducción significativa de la microbiota (a través de la utilización de antibióticos) durante la inducción de periodontitis, resulta en una disminución marcada en la proliferación de las células Th17 (Dutzan y cols., 2018). Sin embargo, se ha demostrado que son necesarios los cambios disbióticos en las comunidades microbianas para la inducción de células Th17, en lugar de un aumento en carga microbiana total, es decir, son las alteraciones en comunidades microbianas específicas las responsables de la activación de Th17 en periodontitis (Dutzan y cols., 2018). En esta misma investigación se vio que el uso de antibióticos dirigidos a bacterias anaerobias, como metronidazol, fue particularmente exitoso al inhibir la proliferación de células Th17, lo cual indicaría que este tipo de bacterias son las responsables de inducir la proliferación de células Th17 durante la periodontitis (Dutzan y cols., 2018). Sin embargo, estudios recientes ya han logrado identificar especies bacterianas específicas como inductores de células Th17 durante periodontitis inducida por ligadura, más específicamente especies del género *Klebsiella*, que corresponden a anaerobias facultativas Gram negativo (Kitamoto y cols., 2020).

Potencial de la inhibición de células Th17 durante periodontitis

Varios estudios en modelos de periodontitis experimental sugieren un importante papel para el subtipo Th17. La inhibición genética o farmacológica de las células Th17 o de la IL-17

protege de la pérdida ósea periodontal, por lo tanto, estas células y sus vías relacionadas podrían ser potencialmente exploradas como objetivo terapéutico (Gaffen y Moutsopoulos, 2020).

Estudios que han analizado la periodontitis en el contexto de diabetes y de la Deficiencia de Adhesión Leucocitaria de tipo 1 (LAD-1, por sus siglas en inglés), han demostrado que respuestas exageradas del eje Th17/IL-17 están fuertemente asociadas con disbiosis de las comunidades subgingivales (Moutsopoulos y cols., 2015; Xiao y cols., 2017). LAD-1 en particular, es causada por una mutación en el gen CD18 (ITGB2), cuando CD18 es disfuncional, los neutrófilos son incapaces de transmigrar de la vasculatura a los tejidos. Estudios en un modelo LAD-1, demostraron que la pérdida de neutrófilos tisulares predispone a disbiosis microbiana y a una amplificación de Th17. Esta amplificación se explica a través de una teoría que postula que las respuestas Th17/IL-17 son clave para el reclutamiento de neutrófilos. Por lo cual, una vez reclutados y localizados en el tejido, los neutrófilos juegan un papel crítico en la regulación negativa del eje IL-23/IL-17. Por lo tanto, durante LAD-1, las respuestas inflamatorias de IL-17 incrementan para aumentar el número de neutrófilos, sin embargo, en ausencia de neutrófilos estas respuestas siguen al alza sin tener una regulación negativa (Gaffen y Moutsopoulos, 2020). Una de las características distintivas de LAD-1 es la periodontitis severa a una edad temprana, que a menudo conduce a la pérdida de toda la dentición a pesar de tratamiento periodontal adecuado y oportuno. El componente inflamatorio de la periodontitis LAD-1 fue caracterizado y se rige por las señales inflamatorias IL-23 e IL-17 que impulsan la destrucción del tejido (Moutsopoulos y cols., 2015). Más aún, la inhibición de IL-17 en el modelo murino de periodontitis experimental y durante LAD, ha mostrado un efecto directo en las comunidades microbianas durante la periodontitis, ya que genera una reducción dramática de la carga bacteriana total (Eskan y cols., 2012; Moutsopoulos y cols., 2014). Por otra parte, en el contexto de diabetes, se realizó un estudio donde se compararon los cambios producidos en la microbiota oral en ratones diabéticos y ratones diabéticos a los cuales se les inyectó un anticuerpo contra IL-17. Para analizar la diferencia entre ambos microbiomas en el contexto de periodontitis, se tomaron muestras de la microbiota oral de estos dos modelos murinos y se inocularon en ratones libres de gérmenes con el modelo PIL. Los resultados de este estudio demostraron que el tratamiento con el anticuerpo contra IL-17 tuvo un efecto dramático sobre la

patogenicidad de las bacterias orales, alteró la composición microbiana y disminuyó la capacidad de las bacterias para estimular la inflamación periodontal (Xiao y cols., 2017).

Para evaluar las consecuencias clínicas de la inhibición celular de Th17 en humanos, se ha estudiado a pacientes con el trastorno mendeliano autosómico dominante síndrome de hipersecreción de Inmunoglobulina E (abreviado “AD-HIES”). Estos pacientes tienen una mutación autosómica dominante, la cual conlleva a la pérdida de la función en el gen STAT3, que conduce a una señalización STAT3 reducida y a una diferenciación defectuosa de células Th17 (Dutzan y cols., 2018). Los pacientes con AD-HIES han sido caracterizados por la tríada de eczema, infecciones de piel y pulmón, así como IgE sérica extremadamente elevada. También presentan infecciones orales recurrentes por *Candida* spp., lo que indica un papel crítico en la inmunidad oral mediada por STAT3 (Abusleme y cols., 2018). Una evaluación periodontal detallada en estos pacientes demostró una inflamación periodontal significativamente reducida y una pérdida ósea atenuada en comparación con individuos sanos de la misma edad (Dutzan y cols., 2018). Además, en estos pacientes se encontró que los defectos en la inmunidad mediada por STAT3 están asociados con cambios en las comunidades bacterianas. Al caracterizar las consecuencias de la deficiencia de STAT3 en las comunidades bacterianas de la mucosa oral se mostró una diversidad disminuida con un número reducido de especies bacterianas, particularmente en el contexto de candidiasis oral (Abusleme y cols., 2018).

Por otro lado, un estudio realizado por Dutzan y cols. (Dutzan y cols., 2018), demostró que la inhibición de Th17 condujo a una reducción significativa de la pérdida ósea (50 a 70%) y a una disminución en el reclutamiento de neutrófilos. La acumulación de neutrófilos se conoce como un sello distintivo de la periodontitis, por lo cual la disminución en la acumulación actúa como protección frente a la pérdida ósea periodontal. Este último antecedente refuerza la idea de centrarse en nuevos enfoques terapéuticos dirigidos específicamente a células Th17. Sin embargo, todavía falta dilucidar todos los mecanismos por los cuales Th17 cobra una especial importancia en la periodontitis, particularmente los efectos que causa en el microbioma subgingival, por lo cual el objetivo de este estudio es evaluar el efecto de la inhibición de las células Th17 en la estructura y composición del microbioma subgingival durante periodontitis experimental.

3) HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:

HIPÓTESIS: Tomando en consideración el papel que tiene la amplificación del eje Th17/IL-17 sobre la microbiota subgingival, proponemos la siguiente hipótesis:

La inhibición del eje Th17/IL-17 durante periodontitis experimental previene cambios disbióticos en el microbioma subgingival.

OBJETIVO GENERAL: Determinar si la inhibición del eje Th17/IL-17 durante periodontitis experimental previene cambios disbióticos en el microbioma subgingival

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Determinar el efecto de la inhibición de las células Th17 en la diversidad del microbioma subgingival durante periodontitis experimental.
2. Determinar el efecto de la inhibición de las células Th17 en la estructura del microbioma subgingival durante periodontitis experimental.
3. Determinar el efecto de la inhibición de las células Th17 en la abundancia relativa de especies bacterianas del microbioma subgingival durante periodontitis experimental.

4) MATERIALES Y MÉTODOS:

El desarrollo de esta Tesis cuenta con el financiamiento y apoyo del Proyecto FONDECYT de Iniciación N° 11180505 (Ver Anexo 1).

Animales y modelo experimental de Periodontitis Inducida por Ligadura

Las muestras de microbioma subgingival que se analizaron en esta tesis provienen de experimentos que fueron previamente realizados. Para este estudio se utilizaron dos grupos de ratones (C57BL/6) pertenecientes a la misma camada, un grupo estaba conformado por ratones genéticamente modificados que presentaban una mutación en el factor de transcripción STAT3 en el compartimiento de las células CD4⁺ (*Cd4^{cre}Stat3^{fl/fl}*), y como STAT3 es esencial para la diferenciación de las células Th17, estos ratones carecían de células Th17 (esto fue verificado a nivel de la encía en Dutzan y cols., 2018). Como grupo control, se utilizaron los ratones de la misma camada que no tenían la mutación en STAT3 (*Stat3^{fl/fl}*) y, por lo tanto, tenían cantidades normales de células Th17. Cada grupo estaba compuesto por 6 ratones, de donde se obtuvieron 12 muestras en total, las cuales provenían de las ligaduras extraídas de cada uno de ellos. Para determinar el papel de la inhibición de las células Th17 en la microbiota subgingival, se utilizó un modelo murino de periodontitis inducida por ligadura (PIL) (Abe y Hajishengallis, 2013). Una ventaja importante de este modelo es que la enfermedad puede iniciarse en un tiempo conocido con una secuencia predecible de eventos que culminan en la pérdida de hueso alveolar en unos pocos días. Como se puede observar en la Fig. 1, el modelo de PIL, consiste en la colocación atraumática de una sutura de seda (ligadura) alrededor del segundo molar, la cual conduce a la acumulación local de bacterias y a la inflamación gingival, seguida de la destrucción del hueso alveolar que es medible desde el quinto día (Abe y Hajishengallis, 2013). Al quinto día post-colocación de ligaduras, éstas fueron retiradas en ambos grupos de ratones para su posterior análisis microbiológico, como se ha descrito en Dutzan y cols. (Dutzan y cols., 2018). Es importante señalar que estos experimentos se realizaron con la aprobación del NIDCR Animal Care and Use Committee (ACUC) (de los National Institutes of Health, Estados Unidos), en el marco del ASP 16-804 (Protocolo de trabajo con animales de la misma institución).



Figura 1. Modelo de periodontitis inducida por ligadura.

En la imagen se observa la ligadura alrededor del segundo molar del ratón.

Tomada de Dutzan y cols., 2018.

Extracción de ADN y secuenciación basada en el gen 16S rDNA

Este procedimiento experimental también fue realizado con anterioridad, de manera que las secuencias sin analizar de cada muestra se encontraban previamente disponibles para su análisis bioinformático, el cual fue realizado en la presente Tesis. Brevemente, para el aislamiento de ADN de las muestras, es decir, las ligaduras extraídas de ambos grupos de ratones, se utilizó una versión modificada del protocolo de extracción del DNeasy Tissue and Blood Kit (Qiagen) descrito en detalle por Abusleme y cols. (Abusleme y cols., 2017). Para la secuenciación masiva del gen 16S rDNA, se utilizó la plataforma MiSeq (Illumina) y partidores que amplificaban la región V4 del gen 16S rDNA, como ha sido descrito en Dutzan y cols. (Dutzan y cols., 2018).

Análisis Bioinformático

a) Preprocesamiento de las secuencias

Para el procesamiento bioinformático de los datos se utilizó el *software* mothur (<http://www.mothur.org>) (Schloss y cols., 2009). En primer lugar, las secuencias correspondientes a cada muestra fueron ensambladas en *contigs*, es decir, los archivos en formato *fastq* R1 y R2 (secuencias *forward* y *reverse*) se unieron para generar un archivo único en formato *fasta*. En el siguiente paso, se eliminaron los partidores, las

secuencias espaciadoras y las secuencias índices que diferenciaban a cada muestra. Luego se utilizó el comando `screen.seqs`, el cual permite eliminar todas aquellas secuencias que no cumplan con los criterios establecidos por el usuario, que en este caso fueron de acuerdo a su tamaño (incluyendo sólo secuencias que tengan desde 200 hasta 400 pares de bases) y a la presencia de ambigüedades en las secuencias (no se admitieron asignaciones de bases ambiguas). Los pasos siguientes del preprocesamiento utilizaron el protocolo estándar establecido (https://mothur.org/wiki/miseq_sop/) (Kozich y cols., 2013), que será detallado a continuación. Para facilitar el análisis en términos de la capacidad computacional requerida, se utilizó el comando `unique.seqs`, para trabajar sólo con aquellas secuencias únicas lo que facilita la siguiente etapa de alineamiento. En el paso siguiente se procedió a alinear las secuencias utilizando el comando `align.seqs` y como base los archivos de referencia SILVA, que fueron ajustados a la región de interés (región variable V4 del gen 16S rDNA). Luego se volvió a utilizar el comando `screen.seqs` esta vez para filtrar y eliminar aquellas secuencias que no se alinearon en la misma región que las otras secuencias, más específicamente se eliminaron aquellas secuencias que comenzaban en la posición 8 y terminaban en la posición 9582, además de permitir un máximo de 8 homopolímeros en las secuencias. En el siguiente paso se trabajó con el comando `filter.seqs` para eliminar las columnas que no contengan datos (con espacios) en nuestro alineamiento. Posteriormente se usó el comando `pre.cluster` para fusionar aquellas secuencias cuya diferencia está dentro de los 2 pares de bases, ya que probablemente se trate de un error y estas pertenezcan a la misma OTU. A continuación, con la ayuda del comando `chimera.uchime` se reconocieron aquellas secuencias quiméricas, es decir, aquellas secuencias que tenían dos tipos de especies diferentes, estas fueron eliminadas con el comando `remove.seqs` y utilizando el algoritmo VSEARCH (Rognes y cols., 2016). Para la asignación de la identidad taxonómica, las secuencias fueron clasificadas utilizando la última versión implementada en mothur del Ribosomal Database Project (RDP) classifier (Wang y cols., 2007) con un *cutoff*=80 (comando `classify.seqs`). Consecutivo a esto se aplicó el comando `remove.lineage`, el cual reconoce y elimina aquellas secuencias que corresponden a cloroplastos, mitocondrias, *archaeas*, otros eucariontes y desconocidas. Los siguientes comandos se utilizaron para calcular distancias pares no corregidas entre secuencias de ADN alineadas (`dist.seqs`) y asignar

secuencias a OTUs (cluster). Es importante mencionar que cada cierta cantidad de pasos se aplicó el comando summary para ir verificando la cantidad de secuencias total y el comando count.group para ir verificando el número de secuencias por muestra.

b) Determinación de Unidades Operacionales Taxonómicas (OTUs)

Para llevar a cabo estos análisis, las secuencias fueron agrupadas en OTUs utilizando un criterio de similitud del 97%. Cada OTU fue clasificada taxonómicamente hasta el nivel de género, basado en la taxonomía de consenso usando el parámetro estándar (51%). Para mejorar la resolución taxonómica, la secuencia representativa de cada OTU fue comparada a través de BLAST utilizando la base de datos NCBI 16S rRNA y en aquellas donde se alcanzó un nivel mayor a 97% de similitud y cobertura, la especie encontrada fue reportada entre paréntesis, como parte del nombre de cada OTU.

c) Cálculo de abundancia relativa

Para determinar la abundancia relativa se utilizó el comando get.relabund, el cual calcula la abundancia de cada OTU en cada muestra.

d) Análisis de α -diversidad

Para estos análisis, primero se procedió a normalizar el número de secuencias por muestra a considerar, usando el comando sub.sample, de modo de asegurar una misma cantidad representativa de secuencias en cada muestra. Posterior a esto, se realizó el cálculo de los parámetros de α -diversidad, que incluyeron el Índice de diversidad de Shannon (versión no paramétrica) y estimadores de riqueza (número de OTUs detectados por muestra), los cuales fueron realizados con el comando summary.single.

e) Análisis de β -diversidad

Primero, se calculó una matriz de distancias a nivel de OTUs basada en el “Yue and Clayton Theta Similarity coefficient”, el cual es una medida utilizada para evaluar la estructura de las comunidades microbianas (comando dist.shared). Esta matriz se visualizó utilizando “Principal Coordinates Analysis” (PCoA).

f) Análisis estadísticos y visualización de los datos

Para la comparación de diversidad y riqueza entre muestras, se analizó la distribución de los datos (normal, no normal) utilizando el software R y RStudio, donde se realizaron las pruebas de Anderson-Darling, Pearson chi-square y Shapiro-Wilk, de acuerdo con eso, se eligió la prueba T-test no pareado para determinar si las diferencias eran estadísticamente significativas. Para la comparación de la estructura de las comunidades, la separación estadísticamente significativa de las muestras se analizó con el test de AMOVA (“Analysis of Molecular Variance”), como se encuentra implementado en mothur. Para la comparación de la abundancia relativa de OTUs, se utilizó el método de LEfSe (Segata y cols., 2011). Todos los gráficos fueron realizados utilizando los softwares R y RStudio.

5) RESULTADOS:

En la tabla 1 se muestra el número total de secuencias inicial, es decir, previo al preprocesamiento de los datos, el cual corresponde a 1.705.577 secuencias. Luego, el número total de secuencias final (488.285) y el promedio de secuencias por muestra (40.660 ± 10.640), que fue el número de secuencias con las cuales se trabajó para la determinación de OTUs. También se puede observar el número de secuencias elegido para la normalización de los datos (22.160 secuencias), en este paso se eliminó una de las muestras, la cual correspondía a un control realizado por el laboratorio previo a la toma de muestras con las ligaduras (solo *buffer* y pinzas estériles utilizadas posteriormente para manipular las ligaduras) y no pertenecía a ninguno de los dos grupos.

Tabla 1. Resumen del número de secuencias durante el preprocesamiento de los datos.			
N° total de secuencias inicial	N° total de secuencias final	Promedio de secuencias por muestras \pm D.S	N° de secuencias para normalización (sub.sample)
1.705.577	488.285	40.660 ± 10.640	22.160

N°: Número. D.S: Desviación estándar.

a) **Diversidad en las comunidades subgingivales**

Para evaluar el efecto de la inhibición de las células Th17 en la diversidad del microbioma subgingival durante periodontitis experimental, se realizó una comparación del índice de Shannon no paramétrico en ambos grupos (Fig. 2). Tanto el grupo sin células Th17 como el grupo control (con cantidades normales de células Th17) poseían un índice de Shannon muy similar, la mediana era de 1.57 y 1.45 respectivamente, la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p = 0.5835$). Además, para determinar la riqueza de las muestras, también se obtuvo el número de OTUs por muestra para ambos grupos (Fig. 3). En ambos grupos se observa una cantidad semejante de OTUs por muestra con una mediana de 90.5 para el grupo control y 96.5 para el grupo sin células Th17, la diferencia no era estadísticamente significativa ($p = 0.5748$).

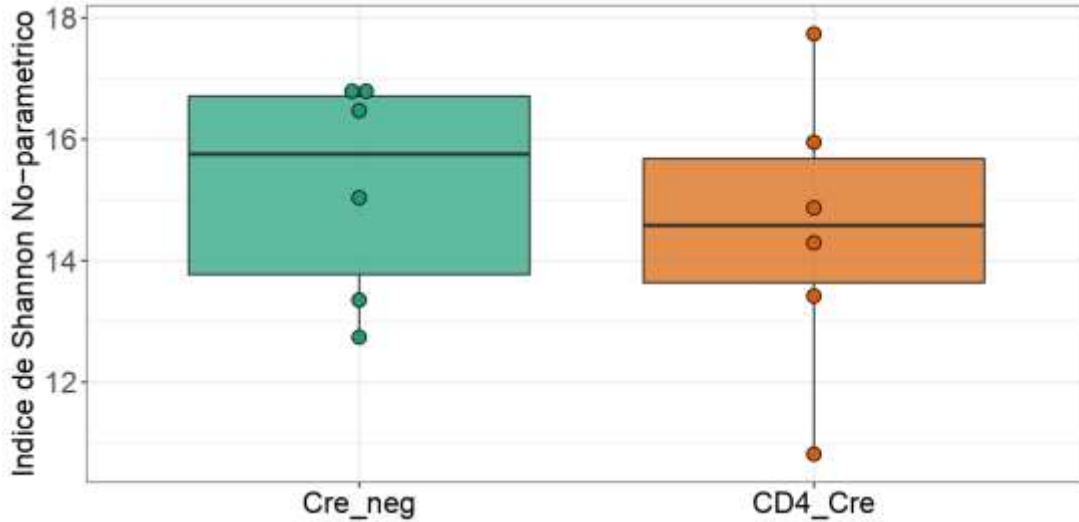


Figura 2. La inhibición de las células Th17 no afecta la diversidad alfa del microbioma subgingival en ratones con periodontitis experimental.

Índice de Shannon no paramétrico en grupo control (Cre_neg) y grupo sin células Th17 (CD4_Cre). $p = 0.5835$.

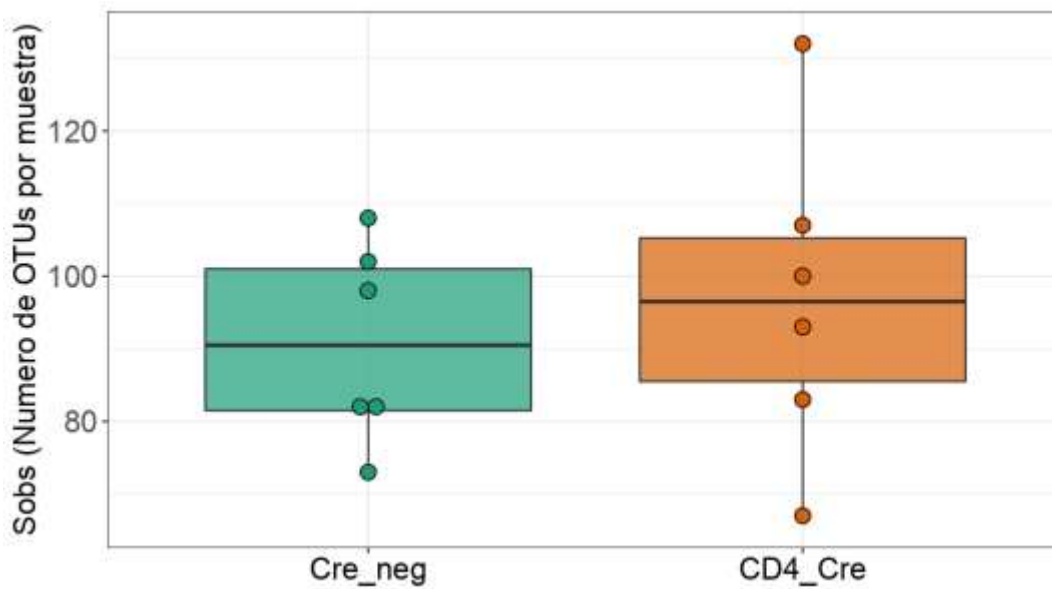


Figura 3. La inhibición de las células Th17 no afecta el número de OTUs por muestra del microbioma subgingival en ratones con periodontitis experimental.

Gráfico de cajas y bigotes. Grupo control (Cre_neg) y el grupo sin células Th17 (CD4_Cre). $p = 0.5748$.

b) Estructura de las comunidades

Para analizar el efecto de la inhibición de las células Th17 en la estructura del microbioma subgingival durante periodontitis experimental, se calculó una matriz de distancias a nivel de OTUs basada en el “Yue and Clayton Theta Similarity coefficient” y ésta se graficó utilizando “Principal Coordinates Analysis” (PCoA). La distancia Theta evalúa la presencia, la ausencia de especies y la abundancia. Como se puede observar en el gráfico (Fig. 4) no existe una agrupación evidente de estas muestras por grupos, es decir, no se agrupan de una forma característica de acuerdo con el grupo que provienen. La diferencia entre ambos grupos no es estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

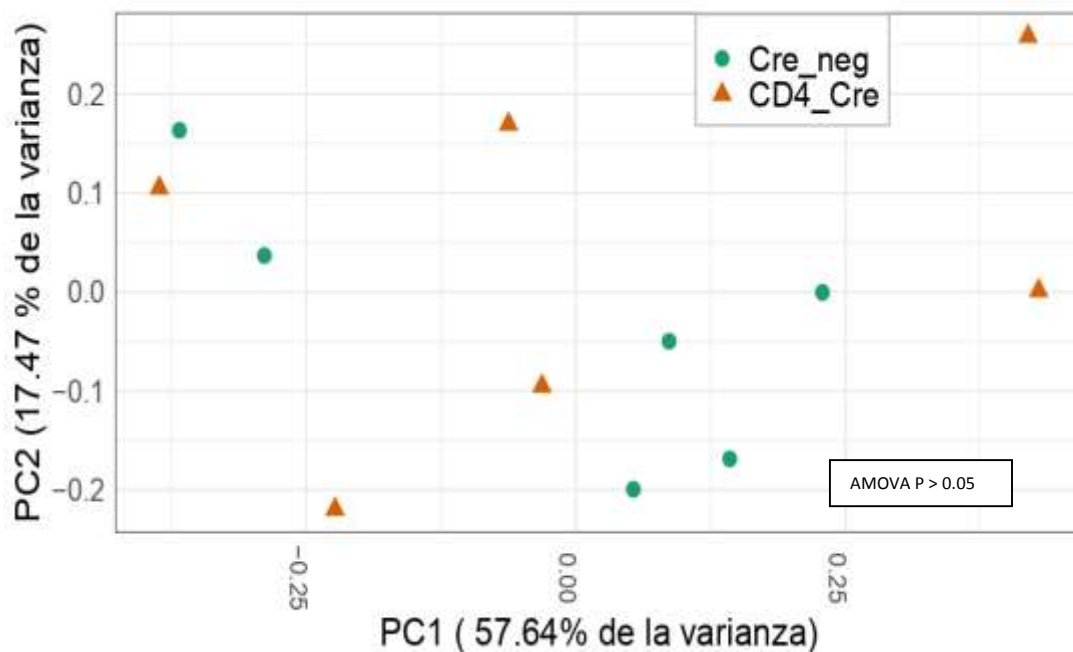


Figura 4. La inhibición de las células Th17 no afecta la estructura de las comunidades del microbioma subgingival en ratones con periodontitis experimental.

Análisis de coordenadas principales (sin elipse). Cada círculo corresponde a una comunidad microbiana en el grupo control (Cre_neg) y los triángulos corresponden a las muestras pertenecientes al grupo sin células Th17 (CD4_Cre). $p > 0.05$.

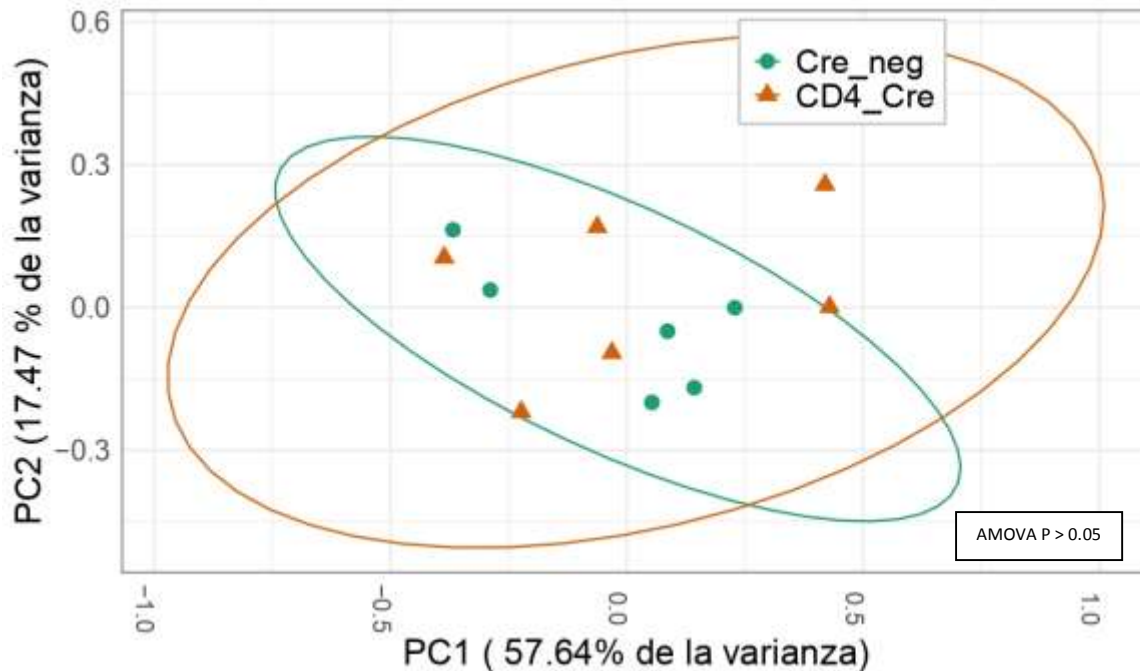


Figura 5. La inhibición de las células Th17 no afecta la estructura de las comunidades del microbioma subgingival en ratones con periodontitis experimental.

Análisis de coordenadas principales con elipse. Cada círculo corresponde a una unidad microbiana en el grupo control (Cre_neg) y los triángulos corresponden al grupo sin células Th17 (CD4_Cre). Cada elipse indica el área donde se distribuyen las muestras de cada grupo respectivamente. $p > 0.05$

c) Abundancia relativa de especies bacterianas en las comunidades

Para evaluar el efecto de la inhibición de las células Th17 en la abundancia relativa de especies bacterianas del microbioma subgingival durante periodontitis experimental utilizamos el comando `get.relabund`, los datos resultantes se pueden observar en la Fig. 5. Como se puede observar tanto las muestras del grupo sin células Th17 como las del grupo control (con cantidades normales de células Th17) poseen una abundancia muy semejante de especies bacterianas, en ambos hay dominancia de *Streptococcus* sp., una especie de *Lactobacillus* y una especie de *Enterococcus*, entre otras. Solo hubo dos especies que se encontraron aumentadas en el grupo control, *Staphylococcus* (*Staphylococcus lentus/fleuretti*) y *Lachnospiraceae* (*Clostridium scindens*).

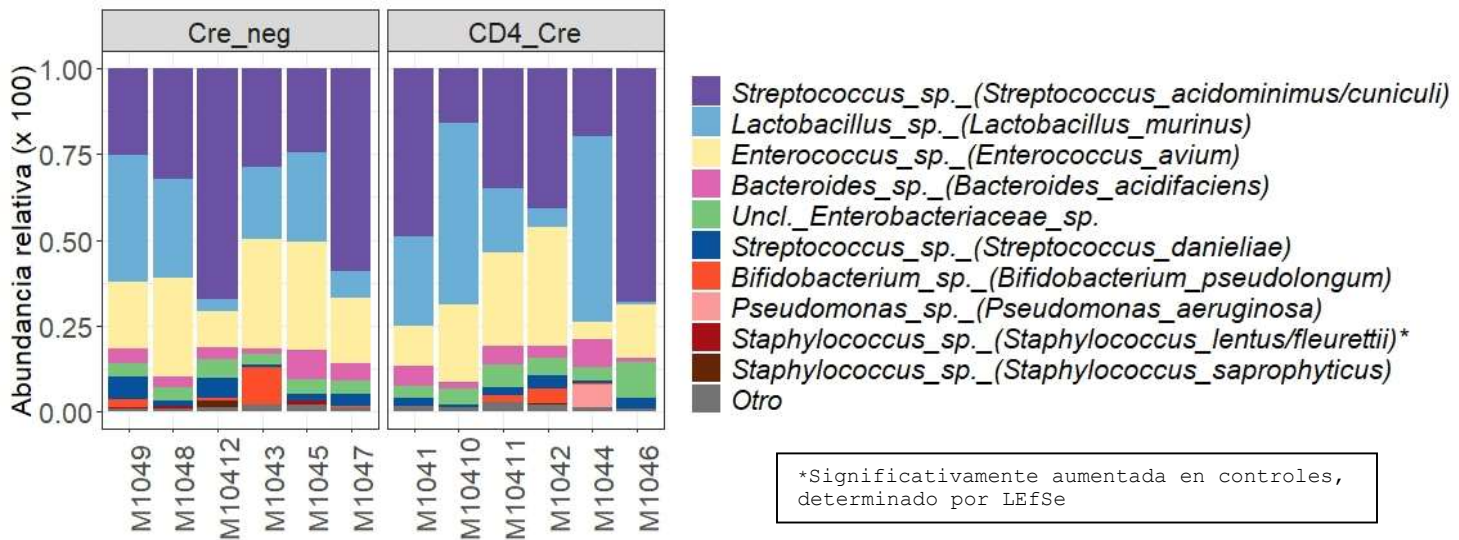


Figura 6. La inhibición de las células Th17 sólo afectó la abundancia relativa de dos especies bacterianas del microbioma subgingival en ratones con periodontitis experimental.

Gráfico de barras. Grupo control (Cre_neg) y grupo sin células Th17 (CD4_Cre). Cada barra corresponde a una muestra, en el eje Y se puede observar el porcentaje de abundancia que representa a cada especie con respecto al total. Cada color representa una especie diferente, esta clasificación se basa en un 97% de similitud de secuencias.

6) DISCUSIÓN:

Las células Th17 son potentes inductores de la inflamación tisular y han sido implicadas en la patogenia de muchas enfermedades autoinmunes e inflamatorias entre ellas la periodontitis (Patel y Kuchroo, 2015). En periodontitis, se ha encontrado que una desregulación y aumento en las respuestas del eje Th17/IL-17 se correlacionan directamente con la gravedad de la enfermedad y con los parámetros clínicos de destrucción periodontal (Dutzan y cols., 2018). Estudios recientes postulan que la gran influencia del eje Th17/IL-17 en periodontitis, se debe entre otros factores a que posee la capacidad de promover la disbiosis de las comunidades del microbioma subgingival (Moutsopoulos y cols., 2014; Xiao y cols., 2017; Abusleme y cols., 2018). Existen varios mecanismos potenciales por los cuales el eje Th17/IL-17 podría alterar el microbioma como, por ejemplo, alterar el crecimiento bacteriano al proporcionar sustratos generados a partir del aumento de la inflamación o, al hablar de la inhibición de las células Th17, se podrían producir cambios en la defensa antibacteriana, los cuales conlleven a una disminución tanto de la carga bacteriana total como del número de especies encontradas en el surco gingival (Xiao y cols., 2017).

Para determinar si efectivamente el eje Th17/IL-17 está relacionado con el proceso de disbiosis microbiana se analizó el efecto de la inhibición de las células Th17 en el microbioma gingival durante la periodontitis, para esto utilizamos un modelo murino de periodontitis inducida por ligadura en dos grupos. El primer grupo correspondía a ratones genéticamente modificados que presentaban una mutación en el factor de transcripción STAT3, la cual produjo la inhibición de las células Th17, mientras que el segundo grupo eran ratones de la misma camada, pero sin la mutación. Nosotros encontramos que ambos grupos, tanto control como deficiente en células Th17, poseían un microbioma muy similar, solo dos especies se encontraron significativamente aumentadas en el grupo control, lo cual indicaría que las células Th17 no tienen una gran influencia en los cambios disbióticos producidos durante la periodontitis o bien, quizá su influencia se ve evidenciada en un tiempo anterior o posterior al medido en este estudio.

Al analizar las diferencias de ambos grupos en cuanto a diversidad, nos encontramos con que ambos grupos poseían una diversidad muy similar, lo que señala que las células Th17

no estarían influyendo de manera distintiva en el aumento de la cantidad de especies bacterianas encontradas en el microbioma subgingival.

Al evaluar el efecto del eje Th17/IL-17 en la estructura de las comunidades se confirmó que al inhibir estas células la distribución de los taxones bacterianos en las muestras no tuvo variación en comparación con el grupo control. Con respecto a la abundancia relativa de especies bacterianas, se encontraron dos especies aumentadas de forma significativa en el grupo control, estas fueron *Staphylococcus* sp. (*Staphylococcus lentus/fleuretti*) y *Lachnospiraceae* sp. (*Clostridium scindens*), a pesar de que estas especies se encontraban aumentadas en el grupo control, esto no proporciona evidencia suficiente de los efectos de las células Th17, ya que el resto de las especies en ambos grupos tenían una abundancia muy similar, principalmente anaerobios facultativos, es decir, nuestros datos indican que la disbiosis microbiana producida durante la periodontitis no se relaciona con mecanismos proinflamatorios producidos por las células Th17. Sin embargo, es importante mencionar que nuestros datos provienen sólo del quinto día de PIL, por lo que es necesario realizar nuevos estudios donde se analicen las diferencias en las comunidades microbianas de ambos grupos, de forma más temprana y más tardía en el establecimiento de la enfermedad, para poder tener resultados más concluyentes con respecto a la influencia de las células Th17 en la disbiosis microbiana durante periodontitis.

Resultados de otras investigaciones realizadas bajo diferentes contextos sistémicos demostraron los cambios producidos en el microbioma en relación con el eje Th17/IL-17. En el caso del estudio de Xiao y cols. (Xiao y cols., 2017) realizado en contexto de diabetes, podemos observar cómo al aplicar un anticuerpo contra IL-17 disminuye significativamente la abundancia de especies y en particular de algunas del tipo anaerobias. Lo mismo fue observado en el contexto de LAD-1 en un estudio de Moutsopoulos y cols. (Moutsopoulos y cols., 2014) donde en un modelo murino de periodontitis LAD-1 aplicaron anticuerpos contra IL-17 e IL-23 y se observó que con ambos anticuerpos hubo una reducción en el número de bacterias anaerobias cultivables y en el recuento total de bacterias. Asimismo, en otro estudio realizado por Abusleme y cols., (Abusleme y cols., 2018) en pacientes con AD-HIES se ve como tanto la diversidad como el número total de especies bacterianas se ven

significativamente disminuidos durante esta patología. En contraste con los hallazgos en investigaciones previas, nuestros resultados sugieren que el aumento en las células Th17 durante periodontitis no induce a cambios disbióticos en el microbioma gingival durante periodontitis en el tiempo experimental analizado. Es necesario considerar que nuestras muestras fueron obtenidas el quinto día del modelo PIL, donde ya se puede apreciar pérdida ósea alveolar, por lo cual es necesario considerar que existen respuestas proinflamatorias que se producen en las etapas más tempranas de la enfermedad, las cuales podrían estar contribuyendo al establecimiento de la disbiosis del microbioma subgingival durante periodontitis. Es decir, se debe explorar la posibilidad de que respuestas del sistema inmune innato sean las responsables de contribuir y aumentar los cambios ocurridos en las comunidades bacterianas durante esta enfermedad. En un estudio de Wang (Wang, 2019), se encontró que la estimulación inmune local de los receptores tipo *toll* (TLRs), presentes en las células del epitelio gingival, es capaz de inducir la disbiosis de las comunidades gingivales y causar periodontitis. Estos receptores son importantes componentes de la inmunidad innata, por lo que esto podría reafirmar nuestra última idea, de que la disbiosis microbiana se establece de forma temprana y la clave estaría en los componentes del sistema inmune innato. De la misma forma, también es necesario estudiar un tiempo más tardío al analizado en nuestro estudio para poder confirmar o refutar con certeza si la ausencia de estas células previene cambios disbióticos en el microbioma.

Por otro lado, los estudios previamente realizados en el contexto de periodontitis que indican que el eje Th17/IL-17 posee un rol importante en la disbiosis de las comunidades, fueron realizados bajo otros contextos sistémicos como LAD-1, diabetes y AD-HIES (Moutsopoulos y cols., 2014; Xiao y cols., 2017; Abusleme y cols., 2018), lo cual podría explicar los diferentes resultados obtenidos, ya que en estas patologías existe un contexto inflamatorio y una respuesta inmune diferentes a las producidas en un individuo sistémicamente sano.

Particularmente en el caso de LAD-1 y diabetes, es esta inmunidad alterada la que podría estar influyendo y causando una respuesta inflamatoria alterada de Th17/IL-17, la cual influye en la disbiosis de las comunidades microbianas durante esta enfermedad. Por lo que es necesario investigar más en profundidad cuáles son las respuestas inflamatorias que

estarían influyendo en la disbiosis de las comunidades en estas patologías y comparar si estas mismas respuestas inflamatorias con la misma intensidad se producen en estado de salud.

Como se dijo anteriormente, es importante mencionar que existen enfermedades que afectan a otras superficies de barrera y mucosas, en las que se puede observar una asociación entre niveles elevados de Th17/IL-17 y disbiosis microbiana, tales como la enfermedad intestinal inflamatoria (compuesta por la enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa) y psoriasis, entre otras. Varios estudios recientes han evaluado el uso de anticuerpos monoclonales contra IL-17 (Secukinumab) y contra IL-23/IL-12 (Ustekinumab, UST) en el contexto de estas enfermedades. Al analizar la microbiota en los estudios realizados con UST en contexto de psoriasis, se observó que, durante el tratamiento, la composición de la microbiota divergió aún más entre la piel lesionada y no lesionada a lo largo de las zonas del cuerpo. UST inhibió significativamente la expresión de péptidos antimicrobianos como las defensinas y proteínas S100, que podrían eliminar la variación en el microbioma que se produce normalmente en la psoriasis (Loesche y cols., 2018). De la misma forma, en un estudio de Doherty y cols. (Doherty y cols., 2018), se vio que la diversidad microbiana del grupo tratado con UST aumentó durante las 22 semanas del estudio, apareciendo especies asociadas a la salud, en contraste con lo que sucedió con los sujetos del grupo control. Esto demuestra la relación que existe entre IL-23 y la modulación de la disbiosis microbiana, lo cual es interesante ya que, si lo llevamos al contexto de la mucosa oral durante periodontitis, sabemos que IL-23 es esencial para el aumento de las células Th17 durante esta enfermedad, lo que indicaría que la inhibición de esta citoquina influiría en los efectos de este tipo celular en la microbiota, sin eliminar por completo el efecto protector de IL-17 en las mucosas.

Si bien ha sido establecido que la disbiosis intestinal puede alterar el equilibrio de las células Th17 y esto es respaldado por estudios en modelos murinos tratados con antibióticos (Ivanov y cols., 2008), el sistema inmune también puede producir cambios en la microbiota intestinal. En el contexto de la enfermedad intestinal inflamatoria (EII), la activación del sistema inmune puede conducir a respuestas proinflamatorias que pueden producir alteraciones en las funciones de las células epiteliales intestinales, alterando su secreción y produciendo

cambios en la microbiota intestinal (Luo y cols., 2017). Se ha demostrado que las bacterias filamentosas segmentadas (BFS) son un componente crítico de la microbiota intestinal comensal que conduce las respuestas de las células Th17 (Ivanov y cols., 2009; Yang y cols., 2014). Sin embargo, un estudio de Kumar y cols. (Kumar y cols., 2016), demostró que existe una relación recíproca entre BFS y el linaje de las células Th17, donde se demostró que la interrupción en la señalización del receptor para IL-17A (IL-17RA) condujo a disbiosis de las comunidades, donde el grupo con el receptor bloqueado mostró un incremento de las células Th17, lo cual a su vez influenció factores medioambientales, como la colonización con BFS.

Estudios recientes evaluaron los cambios producidos en la microbiota intestinal al usar el anticuerpo monoclonal Secukinumab, en el contexto de psoriasis. En este estudio se demostró que Secukinumab impulsó un cambio de la microbiota intestinal desde microorganismos "simbiontes" a "patobiontes", los que han sido identificados como los responsables de los cambios que ocurren en la disbiosis intestinal en EII. Esto podría explicarse porque al inhibir totalmente IL17 se pierden sus funciones protectoras en la mucosa, las cuales permiten mantener la integridad del epitelio, lo que respaldaría la idea de enfocarse en las células Th17 como un posible blanco terapéutico, ya que al inhibir estas células aún quedan disponibles otras fuentes de IL17, por lo que no se perderían sus funciones protectoras.

Si bien se ha demostrado que al inhibir las células Th17 se reduce la pérdida ósea alveolar de un 50 a un 70% (Dutzan y cols., 2018), lo cual implica a esta célula como una de los grandes responsables de la inmunopatología asociada a periodontitis y la ubica como un posible blanco terapéutico de esta enfermedad, es necesario explorar todos los posibles mecanismos mediante los cuales esta célula promueve o induce la pérdida ósea alveolar, para así poder comprender de forma más exacta la patogenia de la periodontitis. Nuestro estudio proporciona información importante con respecto a la relación entre las células Th17 y el microbioma gingival, y da pie a futuras investigaciones enfocadas en determinar cuáles son las respuestas proinflamatorias, producidas durante esta enfermedad, que influyen en el proceso de disbiosis bacteriana, además de dilucidar de forma más exacta cuáles son todos

los mecanismos por los cuales estas células cobran especial importancia durante la periodontitis. Esta información adquiere relevancia al hablar de posibles nuevas terapias para manejar esta enfermedad, ya que entregaría un tratamiento más efectivo y drástico, que impediría que exista un progreso del daño causado por esta patología, lo cual sin duda aumentaría la calidad de vida de la gran cantidad de individuos que padecen de periodontitis.

7) CONCLUSIONES:

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación, inferimos que las células Th17 no tendrían gran influencia en la disbiosis de las comunidades microbianas durante la periodontitis, aunque se debe señalar que hacen falta más estudios que analicen el comportamiento de estas comunidades al inhibir a las células Th17 en fases más tempranas y tardías a las que analizó este estudio.

Es necesario realizar nuevos estudios enfocados a entender los cambios tempranos en las comunidades microbianas y las respuestas proinflamatorias que podrían estar asociadas con los cambios disbióticos en las comunidades durante periodontitis, así como también evaluar cuales son los cambios que se producen en el microbioma subgingival en un tiempo más avanzado de la enfermedad al inhibir las células Th17.

En los últimos años se ha demostrado fehacientemente que el eje IL17/Th17 tiene una gran importancia en la periodontitis. Las células Th17 pasan a tener un rol protagónico clave en esta enfermedad, por lo mismo, la inhibición de los componentes de este eje y de las moléculas esenciales para su diferenciación prometen grandes resultados que cambiarían tanto el enfoque terapéutico actual como el pronóstico de la periodontitis.

8) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Abe, T., & Hajishengallis, G. (2013). Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *Journal of Immunological Methods*, 394(1–2), 49–54.

Abusleme, L., Dupuy, A. K., Dutzan, N., Silva, N., Burlison, J. A., Strausbaugh, L. D., y cols. (2013). The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *The ISME Journal*, 7(5), 1016–1025.

Abusleme, L. & Moutsopoulos, N. M. (2017). IL-17: overview and role in oral immunity and microbiome. *Oral Diseases* 23, 854-865.

Abusleme, L., Hong, B.-Y., Hoare, A., Konkell, J., Diaz, P., & Moutsopoulos, N. (2017). Oral Microbiome Characterization in Murine Models. *Bio-Protocol*, 7, 1–13.

Bartold, P. M. & Van Dyke, T. E. (2013). Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. *Unlearning learned concepts. Periodontology 2000*, 62, 203-217.

Behfarnia, P., Birang, R., Pishva, S. S., Hakemi, M. G., & Khorasani, M. M. (2013). Expression levels of th-2 and th-17 characteristic genes in healthy tissue versus periodontitis. *Journal of Dentistry of Tehran University of medical Sciences*, 10, 23–31.

Bunte, K., & Beikler, T. (2019). Th17 cells and the IL-23/IL-17 axis in the pathogenesis of periodontitis and immune-mediated inflammatory diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 3394.

Cardoso, C. R., Garlet, G. P., Crippa, G. E., Rosa, A. L., Junior, W. M., Rossi, M. A. & Silva, J. S. (2009). Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. *Oral Microbiology and Immunology* 24, 1-6.

Cardoso, E. M., Reis, C., & Manzanares-Céspedes, M. C. (2018). Chronic periodontitis, inflammatory cytokines, and interrelationship with other chronic diseases. *Postgraduate Medicine*, 130, 98–104.

Diaz P. I., Hoare, A, and Hong, B, P., (2016). Subgingival Microbiome Shifts and Community Dynamics in Periodontal Diseases. *California Dental Association*, 44, 421.

Doherty, M. K., Ding, T., Koumpouras, C., Telesco, S. E., Monast, C., y cols. (2018). Fecal microbiota signatures are associated with response to ustekinumab therapy among crohn's disease patients. *mBio*, 9, 1–13.

Dutzan, N., Abusleme, L., Bridgeman, H., Greenwell-Wild, T., Zangerle-Murray, T., Fife, y cols. (2017). On-going Mechanical Damage from Mastication Drives Homeostatic Th17 Cell Responses at the Oral Barrier. *Immunity*, 46, 133–147.

Dutzan, N., E. Konkell, J., Greenwell-Wild, T., and N. M. M. (2016). Characterization of the human immune cell network at the gingival barrier. *Mucosal Immunology*, 9, 1163-1172.

Dutzan, N., Kajikawa, T., Abusleme, L., Greenwell-Wild, T., Zuazo, C. E., y cols. (2018). A

dysbiotic microbiome triggers TH17 cells to mediate oral mucosal immunopathology in mice and humans. *Science Translational Medicine*, 10, 463.

Eke, B. A. Dye, L. Wei, G. D. Slade, G. O. Thornton-Evans, W. S. Borgnakke, G. W. y cols. (2015). Update on prevalence of periodontitis in adults in the United States: NHANES 2009 to 2012. *Journal of Periodontology*, 86, 611–622.

Eskan, M. A., Jotwani, R., Abe, T., Chmelar, J., Lim, J. H. y cols. (2012). The leukocyte integrin antagonist Del-1 inhibits IL-17-mediated inflammatory bone loss. *Nature Immunology*, 13, 465-473.

Gaffen, S. L., & Moutsopoulos, N. M. (2020). Regulation of host-microbe interactions at oral mucosal barriers by type 17 immunity. *Science Immunology*, 5, 43.

Gaffen, S. L., Jain, R., Garg, A. V. & Cua, D. J. (2014). The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nature Reviews Immunology*, 14, 585-600.

Gamonal, J., Mendoza, C., Espinoza, I., Muñoz, A., Urzúa, I., y cols. (2010). Clinical Attachment Loss in Chilean Adult Population: First Chilean National Dental Examination Survey. *Journal of Periodontology*, 81, 1403–1410.

Griffen, A. L., Beall, C. J., Campbell, J. H., Firestone, N. D., Kumar, P. S., y cols. (2012). Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *The ISME Journal*, 6, 1176-1185.

Hernández, M., Dutzan, N., García-Sesnich, J., Abusleme, L. , y cols. (2011). Host-pathogen interactions in progressive chronic periodontitis. *Journal of Dental Research*, 90, 1164-1170.

Ivanov I. I., Llanos R. F., Manel N., Yoshinaga K., Rifkin D., y cols. (2008). Specific microbiota direct the differentiation of Th17 cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host & Microbe*, 4, 337–349.

Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B. Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., y cols. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, 10(1), 1–11.

Kitamoto, S., Nagao-Kitamoto, H., Jiao, Y., Gilliland, M. G., Hayashi, A., y cols. (2020). The Intermucosal Connection between the Mouth and Gut in Commensal Pathobiont-Driven Colitis. *Cell*, 182, 447-462.

Kornman, K. S. (2008). Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. *Journal Periodontology*, 79, 1560-1568.

Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K. & Schloss, P. D. (2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 5112-5120.

Kumar P., Monin L., Castillo P., Elsegeiny W., Horne W. y cols. (2016). Intestinal interleukin-17 receptor signaling mediates reciprocal control of the gut microbiota and autoimmune

inflammation. *Immunity*, 44(3), 659–671.

Loesche, M. A., Farahi, K., Capone, K., Fakharzadeh, S., Blauvelt, A., y cols. (2018). Longitudinal Study of the Psoriasis-Associated Skin Microbiome during Therapy with Ustekinumab in a Randomized Phase 3b Clinical Trial. *Journal of Investigative Dermatology*, 138(9), 1973–1981.

Loos, B. G., & Van Dyke, T. E. (2020). The role of inflammation and genetics in periodontal disease. *Periodontology 2000*, 83, 26–39.

Luo, A., Leach, S. T., Barres, R., Hesson, L. B., Grimm, M. C., & Simar, D. (2017). The microbiota and epigenetic regulation of T helper 17/regulatory T cells: In search of a balanced immune system. *Frontiers in Immunology*, 8, 417.

Marsh, P. D. (2003). Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology Society*, 149, 279-294.

Moutsopoulos, N. M., Konkel, J., Sarmadi, M., Eskin, M. A., Wild, T., y cols. (2014). Defective neutrophil recruitment in leukocyte adhesion deficiency type I disease causes local IL-17-driven inflammatory bone loss. *Science Translational Medicine*, 6(229):229ra40.

Moutsopoulos, N. M., Chalmers, N. I., Barb, J. J., Abusleme, L., Greenwell-Wild, y cols. (2015). Subgingival microbial communities in Leukocyte Adhesion Deficiency and their relationship with local immunopathology. *Plos Pathogens*, 11(3):e1004698.

Pan, W., Wang, Q., & Chen, Q. (2019). The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis. *International Journal of Oral Science*, 11(3):30.

Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4:e2584.

Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., y cols. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied Environmental Microbiology*, 75(23):7537-41.

Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., y cols. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*, 12, R60.

Shaker Olfat G. and Ghallab Noha A. (2012). IL-17 and IL-11 GCF Levels in Aggressive and Chronic Periodontitis Patients: Relation to PCR Bacterial Detection. *Mediators of Inflammation*, Article ID 174764.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr RL. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, 25, 134–144.

Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (2005). Periodontal microbial ecology. *Periodontology 2000*, 38, 135-187.

- Tonetti, M. S., Jepsen, S., Jin, L., & Otomo-Corgel, J. (2017). Impact of the global burden of periodontal diseases on health, nutrition and wellbeing of mankind: A call for global action. *Journal of Clinical Periodontology*, 44(5), 456–462.
- Tsukasaki M, Komatsu, N., Nagashima, K., Nitta, T., Pluemsakunthai, W., y cols. (2018). Host defense against oral microbiota by bone-damaging T cells. *Nature Communication*, 9, 701.
- Wang, N. Xia, D. (2019). Activation of local innate immune signal induces periodontitis in microbiota-dependent manner. *FEMS Microbiology Letters*, 366, 12.
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M. & Cole, J. R. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied Environmental Microbiology*, 73, 5261-5267.
- Watts, G. S., Youens-Clark, K., Slepian, M. J., Wolk, D. M., y cols. (2017). 16S rRNA gene sequencing on a benchtop sequencer: accuracy for identification of clinically important bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 123(6), 1584–1596.
- Wei, Y., Shi, M., Zhen, M., Wang, C., Hu, y cols. (2019). Comparison of subgingival and buccal mucosa microbiome in chronic and aggressive periodontitis: A pilot study. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 1–11.
- Xiao, E., Mattos, M., Vieira, G. H. A., Chen, S., y cols. (2017). Diabetes Enhances IL-17 Expression and Alters the Oral Microbiome to Increase Its Pathogenicity. *Cell Host & Microbe* 22, 120-128.
- Yeh, N. L., Hsu, C. Y., Tsai, T. F., & Chiu, H. Y. (2019). Gut Microbiome in Psoriasis is Perturbed Differently During Secukinumab and Ustekinumab Therapy and Associated with Response to Treatment. *Clinical Drug Investigation*, 39, 1195–1203.
- Zhu, J., Yamane, H., & Paul, W. E. (2010). Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annual Review of Immunology*, 28, 445–489.

9) ANEXOS Y APÉNDICES:



N° 018/FONDECYT/518



Santiago, 30 de Octubre del 2018
Ref.: Proyecto N° 11180505

Señora
LORETO ABUSLEME RAMOS

Estimada señora ABUSLEME:

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 4,300 puntos, ubicándose en el lugar N° 5 del Grupo de Estudio de MEDICINA G2-G3 - CS. CLÍNICAS Y CS. DE LA SALUD PÚBLICA. En este Grupo concursaron 54 proyectos, se evaluaron 45 y aprobaron 14 (25,9%). La calificación del último proyecto financiado en este Grupo fue de 4,030 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(a) 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