



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

**“ACTIVACIÓN DE STAT3 EN CÉLULAS INMUNES DE TEJIDOS
GINGIVALES HUMANOS”**

Javiera Alejandra Olivos Peralta

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

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Nicolás Raúl Dutzan Muñoz

TUTORES ASOCIADOS

Dra. Loreto Andrea Abusleme Ramos

Dra. Marion Elizabeth Arce Paniagua

Adscrito a Proyecto FONDECYT Iniciación 11180389

Santiago – Chile

2021



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLÓGÍA CONSERVADORA
ÁREA DE PERIODONCIA
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL
CRANEOFACIAL
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA ORAL

“ACTIVACIÓN DE STAT3 EN CÉLULAS INMUNES DE TEJIDOS GINGIVALES HUMANOS”

Javiera Alejandra Olivos Peralta

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Nicolás Raúl Dutzan Muñoz

TUTORES ASOCIADOS

Dra. Loreto Andrea Abusleme Ramos

Dra. Marion Elizabeth Arce Paniagua

Adscrito a Proyecto FONDECYT Iniciación 11180389

Santiago – Chile

2021

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores, Nicolás Dutzan, Marion Arce y Loreto Abusleme, quienes me entregaron todas las herramientas para poder llevar a cabo este trabajo, por su paciencia, tiempo y disponibilidad para aclarar cualquier duda. Al grupo del laboratorio, por entusiasmarme y acercarme a la investigación.

A mi familia, gracias a ellos soy la mujer que soy hoy, especialmente a mis papás, por su cariño y apoyo hasta en los peores momentos, gracias a ellos y a mis hermanos, por ayudarme a superar cada adversidad y por celebrar cada uno de mis logros. A mis tatas, Arturo y Guacolda, por ser mi fuente de inspiración y un modelo a seguir de unidad y amor.

A Nicolás, mi compañero de viaje, por su amor, su confianza, su contención y por ser mi pilar en buenas y malas. A su familia, que también fue parte de esta etapa, por abrirme sus puertas y darme el cariño como una más de la familia.

A mis amigas y amigos, por acompañarme en este camino. En especial a Marcela, Paula, Isidora, Victoria y María Ignacia, gracias a ellas hoy puedo ser más fuerte.

A la Universidad de Chile, sus docentes y funcionarios, por formarme como profesional y como persona.

A las mujeres poderosas, a las organizaciones feministas, a la DIGEN de la Universidad y a todos los que fueron parte de este difícil último año, gracias por creer en mi y lograr que yo crea en mi misma.

Gracias a ustedes hoy puedo estar terminando esta etapa.

Este es el comienzo de un nuevo camino, procuraré construir un lugar más seguro para las mujeres y un país más justo para todos.

"Dame Señor, la perseverancia de las olas del mar, que hacen de cada retroceso un punto de partida para un nuevo avance" – Gabriela Mistral

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN	7
2. INTRODUCCIÓN.....	8
3. MARCO TEÓRICO	9
3.1 Importancia de la periodontitis, prevalencia y consecuencias a nivel mundial	9
3.2 Patogénesis de la periodontitis	10
3.3 STAT3 y su rol en la diferenciación de linfocitos Th17	12
3.4 Participación de STAT3 en el sistema inmune	14
3.5 Participación de STAT3 en diferentes tejidos del organismo.....	15
3.6 Marcadores hematopoyéticos CD45 en periodontitis	17
3.7 STAT3 y periodontitis	18
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	20
5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	21
6. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	21
7. METODOLOGÍA.	22
7.1 Diseño del estudio.....	22
7.2 Selección de voluntarios	22
7.3 Obtención de las muestras.....	24
7.4 Protocolo Inmunofluorescencia	24
7.5 Análisis de Inmunofluorescencia.....	26
7.6 Análisis estadístico.....	27
7.7 Determinación de la muestra	28
8. RESULTADOS.....	29
8.1 Caracterización de la muestra.....	29
8.2 Análisis de células inmunes CD45 ⁺ en tejidos gingivales humanos	31
8.3 Análisis de células con activación de STAT3 (pSTAT3 ⁺) en los tejidos gingivales humanos.....	34
8.4 Análisis de pSTAT3 ⁺ en células inmunes CD45 ⁺ de tejidos gingivales humanos.....	37
9. DISCUSIÓN	43
9.1 Identificación de células inmunes y no inmunes en tejidos gingivales sanos y con periodontitis.	43
9.2 Identificación de células que presentan activación de STAT3 en tejidos gingivales sanos y con periodontitis.....	45

9.3 Identificación de células inmunes y no inmunes que presentan activación de STAT3 en tejidos gingivales sanos y con periodontitis.	46
10. CONCLUSIÓN	50
11. RERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	51
11. ANEXOS	62

1. RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La periodontitis es una enfermedad crónica inflamatoria, altamente prevalente y una de las principales causas de pérdida de dientes en la población. Se inicia por cambios ecológicos en la biopelícula sub-gingival los que inducen un desbalance de la respuesta inmune, conllevando a la destrucción de los tejidos que soportan los dientes. Se ha demostrado que linfocitos Th17 cumplen un papel importante en la inmunopatogenia de la periodontitis, y para su diferenciación el transductor de señal y factor de transcripción 3 (STAT3) juega un rol fundamental. La activación de STAT3 (pSTAT3) durante periodontitis en tejidos humanos ha sido recientemente descrita por nuestro grupo de investigación, pero se desconoce los subtipos celulares que la activan en tejidos periodontales humanos. El objetivo del estudio fue determinar la activación de STAT3 en células inmunes (CD45⁺) y no inmunes (CD45⁻) de tejidos gingivales humanos sanos y durante periodontitis.

METODOLOGÍA: Se obtuvieron muestras de tejido gingival de 18 voluntarios (nueve sanos y nueve con periodontitis). Se evaluó la presencia células inmunes y la de pSTAT3 mediante la técnica de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti-pSTAT3 y anti-CD45. Las células inmuno-positivas se contaron usando el software CellProfiler™. Los datos se analizaron mediante el software Prism 9.3. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con un valor de $p < 0,05$. Los datos se mostraron utilizando la media \pm error estándar de la media (SEM).

RESULTADOS: Al comparar tejidos gingivales de individuos con periodontitis y sanos observamos un aumento del porcentaje de células inmunes, así como de células positivas para pSTAT3 en lesiones periodontales. Por otro lado, las células no inmunes con activación de pSTAT3 se observaron en mayor porcentaje en tejidos sanos ($89,7\% \pm 13,2\%$ sanos y $69,7\% \pm 22,2\%$ periodontitis). Se observó un aumento de la proporción de células doble-positivas para CD45 y pSTAT3 durante periodontitis ($39,3\% \pm 22,2\%$ periodontitis y $10,3\% \pm 13,2\%$ sanos).

CONCLUSIONES: STAT3 se encuentra activado en células inmunes y no inmunes del tejido gingival de individuos sanos y con diagnóstico de periodontitis. Se observa un aumento en la activación de pSTAT3 en células inmunes durante periodontitis al compararlos con tejidos sanos.

PALABRAS CLAVES: Periodontitis, células CD45, STAT3.

FINANCIAMIENTO: FONDECYT iniciación 11180389

2. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades orales son altamente prevalentes a nivel mundial, causando un importante problema de salud pública. Dentro de estas enfermedades las más prevalentes son la caries dental y la enfermedad periodontal (Peres y cols., 2019). Por su parte, la periodontitis corresponde a una enfermedad crónica inflamatoria, en donde se produce una respuesta inmune exacerbada ante cambios en la diversidad y estructura de la microbiota subgingival, causando la destrucción de las estructuras de soporte de los dientes (Abusleme y cols., 2013; Chapple, 2014).

El conocimiento respecto a la regulación de los mecanismos inmunes y las respuestas inflamatorias es fundamental para comprender la patogenia de enfermedades como la periodontitis, lo cual ha sido clave para mejorar las estrategias de manejo de esta patología. El tratamiento de la periodontitis se ha centrado principalmente en el control de la biopelícula bacteriana que se acumula entre la encía y el diente. Sin embargo, este enfoque no es siempre exitoso, dentro de los pacientes con periodontitis severa, existe un 20%-25% que no responde al tratamiento y la enfermedad continúa con la progresando luego de éste (Kornman, 2018).

Debido a lo planteado, es que se han propuesto tratamientos complementarios al tratamiento convencional, centrándose en la respuesta inmune e inflamatoria del hospedero (Hajishengallis, 2014). Dentro de los diferentes subtipos de células inmunes presentes en el tejido gingival, las células Th17 fueron descritas como claves en los procesos destructivos que ocurren durante la periodontitis (Dutzan y cols., 2018). Para que estos linfocitos Th17 se diferencien es fundamental la activación del transductor de señal y activador de transcripción (STAT3). A pesar de la importancia de esta proteína, existe un vacío en el conocimiento sobre qué tipo de células activa STAT3 (pSTAT3) en los tejidos periodontales humanos. Por lo tanto, este estudio tiene como objetivo evaluar la activación de STAT3 en células hematopoyéticas (CD45⁺) en tejidos gingivales de sujetos sanos y con periodontitis.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Importancia de la periodontitis, prevalencia y consecuencias a nivel mundial.

La periodontitis es una condición inflamatoria crónica multifactorial asociada a una disbiosis en la biopelícula oral (Papapanou y cols., 2018), que afecta a los tejidos que rodean y soportan los dientes (Chapple, 2014). Se caracteriza por la destrucción progresiva de los tejidos periodontales, incluido el hueso alveolar, lo que podría conllevar a la pérdida dentaria, comprometiendo la calidad de vida de los individuos que la padecen (Tonetti y cols., 2017).

La periodontitis se encuentra como la sexta condición de salud más prevalente, afectando al 10,8% de la población a nivel mundial (743 millones de personas) (Peres y cols., 2019). En Latinoamérica, las enfermedades periodontales son altamente prevalentes desde la adolescencia. Estudios epidemiológicos afirman que el 59,3% de los adolescentes entre 15 a 18 años presentan signos de destrucción de los tejidos periodontales que rodean a los dientes (Morales y cols., 2015). En Chile, se ha determinado que un 93,45% de los adultos jóvenes y un 97,58% de las personas mayores presentan signos de destrucción periodontal (Gamonal y cols., 2010). La periodontitis y sus secuelas son un problema de salud pública que causan un impacto socioeconómico negativo y disminuyen la calidad de vida de los sujetos afectados (Peres y cols., 2019; Tonetti y cols., 2017).

Se ha evidenciado que la periodontitis interacciona con otras enfermedades sistémicas debido a la diseminación de bacterias y sus productos originados en el microbioma subgingival del periodonto inflamado. Así, la periodontitis puede contribuir a la patogénesis de otras enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT), tales como, diabetes, aterosclerosis, artritis reumatoide, enfermedades pulmonares (Tonetti y cols., 2017), y puede aumentar el riesgo de eventos adversos asociados al embarazo y cáncer (Hajishengallis, 2015). Se ha determinado que un correcto control y tratamiento de la periodontitis produce una reducción de la inflamación y un mejor control de enfermedades sistémicas asociadas (Hajishengallis, 2015; Pihlstrom y cols., 2005).

3.2 Patogénesis de la periodontitis

La periodontitis es una condición de compleja etiología, los cambios disbióticos producen un desbalance en la respuesta inmune del hospedero, siendo esta respuesta parte fundamental del daño observado en esta patología (Silva y cols., 2015). La destrucción de los tejidos periodontales está mediada por el sistema inmune del hospedero (Kornman y cols., 1997). Durante la progresión de la periodontitis, la respuesta inmune actúa como una red compleja altamente regulada por células y moléculas (citoquinas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión y sus ligandos) (Hajishengallis, 2015).

El sistema inmune se activa cuando patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) del periodonto (Kinane y cols., 2011). Tras este reconocimiento inicial mediado por células del sistema inmune innato, se desencadena una reacción inflamatoria. Esta reacción de protección provoca el aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos y la migración de diferentes células inmunes al tejido, como leucocitos polimorfonucleares, monocitos y linfocitos, además de la liberación de citoquinas proinflamatorias (Figura 1) (Bascones y González Moles, 2003; Kinane y cols., 2011).

Las citoquinas son mediadores clave en la enfermedad periodontal, su mecanismo consiste en unirse a receptores específicos iniciando una cascada de señalización intracelular que genera cambios celulares (Birkedal-Hansen, 1993). Estas cascadas de señalización generan la activación y migración de células inmunes como los neutrófilos, los cuáles liberan enzimas como colagenasas y proteasas capaces de dañar los tejidos del hospedero (Kinane y cols., 2011).

Las citoquinas participan en la activación y regulación del sistema inmune mediando la diferenciación de las células T colaboradoras CD4⁺ (linfocitos T CD4⁺) (Kinane y cols., 2011). Dentro de estas células inmunes, los linfocitos T CD4⁺ han sido descritos como un importante componente del infiltrado inflamatorio en periodontitis, teniendo un rol esencial en la destrucción de los tejidos periodontales (Baker y cols., 1999; Dutzan y cols., 2016).

Los linfocitos T CD4⁺ pueden diferenciarse en los subconjuntos de linfocitos T colaboradores efectores (Th) como lo son Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, células T

auxiliares foliculares (Tfh) o T reguladores (Tregs) (Silva y cols., 2015). Cada uno de estos subtipos celulares se caracteriza por la secreción de diferentes clases de citoquinas que modulan la respuesta inmune (Kane y cols., 2014) El subconjunto de linfocitos Th17 se ha descrito como mediador clave de la inmunidad de barrera de las mucosas orales, participando en la vigilancia inmune contra bacterias y hongos (Kinane y cols., 2011)

En enfermedad periodontal, se ha demostrado que los linfocitos Th17 cumplen un papel fundamental en la inmunopatogenia de la periodontitis, siendo un factor clave en la destrucción de tejidos periodontales incluyendo la pérdida del hueso alveolar y otros tejidos de inserción (Dutzan y cols., 2018). Este rol de los linfocitos Th17 en la patogénesis de la periodontitis se debe en gran parte a la producción descontrolada de interleuquina 17A (IL-17A) (Abusleme y Moutsopoulos, 2017; Dutzan y cols., 2017).

La IL-17A se considera una molécula clave en la patogénesis de la periodontitis. Aunque tiene una capacidad limitada para inducir inflamación directamente, podría ejercer poderosos efectos inflamatorios a través de actividades sinérgicas con otros factores inflamatorios como interleuquina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) (Cheng y cols., 2014; Huang y cols., 2021). La IL-17A actúa sobre fibroblastos, células epiteliales y endoteliales para promover la expresión de diferentes citoquinas proinflamatorias (Park y cols., 2005), y participa en la destrucción del tejido periodontal y del hueso alveolar indirectamente a través del reclutamiento de neutrófilos y activación de osteoclastos (Dutzan y Abusleme, 2019). IL-17A induce la producción de metaloproteasas de matriz (MMPs) y del ligando activador del receptor NF- κ B (RANKL) el cual tiene un papel fundamental en la destrucción del hueso alveolar ya que la unión de RANKL a su receptor funcional NF- κ B receptor activador (RANK) promueve la maduración y activación de los osteoclastos (Dutzan y Abusleme, 2019; Shen y Gaffen, 2008).

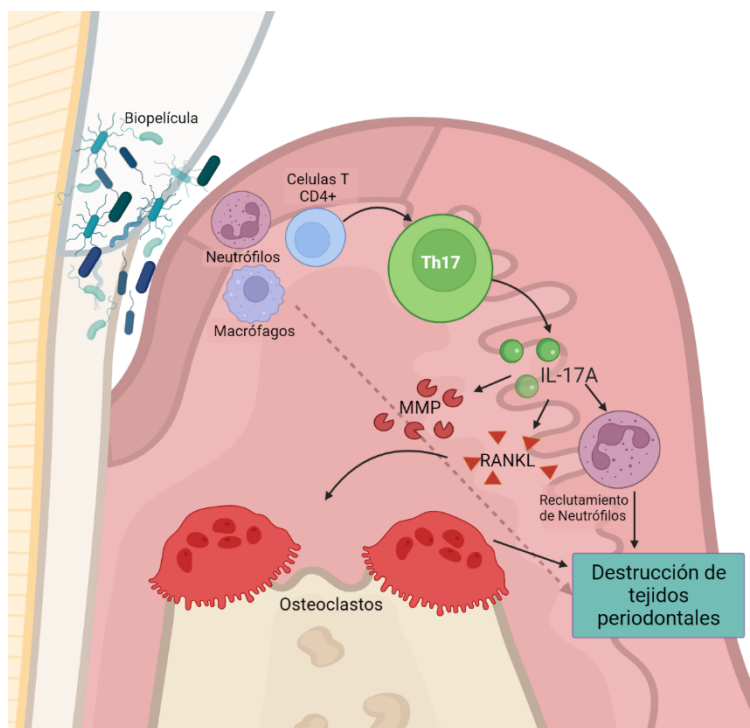


Figura 1: Patogénesis enfermedad periodontal. Comprensión actual del papel de las células Th17 en la inmunopatología de la periodontitis, a través de su citoquina efectora IL-17A. Los periodontopatógenos son reconocidos por células del sistema inmune. Por otra parte, los linfocitos T CD4⁺ han sido descritos como un importante componente del infiltrado inflamatorio en periodontitis; IL-17A, principal citoquina efectora producida por Th17, ayuda a la destrucción del tejido periodontal a través del reclutamiento de neutrófilos, y colabora en el aumento de RANKL y MMP, las cuales participan en las osteoclastogénesis (Imagen adaptada de Dutzan y Abusleme, 2019. Realizada en BioRender, <http://www.biorender.com>).

3.3 STAT3 y su rol en la diferenciación de linfocitos Th17

Los linfocitos Th17 necesitan para su diferenciación la participación de citoquinas específicas como factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), Interleuquina 6 (IL-6), Interleuquina 1 (IL-1) e Interleuquina 21 (IL-21). Además, la Interleuquina 23 (IL-23) es necesaria para la expansión y supervivencia de este tipo de células (Hajishengallis, 2014). Una de las vías de señalización más importante para IL-6, IL-21 e IL-23 es la vía de señalización llamada “JAK-STAT”. Se ha descrito que esta vía de señalización es una de las más directas en transducir las señales que comienzan en la superficie celular y que terminan en la transcripción génica (Alberts y cols., 2014). Esta vía de señalización utiliza receptores de membrana que están acoplados a enzimas. Los receptores son proteínas transmembrana que tienen un solo segmento que atraviesa la membrana, su dominio de unión a ligando se sitúa en la superficie externa de la membrana plasmática y su dominio citosólico se encuentra unido a una enzima JAK (Alberts y cols., 2014). Las janus quinasas (JAK)

son conocidas como la familia de tirosina-quinazas y el acrónimo STAT proviene del inglés “Signal Transducer and Activator of Transcription”. Las proteínas STAT son sustratos de las quinazas JAK. Ambas proteínas han sido estudiadas ampliamente en procesos inflamatorios y de desarrollo, diferenciación, proliferación, transformación celular y oncogénesis (Vogel y cols., 2015). Cuatro quinazas JAKs (JAK1, JAK2, JAK3, Tyk2) y siete factores STATs (STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b, 6) han sido identificados (Kane y cols., 2014; O’Shea y cols., 2013). Se ha observado en estudios de modelos de periodontitis experimental la activación de STAT3 y STAT5 (De Souza y cols., 2011).

Por lo tanto, citoquinas como IL-6, IL-21 e IL-23, se unen con su receptor específico, activando las quinazas JAK1, JAK2 o Tyk2. Estas enzimas fosforilan un residuo de tirosina (Tyr705) en STAT3, activándolo (Kane y cols., 2014). Al estar activado, STAT3 se dimeriza gracias a las interacciones recíprocas de los dominios Src 2 (SH2), para ser transportada al núcleo y así estimular la transcripción de genes específicos que van a producir efectos potenciadores o inhibitorios en las células y generar cambios estructurales en la cromatina (Figura 2) (Levy y Lee, 2002; O’Shea y cols., 2015).

STAT3 juega un rol fundamental en la generación de células Th17 promoviendo la expresión de genes como los factores de transcripción ROR γ t y ROR α , y a su vez promover la producción de citoquinas efectoras IL-17A, IL-17F e IL-21 (Kane y cols., 2014). La evidencia señala que células Th17 no se diferencian cuando se inhibe la vía STAT3 en los linfocitos T CD4⁺, por lo que esta vía es indispensable para su existencia (Harris y cols., 2007).

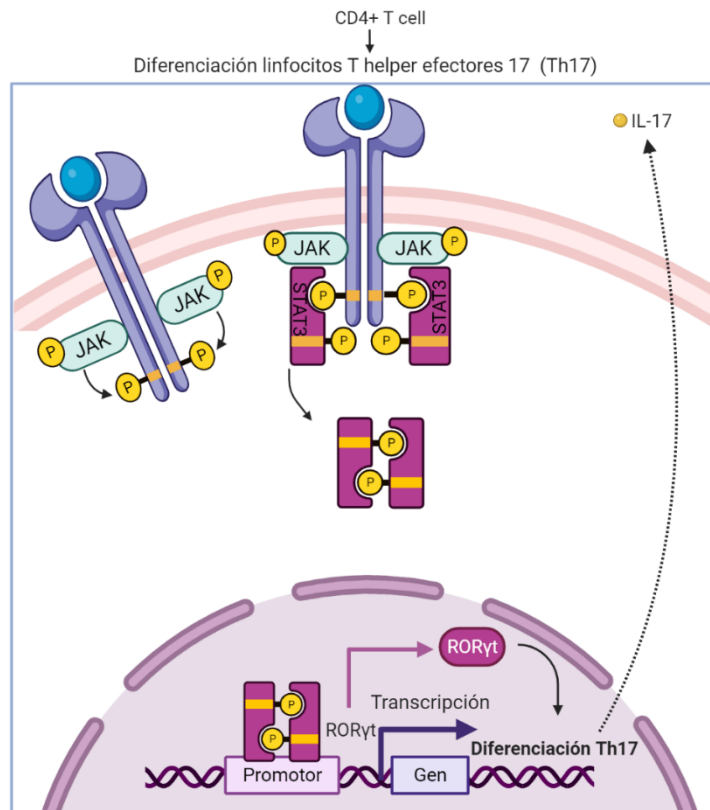


Figura 2: Representación esquemática de la activación de la vía STAT3 en linfocitos Th17. Citoquinas estimuladoras como IL-6 se unen a su receptor de membrana activando las quinasas JAK (JAK1, JAK2 y/o TYK2), quien a su vez fosforila a STAT3, que forma dímeros que se translocan al núcleo celular para activar la traducción de genes clave para diferenciación de linfocitos Th17 y promover la producción de citoquinas efectoras como IL-17. (Realizada en BioRender, <http://www.biorender.com>).

3.4 Participación de STAT3 en el sistema inmune

STAT3 ha sido reconocido como factor de transcripción crítico para diversos procesos celulares (Levy y Lee, 2002; Vogel y cols., 2015), siendo este factor de vital importancia para la proliferación, supervivencia y motilidad celular (Stark y Darnell, 2012). Además, existen varias funciones no nucleares cuando STAT3 no está fosforilado, particularmente en las mitocondrias, promoviendo la fosforilación oxidativa y la permeabilidad de la membrana (O'Shea y cols., 2015).

Los datos hasta la fecha implican funciones para STAT3 en la activación de la inmunidad adaptativa mediada por células B, y otras funciones estimulantes e inhibitoras de la inmunidad innata (Hillmer y cols., 2016). Además, STAT3 juega un papel fundamental en la supresión fisiológica de las funciones de macrófagos y neutrófilos (Takeda y cols., 1999). Varias líneas de investigación sugieren que se requiere STAT3 para los efectos antiinflamatorios de IL-10 en las células mieloides,

incluidos macrófagos y células dendríticas (Williams y cols., 2004). El mecanismo más obvio sugiere que actuaría como factor de transcripción, pero estudios en líneas celulares de macrófagos murinos obtuvieron datos contradictorios sobre el papel de STAT3 (Riley y cols., 1999). Estudios han afirmado la participación fundamental de la proteína supresora de señalización de citoquinas 3 (SOCS3), la cual inhibe la acción de STAT3 para la actividad antiinflamatoria de IL-10. Por lo tanto, IL-10 induce rápidamente la expresión de la proteína SOCS3 en macrófagos humanos y que esta expresión requiere necesariamente de STAT3 (Williams y cols., 2004).

Por otra parte, STAT3 controla las respuestas inflamatorias impulsadas por neutrófilos mediante efectos directos sobre la granulopoyesis y mediante la regulación del linaje Th17 (Hillmer y cols., 2016), elemento crítico para la defensa del hospedero frente a bacterias y hongos, también involucradas en enfermedades inflamatorias y autoinmunes (Gaffen, 2009). Principalmente por su citoquina característica, la IL-17A, que estimula la producción de efectores inmunes como péptidos antimicrobianos, quimiocinas y citoquinas granulopoyéticas (Gaffen, 2011).

3.5 Participación de STAT3 en diferentes tejidos del organismo

Se han descrito diversas funciones de STAT3 en tejidos del organismo, como por ejemplo en piel, epitelio, adipocitos, timo, glándula mamaria, mioblastos, motoneuronas del sistema nervioso, osteoblastos, osteoclastos e inducción de la respuesta inflamatoria de fase aguda (Levy y Lee, 2002).

En células epiteliales, STAT3 es activado por un gran número de factores de crecimiento, incluidos los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina (IGFR), el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFR), receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF) y la leptina (PN) (Wang y cols., 2018). En esa misma línea, se ha demostrado que la activación de STAT3 es fundamental en la diferenciación de queratinocitos del epitelio escamoso estratificado humano (Wu y cols., 2003).

El rol de STAT3 en procesos fisiológicos del ser humano ha sido explicado gracias al descubrimiento de pacientes con mutaciones en STAT3 que llevan a la pérdida de su función (Vogel y cols., 2015). Estos sujetos presentan una rara inmunodeficiencia congénita conocida como Síndrome autosómico dominante de hiperinmunoglobulinemia E (AD-HIES) (Holland y cols., 2007), el cual se caracteriza por infecciones bacterianas recurrentes, cutáneas y pulmonares graves, dermatitis crónicas, IgE elevada en suero y anomalías del tejido conectivo (Steward-Tharp y cols., 2014). La pérdida de función de STAT3 conlleva a una alteración en la permeabilidad vascular, debido a que la respuesta inflamatoria de los pacientes con AD-HIES se reduce notablemente (Hox y cols., 2016). Particularmente, los pacientes AD-HIES experimentan un dramático defecto en la respuesta de Th17, debido a una reducción en la función de IL-6 e IL-23 (Milner y cols., 2008). Se ha evidenciado en estos pacientes diversas lesiones epiteliales en mucosa oral, lengua, paladar y encía, manifestadas como fisuras superficiales, estrías o zonas fibróticas, además de infecciones oportunistas como candidiasis oral debido a la ausencia de células Th17, por otro lado, curiosamente estas personas evidencian signos clínicos de inflamación y destrucción periodontal disminuidos, en comparación con la población sana (Dutzan y cols., 2018; Freeman y cols., 2009).

Recientemente, la literatura ha documentado de manera sólida que STAT3 es un mediador crucial de la carcinogénesis a través de la inmunosupresión asociada a tumores (Wang y cols., 2018). STAT3 es esencial para modular el medio tumoral, como las células estromales e inmunes, para promover la progresión del tumor. Está bien establecido que STAT3 se activa constitutivamente en muchos cánceres humanos (Darnell, 2005), y es una vía intrínseca importante que participa en la proliferación, invasión, angiogénesis y metástasis del cáncer humano (Wang y cols., 2018).

Si bien las funciones de STAT3 son ampliamente reconocidas en el sistema inmunológico, carecemos de información sobre qué poblaciones menos abundantes regulan STAT3, como los linfocitos inmunes innatos u otros subconjuntos granulocíticos, y cómo lo hacen. Recientemente, STAT3 se vinculó con la degranulación de los mastocitos y la protección contra las enfermedades alérgicas

(Siegel y cols., 2013), lo que implica actividades adicionales por descubrir. Será importante su estudio a la luz del desarrollo de inhibidores de STAT3 para uso clínico (Hillmer y cols., 2016).

3.6 Marcadores hematopoyéticos CD45 en periodontitis

El marcador CD45 es una glicoproteína transmembrana, conocido también como antígeno común leucocitario (Woudstra y cols., 2016). La utilidad en la tipificación celular a través del antígeno CD45 se basa en que es una proteína expresada de manera constitutiva en todas las células hematopoyéticas, que incrementa su densidad en los estadios finales de la hematopoyesis en los diferentes linajes celulares leucocitarios y permanece de manera estable en células maduras (Collino y cols., 2006).

Las enfermedades periodontales son procesos inflamatorios caracterizados por una densa acumulación de células inmunes, que incluyen neutrófilos polimorfonucleares, linfocitos T y B, células plasmáticas, mastocitos, monocitos y macrófagos (Silva y cols., 2015). Durante la enfermedad periodontal, la infiltración de células inflamatorias en los tejidos gingivales está bien documentada, caracterizada por la expresión de antígenos específicos que permiten a los investigadores realizar estudios cuantitativos. Se ha demostrado que, ya durante gingivitis, existe un infiltrado linfocitario presente desde etapas iniciales de la inflamación gingival, es decir, independientemente de la etapa del proceso inflamatorio, los linfocitos fueron siempre el tipo celular predominante (Seymour y cols., 1983).

Particularmente, durante periodontitis, existe una correlación significativa entre la pérdida de colágeno gingival, importante para el avance de la enfermedad periodontal, con un aumento en el número de células inflamatorias CD45⁺ (Séguier y cols., 2000). Durante el desarrollo de la periodontitis, se ha observado la presencia de grandes proporciones de células inflamatorias que juegan un papel crucial en la degradación de la matriz extracelular gingival. Se ha demostrado que las células que más se correlacionaron con las lesiones periodontales inflamatorias fueron las relacionadas con el antígeno común leucocitario CD45⁺ (Younes y cols., 2009).

3.7 STAT3 y periodontitis

Como se ha mencionado anteriormente, la vía de señalización STAT3 es fundamental para la diferenciación de las células Th17, importantes en la inmunopatología de la periodontitis (Abusleme y Moutsopoulos, 2017; Dutzan y cols., 2018).

Estudios disponibles actualmente en la literatura que relacionan a STAT3 en la patogenicidad de la periodontitis, provienen de la experimentación con animales. Es decir, los efectos de la vía STAT3 en periodontitis se han estudiado únicamente en modelos murinos. En el año 2009, García de Aquino y colaboradores, utilizaron dos modelos experimentales, ligadura e inoculación de patógenos, observando que STAT3 y STAT5 estaban activados de manera aumentada y preferencial en el modelo de la ligadura (García de Aquino y cols., 2009).

Moffat y colaboradores el 2011, evaluaron la participación de *Porphyromonas gingivalis*, bacteria periodontopatógena, concluyendo que este patobionte es capaz de disminuir la expresión de SOCS3 llevando así a un aumento de STAT3 (Moffatt y cols., 2011). La investigación de Chaves de Souza y colaboradores el 2011, prueba un aumento de IL-10 al cabo de 30 días de inducir periodontitis, además de esto, observaron una disminución de SOCS1 (inhibidora de STAT1) y SOCS3 (inhibidora de STAT3) luego del día 7 de estudio, esto era acompañado de un aumento de resorción ósea y el estado inflamatorio (De Souza y cols., 2011). Así, en modelos de ratón con inhibición de SOCS3 se observó mayor número de osteoclastos y pérdida de hueso alveolar, entendiendo así que SOCS3 inhibe la pérdida de hueso alveolar en periodontitis. Posteriormente, Papathanasiou y colaboradores, el 2016 observaron que la disminución de la expresión de SOCS3 (y por lo tanto un aumento de la activación de STAT3) resultaba en un aumento de osteoclastos a nivel alveolar (Papathanasiou y cols., 2016).

Además, en modelos *in vitro* se evidenció que la activación de STAT3 es necesaria para la diferenciación de los linfocitos B a plasmocitos (Deenick y cols., 2013). Estos linfocitos B, tienen un rol importante en etapas avanzadas de enfermedad periodontal, siendo parte también del infiltrando inflamatorio que invade el tejido conectivo gingival (Kurgan y Kantarci, 2018).

Dentro de los estudios clínicos en humanos, solo existen datos de estudios de cultivos de fibroblastos de ligamentos periodontales humanos, los cuales han demostrado una mayor presencia de la proteína STAT3 durante periodontitis (Ambili y cols., 2017). También, se ha documentado que los pacientes con pérdida de función de STAT3 (AD-HIES) han atenuado las respuestas de las células Th17, reduciendo la inflamación periodontal (sangrado al sondaje) y la pérdida ósea en comparación con pacientes sanos (Dutzan y cols., 2018).

Dentro de nuestra línea de investigación, recientemente se ha evaluado la activación de STAT3 en tejidos gingivales humanos de pacientes con periodontitis, observando activación de STAT3 en el tejido conectivo y epitelial. Esta activación de STAT3 en el tejido conectivo se distribuye de manera homogénea y/o en cúmulos, tanto en núcleo como citoplasma de las células de dicho tejido. Sin embargo, no se realizó un análisis de los tipos celulares que activaban STAT3 durante periodontitis (Plaza, 2019).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria con una alta prevalencia en la población. En nuestro organismo, puede modificar enfermedades sistémicas y aumentar su riesgo. Durante esta patología se generan cambios en la diversidad y estructura de la microbiota periodontal que producen un desbalance en la respuesta inmune activando procesos de destrucción de los tejidos periodontales que pueden llevar a la pérdida de los dientes. Dentro de las células claves en estos procesos destacan los linfocitos Th17, descritos como moduladores de la pérdida ósea y el daño tisular en los tejidos periodontales.

Durante el proceso de diferenciación de linfocitos Th17, STAT3 juega un rol fundamental. La evidencia actual respalda el hecho de que STAT3 es un factor de transcripción primordial en la diferenciación, activación, producción de citoquinas, proliferación y supervivencia de las células Th17. Estas observaciones han posicionado a STAT3 como un objetivo biológicamente relevante para la modulación de la actividad de los linfocitos Th17.

STAT3 participa en la patogénesis de diversas enfermedades inflamatorias y autoinmunes. En enfermedad periodontal, modelos animales experimentales han proporcionado evidencia sobre la activación de esta proteína en periodontitis, conllevando al aumento del número de osteoclastos y mayor pérdida de hueso alveolar, a pesar de esto, aún no existen estudios en humanos que evalúen en qué subtipos celulares específicos se encuentra activado STAT3 en la patogénesis de la periodontitis. Por lo tanto, aún se necesita una comprensión crítica de las actividades específicas del tipo celular, es decir, dónde se expresa más STAT3 durante la enfermedad periodontal.

Un mejor entendimiento de los aspectos moleculares que median la respuesta inmune del hospedero podría permitir en el futuro complementar la terapia periodontal convencional mediante modelos de inhibición directa de vías como STAT3 para regular la activación de células Th17, claves en la patogénesis de la enfermedad periodontal. Debido a que STAT3 participa en la señalización de citoquinas asociadas a periodontitis y otras condiciones inflamatorias en el ser humano. Sumado a que STAT3 es clave en la diferenciación de linfocitos Th17 y estas células participan en la destrucción de tejido que caracteriza la periodontitis.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

En los tejidos gingivales de sujetos sanos y con periodontitis: ¿En qué tipo celular STAT3 se encuentra principalmente activado (pSTAT3)? ¿En células inmunes o en células no inmunes?

6. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

6.1 Hipótesis

“En tejidos gingivales humanos sanos y con periodontitis, STAT3 se encuentra activado (pSTAT3) principalmente en células inmunes.”

6.2 Objetivo general

Determinar la activación de STAT3 (pSTAT3) en células inmunes y no inmunes de tejidos gingivales humanos sanos y durante periodontitis.

6.3 Objetivos específicos

- Caracterizar clínicamente a sujetos con periodontitis y periodontalmente sanos.
- Identificar las células inmunes y no inmunes en tejidos gingivales sanos y con periodontitis.
- Identificar las células inmunes y no inmunes que presentan activación de STAT3 en tejidos gingivales sanos y con periodontitis.

7. METODOLOGÍA.

7.1 Diseño del estudio

El presente estudio tiene un diseño de tipo experimental, observacional, transversal. Se encuentra adscrito al proyecto FONDECYT Iniciación 11180389 (Anexo 1), aprobado por el Comité Ético de Investigación del Servicio de Salud Metropolitano Norte (Anexo 2).

7.2 Selección de voluntarios

Los voluntarios fueron convocados desde la lista de espera de atención de periodoncia de la Clínica Odontológica de la Universidad de Chile. Los sujetos que acudieron a la atención fueron evaluados por un periodoncista, quien por medio de una entrevista, registró junto con la anamnesis los principales antecedentes sistémicos que pudieran modificar la patología o el tratamiento periodontal como por ejemplo: diabetes, infección por VIH, hipertensión, cáncer, coagulopatías, enfermedades autoinmunes, alergias u otras. Además, se constató el uso de fármacos antibióticos, inmunomoduladores o probióticos de alta concentración en los últimos 3 meses, lo cual se encuentra dentro de los criterios de exclusión.

Posterior a eso, se realizó un examen oral, acompañado de un diagnóstico periodontal en base a mediciones de nivel de inserción clínica, profundidad al sondaje, índice de sangrado, todos evaluados en seis sitios por diente. Por su parte, el índice de placa fue evaluado en cuatro sitios por diente (O'leary y cols., 1972). También, se indicó el compromiso de furca y movilidad que presentaba cada uno. Adicionalmente, se solicitaron exámenes radiográficos según la pertinencia de cada caso.

Todos los antecedentes de anamnesis, examen clínico y exámenes complementarios fueron registrados en una ficha clínica especialmente diseñada para este estudio (Anexo 3). Con esta información, se realizó una selección de los voluntarios de acuerdo con los criterios de inclusión y exclusión del estudio, dentro de los criterios de inclusión los pacientes deben ser mayores de 18 años y presentar más de 20 dientes en boca y tener la voluntad de donar tejido gingival para el estudio. Los criterios de exclusión fueron padecer de alguna de estas enfermedades: Hepatitis B o C positivo, VIH positivo, diabetes, desórdenes autoinmunes como lupus, artritis reumatoide, etc., cáncer, desórdenes en la coagulación o condiciones asociadas con sangrado (Coagulopatías como: Hemofilia, Enfermedad de von Willenbrand, etc.) Por otro lado, se excluyen a los voluntarios que han sido tratado con quimioterapéuticos sistémico o terapia de radiación durante los últimos 5 años, estar en periodo de embarazo o en periodo de lactancia, encontrarse en terapia de radiación de cabeza o cuello, haber sido hospitalizado más de 3 veces en los últimos 3 años. Por último, haber usado en los últimos tres meses: antibióticos sistémicos (intravenoso, intramuscular u oral), corticoesteroides u otro inmunosupresor (por ejemplo, ciclosporina), terapia con citoquinas, metotrexato o algún otro agente químico inmunosupresor, probióticos de uso comercial en altas dosis ($\geq 10^8$ unidades formadoras de colonias por día) en formato de tableta, cápsulas, polvo, etc. No aplica para exclusión del individuo el uso de alimentos/líquidos fermentados, por ejemplo, leche, yogurts, etc. (Anexo 4).

Todos los sujetos evaluados que presentaban diagnóstico de periodontitis o gingivitis fueron tratados y/o derivados al correspondiente especialista, independientemente de si fueron seleccionados para el presente estudio o no (figura 3). Para mantener la confidencialidad de los datos personales y clínicos de los sujetos de estudio, las fichas clínicas fueron mantenidas bajo llave y con acceso restringido. A cada sujeto de estudio se le fue asignado un código, con lo cual se garantizó su anonimato al realizar el análisis de datos.

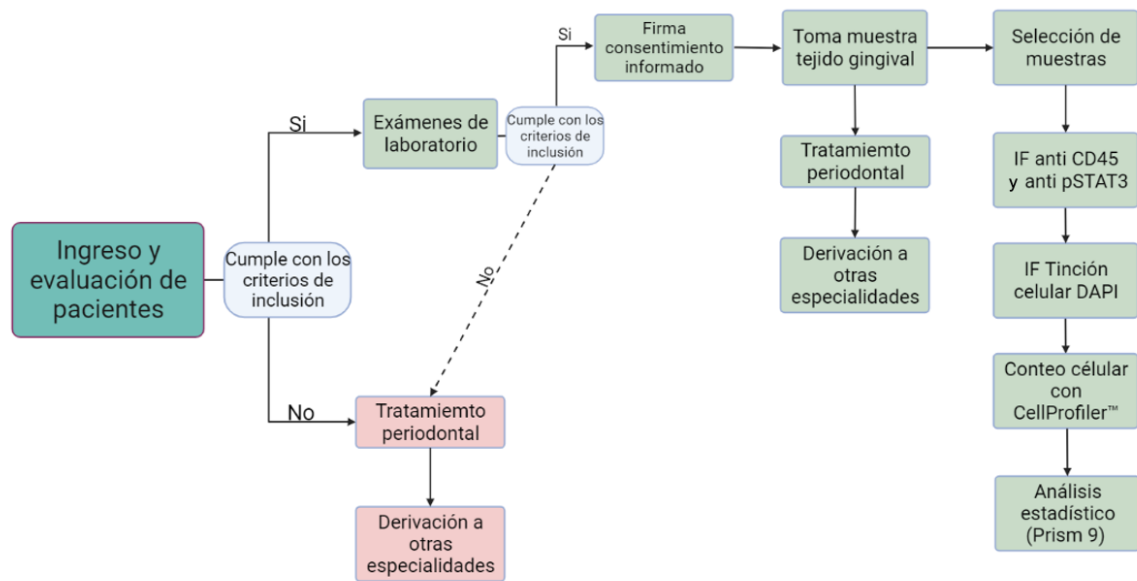


Figura 4: Esquema del reclutamiento de voluntarios y selección de las muestras de tejido gingival para análisis mediante inmunofluorescencia (IF) para pSTAT3 en células inmunes CD45. Realizada en BioRender, <http://www.biorender.com>.

7.3 Obtención de las muestras

Después de firmar el consentimiento informado (Anexo 5), se realizó la toma muestra mediante una biopsia incisional de tejido gingival (3x3 mm) del sitio con mayor profundidad al sondaje y presencia de sangrado, con el fin de obtener una muestra representativa del estado periodontal. En el caso de pacientes sin enfermedad periodontal, la muestra se obtuvo de la misma forma, respetando el mismo tamaño, pero en sitios sin pérdida de inserción de causa periodontal, sin sangrado al sondaje y con profundidad al sondaje máxima de 3 mm. Este trabajo se realizó en la Clínica Odontológica de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

7.4 Protocolo Inmunofluorescencia

1. Fijación y Desparafinación

- La muestra de tejido gingival fue fijada en formalina buffer al 10% e incluida en parafina de grado histológico. La muestra fue seccionada en cortes de 3 μm de espesor, los cuales fueron desparafinados en xilol y rehidratados en

etanol en concentraciones descendientes (100%, 95% y 70%) hasta terminar en agua destilada.

2. Recuperación antigénica

- Las secciones fueron colocadas en buffer citrato 1M pH 6,0.
- Para la recuperación antigénica calórica (olla a presión) se dejó durante 35 minutos, para luego ser lavados en agua destilada y en buffer fosfato salino (PBS) durante 3 veces por 2 minutos.

3. Bloqueo peroxidasa endógena

- Se realizó la permeabilización de la muestra con tritón X-100 al 0,3% durante 30 minutos.
- Se lavó la muestra con PBS, y posteriormente una incubación por 10 minutos con Negro Sudán al 0,1% disuelto en etanol al 70%.
- Se lava la muestra con PBS y se realiza bloqueo con BSA al 5%, previo a la incubación de anticuerpos, por 30 minutos. Posteriormente se incubó con anticuerpos primarios CD45 y pSTAT3. Para identificar a las células inmunes se utilizó el marcador CD45, ratón anti-CD45 humano (Agilent Dako, Agilent Technologies, USA) en concentración 1:200 del anticuerpo disuelto en BSA al 5%. CD45 es una proteína transmembrana presente en todas las células hematopoyéticas diferenciadas (excepto eritrocitos). Este marcador se usa de forma rutinaria en diferentes técnicas para el reconocimiento de células inmunes.
- Luego se incubaron los anticuerpos de conejo anti-pSTAT3 humano en concentración 1:200 del anticuerpo disuelto, de la compañía Cell Signaling Technology. Este anticuerpo monoclonal nos ofrece una alta sensibilidad y especificidad para la observación de la proteína STAT3 fosforilada (RabMab, antibodies).
- Se dejan en incubación con los anticuerpos primarios durante toda la noche, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

4. Anticuerpo secundario y Hoechst

- Se realiza lavado con PBS y se efectúa la incubación con los respectivos anticuerpos acoplados a una sonda fluorescente a 37° por 2 horas para realizar nuevamente un lavado con PBS y dejar con tinción de células mediante la tinción nuclear Hoechst 33342 por 30 minutos.

5. Montaje

- Finalmente se realizó el montaje utilizando medio de montaje de la marca DAKO (Agilent Technologies, USA).

Los tejidos se evaluaron en un microscopio de epifluorescencia con un aumento de 40x y se seleccionaron al menos 3 (de 3 a 8) campos de forma no aleatoria, que tengan presencia de áreas de mayor marcación positiva. Esta marca se evaluó como positiva para la proteína de pSTAT3 en el caso de contar con un marcaje positivo (inmunofluorescencia verde) en el núcleo de las células sin considerar intensidad.

7.5 Análisis de Inmunofluorescencia

El conteo celular se realizó utilizando el programa CellProfiler™ (Carpenter y cols., 2006) con el cual se enumeraron todas las células presentes en el tejido a observar, diferenciando la cantidad de inmunopositivas e inmunonegativas del total contabilizado.

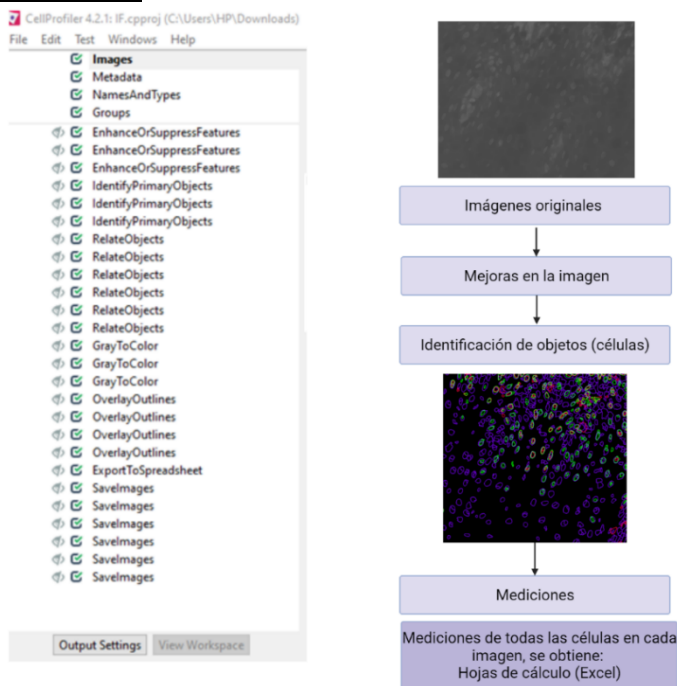
Se utilizó este software de análisis de imágenes celulares para contabilizar células de manera automática mediante un algoritmo de propagación. El algoritmo utilizado o *pipeline* (figura 4), comenzó con mejoras en la imagen con el fin que las células se observaran de manera más notoria y así el software pueda identificarlas. Posteriormente se aplicó la herramienta de identificación de objetos en cada canal de imagen, en el cual se evaluaron las co-localizaciones de las diferentes tinciones teniendo como objeto principal el núcleo. Para facilitar la detección de las co-localizaciones se determinaron tres colores diferentes para las distintas tinciones de

los anticuerpos, siendo CD45⁺ de color rojo, pSTAT3⁺ verde y la tinción celular nuclear de Hoechst 33342 de color azul.

Se determinó la co-localización como la superposición de dos o más tinciones y se contabilizaron dependiendo del objetivo de búsqueda. El programa realizó el conteo celular automatizado, luego de aplicar los pasos anteriores y se obtuvo una planilla Excel con la valorización solicitada, ya sea para células CD45⁺, pSTAT3⁺ y el pSTAT3⁺CD45⁺, todas estas fueron co-localizaciones con la tinción células de Hoechst 33342.

Figura 4: Vista general de CellProfiler y sus funcionalidades más usuales. Realizada en BioRender, <http://www.biorender.com>).

7.6 Análisis estadístico



Los datos se analizaron utilizando el software Prism 9.3 (GraphPad Software, Inc.). El análisis de la distribución de datos se realizó mediante la prueba de normalidad Shapiro-Wilk. Las diferencias entre dos grupos experimentales se determinaron mediante ambas pruebas *t test Student* no pareado y el *test de Mann-Whitney* para datos pareados. La diferencia entre más de dos grupos se determinó mediante el

test Ordinary one-way ANOVA bonferroni para datos con distribución paramétrica y Kruskall-Wallis para datos con distribución no paramétrica.

7.7 Determinación de la muestra

Considerando el promedio y la desviación estándar informados para sujetos con y sin periodontitis en estudios previos para la detección de células Th17 en tejidos (Dutzan y cols., 2016), se necesita un mínimo de 7 pacientes por grupo para lograr un nivel de seguridad del 95% con un poder estadístico del 80%. El tamaño de la muestra se calculó con el software en línea OpenEpi (www.openepi.com). Las diferencias se considerarán estadísticamente significativas si el valor $p < 0,05$.

8. RESULTADOS

8.1 Caracterización de la muestra

De acuerdo con los criterios de selección, nuestra muestra fue conformada por dieciocho sujetos, nueve individuos con diagnóstico de periodontitis, mientras otros nueve individuos presentaban salud periodontal. Todos los voluntarios evaluados recibieron tratamiento periodontal correspondiente y fueron derivados a las especialidades necesarias, de acuerdo con su diagnóstico.

A continuación, se describen las características clínicas de la muestra conformada por los 18 sujetos (n=18) seleccionados para extraer muestra de tejido gingival (Tabla 1).

Tabla 1: Datos clínicos de los voluntarios seleccionados. Las variables Edad, Profundidad al sondaje, Nivel de Inserción Clínica, Índice de Sangrado e índice Placa, se expresaron en promedio (mínimo-máximo). Las variables Tabaquismo, Sexo y número de individuos Total, se expresaron en sumatoria de casos.

Características clínicas de los voluntarios		
	Salud	Periodontitis
Número de Individuos	9 (50%)	9 (50%)
Mujeres	5 (56%)	5 (56%)
Hombres	4 (44%)	4 (44%)
Edad (años)	26 (23 – 28)	46 (30 – 68)
PS (mm)	1,8 (0 – 2)	2,7 (1 – 8)
NIC (mm)	1,8 (0 – 2)	3,4 (1 – 9)
Índice de Sangrado (%)	9,7 (5 – 9,8)	62,8 (25 – 88)
Índice de Placa (%)	15,6 (0 – 24)	68,5 (49 – 100)
Tabaquismo	2 (22%)	2 (22%)

De acuerdo a la nueva clasificación de las enfermedades y condiciones periodontales y peri-implantarias (Caton y cols., 2018), se realizó el diagnóstico de los voluntarios utilizando el algoritmo propuesto por Tonneti y Sanz (Tonetti y Sanz, 2019). Nueve sujetos tuvieron un diagnóstico de periodontitis (Tabla 3). En cuanto a las etapas de la enfermedad que indican la severidad de la enfermedad y

complejidad de tratamiento, el 11,1% (un sujeto) de ellos presentaba una etapa 2, el 44,4% (cuatro voluntarios) estaba en etapa 3 y otro 44,4% (cuatro voluntarios) etapa 4. En el 22,2% (dos voluntarios) era localizada y en el 77,8% (siete voluntarios) generalizada. En tanto los grados, que indican la progresión de la enfermedad, el 11,1% (un sujeto) de la muestra presentaba un grado A, el 33,3% (tres voluntarios) presentaba un grado B y el 55,5% (cinco voluntarios) presentaba un grado C (Tonetti y Sanz, 2019).

Tabla 2: Diagnóstico clínico del total de individuos con periodontitis. Se presenta el diagnóstico de acuerdo con la clasificación periodontal de Caton del 2018. Se evalúa severidad de la enfermedad y complejidad de tratamiento, etapa y grado de la enfermedad

Diagnóstico Periodontal pacientes evaluados con periodontitis	
M1	Periodontitis Etapa II Localizada Grado A
M2	Periodontitis Etapa IV Generalizada Grado C
M3	Periodontitis Etapa IV Localizada Grado C
M4	Periodontitis Etapa IV Generalizada Grado C
M5	Periodontitis Etapa IV Generalizada Grado C
M6	Periodontitis Etapa III Generalizada Grado B
M7	Periodontitis Etapa III Generalizada Grado C
M8	Periodontitis Etapa III Generalizada Grado B
M9	Periodontitis Etapa III Generalizada Grado B

Dentro del grupo de pacientes sanos, se reclutaron nueve sujetos. Este grupo no presentaba signos de destrucción de tejidos periodontales, siendo el promedio del índice de sangrado de 8,7%. De acuerdo con la nueva clasificación de las enfermedades y condiciones periodontales y periimplantarias (Caton y cols. 2018), se realizó el diagnóstico de los voluntarios que llevó a un diagnóstico de salud gingival clínica puesto a que los nueve voluntarios presentaban un sangrado al sondaje menor al 10%. Dentro de este grupo, el 77,8% (siete voluntarios) presentaban salud gingival clínica en periodonto reducido, debido a que presentaban pérdida de inserción con poca inflamación, y el 22,2% (dos voluntarios) presentaban salud gingival clínica en periodonto intacto, los cuales no presentaban pérdida de inserción clínica.

Tabla 3: Diagnóstico clínico del total de individuos sanos. Se presenta el diagnóstico de acuerdo con la clasificación periodontal de Caton del 2018.

Diagnóstico Periodontal pacientes evaluados sanos	
S1	Salud gingival clínica en periodonto reducido
S2	Salud gingival clínica en periodonto reducido
S3	Salud gingival clínica en periodonto reducido
S4	Salud gingival clínica en periodonto reducido
S5	Salud gingival clínica en periodonto reducido
S6	Salud gingival clínica en periodonto reducido
S7	Salud gingival clínica en periodonto reducido
S8	Salud gingival clínica en periodonto intacto
S9	Salud gingival clínica en periodonto intacto

8.2 Análisis de células inmunes CD45⁺ en tejidos gingivales humanos

El primer resultado obtenido fue el número de células inmunes presentes en los tejidos gingivales. Estas corresponden a las células positivas para el marcador CD45 (antígeno común de células inmunes). Luego de realizar el protocolo de inmunofluorescencia, se obtuvieron células con co-localización inmunopositivas con marcaje rojo para CD45⁺ y marcaje azul nuclear con tinción de Hoechst 33342 (Figura 5).

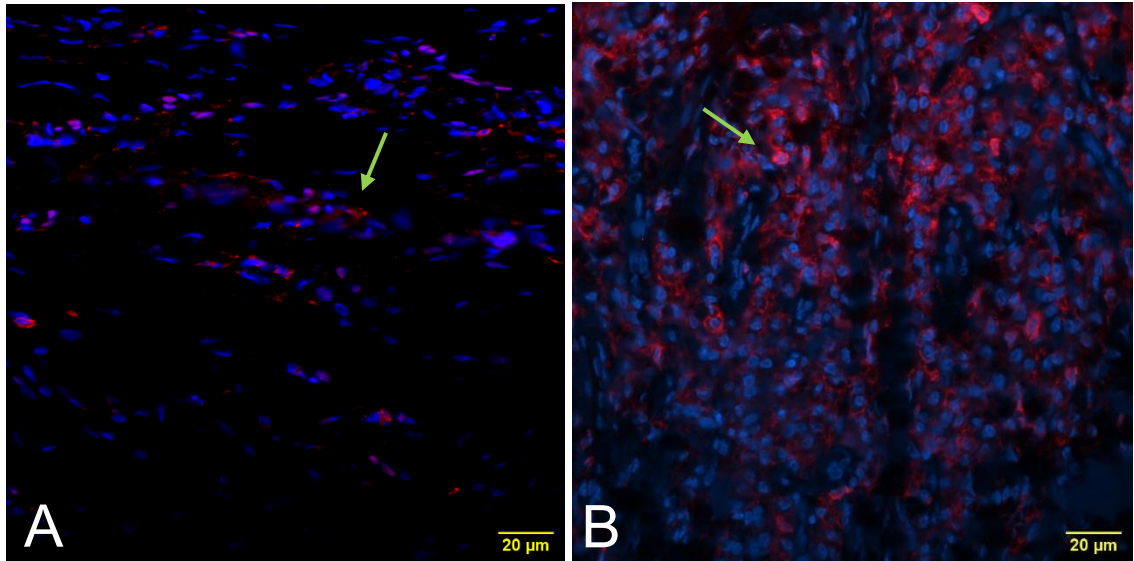


Figura 5: Imágenes representativas de inmunofluorescencia (40x) utilizadas para realizar la cuantificación de células inmunopositivas para CD45. (A) Corte histológico de tejido gingival de paciente sano, se observan células inmunopositivas CD45⁺ y tinción Hoechst 33342 (con marcaje rojo y azul a la inmunofluorescencia). (B) Corte histológico de tejido gingival de paciente con periodontitis, donde se observa mayor cantidad de células CD45⁺. Flechas de color verde indican células inmunopositivas.

Se analizaron 3 a 8 microfotografías por muestra, alcanzando un total de 164 microfotografías de tejido, de los cuales 82 fueron de periodontitis y 88 de tejido sano. Se diferenciaron los cortes de tejido epitelial y conectivo, siendo 79 de tejido epitelial, 42 de tejido sano epitelial y 36 de tejido epitelial con periodontitis, por otra parte, 85 microfotografías de tejido conectivo., siendo 46 microfotografías tanto para tejido conectivo sano como para tejido conectivo con periodontitis. Se contabilizaron las células inmunopositivas CD45⁺ con tinción de Hoechst 33342 en tejido gingival sano y con periodontitis, y de forma separada la co-localización de células inmunopositivas CD45⁺ en tejido epitelial y conectivo (Tabla 4).

Tabla 4: Porcentajes de células hematopoyéticas en tejidos gingivales. Se presenta el porcentaje de células CD45⁺ del total de células detectadas con la tinción de Hoechst 33342 en las microfotografías de tejidos gingivales de sujetos con diagnóstico de periodontitis y sanos. De manera separada, los valores en tejido conectivo y epitelial. Los datos se muestran como promedio \pm DS del porcentaje de células positivas para el marcador CD45⁺ y tinción de Hoechst 33342 del total de células detectadas (positivas solo para Hoechst 33342) por microfotografía.

Porcentaje de células con co-localización para tinción de Hoechst 33342 y marcador CD45⁺

	Tejidos sanos	Tejidos con periodontitis
Tejido epitelial	9,6% ± 10,0%	25,5% ± 20,5%
Tejido conectivo	16,2% ± 10,4%	36,8% ± 8,7%
Proporción Total	11,6% ± 5,0%	33,0% ± 11,0%

Al comparar los porcentajes de células, se observó un aumento significativo de células CD45⁺ (p=0,0001) en los tejidos durante periodontitis en comparación con los tejidos periodontalmente sanos (Figura 6).

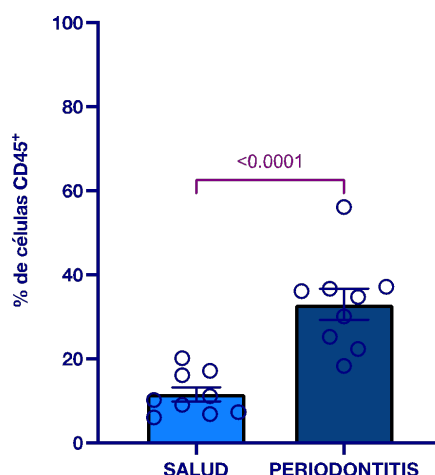


Figura 6: Células de origen hematopoyético en salud y periodontitis. Gráfico de barras en el cual se observa un aumento de células CD45⁺ en tejido gingival de pacientes con periodontitis comparado con el tejido gingival de pacientes sanos. Cada círculo representa el porcentaje total de células CD45⁺ y con tinción de Hoechst 33342 obtenida de los 18 sujetos seleccionados. Los datos fueron analizados mediante *test t student*. Las líneas representan el promedio y el error estándar de la media (SEM).

Al comparar los porcentajes de células de origen hematopoyético del tejido epitelial y del tejido conectivo (Figura 7), se evidenció que el tejido conectivo era el que presentaba una mayor cantidad de células inmunes tanto en salud como en periodontitis. Se obtuvo una diferencia estadística con un valor p=0,0407 cuando se compararon los valores del porcentaje de células inmunopositivas para CD45⁺ en tejido conectivos en salud y periodontitis, además existe una diferencia significativa

al comparar tejido epitelial en salud con el tejido conectivo en periodontitis (Figura 7).

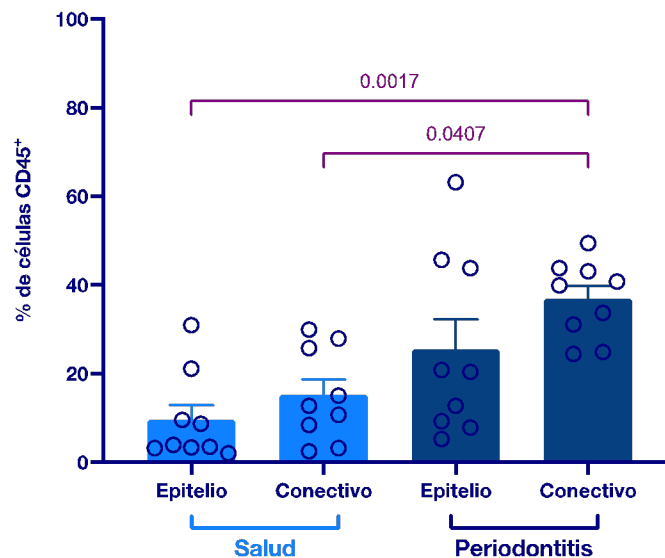


Figura 7: Células inmunopositivas con co-localización para tinción de Hoechst 33342 y CD45⁺ en tejido conectivo y tejido epitelial. Se presenta la cantidad de células CD45⁺ en tejido epitelial y conectivo de muestras sanas y con periodontitis. Se observa un aumento de células hematopoyéticas en periodontitis en comparación con salud. Por otro lado, se observa tanto en salud como periodontitis una mayor cantidad de células CD45⁺ en tejido conectivo de ambos grupos. Cada círculo representa el porcentaje total de células CD45⁺ obtenida de los 18 sujetos seleccionados. Para la comparación de estos grupos se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis. Se observa el promedio con la barra del gráfico, del cual la línea final representa el SEM.

8.3 Análisis de células con activación de STAT3 (pSTAT3⁺) en los tejidos gingivales humanos

Se evaluó la activación de STAT3 en la totalidad de células marcadas con tinción de Hoechst 33342 de los tejidos gingivales humanos, identificando su variación entre tejidos gingivales con periodontitis y sanos. Se observaron y cuantificaron las células inmunopositivas con marcaje verde para pSTAT3⁺ (Figura 8).

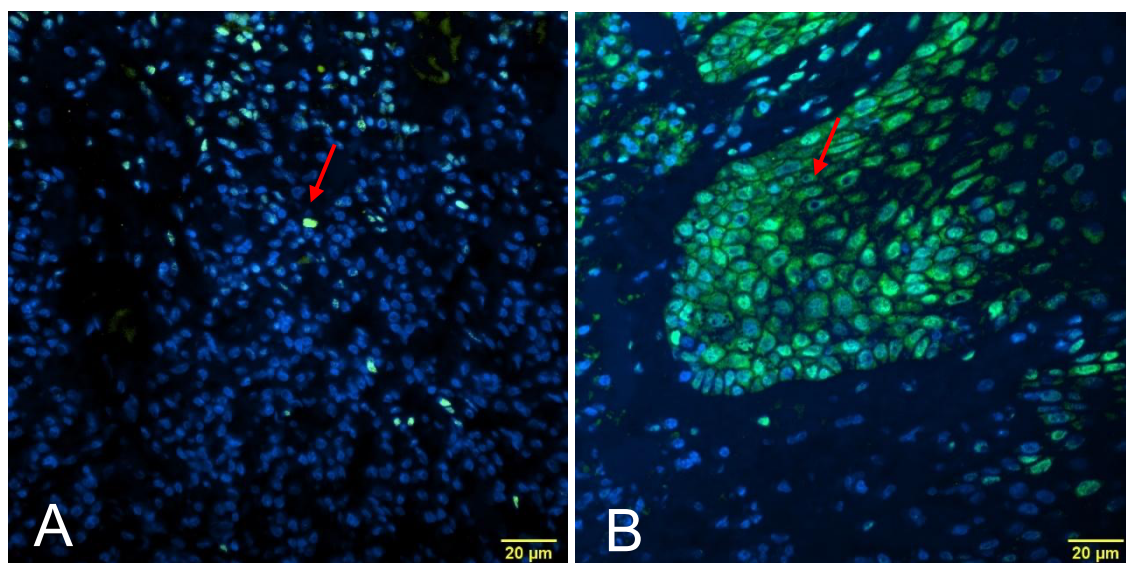


Figura 8: Imágenes representativas de inmunofluorescencia (40x) utilizadas para realizar la cuantificación de células inmunopositivas para pSTAT3 y tinción de Hoechst 33342. (A) Corte histológico de tejido gingival de paciente sano, donde en las células inmunopositivas se observa la presencia de pSTAT3, principalmente a nivel de los núcleos. (B) Corte histológico de tejido gingival de paciente con periodontitis, con un inmunomarcaje homogéneo en su distribución, presente tanto núcleo como citoplasma. Flechas de color rojo indican células inmunopositivas

Para analizar la activación de STAT3 en los tejidos gingivales de los individuos seleccionados, se contabilizaron las células con marcaje para pSTAT3, en su núcleo con co-localización con tinción de Hoechst 33342, del total de 164 muestras. Se contabilizaron las células en tejido gingival sano y con periodontitis, y de forma separada la cantidad de células inmunopositivas pSTAT3⁺ en tejido epitelial y conectivo (Tabla 5).

Tabla 5: Valores de células con co-localización para tinción de Hoechst 33342 y STAT3 activado (pSTAT3⁺) obtenidos mediante inmunofluorescencia, se presenta el total de células con pSTAT3 activado de tejidos con periodontitis y sanos. De manera separada los valores en tejido conectivo y epitelial. Los datos se muestran en porcentaje de células en Promedio \pm DS.

Porcentajes células inmunopositivas para tinción de Hoechst 33342 y pSTAT3⁺		
	Tejidos sanos	Tejidos con periodontitis
Tejido epitelial	28,6% \pm 13,7%	45,2% \pm 12,4%
Tejido conectivo	22,8% \pm 11,3%	35,4% \pm 13,7%
Proporción Total	24,6% \pm 11,9%	40,0% \pm 12,5%

Al cuantificar la presencia de pSTAT3⁺ con co-localización nuclear en las microfotografías de tejidos gingivales, se observó una activación significativa de STAT3 en tejidos con periodontitis. Se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,0167$) cuando se compararon los valores del porcentaje de células positivas para pSTAT3 (Figura 9).

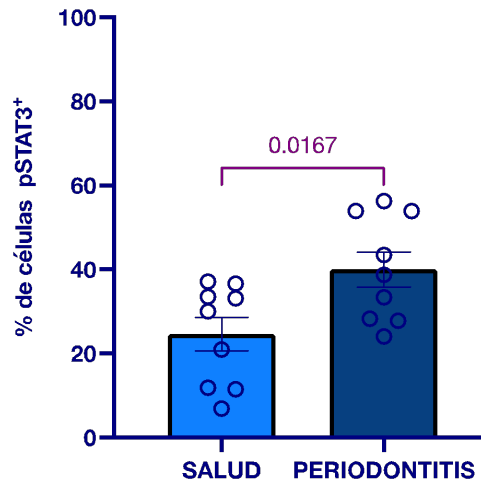


Figura 9: Células inmunopositivas con co-localización para tinción nuclear de Hoechst 33342 y pSTAT3 en salud y periodontitis. Gráfico de barras que demuestra una mayor activación de pSTAT3 en tejidos con periodontitis al compararlos con tejidos sanos. Cada círculo representa el porcentaje total de células pSTAT3⁺ obtenidas de los 18 sujetos seleccionados. Los datos fueron analizados mediante la prueba *t student* para datos no pareados. Las líneas representan el promedio y la SEM.

Cuando se analizó de forma separada el tejido conectivo, se observó que había en promedio un $22,8\% \pm 11,3\%$ de células con activación pSTAT3, en tejidos sanos, y un $35,4\% \pm 13,7\%$, en periodontitis. Al evaluar las células inmunopositivas para pSTAT3 en el tejido epitelial, se determinó que en promedio un $28,6\% \pm 13,7\%$ de células presentes en la región epitelial presentaban activación de STAT3 en tejidos sanos, y un promedio de $45,2\% \pm 12,4\%$ (Tabla 5) en periodontitis.

Se evidenció que el tejido epitelial era el que presentaba un mayor porcentaje de activación de esta proteína tanto en salud como en periodontitis. Se obtuvo una diferencia significativa con un valor $p=0,0050$ al comparar el número total de células positivas para pSTAT3 en tejido conectivo sano y tejido epitelial con periodontitis.

Por otro lado, no se observa una diferencia significativa al comparar tejidos conectivos de sanos con periodontitis, tampoco al comparar tejidos epiteliales de ambos grupos experimentales (Figura 10).

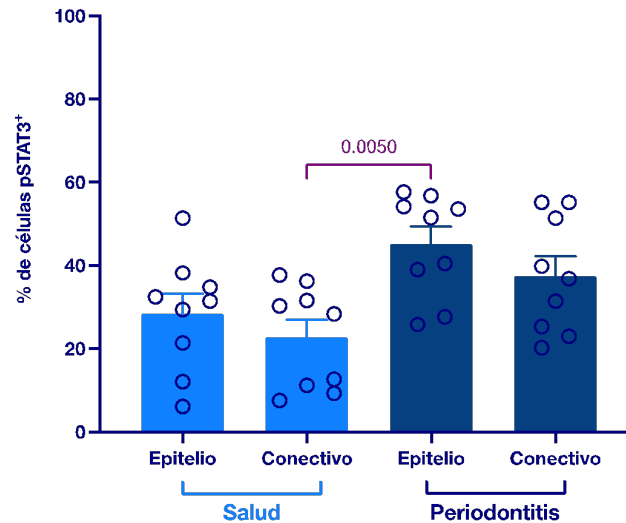


Figura 10: Células inmunopositivas para tinción de Hoechst 33342 y pSTAT3 en tejido conectivo y tejido epitelial. Gráfico de barras en el cual se observa un aumento de células pSTAT3+ en periodontitis. Además, se obtuvo una mayor activación de pSTAT3 en tejido epitelial tanto en salud como en periodontitis, resultados sin una diferencia significativa. Cada círculo representa el porcentaje total de células pSTAT3+ obtenida de los 18 sujetos seleccionados. Para la comparación de estos grupos se utilizó el test one-way ANOVA bonferroni (datos paramétricos). Se observa el promedio con la barra del gráfico, del cual la línea final representa el SEM.

8.4 Análisis de pSTAT3+ en células inmunes CD45+ de tejidos gingivales humanos

Una vez teniendo en evidencia que en tejidos gingivales humanos con periodontitis se observa una mayor activación de células de origen hematopoyético; asimismo, del total de células en los tejidos, pSTAT3+ se encontraba mayormente en tejidos con periodontitis en comparación con tejidos sanos, se procedió a determinar el tipo celular en el cual se encuentra mayormente activado STAT3 (pSTAT3) en los tejidos gingivales humanos. Para esto, se evaluó la activación de pSTAT3 y CD45+ (antígeno común de células inmunes) en células con co-localización nuclear mediante tinción de Hoechst 33342 (Figura 11).

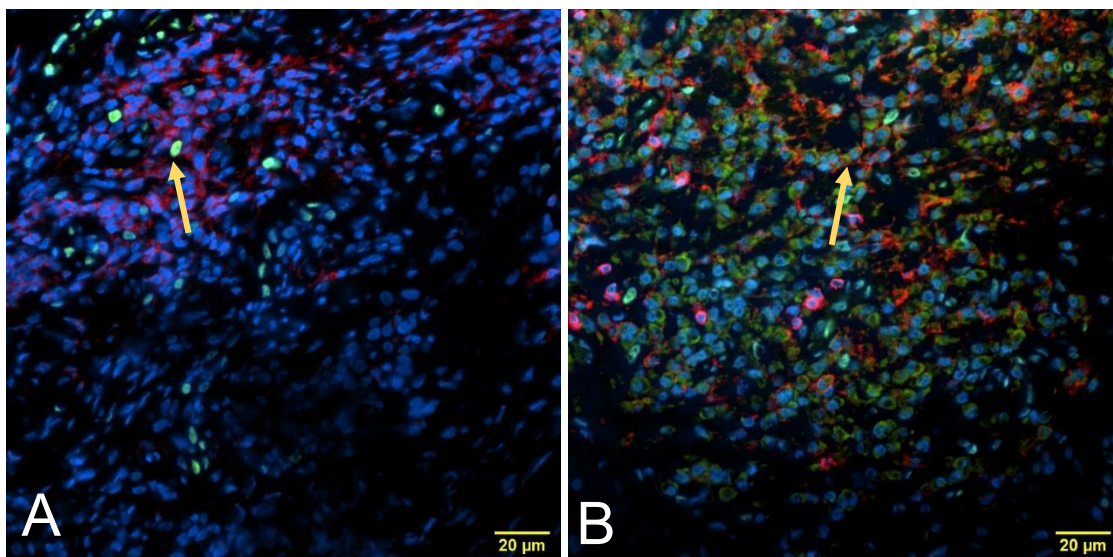


Figura 11: Imágenes representativas de inmunofluorescencia (40x) utilizadas para realizar la cuantificación de células inmunopositivas con tinción de Hoechst 33342 y CD45⁺pSTAT3⁺. (A) Corte histológico de tejido gingival de paciente sano. Flechas de color amarillo indican células con tinción de Hoechst 33342 (azul) e inmunopositivas para marcador CD45⁺ (rojo) y pSTAT3⁺ (verde). (B) Corte histológico de tejido gingival de paciente con periodontitis, con un inmunomarcaje mayor. Flechas de color amarillo indican células inmunopositivas para CD45⁺ (rojo) y pSTAT3⁺ (verde).

Se contabilizaron células con tinción de Hoechst 33342 que presentaban inmunomarcaje positivo para CD45⁺ y pSTAT3⁺, y se observó la activación de pSTAT3 en células inmunes CD45⁺, en tejidos gingivales sanos y con periodontitis (Tabla 6).

Tabla 6: Valores de células inmunes con STAT3 activado (pSTAT3⁺ CD45⁺) con tinción de Hoechst 33342 obtenidos mediante inmunofluorescencia, se presenta el total de células con tinción de Hoechst 33342 y marcaje pSTAT3⁺ CD45⁺ de tejidos con periodontitis y sanos, y de manera separada los valores en tejido conectivo y epitelial. Los datos se muestran en porcentaje de células en Promedio \pm DS.

Porcentajes células inmunopositivas para tinción de Hoechst 3342 y pSTAT3⁺ CD45⁺

	Tejidos sanos	Tejidos con periodontitis
Tejido epitelial	12,1 % \pm 16,5%	36,9% \pm 31,6%
Tejido conectivo	17,7% \pm 11,1%	45,9% \pm 16,9%
Proporción Total	14,3% \pm 13,2%	42,0% \pm 22,2%

En cuanto al análisis de la activación del marcador pSTAT3 en células CD45⁺, se observó un aumento en los tejidos provenientes del grupo con periodontitis, en comparación con las muestras sanas (Figura 12). Estos porcentajes son la proporción de células doble positivas (pSTAT3⁺ CD45⁺) del total de células presentes en el tejido gingival. Los valores son estadísticamente significativos, con un valor $p= 0,0028$ para los porcentajes de células pSTAT3⁺ CD45⁺.

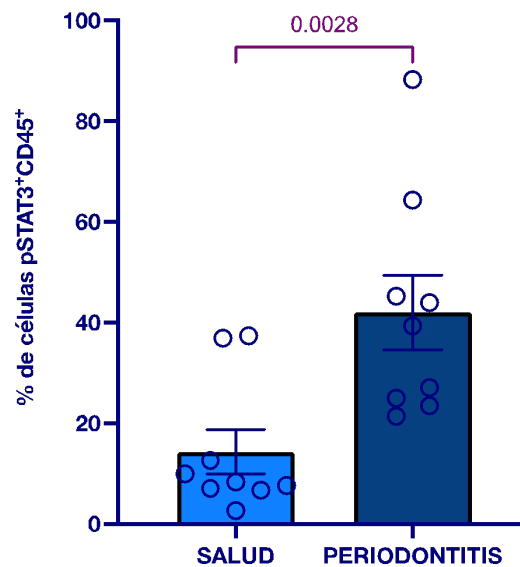


Figura 12: Células inmunes para tinción de Hoechst 33342 y pSTAT3⁺ CD45⁺ en salud y periodontitis. Gráfico de barras que demuestra una mayor cantidad de células inmunes con activación de STAT3 (pSTAT3⁺ CD45⁺) en tejidos con periodontitis al compararlos con tejidos sanos. Cada círculo representa el proporción de células pSTAT3⁺CD45⁺ obtenidas de los 18 sujetos seleccionados. Los datos fueron analizados mediante el test Mann-Whitney para datos paramétricos. Las líneas representan el promedio y la SEM.

Posteriormente, se procedió a evaluar la activación de STAT3 en células no inmunes, así corroborar las funciones presentes de STAT3 tanto en salud periodontal como en periodontitis (Tabla 7).

Tabla 7: Valores de porcentajes de células con tinción de Hoechst 33342, no inmunes con STAT3 activado (pSTAT3⁺ CD45⁻) obtenidos mediante inmunofluorescencia, se presenta la proporción células con tinción de Hoechst 33342 y pSTAT3⁺ CD45⁻ de tejidos con periodontitis y sanos, y separado en tejido conectivo y epitelial. Los datos se muestran en porcentaje de células y número en Promedio ± DS.

Porcentajes células inmunopositivas con co-localización de tinción de Hoechst 33342 y pSTAT3⁺ CD45⁻

	Tejidos sanos	Tejidos con periodontitis
Tejido epitelial	87,9% ± 16,5%	63,1% ± 31,6%
Tejido conectivo	82,3% ± 11,1%	51,1% ± 16,9%
Proporción Total	87,7% ± 13,2%	58,0% ± 22,2%

Se observó una mayor activación de pSTAT3 en células no inmunes CD45⁻ en tejidos sanos, al compararlos con tejidos con periodontitis (Figura 11).

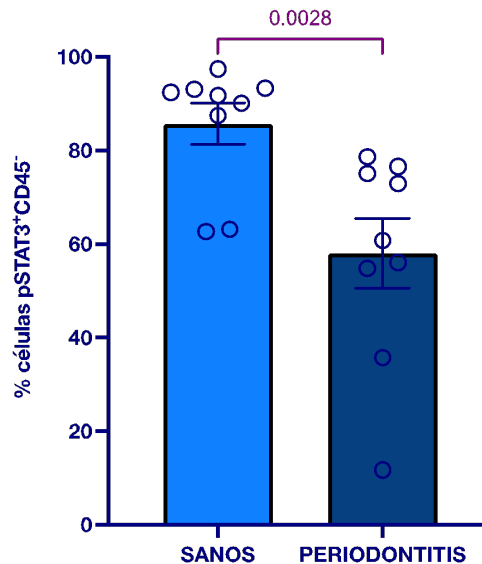


Figura 13: Células no inmunes pSTAT3⁺ CD45⁻ en salud y periodontitis. Gráfico de barras, se observa el aumento de células no inmunes con activación de pSTAT3 (pSTAT3⁺CD45⁻) en tejidos sanos comparado con los tejidos con periodontitis. Cada círculo representa la proporción de células pSTAT3⁺CD45⁻ obtenidas de los 18 sujetos seleccionados. Los datos fueron analizados mediante *test* Mann-Whitney *test* para datos pareados. Las líneas representan el promedio y la SEM.

Para responder nuestra pregunta de investigación: En los tejidos gingivales de sujetos sanos y con periodontitis: ¿En qué tipo celular STAT3 se encuentra principalmente activado? ¿En células inmunes o en células no inmunes? Se analizó

la proporción de células pSTAT3⁺CD45⁺ y pSTAT3⁺CD45⁻ del total de células presentes en los tejidos. Si bien existe una mayor presencia de células pSTAT3⁺CD45⁺ en periodontitis en comparación con salud periodontal, la proporción de células pSTAT3⁺ corresponde principalmente a células no inmunes (CD45⁻)(Figura 14).

Nuestros resultados indican que la proporción de células no inmunes con activación de STAT3 (pSTAT3⁺CD45⁻) presentan una disminución al comparar las muestras de salud con las con periodontitis. Mientras, las células inmunes con activación de STAT3 (pSTAT3⁺CD45⁺) presentan un aumento al comparar el grupo salud con periodontitis (Figura 14).

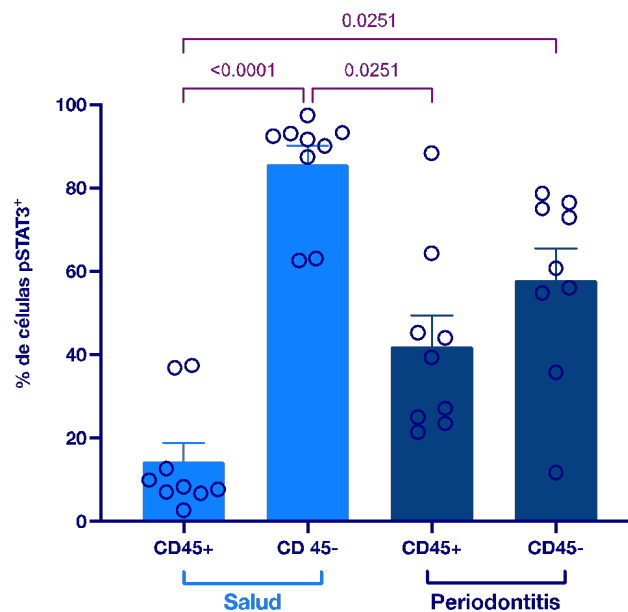


Figura 14: Activación de pSTAT3⁺ en células inmunes y no inmunes con tinción de Hoechst 33342. Gráfico de barras que demuestra una mayor proporción de células no inmunes con activación de STAT3 (pSTAT3⁺CD45⁻) en tejidos sanos al compararlos con periodontitis. Cada círculo representa el porcentaje total de células pSTAT3⁺CD45⁺ o pSTAT3⁺CD45⁻ obtenidas de los 18 sujetos seleccionados. Se obtuvieron diferencias significativas al comparar las células pSTAT3⁺CD45⁺ y pSTAT3⁺CD45⁻ de las muestras de salud. Los datos fueron analizados mediante el *test* para datos no pareados Kruskal-Wallis. Se observa el promedio con la barra del gráfico, del cual la línea final representa el SEM.

Al evaluar la activación de STAT3 en células inmunes con tinción de Hoechst 33342, se observó que estas se encontraban mayormente activadas en tejido conectivo

tanto en salud como en periodontitis (Figura 15A). Por otro lado, al analizar el porcentaje de células pSTAT3⁺CD45⁻ se observó una mayor proporción en tejidos epiteliales al compararlos con el tejido conectivo, en salud y periodontitis (Figura 15B). Se obtuvo una diferencia significativa al comparar la cantidad de células pSTAT3⁺CD45⁺ y pSTAT3⁺CD45⁻ de tejido conectivo de salud con epitelial de periodontitis (Figura 15A y B).

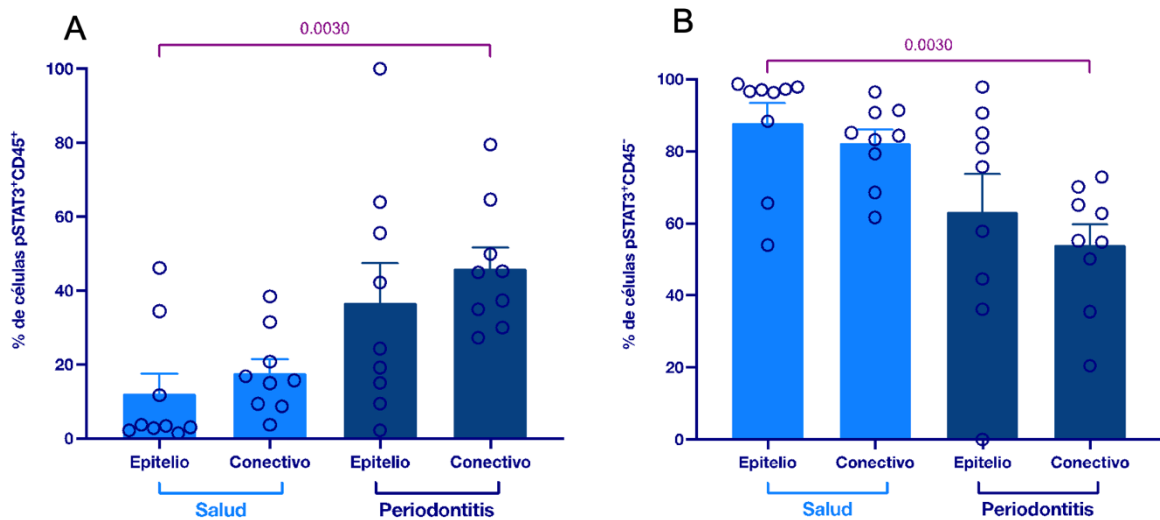


Figura 15: Activación de pSTAT3 en células inmunes CD45⁺ y células no inmunes CD45⁻ con tinción de Hoechst 33342, en tejido conectivo y tejido epitelial. (A) Gráfico de barras para porcentaje de células pSTAT3⁺CD45⁺ en tejido epitelial y conectivo, tanto en salud como en periodontitis, en el cual se observa mayor proporción de células pSTAT3⁺CD45⁺ en tejido conectivo tanto en salud como en periodontitis. (B) Gráfico de barras para porcentaje de células pSTAT3⁺CD45⁻ en tejido epitelial y conectivo, tanto en salud como en periodontitis, se obtuvo una mayor activación de pSTAT3 en células no inmunes (CD45⁻) del tejido epitelial tanto en salud como en periodontitis. Cada círculo representa la proporción de células con activación de STAT3 en células inmunes y no inmunes del total de células obtenida de los 18 sujetos seleccionados. Para la comparación de estos grupos se utilizó el *test* para datos no pareados Kruskal-Wallis. Se observa el promedio con la barra del gráfico, del cual la línea final representa el SEM.

9. DISCUSIÓN

Gran cantidad de los avances logrados en la comprensión de la patogénesis de la periodontitis han sido gracias a investigaciones realizadas en modelos experimentales. Sin embargo, se requieren más estudios de periodontitis en tejidos humanos que permitan estudiar mecanismos moleculares y celulares, así como a mediadores biológicos que participan en el establecimiento y desarrollo de esta enfermedad, entregándonos de esta manera importante información sobre la interacción hospedero-microorganismo y el proceso inflamatorio.

El presente trabajo, de carácter cuantitativo, se realizó mediante análisis automatizado de imágenes asociado a inmunofluorescencia, el cual se ha centrado en infiltración de células inmunes durante la enfermedad periodontal y las posibles vías de diferenciación del infiltrado inflamatorio durante el desarrollo de esta enfermedad.

9.1 Identificación de células inmunes y no inmunes en tejidos gingivales sanos y con periodontitis.

Nuestros resultados muestran poblaciones de células inmunes en los tejidos gingivales de todas las muestras, pero variaron en número. La cuantificación de las células de origen hematopoyético positivas para CD45, reveló una mayor presencia de células inmunes en los tejidos gingivales con periodontitis, consistente con la necesidad de una mayor vigilancia inmunológica en periodontitis debido a la disbiosis microbiana.

Al revisar la literatura, estos resultados son comparables a los encontrados en otras investigaciones, en donde se evalúa el infiltrado inflamatorio en enfermedad periodontal. Particularmente, Séguier y colaboradores, ya en el año 2000, realizaban su investigación en tejidos orales extraídos de pacientes con periodontitis. Este estudio correlacionó la presencia de células linfoides CD45⁺, CD3⁺, CD8⁺ y CD20⁺ con la pérdida de colágeno, característica importante del avance de la enfermedad periodontal. Séguier y cols., observaron un aumento

significativo de células CD45⁺ durante periodontitis, y se vio relacionado con una mayor disminución de las fibras colágenas. Por lo tanto, durante la periodontitis, la pérdida de colágeno podría estar relacionada con la cantidad importante de cada subconjunto de células inmunes y sus numerosas interacciones (Séguier y cols., 2000).

Por otro lado, Younes y colaboradores , en el año 2008, evaluó células CD45⁺ en tejidos gingivales humanos y la pérdida de fibras colágenas en cuatro etapas de severidad de la enfermedad periodontal, con el fin de establecer una posible correlación entre las distintas etapas de la periodontitis, la degradación del colágeno y subconjuntos de células inflamatorias específicas. Este estudio mostró que las células que más se correlacionaron con las lesiones periodontales inflamatorias en sus distintas etapas fueron las células plasmáticas (EMA⁺), el antígeno común leucocitario (CD45⁺) y los monocitos/macrófagos (CD68⁺). Se observó que las células T (CD3⁺, CD8⁺) y las células B (CD20⁺) solo estaban activas en las etapas tempranas o tardías de la enfermedad periodontal (Younes y cols., 2009).

En nuestro estudio, se observó un mayor infiltrado de células CD45⁺ en tejido conectivo en salud y periodontitis. Estos resultados se condicen con lo establecido en la literatura, debido a que este tejido presenta mayor cantidad de infiltrado leucocitario que responden ante la inflamación en la enfermedad periodontal.

Actualmente, el año 2021, Hu y colaboradores, utilizando el modelo de ligadura en ratas, observaron de manera indirecta el aumento de linfocitos T encontrando un aumento de múltiples citoquinas inflamatorias las cuales derivan de linfocitos T, particularmente de linfocitos T helper o colaboradores en presencia de inflamación periodontal (Hu y cols., 2021). Estos antecedentes nos llevan a concluir que, en presencia de inflamación periodontal, es común observar un aumento en el número de células hematopoyéticas, probablemente debido al incremento marcado en la proporción de linfocitos T helper, los cuales tienen un papel fundamental en la patogénesis de la periodontitis.

9.2 Identificación de células que presentan activación de STAT3 en tejidos gingivales sanos y con periodontitis.

En el presente estudio evaluamos la activación de STAT3 en muestras de tejido gingival de pacientes sanos y con periodontitis, en donde encontramos que esta proteína se encontraba mayormente fosforilada en las células del tejido gingival de muestras con periodontitis al compararlas con los tejidos sanos. Esto puede estar en directa relación con la capacidad que tiene esta proteína de activar a las células Th17, las cuales se ha demostrado que aumentan en los tejidos gingivales con periodontitis (Dutzan y cols., 2018).

Al comparar nuestros resultados con los que se encuentran en la literatura, podemos ver que existe una concordancia con aquellos en donde se evalúa el rol de STAT3 en enfermedad periodontal. García de Aquino y colaboradores en el 2009 utilizó dos modelos experimentales de periodontitis en rata (inyecciones de LPS de *E. coli* y el modelo de ligadura) y mediante Western-Blot observaron que, en el modelo de ligadura, pSTAT3 se veía aumentado en tejido gingival (García de Aquino y cols., 2009). Chaves de Souza y colaboradores el 2011, mediante Western-Blot, confirmaron que pSTAT3 se encuentra aumentado en tejido gingival inflamado en modelo de ratas (De Souza y cols., 2011)

Más adelante, Ambili y colaboradores mediante técnicas de citología, observaron una alta activación de la vía de señalización de STAT3 en cultivos de fibroblastos provenientes de ligamento periodontal humano ante la estimulación con LPS de *P. gingivalis* (Ambili y cols., 2017). En tanto, Hu y colaboradores el 2021, decidió investigar el efecto de la periodontitis inducida por ligaduras sobre la función cognitiva y el de STAT3 en este proceso. Sus resultados sugirieron que la periodontitis inducida por ligaduras podría inducir neuroinflamación a través de la activación de las cascadas de la vía pSTAT3. Por lo tanto, la activación de las cascadas STAT3 podría estar involucrada en la asociación entre periodontitis y deterioro cognitivo (Hu y cols., 2021).

Actualmente no existen estudios clínicos que comparen la activación de STAT3 en tejidos orales inflamados con tejidos en homeostasis, ni que caractericen la activación celular de esta proteína en tejidos periodontales humanos. La importancia de nuestro estudio radica principalmente en su realización en tejidos gingivales humanos. El año 2019, Plaza desarrolló un trabajo de investigación en el cual evaluó la activación de STAT3 en tejidos humanos con periodontitis en tejido conectivo y epitelial, encontrando que esta proteína se encontraba fosforilada en la mayoría de las células del tejido gingival, tanto en el compartimiento epitelial como en el conectivo (Plaza, 2019). Estos datos nos sirven como comparación a nuestro estudio en el cual se agregó una cohorte de pacientes periodontalmente sanos, además se condice con nuestro estudio que en sujetos con periodontitis existe una activación significativa de esta vía de señalización intracelular en tejido gingival.

Cuando evaluamos las muestras separando el tejido conectivo del epitelial, observamos en el tejido epitelial una mayor activación de pSTAT3 en comparación con el tejido conectivo. Esto debido a que la capa epitelial donde se observa su mayor presencia, coincide que es la zona del tejido que concentra el mayor potencial de crecimiento, siendo las células de esta capa reemplazadas constantemente, teniendo en consideración que esta vía de señalización puede ser estimulada por diversos factores de crecimiento que influyen en el desarrollo y proliferación del tejido epitelial (Wang y cols., 2018). Nuestros resultados en conjunto con literatura actual respaldan el hecho de que STAT3 juega un rol fundamental en el epitelio gingival, principalmente en procesos de diferenciación, proliferación e inhibición de la apoptosis (Wu y cols., 2003).

9.3 Identificación de células inmunes y no inmunes que presentan activación de STAT3 en tejidos gingivales sanos y con periodontitis.

El objetivo de nuestro trabajo fue evaluar la activación de pSTAT3 en células inmunes CD45⁺ durante periodontitis y salud periodontal. Ante esto, observamos un mayor aumento de células pSTAT3⁺CD45⁺ en periodontitis. Mientras tanto, en tejidos gingivales sanos, observamos una mayor proporción de células no inmunes

CD45⁺, esto indicaría que en salud periodontal existiría activación de STAT3 por su rol en la proliferación celular en células no inmunes.

Nuestros resultados demuestran que existe una activación significativa de pSTAT3 en el tejido gingival de sujetos con periodontitis, específicamente pSTAT3 presenta una mayor activación en células CD45⁺ en periodontitis, pudiendo dilucidar, con un poco más de precisión, el papel de esta proteína en la patogénesis de la enfermedad periodontal.

Como sabemos, la periodontitis se caracteriza por una dilatación vascular y aumento de la permeabilidad de los capilares sanguíneos, lo que en conjunto con una serie de eventos de quimiotaxis, concluyen en un aumento del reclutamiento de neutrófilos, monocitos, macrófagos, linfocitos y plasmocitos, en el tejido conectivo (Dutzan y cols., 2016; Kurgan y Kantarci, 2018). Los neutrófilos quienes migran en primera instancia a los tejidos periodontales inflamados, están directamente influenciados por STAT3, en estudios donde se evalúan a individuos con síndrome hiper-IgE, quienes poseen una deficiencia autosómica en el gen que codifica para STAT3, se ha descrito también una muerte anticipada de neutrófilos (Farmand y cols., 2018).

Por otro lado, sabemos también que durante el proceso inflamatorio en periodontitis, monocitos migran al sitio de inflamación y se diferencian en macrófagos (Kurgan y Kantarci, 2018). Wu y colaboradores identificaron una activación significativa de STAT3 en monocitos de muestras de tejido de carcinoma hepatocelular (Wu y cols., 2011). De hecho, se ha descrito que la activación de STAT3 participa específicamente en la diferenciación de monocitos a macrófagos (Vasamsetti y cols., 2015). En el año 2019, Wan y colaboradores observaron la expresión y activación de esta proteína en células de ligamento periodontal en un modelo experimental de periodontitis apical en ratas, donde pSTAT3 se concentraba en el núcleo y citoplasma de linfocitos, monocitos, neutrófilos, células endoteliales vasculares, fibroblastos y osteoclastos (Wang y cols., 2019).

Los linfocitos son un grupo celular que están directamente implicados en la respuesta inmune en los tejidos gingivales inflamados. Las células B, tienen un rol importante en etapas avanzadas de enfermedad periodontal, siendo parte también del infiltrado inflamatorio que invade el tejido conectivo gingival (Kurgan y Kantarci, 2018). Deenick y colaboradores observaron de manera *in vitro*, que la activación de STAT3 es necesaria para la diferenciación de los linfocitos B a plasmocitos (Deenick y cols., 2013).

Por otro lado, dentro los linfocitos T, se ha demostrado que el subtipo de células Th17 cumple un papel fundamental en la inmunopatología de la periodontitis, siendo claves en el proceso inflamatorio destructivo de tejidos periodontales promoviendo la pérdida del hueso alveolar y otros tejidos de inserción, induciendo un desbalance en la activación de osteoclastos y reclutamiento de neutrófilos durante la inflamación periodontal (Abusleme y Moutsopoulos, 2017; Dutzan y cols., 2018; Zenobia y Hajishengallis, 2015). Como se ha mencionado anteriormente, la vía de señalización STAT3 es fundamental para la diferenciación de las células Th17 (Kane y cols., 2014). De hecho, estudios realizados tanto en modelos animales, como en seres humanos, han demostrado que la activación de STAT3 es indispensable para la activación y diferenciación de las células Th17 (Dutzan y cols., 2018; Harris y cols., 2007; Milner y cols., 2008). Estos resultados son concordantes con los encontrados en esta investigación, en donde observamos que en muestras de tejido humano con periodontitis se producía una activación significativa de esta vía, sugiriendo que estos pueden ser los tipos de células que expresarían pSTAT3 en nuestras observaciones.

La literatura actual respalda el hecho de que STAT3 participa en la activación de las principales células inmunes que están presentes en el infiltrado inflamatorio en periodontitis, nuestros resultados demuestran que existe una activación significativa de esta vía de señalización intracelular en el tejido gingival de sujetos con periodontitis.

La alta prevalencia de periodontitis, su importante carga económica y de salud pública, y el hecho de que los enfoques terapéuticos estándar no resuelven todos los casos clínicos de enfermedad periodontal (Gamonal y cols., 2010), destacan la importancia de emplear intervenciones terapéuticas de última generación y rentables (Hajishengallis, 2015). Como parte de las limitaciones de nuestra investigación analizamos un número pequeño de muestras. Por otro lado, aunque las características histológicas generales de la reacción inflamatoria son similares, es importante reconocer las limitaciones de nuestros datos, ya que la activación de las vías de señalización se determinó en muestras de tejido que incluían áreas tanto epiteliales como supracrestales de tejido conectivo, las cuales hemos demostrado que presentan variación en la severidad del infiltrado inflamatorio.

Este estudio abre una nueva línea de investigación, en la cual futuras investigaciones podrían identificar específicamente qué tipos de células inmunes son los que presentan una activación mayor de STAT3 en periodontitis, tales como, linfocitos T, macrófagos, neutrófilos, entre otros, y así poder determinar con más precisión el papel de esta proteína en la patogénesis de la enfermedad periodontal. Posteriormente, estudios futuros podrían evaluar la inhibición de STAT3 en salud y gingivitis utilizando moléculas pequeñas, esto podría ser útil para limitar el daño tisular en casos graves de periodontitis que no responden al tratamiento estándar de atención.

10. CONCLUSIÓN

En este estudio se analizó al factor de transcripción STAT3 en tejidos gingivales humanos. Específicamente su activación en células inmunes y no inmunes de tejido gingivales de sujetos con diagnóstico de periodontitis y sanos.

A partir de los resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia, determinamos que existe una mayor presencia de células inmunes (CD45⁺) en periodontitis, siendo este marcaje mayormente detectado en el tejido conectivo. Por otro lado, STAT3 se encuentra principalmente activado en tejido gingival humano con periodontitis. Además, esta activación es mayor en tejido epitelial en comparación con tejido conectivo.

Adicionalmente, existe una mayor proporción de células inmunes CD45⁺ que activan STAT3 en tejido gingival humano con periodontitis, al comparar con tejidos sanos. Además, esta activación es mayor en tejido epitelial en comparación con tejido conectivo. En tanto, existe una mayor proporción de células no inmunes con activación de STAT3 en tejidos sanos.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Abusleme, L., Dupuy, A. K., Dutzan, N., Silva, N., Burleson, J. A., Strausbaugh, L. D., Gamonal, J., & Diaz, P. I. (2013). The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME Journal*, 7(5), 1016–1025. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.174>
- Abusleme, L., & Moutsopoulos, N. M. (2017). IL-17: overview and role in oral immunity and microbiome. *Oral Diseases*, 23(7), 854–865. <https://doi.org/10.1111/odi.12598>
- Alberts, B., Johnson, A. D., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2014). Cell Signaling. In *Molecular Biology of the Cell W. W. Norton & Company.: Vol. 6th ed.* (pp. 863–865).
- Ambili, R., Janam, P., Saneesh Babu, P. S., Prasad, M., Vinod, D., Anil Kumar, P. R., Kumary, T. V., & Asha Nair, S. (2017). Differential expression of transcription factors NF- κ B and STAT3 in periodontal ligament fibroblasts and gingiva of healthy and diseased individuals. *Archives of Oral Biology*, 82, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.05.010>
- 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>
- Bascones, A., & González Moles, M. A. (2003). Mecanismos inmunológicos de las enfermedades periodontales y periimplantarias. *Avances En Periodoncia e Implantología Oral*, 15(3). <https://doi.org/10.4321/s1699-65852003000300003>
- Birkedal-Hansen, H. (1993). Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. - birkedalhansen - 1993.pdf. In *Journal of periodontal research* (Vol. 28, Issue 6 Pt 2, pp. 500–510).

- Carpenter, A.E., Jones, T.R., Lamprecht, M. R. et al. (2006). CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol* 7, R100. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-10-r100>.
- Chapple, I. L. C. (2014). Time to take periodontitis seriously. *BMJ (Online)*, 348(April), 1–2. <https://doi.org/10.1136/bmj.g2645>
- Cheng, W. C., Hughes, F. J., & Taams, L. S. (2014). The presence, function and regulation of IL-17 and Th17 cells in periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 41(6), 541–549. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12238>
- Collino, C. J. G., Rodríguez, C., Sastre, D., Heller, V., & Fernández, E. (2006). Utilización estratégica de CD45 en la identificación de células blásticas por citometría de flujo. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 40(2), 173–180.
- Darnell, J. E. (2005). Validating Stat3 in cancer therapy. *Nature Medicine*, 11(6), 595–596. <https://doi.org/10.1038/nm0605-595>
- De Souza, J. A. C., Nogueira, A. V. B., De Souza, P. P. C., Cirelli, J. A., Garlet, G. P., & Rossa, C. (2011). Expression of suppressor of cytokine signaling 1 and 3 in ligature-induced periodontitis in rats. *Archives of Oral Biology*, 56(10), 1120–1128. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.03.022>
- Deenick, E. K., Avery, D. T., Chan, A., Berglund, L. J., Ives, M. L., Moens, L., Stoddard, J. L., Bustamante, J., Boisson-Dupuis, S., Tsumura, M., Kobayashi, M., Arkwright, P. D., Averbuch, D., Engelhard, D., Roesler, J., Peake, J., Wong, M., Adelstein, S., Choo, S., ... Tangye, S. G. (2013). Naive and memory human B cells have distinct requirements for STAT3 activation to differentiate into antibody-secreting plasma cells. *Journal of Experimental Medicine*, 210(12), 2739–2753. <https://doi.org/10.1084/jem.20130323>
- Dutzan, N., & Abusleme, L. (2019). T Helper 17 Cells as Pathogenic Drivers of Periodontitis. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1197). https://doi.org/10.1007/978-3-030-28524-1_10

- 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., Abusleme, L., Konkkel, J. E., & Moutsopoulos, N. M. (2016). Isolation, characterization and functional examination of the gingival immune cell network. *Journal of Visualized Experiments*, 2016(108), 3–7. <https://doi.org/10.3791/53736>
- 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>
- Farmand, S., Kremer, B., Häffner, M., Pütsep, K., Bergman, P., Sundin, M., Ritterbusch, H., Seidl, M., Follo, M., Henneke, P., & Henriques-Normark, B. (2018). Eosinophilia and reduced STAT3 signaling affect neutrophil cell death in autosomal-dominant Hyper-IgE syndrome. *European Journal of Immunology*, 48(12), 1975–1988. <https://doi.org/10.1002/eji.201847650>
- Freeman, A. F., Domingo, D. L., & Holland, S. M. (2009). Hyper IgE (Job's) syndrome: A primary immune deficiency with oral manifestations. *Oral Diseases*, 15(1), 2–7. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2008.01463.x>
- G. Caton, J., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I. L. C., Jepsen, S., S. Kornman, K., L. Mealey, B., Papapanou, P. N., Sanz, M., & S. Tonetti, M. (2018). A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(March), S1–S8. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12935>

- Gaffen, S. L. (2009). Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nature Reviews Immunology*, 9(8), 556–567. <https://doi.org/10.1038/nri2586>
- Gaffen, S. L. (2011). Recent advances in the IL-17 cytokine family. *Current Opinion in Immunology*, 23(5), 613–619. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.07.006>
- Gamonal, J., Mendoza, C., Espinoza, I., Muñoz, A., Urzúa, I., Aranda, W., Carvajal, P., & Arteaga, O. (2010). Clinical Attachment Loss in Chilean Adult Population: First Chilean National Dental Examination Survey. *Journal of Periodontology*, 81(10), 1403–1410. <https://doi.org/10.1902/jop.2010.100148>
- Garcia de Aquino, S., Manzolli Leite, F. R., Stach-Machado, D. R., Francisco da Silva, J. A., Spolidorio, L. C., & Rossa, C. (2009). Signaling pathways associated with the expression of inflammatory mediators activated during the course of two models of experimental periodontitis. *Life Sciences*, 84(21–22), 745–754. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.03.001>
- Hajishengallis, G. (2014). Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: Keystones, pathobionts, and host response. *Trends in Immunology*, 35(1), 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.09.001>
- Hajishengallis, G. (2015). Periodontitis: From microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 15(1), 30–44. <https://doi.org/10.1038/nri3785>
- 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>
- Hillmer, E. J., Zhang, H., Li, H. S., & Watowich, S. S. (2016). STAT3 signaling in immunity. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 31(2015), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2016.05.001>

- Holland, S. M., DeLeo, F. R., Elloumi, H. Z., Hsu, A. P., Uzel, G., Brodsky, N., Freeman, A. F., Demidowich, A., Davis, J., Turner, M. L., Anderson, V. L., Darnell, D. N., Welch, P. A., Kuhns, D. B., Frucht, D. M., Malech, H. L., Gallin, J. I., Kobayashi, B. (2007). STAT3 Mutations in the Hyper-IgE Syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 1608–1619.
- Hox, V., O’Connell, M. P., Lyons, J. J., Sackstein, P., Dimaggio, T., Jones, N., Nelson, C., Boehm, M., Holland, S. M., Freeman, A. F., Twardy, D. J., Olivera, A., Metcalfe, D. D., & Milner, J. D. (2016). Diminution of signal transducer and activator of transcription 3 signaling inhibits vascular permeability and anaphylaxis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138(1), 187–199. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.11.024>
- 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), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02071-9>
- Huang, N., Dong, H., Luo, Y., & Shao, B. (2021). Th17 Cells in Periodontitis and Its Regulation by A20. *Frontiers in Immunology*, 12(September), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.742925>
- 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>
- 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>

- Kornman, K., Page, R., & Tonetti, M. (1997). The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontology 2000*, 24(1), 193–214. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2000.2240109.x>
- Kornman, K. S. (2018). Contemporary approaches for identifying individual risk for periodontitis. *Periodontology 2000*, 78(1), 12–29.
- Kurgan, S., & Kantarci, A. (2018). Molecular basis for immunohistochemical and inflammatory changes during progression of gingivitis to periodontitis. *Periodontology 2000*, 76(1), 51–67. <https://doi.org/10.1111/prd.12146>
- 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>
- Milner, J. D., Brenchley, J. M., Laurence, A., Freeman, A. F., Hill, B. J., Elias, K. M., Kanno, Y., Spalding, C., Elloumi, H. Z., Paulson, M. L., Davis, J., Hsu, A., Asher, A. I., O’Shea, J., Holland, S. M., Paul, W. E., & Douek, D. C. (2008). Impaired TH17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome. *Nature*, 452(7188), 773–776. <https://doi.org/10.1038/nature06764>
- Moffatt, C. E., & Lamont, R. J. (2011). Porphyromonas gingivalis induction of microRNA-203 expression controls suppressor of cytokine signaling 3 in gingival epithelial cells. *Infection and immunity*, 79(7), 2632–2637. <https://doi.org/10.1128/IAI.00082-11>
- Morales, A., Carvajal, P., Romanelli, H., Gómez, M., Loha, C., Esper, M. E., Musso, G., Ardila, C. M., Duque, A., Medina, M., Bueno, L., Andrade, E., Mendoza, C., & Gamonal, J. (2015). Prevalence and predictors for clinical attachment loss in adolescents in Latin America: Cross-sectional study. *Journal of Clinical Periodontology*, 42(10), 900–907. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12452>
- O’leary, T. J., Drake, R. B., & Naylor, J. E. (1972). The Plaque Control Record PLAQUE CONTROL RECORD-PRESENT INDEX PLAQUE CONTROL RECORD the

locations where plaque accumulates and in the pa. *Journal of Periodontology*, 43(1), 38.

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>

Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D. H., Flemmig, T. F., Garcia, R., Giannobile, W. V., Graziani, F., Greenwell, H., Herrera, D., Kao, R. T., Kerschull, M., Kinane, D. F., Kirkwood, K. L., Kocher, T., Kornman, K. S., Kumar, P. S., ... Tonetti, M. S. (2018). Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Periodontology*, 89(March), S173–S182. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0721>

Park, H., Li, Z., Yang, X. O., Chang, S. H., Nurieva, R., Wang, Y. H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., & Dong, C. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature Immunology*, 6(11), 1133–1141. <https://doi.org/10.1038/ni1261>

Peres, M. A., Macpherson, L. M. D., Weyant, R. J., Daly, B., Venturelli, R., Mathur, M. R., Listl, S., Celeste, R. K., Guarnizo-Herreño, C. C., Kearns, C., Benzon, H., Allison, P., & Watt, R. G. (2019). Oral diseases: a global public health challenge. *The Lancet*, 394(10194), 249–260. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31146-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31146-8)

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)

- Plaza, J. A. (2019). TESIS PARA OPTAR A TÍTULO CIRUJANO DENTISTA: *ACTIVACIÓN DE STAT3 EN TEJIDO GINGIVAL EN PERIODONTITIS*.
- Riley, J. K., Takeda, K., Akira, S., & Schreiber, R. D. (1999). Interleukin-10 Receptor Signaling through the JAK-STAT Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 274(23), 16513–16521. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.23.16513>
- Séguier, S., Godeau, G., & Brousse, N. (2000). Collagen fibers and inflammatory cells in healthy and diseased human gingival tissues: a comparative and quantitative study by immunohistochemistry and automated image analysis. *Journal of periodontology*, 71(7), 1079–1085. <https://doi.org/10.1902/jop.2000.71.7.1079>
- Seymour, G. J., Powell, R. N., Cole, K. L., Aitken, J. F., Brooks, D., Beckman, I., Zola, H., Bradley, J., & Burns, G. F. (1983). Experimental gingivitis in humans. In *Journal of Periodontal Research* Vol. 18, (375–385). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1983.tb00373.x>
- Shen, F., & Gaffen, S. L. (2008). Structure-function relationships in the IL-17 receptor: Implications for signal transduction and therapy. *Cytokine*, 41(2), 92–104. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2007.11.013>
- Siegel, A. M., Stone, K. D., Cruse, G., Lawrence, M. G., Olivera, A., Jung, M., Barber, J. S., Freeman, A. F., Holland, S. M., O'Brien, M., Jones, N., Wisch, L. B., Kong, H. H., Desai, A., Farber, O., Gilfillan, A. M., Rivera, J., & Milner, J. D. (2013). Diminished allergic disease in patients with STAT3 mutations reveals a role for STAT3 signaling in mast cell degranulation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 132(6), 1388–1396.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.08.045>
- 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>

- Stark, G. R., & Darnell, J. E. (2012). The JAK-STAT Pathway at Twenty. *Immunity*, 36(4), 503–514. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.013>
- Steward-Tharp, S. M., Laurence, A., Kanno, Y., Kotlyar, A., Villarino, A. V., Sciume, G., Kuchen, S., Resch, W., Wohlfert, E. A., Jiang, K., Hirahara, K., Vahedi, G., Sun, H. W., Feigenbaum, L., Milner, J. D., Holland, S. M., Casellas, R., Powrie, F., & O'Shea, J. J. (2014). A mouse model of HIES reveals pro- And anti-inflammatory functions of STAT3. *Blood*, 123(19), 2978–2987. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-09-523167>
- Takeda, K., Clausen, B. E., Kaisho, T., Tsujimura, T., Terada, N., Förster, I., & Akira, S. (1999). Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity*, 10(1), 39–49. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80005-9](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80005-9)
- 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. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12732>
- Tonetti, M. S., & Sanz, M. (2019). Implementation of the new classification of periodontal diseases: Decision-making algorithms for clinical practice and education. *Journal of Clinical Periodontology*, 46(4), 398–405. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13104>
- Vasamsetti, S. B., Karnewar, S., Kanugula, A. K., Thatipalli, A. R., Kumar, J. M., & Kotamraju, S. (2015). Metformin inhibits monocyte-to-macrophage differentiation via AMPK-mediated inhibition of STAT3 activation: potential role in atherosclerosis. *Diabetes*, 64(6), 2028–2041. <https://doi.org/10.2337/db14-1225>
- Vogel, T. P., Milner, J. D., & Cooper, M. A. (2015). The Ying and Yang of STAT3 in Human Disease. *Journal of Clinical Immunology*, 35(7), 615–623. <https://doi.org/10.1007/s10875-015-0187-8>

- Wang, L., Jin, H., Ao, X., Dong, M., Liu, S., Lu, Y., & Niu, W. (2019). JAK2-STAT3 signaling pathway is involved in rat periapical lesions induced by *Enterococcus faecalis*. *Oral diseases*, 25(7), 1769–1779. <https://doi.org/10.1111/odi.13169>
- Wang, Y., Shen, Y., Wang, S., Shen, Q., & Zhou, X. (2018). The role of STAT3 in leading the crosstalk between human cancers and the immune system. *Cancer Letters*, 415, 117–128. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.12.003>
- Williams, L., Bradley, L., Smith, A., & Foxwell, B. (2004). Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Is the Dominant Mediator of the Anti-Inflammatory Effects of IL-10 in Human Macrophages. *The Journal of Immunology*, 172(1), 567–576. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.1.567>
- Woudstra, L., Biesbroek, P. S., Emmens, R. W., Heymans, S., Juffermans, L. J., van der Wal, A. C., van Rossum, A. C., Niessen, H., & Krijnen, P. (2016). CD45 is a more sensitive marker than CD3 to diagnose lymphocytic myocarditis in the endomyocardium. *Human Pathology*, 45(4). <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2016.11.006>
- Wu, R., Sun, S., & Steinberg, B. M. (2003). Requirement of STAT3 activation for differentiation of mucosal stratified squamous epithelium. *Molecular Medicine*, 9(3–4), 77–84. <https://doi.org/10.2119/2003-00001.wu>
- Wu, W. Y., Li, J., Wu, Z. S., Zhang, C. le, & Meng, X. L. (2011). STAT3 activation in monocytes accelerates liver cancer progression. *BMC Cancer*, 11, 0–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-506>
- Younes, R., Ghorra, C., Khalife, S., Igondjo-Tchen-Changotade, S., Yousfi, M., Willig, C., Senni, K., Godeau, G., & Naaman, N. (2009). Pertinent cell population to characterize periodontal disease. *Tissue and Cell*, 41(2), 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2008.09.003>

Zenobia, C., & Hajishengallis, G. (2015). Basic biology and role of interleukin-17 in immunity and inflammation. *Periodontology* 2000, 69(1), 142–159.
<https://doi.org/10.1111/prd.12083>

11. ANEXOS

Anexo 1:



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 con 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 con lo solicitado, usted puede redistribuir anualmente los recursos, de acuerdo con 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,

Presidente
Consejo Superior de Ciencia


MARIO HAMUY WACKENHUT
presidente
Consejo Superior de Desarrollo Tecnológico

Anexo 2:



Anexo 3:

Periodontal Pocket Chart



Patient Name: _____
 Date of Birth: ____/____/____

Upper Teeth

Buccal	3	M																	M	3
		R																	R	
		PD																	PD	
Buccal	2	M																	M	2
		R																	R	
		PD																	PD	
Buccal	1	M																	M	1
		R																	R	
		PD																	PD	
			8	7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	8		
Palatal	1	PD																	PD	1
		R																	R	
		M																	M	
Palatal	2	PD																	PD	2
		R																	R	
		M																	M	
Palatal	3	PD																	PD	3
		R																	R	
		M																	M	

Lower Teeth

Ungual	3	M																	M	3
		R																	R	
		PD																	PD	
Ungual	2	M																	M	2
		R																	R	
		PD																	PD	
Ungual	1	M																	M	1
		R																	R	
		PD																	PD	
			8	7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	8		
Buccal	1	PL																	PD	1
		R																	R	
		M																	M	
Buccal	2	PD																	PD	2
		R																	R	
		M																	M	
Buccal	3	PD																	PD	3
		R																	R	
		M																	M	

Key: PD = Probing Depth; R = Recession; M= Mobility
 Use ∇ to chart furcation involvement

Plaque Score

3	X																3		
2	X																2		
1	X																1		
		8	7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	8		
1	X																1		
2	X																2		
3	X																3		

Chart Timelines

1: Date: ____/____/____
 Clinician: _____

2: Date: ____/____/____
 Clinician: _____

3: Date: ____/____/____
 Clinician: _____

Version 1.0 © 2017 British Society of Periodontology

Ficha Clínica

Proyectos FONDECYT 11810389 y 11180505

Encuestador: A continuación, se presenta un cuestionario que debe rellenar con los datos del paciente. Sea concreto en sus preguntas ya que estas son específicas y tienen como objetivo evaluar los criterios de inclusión y exclusión de la investigación

Fecha de examen:

Nombre:

Rut:

teléfono:

Fecha de nacimiento:

Edad:

Sexo biológico:

Ocupación:

Enseñanza media:

Completa

Si es completa, especificar cursos

superiores Incompleta

Si es incompleta, especificar ultimo curso alcanzado

Previsión de salud:

Si es FONASA: Especificar

Hábitos:

Tabaco (último año)

Sí No

Promedio de

cigarros/día: Inicio del

consumo:

Antecedentes Sistémicos

Diabetes:

Sí No

VIH:

Sí No

Antecedente de cáncer, Quimioterapia o radioterapia en los últimos 5 años: Sí No

Enfermedades de Coagulación:

Sí No

Enfermedades Autoinmunes (Lupus, Artritis, E. de Crohn, Psoriasis artrítica) Sí No

Otras enfermedades:

Sí No

Alergias

Medicamentos en uso.

Corticoides (últimos 3 meses) Sí No

Antibióticos sistémicos en uso (últimos 3 meses) Sí No

Inmunosupresores Sí No

Probióticos de uso comercial en altas dosis (no considerar lácteos y otros derivados) Sí No

Otros medicamentos:

Antecedentes Quirúrgicos/Hospitalizaciones:

Cáncer en los últimos 5 años Sí No

Radioterapia en cabeza y cuello en los últimos 5 años Sí No

Consignar número de hospitalizaciones en los últimos 3 años; ¿Mas de 3 hospitalizaciones? Sí No

Posibilidad de embarazo: Sí No

Signos vitales:

Presión
Arterial:

Pulso:

IMC:

Número de dientes:

Examen periodontal básico

Anexar Periodontograma:

Anexar exámenes complementarios

(Radiografías): Anexar Exámenes de sangre:

Diagnóstico:

Pronóstico General:

Pronóstico Particular:

Plan de Tratamiento:

Evolución del tratamiento:

Anexo 4:

Criterios de inclusión para participar en el estudio serán:

Pacientes grupo inflamación:

- Cumplir con la definición de caso de periodontitis.

Periodontitis

1.- El paciente presenta pérdida de NIC interproximal detectable en ≥ 2 dientes no adyacentes.

O

2.- El paciente presenta pérdida de NIC vestibular o palatino ≥ 3 mm en conjunto con PS > 3 mm en ≥ 2 dientes.

- Tener una edad ≥ 18 años.
- Mínimo 20 dientes en boca.
- Voluntad de donar tejido gingival para el estudio.

Pacientes grupo sanos:

- Cumplir con la definición de caso de salud periodontal.
- ≥ 18 años. Mínimo 20 dientes.
- Voluntad de donar tejido gingival para el estudio.

Los criterios de exclusión para participar en el estudio serán:

- Hepatitis B o C positivo.
- VIH positivo.
- Terapia de radiación de cabeza o cuello.
- Encontrarse en tratamiento de cáncer
- Haber sido tratado con quimioterapéuticos sistémico o terapia de radiación durante los últimos 5 años.
- Embarazo o lactancia.
- Diagnóstico de diabetes y/o niveles de hemoglobina glicosilada mayor a 6%.
- Mas de 3 hospitalizaciones en los últimos 3 años.
- Tener desorden autoinmune como Lupus, Artritis reumatoide, etc.
- Tener desórdenes en la coagulación o condiciones asociadas con sangrado (Coagulopatías como: Hemofilia, Enfermedad de von Willenbrand, etc.)
- Haber usado en los últimos tres meses:
 - a) Antibióticos sistémicos (intravenoso, intramuscular u oral).
 - b) Corticoesteroides u otro inmunosupresor (por ejemplo, ciclosporina).
 - c) Terapia con citoquinas.
 - d) Metotrexato o algún otro agente químico inmunosupresor.
 - e) Probióticos de uso comercial en altas dosis ($\geq 10^8$ unidades formadoras de colonias por día) en formato de tableta, capsulas, polvo, etc. No aplica para exclusión del individuo el uso de alimentos/líquidos fermentados, por ejemplo, leche, yogurts, etc.

Anexo 5:

Edición del CI 11/01/2019



Consentimiento Informado Para Participación en Proyecto de Investigación Dirigido a Adultos

Título del Protocolo: Investigando a STAT3 y su posible rol en la patogénesis de la periodontitis.

Investigador Principal: Nicolás Dutzan Muñoz

Sede de Estudio: Facultad de Odontología, Universidad de Chile – Sergio Livingstone 943 – Independencia, Santiago.

Nombre del Participante:

.....

Este documento de Consentimiento Informado se aplicará a pacientes adultos, y consta de dos partes:

- Información (proporciona información sobre el estudio para usted).
 - Formulario de Consentimiento (para firmar si está de acuerdo en participar).
- Ud. recibirá una copia completa del Documento de Consentimiento Informado.

Mi nombre es Nicolás Dutzan y soy académico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Estoy realizando una investigación cuyo objetivo es caracterizar y comparar la activación de la molécula STAT3 en la mucosa oral en estados de salud y durante periodontitis y gingivitis (estados inflamatorios). Esta molécula es clave en procesos inflamatorios en otras partes del cuerpo humano, pero su rol en las enfermedades inflamatorias de la boca se desconoce. Los resultados obtenidos podrían ayudar a conocer mejor los eventos que caracterizan la inflamación y destrucción de tejidos orales. En conjunto con otros estudios, nuestra idea es implementar a futuro, nuevos tratamientos que den solución a los casos mas severos y que no responden al tratamiento convencional

Le proporcionaré información y lo/la invitaré a ser parte de este proyecto. No tiene que decidir hoy si lo hará o no. Antes de tomar su decisión puede hablar acerca de la investigación con cualquier persona de su confianza. Este proceso se conoce como Consentimiento Informado y puede que contenga términos que usted no comprenda, por lo que siéntase con la absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude aclarar sus dudas al respecto. Una vez aclarada todas sus consultas y después que haya comprendido los objetivos de la Investigación y si usted desea participar, se le solicitará que firme este formulario.

CEI-SSM.NORTE
Organismo Asesor de la Dirección
Servicio de Salud
Metropolitano Norte

20 MAR 2019

Justificación de la Investigación

En Chile, la mayoría de la población adulta esta afectada por una enfermedad denominada Periodontitis, lo que la convierte en un grave problema de salud pública.

Esta condición se caracteriza por la inflamación y destrucción progresiva de los tejidos que soportan los dientes. En estados severos, la periodontitis puede llevar a la pérdida de dientes, puede modificar otras patologías como diabetes o enfermedad cardiovascular y disminuye la calidad de vida de los afectados.

El tratamiento convencional de la periodontitis disminuye la inflamación y destrucción de tejido, retrasando la pérdida de los dientes. Lamentablemente, este tratamiento no es efectivo para todos los casos. Es por este motivo que es necesario el estudio detallado de esta patología para generar nuevo conocimiento y desarrollar nuevas terapias.

Nuestros estudios previos han demostrado que en las encías inflamadas hay un aumento células con un rol clave en la inflamación y destrucción de tejidos de soporte de los dientes. Para poder desarrollarse y ejercer sus efectos dañinos, estas células necesitan la activación de una molécula específica (STAT3).

En el presente estudio, investigaremos la activación de STAT3 en la mucosa oral con la idea de entender un poco mas las enfermedades inflamatorias y destructivas de las encías y en el futuro proponer nuevas terapias para sujetos con diagnósticos mas severos y de difícil tratamiento.

Objetivo de la Investigación

Nuestro objetivo es caracterizar y comparar la activación de la molécula STAT3 en la mucosa oral en estados de salud y durante periodontitis y gingivitis (estados inflamatorios).

Beneficio de la Investigación.

Todos los pacientes recibirán diagnóstico y de ser necesario, tratamiento dental correspondiente sin costo.

A todos los pacientes participantes del estudio se les hará entrega de todos los elementos necesarios para la higiene bucal (cepillo dentario y/o cepillo interproximal y/o seda y/o enjuagatorios).

El paciente o su sistema previsional deberá costear los gastos de exámenes incluyendo radiografías.

Tipo de Intervención y Procedimiento.

Si usted decide participar se le realizará un examen dental para efectos del diagnóstico de su patología, se obtendrá una biopsia (pequeño pedazo de tejido) y si es necesario se realizará el tratamiento periodontal. Tanto la toma de la biopsia como los procedimientos de tratamiento se realizarán bajo anestesia local.

Procedimientos del tratamiento periodontal estándar:

Tratamiento periodontal no quirúrgico:

Este tratamiento puede incluir instrumentación mecánica de los dientes para remover calculo y placa bacteriana adherida las raíces y coronas dentarias.

Tratamiento periodontal quirúrgico:

Este tratamiento puede incluir una cirugía de colgajo submucoso localizado para el desbridamiento del tejido inflamado, eliminación de placa bacteriana en zonas de difícil acceso y re-contorneo de tejidos óseos y mucosos. Este tratamiento también puede incluir extracción de dientes infectados y con mal pronóstico.

Los tejidos de desecho producto del tratamiento periodontal quirúrgico, serán utilizados para investigación. El tamaño y el tipo de tejido a obtener va a depender sus necesidades de tratamiento. Estos tejidos de desecho incluyen, pero no están limitados a tejido gingival, mucosa oral, tejido de granulación, hueso alveolar, dientes. No se obtendrán mas tejidos que los que los estrictamente necesarios para realizar el tratamiento periodontal estándar.

CEI-SSM.NORTE
Organismo Asesor de la Dirección
Servicio de Salud
Metropolitano Norte

20 MAR 2019

2

Riesgo de la Investigación.

Todos los posibles riesgos de esta investigación son mínimos debido a que todos los procedimientos son parte de la atención dental de rutina y se encuentran estandarizados.

En caso de presentar algún problema será tratado en forma inmediata por el director del presente estudio y del equipo que trabaja en el desarrollo del proyecto de investigación.

Los riesgos según procedimientos son:

Evaluación intraoral y periodontal:

Se realizarán exámenes de rutina necesarios para el diagnóstico de los pacientes. Los riesgos de un examen intraoral/periodontal de rutina incluyen molestias menores durante y después de los procedimientos como también un sangramiento menor de las encías e inflamación de estas.

Radiografías:

Se solicitarán radiografías según la necesidad diagnóstica o de tratamiento de cada paciente. La acumulación máxima de exposición a radiación ionizante por año producto de esas radiografías serán de 6.9 millirem (0.069mSv) (esto incluye una radiografía panorámica más radiografías periapicales de todos los dientes). Esta acumulación está por debajo de las normativas internacionales de 5000mrem por año permitidos para sujetos participantes en estudios clínicos (fuente: NIH Radiation Safety Committee) y menor al promedio de exposición a radiación ionizante medioambiental de una persona al año (300 millirem aproximadamente). Para minimizar el riesgo, las radiografías serán realizadas por personal de la Clínica Odontológica de la Universidad de Chile altamente entrenado, los cuales seguirán las precauciones de seguridad establecidas.

Biopsias Orales:

Las biopsias orales pueden causar molestias moderadas, dolor e inflamación en el sitio de toma por 3 a 4 días. Estos síntomas pueden ser tratados con antiinflamatorios no esteroideos (AINES) si fuese necesario. Eventos como sangrado e infección en el sitio de la biopsia son de ocurrencia mínima debido a que la técnica ha sido estandarizada y perfeccionada para evitar complicaciones y debido al pequeño tamaño de la biopsia.

Tratamiento periodontal:

No quirúrgico:

El tratamiento periodontal tiene el riesgo de provocar sangramiento gingival y molestias menores luego del procedimiento. Se aplicarán medidas de control de hemostasia y uso de AINES de ser necesario.

Cirugías Periodontales:

La complicación posoperatoria más común luego de una cirugía periodontal es dolor e inflamación durante la semana poscirugía. En el 5% de los casos se podría observar infección del sitio intervenido. Se tomarán todas las medidas estándares para evitar infecciones y se prescribirán antibióticos en caso de diagnosticar una infección.

Extracciones dentales por indicación periodontal:

Las complicaciones más comunes asociadas a la extracción dental incluyen: Dolor posoperatorio, sangrado, infección. Se prescribirán antibióticos y/o AINES de ser necesario en conjunto con intervenciones necesarias para eliminar infecciones o sangrado.

CEI-SSM.NORTE
Organismo Asesor de la Dirección
Servicio de Salud
Metropolitano Norte
20 MAR 2019

Criterios para selección de los participantes en el estudio

Criterios de inclusión:

Pacientes grupo inflamación:

1. Cumplir con la definición de caso de gingivitis y/o periodontitis
2. ≥ 18 años
3. Mínimo 20 dientes
4. Voluntad de donar tejido gingival para el estudio

Pacientes grupo sanos:

1. Cumplir con la definición de caso de salud periodontal
2. ≥ 18 años
3. Mínimo 20 dientes
4. Voluntad de donar tejido gingival para el estudio

Criterios de exclusión:

1. Hepatitis B o C positivo
2. VIH positivo
3. Terapia de radiación de cabeza o cuello
4. Tener algún cáncer activo.
5. Haber sido tratado con quimioterapéuticos sistémicos o terapia de radiación durante los últimos 5 años
6. Embarazo o lactancia
7. Diagnóstico de diabetes y/o niveles de hemoglobina glicosilada mayor a 6%
8. Mas de 3 hospitalizaciones en los últimos 3 años
9. Tener desorden autoinmune como Lupus, Artritis reumatoide, etc.
10. Tener desordenes en la coagulación o condiciones asociadas con sangrado como hemofilia, enfermedad de von Willenbrand, etc.
11. Haber usado tabaco en el último año previo al examen
12. Haber usado en los últimos tres meses:
 - a) Antibióticos sistémicos (intravenoso, intramuscular u oral)
 - b) Corticoesteroides u otro inmunosupresor (por ejemplo, ciclosporina)
 - c) Terapia con citoquinas
 - d) Metotrexato o algún otro agente químico inmunosupresor
 - e) Probióticos de uso comercial en altas dosis ($\geq 10^8$ unidades formadoras de colonias por día) en formato de tableta, capsulas, polvo, etc. No aplica para exclusión del individuo el uso de alimentos/líquidos fermentados, por ejemplo, leche, yogurts, etc.

Confidencialidad y difusión de datos.

La información obtenida de la Investigación, respecto de la identificación de participantes, será mantenida con estricta confidencialidad por el investigador. El nombre y datos personales de Usted serán codificados para el uso en este estudio y no serán identificados públicamente. Los resultados emanados de este estudio podrán ser publicados en revistas científicas.

Sus muestras pueden ser guardadas por un máximo 10 años y ser utilizadas en otros proyectos de investigación asociados y/o futuros. Sus muestras no se utilizarán para testear desórdenes genéticos familiares.

CEI-SSM.NORTE
Organismo Aesor de la Dirección
Servicio de Salud
Metropolitano Norte
20 MAR 2019

Aclaraciones

- La participación es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la intervención y/o participación.
- Si usted decide puede retirarse cuando lo desee.
- No tendrá que efectuar gasto alguno como consecuencia del estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- Usted podrá solicitar información actualizada sobre el estudio, al investigador responsable.
- La información obtenida de la Investigación, respecto de la identificación de pacientes, será mantenida con estricta confidencialidad por los investigadores.
- Si considera que no existen dudas ni preguntas acerca de su participación, puede si lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado anexa al documento.

CEI-SSM.NORTE
Organismo Asesor de la Dirección
Servicio de Salud
Metropolitano Norte



20 MAR 2019

Carta de Consentimiento Informado

A través de la presente, declaro y manifiesto, libre y espontáneamente, y en consecuencia, acepto que:

1. He leído y comprendido la información anteriormente entregada y que mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria.
2. He sido informado(a) y comprendo la necesidad y fines de ser atendido.
3. Tengo conocimiento del procedimiento a realizar.
4. Conozco los beneficios de participar en la Investigación.
5. Además de esta información que he recibido, seré informado(a) en cada momento y al requerimiento de la evolución de mi proceso, de manera verbal y/o escrita si fuera necesaria y al criterio del investigador.
6. Autorizo a usar mi caso para investigación y para ser usado como material audiovisual en clases, protegiendo mi identidad.
7. Autorizo a almacenar mis muestras de tejido por 10 años y a ser utilizadas en otros proyectos futuros y/o asociados.
8. En caso de cualquier duda puedo acudir a la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, ubicada en Sergio Livingstone 943, Independencia, Santiago.
9. Si Ud. desea consultar sobre sus derechos como sujeto de investigación o piensa que estos han sido vulnerados se puede dirigir al Comité de Ética de la Investigación del Servicio de Salud Metropolitano Norte. Uicado en calle San José N°1053, Independencia, Santiago. Teléfono:+56-2-25758506.

Doy mi consentimiento al investigador y al resto de colaboradores, a realizar el procedimiento diagnóstico pertinente, PUESTO QUE SE QUE ES POR MI PROPIO INTERÉS.

Nombre del Paciente: _____

Firma: _____

Fecha: _____

Sección a llenar por el Investigador Principal

He explicado al Sr(a) _____ la naturaleza de la investigación, le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que conozco la normativa vigente para realizar la investigación con seres humanos y me apego a ella.

Nombre del Investigador Principal: _____

Firma: _____

Fecha: _____

Nombre del Director del establecimiento donde realiza la investigación o de su representante

Firma: _____

Fecha: _____

GEI-SSM.NORTE
Organismo Asesor de la Dirección
Servicio de Salud
Metropolitano Norte

June

20 MAR 2019