



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA**  
DEPARTAMENTO DE ODONTOLÓGÍA CONSERVADORA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL  
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA ORAL  
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN TRANSLACIONAL  
CRANEOFACIAL

**“ACTIVACIÓN DE STAT3 EN TEJIDO GINGIVAL EN PERIODONTITIS”**

**José Antonio Plaza Santibáñez**

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

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dr. Nicolás Raúl Dutzan Muñoz**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Dra. Montserrat Reyes Rojas**

**Dra. Loreto Abusleme Ramos**

**ASESORES**

**Dra. Marion Arce Paniagua**

**Adscrito a Proyecto FONDECYT Iniciación 11180389**

**Santiago – Chile**

**2020**







**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA**  
DEPARTAMENTO DE ODONTOLÓGÍA CONSERVADORA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL  
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA ORAL  
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN TRANSLACIONAL  
CRANEOFACIAL

**“ACTIVACIÓN DE STAT3 EN TEJIDO GINGIVAL EN PERIODONTITIS”**

**José Antonio Plaza Santibáñez**

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

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dr. Nicolás Raúl Dutzan Muñoz**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Dra. Montserrat Reyes Rojas**

**Dra. Loreto Abusleme Ramos**

**ASESORES**

**Dra. Marion Arce Paniagua**

**Adscrito a Proyecto FONDECYT Iniciación 11180389**

**Santiago – Chile**

**2020**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres, por apoyarme desde pequeño en los proyectos que me he propuesto.

A Ederson, por creer siempre en mí.

A mi tutor Nicolás Dutzan, por permitirme participar en este proyecto, acercarme a la investigación, guiarme en este proceso y tener siempre la mejor disposición.

A mi tutora Montserrat Reyes junto con María José Flores, por recibirme con cariño y enseñarme con dedicación a trabajar en el laboratorio.

A mis amigos y amigas, por recorrer junto a mi este camino.

A la Universidad de Chile, por formarme como profesional y hacerme crecer como persona.

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b>	<b>7</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>8</b>
<b>3. MARCO TEÓRICO</b>	<b>9</b>
3.1 PERIODONTITIS Y SU IMPORTANCIA	9
3.2 RESPUESTA INMUNE Y PERIODONTITIS	9
3.3 ROL DE STAT3 EN LA DIFERENCIACIÓN DE LINFOCITOS TH17	11
3.4 PARTICIPACIÓN DE STAT3 EN DIFERENTES TEJIDOS	13
3.5 ACTIVACIÓN DE LA VÍA STAT3 EN ENFERMEDAD PERIODONTAL	14
3.6 RELEVANCIA DEL ESTUDIO	15
<b>4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
4.1 HIPÓTESIS	17
4.2 OBJETIVO GENERAL	17
4.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
<b>5. METODOLOGÍA</b>	<b>18</b>
5.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	18
5.2 SELECCIÓN DE VOLUNTARIOS	18
5.3 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	20
5.4 ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO	21
5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	22
5.6 DETERMINACIÓN DE LA MUESTRA	22
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>24</b>
6.1 INDIVIDUOS EVALUADOS	24
6.2 INDIVIDUOS SELECCIONADOS	25
6.3 ANÁLISIS DE pSTAT3 EN LOS TEJIDOS GINGIVALES	27

<b>7. DISCUSIÓN</b>	<b>31</b>
7.1 ACTIVACIÓN DE STAT3 EN PERIODONTITIS	31
7.2 pSTAT3 EN TEJIDO EPITELIAL	32
7.3 pSTAT3 EN TEJIDO CONECTIVO	33
7.4 TABAQUISMO	35
7.5 HIPERTENSIÓN	36
7.6 STAT3 EN OTRAS ENFERMEDADES	37
7.7 ASPECTOS IMPORTANTES	37
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>39</b>
<b>9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>40</b>
<b>10. ANEXOS</b>	<b>47</b>
10.1 ANEXO 1	47
10.2 ANEXO 2	48
10.3 ANEXO 3	49
10.4 ANEXO 4	53

## 1. RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** La periodontitis es una enfermedad crónica inflamatoria con una alta prevalencia en la población que tiene implicancias tanto a nivel local como sistémico, puede ir a modificar la presentación de otras enfermedades y aumentar su riesgo. Los linfocitos Th17, son claves en la patogénesis de la periodontitis, ya que promueven la quimiotaxis de neutrófilos, pérdida ósea y daño en los tejidos peridontales. STAT3 es un factor de transcripción primordial en la diferenciación, activación, producción de citoquinas, proliferación y supervivencia de células Th17. El objetivo de este estudio fue determinar en tejidos gingivales de sujetos con periodontitis los tipos celulares donde STAT3 se encuentra activado.

**MATERIALES Y MÉTODOS:** El diseño del estudio fue de tipo observacional y transversal. Los participantes fueron evaluados por un periodoncista, realizando un examen extra e intra-oral, diagnóstico y selección. Se tomó una muestra representativa de tejido gingival, para su posterior inmunomarcaje contra pSTAT3 (Tyr705). Se realizó el recuento de células inmunopositivas utilizando el programa Image J (NIH, USA). Los datos se analizaron utilizando el software Prism 8 (GraphPad Software, Inc). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con un valor de  $p < 0.05$ .

**RESULTADOS:** Se evaluaron clínicamente 18 individuos con necesidad de tratamiento periodontal y de acuerdo con los criterios de selección, la muestra quedó conformada por 9 individuos con periodontitis. Al cuantificar la expresión de pSTAT3, se observó una activación promedio de un  $61.79 \pm 2.13\%$  del total de células. En el tejido epitelial, la activación de STAT3 fue en promedio de un  $55.60 \pm 2.86\%$ , con la tinción ubicada principalmente en los núcleos de las células del estrato basal. En el tejido conectivo, la activación fue en promedio de un  $67.98 \pm 2.90\%$  del total de células, con la tinción ubicada en núcleo y citoplasma celular.

**CONCLUSIONES:** La vía de señalización intracelular STAT3 se encuentra activada en el tejido gingival humano de sujetos con periodontitis. Además, durante esta patología, la activación de STAT3 es mayor en tejido conectivo en comparación con tejido epitelial.

## 2. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades orales corresponden a un importante problema de salud pública en el mundo, dentro ellas destacan principalmente caries no tratada y periodontitis severa (Collaborators, 2016; Peres y cols., 2019). Por su parte, la periodontitis corresponde a una enfermedad crónica inflamatoria en donde se produce una respuesta inmune exacerbada del hospedero ante cambios disbióticos de las comunidades microbianas subgingivales, que resulta en la destrucción de las estructuras de soporte de los dientes. (Abusleme y cols., 2013; Chapple, 2014).

Comprender la patogenia de la enfermedad periodontal ha sido clave para mejorar las estrategias de manejo de esta patología. El tratamiento de la periodontitis se ha centrado principalmente en disminuir la carga bacteriana en el medio oral y modificar los factores locales que contribuyen al aumento de la carga microbiana. Sin embargo, este enfoque no es exitoso en todas las personas, pues en aproximadamente un 20 a 25% de los sujetos con periodontitis en etapas avanzadas no se produce una respuesta favorable y la enfermedad continúa progresando después del tratamiento y la fase de mantención (Kornman, 2018). Nuevos enfoques buscan complementar el tratamiento convencional, abordando las vías de señalización del hospedero implicadas en la respuesta inmunoinflamatoria de los tejidos (Hajishengallis, 2014). En ese contexto, los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, se han descrito como esenciales en la destrucción de los tejidos periodontales (Hajishengallis, 2014; Silva y cols., 2015; Wilensky y cols., 2014). Además, se ha demostrado que los linfocitos Th17 cumplen un papel fundamental en la inmunopatogenia de la periodontitis, siendo un factor clave en la destrucción del periodonto (Dutzan y cols., 2018). La vía de señalización STAT3 juega un rol clave en la diferenciación de las células Th17 (Kane y cols., 2014). Una mejor comprensión de los aspectos moleculares que regulan la respuesta inmune del hospedero podría permitir en el futuro complementar la terapia periodontal convencional, teniendo como objetivo aspectos moleculares como la vía de señalización de STAT3 durante la activación de células Th17.

### **3. MARCO TEÓRICO:**

#### **3.1 Periodontitis y su importancia:**

La periodontitis corresponde a una enfermedad crónica inflamatoria que produce la destrucción de los tejidos de soporte de los dientes, pudiendo llevar a la pérdida de éstos y comprometiendo la calidad de vida de los individuos que la padecen (Abusleme y cols., 2013; Chapple, 2014). Los factores de riesgo asociados a la periodontitis son consumo de tabaco y diabetes mal controlada. Además, la evidencia señala que obesidad, artritis reumatoide, síndrome metabólico, hiposalivación, deficiencias nutricionales, osteoporosis, cambios hormonales y estrés podrían también aumentar el riesgo de desarrollar esta patología ( Genco & Borgnakke, 2013; Chapple y cols., 2017). En cuanto a la prevalencia esta enfermedad, aumenta progresivamente con la edad, y la incidencia de esta misma aumenta bruscamente entre los 30 a 40 años (Tonetti y cols., 2017). En Chile, se ha determinado que un 93.45% de los adultos jóvenes y un 97.58% de los adultos mayores presentan signos de destrucción periodontal (Gamonal y cols., 2010).

La periodontitis, sobre todo en sus estados más severos, tiene implicancias tanto a nivel local como sistémico, ya que por medio de la diseminación hematológica de bacterias y sus toxinas, además de los mediadores inflamatorios que se originan en el periodonto inflamado, puede modificar ciertas enfermedades sistémicas y aumentar su riesgo (Genco & Borgnakke, 2013; Tonetti y cols., 2017). Algunas de estas condiciones modificables por la periodontitis son: diabetes, aterosclerosis, artritis reumatoide, neumonía por aspiración, cáncer y resultados adversos del embarazo (Hajishengallis, 2015).

#### **3.2 Respuesta inmune y periodontitis:**

Durante el desarrollo de la periodontitis se observan cambios en la diversidad y estructura ecológica de la microbiota subgingival (Abusleme y cols., 2013). Estos cambios disbióticos producen un desbalance en la respuesta inmune del hospedero,

siendo esta misma respuesta parte fundamental del daño observado en esta patología (Taubman y cols., 2005; Silva y cols., 2015).

La respuesta inmune se divide teóricamente en respuesta innata y adaptativa, ambas con células y mediadores inflamatorios específicos. Dentro de la inmunidad adaptativa se destacan los linfocitos T colaboradores (T CD4<sup>+</sup>), para los cuales se ha descrito que tienen un rol esencial en la destrucción de los tejidos periodontales (Hajishengallis, 2014; Wilensky y cols., 2014; Silva y cols., 2015). El desarrollo de la inmunidad adaptativa mediada por linfocitos T depende en gran medida de las células presentadoras de antígeno asociadas a la inmunidad innata, que después de la captura del antígeno se someten a un proceso de maduración, donde producirán distintos patrones de citoquinas que contribuirán a la posterior polarización y activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicos (Silva y cols., 2015).

Las células T CD4<sup>+</sup> vírgenes pueden diferenciarse en subconjuntos efectores de linfocitos T colaboradores o helper (Th) como lo son Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, células T auxiliares foliculares (Tfh) o T reguladores (Treg). Estos subtipos de células T CD4<sup>+</sup> poseen funciones específicas dentro de la respuesta inmune contra enfermedades infecciosas, autoinmunes y trastornos inflamatorios (Yamane & Paul, 2013; Kane, 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 (Dutzan y cols., 2017; Konkel & Moutsopoulos, 2018). En general, se ha observado que este tipo de linfocitos media respuestas que refuerzan la inmunidad innata, principalmente relacionada con la acción de neutrófilos. Además, múltiples estudios han demostrado que estos linfocitos están directamente implicados en trastornos autoinmunes y desórdenes inflamatorios (Hajishengallis, 2014; Stockinger & Omenetti, 2017; Veldhoen, 2017). Los linfocitos Th17 se caracterizan por la producción de citoquinas efectoras características como: Interleuquina 17A (IL-17A), Interleuquina 17F (IL-17F) e Interleuquina 21 (IL-21) (Kane y cols., 2014; Konkel & Moutsopoulos, 2018).



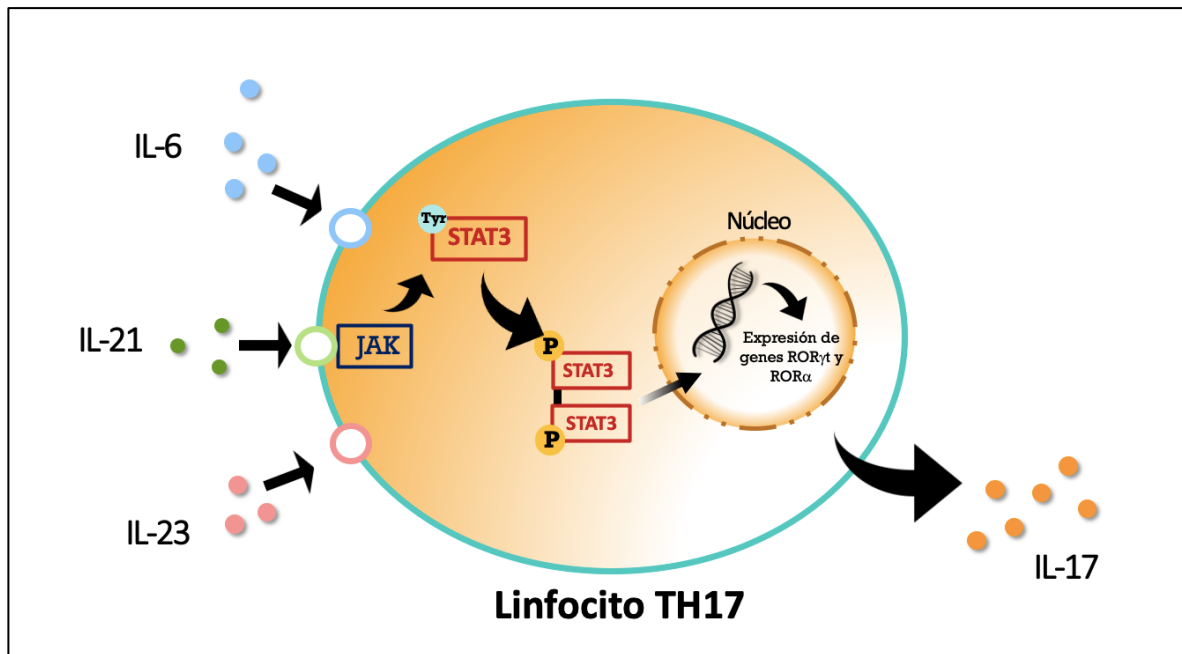
En enfermedad periodontal, se ha demostrado que los linfocitos Th17 cumplen un papel fundamental en la inmunopatogenia de la periodontitis, siendo un factor clave en la destrucción de tejidos periodontales incluyendo la pérdida del hueso alveolar y otros tejidos de inserción (Dutzan y cols., 2018). Este rol de los linfocitos Th17 en la patogénesis de la periodontitis se debe en gran parte a la producción descontrolada de IL-17A, la cual induce a un desbalance en la activación de osteoclastos y aumento del reclutamiento de neutrófilos durante la inflamación periodontal (Zenobia & Hajishengallis, 2015; Abusleme & Moutsopoulos, 2016; Dutzan y cols., 2018).

### **3.3 Rol de STAT3 en la diferenciación de linfocitos Th17:**

Durante el proceso de diferenciación de linfocitos Th17 es necesaria la participación de diferentes citoquinas estimuladoras como: factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), 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 (McGeachy y cols., 2009; Patel & Kuchroo, 2015). En este proceso, las citoquinas activan diferentes cascadas de señalización intracelular, dentro de ellas podemos encontrar las vías Janus Quinasa (JAK, por su sigla en inglés) de las cuales se han identificado cuatro tipos (JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2) que se unen selectivamente a diferentes cadenas de receptores, y a factores de transcripción denominados Transductor de Señales y Activador de Transcripción (STAT, por su sigla en inglés) de los cuales se conocen siete tipos (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B y STAT6) (Kane y cols., 2014; O'Shea y cols., 2015).

Específicamente en las células Th17, la unión de citoquinas estimuladoras como IL-6, IL-21 y IL-23 a su receptor específico, va a activar a quinasas como JAK1, JAK2 y/o TYK2. Estos complejos activan a STAT3 a través de la fosforilación de un residuo de tirosina (Tyr705). STAT3 fosforilado (pSTAT3) forma dímeros gracias a las interacciones recíprocas de los dominios de fosfotirosina-Src 2 (SH2),

para ser trasladado de esa manera al núcleo y estimular la transcripción de genes específicos que van a producir efectos potenciadores o inhibitorios en las células, además de generar cambios estructurales en la cromatina (Figura 1). (Levy & Lee, 2002; O'Shea y cols., 2015; Johnson, O'Keefe, & Grandis, 2018).



**Figura 1: Representación esquemática de la activación de la vía STAT3 en linfocitos Th17.** Citoquinas estimuladoras como IL-6, IL-21 e IL-23 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 trasladan 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.

En el proceso de diferenciación de los linfocitos Th17, STAT3 va a promover la expresión de genes como Retinoic Acid Receptor – Related orphan receptor gamma t (ROR $\gamma$ t) y Retinoic Acid Receptor – Related orphan receptor alfa (ROR $\alpha$ ), que caracterizan a este tipo de células, y a su vez va a promover la producción de citoquinas efectoras IL-17A, IL-17F e IL-21. (Kane y cols., 2014). Estudios de inhibición en modelos experimentales y estudios realizados en seres humanos con mutaciones específicas que bloquean la vía STAT3, han demostrado que la

activación de esta proteína es indispensable para la diferenciación de los linfocitos Th17 (Harris y cols., 2007; Milner y cols., 2008; Durant y cols., 2010).

### **3.4 Participación de STAT3 en diferentes tejidos:**

Esta vía de señalización tiene gran importancia en procesos de proliferación celular, diferenciación, angiogénesis, apoptosis, respuesta inmune y metástasis celular (Xiong y cols., 2014). Se han descrito diversas funciones de STAT3 en los tejidos de nuestro 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 & Lee, 2002; Nadali y cols., 2017; Nakajima & Sano, 2018). En algunos casos, la acción puede atribuirse a la inducción de un conjunto de genes blanco, pero en otros casos, a funciones no nucleares cuando STAT3 no está fosforilado, donde puede estar actuando como estimulador, represor o adaptador de señalización sin función transcripcional (O'Shea y cols., 2015).

En las células epiteliales, STAT3 va ser 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) (Y. 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 (R. Wu y cols, 2003; Luo y cols. 2014). De hecho, en pacientes con Síndrome autosómico dominante de Hiper secreción de IgE (*AD-HIES* por sus siglas en inglés) que poseen una mutación en el gen STAT3, donde esta vía de señalización se presenta con una función deficiente, se puede observar diversas lesiones epiteliales en especial en relación a mucosa oral, en lengua,

paladar y encía, manifestadas como fisuras superficiales, estrias o zonas fibróticas, además de infecciones oportunistas como candidiasis oral debido a la ausencia de células Th17, pero curiosamente estas personas no desarrollan periodontitis. (Freeman, Domingo, & Holland, 2009; Dutzan y cols., 2018)

En células inmunes, la estimulación de la vía STAT3 es necesaria para la activación y maduración de las células dendríticas (Xiong y cols., 2014), participa en la proliferación de linfocitos B y en la diferenciación terminal de monocitos. En macrófagos va a propiciar un efecto anti-inflamatorio mediado principalmente por IL-10. Además, como ya fue mencionado, STAT3 modula la respuesta inflamatoria impulsada por neutrófilos y linfocitos Th17. (Kane y cols., 2014; Levy & Lee, 2002 Hillmer y cols., 2016).

Debido a su importante rol en la proliferación celular, se ha observado que STAT3 se encuentra activado también en cánceres como el de mama y hepático (Levy & Lee, 2002; O'Shea, Holland, & Staudt, 2013; Xiong y cols., 2014). Durante la carcinogénesis, desempeña un papel importante al modificar el curso del ciclo celular, además de estimular la división celular, angiogénesis, alterar las respuestas inmunológicas por medio de la modulación de células inmunes y estromales, para propiciar la progresión tumoral (Inghirami y cols., 2005; Y. Wang y cols., 2018)

### **3.5 Activación de la vía STAT3 en enfermedad periodontal:**

La evidencia señala que la vía JAK-STAT y las citoquinas que la estimulan, tienen papeles críticos en la patogénesis de enfermedades inflamatorias y autoinmunes (O'Shea y cols., 2013). Los estudios que evalúan directamente la activación de STAT3 en enfermedad periodontal, aún son escasos. Se ha logrado determinar mediante estudios en modelos experimentales de periodontitis, una activación significativa de STAT3 en encía (García de Aquino y cols., 2009; Chavez de Souza y cols., 2011), asociado a un aumento de la inflamación y de citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 y Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )

(Chaves de Souza y cols., 2013). De manera indirecta, los efectos de esta vía se han estudiado por medio de las proteínas supresoras de señalización de citoquinas (SOCS), específicamente SOCS-3 que inhibe la acción de STAT3. En ratones con bloqueo de SOCS-3 se evidenció un aumento en la pérdida de hueso alveolar en periodontitis (Papathanasiou y cols., 2016). Además se ha demostrado que *Porphyromonas gingivalis*, importante patobionte asociado con periodontitis, es capaz de disminuir la expresión de SOCS-3, produciendo así un aumento de STAT3 (Moffatt & Lamont, 2011). Estudios de cultivos de fibroblastos de ligamentos periodontales humanos han demostrado una mayor presencia de la proteína STAT3 durante periodontitis (Ambili y cols., 2017). Al momento de escribir esta tesis no hemos encontrado estudios que describan la activación de STAT3 en tejidos gingivales humanos durante periodontitis.

### **3.6 Relevancia del estudio:**

En resumen, la periodontitis es una enfermedad inflamatoria con una alta prevalencia en la población. En nuestro organismo, va a tener implicancias tanto a nivel local como sistémico, modificando otras enfermedades y aumentando su riesgo. Durante el desarrollo de esta patología se generan cambios en la diversidad y estructura de la microbiota periodontal, que produce un desbalance en la respuesta inmune, donde se destacan los linfocitos Th17, quienes se han descrito como mediadores clave en la patogénesis de la periodontitis, promoviendo la pérdida ósea y el daño tisular en los tejidos periodontales.

La evidencia actual respalda el hecho de que STAT3 es un factor de transcripción primordial durante el proceso de maduración de los linfocitos Th17 promoviendo su diferenciación, activación, producción de citoquinas, proliferación y supervivencia. 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 clara sobre la activación de esta proteína en periodontitis, a pesar de esto, aún no existen estudios en humanos que evalúen su activación en tejido periodontal, ni tampoco certeza sobre en que tipos celulares específicos se encuentra activado STAT3 en la patogénesis de la enfermedad periodontal.

## **4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.**

### **4.1 Hipótesis:**

“En los tejidos gingivales con periodontitis, STAT3 se encuentra activado principalmente en células inmunes del estroma y queratinocitos.”

### **4.2 Objetivo General:**

- Determinar los tipos celulares donde STAT3 se encuentra activado en los tejidos gingivales de sujetos con enfermedad periodontal.

### **4.3 Objetivos Específicos:**

- Seleccionar y caracterizar clínicamente a sujetos con periodontitis.
- Identificar los tipos celulares donde STAT3 se encuentra activado en tejido gingival de sujetos con periodontitis.

## **5. METODOLOGÍA.**

### **5.1 Diseño del estudio:**

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

### **5.2 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.

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. También, se indicó el compromiso de furca y movilidad que presentaba cada uno. Adicionalmente, se solicitaron exámenes radiográficos según la pertinencia de cada caso y exámenes de laboratorio de detección de virus Hepatitis B, virus Hepatitis C, VIH, hemoglobina glicosilada A1c para comprobar el control glicémico y niveles de gonadotropina coriónica para detección de embarazo en mujeres en edad fértil.

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, que se detallan a continuación:

**Criterios de inclusión para participar en el estudio fueron:**

- Cumplir con la definición de caso de periodontitis.
  - 1.- El paciente presenta pérdida de NIC interproximal detectable en  $\geq 2$  dientes no adyacentes.
  - O
  - 2.- El paciente presenta pérdida de NIC vestibular o palatino  $\geq 3$  mm en conjunto con PS  $> 3$  mm en  $\geq 2$  dientes.
- Tener una edad  $\geq 18$  años.
- Mínimo 18 dientes en boca.
- Voluntad de donar tejido gingival para el estudio.

**Los criterios de exclusión para participar en el estudio fueron:**

- Hepatitis B o C positivo.
- VIH positivo.
- Terapia de radiación de cabeza o cuello.
- Tener algún cáncer activo.
- Haber sido tratado con quimioterapéuticos sistémicos 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 desordenes en la coagulación o condiciones asociadas con sangrado o 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.

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. 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 asignó un código, con lo cual se garantizó su anonimato al realizar el análisis de datos.

### **5.3 Obtención de las muestras:**

Después de firmar un consentimiento informado (Anexo 4), se realizó la toma de muestra mediante una biopsia incisional de tejido gingival (2 x 2 mm) del sitio con mayor profundidad al sondaje y presencia de sangrado, con el fin de obtener

una muestra representativa del estado periodontal. Este trabajo se realizó en la Clínica Odontológica, Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

#### **5.4 Análisis histopatológico:**

La muestra de tejido gingival fue fijada en formalina buffer al 10% y se incluyó en parafina de grado histológico. La muestra fue seccionada en cortes de 3µm de espesor, los cuales fueron desparafinados y rehidratados en alcoholes descendentes, seguido de la recuperación del epítipo en Buffer Citrato inducido por calor. Para bloquear la peroxidasa endógena de los tejidos, se usó metanol con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%. Las secciones se bloquearon con albúmina de suero bovino y posteriormente se incubaron con anticuerpo primario contra pSTAT3 (Tyr705) (Cell Signaling Technologies, USA) a una concentración de 1:100. Para la determinación de la concentración final del anticuerpo, se utilizaron cortes histológicos de amígdala. El inmunomarcaje se realizó con el sistema de detección VECTASTAIN® Elite® ABC HRP Kit (Peroxidase, Universal), R.T.U. (Ready-to-Use) (VectorLabs, USA). Seguido de la visualización con sustrato de peroxidasa ImmPACT DAB (VectorLabs, USA). Finalmente, las muestras se contratiñeron con hematoxilina de Harris y se montaron.

Las láminas teñidas se enumeraron de acuerdo al número de molde al cual pertenecían y se etiquetaron describiendo el anticuerpo utilizado. Las células inmunopositivas en las láminas se evaluaron microscópicamente con un aumento de 40x y se eligieron 10 campos de forma no aleatoria, 5 para tejido epitelial y 5 para tejido conectivo, seleccionando las que tuviesen presencia de áreas de mayor marcación positiva. Esta marca se evaluó como positiva para la proteína de pSTAT3 en el caso de contar con una marca de color pardo en el núcleo o citoplasma de las células sin considerar intensidad. Los campos fueron fotografiados con un microscopio óptico Olympus BX41 (Olympus, Japón) con el programa Micrometrics SE Premium V2.7 (micrometrics).

El conteo celular se realizó utilizando el programa Image J (NIH, USA), con el cual se enumeraron todas las células presentes en el tejido a observar, diferenciado la cantidad de inmunopositivas e inmunonegativas del total contabilizado.

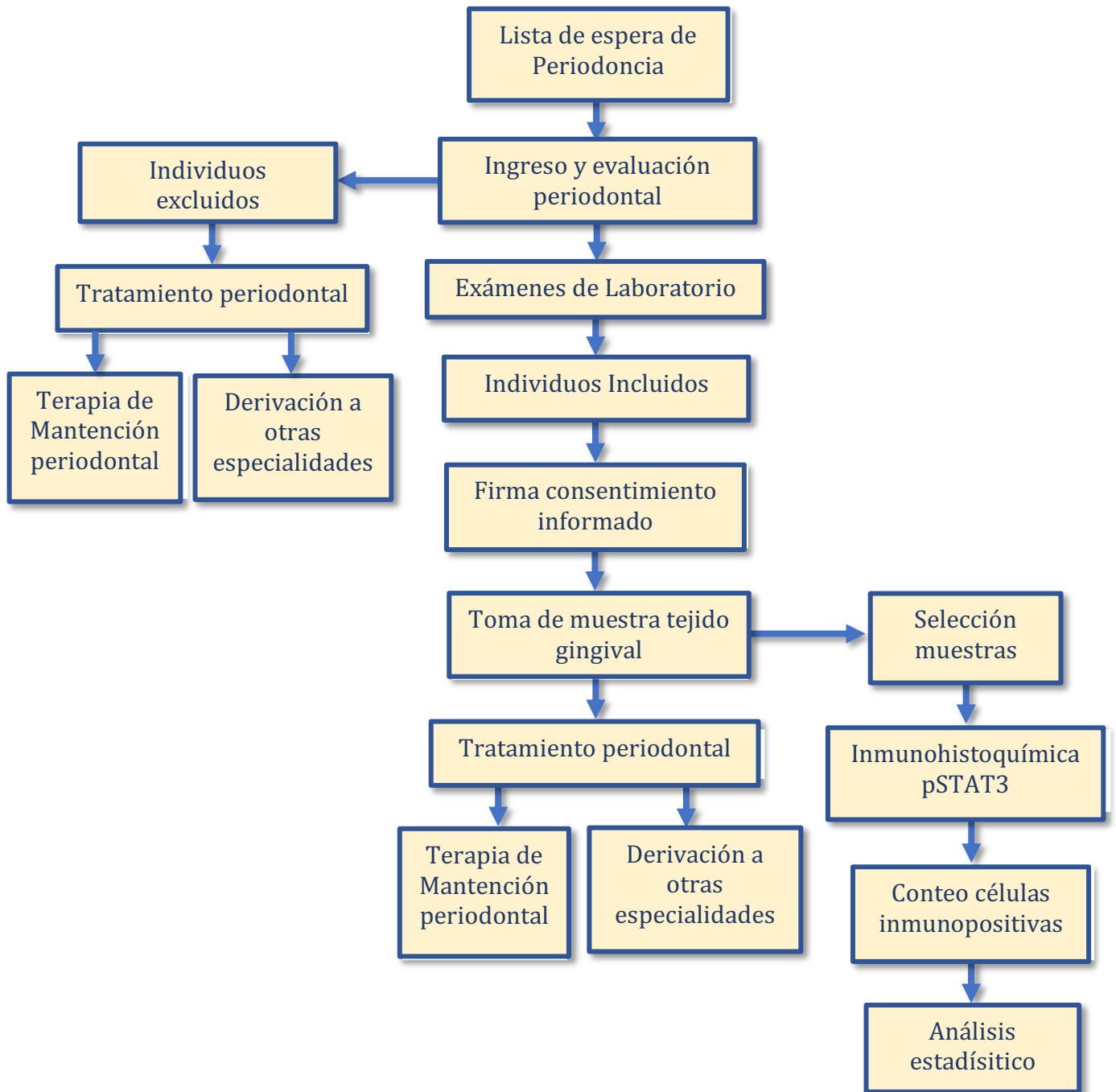
La observación de estos cortes y fotografías se realizó en el Área de Anatomía Patológica del Departamento de Patología y Medicina Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

### **5.5 Análisis estadístico:**

Los datos se analizaron utilizando el software Prism 8 (GraphPad Software, Inc). El análisis de la distribución de datos se realizó mediante el test D'Agostino & Pearson. Las diferencias entre 2 grupos se determinó mediante la prueba t de Student no pareado. Los resultados se expresaron en promedio  $\pm$  error estándar. Se consideró como estadísticamente significativo un p valor  $< 0.05$ .

### **5.6 Deteminación de la muestra:**

En base a estudios previos para detección de células Th17 en tejidos gingivales con periodontitis (Dutzan y cols. 2016), se concluyó necesario obtener una muestra de un mínimo de 7 individuos. (Nivel de significancia del 5% con un poder estadístico del 80%). El tamaño de la muestra se calculó con el software en línea OpenEpi ([www.openepi.com](http://www.openepi.com)).



**Figura 2:** Esquema del reclutamiento de voluntarios y selección de las muestras de tejido gingival para análisis histopatológico, mediante inmunohistoquímica para pSTAT3.

## 6. RESULTADOS:

### 6.1 Individuos evaluados:

Fueron evaluados clínicamente 18 individuos con necesidad de tratamiento periodontal (Tabla 1), el promedio de edad de este grupo fue de 50 años, siendo el/la más joven de 30 años y el/la mayor de 68 años. El 33% (6 individuos) eran hombres y el 66% (12 individuos) eran mujeres. El 22% (4 individuos) de ellos era fumador, el 28% (5 individuos) de ellos presentaba hipertensión arterial y ninguno presentaba diabetes. El promedio de dientes en boca fue de 26, siendo el número menor 16 y el mayor 31. Los promedios de profundidad al sondaje de los pacientes fueron desde 1,07 mm a 3,74 mm, siendo el promedio de 2,59 mm. El nivel de inserción clínica fue en promedio de 3,30 mm, siendo el menor valor de 2,08 mm y el mayor de 6 mm. En cuanto al índice de sangrado, el promedio fue de 54,8% siendo el menor de 25% y el mayor de 88%. En el índice de placa, el promedio fue de 73,5%, siendo el menor valor de 40% y el mayor de 100%.

**Características clínicas de los voluntarios evaluados**

	Hombres	Mujeres	Total
<b>Número de Individuos</b>	6	12	18
<b>Edad (años)</b>	56 (42 – 68)	48 (30 – 61)	50 (30 – 68)
<b>Dientes</b>	26 (18 – 31)	26 (16 – 31)	26 (16 – 31)
<b>PS (mm)</b>	2,64 (1,07 – 3,74)	2,56 (2,01 – 3,36)	2,59 (1,07 – 3,74)
<b>NIC (mm)</b>	3,83 (2,08 – 6,00)	2,96 (2,35 – 3,52)	3,30 (2,08 – 6,00)
<b>Índice de Sangrado (%)</b>	59,3 (30– 88)	52,5 (25 – 88)	54,8 (25 – 88)
<b>Índice de Placa (%)</b>	79,6 (48 – 100)	70,5 (40 – 94)	73,5 (40 – 100)
<b>Tabaquismo</b>	0	4	4
<b>Hipertensión</b>	3	2	5

**Tabla 1: Datos clínicos del total de individuos evaluados.** Las variables Edad, Número de dientes, Profundidad al sondaje, Nivel de Inserción Clínica, Índice de sangrado e Índice placa, se expresaron en Promedio (Mínimo-Máximo). Las variables Tabaquismo, Hipertensión y Número de Individuos, se expresaron en sumatoria de casos.

## **6.2 Individuos seleccionados:**

De acuerdo con los criterios de selección la muestra quedó conformada por 9 individuos con periodontitis. Dos voluntarios fueron excluidos del estudio por comenzar tratamiento con antibióticos u otros medicamentos. Otros dos voluntarios no quisieron continuar participando del estudio. Un individuo presentaba en la mayoría de sus dientes rehabilitaciones con prótesis fija, lo que si bien no es un criterio de exclusión de este estudio, se determinó que modificaba de forma significativa la presentación clínica de la enfermedad. Además fueron excluidas cuatro muestras de tejido que no permitieron realizar correctamente su análisis histológico, ya sea por su tamaño como por la calidad de tejido obtenido. De igual manera, todos los voluntarios que fueron evaluados recibieron tratamiento periodontal y fueron derivados a otras especialidades, de acuerdo a su diagnóstico.

A continuación se describen las características clínicas del grupo de 9 sujetos (n=9) seleccionados para analizar la expresión de pSTAT3 en tejido gingival (Tabla 2). El promedio de edad fue de 48 años, siendo el/la más joven de 30 años y el/la mayor de 68 años. El 44,4% (4 individuos) eran hombres y el 55,5% (5 individuos) eran mujeres. El 11,1% (1 individuo) de ellos era fumador, el 44,4% (4 individuos) de ellos presentaba hipertensión arterial y ninguno presentaba diabetes. El promedio de dientes en boca fue de 26, siendo el menor número 18 y el mayor 31. El promedio de la profundidad al sondaje de los individuos de esta muestra fue de 2,69 mm, con un mínimo de 1,07 mm y máximo de 3,74 mm por sujeto. El nivel de inserción clínica promedio fue de 3,50 mm, siendo el menor valor por individuo de 2,08 mm y el mayor de 6 mm. En cuanto al índice de sangrado el promedio de la muestra fue de 63,6%, siendo el menor de 25% y el mayor de 88%. En el índice de placa, el promedio fue de 81,7%, siendo el menor valor 49% y el mayor de 100%.

### Características clínicas de voluntarios incluidos en el estudio.

	Hombres	Mujeres	Total
<b>Número de Individuos</b>	4	5	9
<b>Edad (años)</b>	55 (42 – 68)	42 (30 – 53)	48 (30 – 68)
<b>Dientes</b>	23 (18 – 27)	27 (27 – 31)	26 (18 – 31)
<b>PS (mm)</b>	2,70 (1,07 – 3,74)	2,67 (2,01 – 3,36)	2,69 (1,07 – 3,74)
<b>NIC (mm)</b>	3,98 (2,08 – 6,00)	3,13 (2,35 – 3,52)	3,50 (2,08 – 6,00)
<b>Índice de Sangrado (%)</b>	67,2 (44 – 88)	60,7 (25 – 88)	63,6 (25 – 88)
<b>Índice de Placa (%)</b>	86,1 (63 – 100)	78,2 (49 – 94)	81,7 (49 – 100)
<b>Tabaquismo</b>	0	1	1
<b>Hipertensión</b>	3	1	4

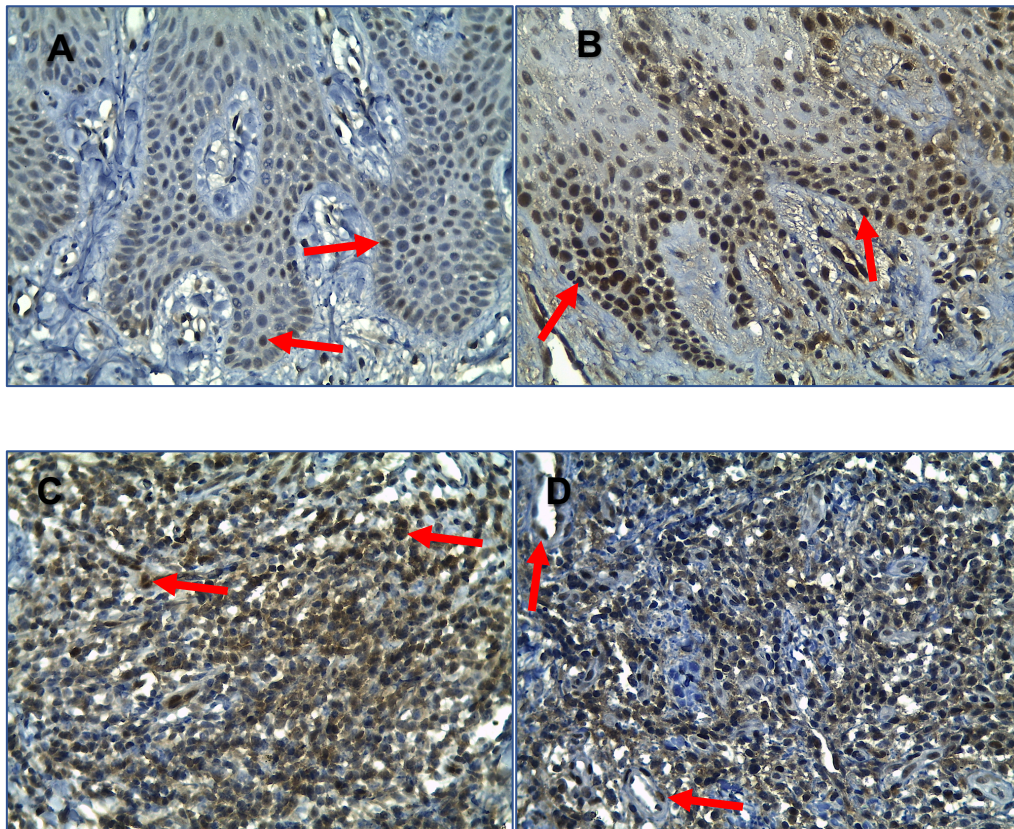
**Tabla 2: Datos clínicos de los voluntarios seleccionados para analizar la expresión de pSTAT3 en muestras de tejido gingival.** Las variables Edad, Número de dientes, Profundidad al sondaje, Nivel de Inserción Clínica, Índice de Sangrado e índice Placa, se expresaron en promedio (mínimo-máximo). Las variables Tabaquismo, Hipertensión y número de individuos Total, se expresaron en sumatoria de casos.

De acuerdo a la nueva clasificación de las enfermedades y condiciones periodontales y periimplantarias (Caton y cols., 2018), se realizó el diagnóstico de los voluntarios utilizando el algoritmo propuesto por Tonetti y Sanz (Tonetti & Sanz, 2019). Los 9 sujetos tuvieron un diagnóstico de periodontitis. En cuanto a las etapas de la enfermedad que indica la severidad de la enfermedad y complejidad de tratamiento, el 11,1% (1) de ellos presentaba una etapa 2, el 44,4% (4) estaba en etapa 3 y otro 44,4% (4) etapa 4. En el 22,2% (2) era localizada y en el 77,8% (7) generalizada. En cuanto a los grados, que indica la progresión de la enfermedad, el 11,1% (1) de la muestra presentaba un grado A, el 33,3% (3) presentaba un grado B y el 55,5% (5) presentaba un grado C (Tonetti, Greenwell & Kornman, 2018).



### **6.3 Análisis de pSTAT3 en los tejidos gingivales:**

Para analizar la activación de STAT3 en los tejidos gingivales de los individuos seleccionados, se realizó el inmunomarcaje para pSTAT3 a un total 9 muestras de tejidos gingivales, una de cada individuo. Se contabilizaron las células inmunopositivas en 10 microfotografías por muestra, alcanzando un total de 90 microfotografías de cortes de tejido, 45 de tejido epitelial y 45 de tejido conectivo.



**Figura 3: Imágenes representativas de microfotografías (40X) utilizadas para realizar la cuantificación de células inmunopositivas para pSTAT3. A y B:** Corte histológico de tejido gingival epitelial con amplias crestas epiteliales, donde las células inmunomarcadas se ubican principalmente en la zona basal del epitelio se observa un aumento en la expresión, principalmente a nivel de los núcleos. Flechas de color rojo indican núcleos de células inmunopositivas en estrato basal del epitelio **C:** Corte histológico de tejido conectivo gingival con un inmunomarcaje homogéneo en su distribución, presente tanto núcleo como citoplasma. Presencia de vasos sanguíneos y células endoteliales inmunopositivas. Flechas de color rojo indican células inmunopositivas **D:** Corte Histológico de tejido conectivo gingival con un inmunomarcaje distribuido en grupos celulares, tinción tanto de núcleos como citoplasma. Presencia de infiltrado inflamatorio. Presencia de vasos sanguíneos y células endoteliales inmunopositivas. Flechas rojas indican vasos sanguíneos con células inmunopositivas.

Al analizar los cortes histológicos se pudo observar que en el epitelio la activación de STAT3 se ubicaba principalmente en los núcleos de las células del estrato basal (figura 3A y 3B). En cambio, en el tejido conectivo se aprecia una tinción inmunopositiva en núcleo y citoplasma de las células, ubicadas de manera homogénea (figura 3C), o en forma de cúmulos (figura 3D). Además se identificaron células endoteliales inmunomarcadas en relación a vasos sanguíneos.

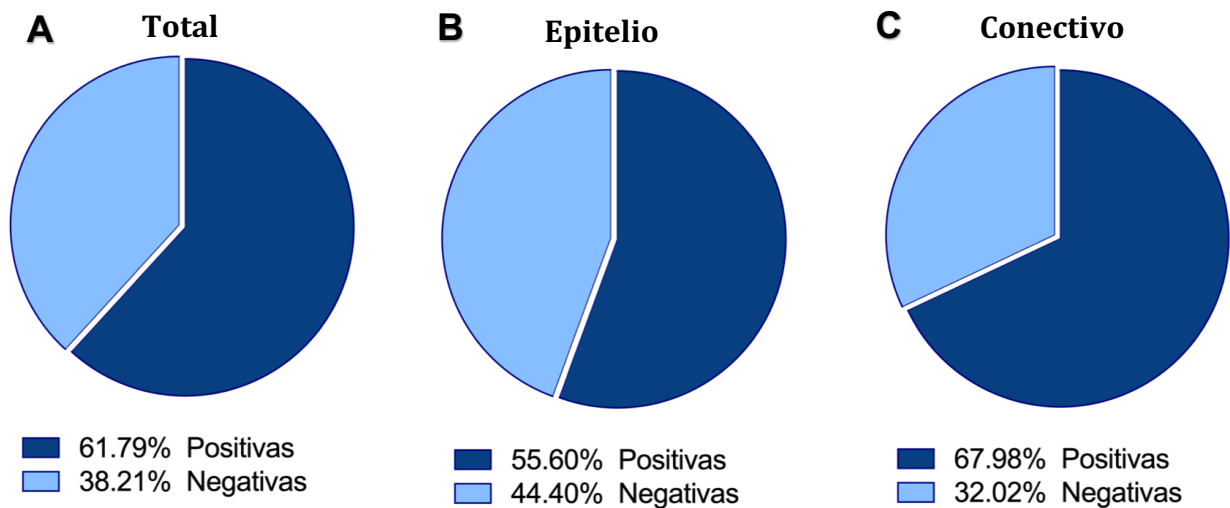
**Tabla de características clínicas de muestras analizadas.**

	Diente	PS (mm)	NIC (mm)	Sangrado	Células inmunopositivas pSTAT3 (%)		
					Epitelio	Conectivo	Total
<b>M1</b>	4.6	4	4	+	48	87	67
<b>M2</b>	1.6	6	7	+	43	83	63
<b>M3</b>	2.7	8	12	+	85	83	84
<b>M4</b>	1.6	4	4	+	63	68	66
<b>M5</b>	1.3	5	5	+	52	67	59
<b>M6</b>	3.6	4	4	+	39	37	38
<b>M7</b>	1.4	5	4	+	83	76	80
<b>M8</b>	4.7	7	7	+	38	36	37
<b>M9</b>	1.7	6	6	+	50	73	62

**Tabla 3: Características clínicas de los sitios de muestras analizadas de tejido gingival.** Se indica el diente del cual se extrajo la muestra de tejido, la profundidad al sondaje del sitio expresada en milímetros, el nivel de inserción clínica del sitio expresada en milímetros, la presencia de sangrado al sondaje. Además se presenta el promedio de células inmunopositivas para pSTAT3 expresado en porcentaje, para el tejido epitelial de la muestra, para el tejido conectivo y de ambos tejidos.

Cuando se analizaron las diferencias en la activación de pSTAT3 entre individuos (Tabl 2 y 3), no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas en relación al sexo del sujeto ni a las características clínicas periodontales del sitio evaluado, como profundidad al sondaje o nivel de inserción clínica. Al observar los resultados de los individuos que presentaban alguna

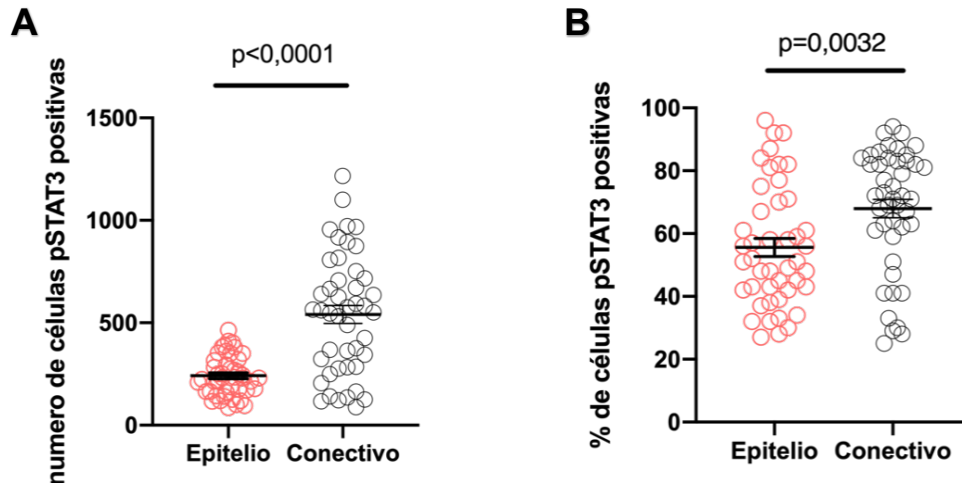
característica sistémica que pudiese modificar su condición periodontal (Tabla 3), se observó que el único sujeto fumador de esta muestra mostró un alto porcentaje de activación de esta proteína, en relación a los otros individuos (80% de las células). De las muestras de tejido de los 4 individuos que padecían hipertensión arterial se observó que presentaban también un alto promedio de expresión de pSTAT3 (59%, 62%, 67% y 84%). En contraste, cuando nos enfocamos en los pacientes que no presentaran alguna de estas características, obtuvieron los menores niveles de activación de STAT3 en las células estudiadas (38%, 37%, 63% y 66%).



**Figura 4: Gráficos circulares que representan el porcentaje de células positivas y negativas para inmunoexpresión de pSTAT3.** Se observan de izquierda a derecha. **A:** Promedio de células inmunopositivas e inmunonegativas para pSTAT3 en el total de cortes histológicos analizados. **B:** Promedio de células inmunopositivas e inmunonegativas en los cortes histológicos analizados, exclusivamente de tejido epitelial. **C:** Promedio de células inmunopositivas e inmunonegativas en los cortes histológicos analizados, exclusivamente de tejido conectivo.

Al cuantificar la expresión de pSTAT3 activado en las 90 microfotografías, se observó una activación significativa de esta proteína, en promedio  $61.79 \pm 2.13\%$  (Figura 4A) fueron inmunopositivas para pSTAT3 (máximo de 96% y un mínimo de 25%). Cuando se analizó de forma separada el tejido conectivo, se observó que en

promedio había un  $67.98 \pm 2.90\%$  (Figura 4B) de células que expresaron pSTAT3, (máximo de 94% y un mínimo de 25%). En contraste, al evaluar las células inmunopositivas para pSTAT3 en el tejido epitelial, se determinó que en promedio un  $55.60 \pm 2.86\%$  de células epiteliales presentaban activación de STAT3 (máximo de 96% y un mínimo de 27%) (Figura 4C).



**Figura 5 Células inmunopositivas para pSTAT3 en tejido conectivo y tejido epitelial. A:** Se observa la comparación del número total de células positivas pSTAT3 en tejido epitelial y tejido conectivo  $p < 0,0001$ . **B:** Se observa la comparación de porcentaje de células pSTAT3 positivas en tejido epitelial comparado con el tejido conectivo.  $p = 0,0032$ . Cada círculo representa una microfotografía obtenida de los 9 sujetos seleccionados. Las líneas representan el promedio y el error estándar.

Al comparar las células inmunopositivas del tejido epitelial y del tejido conectivo (Figura 5), se evidenció que el tejido conectivo era el que presentaba una mayor expresión de esta proteína. Se obtuvo una diferencia estadística con un valor  $p < 0,001$  al analizar el número total de células positivas para pSTAT3 y una diferencia estadística con un valor  $p = 0,0032$  cuando se compararon los valores del porcentaje de células positivas para pSTAT3.

## 7. DISCUSIÓN:

### 7.1 Activación de STAT3 en periodontitis

En el proceso inflamatorio de la periodontitis, las células Th17 juegan un rol fundamental en la patogénesis de la enfermedad y en la perpetuación de una reacción inflamatoria descontrolada. Se ha demostrado que sus principales citoquinas estimuladoras: IL-6, IL-23 e IL-21, presentan niveles aumentados en tejidos con periodontitis (Cardoso y cols., 2009; Zhao y cols., 2011; Dutzan y cols., 2012; Keles y cols., 2014). Para la activación de estas células es necesario que estas citoquinas se unan a receptores específicos de la membrana celular, que por medio de la estimulación de vías JAK van a fosforilar a STAT3, un factor de transcripción clave para la diferenciación de linfocitos Th17 (Park y cols., 2014). Debido a lo anterior, STAT3 ha sido identificado como un objetivo biológicamente relevante a estudiar ya que podría tener un papel crucial en la patogénesis de la enfermedad periodontal.

En el presente estudio evaluamos la activación de STAT3 en muestras de tejido gingival en sujetos con periodontitis, en donde encontramos que esta proteína se encontraba fosforilada en la mayoría de las células del tejido gingival, tanto en el compartimiento epitelial como en el conectivo ( $61.79 \pm 2.13\%$  del total de células). Al revisar la literatura, estos resultados se relacionan con los encontrados en otras investigaciones, en donde se evalúa el rol de STAT3 en enfermedad periodontal. Garcia de Aquino en el 2009 y Chaves de Souza en el 2011 observaron una activación elevada de STAT3 en el tejido gingival de ratones utilizando un modelo de periodontitis por ligadura (Garcia de Aquino y cols., 2009; Chaves de Souza y cols., 2011). Posteriormente, Chavez de Souza en 2013, concluyó que existía una activación significativa de esta proteína en el tejido gingival murino, pero a diferencia del anterior, con un modelo de inflamación por inducción utilizando lipopolisacáridos (LPS) bacterianos de *Escherichia coli* (Chaves de Souza y cols., 2013). Por su parte, Ambili y colaboradores en 2017, analizaron STAT3 en cultivos de fibroblastos periodontales humanos donde también se observó una activación importante de

esta proteína ante la estimulación con LPS de *Porphyromonas gingivalis* (Ambili y cols., 2017). Nuestro trabajo evaluó por primera vez la activación de STAT3 en muestras de tejido gingival humano, concluyendo que en sujetos con periodontitis existe una activación significativa de esta vía de señalización intracelular en tejido gingival. 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). Futuras investigaciones podrían evaluar la activación de STAT3 en salud y gingivitis, y de esta manera poder determinar si la activación de esta vía de señalización se produce solo en periodontitis y así poder esclarecer aún más su rol en la enfermedad.

## **7.2 pSTAT3 en tejido epitelial:**

Mediante análisis inmunohistoquímico hemos podido también analizar la activación de STAT3 en los distintos estratos celulares, ya sea en el tejido epitelial como en el tejido conectivo gingival. Otras investigaciones han evaluado la activación de esta vía de señalización en células de tejido epitelial. Macha y colaboradores en 2011, evaluaron la expresión STAT3 en células de tejido displásico de carcinoma oral de células escamosas y en muestras de tejido oral normal, donde la localización de la proteína se ubicó predominantemente en los núcleos de células epiteliales, y por el contrario, no se observó activación de STAT3 en células epiteliales en muestras de tejidos normales (Macha y cols., 2011). Por su parte Fasanaro y colaboradores en 2015, analizaron pSTAT3 en muestras de mucosa de lengua y carcinoma oral de células escamosas, en tejido normal se detectó un marcaje nuclear en las capas basales y espinosas del epitelio, mientras que la tinción en la capa granular fue débil y escasa, y no hubo inmunoreacción en la capa de queratina. En las muestras de carcinoma oral de células escamosas se observó una activación mayor de STAT3, en comparación con las muestras de mucosa oral en lengua (Fasanaro y cols., 2015). De forma similar, Tashiro y

colaboradores en el presente año, analizaron mediante inmunohistoquímica a pSTAT3 en muestras de carcinoma oral de células escamosas y en lesiones orales del epitelio, en donde describieron una activación tanto en el citoplasma, como en los núcleos. Por su parte, en carcinoma hallaron una activación homogénea de esta proteína, en comparación a las lesiones displásicas, en donde observaron que la activación de STAT3 se encontraba concentrada principalmente en las células de la capa basal y células del estrato espinoso del epitelio. (Tashiro y cols., 2020). Estos resultados se condicen con los obtenidos en esta investigación, donde la activación de STAT3 en el tejido epitelial se concentró principalmente en los núcleos de las células del estrato basal del tejido gingival, esto podría tener explicación en que STAT3 ejerce su función de activación de la transcripción dentro del núcleo celular. Además, con respecto a la capa epitelial donde se observa su mayor presencia, coincide que es la zona del tejido que concentra el mayor potencial de crecimiento y reacción, 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 (Y. Wang y cols., 2018). Nuestros resultados en conjunto con literatura actual respaldan el hecho de que STAT3 juega un rol fundamental en epitelio gingival, principalmente en procesos de diferenciación, proliferación e inhibición de la apoptosis. (Fasanaro y cols., 2015; Luo y cols., 2014; R. Wu y cols., 2003).

### **7.3 pSTAT3 en tejido conectivo:**

En el estroma de las muestras analizadas, observamos una mayor activación de pSTAT3, en comparación con el epitelio, además con una distribución homogénea y/o de cúmulos en diferentes zonas del tejido. 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., 2016a; Dutzan y cols., 2016b; Kurgan & 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). Además, Taylor y colaboradores demostraron que IL-6 e IL-23 inducen la fosforilación STAT3 en neutrófilos en un modelo *in vitro* animal de queratitis fúngica. (Taylor y cols., 2016).

Por otro lado, sabemos también que durante el proceso inflamatorio en periodontitis, monocitos migran al sitio de inflamación y se diferencian en macrófagos (Kurgan & Kantarci, 2018). W. Wu y colaboradores identificaron una activación significativa de STAT3 en monocitos de muestras de tejido de carcinoma hepatocelular (W. 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).

Además de lo anterior, los linfocitos son otro grupo celular que van a estar 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 & Kantarci, 2018), Deenick y colaboradores observaron *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. (Zenobia & Hajishengallis, 2015; Abusleme & Moutsopoulos, 2016; Dutzan y cols., 2018). 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 (Harris y cols., 2007; Milner y cols., 2008; Durant y cols., 2010; Dutzan y cols., 2018)

En el año 2019 Wan y colaboradores observaron que 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 (L. Wang y cols., 2019). Estos resultados son concordantes con los encontrados en esta investigación, en donde observamos que en muestras de tejido humano con periodontitis también 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 conectivo gingival de sujetos con periodontitis, es por esto que futuras investigaciones podrían identificar específicamente cuales de estos tipos celulares son los que presentan una activación mayor de STAT3 en periodontitis y poder determinar con más precisión el papel de esta proteína en la patogénesis de la enfermedad periodontal.

#### **7.4 Tabaquismo:**

Otro resultado importante fueron las patologías sistémicas que pudiesen estar modificando el proceso inflamatorio en los tejidos periodontales de los individuos. A pesar de solo contar con un individuo fumador, pudimos observar en promedio una activación de STAT3 en un 80% del total de células gingivales, estos resultados podrían guardar relación con el hecho de que se ha descrito una

asociación positiva y de riesgo, entre la periodontitis y el hábito tabáquico, en donde se ha observado además, que el tabaquismo afecta la composición de la microbiota oral, la respuesta inmune y la capacidad de recuperación de los tejidos periodontales. (Leite y cols., 2018). De hecho, se ha demostrado *in vitro* que se produce un aumento significativo de STAT3 en queratinocitos orales estimulados con humo de tabaco (Arredondo y cols., 2006). Dicho eso, se vuelve relevante poder investigar cómo el tabaco puede afectar la vía de señalización STAT3 en células del tejido gingival y cómo eso puede llegar a modificar el curso de la enfermedad periodontal en pacientes que presenten este hábito.

### **7.5 Hipertensión:**

Al analizar el nivel de activación de STAT3 en muestras de sujetos que presentaban periodontitis e hipertensión, se observó que existía un alto porcentaje de expresión de pSTAT3 en las muestras de tejido gingival. Estos resultados preliminares son coherentes con la evidencia que señala una fuerte asociación entre estas dos patologías (Martin-Cabezas y cols., 2016). Además, algunos estudios han relacionado la hipertensión directamente con la vía de STAT3 en células inmunes, específicamente con macrófagos. A pesar de eso, la evidencia aún es contradictoria sobre si un estímulo hipertensivo, principalmente inducido por células endoteliales, produce un efecto estimulador o inhibitorio sobre la vía de señalización STAT3 (Loperena y cols., 2018; Wei y cols., 2019). Sin embargo, se ha demostrado en modelos animales que el estímulo hipertensivo produce un aumento de citoquinas proinflamatorias, incluidas IL-6 y IL-23, son claves para la activación y supervivencia de linfocitos Th17 (Kirabo y cols., 2014). Estos resultados en conjunto con la evidencia científica que relaciona a STAT3 tanto con hipertensión como con periodontitis, podría dar pie para que futuras investigaciones puedan estudiar de manera más específica cómo esta vía de señalización intracelular puede estar relacionando a estas dos enfermedades entre sí.

## **7.6 STAT3 en otras enfermedades:**

La participación de la vía STAT3 también ha sido estudiada en otro tipo de enfermedades humanas de carácter inmunoinflamatorio. En el caso de la enfermedad del intestino irritable y psoriasis, se ha encontrado una expresión aumentada de STAT3 en biopsias de tejidos humano con dichas patologías (Vavricka y cols., 2018). También en el análisis de muestras de tejido uterino con endometriosis se ha distinguido además de una alta expresión de STAT3 y de su forma fosforilada es decir pSTAT3. (Kim y cols., 2015). En el caso de la artritis reumatoide también ha sido analizada la activación de este factor de transcripción clave, donde se ha hallado un aumento significativo de pSTAT3 en el tejido sinovial de articulaciones con esta enfermedad (Gao y cols., 2015). Es relevante además destacar que a partir de las conclusiones sobre el papel clave de STAT3 en la patogénesis de estas enfermedades, es que se han desarrollado nuevas terapias que tienen como blanco farmacológico la inhibición de esta vía de señalización.

## **7.7 Aspectos importantes:**

En este estudio pudimos observar en muestras de tejido gingival humano con periodontitis la activación de STAT3, un miembro importante de la familia de transductores de señales y activadores de la transcripción, que juega un rol fundamental en diferentes enfermedades de carácter inflamatorio y autoinmune. Dentro de las limitaciones que se produjeron en la realización de este trabajo, podemos mencionar la cantidad limitada de sujetos con los que se conformó la muestra y la necesidad de poder comparar estos resultados con muestras de tejido sano o con gingivitis. Un aspecto a evaluar en futuras investigaciones es determinar de manera más específica que células inmunes son las que están siendo activadas mediante la vía de STAT3, para poder dilucidar de mejor manera cual es su rol durante el proceso de inflamación de los tejidos peridontales.

Ampliar el conocimiento sobre la red de señales que componen la respuesta inmune en los tejidos podría en el futuro permitir desarrollar nuevas estrategias que permitan abordar el proceso inmunodestructivo que se produce durante el desarrollo de la enfermedad periodontal, para de esta manera evaluar, como en otras patologías, si es factible complementar las terapias convencionales mediante modelos de inhibición directa de vías de señalización inmune como STAT3.

## **8. CONCLUSIONES:**

- STAT3 se encuentra activada en tejido gingival humano con periodontitis. Además, esta activación es mayor en tejido conectivo en comparación con tejido epitelial.
- En tejido epitelial, la activación de STAT3 se localiza principalmente en estrato basal, concentrado en los núcleos celulares.
- En tejido conectivo, la activación de STAT3 se distribuye de manera homogénea y/o en cúmulos, tanto en núcleo como citoplasma de las células de dicho tejido.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Abusleme L., Dupuy A. K., Dutzan N., Silva N., Burleson J. A., Strausbaugh L. D. y cols. (2013). The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME J*, 7(5), 1016-1025.
- Abusleme L., & Moutsopoulos N. M. (2016). IL-17: overview and role in oral immunity and microbiome. *Oral Dis*.
- Ambili R., Janam P., Saneesh Babu P. S., Prasad M., Vinod D., Anil Kumar P. R. y cols. (2017). Differential expression of transcription factors NF- $\kappa$ B and STAT3 in periodontal ligament fibroblasts and gingiva of healthy and diseased individuals. *Arch Oral Biol*, 82, 19-26.
- Arredondo J., Chernyavsky A. I., Jolkovsky D. L., Pinkerton K. E., & Grando S. A. (2006). Receptor-mediated tobacco toxicity: cooperation of the Ras/Raf-1/MEK1/ERK and JAK-2/STAT-3 pathways downstream of alpha7 nicotinic receptor in oral keratinocytes. *FASEB J*, 20(12), 2093-2101.
- Cardoso C. R., Garlet G. P., Crippa G. E., Rosa A. L., Júnior W. M., Rossi M. A., & Silva J. S. (2009). Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol*, 24(1), 1-6.
- Chapple I. L. (2014). Time to take periodontitis seriously. *BMJ*, 348, g2645.
- Chapple I. L., Bouchard P., Cagetti M. G., Campus G., Carra M. C., Cocco F. y cols. (2017). Interaction of lifestyle, behaviour or systemic diseases with dental caries and periodontal diseases: consensus report of group 2 of the joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. *J Clin Periodontol*, 44 Suppl 18, S39-S51.
- Chavez de Souza J. A., Nogueira A. V., Chavez de Souza P. P., Cirelli J. A., Garlet G. P., & Rossa C. (2011). Expression of suppressor of cytokine signaling 1 and 3 in ligature-induced periodontitis in rats. *Arch Oral Biol*, 56(10), 1120-1128.
- Chaves de Souza J. A., Nogueira A. V., Chaves de Souza P. P., Kim Y. J., Silva Lobo C., Pimentel Lopes de Oliveira G. J. y cols. (2013). SOCS3 expression correlates with severity of inflammation, expression of proinflammatory cytokines, and activation of STAT3 and p38 MAPK in LPS-induced inflammation in vivo. *Mediators Inflamm*, 2013, 650812.

- Collaborators G. D. a. I. I. a. P. (2016). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*, 388(10053), 1545-1602.
- Deenick E. K., Avery D. T., Chan A., Berglund L. J., Ives M. L., Moens L. y cols. (2013). Naive and memory human B cells have distinct requirements for STAT3 activation to differentiate into antibody-secreting plasma cells. *J Exp Med*, 210(12), 2739-2753.
- Durant L., Watford W. T., Ramos H. L., Laurence A., Vahedi G., Wei L. y cols. (2010). Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. *Immunity*, 32(5), 605-615.
- Dutzan N., Abusleme L., Bridgeman H., Greenwell-Wild T., Zangerle-Murray T., Fife M. E. y cols. (2017). On-going Mechanical Damage from Mastication Drives Homeostatic Th17 Cell Responses at the Oral Barrier. *Immunity*, 46(1), 133-147.
- Dutzan N., Kajikawa T., Abusleme L., Greenwell-Wild T., Zuazo C. E., Ikeuchi T. y cols. (2018). A dysbiotic microbiome triggers T. *Sci Transl Med*, 10(463).
- Dutzan N., Konkel J. E., Greenwell-Wild T., & Moutsopoulos N. M. (2016a). Characterization of the human immune cell network at the gingival barrier. *Mucosal Immunol*, 9(5), 1163-1172.
- Dutzan N., Konkel J. E., Greenwell-Wild T., & Moutsopoulos N. M. (2016b). Characterization of the human immune cell network at the gingival barrier. *Mucosal Immunol*, 9(5), 1163-1172.
- Dutzan N., Vernal R., Vaque J. P., García-Sesnich J., Hernandez M., Abusleme L. y cols. (2012). Interleukin-21 expression and its association with proinflammatory cytokines in untreated chronic periodontitis patients. *J Periodontol*, 83(7), 948-954.
- Farmand S., Kremer B., Häffner M., Pütsep K., Bergman P., Sundin M. y cols. (2018). Eosinophilia and reduced STAT3 signaling affect neutrophil cell death in autosomal-dominant Hyper-IgE syndrome. *Eur J Immunol*, 48(12), 1975-1988.
- Fasanaro E., Staffieri C., Cappellesso R., Marino F., Ottaviano G., Val M. y cols. (2015). Prognostic Significance of Serine-Phosphorylated STAT3 Expression in pT1-T2 Oral Tongue Carcinoma. *Clin Exp Otorhinolaryngol*, 8(3), 275-280.

- Freeman A. F., Domingo D. L., & Holland S. M. (2009). Hyper IgE (Job's) syndrome: a primary immune deficiency with oral manifestations. *Oral Dis*, 15(1), 2-7.
- G Caton J., Armitage G., Berglundh T., Chapple I. L. C., Jepsen S., S Kornman K. y cols. (2018). A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol*, 45 Suppl 20, S1-S8.
- Gamonal J., Mendoza C., Espinoza I., Muñoz A., Urzúa I., Aranda W. y cols. (2010). Clinical attachment loss in Chilean adult population: First Chilean National Dental Examination Survey. *J Periodontol*, 81(10), 1403-1410.
- Gao W., McCormick J., Connolly M., Balogh E., Veale D. J., & Fearon U. (2015). Hypoxia and STAT3 signalling interactions regulate pro-inflammatory pathways in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 74(6), 1275-1283.
- 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 Sci*, 84(21-22), 745-754.
- Genco R. J., & Borgnakke W. S. (2013). Risk factors for periodontal disease. *Periodontol 2000*, 62(1), 59-94.
- Hajishengallis G. (2014). Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol*, 35(1), 3-11.
- Hajishengallis G. (2015). Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol*, 15(1), 30-44.
- Harris T. J., Grosso J. F., Yen H. R., Xin H., Kortylewski M., Albesiano, E. y cols. (2007). Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. *J Immunol*, 179(7), 4313-4317.
- Hillmer E. J., Zhang H., Li, H. S., & Watowich S. S. (2016). STAT3 signaling in immunity. *Cytokine Growth Factor Rev*, 31, 1-15.
- Inghirami G., Chiarle R., Simmons W. J., Piva R., Schlessinger K., & Levy D. E. (2005). New and old functions of STAT3: a pivotal target for individualized treatment of cancer. *Cell Cycle*, 4(9), 1131-1133.
- Johnson D. E., O'Keefe R. A., & Grandis J. R. (2018). Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 15(4), 234-248.



- 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. *Curr Opin Immunol*, 28, 49-57.
- Keles Z. P., Keles G. C., Avci B., Cetinkaya B. O., & Emingil G. (2014). Analysis of YKL-40 acute-phase protein and interleukin-6 levels in periodontal disease. *J Periodontol*, 85(9), 1240-1246.
- Kim B. G., Yoo J. Y., Kim T. H., Shin J. H., Langenheim J. F., Ferguson S. D. y cols. (2015). Aberrant activation of signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) signaling in endometriosis. *Hum Reprod*, 30(5), 1069-1078.
- Kirabo A., Fontana V., de Faria A. P., Loperena R., Galindo C. L., Wu J. y cols. (2014). DC isoketal-modified proteins activate T cells and promote hypertension. *J Clin Invest*, 124(10), 4642-4656.
- Konkel J. E., & Moutsopoulos N. M. (2018). Unique Tailoring of Th17 at the Gingival Oral Mucosal Barrier. *J Dent Res*, 97(2), 128-131.
- Kornman K. S. (2018). Contemporary approaches for identifying individual risk for periodontitis. *Periodontol 2000*, 78(1), 12-29.
- Kurgan S., & Kantarci A. (2018). Molecular basis for immunohistochemical and inflammatory changes during progression of gingivitis to periodontitis. *Periodontol 2000*, 76(1), 51-67.
- Leite F. R. M., Nascimento G. G., Scheutz F., & López R. (2018). Effect of Smoking on Periodontitis: A Systematic Review and Meta-regression. *Am J Prev Med*, 54(6), 831-841.
- Levy D. E., & Lee, C. K. (2002). What does Stat3 do? *J Clin Invest*, 109(9), 1143-1148.
- Loperena R., Van Beusecum J. P., Itani H. A., Engel N., Laroumanie F., Xiao, L. y cols. (2018). Hypertension and increased endothelial mechanical stretch promote monocyte differentiation and activation: roles of STAT3, interleukin 6 and hydrogen peroxide. *Cardiovasc Res*, 114(11), 1547-1563.
- Luo Z., Wang H., Wu Y., & Sun Z. (2014). Clinical significance of IL-23 regulating IL-17A and/or IL-17F positive Th17 cells in chronic periodontitis. *Mediators Inflamm*, 2014, 627959.

- Macha M. A., Matta A., Kaur J., Chauhan S. S., Thakar A., Shukla N. K. y cols. (2011). Prognostic significance of nuclear pSTAT3 in oral cancer. *Head Neck*, 33(4), 482-489.
- Martin-Cabezas R., Seelam N., Petit C., Agossa K., Gaertner S., Tenenbaum H. y cols. (2016). Association between periodontitis and arterial hypertension: A systematic review and meta-analysis. *Am Heart J*, 180, 98-112.
- McGeachy M. J., Chen Y., Tato C. M., Laurence A., Joyce-Shaikh B., Blumenschein W. M. y cols. (2009). The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat Immunol*, 10(3), 314-324.
- Milner J. D., Brenchley J. M., Laurence A., Freeman A. F., Hill B. J., Elias K. M. y cols. (2008). Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome. *Nature*, 452(7188), 773-776.
- Moffatt C. E., & Lamont R. J. (2011). Porphyromonas gingivalis induction of microRNA-203 expression controls suppressor of cytokine signaling 3 in gingival epithelial cells. *Infect Immun*, 79(7), 2632-2637.
- Nadali M., Pullerits R., Andersson K. M. E., Silfverswärd S. T., Erlandsson M. C., & Bokarewa M. I. (2017). High Expression of STAT3 in Subcutaneous Adipose Tissue Associates with Cardiovascular Risk in Women with Rheumatoid Arthritis. *Int J Mol Sci*, 18(11).
- Nakajima K., & Sano S. (2018). Mouse models of psoriasis and their relevance. *J Dermatol*, 45(3), 252-263.
- O'Shea J. J., Holland S. M., & Staudt L. M. (2013). JAKs and STATs in immunity, immunodeficiency, and cancer. *N Engl J Med*, 368(2), 161-170.
- 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. *Annu Rev Med*, 66, 311-328. doi:10.1146/annurev-med-051113-024537
- Papathanasiou E., Kantarci A., Konstantinidis A., Gao H., & Van Dyke T. E. (2016). SOCS-3 Regulates Alveolar Bone Loss in Experimental Periodontitis. *J Dent Res*, 95(9), 1018-1025.
- Park J. S., Lee J., Lim M. A., Kim E. K., Kim S. M., Ryu J. G. y cols. (2014). JAK2-STAT3 blockade by AG490 suppresses autoimmune arthritis in mice via reciprocal regulation of regulatory T Cells and Th17 cells. *J Immunol*, 192(9), 4417-4424.

- Patel D. D., & Kuchroo V. K. (2015). Th17 Cell Pathway in Human Immunity: Lessons from Genetics and Therapeutic Interventions. *Immunity*, 43(6), 1040-1051.
- Peres M. A., Macpherson L. M. D., Weyant R. J., Daly B., Venturelli R., Mathur M. R. y cols. (2019). Oral diseases: a global public health challenge. *Lancet*, 394(10194), 249-260.
- Silva N., Abusleme L., Bravo D., Dutzan N., Garcia-Sesnich J., Vernal R., y cols. (2015). Host response mechanisms in periodontal diseases. *J Appl Oral Sci*, 23(3), 329-355.
- Stockinger B., & Omenetti S. (2017). The dichotomous nature of T helper 17 cells. *Nat Rev Immunol*.
- Tashiro K., Oikawa M., Miki Y., Takahashi T., & Kumamoto H. (2020). Immunohistochemical assessment of growth factor signaling molecules: MAPK, Akt, and STAT3 pathways in oral epithelial precursor lesions and squamous cell carcinoma. *Odontology*, 108(1), 91-101.
- Taubman M. A., Valverde P., Han X., & Kawai T. (2005). Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. *J Periodontol*, 76(11 Suppl), 2033-2041.
- Taylor P. R., Roy S., Meszaros E. C., Sun Y., Howell S. J., Malemud C. J., & Pearlman E. (2016). JAK/STAT regulation of *Aspergillus fumigatus* corneal infections and IL-6/23-stimulated neutrophil, IL-17, elastase, and MMP9 activity. *J Leukoc Biol*, 100(1), 213-222.
- Tonetti M. S., Greenwell H., & Kornman K. S. (2018). Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol*, 89 Suppl 1, S159-S172.
- 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. *J Clin Periodontol*, 44(5), 456-462.
- Tonetti M. S., & Sanz M. (2019). Implementation of the new classification of periodontal diseases: Decision-making algorithms for clinical practice and education. *J Clin Periodontol*, 46(4), 398-405.
- 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.

- Vavricka S. R., Galván J. A., Dawson H., Soltermann A., Biedermann L., Scharl M. y cols. (2018). Expression Patterns of TNF $\alpha$ , MAdCAM1, and STAT3 in Intestinal and Skin Manifestations of Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis*, 12(3), 347-354.
- Veldhoen M. (2017). Interleukin 17 is a chief orchestrator of immunity. *Nat Immunol*, 18(6), 612-621.
- 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 Dis*, 25(7), 1769-1779.
- 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 Lett*, 415, 117-128.
- Wei W., Xiao X., Li J., Ding H., Pan W., Deng S. y cols. (2019). Activation of the STAT1 Pathway Accelerates Periodontitis in. *J Dent Res*, 98(9), 1027-1036.
- Wilensky A., Segev H., Mizraji G., Shaul Y., Capucha T., Shacham M., & Hovav A. H. (2014). Dendritic cells and their role in periodontal disease. *Oral Dis*, 20(2),
- Wu R., Sun S., & Steinberg B. M. (2003). Requirement of STAT3 activation for differentiation of mucosal stratified squamous epithelium. *Mol Med*, 9(3-4), 77-84.
- Wu W. Y., Li J., Wu Z. S., Zhang C. L., & Meng X. L. (2011). STAT3 activation in monocytes accelerates liver cancer progression. *BMC Cancer*, 11, 506.
- Xiong A., Yang Z., Shen Y., Zhou J., & Shen Q. (2014). Transcription Factor STAT3 as a Novel Molecular Target for Cancer Prevention. *Cancers (Basel)*, 6(2), 926-957.
- Yamane H., & Paul W. E. (2013). Early signaling events that underlie fate decisions of naive CD4(+) T cells toward distinct T-helper cell subsets. *Immunol Rev*, 252(1), 12-23.
- Zenobia C., & Hajishengallis G. (2015). Basic biology and role of interleukin-17 in immunity and inflammation. *Periodontol 2000*, 69(1), 142-159.
- Zhao L., Zhou Y., Xu Y., Sun Y., Li L., & Chen W. (2011). Effect of non-surgical periodontal therapy on the levels of Th17/Th1/Th2 cytokines and their transcription factors in Chinese chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol*, 38(6), 509-516.

## 10. ANEXOS.

### 10.1 Anexo1:



N° 018/FONDECYT/518

Programa  
Fondecyt

Santiago, 30 de Octubre del 2018

Ref.: Proyecto N° 11180389

Señor  
NICOLAS DUTZAN MUÑOZ

Estimado señor DUTZAN:

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

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

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

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

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

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

Saludan atentamente a usted,

EDGAR VOGEL GONZÁLEZ  
Presidente  
Consejo Superior de Ciencia

MARIO HAMUY WACKENHUT  
Presidente  
Consejo Superior de Desarrollo Tecnológico

## 10.2 Anexo 2:



Dirección  
Comité de Ética de la Investigación del Servicio de  
Salud Metropolitano Norte  
Carta N° 018/2019  
Dr. TIS/lcr

Santiago, marzo 20 de 2019

Dr. Nicolas Dutzan  
Investigador Principal  
Facultad de Odontología  
Universidad de Chile  
Presente

Proyecto Fondecyt (iniciación N° 11180389)

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

Estimado Dr. Dutzan:

Acuso recibo de su carta de fecha 22 de febrero de 2019 en que incorpora las modificaciones a su protocolo solicitadas por este Comité no habiendo otras objeciones se da Aprobación definitiva al Protocolo y Consentimiento Informado.

Sin otro particular, le saluda atentamente,

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

DR. JUAN JORGE SILVA SOLÍS  
PRESIDENTE - CEI-SSMN

Calle San José 1053, Independencia,  
Santiago, Chile  
Correo:lorena.carrasco@redsalud.gov.cl  
Fono (56-2) 575 8506  
www.ssmn.cl



## 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 exámen:**

**Nombre:**

**Rut:**

**Telefono:**

**Fecha de nacimiento:**

**Edad:**

**Sexo biológico:**

**Ocupación:**

**Enseñanza media:**

Completa

Si es completa, especificar cursos superiores

Incompleta

Si es incompleta, especificar ultimo curso alcanzado

**Prevision de salud:**

Si es FONASA: Especificar

**Hábitos:**

Tabaco (último año)

Sí No

Promedio de cigarros/dia:

Inicio del consumo:

**Antecedentes Sistémicos**

Diabetes:

Sí No

VIH:

Sí No



Antecedente de Cancer, 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:

Evolucion del tratamiento:

## 10.4 Anexo 4:

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 pronostico.

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.  $\geq 18$  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.  $\geq 18$  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 Asesor 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: \_\_\_\_\_

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

*June*

6



