



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLÓGÍA CONSERVADORA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA PERIODONTAL**

**Rol de los linfocitos Th22 en la resorción ósea producida durante la
periodontitis.**

Victoria Constanza Budini Jorquera

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

TUTORES PRINCIPALES

**Prof. Dra. Paola Carvajal
Prof. Dr. Rolando Vernal Astudillo**

TUTOR ASOCIADO

Prof. Dr. Cristian Cortez Plaza

ASESOR EXPERTO

Dr. Gustavo Monasterio Ocares

**Adscrito a Proyecto Fondecyt regular 1181780
Santiago - Chile
2018**



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLÓGÍA CONSERVADORA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA PERIODONTAL**

**Rol de los linfocitos Th22 en la resorción ósea producida durante la
periodontitis.**

Victoria Constanza Budini Jorquera

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

TUTORES PRINCIPALES

**Prof. Dra. Paola Carvajal
Prof. Dr. Rolando Vernal Astudillo**

TUTOR ASOCIADO

Prof. Dr. Cristian Cortez Plaza

ASESOR EXPERTO

Dr. Gustavo Monasterio Ocares

**Adscrito a Proyecto Fondecyt regular 1181780
Santiago - Chile
2018**

Agradecimientos

Quisiera agradecer primeramente a mis padres por su apoyo y amor incondicional en todos los pasos que di en esta carrera, gracias. A mi “brodo” por siempre tener las palabras justas y el abrazo perfecto cuando se lo pedía, te quiero lino.

A mis primis que a pesar de la distancia siempre se han hecho presentes en cada uno de mis años, las quiero amigas.

A Ale quien me acompañó durante tantos años apoyándome en la carrera, gracias.

A mi grupo certificado de amigos más falsos de la Universidad, sin ustedes, en la vida, me habría reído tanto, los quiero y gracias por hacer este viaje así de divertido: Paula, Pipo, Susi, Vale, Nelson Felipe, Isi, Jessi, Fran.

A mi aspirante a farándula, mi mejor amiga, la dinastía Ballero hecha persona, Scarlett, te quiero hasta el infinito, al fin recuperamos la amistad.

A la gente que el año pasado llegó para quedarse en mi vida, Sol, América, Claudia, las amo, gracias por todo el apoyo que me han dado.

Finalmente quiero agradecer a mi tutor el profesor Rolando Vernal quien fue un gran guía en este camino llamado tesis, me siento infinitamente orgullosa y agradecido de haber sido su pupila en este proyecto.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. RESÚMEN | 7 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 9 |
| 2.1 PERIODONTITIS..... | 9 |
| 2.2 <i>AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS</i> | 10 |
| 2.3 LPS Y SEROTIPOS DE <i>A. ACTINOMYCETEMCOMITANS</i> | 11 |
| 2.4 RESPUESTA INMUNE DURANTE LAS PERIODONTITIS | 13 |
| 2.5 MODELOS ANIMALES | 14 |
| 3. HIPÓTESIS | 16 |
| 4. OBJETIVO GENERAL | 16 |
| 5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 16 |
| 6. METODOLOGÍA | 17 |
| 6.1 TIPO DE ESTUDIO..... | 17 |
| 6.2 <i>AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS</i> | 17 |
| 6.3 INFECCIÓN PERIODONTAL | 17 |
| 6.4 ANÁLISIS DE LA RESORCIÓN ÓSEA MEDIANTE μ CT Y MICROSCOPIA SEM..... | 18 |
| 6.5 EXPRESIÓN DE IL-22, AHR Y RANKL MEDIANTE RT-QPCR | 19 |
| 6.6 EXPRESIÓN DE RANKL MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA..... | 21 |
| 6.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 22 |
| 7. RESULTADOS | 23 |
| 7.1 EXPRESIÓN DE IL-22 Y AHR MEDIANTE QPCR | 23 |
| 7.2 EXPRESIÓN DE RANKL MEDIANTE QPCR..... | 24 |
| 7.3 INMUNODETECCIÓN DE RANKL MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA..... | 24 |
| 7.4 RESORCIÓN DEL HUESO ALVEOLAR MEDIANTE μ CT Y MICROSCOPIA SEM..... | 26 |
| 7.5 CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE IL-22 Y RANKL <i>VERSUS</i> LA RESORCIÓN ÓSEA ALVEOLAR | 27 |
| 8. DISCUSIÓN | 28 |
| 9. CONCLUSIONES | 32 |

| | |
|--|-----------|
| 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 33 |
| 11. ANEXOS..... | 42 |
| 11.1 INFORME DE APROBACIÓN BIOÉTICA..... | 42 |
| 11.2 INFORMA APROBACIÓN DE BIOSEGURIDAD..... | 43 |

1. RESÚMEN

Las enfermedades periodontales son un conjunto de patologías de naturaleza inflamatoria y etiología infecciosa que afecta al periodonto, de las cuales la periodontitis es la condición más común en la cavidad oral. El biofilm bacteriano es el factor etiológico responsable del inicio y progresión de la periodontitis. Recientemente, se ha propuesto un modelo de patogenia periodontal llamado Sinergia Polimicrobiana y Disbiosis en el que las comunidades de microorganismos que colonizan el crévice gingival están en equilibrio con el huésped, pero a causa de un desbalance ecológico se ve afectada la respuesta inmune del hospedero, lo que finalmente altera la homeostasis del tejido periodontal. Las comunidades de microorganismos que colonizan el crévice gingival están compuestas por una amplia variedad de bacterias, entre ellas *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Sobre la base de la antigenicidad del O-polisacárido, componente del LPS, en *A. actinomycetemcomitans* se describen distintos serotipos bacterianos. Varios estudios han determinado que el serotipo b se asocia a la patogenia de las periodontitis más severas.

La respuesta inmune del hospedero es el determinante responsable final de la destrucción de los tejidos periodontales que caracteriza a la enfermedad. Las bacterias periodonto-patógenas son fagocitadas por las células dendríticas las que procesan sus antígenos para presentarlos a los linfocitos T. Durante esta presentación antigénica, las células dendríticas maduran y producen citoquinas, las que cumplen un rol fundamental en la activación, proliferación y diferenciación selectiva de los linfocitos TCD4⁺ naïve hacia los distintos fenotipos efectores, caracterizados por la expresión y secreción de un patrón específico de citoquinas que determina el tipo de respuesta inmune del hospedero y, por lo tanto, el fenotipo clínico de las periodontitis. Recientemente, se ha descrito un nuevo fenotipo linfocitario T efector, denominado linfocito Th22. Éste se diferencia en presencia de TNF- α e IL-6 durante la presentación antigénica y expresa AhR como factor de transcripción específico, determinante de su fenotipo y función. Aunque, su rol patogénico durante las periodontitis aún no ha sido descrito completamente, considerando la patogenia de otras enfermedades inflamatorias crónicas, los

linfocitos Th22 podrían jugar un rol pro-inflamatorio y pro-osteo-destructivo mediante la producción de IL-22.

En este trabajo de investigación, se evaluó el rol de los linfocitos Th22 en la reabsorción ósea durante la periodontitis generada por la inoculación de LPS purificado de *A. actinomycetemcomitans* en un modelo experimental en ratones. Se cuantificaron mediante qPCR los niveles de expresión de los mRNA de IL-22, AhR y RANKL. Además, se detectó la presencia mediante la técnica de inmunofluorescencia de RANKL en las lesiones periodontales. Por último, se midió, visualizó y comparó la pérdida ósea mediante microscopía SEM y μ CT entre los tres grupos de estudio.

En conjunto, los datos obtenidos permiten establecer que: (1) existen mayores niveles de expresión de IL-22, AhR y RANKL en las lesiones periodontales experimentales, en comparación, animales de los grupos de ratones inoculados con PBS libre de LPS (Sham) y no infectado (n.i.) presentaron niveles de expresión significativamente menores. (2) Existe una mayor resorción ósea en los animales infectados en contraposición con los ratones inoculados con PBS libre de LPS (Sham) y no infectado (n.i.). (3) Los linfocitos Th22 en las lesiones periodontales podrían contribuir a la resorción ósea alveolar.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Periodontitis

La periodontitis es una patología de naturaleza inflamatoria y etiología infecciosa que afecta al periodonto, es decir, a los tejidos que soportan y rodean a los dientes (Cochran, 2008). Clínicamente, la periodontitis se caracteriza por presentar inflamación gingival, resorción del hueso alveolar y pérdida de inserción dentaria, que provocan la formación de saco periodontal y, finalmente, la pérdida de los dientes (Botero y Bedoya, 2010).

Epidemiológicamente, la periodontitis es la condición más común en la cavidad oral y es altamente prevalente a nivel mundial, llegando hasta un 63% de prevalencia en países en vías de desarrollo y un 47% en países desarrollados (Nazir, 2017). En Chile, el 90% de la población adulta presenta signos clínicos de esta patología en sus distintos grados de severidad (Gamonal y cols., 2010).

El biofilm bacteriano es el factor etiológico responsable del inicio y progresión de la periodontitis. Este biofilm tiene como característica la agregación microbiana en un ambiente acuoso y las bacterias que lo componen son capaces de secretar sustancias que permiten su adhesión al diente y la coagregación de nuevas especies bacterianas patógenas. Durante este proceso de maduración, las asociaciones bacterianas se organizan estructuralmente y funcionalmente para compartir nutrientes y factores de coagregación (Darveau, 2010).

Recientemente, se ha propuesto un nuevo modelo de etiopatogenia de la periodontitis llamado Sinergia Polimicrobiana y Disbiosis (PSD, del inglés *Polymicrobial Sinergy and Disbiosis*). Según este modelo, las comunidades de microorganismos que colonizan el crévice gingival están en equilibrio con el hospedero; sin embargo, un desbalance ecológico generado por la colonización de patógenos claves y un desequilibrio en la abundancia de la microbiota, o disbiosis, afectan la respuesta inmune del hospedero, lo que finalmente altera la homeostasis periodontal (Hajishengallis y Lamont 2012; Lamont y Hajishengallis 2016).

Según la localización de las comunidades de microorganismos, se describe un biofilm supragingival y uno subgingival. El primero está constituido principalmente por bacterias Gram-positivas facultativas; el biofilm subgingival, en cambio, está conformado por una amplia gama de bacterias principalmente anaerobias Gram-negativas, entre ellas, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Haffajee y cols., 2008; Socransky y cols., 1998).

2.2 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

A. actinomycetemcomitans es una bacteria orofaríngea endógena característica de los humanos. Corresponde a un cocobacilo Gram-negativo pequeño, anaerobio facultativo y no móvil, miembro del género *Aggregatibacter* perteneciente a la familia de *Pasteurellaceae* que requiere de un ambiente preferentemente capnofílico para su desarrollo (Norskov-Lauritsen y Kilian, 2006; Díaz-Zúñiga y cols., 2013). *A. actinomycetemcomitans* está presente en condiciones de salud en los individuos; sin embargo, puede convertirse en uno de los microorganismos más abundantes en la cavidad oral de adolescentes y adultos jóvenes afectados por periodontitis. En este sentido, existe evidencia que sostiene a este patógeno como el factor etiológico más importante en el inicio y progresión de las formas agresivas de periodontitis (Armitage, 2010; Socransky y Haffajee, 2000).

A. actinomycetemcomitans expresa diversos factores de virulencia, algunos de los cuales interactúan con las células del hospedero para iniciar la respuesta inmunoinflamatoria que altera la homeostasis normal celular y molecular de los tejidos periodontales (Herbert y cols., 2016). Entre estos factores de virulencia, se destaca el lipopolisacárido (LPS) (Fig. 1).

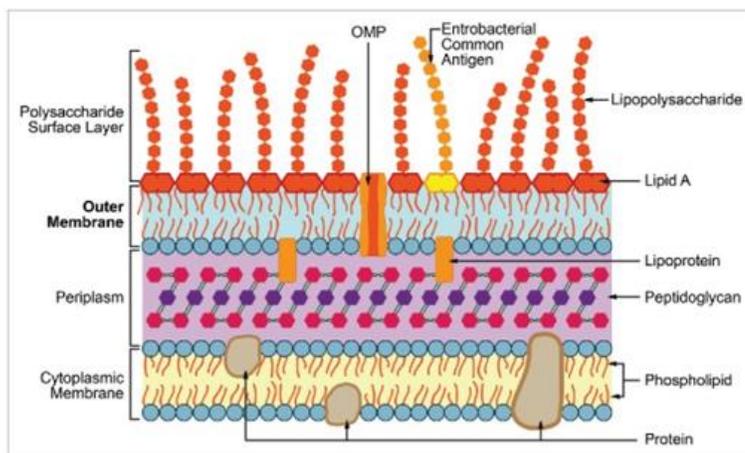


Figura 1. Esquema de la estructura de membrana externa de una célula Gram-negativa en la que se muestra su LPS. (Benso B. 2017).

2.3 LPS y serotipos de *A. actinomycetemcomitans*

El LPS es uno de los determinantes centrales del potencial patogénico de *A. actinomycetemcomitans* (Kayal, 2013). El LPS de *A. actinomycetemcomitans* es un potente agonista de los receptores tipo Toll (TLR, del inglés *Toll-like receptor*) TLR2 y TLR4 (Park y Cols., 2014); así, producto de la interacción LPS-TLR2/TLR4, se desencadena la respuesta inmune celular del hospedero, que involucra células presentadoras de antígenos y linfocitos T, los que determinan el fenotipo clínico de la periodontitis.

En términos generales, el LPS está constituido por tres dominios moleculares: el lípido A, una cadena central de oligosacáridos y los O-polisacáridos (O-PS), principales inmunógenos del LPS de *A. actinomycetemcomitans*. El lípido A está asociado con la porción hidrófoba de la membrana celular externa bacteriana y los oligosacáridos centrales están unidos covalentemente al lípido A (Tang y cols., 2012). Por otro lado, los O-PS son el componente externo del LPS y conforma la superficie de la bacteria. Su estructura es altamente variable e inmunogénica, lo que permite la tipificación bacteriana al distinguir diferentes serotipos bacterianos (Jain y Darveau, 2010). Así, los O-PS estructuralmente distintos definen los diferentes serotipos de *A. actinomycetemcomitans* y su variabilidad inmunogénica *in vitro* (Díaz-Zúñiga y cols., 2015).

En *A. actinomycetemcomitans*, se reconocen siete serotipos bacterianos distintos (a-g), definidos sobre la base de la antigenicidad del O-PS componente de su LPS (Takada y Cols., 2010). Entre ellos, los serotipos a, b y c son los detectados más frecuentemente en latino-americanos, europeos, africanos y asiáticos (Aberg y Cols., 2012; Bandhaya P y Cols., 2012; Chen y Cols., 2010; Cortelli y Cols., 2011; Jentsch y Cols., 2012; Roman-Torres y Cols., 2010; Sakellari y Cols., 2011), con variaciones de prevalencia dependiendo del estado clínico periodontal del individuo.

Esta asociación serotipo-clínica variable sugiere una virulencia diferente entre los diferentes serotipos de *A. actinomycetemcomitans*. En efecto, se ha establecido que los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans* inducen una respuesta inmune diferente en las células del hospedero (Takahashi y cols., 1991; Yamaguchi y cols., 1995; Shimada y cols., 2008). Además, su detección en pacientes con periodontitis también es variable, donde el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* se asocia a las periodontitis más severas y los serotipos a y c se asocian a las periodontitis menos severas e incluso a salud periodontal (Díaz-Zúñiga y cols., 2013).

En pacientes afectados de periodontitis, el serotipo b se aísla más frecuentemente desde las lesiones periodontales con activa destrucción tisular (Paju y cols., 2000). Además, el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* induce mayor producción de mediadores pro-inflamatorios y pro-ósteo-destructivos en las células inmunes del hospedero, tal como el factor denominado ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B (RANKL) (Díaz-Zúñiga y cols., 2015). En efecto, estudios clínicos indican que niveles elevados de RANKL son detectados en el fluido gingival crevicular en pacientes con periodontitis (Vernal y cols., 2004; Vernal y cols., 2006). En particular, el serotipo b produce mayor cantidad de micro-vesículas citotóxicas de membrana, es más resistente a la fagocitosis y muerte por leucocitos polimorfonucleares e induce mayor expresión de interleuquina (IL)-8 en queratinocitos gingivales, IL-1 β en macrófagos periodontales e IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, interferón (IFN)- γ y factor de necrosis tumoral (TNF)- α en células dendríticas y linfocitos T, citoquinas propias de un patrón de respuesta inmune tipo Th1 y Th17 (Díaz-Zúñiga y cols., 2015; Díaz-Zúñiga y cols., 2013).

2.4 Respuesta inmune durante las periodontitis

Aunque las bacterias son el factor etiológico de las periodontitis, la respuesta inmune del hospedero es el determinante final responsable de la destrucción de los tejidos periodontales que caracteriza a la enfermedad.

Las células dendríticas periodontales fagocitan a las bacterias patógenas y procesan sus antígenos para presentarlos a los linfocitos T. Durante esta presentación antigénica, las células dendríticas maduran y producen citoquinas, las que cumplen un rol fundamental en la activación, proliferación y diferenciación selectiva de los linfocitos TCD4⁺ naïve hacia los distintos fenotipos efectores. Los fenotipos efectores linfocitarios característicos de la respuesta inmune del hospedero durante las periodontitis son los linfocitos T colaboradores tipo Th1 y Th17 (Días-Zúñiga y cols. 2017a). Cada fenotipo linfocitario efector se define por la expresión de un factor de transcripción particular y la secreción de un perfil de citoquinas específico que determina su función.

Recientemente, se ha descrito un nuevo fenotipo linfocitario T efector, denominado linfocito Th22. Éste se diferencia en presencia de TNF- α e IL-6 durante la presentación antigénica y expresa AhR como factor de transcripción específico, determinante de su fenotipo y función (Baba y cols., 2012; Kim y cols., 2012). El rol patogénico de los linfocitos Th22 durante las periodontitis aún no ha sido descrito completamente; sin embargo, considerando la patogenia de otras enfermedades inflamatorias crónicas, los linfocitos Th22 podrían jugar un rol pro-inflamatorio y pro-ósteo-destructivo mediante la producción de IL-22 (Días-Zúñiga y cols., 2017b; Luo y cols., 2013; Ramanathan y cols., 2017; Wang y cols., 2014; Zhu y cols., 2015).

Por ejemplo, durante la peri-implantitis, existe una reacción inflamatoria de los tejidos que rodean al implante, lo que puede ocasionar la pérdida del hueso de soporte y el fracaso del implante (Fransson y cols., 2010). Elevados niveles de IL-22 son detectados en los tejidos circundantes al implante afectado de periimplantitis y estos niveles incrementados se han asociado a la resorción del hueso alveolar (Luo y cols., 2013).

Durante la artritis reumatoide, IL-22 contribuye a la respuesta mediada por TNF α , IL-1 β e IL-6, que determinan a su vez la pérdida del hueso articular sub-condral (Ikeuchi y cols., 2005; Xie y cols., 2014). En estos pacientes, IL-22 favorece la expresión de RANKL por fibroblastos sinoviales y osteoblastos, que a su vez determina la diferenciación y activación de osteoclastos e induce la resorción ósea articular sub-condral (Kim y cols., 2012).

En términos generales, los linfocitos Th22 podrían estar asociados a la resorción ósea durante las enfermedades óseo-destructivas, entre ellas la periodontitis, mediante la inducción de la expresión de RANKL. En este contexto, elevados niveles de RANKL han sido detectados en sujetos con periodontitis en comparación a individuos sanos (Balci Yuce y cols., 2017). Así, se puede especular que los linfocitos Th22 podrían participar de los eventos patogénicos que definen a la periodontitis, de tal manera que un incremento en los niveles de su factor de transcripción específico AhR y su citoquina particular IL-22 se podría asociar a la producción de RANKL y la resorción del hueso alveolar.

2.5 Modelos animales

Los modelos animales de enfermedades humanas son herramientas indispensables en la investigación biomédica. En términos generales, se utilizan para comprender la etiología y patogenia de las enfermedades, con el objeto de generar herramientas preventivas, de diagnóstico, pronóstico y tratamiento de ellas (Hanqing, 2012). Los animales que se usan como modelos de estudio pueden ser conejos, ratas y, como el caso del presente estudio, ratones, que es el modelo de experimentación más utilizado en las investigaciones de enfermedades orales. Esto no resulta sorprendente, dado que el 99% de los genes del ratón son conservados y similares a los del humano. En general, los ratones son el modelo de elección para investigar la respuesta de un hospedero ante una infección experimental (Hanqing, 2012).

Unos de los puntos de mayor relevancia al trabajar con animales de experimentación son su cuidado y manipulación, siguiendo la normativa ética vigente. En 1959, W. Russell y R. Burchen su libro "The principles of humane

experimental technique” definieron claramente las normas en las que se basan los principios éticos en la investigación con animales de experimentación “las tres Rs”, que son: reducir al mínimo necesario de animales a utilizar que permitan obtener resultados científicamente válidos, reemplazar el uso de animales por métodos alternativos que no usen animales, y refinar realizando todos los procedimientos necesarios para minimizar o eliminar el dolor, así como todos los métodos de enriquecimiento, que permitan asegurar el bienestar animal (Hernández, 2006; Russell y Burch, 1959). Estos principios han sido cumplidos a cabalidad en la presente investigación.

En particular, en este estudio se utilizó un modelo animal de periodontitis experimental estandarizado y previamente publicado (Liang y cols., 2018; Pan y cols., 2018; Yang y cols., 2013), en el cual ratones BALB/c fueron inoculados mediante punción palatina bilateral con LPS purificado de *A. actinomycetemcomitans*. El protocolo experimental completo fue aprobado y monitoreado por el Comité de Bioética para Investigación en Animales de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (Anexo 1).

Utilizando este modelo animal de periodontitis experimental y considerando en conjunto la información presentada, en el presente estudio se analizaron los niveles de expresión de IL-22 y AhR, citoquina y factor de transcripción característicos del fenotipo linfocitario Th22, en lesiones periodontales experimentales inducidas por LPS purificado de *A. actinomycetemcomitans*, y estos niveles se asociaron a la producción local de RANKL y la resorción del hueso alveolar.

3. HIPÓTESIS

En lesiones periodontales experimentales inducidas por LPS purificado del serotipo b de *A. actinomycetemcomitans*, se produce un incremento en la expresión de IL-22 y AhR, citoquina y factor de transcripción característicos del fenotipo linfocitario Th22, y este incremento se asocia a una mayor expresión de RANKL y mayor resorción del hueso alveolar.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar los niveles de expresión de IL-22 y AhR en lesiones periodontales experimentales inducidas por LPS purificado del serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* y asociarlos a los niveles de expresión de RANKL y de resorción del hueso alveolar.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cuantificar los niveles de expresión de IL-22 y AhR en lesiones periodontales experimentales inducidas por LPS de *A. actinomycetemcomitans*.
2. Cuantificar los niveles de expresión RANKL en lesiones periodontales experimentales inducidas por LPS de *A. actinomycetemcomitans* y asociarlos con los niveles de expresión de IL-22 y AhR.
3. Cuantificar la resorción del hueso alveolar observada en lesiones periodontales experimentales inducidas por LPS de *A. actinomycetemcomitans* y asociarla con los niveles de expresión de IL-22, AhR y RANKL.

6. METODOLOGÍA

6.1 Tipo de estudio

Estudio de tipo experimental, transversal y de apreciación cuantitativa.

6.2 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

La cepa ATCC® 43718™ perteneciente al serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* fue utilizada en este estudio dado que es la cepa más virulenta de esta especie microbiana. Esta cepa se cultivó en un medio agar infusión cerebro-corazón (Oxoid Ltd., Hampshire, Inglaterra) e incubó a 37°C en condiciones de capnofilia (O₂ 8% y CO₂ 12%) usando generadores CampyGen™ (Oxoid Ltd.). La infección periodontal se indujo usando LPS purificado de la bacteria, que fue obtenido mediante una versión modificada del protocolo de TRI-reagent. Para esto, las bacterias se cultivaron en infusión cerebro-corazón (Oxoid Ltd.) hasta alcanzar la fase de crecimiento estacionario. Las bacterias se centrifugaron a 6.000 xg a 4°C durante 4 minutos y el pellet obtenido se lavó tres veces con amortiguador de fosfato salino (PBS). Luego, el pellet se incubó en 3 mL de una mezcla de TRIzol® Reagent (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) y cloroformo (Fluka Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU), en una proporción de 5:1, a temperatura ambiente durante 30 minutos. La fase acuosa se recuperó y liofilizó durante toda la noche. La purificación del LPS se realizó usando 0,375 M de MgCl₂ en etanol 95% y el producto se lavó 5 veces con una mezcla de etanol 95% y reactivo de Folch 1% (cloroformo y MeOH en una proporción de 2:1). El LPS purificado se visualizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 14% tris-glicina sodio dodecil-sulfato (SDS-PAGE), teñido con ácido peryódico de plata, y se cuantificó mediante la reacción del ácido tiobarbitúrico malondialdehído.

6.3 Infección periodontal

Ratones BALB/c de 8 semanas de edad se infectaron mediante microinyección palatina directa entre el primer y tercer molar, tanto en el lado izquierdo

como en el derecho. Las inyecciones contenían 20 µg de LPS purificado de *A. actinomycetemcomitans* en 2 µL de PBS y se realizaron dos veces cada semana durante 30 días. Se utilizaron 12 ratones que se dividieron en 3 grupos de 4 ratones cada uno. Grupo 1: ratones infectados con LPS purificado de *A. actinomycetemcomitans*. Grupo 2: ratones infectados con PBS libre de LPS (grupo control sham). Grupo 3: animales no infectados (grupo n.i.). Los animales se alojaron en las instalaciones para animales de la Plataforma Experimental de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Se mantuvieron en jaulas separadas en condiciones estándar en ciclos de luz/oscuridad de 12:12 horas, con luces encendidas a las 07:00 am, a 24 ±0,5°C y 40-70% de humedad ambiental, con una tasa de intercambio de aire de 15 volúmenes/hora. Durante el período de la investigación, los animales tuvieron acceso libre a la comida y agua estériles. El protocolo fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales y los experimentos se llevaron a cabo siguiendo las pautas establecidas por el Consejo de la Sociedad Americana de Veterinaria de 1980 para el uso de animales de experimentación y las recomendaciones de la American Veterinary Medical Association.

6.4 Análisis de la resorción ósea mediante µCT y microscopía SEM

Se realizó la eutanasia de los ratones por un profesional calificado (Dra. Carolina Vega de la Plataforma Experimental) a los 30 días de la primera inoculación bacteriana, mediante dislocación cervical bajo anestesia con ketamina y xylacina. El maxilar se disecó para obtener el hueso libre de tejidos blandos para cuantificar la extensión y el porcentaje de resorción ósea alveolar. El maxilar se dividió en dos mitades desde la línea media entre los incisivos centrales. Una mitad se utilizó para el análisis mediante micro-tomografía computarizada (µCT), mientras que la otra mitad se utilizó para el análisis mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Para el análisis con µCT, las muestras se escanearon en los tres planos espaciales usando un equipo Skyscan 1278 (Bruker, Kontich, Bélgica), ajustado con los siguientes parámetros: 60 kV, 590 µA, 0,5° de rotación y 360° de rango angular. Se generaron imágenes 3D digitalizadas usando un algoritmo modificado de cone-

beam (Feldkamp y cols., 1984) y un software específico de reconstrucción (Nrecon software; Bruker, Kontich, Bélgica). Los datos se cuantificaron utilizando un protocolo descrito previamente por Chan Ho Park en 2007 (Park y cols., 2007), usando un software de análisis (Dataviewer software; Bruker, Kontich, Bélgica). Para el análisis mediante SEM, las hemimaxilas se lavaron en peróxido de hidrógeno 3% y, previo lavado en PBS, se fijaron en glutaraldehído 2,5%. Posteriormente, los especímenes se deshidrataron mediante inmersión usando un gradiente ascendente de etanoles hasta el 100%, se cubrieron con una capa de oro de 200 nm de grosor y se analizaron a un aumento de 30x en un microscopio JSM-IT300LV (Jeol Ltd., Akishima, Tokio, Japón) a 20 kV. La pérdida ósea analizada usando μ CT se expresó como porcentaje de resorción ósea, y la analizada usando SEM se expresó como área de resorción ósea entre la superficie mesial del primer molar y la superficie distal del tercer molar, y entre la unión amelo-cementaria y la cresta ósea alveolar. Todos los datos fueron recolectados por un solo observador, quien estuvo ciego a las condiciones experimentales de las muestras.

6.5 Expresión de IL-22, AhR y RANKL mediante RT-qPCR

Para determinar si la resorción ósea alveolar se asocia a los cambios en la expresión del factor de transcripción específico de linfocitos Th22 (AhR), su citoquina específica (IL-22) y el factor RANKL, se cuantificaron los niveles de sus mRNA mediante RT-qPCR. Para esto, se obtuvo quirúrgicamente la mucosa palatina total localizada entre la superficie distal del tercer molar y las rugas palatinas, separándola del periostio subyacente utilizando un decolador romo con fuerza suave. Luego, la muestra biológica de la lesión periodontal consistente de epitelio palatino y tejido conectivo denso subepitelial se fragmentó en trozos de ~ 1 mm³ y homogeneizó manualmente en un vial libre de RNasas usando 1 mL de reactivo de purificación de ácidos nucleicos TRIzol[®] Plus (Invitrogen Corp., Barcelona, España), siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego, al homogeneizado se agregó 200 μ L de cloroformo y las fases se separaron centrifugando a 12.000 xg por 15 minutos a 4°C. Posteriormente, se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y el RNA total se precipitó con 20 μ g/mL de glicógeno y 500 μ L de isopropanol. Se centrifugó a 12.000 xg por 10 minutos a 4°C, se eliminó el

sobrenadante y el pellet se re-suspendió en 1 mL de etanol 75% con el objeto de limpiar la muestra obtenida. Enseguida, se agitó el tubo durante 3 segundos y se centrifugó a 7.500 xg durante 5 minutos a 4°C. Finalmente, el RNA citoplasmático total extraído se re-suspendió en 10 µL de agua milli-Q y se cuantificó utilizando un espectrofotómetro (Synergy™ HT; Bio-Tek Instrument Inc., Winooski, VT, EEUU).

Posteriormente, la primera cadena de cDNA se sintetizó usando 1 µg de RNA total con un kit de transcripción inversa (SuperScrip™III; Invitrogen, Grand Island, NY, EEUU), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Finalmente, se amplificaron 10 ng de cDNA utilizando los partidores apropiados (Tabla 1) y un kit KAPA™ SYBR® Fast qPCR (KAPA Biosystems, Woburn, MA, EEUU) en un equipo de qPCR (StepOnePlus®; Applied Biosystems, Singapur). La amplificación se llevó a cabo de la siguiente manera: un primer paso de 95°C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 3 segundos y 60°C durante 30 segundos. Con el objetivo de detectar amplificación inespecífica y falsos positivos, se realizó una curva de degradación del producto de amplificación de 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto y 95°C durante 15 segundos. Como control endógeno, se cuantificaron los niveles de expresión de la subunidad rRNA 18S. Para cada espécimen, los experimentos se realizaron por separado y en triplicado.

| Citoquina / Factor de transcripción | Partidor <i>Forward</i> | Partidor <i>Reverse</i> |
|-------------------------------------|----------------------------|-------------------------|
| IL-22 | GTGGAGAGATCAAGGCGATT | GTGGAGAGATCAAGGCGATT |
| AhR | GCCAAGAGCTTCTTTGATGG | TGCTGAAAGCCCAGGTAATC |
| RANKL | TGAAGACACACTACCTGACTCCTG | CCCACAATGTGTTGCAGTTC |
| 18S rRNA | GCAATTATTCCCATGAACG | GGGACTTAATCAACGCAAGC |

Tabla 1. Partidores específicos para la cuantificación mediante RT-qPCR.

6.6 Expresión de RANKL mediante inmunofluorescencia

Las biopsias de las lesiones periodontales se suspendieron en formaldehído al 10% tamponado a pH neutro, en una relación 1:20 muestras-fijador por 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras fueron descalcificadas en EDTA al 5% durante 45 días a 4°C en una concentración 1:20. La descalcificación se controló mediante radiografías. Una vez descalcificadas, las muestras fueron procesadas en histoprocador de tejidos tipo carrusel Thermo Fisher Scientific™ STP120 (Waltham, Massachusetts, EEUU). La técnica consta de una deshidratación de la muestra en seis contenedores con alcoholes etílicos de graduación ascendente (70°, 85°, 95°, 95°, 100° y 100°) y xilol. Luego, las muestras fueron incluidas en parafina para obtener cortes histológicos. Los cortes histológicos se realizaron en un micrótopo pedestal Leica RM2235 (Leica microsystems®, Wetzlar, Alemania) con ángulo 10°, realizando cortes de 8 µm de grosor. Posteriormente, los cortes se depositaron en baño de flotación a 40°C para adherirlos en portaobjetos cargados negativamente. Luego, los cortes fueron secados a 60°C durante 2 horas y se almacenaron a 4°C. Los cortes se desparafinaron en xilol, seguido de alcoholes etílicos en grado descendente, hasta hidratarlos en agua. Para el inmuno-marcaje, se realizó la recuperación antigénica con amortiguador citrato de sodio 2,5% pH 6,0 en vaporera a 100°C, para desenmascarar los epítomos bloqueados por los puentes metilénicos generados durante la fijación tisular. Luego, se realizó el bloqueo con albúmina de suero bovino 2,5% y se incubó el anticuerpo primario de cabra anti-TRANCE/TNFSF11/RANKL (Bio-technne®, Mineapolis, Minnesota, EEUU) de ratón a una concentración 1:100 durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Previo lavado con PBS-Tween 20 0,05%, el marcaje primario se reveló con un anticuerpo secundario de burro anti-cabra IgG H&L (Abcam®, Cambridge, Inglaterra) conjugado con fluoresceína-isotiocianato (FITC) diluido 1:500 durante 1 hora a 4°C. Para identificar los núcleos celulares, los cortes se incubaron con solución DAPI en una dilución 1:1000 durante 1 minuto a temperatura ambiente.

Las visualizaciones se realizaron en un microscopio confocal Leica TCS SP8 (Leica microsystems®, Wetzlar, Alemania). Las imágenes fueron obtenidas bajo objetivo seco y magnificación de 10X, ajustando la intensidad de la fluorescencia de los

láseres 405 nm (UV), 488nm (verde) y 562nm (rojo) y la ganancia de los detectores fotomultiplicadores. La adquisición de las imágenes se obtuvo en un formato de 1024x1024 píxeles, y se editaron con el software Imaris 7.4.2 (Leica, Wetzlar, Alemania), con la finalidad de eliminar el marcaje inespecífico de la inmuno-tinción. La intensidad de cada canal de fluorescencia se ajustó para cada marcador específico, lo que permitió el análisis comparativo de los diferentes grupos en experimentales.

6.7 Análisis estadístico

Los resultados de resorción ósea alveolar fueron calculados como porcentajes (μ CT) y μm^2 (SEM) y presentados como media \pm desviación estándar. La expresión de IL-22, AhR y RANKL, determinada mediante RT-qPCR, se analizó usando el software StepOne v.2.2.2 (Applied Biosystems, Foster City, California, EEUU) y se presentó como la media \pm desviación usando el método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. Los datos se analizaron estadísticamente utilizando el software SPSS v.22.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EEUU). La normalidad de la distribución de datos se determinó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y las diferencias entre los grupos se analizaron con las pruebas ANOVA y post-hoc Tukey. Se correlacionó la expresión de IL-22 y RANKL con la resorción ósea detectada usando el coeficiente de correlación de Pearson. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor p fue $<0,05$.

7. RESULTADOS

7.1 Expresión de IL-22 y AhR mediante qPCR

Significativamente, mayores niveles de expresión de mRNAs de IL-22 ($p < 0,001$) y AhR ($p = 0,001$) fueron detectados en las lesiones periodontales de ratones infectados mediante inoculación oral de 20 μg de LPS purificado de *A. actinomycetemcomitans* cuando se compara a los niveles detectados en los tejidos periodontales de los animales infectados con PBS libre de LPS (grupo control sham) y no infectados (n.i.) (Fig. 2A). Además, el análisis de correlación realizado entre la expresión de IL-22 y AhR en los animales infectados produjo una correlación positiva significativa ($p = 0,001$, $r = 0,922$), sugiriendo que el aumento de la expresión de IL-22 en las lesiones periodontales se asoció con la función de los linfocitos T AhR⁺ (Fig. 2B).

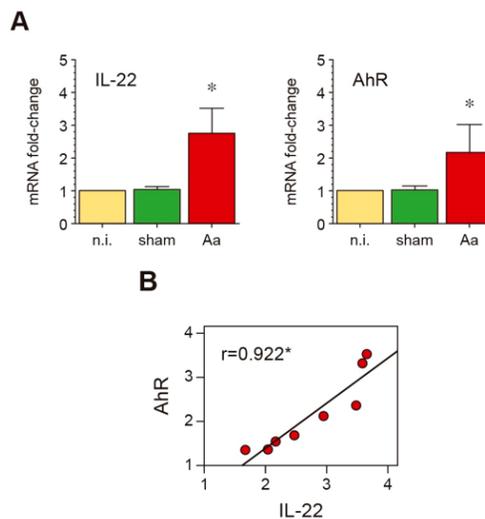


Figura 2. Expresión de IL-22 y AhR cuantificada mediante qPCR. A) Expresión del mRNA de IL-22 y AhR en lesiones periodontales de ratones infectados por vía oral con 20 μg de LPS purificado de *A. actinomycetemcomitans*. Para la expresión relativa, la expresión de mRNA de IL-22 y AhR en ratones no infectados (n.i.) se consideró como 1, como una referencia para el cambio en la expresión. Se usaron ratones infectados con placebo (sham) como controles. Los datos se representan como un cambio en el número de mRNA y se muestran como media \pm desviación estándar de 8 experimentos independientes. Cada experimento se realizó por duplicado. **B)** Correlación entre los niveles expresados de mRNA de IL-22 y AhR. El coeficiente de correlación de Pearson (r) se calculó para 8 experimentos independientes. * $p < 0,05$. Aa, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; AhR, factor de transcripción del receptor de aril hidrocarburo; IL-22, interleuquina-22.

7.2 Expresión de RANKL mediante qPCR

Se detectó, un incremento en los niveles de expresión de mRNA de RANKL en las lesiones periodontales de ratones inoculados con LPS purificado de *A. actinomycetemcomitans* ($p < 0,001$) en comparación con tejidos periodontales de los animales no infectados (n.i.) y los inoculados con PBS libre de LPS (sham) (Fig. 3A). En las lesiones periodontales de ratones infectados, el análisis de correlación arrojó una correlación positiva significativa entre la expresión de RANKL e IL-22 ($p = 0,003$, $r = 0,889$), sugiriendo que los cambios en la expresión de RANKL en las lesiones periodontales estaban asociados con la función de linfocitos Th22 (Fig. 3B).

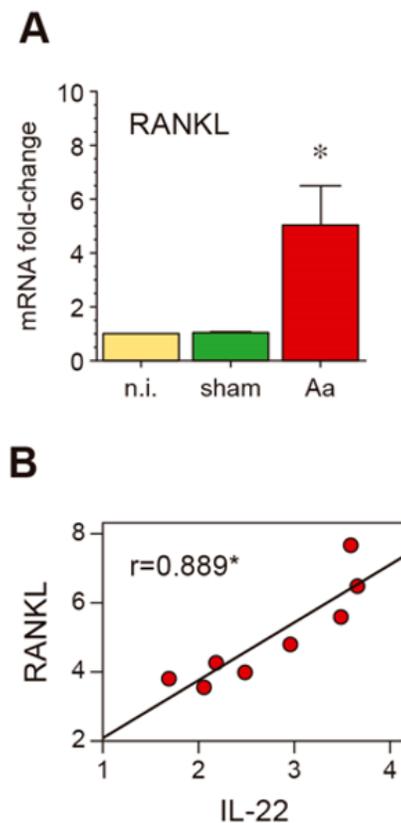


Figura 3. Expresión RANKL cuantificada mediante qPCR.

A) Expresión del mRNA de RANKL en lesiones periodontales de ratones infectados por vía oral con 20 μ g de *A. actinomycetemcomitans*. Para la expresión relativa, la expresión del mRNA de RANKL en ratones no infectados (n.i) se consideró como 1, como una referencia para el cambio en la expresión. Se usaron ratones inoculados con placebo (sham) como controles. Los datos se representan como un cambio en el número de mRNA y se muestran como media \pm desviación estándar de 8 experimentos independientes. Cada experimento se realizó por duplicado.

B) Correlación entre los niveles expresados de mRNA de IL-22 y RANKL. El coeficiente de correlación de Pearson (r) se calculó para 8 experimentos independientes. * $p < 0,05$. Aa, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; RANKL, ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B.

7.3 Inmunodetección de RANKL mediante inmunofluorescencia

En las lesiones periodontales de ratones infectados con LPS purificado de *A. actinomycetemcomitans*, se observó una inmuno-detección de RANKL de diversas intensidades; por el contrario, se observó poca o nula inmuno-detección de RANKL en los tejidos periodontales de los animales control inoculados con placebo (sham) y los no infectados (n.i.) (Fig. 4).

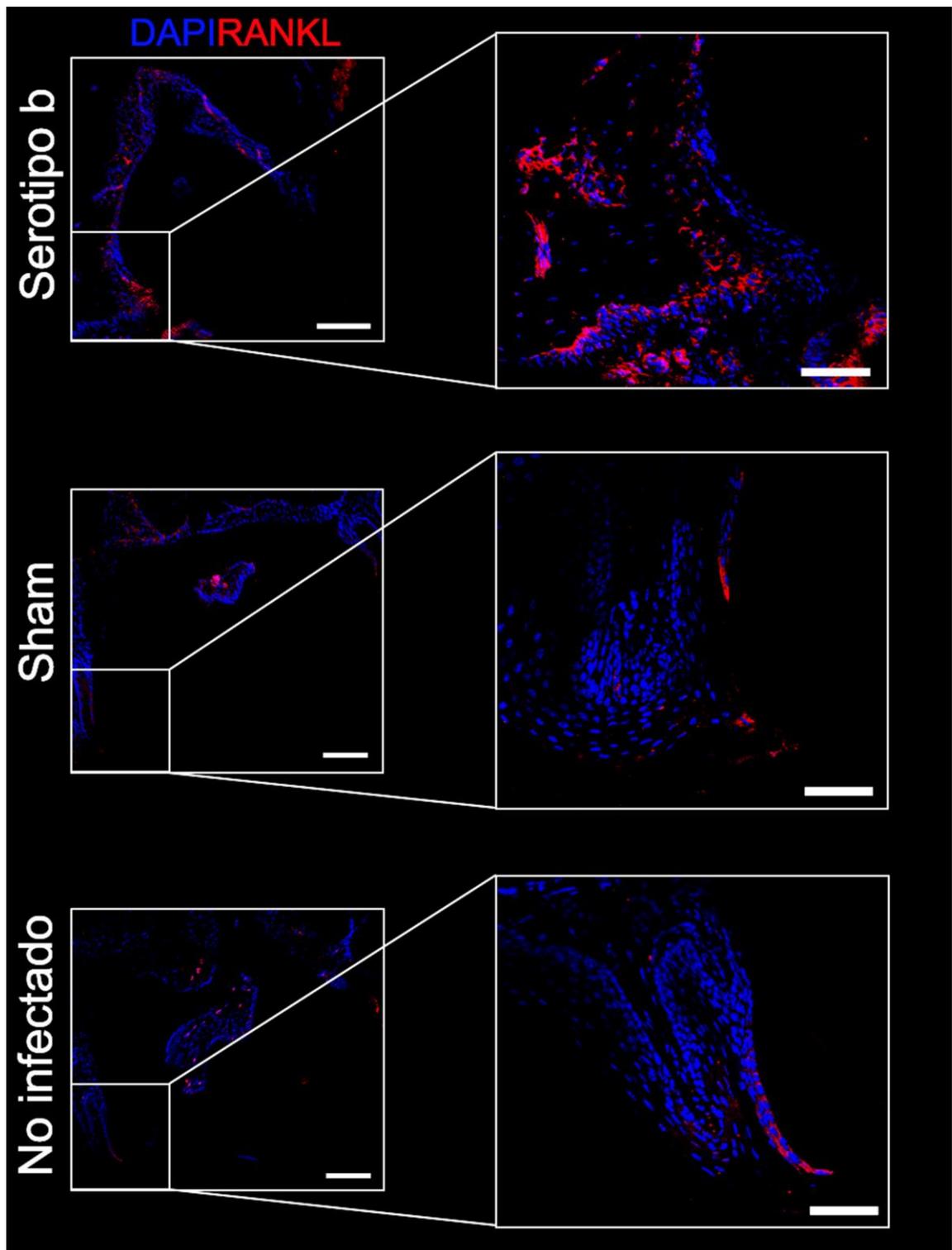


Figura 4. Detección de RANKL mediante inmunofluorescencia. Inmuno-reactividad de RANKL analizada mediante microscopía de fluorescencia en una lesión periodontal representativa de un ratón infectado oralmente con LPS purificado de *A. actinomycetemcomitans*. La inmuno-reacción en animales inoculados con PBS sin LPS (sham) y no infectados (non-infected) fue usada como control. La tinción DAPI fue utilizada para inmunolocalizar los núcleos celulares. Barra imágenes derechas: 200 μ m. Barras imágenes izquierdas: 50 μ m.

7.4 Resorción del hueso alveolar mediante μ CT y microscopía SEM

Una mayor resorción ósea alveolar fue observada mediante μ CT ($p < 0,001$) en las lesiones periodontales de ratones infectados con LPS purificado de *A. actinomycetemcomitans* en comparación con los ratones inoculados con PBS libre de LPS (sham) y los animales no infectados (n.i.) (Fig. 5A-5B). De manera similar, en las infecciones periodontales inducidas por *A. actinomycetemcomitans*, se detectó un aumento en el área de pérdida ósea entre la superficie mesial del primer molar y la superficie distal del tercer molar, y entre la unión del límite amelo-cementario con la cresta ósea alveolar mediante SEM ($p < 0,001$) en comparación con los animales de los grupos sham y no infectados (Fig. 5C).

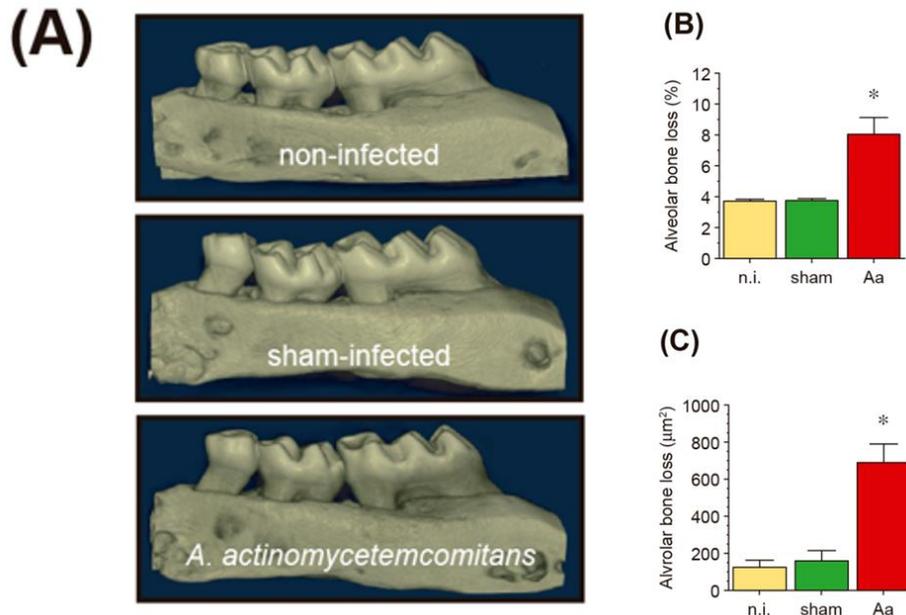


Figura 5. Resorción ósea alveolar. **A)** Imágenes en 3D representativas de micro-tomografía computarizada (micro-CT) de maxilares de ratones infectados por vía oral con 20 μg de LPS de *A. actinomycetemcomitans*, ratones inoculados con placebo (sham-infected) y no infectados (non-infected). **B)** Pérdida ósea alveolar cuantificada mediante micro-CT en maxilares de ratones infectados con *A. actinomycetemcomitans* (Aa), ratones inoculados con placebo (sham) y no infectados (n.i.). Los datos se representan como porcentaje y se muestran como media \pm desviación estándar de 8 experimentos independientes. **C)** Área de pérdida ósea cuantificada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) en maxilares de ratones infectados con *A. actinomycetemcomitans* (Aa), ratones inoculados con placebo (sham) y no infectados (n.i.). Los datos se representan como μm^2 y se muestran como media \pm desviación estándar de 8 experimentos independientes. * $p < 0,05$.

7.5 Correlación entre la expresión de IL-22 y RANKL *versus* la resorción ósea alveolar

En las lesiones periodontales inducidas por inoculación de LPS purificado de *A. actinomycetemcomitans*, se realizaron los análisis de correlación entre los niveles de expresión de IL-22 y RANKL *versus* la resorción ósea alveolar cuantificada mediante μ CT, para identificar si los cambios descritos en la resorción ósea alveolar estaban asociados con la expresión de RANKL y la función de los linfocitos Th22 (Fig. 5D). El análisis correlativo arrojó una correlación positiva significativa entre la resorción ósea alveolar y la expresión de RANKL ($p = 0,007$, $r = 0,853$) y entre la resorción ósea alveolar y la expresión de IL-22 ($p = 0,003$, $r = 0,888$), lo que sugiere que los cambios en la resorción ósea alveolar y la expresión de RANKL se asociaron con actividad de linfocitos Th22.

(D)

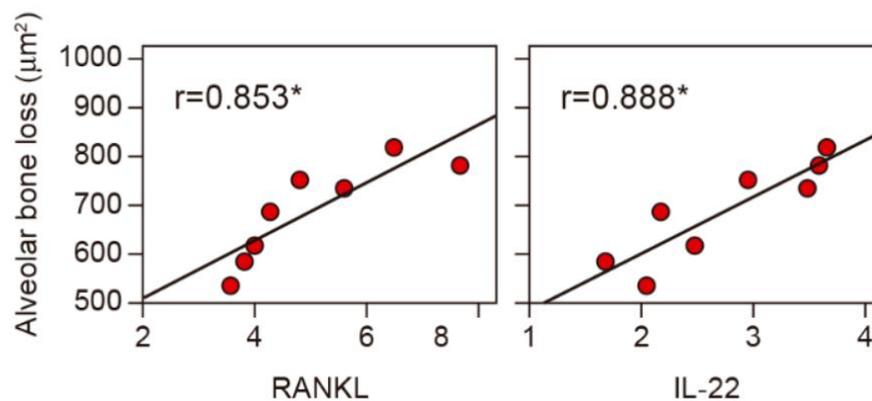


Figura 5D. resorción ósea alveolar. Correlación entre los niveles expresados de mRNA de IL-22 y RANKL *versus* la pérdida ósea alveolar cuantificada por micro-CT. Los coeficientes de correlación de Pearson (r) se calcularon para 8 experimentos independientes. $*p < 0.05$. IL-22, interleuquina-22; RANKL, ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B.

8. DISCUSIÓN

Entre las células principales que participan en la respuesta inmune durante la patogenia de la periodontitis se describen los linfocitos TCD4⁺. Durante la infección periodontal, los linfocitos TCD4⁺ naïve pueden diferenciarse en uno de los distintos subtipos linfocitarios, entre ellos los linfocitos Th1, Th2, Th17 y T reguladores, los cuales expresan factores de transcripción maestros específicos y producen patrones de citoquinas particulares que determinan su función. En este contexto, los linfocitos Th1 y Th17 se han asociado con el inicio y progresión de la periodontitis, mientras que los linfocitos Th2 y T reguladores se han asociado con la supresión de las respuestas Th1 y Th17 y la salud periodontal (Garlet, 2010; Garlet y cols., 2010; Gemmell, Yamazaki y Seymour, 2007; Graves, Oates y Garlet, 2011; Houry-Haddad y cols., 2007; Vernal y Garcia-Sanz, 2008).

En 2009, se descubrió un nuevo subtipo de linfocito TCD4⁺ que se denominó Th22. Los linfocitos Th22 se diferencian a partir de las células T naïve en presencia de TNF- α e IL-6, secretan IL-22 y exhiben el fenotipo CCR4⁺CCR6⁺CCR10⁺ al expresar AhR como factor de transcripción maestro involucrado en su diferenciación y función (Duhon y cols., 2009; Trifari y cols., 2009). Patológicamente, los linfocitos Th22 se han visto implicados en la inmuno-patogénesis de varias enfermedades inflamatorias y autoinmunes (Azizi y cols., 2015; Shabgah y cols, 2017). Usando un modelo experimental de periodontitis, se observaron abundantes células IL-22⁺ en las lesiones periodontales (Pan y cols., 2018). De manera similar, mayor cantidad de linfocitos CD4⁺IL-22⁺AhR⁺ fue detectada en los tejidos periodontales obtenidos de pacientes afectados de periodontitis en comparación a individuos sanos (Díaz-Zúñiga y cols., 2017b). En el presente estudio, la detección incrementada de IL-22 y AhR en un modelo experimental de periodontitis se asoció con una mayor expresión de RANKL y resorción ósea alveolar *in vivo*, lo que demuestra el papel de los linfocitos Th22 en la patogénesis de la periodontitis.

Los osteoclastos son el tipo celular responsable de la resorción ósea alveolar durante la periodontitis, y la diferenciación, actividad y supervivencia de los osteoclastos requiere de RANKL como mediador osteoclastogénico esencial. Los

linfocitos Th17 tienen la capacidad de inducir la diferenciación y activación de los osteoclastos al actuar directamente sobre sus precursores y los osteoclastos maduros mediante la producción de RANKL (Vernal y cols., 2006; Vernal & Garcia-Sanz, 2008; Yasuda y cols., 1998). A su vez, los linfocitos Th1 producen una gran cantidad de IFN- γ , TNF- α e IL-1 β , que ejercen actividad osteoclastogénica al inducir la expresión de RANKL en fibroblastos, osteoblastos y linfocitos Th17 (Boyle y cols., 2003; Sato y cols., 2006). En este estudio, se detectaron niveles mayores de RANKL en las lesiones periodontales de ratones infectados con LPS purificado de *A. actinomycetemcomitans* en comparación con animales inoculados con placebo (sham) o no infectados (n.i.) y estos niveles aumentados de RANKL se correlacionaron positivamente con los niveles incrementados de IL-22 y la resorción ósea alveolar. Tomados en conjunto estos datos, es posible sugerir que los linfocitos Th22 mediante a producción de IL-22 podrían favorecer la expresión de RANKL en las células residentes periodontales y los linfocitos Th17 que infiltran los tejidos periodontales durante la periodontitis. De hecho, IL-22 contribuye a la respuesta inflamatoria articular mediada por TNF- α e IL-1 β durante la artritis reumatoide y también favorece la expresión de RANKL por fibroblastos sinoviales, osteoblastos articulares y linfocitos Th17 infiltrantes, que a su vez determina la diferenciación y activación de osteoclastos e induce la pérdida de hueso articular subcondral (Ikeuchi y cols., 2005; Kim y cols., 2012; Xie y cols., 2015).

Originalmente se pensó que la IL-22 era una citoquina asociada a Th1, pero el descubrimiento de los linfocitos Th17 y Th22 demostró que estas células son las principales productoras de IL-22. Alrededor del 15% de la IL-22 producida en la sangre periférica es producida por los linfocitos Th17 (Duhon y cols., 2009). De hecho, TGF- β 1 induce a los linfocitos Th17 a producir IL-22 e IL-17, de modo que la presencia simultánea de altas concentraciones de TGF- β 1 e IL-6 conduce a la producción de IL-17 y la presencia única de IL-6 induce la producción de IL-22 (Shabgah y cols., 2017). Durante la periodontitis, niveles mayores de TGF- β 1 e IL-6 se detectan frecuentemente en las lesiones periodontales; por lo tanto, es posible sugerir que los linfocitos Th17 infiltrantes en los tejidos periodontales infectados producen IL-17 en lugar de IL-22. Junto con IL-6, se detectan niveles aumentados de TNF- α en los tejidos afectados por periodontitis, y estas citoquinas pueden

promover la diferenciación y activación de los linfocitos Th22 y la expresión de IL-22 (Duhén y cols., 2009; Trifari y cols., 2009). Sobre la base de los datos del presente estudio, es posible sugerir que la principal fuente de IL-22 en tejidos afectados por periodontitis son los linfocitos Th22; sin embargo, no podemos descartar que otros tipos celulares puedan ser responsables, al menos en parte, de la producción de IL-22, tal como los linfocitos T citotóxicos TC22 (CD8⁺IFN- γ IL-17⁻IL-22⁺), las células Natural Killer NK-22, los linfocitos T CD4 γ δ , las células linfoides innatas tipo 3 (ILC3) y las células no linfoides productoras de IL-22 (Dudakov y cols., 2015; Montaldo y cols., 2015; Shabgah y cols., 2017). En efecto, los linfocitos Th22 se han establecido como la fuente principal de IL-22 en los tejidos infectados y en una variedad de enfermedades inflamatorias, y sólo una producción marginal de IL-22 se ha asociado con otros tipos celulares (Azizi y cols., 2015; Dudakov y cols., 2015; Plank y cols., 2017; Shabgah y cols., 2017).

IL-22 puede jugar tanto papeles pro-inflamatorios como de protección tisular, y este efecto *dual* parece estar influenciado por el tejido en el que es producida y el ambiente circundante de citoquinas (Besnard y cols., 2011; Sonnenberg y cols., 2010). En el hígado, IL-22 tiene un papel protector y participa en la regeneración de las células hepáticas después de la hepatectomía parcial y la reparación del daño hepático inducido por el alcohol (Ki y cols., 2010; Ren y cols., 2010). En pacientes con peri-implantitis, un aumento en los niveles de expresión de IL-22 y su receptor específico IL-22R se detectan en los tejidos periimplantarios en comparación a individuos con implantes sanos, y los autores del estudio sugieren que IL-22 podría estar involucrado en la reparación de tejidos destruidos durante la infección (Luo y cols., 2013). Durante la periimplantitis, la producción crónica de IL-22 a altos niveles puede también incrementar la producción de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias, favoreciendo el reclutamiento de linfocitos T efectores patogénicos hacia los tejidos inflamados, como ocurre en varias enfermedades (Azizi y cols., 2015; Dudakov y cols., 2015; Plank y cols., 2017; Shabgah y cols., 2017). Este rol dicotómico de IL-22 puede depender de la expresión concomitante de IL-17. Por ejemplo, en presencia de IL-17, IL22 contribuye a la inflamación mediada por bleomicina, mientras que si IL-17 está ausente, como en ratones IL-17^{-/-} knockout, IL-22 contribuye a la protección tisular (Sonnenberg y cols., 2010). Durante la

periodontitis experimental, la inoculación oral de *A. actinomycetemcomitans* induce una mayor expresión de IL-17 y una mayor detección de linfocitos Th17 CD4⁺IL-17⁺RORγt⁺ en las lesiones periodontales (Monasterio y cols., 2018). Por lo tanto, en presencia de IL-17, los linfocitos Th22 pueden contribuir a los eventos patogénicos de la periodontitis secretando IL-22 y de esta manera favorecer la resorción del hueso alveolar mediada por RANKL.

Aunque la caracterización de IL-22 está muy avanzada y los linfocitos Th22 se han identificado en varias enfermedades, se sabe muy poco sobre la función precisa de esta interleuquina. La descripción completa del rol patogénico de los linfocitos Th22 ha sido limitada debido a la incapacidad de caracterizar completamente y directamente este subtipo de células T *in vivo*. Para muchos linajes de Th, tales como los linfocitos Th1, Th2, Th17 y T reguladores, su rol patogénico o no-patogénico durante la periodontitis ha sido bien caracterizado. En contraste, la comprensión de la contribución de Th22 durante la patogénesis de la periodontitis recién está comenzando. La infiltración de Th22 en las lesiones periodontales podría contribuir a vincular la respuesta anormal de las células T con la resorción ósea alveolar. Por lo tanto, la patogenia de la periodontitis debiese ser reconsiderada en el contexto de una enfermedad de tipo Th1/Th17/Th22. En esta línea, los linfocitos Th22 podrían ser un objetivo auspicioso de terapia futura y las citoquinas relacionadas con su diferenciación y función, principalmente IL-22, podrían llegar a tener gran importancia clínica.

9. CONCLUSIONES

1. Durante la periodontitis generada en un modelo experimental en ratones, se expresan mayores niveles de mRNA de la citoquina IL-22, del factor de transcripción AhR y RANKL en comparación a los animales controles inoculados con PBS sin LPS (sham) y no infectados (n.i.).
2. Niveles de RANKL aumentados se correlacionaron positivamente con los niveles incrementados de IL-22 y resorción ósea alveolar. Estos datos, sugieren que los linfocitos Th22 produciendo IL-22 podrían favorecer la expresión de RANKL.
3. La detección incrementada de linfocitos CD4⁺IL-22⁺AhR⁺ en un modelo experimental de periodontitis en ratones fue asociada con una mayor expresión de RANKL y resorción ósea alveolar *in vivo*, lo que demuestra el papel de los linfocitos Th22 en la patogénesis de la periodontitis.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Åberg, C., Kwamin, F., Claesson, R., Johansson, A. and Haubek, D. (2012). Presence of JP2 and non-JP2 genotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and attachment loss in adolescents in Ghana. *Journal of Periodontology*, 83(12), 1520-1528.
- Armitage, G. (2010). Comparison of the microbiological features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontology 2000*, 53(1), 70-88.
- Azizi, G., Yazdani, R., and Mirshafiey, A. (2015). Th22 cells in autoimmunity: a review of current knowledge. *European annals of allergy and clinical immunology*, 47(4), 108-117.
- Balci Yuce, H., Gokturk, O., Aydemir Turkal, H., Inanir, A., Benli, I. and Demir, O. (2017). Assessment of local and systemic 25-hydroxy-vitamin D, RANKL, OPG, and TNF levels in patients with rheumatoid arthritis and periodontitis. *Journal of Oral Science*, 59(3), 397-404.
- Baba, N., Rubio, M., Kenins, L., Regairaz, C., Woisetschlager, M., Carballido, J., y cols. (2012). The aryl hydrocarbon receptor (AhR) ligand VAF347 selectively acts on monocytes and naïve CD4 Th cells to promote the development of IL-22-secreting Th cells. *Human Immunology*, 73(8), 795-800.
- Bandhaya, P., Saraithong, P., Likittanasombat, K., Hengprasith, B. and Torrungruang, K. (2012). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes, the JP2 clone and cytolethal distending toxin genes in a Thai population. *Journal of Clinical Periodontology*, 39(6), 519-525.
- Benso, B. (2016). Virulence factors associated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and their role in promoting periodontal diseases. *Virulence*, 8(2), 111-114.
- Besnard, A. G., Sabat, R., Dumoutier, L., Renauld, J. C., Willart, M., Lambrecht, B., y cols., (2011). Dual Role of IL-22 in allergic airway inflammation and its cross-

- talk with IL-17A. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 183(9), 1153-1163.
- Botero, J. and Bedoya, E. (2010). Determinantes del diagnóstico periodontal. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*, 3(2), 94-99.
- Boyle, W. J., Simonet, W. S., and Lacey, D. L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423(6937), 337-342.
- Chen, C., Wang, T. and Chen, W. (2010). Occurrence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes in subgingival plaque from United States subjects. *Molecular Oral Microbiology*, 25(3), 207-214.
- Cochran, D. (2008). Inflammation and Bone Loss in Periodontal Disease. *Journal of Periodontology*, 79(8s), 1569-1576.
- Cortelli, J., Aquino, D., Cortelli, S., Roman-Torres, C., Franco, G., Gomez, R., Batista, L., y cols. (2011). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes infections and periodontal conditions: a two-way assessment. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 31(7), 1311-1318.
- Darveau, R. (2010). Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nature Reviews Microbiology*, 8(7), 481-490.
- Díaz-Zúñiga, J., Yáñez, J., Alvarez, C., Melgar-Rodríguez, S., Hernández, M., Sanz, M., y cols. (2013). Serotype-dependent response of human dendritic cells stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Journal of Clinical Periodontology*, 41(3), 242-251.
- Díaz-Zúñiga, J., Melgar-Rodríguez, S., Alvarez, C., Monasterio, G., Benítez, A., Ciuchi, P., Díaz, C., y cols. (2015). T-lymphocyte phenotype and function triggered by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is serotype-dependent. *Journal of Periodontal Research*, 50(6), 824-835.
- Díaz-Zúñiga, J., Melgar-Rodríguez, S., Monasterio, G., Pujol, M., Rojas, L., Alvarez, C., Carvajal, P., y cols. (2017a). Differential human Th22-lymphocyte

response triggered by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes. *Archives of Oral Biology*, 78, 26-33.

Díaz-Zúñiga, J., Melgar-Rodríguez, S., Rojas, L., Alvarez, C., Monasterio, G., Carvajal, P., y cols. (2017b). Increased levels of the T-helper 22-associated cytokine (interleukin-22) and transcription factor (aryl hydrocarbon receptor) in patients with periodontitis are associated with osteoclast resorptive activity and severity of the disease. *Journal of Periodontal Research*, 52(5), 893-902.

Dudakov, J. A., Hanash, A. M., and van den Brink, M. R. (2015). Interleukin-22: immunobiology and pathology. *Annual review of immunology*, 33, 747-785.

Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2009). Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nature immunology*, 10(8), 857-863.

Fransson, C., Tomasi, C., Pikner, S., Gröndahl, K., Wennström, J., Leyland, A., y cols. (2010). Severity and pattern of peri-implantitis-associated bone loss. *Journal of Clinical Periodontology*, 37(5), 442-448.

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. *Journal of Periodontology*, 81(10), 1403-1410.

Garlet, G. P., Cardoso, C.R., Mariano, F.S., Claudino, M., de Asis, G.f., Cimpanelli, A.P., y cols., (2010). Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *Journal of Dental Research*, 89(12), 1349-1363.

Gemmell, E., Yamazaki, K., and Seymour, G. J. (2007). The role of T cells in periodontal disease: homeostasis and autoimmunity. *Periodontology 2000*, 43(1), 14-40.

Graves, D. T., Oates, T., and Garlet, G. P. (2011). Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *Journal of oral microbiology*, 3(1), 5304.

- Haffajee, A., Socransky, S., Patel, M. and Song, X. (2008). Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiology and Immunology*, 23(3), 196-205.
- Hajishengallis G and Lamont RJ (2012). "Beyond the red complex and into more complexity: The polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology". *Molecular Oral Microbiology*, 27(6):409–19.
- Hanqing Xie. Ratonos y ratas de laboratorio. *Synatom Research*. EEUU, New Jersey. 2012. Disponible en <http://www.labome.es/method/Laboratory-Mice-and-Rats.html>.
- Herbert, B., Novince, C. and Kirkwood, K. (2015). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, a potent immunoregulator of the periodontal host defense system and alveolar bone homeostasis. *Molecular Oral Microbiology*, 31(3), 207-227.
- Hernández, S. (2006). El modelo animal en las investigaciones biomédicas. *Biomedicina*, 2(3), 252-256.
- Houri-Haddad, Y., Wilensky, A., and Shapira, L. (2007). T-cell phenotype as a risk factor for periodontal disease. *Periodontology 2000*, 45(1), 67-75.
- Ikeuchi, H., Kuroiwa, T., Hiramatsu, N., Kaneko, Y., Hiromura, K., Ueki, K., y cols. (2005). Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: Potential role as a proinflammatory cytokine. *Arthritis & Rheumatism*, 52(4), 1037-1046.
- Jain, S. and Darveau, R. (2010). Contribution of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide to periodontitis. *Periodontology 2000*, 54(1), p53-70.
- Jentsch, H., Cachovan, G., Guentsch, A., Eickholz, P., Pfister, W. and Eick, S. (2012). Characterization of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* strains in periodontitis patients in Germany. *Clinical Oral Investigations*, 16(6), 1589-1597.
- Kayal, R. (2013). The Role of osteoimmunology in periodontal disease. *BioMed Research International*, 2013, 1-12.
- Ki, S. H., Park, O., Zheng, M., Morales-Ibanez, O., Kolls, J. K., Bataller, R., y cols. (2010). Interleukin-22 treatment ameliorates alcoholic liver injury in a murine

model of chronic-binge ethanol feeding: role of signal transducer and activator of transcription 3. *Hepatology*, 52(4), 1291-1300.

Kim, K., Kim, H., Park, J., Park, J., Oh, H., Woo, Y., y cols. (2012). Interleukin-22 promotes osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis through induction of RANKL in human synovial fibroblasts. *Arthritis & Rheumatism*, 64(4), 1015-1023.

Lamont, R. J. and Hajishengallis, G. (2016). "Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease". *Dental Clinics of North America* 21(3):172–83.

Liang, S., Ren, H., Guo, H., Xing, W., Liu, C., Ji, Y., y cols. (2018). Periodontal infection with *Porphyromonas gingivalis* induces preterm birth and lower birth weight in rats. *Molecular oral Microbiology*, en prensa.

Luo, Z., Wang, H., Sun, Z., Luo, W. and Wu, Y. (2013). Expression of IL-22, IL-22R and IL-23 in the peri-implant soft tissues of patients with peri-implantitis. *Archives of Oral Biology*, 58(5), 523-529.

Monasterio, G., Castillo, F., Ibarra, J. P., Guevara, J., Rojas, L., Alvarez, C., y cols. (2018). Alveolar bone resorption and Th1/Th17-associated immune response triggered during *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced experimental periodontitis are serotype-dependent. *Journal of Periodontology*, en prensa.

Montaldo, E., Juelke, K., and Romagnani, C. (2015). Group 3 innate lymphoid cells (ILC3s): origin, differentiation, and plasticity in humans and mice. *European journal of immunology*, 45(8), 2171-2182.

Nazir, M. A. (2017). Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *International journal of health sciences*, 11(2), 72.

Nørskov-Lauritsen, N., and Kilian, M. (2006). Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description

of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(9), 2135-2146.

- Paju, S., Carlson, P., Jousimies-Somer, H., and Asikainen, S. (2000). Heterogeneity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains in various human infections and relationships between serotype, genotype, and antimicrobial susceptibility. *Journal of clinical microbiology*, 38(1), 79-84.
- Pan, S., Yang, D., Zhang, J., Zhang, Z., Zhang, H., Liu, X., y cols. (2018). Temporal expression of interleukin-22, interleukin-22 receptor 1 and interleukin-22-binding protein during experimental periodontitis in rats. *Journal of periodontal research*, 53(2), 250-257.
- Park, C., Abramson, Z., Taba, M., Jin, Q., Chang, J., Kreider, J., y cols. (2007). Three-dimensional micro-computed tomographic imaging of alveolar bone in experimental bone loss or repair. *Journal of Periodontology*, 78(2), 273-281.
- Park, S., Kim, D., Han, S., Kang, M., Lee, J., Jeong, Y., y cols. (2014). Diverse Toll-Like receptors mediate cytokine production by *Fusobacterium nucleatum* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in macrophages. *Infection and Immunity*, 82(5), 1914-1920.
- Plank, M. W., Kaiko, G. E., Maltby, S., Weaver, J., Tay, H. L., Shen, W., y cols. (2017). Th22 cells form a distinct Th lineage from Th17 cells in vitro with unique transcriptional properties and Tbet-dependent Th1 plasticity. *The Journal of Immunology*, 198(5), 2182-2190.
- Ramanathan, M., Spannhake, E. and Lane, A. (2007). Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps is Associated with Decreased Expression of Mucosal Interleukin 22 Receptor. *The Laryngoscope*, 117(10), 1839-1843.
- Ren, X., Hu, B., and Colletti, L. M. (2010). IL-22 is involved in liver regeneration after hepatectomy. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 298(1), G74-G80.

- Roman-Torres, C., Aquino, D., Cortelli, S., Franco, G., dos Santos, J., Corraini, P., y cols. (2010). Prevalence and distribution of serotype-specific genotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in chronic periodontitis Brazilian subjects. *Archives of Oral Biology*, 55(3), 242-248.
- Russell W, Burch R. The principles of humane experimental technique. London: Methuen, 1992.
- Sakellari, D., Katsikari, A., Slini, T., Ioannidis, I., Konstantinidis, A. and Arsenakis, M. (2011). Prevalence and distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes and the JP2 clone in a Greek population. *Journal of Clinical Periodontology*, 38(2), 108-114.
- Sato, K., Suematsu, A., Okamoto, K., Yamaguchi, A., Morishita, Y., Kadono, Y., y cols. (2006). Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *Journal of Experimental Medicine*, 203(12), 2673-2682.
- Shabgah, A. G., Navashenaq, J. G., Shabgah, O. G., Mohammadi, H., & Sahebkar, A. (2017). Interleukin-22 in human inflammatory diseases and viral infections. *Autoimmunity reviews*, 16(12), 1209-1218.
- Shimada, T., Sugano, N., Nishihara, R., Suzuki, K., Tanaka, H. and Ito, K. (2008). Differential effects of five *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* strains on gingival epithelial cells. *Oral Microbiology and Immunology*, 23(6), 455-458.
- Socransky, S., Haffajee, A., Cugini, M., Smith, C. and Kent, R. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, 25(2), 134-144.
- Socransky, S. and Haffajee, A. (2005). Periodontal microbial ecology. *Periodontology 2000*, 38(1), 135-187.
- Sonnenberg, G. F., Nair, M. G., Kirn, T. J., Zaph, C., Fouser, L. A., and Artis, D. (2010). Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A. *Journal of Experimental Medicine*, 207(6), 1293-1305.

- Takada, K., Saito, M., Tsuzukibashi, O., Kawashima, Y., Ishida, S. and Hirasawa, M. (2010). Characterization of a new serotype g isolate of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Molecular Oral Microbiology*, 25(3), 200-206.
- Takahashi, T., Nishihara, T., Ishihara, Y., Amano, K., Shibuya, N., Moro, I., y cols. (1991). Murine macrophage interleukin-1 release by capsular like serotype-specific polysaccharide antigens of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infection and immunity*, 59(1), 18-23.
- Tang, G., Kawai, T., Komatsuzawa, H. and Mintz, K. (2012). Lipopolysaccharides mediate leukotoxin secretion in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Molecular Oral Microbiology*, 27(2), 70-82.
- Trifari, S., Kaplan, C. D., Tran, E. H., Crellin, N. K., and Spits, H. (2009). Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T_H17, T_H1 and T_H2 cells. *Nature immunology*, 10(8), 864-871.
- Vernal, R., Chaparro, A., Graumann, R., Puente, J., Valenzuela, M. and Gamonal, J. (2004). Levels of cytokine receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand in gingival crevicular fluid in untreated chronic periodontitis patients *Journal of Clinical Periodontology*, 75 (12): 1586-1591.
- Vernal, R., Dutzan, N., Chaparro, A., Puente, J., Valenzuela, M. y cols. (2005). Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(4), 383-389.
- Vernal, R., Dutzan, N., Hernández, M., Chandía, S., Puente, J., León, R., y cols. (2006). High expression levels of receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand associated with human chronic periodontitis are mainly secreted by CD4⁺ T lymphocytes. *Journal of Clinical Periodontology* , 77(10): 1772–1780.
- Vernal, R., and Garcia-Sanz, J. A. (2008). Th17 and Treg cells, two new lymphocyte subpopulations with a key role in the immune response against infection. *Infectious Disorders Drug Targets*, 8(4), 207-220.

- Wang, X., Ota, N., Manzanillo, P., Kates, L., Zavala-Solorio, J., Eidenschenk, C., y cols. (2014). Interleukin-22 alleviates metabolic disorders and restores mucosal immunity in diabetes. *Nature*, 514(7521), 237-241.
- Xie, Q., Huang, C. and Li, J. (2015). Interleukin-22 and rheumatoid arthritis: Emerging role in pathogenesis and therapy. *Autoimmunity*, 48(2), 69-72.
- Yamaguchi, N., Kawasaki, M., Yamashita, Y., Nakashima, K., and Koga, T. (1995). Role of the capsular polysaccharide-like serotype-specific antigen in resistance of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. *Infection and immunity*, 63(12), 4589-4594.
- Yang, D., Wang, J., Ni, J., Shang, S., Liu, L., Xiang, J., y cols. (2013). Temporal expression of metalloproteinase-8 and -13 and their relationships with extracellular matrix metalloproteinase inducer in the development of ligature-induced periodontitis in rats. *Journal of periodontal research*, 48(4), 411-419.
- Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S. I., y cols. (1998). Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(7), 3597-3602.
- Zhu, J., Jia, E., Zhou, Y., Xu, J., Feng, Z., Wang, H., y cols. (2015). Interleukin-22 secreted by NKp44⁺ Natural Killer cells promotes proliferation of fibroblast-like synoviocytes in Rheumatoid Arthritis. *Medicine*, 94(52), 2137.

11. ANEXOS

11.1 Informe de aprobación bioética.



COMITÉ DE BIOÉTICA EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN (CBAE)

Santiago, 13 de Junio de 2016

CERTIFICADO N° 061601

Se certifica que, en calidad de Investigador Responsable, el Dr. Rolando Vernal solicitó la evaluación del protocolo titulado "Rol de los serotipos bacterianos periodonto-patógenos en la inducción de la reabsorción ósea alveolar producida durante la periodontitis mediante un desbalance de la respuesta inmune Th1/Th17 y T reguladora".

Dicho protocolo se encuentra en el marco de los proyectos FONDECYT 1140904 (proyecto principal), FIS 1602734-2016 y EQM 150010. En base a lo evaluado, este comité certifica que en el protocolo de procedimiento presentado (N°FOUCH061601) no se plantean acciones que contravengan las normas bioéticas básicas de manejo y cuidado de los animales a utilizar en los procedimientos experimentales planificados.

Además, el Dr. Vernal se ha comprometido a mantener los procedimientos experimentales planteados en el protocolo de trabajo y a no realizar ninguna modificación sin previa información y posterior aprobación por parte de este comité.

La presente certificación es válida desde Junio de 2016 hasta Junio de 2020, tiempo que durará la realización de este protocolo.

Sin otro particular, saluda a Ud. muy cordialmente.

Mauricio Fernando Budini (P)
Presidente
Comité de Bioética en
Animales de Experimentación



COMITÉ DE BIOÉTICA EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN (CBAE)
cbae@odontologia.uchile.cl

11.2 Informa aprobación de bioseguridad.



Comité Institucional de Bioseguridad
Administración Conjunta Campus Norte
FDO N°14

Santiago, 10 de Octubre de 2013.

C E R T I F I C A D O

El Comité Institucional de Bioseguridad (CIB) ha analizado el Proyecto de Investigación presentado al Concurso Fondecyt Regular 2014, titulado "Role of periodonto-pathogenic bacterial serotypes in promoting the alveolar bone resorption during periodontitis through an imbalance of TH1/Th17 versus Treg immune responses". El Investigador Responsable de este proyecto es el Dr. Rolando Vernal Astudillo.

Los procedimientos experimentales, que involucran tanto el manejo de material biológico y de microorganismos patógenos, así como el uso de agentes químicos de riesgo, se realizarán en el Laboratorio de Microbiología y en el Laboratorio de Patología, dependiente del Departamento de Patología y Medicina Oral, además del Laboratorio de Biología Periodontal dependiente de Decanato, Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

El CIB certifica que los Laboratorios y la Facultad mencionada anteriormente, cuentan con las facilidades para el manejo y desecho del material químico y biológico a utilizar en el proyecto de acuerdo al Manual de Bioseguridad, Conicyt 2008. Además, el investigador se compromete a velar por el cumplimiento de las normas de bioseguridad, durante el desarrollo del proyecto.

Se extiende el presente certificado a solicitud del Dr. Rolando Vernal para ser presentado al Concurso Fondecyt Regular 2014.

Dr. Mario Chiong
Presidente

Dra. Andrea Paula-Lima
Secretaria

Facultad de Odontología. Sergio Livingstone P. 943, Independencia, Fono 9781793-9781832, Fax: 9781748, Santiago. <http://odontologia.uchile.cl>
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Sergio Livingstone P. 1007, Independencia, Fono 9781792 Fax: 9781748, Santiago. <http://www.quimica.uchile.cl/>