



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

**Efecto de la administración oral de boldina en la resorción ósea alveolar y el
desequilibrio inmune Th17/Treg en un modelo animal de periodontitis
experimental**

Felipe Gabriel Rivera Rodríguez

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

TUTORES PRINCIPALES

Prof. Dr. Rolando Vernal

Dr(c). Sebastián Castro

TUTORES ASOCIADOS

Dr(c). Emilio A. Cafferata

**Adscrito a Proyecto FONDECYT 1181780
Santiago - Chile
2022**



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

**Efecto de la administración oral de boldina en la resorción ósea alveolar y el
desequilibrio inmune Th17/Treg en un modelo animal de periodontitis
experimental**

Felipe Gabriel Rivera Rodríguez

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

TUTORES PRINCIPALES

Prof. Dr. Rolando Vernal

Dr(c). Sebastián Castro

TUTORES ASOCIADOS

Dr(c). Emilio A. Cafferata

**Adscrito a Proyecto FONDECYT 1181780
Santiago - Chile
2022**

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación está dedicado con todo mi corazón a mis padres, Mónica y Luis, los seres que más amo en el universo. Gracias por el inmenso cariño que me han entregado durante toda mi vida, por las enseñanzas, el esfuerzo, la paciencia, la preocupación, y los valores que han permitido formarme para poder llegar a dar este paso académico tan anhelado.

A mis abuelos, Luis y Eugenia. Soy afortunado de poder tenerlos conmigo, les agradezco por brindarse incondicionalmente al cuidado de una familia tan numerosa, y todo el sacrificio que ello significa.

A mi abuela Editha, que desde el cielo me abrigas con tu ternura y alegría.

A mis tías y tíos, gracias por el apoyo y la confianza a lo largo de todo este proceso.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente a mi tutor, el doctor Rolando Vernal, por brindarme la posibilidad de soñar con realizar este trabajo de investigación, por guiarme en su camino, por la dedicación invertida y sobretodo por creer en mí. Gracias por la oportunidad de ingresar al Laboratorio de Biología Periodontal, donde conocí y generé lazos con bellas personas que desde el inicio me hicieron sentir como uno más del equipo. Entre ellas, mencionar a Bernardita, Samanta, Carla, Paula, Leticia, Jaime y Emilio.

A los tutores que fueron parte de este proyecto, los doctores Castro y Cassels, por su gran contribución a la ciencia con el estudio del boldo y sus derivados.

A Gustavo Monasterio y su esposa Francisca, por acercarme a la investigación, por la compañía y sabiduría que me han entregado siempre.

A los profesores que me formaron durante toda la etapa académica, en particular quisiera agradecer a la doctora Marcela Farías, por su aporte a la extensión universitaria y la confianza depositada en mí. También quisiera destacar, al doctor Alfredo Apip, por su fraternidad y por ser fuente de inspiración sempiterna.

A la Facultad de Odontología y sus autoridades, por permitirme formar parte de la comunidad académica de mayor prestigio en educación superior a nivel nacional.

A los funcionarios, que hicieron más grata y bonita mi estadía por la Facultad.

ÍNDICE

1. RESUMEN	7
2. INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO	9
Boldina	9
Efectos citoprotectores y anti-oxidantes de la boldina	9
Efectos anti-proliferativos de la boldina	13
Efectos anti-inflamatorios y osteoprotectores de la boldina	13
Periodontitis	15
Formulación del problema científico	17
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS	20
Extracción y purificación de boldina	20
Animales	20
Inducción de periodontitis experimental y administración de boldina	21
Grupos experimentales y obtención de muestras biológicas	21
Resorción ósea alveola	22
Producción de RANKL y OPG	22
Expresión de RANKL, OPG y citoquinas y factores de transcripción asociados a los linfocitos Th17 y Treg	23
Detección de linfocitos Th17 y Treg	25
Análisis estadístico	26
5. RESULTADOS	27
Resorción ósea alveolar	27
Producción de RANKL y OPG	28
Expresión de citoquinas y factores de transcripción asociados a linfocitos Th17 y Treg	30
Detección de linfocitos Th17 y Treg	31
6. DISCUSIÓN	35
7. CONCLUSIONES	40
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
9. ANEXOS Y APÉNDICES	53

1. RESUMEN

Introducción: Boldina, es un alcaloide aislado de diversas plantas, entre ellas, el boldo (*Peumus Boldus* Molina), árbol nativo chileno, reconocido por sus propiedades benéficas para la salud. Diversos estudios *in vivo* e *in vitro* señalan a la boldina como un importante agente anti-oxidante, anti-proliferativo, anti-inflamatorio y osteoprotector. En modelos experimentales animales, la boldina desempeña un rol clave en la inhibición de la resorción ósea en artritis reumatoide y osteoporosis, ambas patologías pro-resortivas relacionadas con el desbalance inmune Th17 y Treg. Este desequilibrio es compartido en su patogénesis por la periodontitis, enfermedad inflamatoria crónica que afecta los tejidos de soporte dentario, explicado por un predominio de la actividad osteoclástica mediada por RANKL. El objetivo de esta investigación es evaluar el efecto de la administración oral de la boldina en la resorción ósea alveolar en un modelo experimental de ratones con periodontitis inducida mediante la colocación de ligadura.

Materiales y métodos: Se administró la boldina vía oral en ratones durante 15 días en dosis de 10, 20 y 40 mg/kg. Se utilizaron como grupo control los ratones sin la colocación de ligadura, y para las variaciones estadísticas, se utilizaron los ratones con periodontitis que no recibieron tratamiento con boldina. La resorción ósea alveolar de muestras analizadas de ratones fue cuantificada mediante microtomografía computarizada. La producción de RANKL/OPG en muestras de fluido crevicular gingival fue cuantificada a través de qPCR y ELISA. El posible cambio en el patrón de respuesta inmune Th17/Treg se realizó mediante qPCR cuantificando los niveles de expresión de los factores de transcripción y citoquinas linfocitarias relacionadas. Se utilizó citometría de flujo para la cuantificación del número y frecuencia de linfocitos Th17 y Treg.

Resultados: En las muestras experimentales se observa que la administración oral de boldina dosis-dependiente mejoró la condición periodontal al inhibir la resorción ósea alveolar. Esta disminución de la actividad osteoclástica se puede asociar al posible rol de la boldina en la modulación del desequilibrio inmune Th17/Treg, al favorecer la respuesta Treg y suprimir la respuesta Th17.

Conclusiones: Los datos obtenidos en la presente investigación permiten postular a la boldina, como potencial coadyuvante en el control y tratamiento periodontal.

2. INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

Boldina

Boldina, es alcaloide aporfínico, que se obtiene como metabolito secundario a partir de la aislación de diversas especies de plantas, reportándose en la actualidad al menos 55 de éstas, casi en su totalidad pertenecientes a los órdenes taxonómicos *Magnoliales*, *Laurales* y *Ranunculales*. La principal fuente industrial de la boldina corresponde a la corteza del boldo (*Peumus boldus* Molina, de la familia *Monimiaceae*, orden *Laurales*), árbol endémico de Chile, que se adapta a condiciones climáticas de sequía, resistente a temperaturas altas debido a su carácter semixerófito, y que se encuentra distribuido desde la provincia del Limarí, en la región de Coquimbo, hasta la provincia de Osorno, región de los Lagos (Valdebenito y cols., 2015; Cassels y cols., 2018). Las propiedades del boldo son ampliamente conocidas entre las hierbas medicinales nativas debido a su uso en dolores de cabeza y de oídos, congestión nasal, hidropesía y reumatismo (Speisky y Cassels, 1994). Desde mediados del siglo XIX el boldo despertó interés en Europa, en la actualidad se usa para combatir la dispepsia y los espasmos digestivos moderados, por su actividad hepatoprotectora y su capacidad sedante leve. Es por ello que se ha incluido en diversas farmacopeas, por ejemplo como *boldi folium* (hoja de boldo) en la European Pharmacopoeia (Fuentes-Barros y cols., 2018; Cassels y cols., 2018).

Efectos citoprotectores y anti-oxidantes de la boldina

Los estudios científicos sobre la boldina, con más de dos décadas de data y actualizados recientemente, han evidenciado su actividad antioxidante citoprotectiva, anti-proliferativa, anti-aterogénica lo que ha sido demostrado utilizando modelos *in vitro* e *in vivo* (O'Brien y cols., 2006; Simirgiotis y Schmeda-Hirschmann, 2010; Muthna y cols., 2013).

En un estudio *in vitro* al co-incubar la boldina en dosis bajas (0,50 mM) en un cultivo bacteriano de *Escherichia coli* bajo un proceso oxidativo inducido se

observó que no se modificó la forma superenrollada del plásmido bacteriano y aumentó la sobrevivencia de la bacteria, y ambos efectos protectores fueron atribuidos a la supresión oxidativa y la inhibición de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Reiniger y cols., 1999). La hepatoprotectividad de la boldina ha sido demostrada en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*. En uno de estos estudios, la boldina redujo el daño hepático inducido en ratones (Lanhers y cols., 1991). En la misma línea de lo anterior, estudios recientes mostraron que al administrar boldina vía oral, a dosis de 5, 10 y 20 mg/kg durante 14 y 28 días inhibió el daño hepático en modelos de ratones colestásicos y cirróticos (Heidari y cols., 2017). Además, se normalizó la relación peso hígado/cuerpo de los ratones tratados con boldina en comparación con los que no fueron tratados. Por otro lado, en un modelo experimental de ratas con hipertrigliceridemia hereditaria y alimentadas con una dieta elevada en sacarosa, se evidenció que al administrar boldina disminuyó la colestasis al estimular la secreción de ácidos biliares (Zagorova y cols., 2015). También se evidenció que la administración oral de boldina en ratas suprimió el crecimiento tumoral e indujo la apoptosis en hepatocarcinogénesis inducida por dietilnitrosamina (Subramaniam y cols., 2019). En un modelo experimental en ratones con necrosis hepática inducida por acetaminofeno se demostró que la administración oral de 20 mg/kg de boldina, previno la degeneración hepatocelular y la disminución de anti-oxidantes enzimáticos en el tejido hepático (Ezhilarasan y Raghunandhakumar, 2021). En un estudio reciente, en modelo experimental en ratas con hepatotoxicidad inducida por metilprednisolona donde se administró boldina vía oral durante 30 días en dosis de 5, 10 y 50 mg/kg, se evidenció que con dosis principalmente de 50 mg/kg se redujo significativamente el estrés oxidativo y el daño hepático a nivel histológico (Shuker y cols., 2022).

Al investigar la implicancia de derivados extraídos del boldo en afecciones gastrointestinales, la boldina en un rango micromolar bajo, mostró ser antagonista competitivo de los receptores 5-HT₃ humanos, lo que podría ser útil para combatir el síndrome de intestino/colon irritable y para el tratamiento de náuseas y vómitos (Walstab y cols., 2014). En un modelo experimental de ratones con úlceras

gástricas inducidas por etanol/HCl y por indometacina (fármaco anti-inflamatorio no esteroideal), se administró boldina vía oral en dosis de 1, 10 y 100 mg/kg, y se demostró que en dosis de 10 y 100 mg/kg, redujo el sangrado y la lesión del tejido gástrico, aumentó significativamente los niveles de mucina y disminuyó los niveles de TNF- α en los ratones tratados (Boeing y cols., 2020).

El efecto citoprotector de la boldina se ha estudiado en modelo experimental de ratas con insuficiencia renal crónica inducida, en dosis de 50 mg/kg/día durante 28 días administradas vía oral gavage, donde mostró disminuir el daño renal en los ratones tratados (Gómez y Velarde, 2016). En otro estudio, al administrar esta misma dosis vía oral, se mejoró la función y se redujo la lesión renal en ratas hipertensas, sin afectar la presión arterial sistólica (Gómez y Velarde, 2018). Diversos estudios en los últimos años han evaluado la función endotelial de la boldina, donde se evidenció que esta, al ser administrada intra-peritonealmente en un modelo de ratas hipertensas, disminuyó la presión arterial sistólica, relacionado en parte a la inhibición en la producción de superóxido y peroxinitrito (Lau y cols., 2012). Sumado a lo anterior, en ratones diabéticos homocigotos *db/db*, donde se les administró boldina vía oral, se redujo el estrés oxidativo y mejoraron las relajaciones endotelio-dependientes en las arterias aorta de los ratones analizados (Lau y cols., 2013).

En el área del sistema nervioso, al evaluar la actividad nootrópica de la boldina en un modelo experimental en ratones jóvenes y envejecidos, donde se administró boldina intra-peritonealmente por siete días consecutivos, se demostró que en ambos grupos de ratones mejoró significativamente el aprendizaje y la memoria, posiblemente a través de un mecanismo relacionado con la activación de la actividad acilcolinesterasa y atenuando el estrés oxidativo (Dhingra y Soni, 2018). En otro estudio, se reportó que la boldina, administrada a largo plazo en ratones con enfermedad de Alzheimer, previno el aumento en la actividad de hemocanales gliales y alivió el daño neuronal del hipocampo de los roedores estudiados (Yi y cols., 2017). De manera similar, se evidenció en una investigación en modelo experimental de ratones con desmielinización inducida

vía conexina 43 (Cx43), donde la administración oral de boldina promovió el proceso de remielinización y redujo la inflamación local (Li y cols., 2020). Al evaluar un posible efecto anti-convulsivante de la boldina, se evidenció que la administración subcrónica de ésta, aumentó el período de latencia del inicio de convulsiones de tipo mioclónicas y clónicas en dos de los tres tipos de ratones estudiados (Moezi y cols., 2018). En un modelo experimental de ratones bajo la inducción de crisis convulsivas por pentilenotetrazol, y por terapia electroconvulsiva, se evidenció que la administración intraperitoneal de boldina tiene efecto anti-convulsivante, y aumentó los niveles de glutatión y peróxido dismutasa en todo el cerebro de los ratones tratados (Moezi y cols., 2019). Al evaluar la actividad de la boldina en un modelo de experimentación en ratones con daño cerebral inducido por isquemia, administrada vía intraperitoneal en dosis de 8, 16 y 25 mg/kg durante 5 días, se demostró que evitó el deterioro motor y de la memoria (De Lima y cols., 2017). En otra investigación donde se examinó el efecto protector de la boldina a nivel cerebrovascular, se demostró que mejoró significativamente la coordinación motora en un modelo de ratones con lesión cerebral traumática estandarizada, que fueron inyectados intra-peritonealmente con el alcaloide a 10, 20 y 30 mg/kg, siendo esta última dosis, la que evidenció al análisis histopatológico que la boldina previene anomalías asociadas al trauma y redujo el índice apoptótico en las células cerebrales (Qiu y cols., 2017). Otro ejemplo del efecto neuroprotector relacionado a la boldina, fue experimentado en ratones sometidos a isquemia inducida por ligadura reversible de la arteria coronaria izquierda y posterior reperusión, donde inmediatamente después de la administración intraventricular y por sonda gástrica de boldina provocó un descenso en la presión arterial sistólica, y con mayor relevancia aún, disminuyó la apoptosis miocárdica (López y cols., 2010).

A nivel cardiovascular, se han evidenciado propiedades de la boldina junto a otros aislados del boldo, donde se demostró el rol que ejerce la boldina en la inhibición de los receptores adrenérgicos α_1 , y su participación en el bloqueo de canales de calcio dependientes de voltaje en sitios benzodiazepínicos (Ivorra y cols., 1993; Chuliá y cols., 1996; Ivorra y cols., 2005). La boldina también

demostró ser un potente inhibidor de agregación plaquetaria inducida por ácido araquidónico, aunque con efecto menos potente en la inducida por colágeno (Teng y cols., 1997). En otro estudio donde se administró boldina por vía oral en ratones deficientes de lipoproteínas de baja densidad (LDL), el alcaloide generó una protección en el establecimiento de lesiones ateroscleróticas. Esto se asoció a una disminución en la oxidación de LDL (Santanam y cols., 2004).

Efectos anti-proliferativos de la boldina

Al evaluar la actividad anti-proliferativa de la boldina, esta mostró leve potencia contra la línea de cáncer pancreático BxPC-3 y además no generó toxicidad en células pancreáticas no cancerosas (Zahari y cols., 2014). En un estudio *in vivo*, probado en modelo de glioma C6 en ratones, los cuales fueron inyectados con boldina por vía intraperitoneal, provocó una gran reducción del volumen del glioma y el análisis histológico indicó que estos tumores fueron menos invasivos y proliferativos, sin causar alteraciones significativas en los ratones sanos (Gerhardt y cols., 2009). En otro estudio, se evidenció que al tratar con boldina se logró la reducción de la viabilidad y la proliferación de células cancerígenas de vejiga T24 (Gerhardt y cols., 2014). Al examinar el efecto *in vitro* que tenía la boldina en células de cáncer mamario humano MCF-7, se mostró la citotoxicidad de la boldina al reducir la viabilidad y proliferación de estas células. En un modelo *in vivo* de cáncer mamario, al ser tratados los animales con el alcaloide disminuyó el crecimiento del carcinoma sólido de Ehrlich y al ser administrado en altas dosis prolongó la supervivencia/vida postoperatoria de los ratones (Tomšík y cols., 2016). En un estudio para evaluar el efecto de la boldina frente a la hepatotoxicidad inducida por cisplatino, el alcaloide demostró que aumentó la viabilidad de las células normales del hígado, sin mejorar la supervivencia de las células del carcinoma hepático (Mondal y cols., 2020).

Efectos anti-inflamatorios y osteoprotectores de la boldina

En un estudio realizado en un modelo de ratones con edema inducido, se evaluó la boldina en conjunto con otro alcaloide aislado del boldo, la reticulina. Los resultados mostraron que la administración intragástrica de boldina y reticulina, mitigaron significativamente el peso de la oreja afectada en ratones y disminuyeron el volumen de la pata inflamada en ratas (Yang y cols., 2017).

In vivo, la actividad anti-inflamatoria de la boldina ha sido sujeta a amplia investigación. Se evidenció que su administración por vía oral redujo la severidad y extensión de la inflamación patológica (Wang y cols., 2007; Lv y cols., 2015; Qiao y cols., 2015). Así, la administración oral de boldina en un modelo animal de colitis ulcerosa redujo la extensión y severidad de la inflamación intestinal, el índice de actividad de la enfermedad, el peso del bazo y aumentó la longitud del colon (Lv y cols., 2015). De manera similar, en un modelo experimental de ratones con colitis ulcerosa inducida por dextrano-sulfato de sodio, con la administración oral de 50 mg/kg de boldina durante 7 días se atenuó la severidad de la patología, aumentó la longitud del colon y se redujo el peso del bazo en los ratones tratados. Boldina además disminuyó significativamente la expresión de TNF- α , IL-6 e IL-17, citoquinas pro-inflamatorias que desempeñan un rol clave en la modulación de la respuesta inmune durante colitis ulcerativa (Pandurangan y cols., 2016). Este efecto anti-inflamatorio de boldina fue investigado en un modelo experimental de ratones con asma inducida por ovoalbúmina, donde en los animales que recibieron 10 y 20 mg/kg del alcaloide, este redujo la acumulación de células inflamatorias, lo que podría explicar el manejo significativo de la enfermedad (Li y cols., 2020).

Boldina mostró la capacidad de reducir la inflamación articular y la destrucción ósea articular subcondral al ser administrada por vía oral en ratones afectados de artritis reumatoide experimental (Wang y cols., 2007; Qiao y cols., 2015). Estos efectos osteo-protectores fueron explicados por la inhibición de la osteoclastogénesis articular debido al aumento en la expresión de osteoprotegerina (OPG) y la disminución de la expresión del ligando del receptor activador del factor nuclear κ B (RANKL) (Zhao y cols., 2017). En efecto, la pérdida

ósea mediada por la actividad de los osteoclastos es producto del desbalance RANKL/OPG en los tejidos afectados y la modulación del desbalance RANKL/OPG inducido por boldina es considerado el evento molecular osteoprotector (Zhao y cols., 2017). Ratificando esto, cuando boldina fue oralmente administrada en un modelo experimental animal de osteoporosis inducida mediante ovariectomía se demostró su capacidad de inhibir la resorción ósea mediada por RANKL (Chen y cols., 2018).

Periodontitis

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta los tejidos de soporte de los dientes (ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar). Su patogénesis se explica por la disbiosis de las comunidades microbianas subgingivales en un hospedero susceptible y se asocia a diversos factores de riesgo que modulan la respuesta inmune (Kinane y cols., 2005; Hajishengallis, 2015; Papapanou y cols., 2018). La resorción ósea alveolar producida durante la periodontitis se debe al aumento de la actividad de los osteoclastos en respuesta al incremento en la producción de RANKL en las lesiones periodontales (Vernal y cols., 2004; Bostanci y cols., 2007; Vernal y cols., 2014). A su vez, el aumento en los niveles de RANKL es producido por un desbalance en la actividad de los linfocitos T-helper tipo 17 (Th17) y los linfocitos T reguladores (Treg) que infiltran los tejidos periodontales debido a la disbiosis microbiana subgingival, en donde predomina la actividad de los linfocitos Th17 productores de RANKL (Sojod y cols., 2017; Alvarez y cols., 2018; Alvarez y cols., 2019).

En efecto, la evidencia ha mostrado consistentemente que la resorción ósea alveolar durante la periodontitis se asocia a una respuesta inmune donde existe un predominio de la actividad de los linfocitos Th17 (Takahashi y cols., 2005; Vernal y cols., 2005; Vernal y cols., 2006; Vernal y cols., 2008; Dutzan y cols., 2009a; Dutzan y cols., 2009b; Garlet, 2010; Graves y cols., 2011). De tal manera, el efecto patogénico de los linfocitos Th17 se refleja mediante la producción de citoquinas pro-inflamatorias, tales como IL-6, IL-17 e IL-23, que

contribuyen a la inflamación periodontal y la actividad osteoclastogénica al inducir la expresión de RANKL en osteoblastos y fibroblastos (Boyle y cols., 2003; Sato y cols., 2006; Weaver y cols., 2006; Dong, 2016; Tsukasaki y cols., 2018). El rol patogénico central de los linfocitos Th17 se establece además porque los linfocitos Th17 secretan de manera directa RANKL (Kawai y cols., 2005; Yang y cols., 2008; Han y cols., 2013) (**Figura 1**).

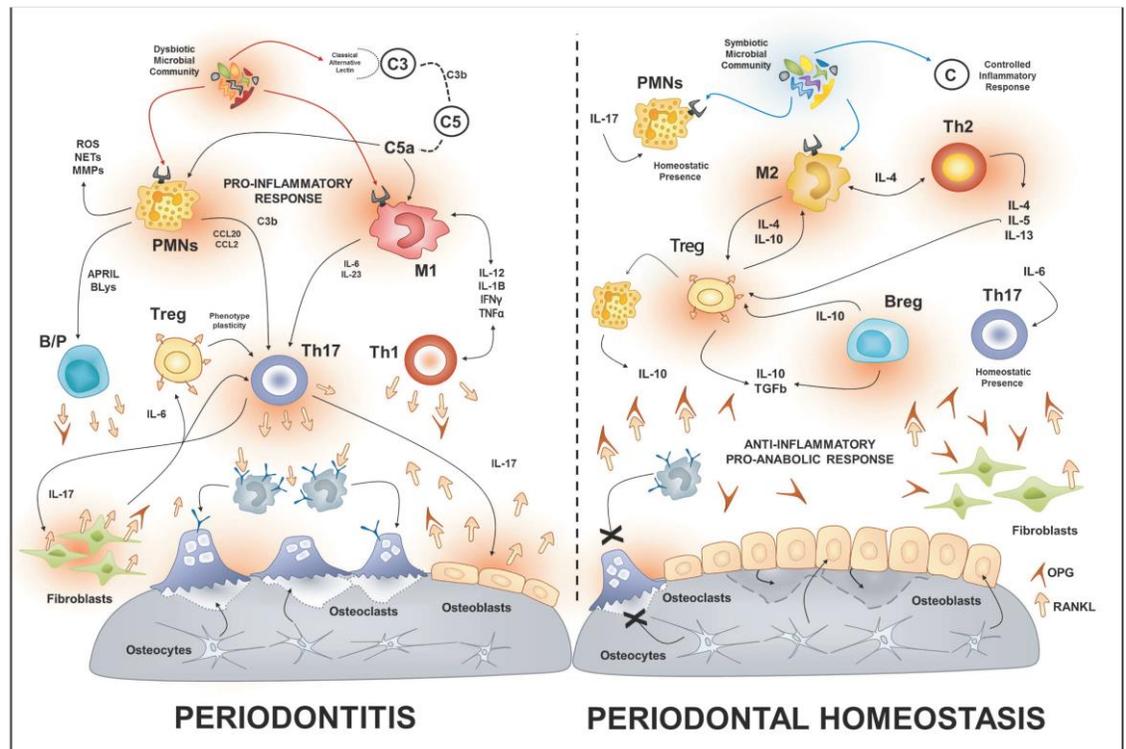


Figura 1. Respuesta osteoinmune durante periodontitis y en salud periodontal. La disbiosis microbiana subgingival genera una respuesta inmune periodontal desregulada que lleva a la producción local de RANKL. A consecuencia de la inflamación, la expresión de RANKL en osteoblastos y fibroblastos de ligamento periodontal produce activación osteoclastica y destrucción ósea. Por otro lado, el fenómeno osteodestructor se exagera por la actividad de los linfocitos Th17 productores de RANKL. En contraste, en condición de salud periodontal, diferentes células del sistema inmune, tal como los linfocitos Treg, Bregs y Th2, promueven la actividad anti-inflamatoria y proanabólica que

mantiene la homeostasis del hueso alveolar mediante la producción de OPG. (Extraída de Alvarez y cols. (2019) *Front Immunol* 10:1664).

En condiciones de salud periodontal existe un balance en la actividad Th17/Treg que contribuye al equilibrio inmune periodontal, donde los linfocitos Treg producen citoquinas anti-inflamatorias, tales como IL-10, IL-35 y el factor transformante beta-1 (TGF- β 1), que inhiben la diferenciación y actividad de linfocitos Th17 productores de RANKL e inducen la producción de OPG por los linfocitos B (Liu y cols., 2006; Liang y cols., 2011; Lin y cols., 2014; Araujo-Pires y cols., 2015) (**Figura 1**).

Por lo tanto, durante la periodontitis, el desbalance inmune Th17/Treg asociado a la disbiosis microbiana subgingival lleva a la disminución del rol regulador de los linfocitos Treg y al incremento patogénico de los linfocitos Th17. En consecuencia, se produce un desbalance local RANKL/OPG y la resorción del hueso alveolar.

Formulación del problema científico

Existe una similitud patogénica a nivel molecular entre la periodontitis, la artritis reumatoide y la osteoporosis, caracterizadas por ser patologías donde como consecuencia de un desequilibrio en la respuesta inmune en el hospedero, se genera el fenómeno de resorción patológica del tejido óseo, explicado por un aumento en la actividad de los osteoclastos mediada por RANKL. La boldina al ser administrada por vía oral y de manera dosis/dependiente en modelos experimentales animales, ha mostrado la capacidad de inhibir la pérdida ósea tanto en artritis reumatoide como en osteoporosis. El efecto protector óseo de la boldina en ambas patologías está asociado con el rol de este alcaloide en la inhibición de la osteoclastogénesis mediada por RANKL. Por lo anterior, es factible especular que la administración oral de boldina podría tener un efecto osteoprotector durante la periodontitis. Usando un modelo animal de periodontitis experimental inducida mediante ligadura, en este estudio se analizará el efecto de

la administración oral de boldina en la inhibición de la pérdida ósea alveolar y la modulación del desbalance periodontal RANKL/OPG y Th17/Treg.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La administración oral de boldina inhibe la resorción ósea alveolar y modula el desbalance RANKL/OPG y Th17/Treg durante la periodontitis experimental.

OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de la administración oral de boldina sobre la resorción ósea alveolar, la expresión de RANKL y OPG, y la detección de linfocitos Th17 y Treg en un modelo experimental animal de periodontitis inducida por ligadura.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cuantificar la pérdida ósea alveolar producida durante la periodontitis experimental inducida por ligadura en animales tratados con boldina, mediante micro-tomografía computarizada micro-CT.
2. Cuantificar los niveles de expresión y secreción de RANKL y OPG en los tejidos periodontales de animales con periodontitis experimental tratados con boldina, mediante qPCR y ELISA.
3. Cuantificar los niveles de expresión de los factores de transcripción y citoquinas características de los linfocitos Th17 y Treg en los tejidos periodontales de animales con periodontitis experimental tratados con boldina mediante qPCR.
4. Cuantificar mediante citometría de flujo el número de linfocitos Th17 y Treg en los linfonodos cervicales que drenan las lesiones periodontales en los animales con periodontitis experimental tratados con boldina.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción y purificación de boldina

La boldina se aisló de la corteza del *Peumus boldus* Molina, tal como fue descrito previamente (Fuentes-Barros y cols., 2018). La corteza del boldo secada y molida se sumergió durante 4 horas en hexano a 50 °C para desengrasarla, repitiendo el procedimiento 3 veces. El material vegetal se secó, y luego fue extraído con HCl 1M. La solución filtrada se alcalinizó (pH 9-10) agregando amoníaco concentrado (25%), y la solución acuosa se extrajo 3 veces con diclorometano (Merck, Darmstadt, Alemania). El extracto de alcaloides totales se secó con Na₂SO₄, se filtró y concentró. Finalmente, la boldina se purificó mediante columnas de cromatografía en gel de sílice 60Å (40-63 µm) (Merck, Darmstadt, Alemania), usando EtOAc:MeOH en gradiente pasando desde EtOAc puro a MeOH puro, monitoreando las fracciones por CCF (EtOAc:MeOH 4:1 y DCM: MeOH 5:3), examinando los cromatogramas bajo luz ultravioleta 254 y 365 nm, y pulverizando con reactivo de Dragendorff, con el fin de detectar la presencia de alcaloides. La boldina se identificó por RMN de ¹H y ¹³C, y se obtuvo una pureza superior al 98% por cromatografía de líquidos de alto rendimiento HPLC-UV. El clorhidrato se preparó posteriormente agregando la cantidad calculada de HCl concentrado (37%) diluido en acetona. El clorhidrato de boldina (PM: 363,835 g/mol) se usó para su administración en los animales.

Animales

Ratones C57BL/6 saludables, de 7 semanas de edad y ≈20 gramos de peso se obtuvieron de la Plataforma Experimental Bioterio de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Los ratones se mantuvieron en condiciones libres de patógenos en un ambiente controlado: temperatura a 24±0.5°C, humedad relativa de 40 a 70%, tasa de intercambio de aire de 15 volúmenes/hora y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, con luces encendidas a las 07:00 a.m. A lo largo del

estudio, los animales se alimentaron con comida y agua estéril *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales fueron sujetos a revisión y aprobación por el Comité de Ética Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile, con la certificación #18173-ODO-UCH (**Anexo**). El estudio se llevó a cabo acorde a las pautas NC3Rs ARRIVE, las recomendaciones de la Asociación Americana de Medicina Veterinaria (AVMA) y las pautas aprobadas por el Consejo de la Sociedad Americana de Psicología (1980) para el uso de experimentos con animales.

Inducción de periodontitis experimental y administración de boldina

La periodontitis experimental se indujo por método de ligadura siguiendo un protocolo previamente descrito (Abe y Hajishengallis, 2013). Brevemente, los ratones fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de ketamina 10% y xilacina 2%, y se ató una ligadura de seda 5-0 alrededor de los segundos molares superiores, sin causar daño a los tejidos periodontales. La boldina se administró oralmente usando la técnica oral gavage en dosis a 10, 20 o 40 mg/kg en 100 µl de amortiguador de fosfato salino (PBS), a partir del día de la colocación de la ligadura y durante 15 días consecutivos. Las dosis de boldina se determinaron en base a informes anteriores (Luo y cols., 2010; Lau y cols., 2013; Tong y cols., 2016).

Grupos experimentales y obtención de muestras biológicas

Cuarenta animales fueron aleatoriamente distribuidos en cinco grupos, de ocho ratones cada uno: (a) grupo sin ligadura, (b) grupo con ligadura no tratado, (c) grupo con ligadura que recibió dosis bajas de boldina (10 mg/kg), (d) grupo con ligadura que recibió dosis medias de boldina (20 mg/kg), y (e) grupo con ligadura que recibió dosis altas de boldina (40 mg/kg). El grupo sin ligadura (grupo a) se utilizó como control. El grupo con ligadura no tratado (grupo b), que recibió el vehículo PBS sin boldina, se utilizó para las comparaciones estadísticas. Después

de 15 días, se eutanasiaron los animales mediante una sobredosis intraperitoneal de ketamina y xilacina, y se obtuvieron las siguientes muestras biológicas: fluido crevicular gingival, huesos maxilares, mucosa palatina completa (correspondiente a la lesión periodontal) y los linfonodos cervicales que drenan específicamente estas lesiones periodontales.

Resorción ósea alveolar

La extensión de la resorción ósea alveolar en los maxilares se cuantificó mediante micro-tomografía computarizada (micro-CT) como se describió anteriormente (Monasterio y cols., 2018). Los maxilares se disecaron eliminando tejidos blandos, y se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 2,5% durante 1 hora y se lavaron 3 veces en PBS. Luego, se escanearon los maxilares en los tres planos espaciales utilizando un equipo de micro-CT (SkyScan 1278; Bruker, Kontich, Bélgica) y las imágenes digitalizadas en 3D se obtuvieron utilizando un software de reconstrucción (Nrecon software; Bruker, Kontich, Bélgica). Una región de interés estandarizada (ROI) se adquirió utilizando un software de análisis (software Dataviewer; Bruker, Kontich, Bélgica), utilizando los siguientes parámetros anatómicos: el techo de furca, el ápice de la raíz del primer y segundo molar, la superficie de la raíz medial del primer molar y la superficie de la raíz distal del segundo molar. El porcentaje de pérdida ósea se calculó utilizando la fórmula: $\text{porcentaje de pérdida ósea} = 1 - (\text{volumen óseo remanente} / \text{ROI}) \times 100$, y se ajustó el grupo de control sin ligadura.

Producción de RANKL y OPG

Para medir la producción de RANKL y OPG en los tejidos periodontales, se recogieron muestras de fluido crevicular gingival utilizando un protocolo descrito previamente (Matsuda y cols., 2016). Brevemente, bajo anestesia intraperitoneal de ketamina y xilacina, la ligadura original que se utilizó para la inducción de periodontitis se retiró suavemente y se ató una nueva ligadura de seda 5-0 de 2

cm de longitud en la misma posición. Después de 10 minutos, se recogió la nueva ligadura que contenía el fluido crevicular gingival y se procesó inmediatamente usando un procedimiento de elución estandarizado en centrífuga. Brevemente, las muestras se sumergieron en 60 μ l de PBS-Tween 20 al 0,05%, que contenía un cóctel de inhibidores de la proteasa (cOmplete Mini sin/libre de EDTA; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania), se incubaron durante 30 minutos a 4 °C y se centrifugaron a 12.000 g durante 5 minutos. El protocolo de elución se repitió dos veces. A partir de muestras eluidas, los niveles de RANKL y OPG se determinaron utilizando kits de ELISA disponibles en el mercado (Quantikine; R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, EE.UU.), los que se analizaron en un lector automático de placas (Sinergia HT; Bio-Tek Instrument Inc., Winooski, VT, EE.UU).

Expresión de RANKL, OPG y citoquinas y factores de transcripción asociados a los linfocitos Th17 y Treg

Para analizar los potenciales cambios en el patrón de respuesta inmune desencadenados en las lesiones periodontales durante la periodontitis experimental y el tratamiento con boldina se cuantificaron los niveles de expresión de los mRNA de los factores de transcripción asociados a los linfocitos Th17 y Treg y sus citoquinas características utilizando qPCR. Como complemento, se cuantificaron también los niveles de expresión para los mRNA de RANKL y OPG. De cada muestra de mucosa palatina, se obtuvo el RNA citoplasmático total usando un reactivo de purificación molecular (TRIzol Plus; Invitrogen, Barcelona, España) y la primera cadena de cDNA se sintetizó utilizando un kit de transcripción inversa (SuperScript III; Invitrogen, Grand Island, NY, EE.UU), siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego, se amplificaron 10 ng de cDNA usando partidores específicos (**Tabla 1**) y un reactivo qPCR (KAPA SYBR Fast qPCR; KAPA Biosystems, Woburn, MA, EE.UU). Los niveles de expresión de los mRNA de los factores de transcripción ROR γ t y Foxp3, las citoquinas IL-6, IL-10, IL-17A, IL-23p19, IL-35 EBI3 y TGF- β 1, y los factores RANKL y OPG se

determinaron en un equipo qPCR en tiempo real (StepOnePlus; Applied Biosystems, Singapur). Las reacciones de amplificación se realizaron de la siguiente manera: 95 °C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 3 segundos, 60 °C durante 30 segundos. Para la detección de la formación de productos inespecíficos falsos positivos, se realizó una curva de fusión de la siguiente manera: 95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 1 minuto y 95 °C durante 15 segundos. Como control endógeno, se midieron los niveles de expresión de la subunidad de rRNA 18S.

Tabla 1. Secuencias de partidores utilizados para amplificaciones por qPCR

	Partidor 5'-3'	Partidor 3'-5'
IL-6	tgatggatgctaccaaactgg	ttcatgtactccaggtagctatgg
IL-10	gcttcatccctgaaaactgtg	tgctacaaaggcagacaaaca
IL-17A	cagggagagcttcatctgtgt	gctgagctttgagggatgat
IL-23p19	gaagggcaaggacaccatta	ttcttcttccagctcctttc
IL-35 EBI3	gctcccctggttacactgaa	acgggataaccgagaagcat
TGF- β 1	tggagcaacatgtggaactc	gtcagcagccggttacca
ROR γ t	cgcgagcagacacactta	ccctggacctctgtttggc
Foxp3	agaagctgggagctatgcag	actggtggctacgatgcag
RANKL	tgaagacacactacctgactctg	cccacaatgtgttcagttc
OPG	gttcccaggaccacaat	ccattcaatgatgtccaggag
18S rRNA	gcaattattcccatgaacg	gggacttaatacaacgcaagc

EBI3, Virus Epstein-Barr Gen 3 inducido; Foxp3, factor de transcripción forkhead box P3; IL, interleuquina; OPG, osteoprotegerina; RANKL, ligando del receptor activador del factor nuclear κ B; ROR γ t, receptor gamma huérfano relacionado con RAR; TGF- β 1, factor de crecimiento transformante- β 1.

DetECCIÓN DE LINFOCITOS Th17 Y TREG

Para analizar el patrón de respuesta inmune Th17/Treg desencadenado en las lesiones periodontales durante la periodontitis experimental y el tratamiento con boldina, la presencia de linfocitos Th17 y Treg en los linfonodos cervicales que drenan las lesiones periodontales se analizaron usando citometría de flujo, tal como se describió previamente (Monasterio y cols., 2018). Los linfonodos cervicales se removieron y disgregaron mecánicamente usando un filtro de 70 μm en PBS y las células obtenidas se cuantificaron usando un contador automatizado (Luna II, Logos Biosystems, Annandale, VA, EE.UU). Previa determinación de viabilidad celular usando un kit live/dead (Zombie UV Fixable Viability Kit (BioLegend, San Diego, CA, EE.UU), las células se marcaron extracelularmente usando los siguientes anticuerpos: anti-CD4 brilliant violet 605 (BV605) (clone GK.1.5) (BioLegend, San Diego, CA, EE.UU), anti-CD8a brilliant ultraviolet 396 (BUV396) (clone 53-6.7) (BD Bioscience, San Jose, CA, EE.UU), y anti-CD45 brilliant ultraviolet 737 (BUV737) (clone 30-F11) (BD Bioscience, San Jose, CA, EE.UU). Luego, las células se trataron con 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de brefeldina-A (Invitrogen, Grand Island, NY, EE.UU) a 37 °C durante 6 horas y se fijaron/permeabilizaron usando un kit comercial (R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU). Después, las células se marcaron intracelularmente usando los siguientes anticuerpos: anti-ROR γ t phycoerythrin CF594 (PE CF594) (clone Q31-378) (BD Bioscience, San Jose, CA, EE.UU), anti-Foxp3 Alexa Fluor 488 (clone 150D) (BioLegend, San Diego, CA, EE.UU), anti-IL-10 allophycocyanin-Cy7 (APC-Cy7) (clone JES5-16E3) (BioLegend, San Diego, CA, EE.UU) y anti-IL-17A phycoerythrin-Cy7 (PE-Cy7) (clone TC11-18H10.1) (BioLegend, San Diego, CA, EE.UU). Las células se analizaron en un citómetro de flujo (LSR Fortessa X-20, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Franklin Lakes, NJ, EE.UU) con la siguiente estrategia de identificación: FSC/SSC, FSC/FSC, live/dead/CD45 y CD4/CD8. Se usaron anticuerpos control de isotipos para determinar poblaciones celulares negativas. Los experimentos se realizaron por separado para cada animal.

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como promedio \pm desviación estándar. La pérdida ósea alveolar se calculó como porcentaje. Los datos de ELISA se calcularon como pg/ml utilizando una ecuación logística de 4 parámetros. Los datos de qPCR se calcularon utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando el software StepOne v2.2.2 (Applied Biosystems, Singapur) y se expresaron como niveles de expresión relativos (fold-change). Los datos de citometría de flujo se analizaron utilizando el software WinMDi v.2.9 (Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EE.UU.). Los datos se analizaron estadísticamente utilizando el software SPSS v22.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EE.UU.). La normalidad de la distribución de datos se determinó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov y las diferencias estadísticas se establecieron con las pruebas de ANOVA y post-hoc Bonferroni. Los valores de $\alpha < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

5. RESULTADOS

Resorción ósea alveolar

La periodontitis experimental mediante ligadura fue inducida exitosamente, y los ratones desarrollaron una resorción ósea alveolar sustancial alrededor de los molares superiores 15 días después de colocada la ligadura (**Figura 2A**). La boldina, dependiendo de la dosis administrada, inhibió la resorción ósea alveolar en aquellos ratones periodontalmente afectados (**Figura 2B**). Cuando se administraron 10 mg/kg vía oral, la resorción ósea alveolar inducida fue significativamente menor en comparación con los ratones no tratados. Cuando se usaron 20 mg/kg de boldina se indujo una resorción ósea alveolar significativamente menor comparada con los ratones no tratados y los tratados con 10 mg/kg de boldina. Cuando se usaron 40 mg/kg de boldina se indujo una resorción ósea alveolar significativamente menor en comparación con ratones no tratados y los tratados con 10 y 20 mg/kg de boldina.

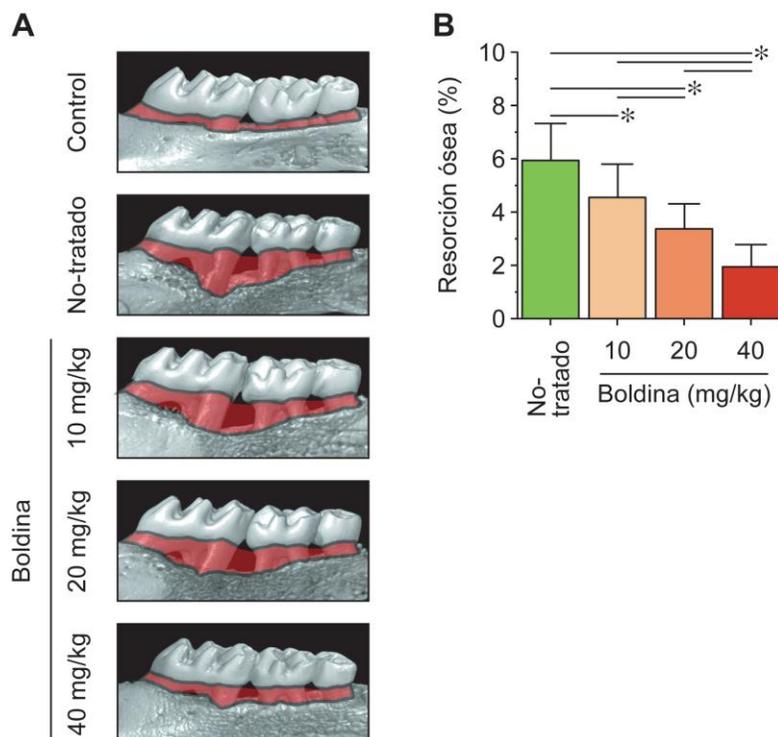


Figura 2. Niveles de resorción ósea alveolar. A) Imágenes representativas de la pérdida ósea alveolar utilizando micro-tomografía computarizada (micro-CT) obtenidas de muestras maxilares de ratones con periodontitis inducida mediante ligadura, tratados o no tratados con boldina. Se utilizaron ratones sanos sin ligadura como control. **B)** Porcentaje de resorción ósea alveolar cuantificado mediante micro-CT en muestras maxilares de ratones con periodontitis inducida por ligadura tratados o no tratados con boldina. Los datos son representados como porcentajes de pérdida ósea alveolar ajustados al grupo control sin ligadura y se muestran como promedio \pm desviación estándar (n= 8). * $P < 0,05$. Grupo sin tratar comparado con grupos tratados con boldina (administrada por vía oral en dosis de 10, 20 o 40 mg/kg).

Producción de RANKL y OPG

Basado en el hallazgo de que la boldina otorga protección contra la resorción ósea alveolar durante la periodontitis experimental y que la diferenciación y activación de osteoclastos depende de los niveles locales de RANKL/OPG, se analizó la producción de RANKL y OPG en los tejidos periodontalmente afectados (**Figura 3**). De manera dosis-dependiente, la expresión (niveles de mRNA) y la secreción (niveles de proteína) de RANKL fue significativamente menor en los ratones con periodontitis tratados con boldina que los ratones no tratados (**Figuras 3A y 3B**). Por el contrario, se detectó un aumento en los niveles de OPG expresados y secretados en los ratones con periodontitis tratados con boldina en comparación con los ratones no tratados (**Figuras 3A y 3B**). Estos cambios resultaron en una disminución de la razón RANKL/OPG en las lesiones periodontales cuando los ratones con periodontitis fueron tratados con boldina (**Figura 3C**).

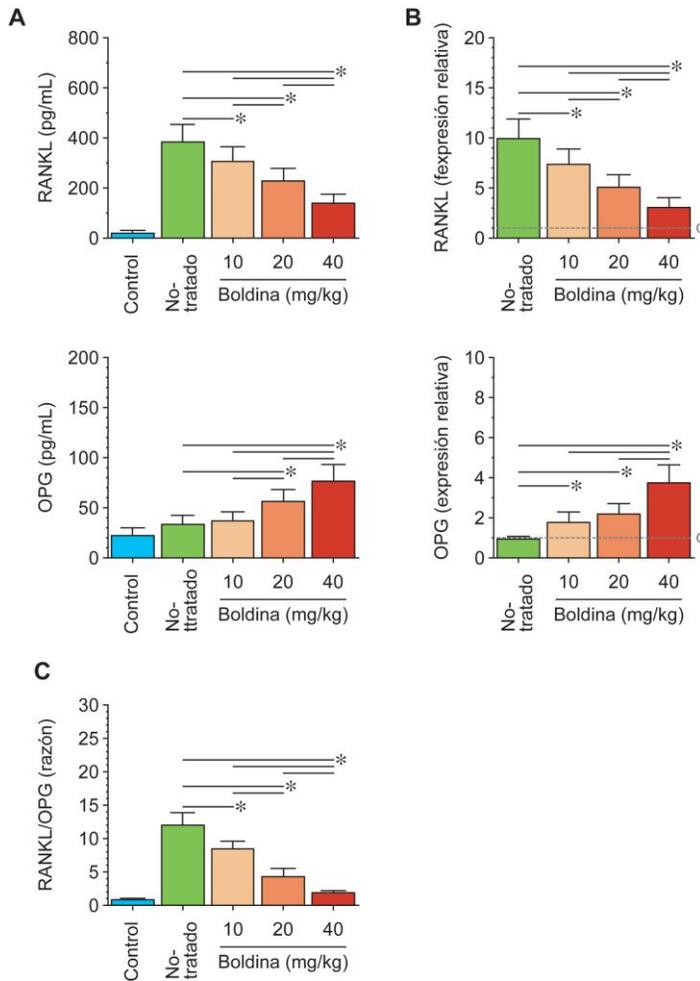


Figura 3. Producción de RANKL y OPG. **A)** Secreción de RANKL y OPG en muestras de fluido crevicular gingival de ratones con periodontitis inducida mediante ligadura tratados o no tratados con boldina. Se utilizaron ratones sanos sin ligadura como control. Los datos son representados como promedio \pm desviación estándar ($n=8$). Cada experimento fue realizado por duplicado. **B)** Expresión de RANKL y OPG en las lesiones periodontales de ratones con periodontitis inducida mediante ligadura tratados o no tratados con boldina. Como referencias de la expresión relativa, las expresiones de los mRNA de RANKL y OPG en ratones control sin ligadura (c) fueron considerados como 1. Los datos son representados como expresión relativa de mRNA y se muestran como promedio \pm desviación estándar ($n=8$). Cada experimento fue realizado por duplicado. **C)** Razón entre los niveles secretados de RANKL y OPG en muestras

de fluido crevicular gingival de ratones con periodontitis inducida mediante ligadura tratados o no tratados con boldina. Se utilizaron ratones sanos sin ligadura como control. Los datos son representados como razón RANKL/OPG y se muestran como promedio \pm desviación estándar (n= 8). * $P < 0,05$. Grupo sin tratar comparado con grupos tratados con boldina (administrada vía oral en dosis de 10, 20 o 40 mg/kg).

Expresión de citoquinas y factores de transcripción asociados a linfocitos Th17 y Treg

La resorción ósea alveolar y la sobreexpresión de RANKL durante la periodontitis está estrechamente asociada al desbalance local Th17/Treg. Por lo tanto, para evaluar si el efecto inhibitor de la boldina en la pérdida ósea alveolar y la activación de osteoclastos mediada por RANKL estaba relacionado con la modulación del desbalance Th17/Treg se analizó la expresión de las citoquinas y factores de transcripción asociados a linfocitos Th17 y Treg en los tejidos periodontales (**Figura 4**). De manera dosis-dependiente, la expresión de mRNA del factor de transcripción ROR γ t, asociada con la diferenciación y función de los linfocitos Th17, fue significativamente menor en los ratones con periodontitis tratados con boldina que en los ratones no tratados (**Figura 4A**). Por el contrario, un aumento dosis-dependiente en la expresión de mRNA del factor de transcripción Foxp3, asociado con la diferenciación y función de los linfocitos Treg se detectó en los ratones con periodontitis tratados con boldina comparados con los ratones no tratados (**Figura 4B**). Además, los ratones periodontalmente afectados que fueron tratados con boldina mostraron una expresión significativamente menor de mRNA de las citoquinas asociadas a linfocitos Th17 (IL-6, IL-17A, e IL-23) en comparación con los ratones no tratados (**Figura 4C**). Por el contrario, de manera dosis-dependiente los niveles de mRNA de las citoquinas asociadas a linfocitos Treg (IL-10, IL-35, e TGF- β 1) fueron significativamente mayores en los ratones con periodontitis tratados con boldina que en los ratones no tratados (**Figura 4D**).

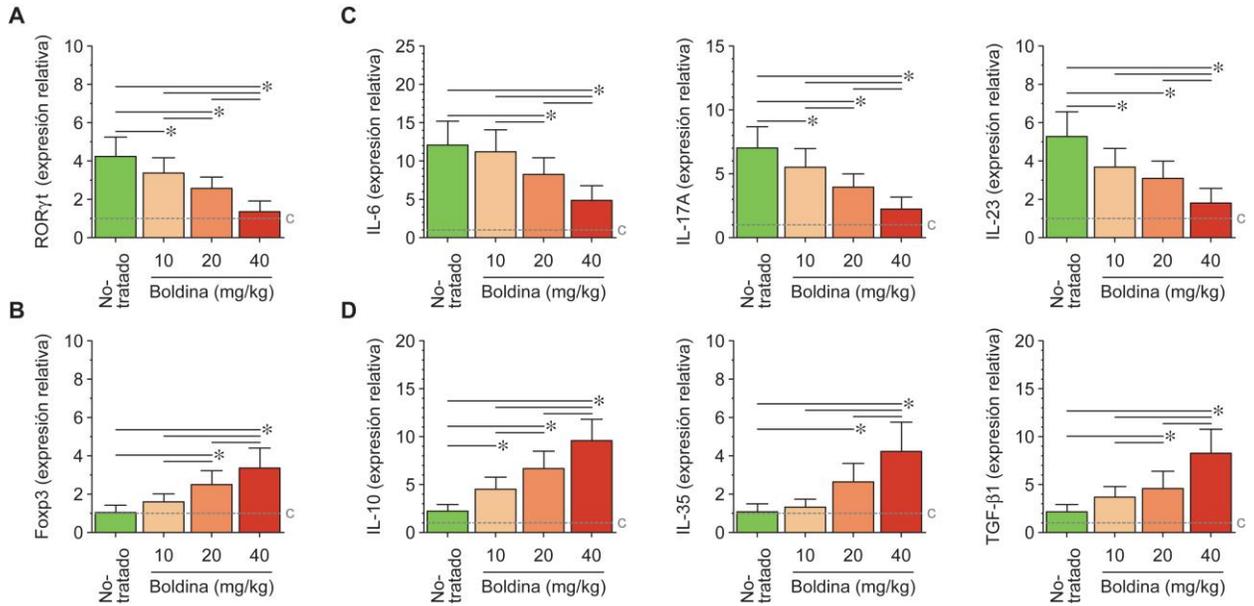


Figura 4. Expresión de citoquinas y factores de transcripción relacionados a linfocitos Th17 y Treg. A y B) Niveles de expresión relativa de los mRNA de los factores de transcripción RORγt (Th17) y Foxp3 (Treg) en las lesiones periodontales de ratones con periodontitis inducida mediante ligadura tratados o no tratados con boldina. C y D) Niveles de expresión relativa de los mRNA de las citoquinas IL-6, IL-17A, y IL-23 (Th17) y IL-10, IL-35 EBI3, y TGF-β1 (Treg) en las lesiones periodontales de ratones con periodontitis inducida mediante ligadura tratados o no tratados con boldina. Como referencias para calcular la expresión relativa de los mRNA de las citoquinas y los factores de transcripción, los ratones control sin ligadura (c) fueron considerados como 1. Los datos son representados como expresión relativa de mRNA y se muestran como promedio ± desviación estándar (n= 8). Cada experimento fue realizado en triplicado. * $P < 0,05$. Grupo sin tratar comparado con grupos tratados con boldina (administrada por vía oral en dosis de 10, 20 o 40 mg/kg).

Detección de linfocitos Th17 y Treg

Los cambios en el patrón Th17/Treg de la respuesta inmune inducida por la boldina fueron ratificados cuando la frecuencia y el número absoluto de los linfocitos Th17 y Treg fueron analizados dentro de los linfonodos cervicales que drenan los tejidos periodontales (**Figura 5**). De manera dosis-dependiente, la boldina indujo una reducción significativa en la frecuencia y el número de linfocitos Th17 CD45⁺CD4⁺CD8-RORγt⁺IL-17A⁺ en los ratones periodontalmente afectados comparados con los ratones no tratados (**Figuras 5A y 5C**). Curiosamente, la boldina también indujo un aumento significativo en la frecuencia y el número de linfocitos Treg CD45⁺CD4⁺CD8-Foxp3⁺IL-10⁺ en los ratones periodontalmente afectados comparados con los ratones no tratados (**Figuras 5B y 5D**).

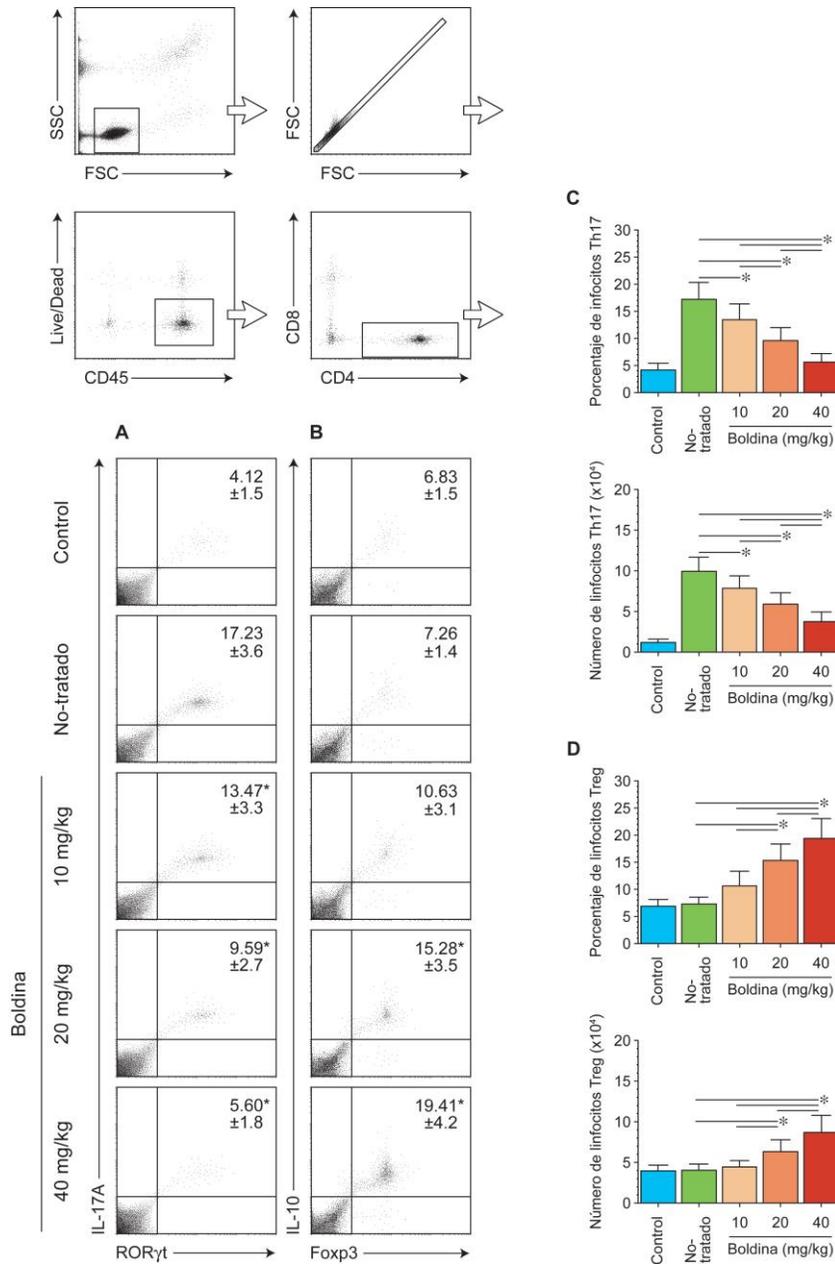


Figura 5. Detección de linfocitos Th17 y Treg. Análisis por citometría de flujo demostrando la presencia de A) Linfocitos Th17 CD45⁺CD4⁺CD8-RORγt⁺IL-17A⁺ y B) Linfocitos Treg CD45⁺CD4⁺CD8-Foxp3⁺IL-10⁺ dentro de los linfonodos cervicales que drenan los tejidos periodontales de ratones con periodontitis inducida mediante ligadura tratados o no tratados con boldina. Se utilizaron ratones sanos sin ligadura como control. Número y frecuencia de C) Linfocitos

Th17 CD45⁺CD4⁺CD8⁻RORγt⁺IL-17A⁺ y **D)** Linfocitos Treg CD45⁺CD4⁺CD8⁻Foxp3⁺IL-10⁺ dentro de los linfonodos cervicales que drenan los tejidos periodontales de ratones con periodontitis inducida mediante ligadura tratados o no tratados con boldina. Se utilizaron ratones sanos sin ligadura como control. Los datos son representados como número absoluto y porcentaje de células Treg o Th17 y se muestran como promedio ± desviación estándar (n= 8). Cada experimento fue realizado en duplicado. **P* < 0,05. Grupo sin tratar comparado con grupos tratados con boldina (administrada por vía oral en dosis de 10, 20 o 40 mg/kg).

6. DISCUSIÓN

Diversos estudios *in vivo* indican que la boldina, alcaloide extraído del boldo, posee propiedades para mitigar condiciones de salud a nivel renal, hepático, gastrointestinal, cerebrovascular, cardiovascular, del sistema nervioso y óseas (Lanhers y cols., 1991; Ivorra y cols., 1993; Chuliá y cols., 1996; Ivorra y cols., 2005; López y cols., 2010; Lau y cols., 2012; Gómez y Velarde, 2016; Pandurangan y cols., 2016; De Lima y cols., 2017; Heidari y cols., 2017; Qiu y cols., 2017; Yi y cols., 2017; Dhingra y Soni, 2018; Moezi y cols., 2019; Boeing y cols., 2020; Mondal y cols., 2020; Li y cols., 2020; Ezhilarasan y Raghunandhakumar, 2021; Shuker y cols., 2022). Esta última es objeto de gran interés para esta investigación debido a la relación osteoprotectora de la boldina en patologías proresortivas de alta prevalencia en la población mundial, como la artritis reumatoide y la osteoporosis (Wang y cols., 2007; Qiao y cols., 2015; Zhao y cols., 2017; Chen y cols., 2018). En un modelo experimental animal de artritis reumatoide inducida por colágeno, se mostró que la boldina administrada de forma oral inhibió la pérdida ósea en el tejido articular subcondral, suprimiendo la diferenciación de osteoclastos, promoviendo un aumento en la expresión de los niveles de OPG y una disminución en los niveles de expresión de RANKL (Zhao y cols., 2017). En la misma línea de lo anterior, en un modelo murino de osteoporosis inducida por deficiencia de estrógeno, se evidenció que la boldina administrada por sonda gástrica evitó la resorción ósea, lo que podría ser explicado por la inhibición en la formación de osteoclastos al interferir en la activación de la vía de señalización AKT inducida por RANKL durante la osteoclastogénesis (Chen y cols., 2018). Por su parte, la pérdida ósea patológica durante la periodontitis es producida por la afectación de los tejidos de soporte dentario generada por un desequilibrio en la respuesta inmune del hospedero. El fenómeno disbiótico provocado por los microorganismos subgingivales involucra la aparición de bacterias patogénicas particulares que son clave en el inicio y desarrollo de la enfermedad periodontal (Kinane y cols., 2005; Hajishengallis, 2015; Papapanou y cols., 2018). Las células dendríticas al reconocer las bacterias

periodonto-patógenas, presentan los antígenos a los linfocitos T que ejercen un rol elemental en la modulación del desequilibrio inmune que provoca la osteodestrucción (Vernal y cols., 2004; Bostanci y cols., 2007; Vernal y cols., 2014; Sojod y cols., 2017; Alvarez y cols., 2018; Alvarez y cols., 2019). Dentro de los fenotipos linfocitarios asociados con la patogenia de la enfermedad periodontal la respuesta de los linfocitos Th17 se encuentra en mayor actividad durante la periodontitis e influye en el metabolismo óseo al inducir la osteoclastogénesis mediante la producción directa de RANKL, e indirecta al secretar IL-17A (Kawai y cols., 2005; Yang y cols., 2008; Han y cols., 2013) promoviendo la sobreexpresión de RANKL en fibroblastos, osteoblastos y macrófagos (Boyle y cols., 2003; Vernal, Dutzan, y cols., 2006; Cheng y cols., 2014).

En el presente trabajo de investigación se sometió a estudio el efecto de la administración por sonda gástrica de boldina en el desbalance inmune Th17/Treg y RANKL/OPG, y la resorción ósea alveolar de ratones con periodontitis experimental inducida mediante la colocación de ligadura en los segundos molares superiores. De acuerdo a los resultados obtenidos se desprende que la boldina administrada de forma dosis-dependiente mejoró la condición periodontal al inhibir la pérdida ósea en los tejidos periodontales analizados de los ratones con periodontitis inducida mediante ligadura, que se relaciona con la modulación inmune del desequilibrio linfocitario Th17 y Treg, y podría ser explicado por la variación en los niveles de expresión local de RANKL/OPG en los tejidos periodontales, resultando en la atenuación de la vía de señalización RANKL/OPG determinante de la resorción ósea mediada por osteoclastos. En ese contexto, la boldina como agente terapéutico osteoprotector en un modelo animal de periodontitis inducida por ligadura, demostrado en esta investigación al inhibir la resorción ósea a nivel periodontal, también podría ser explicado por la implicancia del alcaloide en esta modulación del desequilibrio linfocitario Th17/Treg que determina la actividad osteoclástica mediada por RANKL al favorecer de forma dosis-dependiente una respuesta Treg aumentada en linfonodos cervicales que drenan los tejidos periodontales expresada en la disminución significativa en frecuencia y número de los linfocitos Th17 CD45⁺CD4⁺CD8-RORγt⁺IL-17A⁺, en

comparación con los ratones no tratados con boldina. Al contrario, la administración de boldina dosis-dependiente suprime de forma dosis-dependiente la respuesta Th17. En este trabajo de investigación se analizó el efecto inhibitor de la boldina en la resorción ósea alveolar de la periodontitis, asociado con la modulación inmune de RANKL durante la formación de osteoclastos. Nuestros hallazgos mostraron que la boldina administrada de forma dosis-dependiente está relacionada con la modulación del desbalance de linfocitos Th17/Treg, lo que podría ser explicado por los datos obtenidos en la expresión de citoquinas y factores de transcripción característicos de los perfiles linfocitarios Th17 y Treg. En efecto, este estudio demostró que la boldina indujo en los tejidos periodontales de los ratones tratados con esta una disminución significativa de la expresión del factor de transcripción ROR γ t asociado al perfil de linfocitos Th17, en comparación con los ratones no tratados. De manera contraria, en los ratones tratados con boldina se encontró un incremento dosis-dependiente en la expresión del factor de transcripción Foxp3 asociado al perfil linfocitario Treg, en contraste con los ratones no tratados. Por su parte, el efecto de la boldina en la expresión de citoquinas asociadas a linfocitos Th17 y Treg también se vio reflejado en los ratones tratados, demostrando que la administración oral del alcaloide redujo significativamente la expresión de citoquinas IL-6, IL-17A e IL-23 (asociadas a linfocitos Th17) y aumentó significativamente la expresión de citoquinas IL-10, IL-35 e TGF- β 1 (asociadas a linfocitos Treg) en los tejidos periodontales de ratones tratados, en comparación con los no tratados.

La osteoinmunología investiga los procesos celulares y moleculares involucrados en la osteólisis inflamatoria que desencadena la destrucción ósea alveolar (Gruber, 2019). La interacción entre las células del sistema inmune juega un rol elemental en los procesos catabólicos de pérdida ósea, como también en los procesos fisiológicos involucrados en la remodelación y regeneración ósea. En este último, las células T $\gamma\delta$ pueden desempeñar funciones tisulares regenerativas (Witherden y cols., 2012). Estas células proliferan en los sitios de daño tisular y son productoras de IL-17A, citoquina que es producida en altos niveles después del daño tisular óseo y que promueve la regeneración ósea al acelerar la

osteoblastogénesis mediante sus efectos sobre las células mesenquimales (Ono y cols., 2016). Según los resultados de la presente investigación, la boldina logró reducir el rol catabólico de los linfocitos Th17 durante la pérdida ósea alveolar periodontal a través de la modulación del desequilibrio inmune RANKL/OPG y de la actividad de osteoclastos mediada por RANKL. Considerando lo anterior, es probable suponer entonces que boldina podría ejercer un rol anabólico a nivel óseo, al estar eventualmente involucrado en la función y diferenciación de osteoblastos, pudiendo ser de utilidad en los fenómenos de remodelación y regeneración ósea, y una alternativa viable en la actualidad para hacer frente al desafío de resolver las secuelas clínicas de la enfermedad periodontal, que es la destrucción patológica de los tejidos de soporte dentario.

La presente investigación analizó el efecto de la administración oral de boldina en un modelo experimental animal, dando como resultado una inhibición en la pérdida ósea patológica durante la periodontitis inducida mediante ligadura. El mecanismo por el cual la boldina modula el desequilibrio inmune no fue parte de esta investigación. Por tanto, es pertinente desarrollar más estudios para profundizar el rol de la boldina en la inhibición de la resorción ósea, identificando los procesos moleculares asociados a la expansión de la respuesta inmune Treg y la supresión de la respuesta inmune Th17 en los tejidos periodontales.

Finalmente, dentro de las consideraciones y limitaciones de esta investigación, está la necesidad de administración diaria de la boldina, debido a que si bien posee una rápida absorción tiene una vida media baja. Otra consideración importante de la boldina es que a partir de una concentración de 65 mg/kg es tóxica, lo que sugiere que se deban realizar investigaciones que minimicen sus riesgos (Álvarez., 2015). En este estudio trabajamos con ratones inmunocompetentes, por lo cual, para hacer más expedito el eventual paso a una terapéutica aplicada en seres humanos se debería considerar avanzar a la incorporación de células humanas en la respuesta inmune de los ratones. Otra consideración relevante a destacar, es que en esta investigación se utilizaron muestras animales de los tejidos de soporte dentario de los segundos molares

maxilares. Para ampliar el espectro terapéutico de la boldina hacia el territorio maxilofacial se sugiere incluir en estudios posteriores el análisis de la administración de boldina y su repercusión clínica en la articulación temporomandibular y en lesiones periapicales.

7. CONCLUSIONES

Sobre la base de los datos obtenidos de esta investigación podemos concluir que la administración oral de boldina mejora la condición periodontal de los ratones con periodontitis inducida mediante ligadura. En particular, boldina inhibe la resorción ósea alveolar, disminuye la razón RANKL/OPG, disminuye la expresión de ROR γ t, IL-6, IL-17A y IL-23 e incrementa la expresión de Foxp3, IL-10, IL-35 EBI3 y TGF- β 1 y, finalmente, disminuye el número de linfocitos Th17 y aumenta el de linfocitos Treg en los tejidos periodontales, en comparación a los ratones con periodontitis sin tratamiento.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, T., y Hajishengallis, G. (2013). Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *Journal of Immunological Methods*, 394:49–54.
- Alvarez, C., Monasterio, G., Cavalla, F., Córdova, L. A., Hernández, M., Heymann, D., Garlet, G. P., Sorsa, T., Pärnänen, P., Lee, H. M., Golub, L. M., Vernal, R., Kantarci, A., y cols. (2019). Osteoimmunology of oral and maxillofacial diseases: Translational applications based on biological mechanisms. *Frontiers in Immunology*, 10.
- Alvarez, C., Rojas, C., Rojas, L., Cafferata, E. A., Monasterio, G., Vernal, R., y cols. (2018). Regulatory T lymphocytes in periodontitis: a translational view. *Mediators of Inflammation*, 2018.
- Álvarez, M. (2015). *Caracterización de la actividad biológica y farmacológica del alcaloide boldina en la Distrofia Miotónica de tipo 1*. Trabajo de investigación para optar al grado de doctora. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Valencia.
- Araujo-Pires, A. C., Vieira, A. E., Francisconi, C. F., Bigueti, C. C., Glowacki, A., Yoshizawa, S., Campanelli, A. P., Trombone, A. P. F., Sfeir, C. S., Little, S. R., Garlet, G. P., y cols. (2015). IL-4/CCL22/CCR4 axis controls regulatory T-cell migration that suppresses inflammatory bone loss in murine experimental periodontitis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 30:400–410.
- Boeing, T., Mariano, L. N. B., dos Santos, A. C., Tolentino, B., Vargas, A. C., de Souza, P., Nesello, L. A. N., da Silva, L. M., y cols. (2020). Gastroprotective effect of the alkaloid boldine: Involvement of non-protein sulfhydryl groups, prostanoids and reduction on oxidative stress. *Chemico-Biological Interactions*, 327:109166.
- Bostanci, N., Ilgenli, T., Emingil, G., Afacan, B., Han, B., Töz, H., Berdeli, A., Atilla, G., McKay, I. J., Hughes, F. J., Belibasakis, G. N., y cols. (2007). Differential

expression of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin mRNA in periodontal diseases. *Journal of Periodontal Research*, 42:287–293.

Camidge, R. (2001). The Genetic Basis of Cancer. *Bmj*, 323:813.

Cassels, B. K., Fuentes-Barros, G., y Castro-Saavedra, S. (2018). Boldo, Its Secondary Metabolites and their Derivatives. *Current Traditional Medicine*, 5:31–65.

Chen, K., Lv, Z. T., Cheng, P., Zhu, W. T., Liang, S., Yang, Q., Parkman, V. J. A., Zhou, C. H., Jing, X. Z., Liu, H., Wang, Y. T., Lin, H., Liao, H., Chen, A. M., y cols. (2018). Boldine ameliorates estrogen deficiency-induced bone loss via inhibiting bone resorption. *Frontiers in Pharmacology*, 9:1–13.

Chuliá, S., Moreau, J., Naline, E., Noguera, M. A., Ivorra, M. D., D'Ocón, M. P., Advenier, C., y cols. (1996). The effect of S-(+)-boldine on the alpha 1-adrenoceptor of the guinea-pig aorta. *British journal of pharmacology*, 119:1305–1312

De Lima, N. M. R., Ferreira, E. D. O., Fernandes, M. Y. S. D., Lima, F. A. V., Neves, K. R. T., Do Carmo, M. R. S., De Andrade, G. M., y cols. (2016). Neuroinflammatory response to experimental stroke is inhibited by boldine. *Behavioural Pharmacology*, 28:223–227.

Dhingra, D., y Soni, K. (2018). Behavioral and biochemical evidences for nootropic activity of boldine in young and aged mice. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 97:895–904

Dong, C. (2006). Diversification of T-helper-cell lineages: Finding the family root of IL-17-producing cells. *Nature Reviews Immunology*, 6:329–333.

Dutzan, N., Gamonal, J., Silva, A., Sanz, M., y Vernal, R. (2009). Over-expression of forkhead box P3 and its association with receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, interleukin (IL) -17, IL-10 and transforming growth factor- β

during the progression of chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 36:396–403.

Dutzan, N., Vernal, R., Hernandez, M., Dezerega, A., Rivera, O., Silva, N., Aguillon, J. C., Puente, J., Pozo, P., Gamonal, J., y cols. (2009). Levels of Interferon-Gamma and Transcription Factor T-Bet in Progressive Periodontal Lesions in Patients With Chronic Periodontitis. *Journal of Periodontology*, 80:290–296.

Ezhilarasan, D., y Raghunandhakumar, S. (2021). Boldine treatment protects acetaminophen-induced liver inflammation and acute hepatic necrosis in mice. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 35.

Fuentes-Barros, G., Castro-Saavedra, S., Liberona, L., Acevedo-Fuentes, W., Tirapegui, C., Mattar, C., Cassels, B. K., y cols. (2018). Variation of the alkaloid content of *Peumus boldus* (boldo). *Fitoterapia*, 127:179–185.

Garlet, G. P. (2010). Critical reviews in oral biology & medicine: Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: A re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *Journal of Dental Research*, 89:1349–1363.

Gerhardt, D., Horn, A. P., Gaelzer, M. M., Frozza, R. L., Delgado-Cañedo, A., Pelegrini, A. L., Henriques, A. T., Lenz, G., Salbego, C., y cols. (2009). Boldine: A potential new antiproliferative drug against glioma cell lines. *Investigational New Drugs*, 27:517–525.

Gerhardt, D., Bertola, G., Dietrich, F., Figueiró, F., Zanotto-Filho, A., Moreira Fonseca, J. C., Morrone, F. B., Barrios, C. H., Battastini, A. M. O., Salbego, C. G., y cols. (2014). Boldine induces cell cycle arrest and apoptosis in T24 human bladder cancer cell line via regulation of ERK, AKT, and GSK-3 β . *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 32:36.e1-36.e9.

Gómez, G. I., y Velarde, V. (2018). Boldine improves kidney damage in the goldblatt 2K1C model avoiding the increase in TGF- β . *International Journal of Molecular Sciences*, 19.

- Gómez, G. I., y Velarde, V. (2016). *Indian Journal of Medical Research and Pharmaceutical Sciences*. 3:80–90.
- Graves, D. T., Oates, T., y Garlet, G. P. (2011). Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *Journal of Oral Microbiology*, 3:1–15.
- Gruber, R. (2019). Osteoimmunology: Inflammatory osteolysis and regeneration of the alveolar bone. *Journal of Clinical Periodontology*, 46:52–69.
- Hajishengallis, G. (2015). Periodontitis: From microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 15:30–44.
- Han, X., Lin, X., Yu, X., Lin, J., Kawai, T., LaRosa, K. B., Taubman, M. A., y cols. (2013). Porphyromonas gingivalis infection-associated periodontal bone resorption is dependent on receptor activator of NF- κ B ligand. *Infection and Immunity*, 81:1502–1509
- Heidari, R., Moezi, L., Asadi, B., Ommati, M. M., y Azarpira, N. (2017). Hepatoprotective effect of boldine in a bile duct ligated rat model of cholestasis/cirrhosis. *PharmaNutrition*, 5:109–117.
- Ivorra, M. D., Chuliá, S., Lugnier, C., y D'Ocón, M. P. (1993). Selective action of two aporphines at α 1-adrenoceptors and potential-operated Ca^{2+} channels. *European Journal of Pharmacology*, 231:165–174.
- Ivorra, M. D., Valiente, M., Martínez, S., Madrero, Y., Noguera, M. A., Cassels, B. K., Sobarzo, E. M., D'Ocón, P., y cols. (2005). 8-NH2-boldine, an antagonist of α 1A and α 1B adrenoceptors without affinity for the α 1D subtype: Structural requirements for aporphines at α 1- adrenoceptor subtypes. *Planta Medica*, 71:897–903.
- Kawai, T., Matsuyama, T., Hosokawa, Y., Makihira, S., Seki, M., Karimbux, N. Y., Goncalves, R. B., Valverde, P., Dibart, S., Li, Y. P., Miranda, L. A., Ernst, C. W. O., Izumi, Y., Taubman, M. A., y cols. (2006). B and T lymphocytes are the

primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *American Journal of Pathology*, 169:987–998.

Kinane, D. F., Shiba, H., y Hart, T. C. (2005). The genetic basis of periodontitis. *Periodontology 2000*, 39:91–117.

Lanhers, M. C., Joyeux, M., Soulimani, R., Fleurentin, J., Sayag, M., Mortier, F., Younos, C., Pelt, J. M., y cols. (1991). Hepatoprotective and anti-inflammatory effects of a traditional medicinal plant of Chile, *Peumus boldus*. *Planta Medica*, 57:110–115

Lau, Y. S., Machha, A., Achike, F. I., Murugan, D., y Mustafa, M. R. (2012). The aporphine alkaloid boldine improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *Experimental Biology and Medicine*, 237:93–98.

Lau, Y. S., Tian, X. Y., Mustafa, M. R., Murugan, D., Liu, J., Zhang, Y., Lau, C. W., Huang, Y., y cols. (2013). Boldine improves endothelial function in diabetic db/db mice through inhibition of angiotensin II-mediated BMP4-oxidative stress cascade. *British Journal of Pharmacology*, 170:1190–1198.

Li, T., Niu, J., Yu, G., Ezan, P., Yi, C., Wang, X., Koulakoff, A., Gao, X., Chen, X., Sáez, J. C., Giaume, C., Xiao, L., y cols. (2020). Connexin 43 deletion in astrocytes promotes CNS remyelination by modulating local inflammation. *Glia*, 68:1201–1212.

Li, W., Veeraraghavan, V. P., y Ma, W. (2020). Effects of boldine on antioxidants and allied inflammatory markers in mouse models of asthma. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 39: 225–234.

Liang, S., Krauss, J. L., Domon, H., McIntosh, M. L., Hosur, K. B., Qu, H., Li, F., Tzekou, A., Lambris, J. D., Hajishengallis, G., y cols. (2011). The C5a receptor impairs IL-12–dependent clearance of *Porphyromonas gingivalis* and is required for induction of periodontal bone loss. *The Journal of Immunology*, 186:869–877.

- Lin, D., Li, L., Sun, Y., Wang, W., Wang, X., Ye, Y., Chen, X., Xu, Y., y cols. (2015). Interleukin-17 regulates the expressions of RANKL and OPG in human periodontal ligament cells via TRAF6/TBK1-JNK/NF- κ B pathways. *Immunology*, 144:472–485.
- Liu, D., Yao, S., y Wise, G. E. (2006). Effect of interleukin-10 on gene expression of osteoclastogenic regulatory molecules in the rat dental follicle. *European Journal of Oral Sciences*, 114:42–49.
- López, R., Arismendi, M., Sáez, J. C., Godoy, I., y Ocaranza, M. P. (2011). Boldina disminuye la apoptosis miocárdica post isquemia reperusión en la rata. *Rev. Chil. Cardiol*, 30:146–154.
- Luo, Y., Liu, M., Xia, Y., Dai, Y., Chou, G., Wang, Z., y cols. (2010). Therapeutic effect of norisoboldine, an alkaloid isolated from Radix Linderae, on collagen-induced arthritis in mice. *Phytomedicine*, 17:726–731.
- Lv, Q., Qiao, S. M., Xia, Y., Shi, C., Xia, Y. F., Chou, G. X., Wang, Z. T., Dai, Y., Wei, Z. F., y cols. (2015). Norisoboldine ameliorates DSS-induced ulcerative colitis in mice through induction of regulatory T cells in colons. *International Immunopharmacology*, 29:787–797.
- Matsuda, S., Movila, A., Suzuki, M., Kajiya, M., Wisitrasameewong, W., Kayal, R., Hirshfeld, J., Al-dharrab, A., Savitri, I. J., Mira, A., Kurihara, H., Taubman, M. A., Kawai, T., y cols. (2016). A novel method of sampling gingival crevicular fluid from a mouse model of periodontitis. *Journal of Immunological Methods*, 438:21–25.
- Mazzaferro, S., Bagordo, D., De Martini, N., Pasquali, M., Rotondi, S., Tartaglione, L., Stenvinkel, P., y cols. (2021). Inflammation, Oxidative Stress, and Bone in Chronic Kidney Disease in the Osteoimmunology Era. *Calcified Tissue International*, 108:452–460.

- Moezi, L., Yahosseini, S., Jamshidzadeh, A., Dastgheib, M., y Pirsalami, F. (2018). Sub-chronic boldine treatment exerts anticonvulsant effects in mice. *Neurological Research*, 40:146–152.
- Moezi, L., Yahosseini, S., Jamshidzadeh, A., y Pirsalami, F. (2019). Acute Boldine Treatment Induces Anti-convulsant Effects in Mice through its Antioxidant Activity. *Drug Research*, 69:227–233.
- Monasterio, G., Castillo, F., Rojas, L., Cafferata, E. A., Alvarez, C., Carvajal, P., Núñez, C., Flores, G., Díaz, W., Vernal, R., y cols. (2018). Th1/Th17/Th22 immune response and their association with joint pain, imagenological bone loss, RANKL expression and osteoclast activity in temporomandibular joint osteoarthritis: A preliminary report. *Journal of Oral Rehabilitation*, 45:589–597.
- Mondal, J., Patra, M., Panigrahi, A. K., y Khuda-Bukhsh, A. R. (2020). Improved drug carriage and protective potential against Cisplatin-induced toxicity using Boldine-loaded PLGA nanoparticles. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 11:24–36.
- Muthna, D., Cmielova, J., Tomsik, P., y Rezacova, M. (2013). Boldine and related aporphines: From antioxidant to antiproliferative properties. *Natural Product Communications*, 8:1797–1800.
- O'Brien, P., Carrasco-Pozo, C., y Speisky, H. (2006). Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. *Chemico-Biological Interactions*, 159: 1–17.
- Ono, T., Okamoto, K., Nakashima, T., Nitta, T., Hori, S., Iwakura, Y., Takayanagi, H., y cols. (2016). IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells enhance bone regeneration. *Nature Communications*, 7:1–9.
- Pandurangan, A. K., Mohebbali, N., Hasanpourghadi, M., Looi, C. Y., Mustafa, M. R., Mohd Esa, N., y cols. (2016). Boldine suppresses dextran sulfate sodium-induced mouse experimental colitis: NF- κ B and IL-6/STAT3 as potential targets. *BioFactors*, 42:247–258.

- Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D. H., Flemmig, T. F., Garcia, R., Giannobile, W. V., Graziani, F., Greenwell, H., Herrera, D., Kao, R. T., Kerschull, M., Kinane, D. F., Kirkwood, K. L., Kocher, T., Kornman, K. S., Kumar, P. S., Tonetti, M. S., y cols. (2018). Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Periodontology*, 89:S173–S182.
- Qiu, X., Shi, L., Zhuang, H., Zhang, H., Wang, J., Wang, L., Sun, P., Yu, L., y Liu, L., y cols. (2017). Cerebrovascular protective effect of boldine against neural apoptosis via inhibition of mitochondrial bax translocation and cytochrome C release. *Medical Science Monitor*, 23:4109–4116.
- Reiniger, I. W., Da Silva, C. R., Felzenszwalb, I., De Mattos, J. C. P., De Oliveira, J. F., Dantas, F. J. D. S., Bezerra, R. J. A. C., Caldeira-De-Araújo, A., Bernardo-Filho, M., y cols. (1999). Boldine action against the stannous chloride effect. *Journal of Ethnopharmacology*, 68:345–348.
- Santanam, N., Penumetcha, M., Speisky, H., y Parthasarathy, S. (2004). A novel alkaloid antioxidant, Boldine and synthetic antioxidant, reduced form of RU486, inhibit the oxidation of LDL in-vitro and atherosclerosis in vivo in LDLR^{-/-} mice. *Atherosclerosis*, 173:203–210.
- Sato, K., Suematsu, A., Okamoto, K., Yamaguchi, A., Morishita, Y., Kadono, Y., Tanaka, S., Kodama, T., Akira, S., Iwakura, Y., Cua, D. J., Takayanagi, H., y cols. (2006). Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *Journal of Experimental Medicine*, 203:2673–2682
- Shuker, E., Farhood, M., Al-Qudaihi, G., y Fouad, D. (2022). Potential Effects of Boldine on Oxidative Stress, Apoptosis, and Inflammatory Changes Induced by the Methylprednisolone Hepatotoxicity in Male Wistar Rats. *Dose-Response*, 20:1–16.

- Simirgiotis, M. J., y Schmeda-Hirschmann, G. (2010). Direct identification of phenolic constituents in Boldo Folium (*Peumus boldus* Mol.) infusions by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217:443–449.
- Sojod, B., Chateau, D., Mueller, C. G., Babajko, S., Berdal, A., Lézot, F., Castaneda, B., y cols. (2017). RANK/RANKL/OPG signalization implication in periodontitis: New evidence from a RANK transgenic mouse model. *Frontiers in Physiology*, 8:1–12.
- Speisky, H., y Cassels, B. K. (1994). Boldo and boldine: an emerging case of natural drug development. *Pharmacological Research*, 29:1–12.
- Subramaniam, N., Kannan, P., Ashokkumar, K., y Thiruvengadam, D. (2019). Hepatoprotective effect of boldine against diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in wistar rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 33:1–7.
- Takahashi, K., Azuma, T., Motohira, H., Kinane, D. F., y Kitetsu, S. (2005). The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 32:369–374.
- Teng, C. M., Hsueh, C. M., Chang, Y. L., Ko, F. N., Lee, S. S., Liu, K. C. S., y cols. (1997). Antiplatelet effects of some aporphine and phenanthrene alkaloids in rabbits and man. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 49:706–711.
- Tomšík, P., Mičuda, S., Muthná, D., Čermáková, E., Havelek, R., Rudolf, E., Hroch, M., Kadová, Z., Řezáčová, M., Čmielová, J., Živný, P., y cols. (2016). Boldine Inhibits Mouse Mammary Carcinoma In Vivo and Human MCF-7 Breast Cancer Cells In Vitro. *Planta Medica*, 82:1416–1424.
- Tong, B., Yuan, X., Dou, Y., Wu, X., Chou, G., Wang, Z., Xia, Y., Dai, Y., y cols. (2016). Norisoboldine, an isoquinoline alkaloid, acts as an aryl hydrocarbon

receptor ligand to induce intestinal Treg cells and thereby attenuate arthritis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 75:63–73.

- Tsukasaki, M., Komatsu, N., Nagashima, K., Nitta, T., Pluemsakunthai, W., Shukunami, C., Iwakura, Y., Nakashima, T., Okamoto, K., Takayanagi, H., y cols. (2018). Host defense against oral microbiota by bone-damaging T cells. *Nature Communications*, 9:1–11.
- Valdebenito, G.; Molina, J.; Benedetti, S.; Hormazábal, M., y Pavez, C. (2017). *Serie Estudios Para La Innovación FIA. Modelos de negocios sustentables de recolección, procesamiento y comercialización de Productos Forestales No Madereros (PFNM) en Chile.*
- Vernal, R., Chaparro, A., Graumann, R., Puente, J., Valenzuela, M. A., Gamonal, J., y cols. (2004). Levels of Cytokine Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand in Gingival Crevicular Fluid in Untreated Chronic Periodontitis Patients. *Journal of Periodontology*, 75:1586–1591.
- Vernal, R., Díaz-Zúñiga, J., Melgar-Rodríguez, S., Pujol, M., Diaz-Guerra, E., Silva, A., Sanz, M., Garcia-Sanz, J. A., y cols. (2014). Activation of RANKL-induced osteoclasts and memory T lymphocytes by *Porphyromonas gingivalis* is serotype dependant. *Journal of Clinical Periodontology*, 41:451–459.
- Vernal, R., Dutzan, N., Chaparro, A., Puente, J., Valenzuela, M. A., Gamonal, J., 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*, 32:383–389.
- Vernal, R., Dutzan, N., Hernández, M., Chandía, S., Puente, J., León, R., García, L., Valle, I. Del, Silva, A., Gamonal, J., 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 Periodontology*, 77:1772–1780.

- Vernal, R., y Garcia-Sanz, J. (2012). Th17 and Treg Cells, Two New Lymphocyte Subpopulations with a Key Role in the Immune Response Against Infection. *Infectious Disorders - Drug Targets*, 8:207–220.
- Walstab, J., Wohlfarth, C., Hovius, R., Schmitteckert, S., Röth, R., Lasitschka, F., Wink, M., Bönisch, H., Niesler, B., y cols. (2014). Natural compounds boldine and menthol are antagonists of human 5-HT₃ receptors: Implications for treating gastrointestinal disorders. *Neurogastroenterology and Motility*, 26:810–820.
- Wang, C., Dai, Y., Yang, J., Chou, G., Wang, C., Wang, Z., y cols. (2007). Treatment with total alkaloids from Radix Linderae reduces inflammation and joint destruction in type II collagen-induced model for rheumatoid arthritis. *Journal of Ethnopharmacology*, 111:322–328.
- Weaver, C. T., Harrington, L. E., Mangan, P. R., Gavrieli, M., y Murphy, K. M. (2006). Th17: An Effector CD4 T Cell Lineage with Regulatory T Cell Ties. *Immunity*, 24:677–688.
- Witherden, D. A., Watanabe, M., Garijo, O., Rieder, S. E., Sarkisyan, G., Cronin, S. J. F., Verdino, P., Wilson, I. A., Kumanogoh, A., Kikutani, H., Teyton, L., Fischer, W. H., Havran, W. L., y cols. (2012). The CD100 Receptor Interacts with Its Plexin B2 Ligand to Regulate Epidermal $\gamma\delta$ T Cell Function. *Immunity*, 37:314–325.
- Yang, X., Gao, X., Cao, Y., Guo, Q., Li, S., Zhu, Z., Zhao, Y., Tu, P., Chai, X., y cols. (2018). Anti-Inflammatory Effects of Boldine and Reticuline Isolated from *Litsea cubeba* through JAK2/STAT3 and NF- κ B Signaling Pathways. *Planta Medica*, 84:20–25.
- Yang, X. O., Pappu, B., Nurieva, R., Akimzhanov, A., Soon, H., Chung, Y., Ma, L., Shah, B., Panopoulos, A. D., Watowich, S. S., Tian, Q., Jetten, A. M., Dong, C., y cols. (2009). *TH17 lineage differentiation 2008*. 28:29–39.

- Yi, C., Ezan, P., Fernández, P., Schmitt, J., Sáez, J. C., Giaume, C., Koulakoff, A., y cols. (2017). Inhibition of glial hemichannels by boldine treatment reduces neuronal suffering in a murine model of Alzheimer's disease. *Glia*, 65:1607–1625.
- Zagorova, M., Prasnicka, A., Kadova, Z., Dolezelova, E., Kazdova, L., Cermanova, J., Rozkydalova, L., Hroch, M., Mokry, J., Micuda, S., y cols. (2015). Boldine attenuates cholestasis associated with nonalcoholic fatty liver disease in hereditary hypertriglyceridemic rats fed by high-sucrose diet. *Physiological Research*, 64:S467–S476.
- Zahari, A., Cheah, F. K., Mohamad, J., Sulaiman, S. N., Litaudon, M., Leong, K. H., Awang, K., y cols. (2014). Antiplasmodial and antioxidant isoquinoline alkaloids from *Dehaasia longipedicellata*. *Planta Medica*, 80:599–603.
- Zhao, H., Xu, H., Qiao, S., Lu, C., Wang, G., Liu, M., Guo, B., Tan, Y., Ju, D., Xiao, C., y cols. (2017). Boldine isolated from *Litsea cubeba* inhibits bone resorption by suppressing the osteoclast differentiation in collagen-induced arthritis. *International Immunopharmacology*, 51:114–123.

9. ANEXO

Certificado del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA)



Santiago, a 25 de junio de 2018

Certificado n°: 18173-ODO-UCH

CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica que el Proyecto de Investigación titulado: **"Rol de la citoquina IL-35, el ácido retinoico y los exosomas derivados de linfocitos T reguladores en la resorción del hueso de soporte dentario durante la periodontitis experimental, mediante la modulación del balance Th17/Treg."**, del Investigador Responsable **Dr. Rolando Vernal Astudillo**, del Laboratorio de Biología Periodontal, Departamento de Odontología Conservadora, Facultad de Odontología, Universidad de Chile, no se plantean acciones en sus procedimientos que contravengan las normas de Bioética de manejo y cuidado de animales, así mismo la metodología experimental planteada satisface lo estipulado en el Programa Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.

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

Se otorga la presente certificación para el uso de **430** ratones *Mus musculus* cepa Balb/c, C57BL/6 y B6.129S7-Rag1^{tm1.1Mom/J}, provenientes de la Plataforma Experimental Bioterio, Facultad de Odontología, Universidad de Chile: Balb/c, C57BL/6; y The Jackson Laboratory los animales de cepa B6.129S7-Rag1^{tm1.1Mom/J}, desde julio de 2018 hasta julio de 2022, tiempo estimado de ejecución del estudio, el cual será financiado por Proyecto Fondecyt Regular Nro. **1181780**.

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

Dr. Cristián Ugaz Ruiz
Director Ejecutivo
CICUA - VID
Universidad de Chile



MV Pía Ocampos Toro
Presidente Subrogante
CICUA - VID
Universidad de Chile