



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

**“EXPRESIÓN DEL GEN PARA EL RECEPTOR GP130 EN TEJIDO GINGIVAL  
MURINO DURANTE HOMEOSTASIS Y PERIODONTITIS EXPERIMENTAL”**

**Franco Bruno Nicolás Miquio Portell**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

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

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dr. Nicolás Raúl Dutzan Muñoz**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Dra. Marion Elizabeth Arce Paniagua**

**Dra. Loreto Andrea Abusleme Ramos**

**ASESORES**

**Dr. Marcelo Rodríguez Peña**

**Adscrito a Proyecto FONDECYT Iniciación 11180389**

**Santiago – Chile  
2022**



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

**“ EXPRESIÓN DEL GEN PARA EL RECEPTOR GP130 EN TEJIDO GINGIVAL  
MURINO DURANTE HOMEOSTASIS Y PERIODONTITIS EXPERIMENTAL ”**

**Franco Bruno Nicolás Miquio Portell**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

**REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE**

**CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dr. Nicolás Raúl Dutzan Muñoz**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Dra. Marion Elizabeth Arce Paniagua**

**Dra. Loreto Andrea Abusleme Ramos**

**ASESORES**

**Dr. Marcelo Rodríguez Peña**

**Adscrito a Proyecto FONDECYT Iniciación 11180389**

**Santiago – Chile  
2022**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia por permitirme llegar hasta aquí y por el apoyo que me han brindado durante mi vida.

A Paula Muñoz y su familia por toda su ayuda, cariño y comprensión durante este proceso, sin ella esto hubiera sido mucho más difícil.

A mis amig@s Odontos, Bachiodontos y Bachis por todos los momentos que vivimos durante mi paso por la universidad.

A mis amigos “Implacables”, y a las “Ratas Judías”.

A mi tutor principal de tesis: Dr. Nicolás Dutzan, por la buena disposición, y sobre todo paciencia que me tuvo y apoyo durante el desarrollo del trabajo de investigación.

A mis tutoras asociadas y asesor: Dra. Marion Arce, Dra. Loreto Abusleme y Dr. Marcelo Rodríguez, también por su apoyo en todo momento y buena disposición.

A mis compañeros tesistas que siempre me ayudaron.

# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b>	<b>6</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
<b>3. MARCO TEÓRICO</b>	<b>8</b>
3.1 IMPORTANCIA DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL	8
3.2 RESPUESTA INMUNE Y PERIODONTITIS	9
3.3 INTERLEUQUINA 6	10
3.4 RECEPTOR DE CITOQUINAS GP130 Y SU GEN <i>IL6ST</i>	11
3.5 MODULACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE <i>GP130/IL6ST</i>	13
3.6 SEÑALIZACIÓN DE <i>IL6ST/GP130</i>	15
3.7 RECEPTOR DE IL-6 (IL-6R)	16
3.8 SEÑALIZACIÓN DE <i>GP130/STAT3</i> EN PERIODONTITIS	17
3.9 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
<b>4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>21</b>
4.1 HIPÓTESIS	21
4.2 OBJETIVO GENERAL	21
4.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
<b>5. METODOLOGÍA</b>	<b>22</b>
5.1 ANIMALES	22
5.2 MODELO DE PERIODONTITIS INDUCIDA POR LIGADURA	22
5.3 EXTRACCIÓN DE ARN	23
5.4 CUANTIFICACIÓN DE ARN	24
5.5 TRANSCRIPCIÓN REVERSA	24
5.6 PCR EN TIEMPO REAL (RT- QPCR)	26
5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	27

<b>6. RESULTADOS</b>	<b>29</b>
6.1 EXPRESIÓN Y EXPRESIÓN RELATIVA DEL GEN IL6ST	29
<b>7. DISCUSIÓN</b>	<b>31</b>
7.1 INTERNALIZACION DE GP130	32
7.2 RECICLAJE DE GP130 Y IL6R	34
7.3 PROMOCIÓN DEL GEN <i>IL6ST</i> POR STAT	36
7.4 EXPRESIÓN DE IL6ST EN SALUD Y PERIODONTITIS	38
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>41</b>
8.1 CONSIDERACIONES	41
<b>9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>42</b>
<b>10. ANEXOS</b>	<b>50</b>

## 1.RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** La periodontitis es una enfermedad oral inflamatoria crónica altamente prevalente a nivel mundial y constituye una de las principales causas de pérdida de dientes en la población. Esta condición se caracteriza por la destrucción de los tejidos de soporte de los dientes la cual es mediada por la respuesta inmune y está asociada a un aumento de citoquinas pro-inflamatorias como las de tipo IL-6. La señalización de estas citoquinas mediante el receptor GP130 activa la vía mediada por STAT3, permitiendo la diferenciación de linfocitos Th17, los que son claves en la destrucción de tejidos periodontales. *IL6ST* es el gen que codifica para el receptor GP130 del cual existen pocas investigaciones que analicen su expresión en periodontitis. El objetivo de este estudio fue determinar la expresión del gen *Il6st* que codifica para GP130 en tejido gingival en salud y durante periodontitis experimental.

**METODOLOGÍA:** Se obtuvieron muestras de tejido gingival sano y con periodontitis inducida por el método de ligadura en ratones C57BL6. La expresión génica de las muestras fue determinada por RT-qPCR. Para calcular los niveles relativos de expresión génica se utilizó el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas si el valor de  $p < 0,05$ .

**RESULTADOS:** Observamos que en el grupo con periodontitis experimental el gen *Il6st* se expresó 0.102 veces más en comparación al grupo sano, por lo que no existen diferencias significativas en la expresión del gen.

**CONCLUSIONES:** Nuestro estudio sugiere que en tejido gingival la regulación de la disponibilidad del receptor no estaría ligada a la expresión del gen *Il6st*. Sin embargo, recientemente se ha observado que citoquinas presentes en la periodontitis, como IL-6, podrían estar modulando esta disponibilidad a través del aumento del reciclaje de GP130 y sus receptores asociados, proporcionando un mecanismo de regulación que no sería dependiente del nivel de expresión del gen.

**PALABRAS CLAVES:** Periodontitis, GP130, *Il6st*, IL-6

**FINANCIAMIENTO:** FONDECYT iniciación 11180389

## 2. INTRODUCCIÓN

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica multifactorial asociada a una disbiosis del biofilm subgingival y caracterizada por la destrucción progresiva de los tejidos de soporte del diente (Papapanou y cols., 2018) pudiendo llevar a la pérdida de éstos lo que reduce la calidad de vida de los individuos que la padecen (Abusleme y cols., 2013; Chapple, 2014).

A través de los años, el tratamiento de la periodontitis se ha enfocado en la reducción de la acumulación de la placa bacteriana local mediante procedimientos mecánicos. Sin embargo, aproximadamente el 20%-25% de los individuos en etapas avanzadas de la enfermedad y sometidos a tratamiento y mantención, continúan perdiendo tejido periodontal y dientes (Kornman, 2018). Por esta razón se han planteado nuevos enfoques que buscan complementar el tratamiento convencional, centrados en las vías de señalización implicadas en la respuesta inmunológica e inflamatoria de los tejidos (Hajishengallis, 2014).

Se ha descrito que algunas células pertenecientes a la inmunidad adaptativa tienen una función importante en la patogénesis de la enfermedad periodontal (Silva y cols., 2015). Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> del subtipo Th17 desempeñan un papel central tanto en la progresión como en el control de la enfermedad. En este proceso participan diferentes citoquinas como interleuquina 6 (IL-6), IL-23, IL-21, cuyos efectos están mediados por la activación vía de señalización JAK/STAT. Recientemente se ha demostrado que en tejidos gingivales IL-6 es necesaria para esta diferenciación, además de la acumulación homeostática y patológica de las células Th17 (Dutzan y cols., 2017; Dutzan y cols., 2018). Un componente crítico para la función efectiva de IL-6 es el receptor de membrana GP130 que permite el inicio de la cascada de señalización de esta citoquina activando el factor de transcripción STAT3 perteneciente a la vía JAK/STAT (Taga y cols., 1997; Lokau y Garbers, 2018).

### **3. MARCO TEÓRICO:**

#### **3.1 Importancia de la periodontitis**

Las enfermedades bucodentales se encuentran entre los problemas de salud más prevalentes a nivel mundial, provocando un alto costo sanitario, además de reducir en gran medida la calidad de vida de los afectados (Peres y cols., 2019).

La periodontitis es una enfermedad crónica inflamatoria multifactorial asociada a una disbiosis de la biopelícula subgingival (Papapanou y cols., 2018), esta compromete la integridad de los tejidos de soporte de los dientes, es decir, encía, ligamento periodontal y hueso alveolar (Hajishengallis, 2015). Se ha demostrado que esta enfermedad puede influir en otras patologías inflamatorias tanto a nivel local como a nivel sistémico (Hajishengallis, 2015), siendo asociada de forma significativa e independiente con otros problemas de salud, tales como: diabetes tipo II, artritis reumatoide, aterosclerosis, obesidad, enfermedad renal crónica y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Chapple, 2014). Además, podría aumentar el riesgo de cáncer y complicaciones asociados al embarazo (Hajishengallis, 2015).

El tabaquismo y el mal control de la diabetes son factores de riesgo bien establecidos para la periodontitis, sin embargo, la respuesta específica del hospedero a la presencia bacteriana podría ser un factor determinante en la susceptibilidad a la periodontitis, aumentando la severidad de la enfermedad. (Van Dyke y Sheliesh, 2005).

En cuanto a la prevalencia de la periodontitis, se ha visto que aumenta progresivamente con la edad, y elevándose bruscamente entre los 30 a 40 años (Tonetti y cols., 2017). De acuerdo con la Academia Americana de Periodoncia (AAP) y la Federación Europea de Periodoncia (EFP), la prevalencia en adolescentes es de 75,6% aumentando en adultos llegando al 99%. En Chile un 93,45% de los adultos jóvenes y un 97,58% de los adultos mayores presentan

signos de destrucción en los tejidos periodontales, además, la pérdida de dientes asociada a esta patología alcanza un promedio de 6,51 y 15,81 respectivamente (Gamonal y cols., 2010; Morales y cols., 2021).

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

La disbiosis que se presenta en la periodontitis produce una alteración de la homeostasis tisular y de la respuesta inmune (Lamont y Hajishengallis, 2015), a su vez, induce la producción de citoquinas y quimioquinas por células del epitelio gingival, aumentando la permeabilidad de los capilares gingivales y la quimiotaxis de neutrófilos polimorfonucleares a través del epitelio de unión y el surco gingival, provocando un desbalance en la respuesta inmune innata y adaptativa del hospedero (Silva y cols., 2015). Este estado inflamatorio crónico junto con una respuesta inmunitaria descontrolada contribuirían a la destrucción de los tejidos periodontales (Hajishengallis, 2014).

Se ha descrito que algunas células pertenecientes a la inmunidad adaptativa tienen una función importante en la patogénesis de la enfermedad periodontal (Silva y cols., 2015). Los linfocitos T, específicamente las células T CD4<sup>+</sup> desempeñan un papel central en la progresión de la enfermedad (Dutzan y cols., 2017).

Las células T CD4<sup>+</sup> vírgenes pueden diferenciarse en subconjuntos efectores T-colaboradores o helper (Th) como lo son Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, células T auxiliares foliculares (Tfh) y T reguladoras (Treg), que tendrán roles únicos en la inmunidad protectora, enfermedades, infecciones y trastornos autoinmunes e inflamatorios (Kane y cols., 2014).

Los linfocitos Th17 son mediadores claves en la inmunidad de barrera. Este subconjunto de células Th participan tanto en la mediación de la inmunidad protectora como en la inflamación gingival (Dutzan y cols., 2017). Una respuesta exagerada de los linfocitos Th17 es perjudicial para los tejidos periodontales ya que

se ha demostrado que son esenciales para la pérdida ósea y el daño tisular en periodontitis (Moutsopoulos y cols., 2014). La diferenciación de linfocitos Th17, ocurre a través de la participación de distintas citoquinas como las de tipo IL-6, cuyos efectos están mediados principalmente por la activación de cascadas de señalización como la vía de las quinasas de Jano (JAK) y Transductor de Señales y Activador de Transcripción (STAT). Estas proteínas actúan en el núcleo como transductoras de señales y factores de transcripción, participando en procesos de proliferación, inmunidad y diferenciación celular (O'Shea y cols., 2015). Recientemente se ha demostrado que en tejidos gingivales, tanto en procesos homeostáticos como patológicos, IL-6 es necesaria para la activación de STAT3 permitiendo la diferenciación y acumulación de estos linfocitos Th17 (Dutzan y cols., 2017; Dutzan y cols., 2018).

### **3.3 Interleuquina 6:**

IL-6 forma parte de una familia de citoquinas que además incluye IL-11, IL-31, factor inhibidor de la leucemia (LIF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), oncostatina M (OSM), IL-27 y Neuropoietina (NP), Cardiotropina (CLC) y Cardiotropina-1 (CT-1) (Lokau y gabers, 2019). Se ha determinado que esta familia es responsable de la activación de genes implicados en la diferenciación, supervivencia, apoptosis y proliferación celular. Además, tienen propiedades pro y antiinflamatorias y son actores importantes en la hematopoyesis, así como en la respuesta inmune e inflamatoria del organismo (Heinrich y cols., 2003).

IL-6 es una de las citoquinas más estudiadas de esta familia, esta participa en varios procesos inflamatorios y es responsable de la inducción de una amplia gama de proteínas de fase aguda (Heinrich y cols., 1990). Además, en combinación con factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ), es indispensable para la diferenciación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes en Th17 (Korn y cols., 2009). Por otro lado, IL-6 también inhibe la diferenciación de Treg inducida por TGF- $\beta$  (Bettelli y cols., 2006), y se conoce que la regulación positiva del equilibrio Th17/ Treg produce alteraciones

en la tolerancia inmunológica y está patológicamente involucrada en el desarrollo de enfermedades autoinmunes e inflamatorias crónicas (Kimura y Kishimoto, 2010).

En la cavidad oral, IL-6 juega un papel importante en la respuesta inflamatoria del periodonto contribuyendo al desarrollo de periodontitis. Estudios han demostrado la presencia de esta citoquina en células endoteliales y macrófagos de sujetos afectados por periodontitis, como también un aumento en la expresión de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de esta citoquina en células gingivales mononucleares (Fujihashi y cols., 1993; Takahashi y cols., 1994; Nidali y cols., 2019; Naruishi y Nagata, 2018).

El lipopolisacárido (LPS) derivado de *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), una de las bacterias más asociadas con la destrucción de tejidos periodontales e IL-1 (citoquina pro inflamatoria asociada con periodontitis) aumentan significativamente la producción de IL-6 en los fibroblastos gingivales humanos (Naruishi y Nagata, 2018). Se sugiere también, que los altos niveles de IL-6 en el tejido periodontal inflamado contribuyen a la desregulación del sistema inmunológico, que luego promueve la destrucción de tejidos debido a la inducción de la diferenciación de células T vírgenes hacia el fenotipo Th17 (Glowczyk y cols., 2017).

Un componente crítico para la función efectiva de IL-6 es el receptor de membrana GP130 que forma complejos funcionales que permiten el inicio de la cascada de señalización de esta citoquina (Taga y cols., 1997).

### **3.4 Receptor de citoquinas GP130 y su gen *IL6ST***

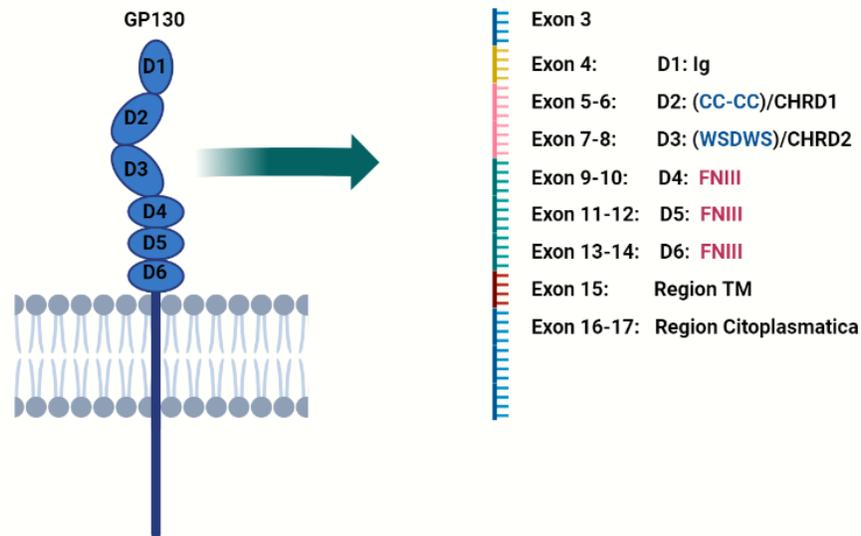
GP130 es un receptor transmembrana ubicuo común para la familia de citoquinas de IL-6, es el miembro principal de la familia de receptores “tall”, consta de 918 aminoácidos y seis dominios: un dominio similar a Ig N-terminal (D1); un módulo de unión a citoquinas o región de homología de unión a citoquinas (D2-D3); y tres dominios contiguos, proximales a la membrana, de fibronectina tipo III (FNIII) (D4-D6) que definen la familia de receptores (Xu y cols., 2010).

La señalización mediada por GP130 es responsable de la regulación de una amplia variedad de tejidos y sistemas, incluyendo hematopoyesis, sistema nervioso, hueso, corazón, tejido adiposo, testículos, hígado y músculo (Kishimoto y cols., 1995). Sin embargo, la faceta mejor caracterizada de este receptor y sus citoquinas asociadas es la capacidad de promover o suprimir la inflamación (Silver y Hunter, 2010).

El gen *IL6ST* (*GP130*) que codifica para este receptor, comprende 17 exones y 16 intrones. La proteína GP130 se codifica entre los exones 3 y 17 (Figura 1) y cada subdominio del receptor está codificado por un conjunto de exones (Szalai y cols., 2000). La secuencia completa del ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) de la GP130 tiene un marco de lectura abierto capaz de codificar 918 aminoácidos, siendo los 22 primeros un péptido señal (Hibi y cols., 1990). Así, La GP130 madura consta de una región extracelular de 597 aminoácidos, que comprenden los dominios similares a la fibronectina tipo III (D1 a D6), además de una región de transmembrana de 22 aminoácidos que no sólo posee una función de anclaje, sino que también es necesaria para la transducción de señales y determina la interacción con miembros de la familia JAK, y finalmente una región citoplásmica de 277 aminoácidos (Kim y Baumann, 1997; Szalai y cols., 2000).

Hay dos motivos bien conservados en la región citoplasmática próxima a la membrana, denominadas box1 (codón 652-659) y box2 (codones 691-702). Estudios revelaron que las quinasas JAK interactúan con la región box1 y que la región box2 es importante para la regulación positiva de la síntesis de ADN mediada por GP130. La parte distal de la región citoplasmática incluye el sitio box3 (codones 761-771) que atrae el dominio SH2 de STAT3. (Szalai y cols., 2000)

La inactivación dirigida del gen *Il6st* da como resultado un fenotipo murino prenatal letal, incluyendo defectos en la función cardíaca y hematológica (Yoshida y cols., 1996). Además, la activación crónica de la señalización de GP130 da como resultado hipertrofia cardíaca (Hirota y cols., 1999).



**Figura 1: Organización de los exones en el ARNm de la proteína GP130 en humanos.** Cada color indica los exones de codificación, exón 3 como péptido señal, se indican los residuos de cisteína conservados (CC; en el exón 5 y 6) y los motivos WSDWS (en el exón 8). Abreviaturas: Ig: dominio similar a inmunoglobulina; FNIII: dominio similar a la fibronectina tipo III; CHR D1,2 = región de homología de unión a citoquinas 1 y 2; TM: región transmembrana. Extraído de Szalai y cols., 2000

### **3.5 Modulación en la expresión de GP130/IL6ST**

Se ha descrito que varios tipos celulares y/o tejidos presentan una variación en la expresión de GP130 (Tabla 1 y 2) en presencia de moléculas específicas como citoquinas, factores inflamatorios y/o hormonas y se ha demostrado que esto podría tener un impacto significativo en una gran cantidad de respuestas biológicas debido a la amplia gama de funciones de las citoquinas de tipo IL-6 (O'Brien y cols., 2000).

Algunos de estos estudios como el de Falus y cols (1992), evaluaron tanto la presencia del receptor en la membrana superficial como el nivel de expresión de *IL6ST*, encontrando un paralelismo entre la aparición de la proteína en la membrana superficial y la cantidad de ARNm, indicando que moléculas como la

Dexametasona, el TPA y el DB-CAMP son capaces de actuar a nivel transcripcional (o al menos pretraduccional), en la expresión de GP130 en algunos tipos celulares humanos (Falus y cols., 1992). A su vez, como podemos ver en la Tabla 1, IL-6 es capaz de inducir un aumento del ARNm de GP130 en algunos tipos celulares humanos como: monocitos, células epiteliales y células pertenecientes a hepatoma (HepG2, Hep3B) (Schoester y cols., 1994; Snyers y Content, 1992; Schooltink y cols., 1992), además de producir este mismo efecto en varios tipos de tejido murino (Tabla 2), (Saíto y cols., 1992).

Expresión de GP130/ <i>IL6ST</i> Tipos celulares humanos	IL-6	Dex	TNF- $\alpha$	IL-1	IL-1 $\beta$	IL-3	LPS	IL-6Rs + IL-6	IL-6 + Dex
Monocitos	↑						-		
Epitelio Humano UAC	↑		↑	↑					↑
HepG2	↑								↑
Hep3B	↑		↑	↑					↑
HGFs					↑			-	
Macrofagos THP-1								↑	
Basófilos Perifericos	-					↑			

**Tabla 1: Cuadro resumen sobre expresión *IL6ST* y las señales que la inducen;** investigaciones anteriores relacionadas al estudio de la modulación en la expresión de *IL6ST* en tipos celulares humanos (Hep3B y HepG2 = líneas celulares de hepatoma, (HGF = fibroblastos gingivales humanos), (Dex = dexametasona, color gris = sin cambios en la expresión) Extraído de Schoester y cols., 1994; Snyers y Content, 1992; Schooltink y cols., 1992; Falus y cols., 1994; Falus y cols., 1992; Bauer y cols., 1989; Sawada y cols., 2013.

Expresión de Gp130 / Ratón	IL-6	IL-6s	TNF- $\alpha$	17 $\beta$ -estradiol (E2),	Dihydrotestosterone (DHT),	Parathyroid hormone	1,25-(OH)2D3
Linfocitos T Esplénicos	↓	↓					
Tejido Bazo, Riñón, Corazón, Hígado	↑	↑					
PC12 / Neuronas Sinápticas			↑ t,d				
Osteoblastos/Médula Ósea				↓	↓	↑	↑

**Tabla 2: Cuadro resumen sobre expresión *Il6st* y las señales que la inducen;** investigaciones anteriores relacionadas al estudio de la modulación en la expresión de *Il6st* en tipos celulares murinos (t,d = tiempo y dosis dependiente). Extraído de Wang y cols., 1998; Saïto y cols., 1992; Marz y cols., 1996; O'Brien y cols., 2000.

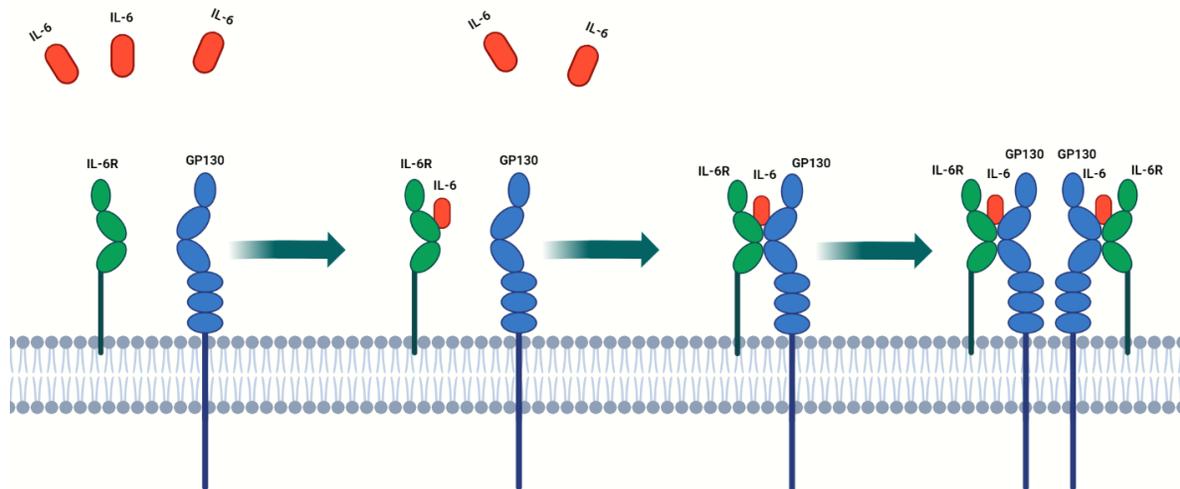
En periodontitis existe un aumento de citoquinas pro-inflamatorias como IL-6 además de IL-1 $\beta$ , y Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Chavez de Souza y cols., 2011), esto podría modular la expresión de GP130 permitiendo un aumento de la señalización de esta citoquina.

### **3.6 Señalización de IL-6/GP130**

Debido a que GP130 se expresa de forma ubicua en el organismo, es necesaria la participación de otros receptores para que la transducción de señal se realice exitosamente (Figura 2), de lo contrario IL-6 podría activar todas las células simultáneamente (Lokau y Gabers., 2019). Para esto, GP130 debe asociarse a una serie de receptores de citoquinas específicos como por ejemplo IL-6R $\alpha$  e IL-11R $\alpha$  (Silver y Hunter., 2010).

Para que IL-6 pueda ser utilizada, es necesaria la dimerización de GP130 junto con la participación del receptor específico para IL-6 (IL-6R), formando un complejo de

señalización hexamérico que consta de 2 moléculas de IL-6, IL-6R y GP130 cada una (Ward y cols., 1994) (Figura 2). Es importante señalar que IL-6R no posee un dominio intracelular, por lo tanto, la unión de la IL-6 con su receptor no es suficiente para que la señalización se inicie y debe asociarse posteriormente con GP130 para lograr la activación celular (Ramírez y cols., 2010).



**Figura 2: Participación del receptor específico para interleuquina-6 (IL-6R) y dimerización del complejo.** IL-6R luego de unirse a su ligando se asocia con GP130, luego este complejo se dimeriza, formando una estructura hexamérica, que me permitirá desencadenar la cascada de señalización. Modificado de Boulanger y cols., 2003

### **3.7 Receptor de IL-6 (IL-6R)**

IL-6R es expresado principalmente por hepatocitos, monocitos, macrófagos y algunos linfocitos, por lo que los demás tipos celulares no deberían responder a IL-6. Sin embargo, IL-6R también puede encontrarse en forma soluble (sIL-6R) y permitir que otros tipos celulares como células endoteliales, de músculo liso, neurales y hematopoyéticas, entre otras, respondan a IL-6, (Sheller y Rose-John, 2006). Esta forma soluble natural se encuentra en varios fluidos corporales y se produce debido a proteólisis limitada de la proteína que conduce a su liberación de

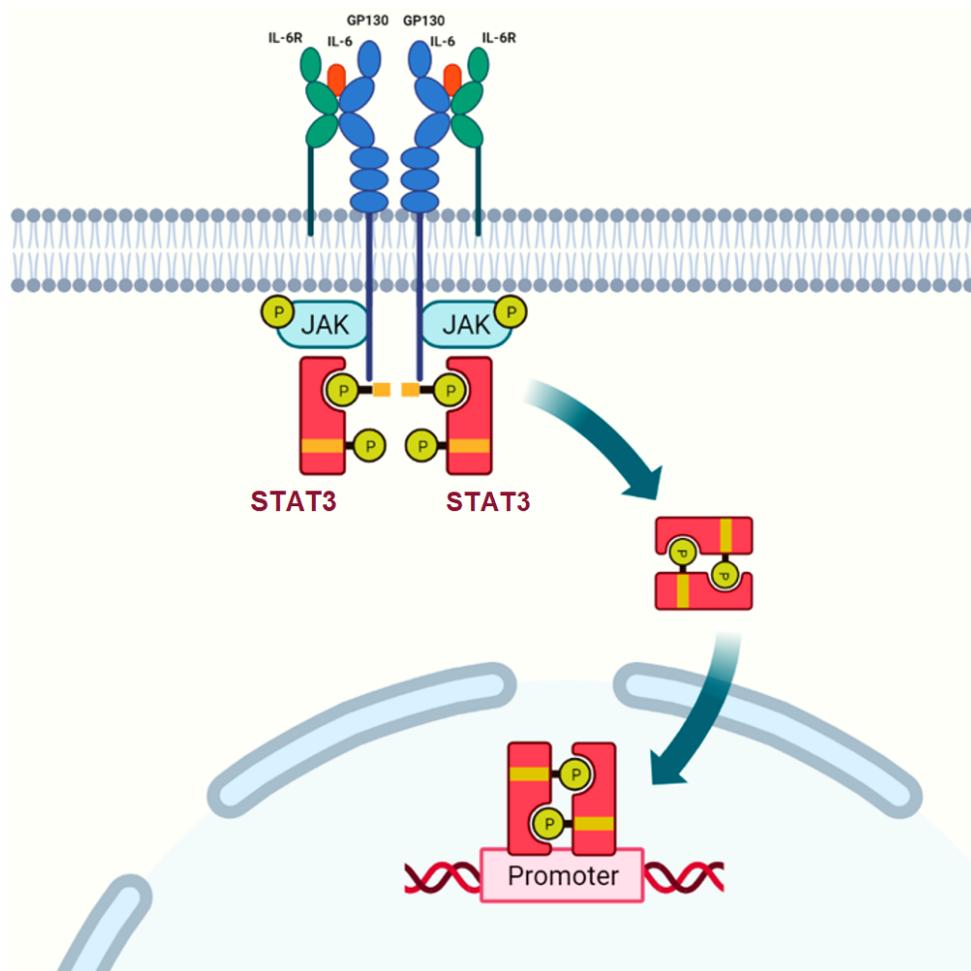
la membrana celular o por medio de un empalme alternativo del gen que codifica para IL-6R (Sheller y cols., 2006).

Debido a la ubicua expresión de GP130, el sIL-6R junto con IL-6 podrían estimular a una amplia variedad de células del cuerpo independientemente de si expresan el IL-6R unido a la membrana o no (Taga, 1989). Este proceso se ha denominado trans-señalización (Rose-John y Heinrich, 1994). La trans-señalización de la IL-6 le confiere a esta citoquina la capacidad de desencadenar respuestas en una amplia variedad de células (Simon y Jones, 2005).

En lesiones apicales la trans-señalización de IL-6 ha demostrado inducir citoquinas relacionadas con linfocitos Th1 y Th17 en fibroblastos del ligamento periodontal humano, lo que contribuiría a explicar el fenotipo destructivo del hueso (Hernández y cols., 2018).

### **3.8 Señalización de GP130 y Periodontitis**

Las vías de señalización intracelular mediadas por ligando de GP130 incluyen la activación de 4 vías diferentes: las quinasas de Jano (JAK) / transductor de señales y activador de la transcripción (STAT), la fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K), proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), y las cascadas Src/proteína 1 asociada a los síes (YAP1). Sin embargo, la vía más utilizada por esta familia de citoquinas es JAK/STAT (Lokau y Gabers, 2019). Específicamente, la unión de citoquinas como IL-6 a este receptor va a activar principalmente la quinasa JAK1, que interactúa y activa a STAT3 a través de la fosforilación de un residuo de tirosina (Tyr705) (Figura 3) (Lokau y Garbers, 2018). La activación de STAT3, permitiría la diferenciación de los linfocitos Th17 y con esto la producción y liberación de citoquinas efectoras como IL-17A, IL17F e IL-21 (Kane y cols., 2014) potenciando reacciones inflamatorias a través de mediadores derivados de fibroblastos gingivales durante periodontitis (Takahashi y cols., 2005). Además de la acumulación patológica de estas células, participando en la destrucción del tejido periodontal y del hueso alveolar (Dutzan y cols., 2018; Dutzan y Abusleme, 2019).



**Figura 3: Representación esquemática de la señalización de IL-6.** Estructura de señalización hexamérica compuesta por 2 moléculas de GP130, IL-6 y IL-6R, que inicia la cascada de señalización JAK1/STAT3. Modificado de Boulanger y cols., 2003.

En periodontitis experimental se ha determinado que existe activación de STAT3 en tejidos gingivales de ratas (Chavez de Souza y cols., 2011) junto con un aumento de inflamación y de citoquinas pro-inflamatorias como IL-6 además de IL-1  $\beta$ , y Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Chaves de Souza y cols., 2013). Sin embargo, existen escasas investigaciones sobre el comportamiento del receptor GP130, su gen codificante *IL6ST* y la expresión de este en periodontitis, es por esto

que desarrollar el conocimiento sobre este receptor y la expresión de su gen en salud y en periodontitis nos ayudaría a comprender de mejor manera el proceso de señalización involucrado en la destrucción del tejido periodontal.

### **3.9 Planteamiento del problema:**

La periodontitis es una enfermedad prevalente a nivel mundial, la presencia de esta enfermedad no solo puede ocasionar alteraciones a nivel local, sino también a nivel sistémico y está asociada a otras enfermedades crónicas inflamatorias graves como pueden ser la artritis reumatoide, aterosclerosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica entre otras.

La diferenciación de los linfocitos Th17 es crucial en la destrucción de tejidos que caracteriza a esta enfermedad. Para que esto ocurra, se requiere la presencia de varias moléculas que mediarán este proceso. Se ha determinado que IL-6 es necesaria para la activación y acumulación patológica de estos linfocitos, a través de la vía de señalización JAK1/STAT3. Sin embargo, IL-6 debe unirse a un receptor de interleuquina ya sea soluble (sIL-6R) o propio (IL-6R) de la membrana, y estos a su vez asociarse con el receptor GP130 que formará un complejo hexamérico con 2 moléculas de cada uno (IL-6, IL-6R, gp130), permitiendo así la activación de la cascada de señalización.

Estudios anteriores han demostrado que la expresión de GP130 puede variar y alterar la respuesta celular dependiendo del estado de activación de la célula o en presencia de otras moléculas, además de jugar un papel crucial en los procesos moleculares asociados a la periodontitis.

Debido a lo planteado anteriormente es importante identificar y caracterizar GP130, debido a su carácter ubicuo, inducible y determinante para la transducción de señal de las citoquinas de la familia de IL-6, que son claves para la patogénesis de la enfermedad periodontal. Estos estudios podrían producir una mejor comprensión de esta enfermedad y sus procesos moleculares.

## **4. HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

### **4.1 Hipótesis.**

-En tejidos gingivales inflamados durante periodontitis experimental hay una mayor expresión del gen *Il6st* que codifica para el receptor GP130 que en tejidos gingivales sanos.

### **4.2 Objetivo General**

-Evaluar la expresión del gen *Il6st* en tejidos gingivales sanos e inflamados durante periodontitis experimental.

### **4.2 Objetivos específicos**

-Detectar la expresión del gen *Il6st* en tejidos gingivales murinos sanos.

-Detectar la expresión del gen *Il6st* en tejidos gingivales murinos durante periodontitis experimental.

## **5. METODOLOGÍA.**

El presente anteproyecto se encuentra adscrito al proyecto FONDECYT Iniciación 11180389 (Anexo 1).

### **5.1 Animales:**

Las muestras de tejido gingival que se analizaron en esta tesis provinieron de experimentos que se realizaron en 13 ratones *Mus musculus*, cepa C57BL/6. El manejo de éstos y todas las intervenciones se realizaron con la aprobación del Comité institucional de cuidado y uso de animales (CICUA) (Anexo 2), Universidad de Chile. Se obtuvieron ratones C57BL/6 libres de patógenos específicos de la “Plataforma Experimental de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile”. Los animales se utilizaron entre las 10 y las 15 semanas de edad. Los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo con los protocolos aprobados por el CICUA.

### **5.2 Modelo de periodontitis inducida por ligadura:**

Para inducir la periodontitis experimental, nos basamos en el procedimiento desarrollado por Abe y Hajishengallis (Abe y Hajishengallis, 2013), en el cual se situó una ligadura (seda 5-0) alrededor del segundo molar superior izquierdo de 7 ratones, de esta manera la ligadura promovió la acumulación de placa con la subsecuente inflamación gingival. Posteriormente fueron sometidos a eutanasia al día 7 procediendo a recolectar la mucosa gingival para su posterior análisis. Las 6 muestras control se obtuvieron a partir de un pool de 3 tejidos de diferentes ratones no ligados.

El tejido gingival inflamado y no inflamado fue diseccionado de forma estandarizada con un bisturí de hoja 15, obteniendo el tejido que rodea los molares y la ligadura. Una vez obtenidas las muestras fueron congeladas en RNAlater (ThermoFisher Scientific, USA) y mantenidas a -80° C hasta su procesamiento.

### **5.3 Extracción de ARN:**

Las muestras fueron descongeladas a una temperatura de 4°C realizando posteriormente la extracción de ARN total de los tejidos gingivales usando reactivos de aislamiento de ARN “TRIzol” (Thermo Fisher Scientific, USA). Se colocó 1ml de reactivo “TRIzol™” en los tubos de homogenización para luego agregar las muestras de tejido cuidadosamente. Posteriormente fueron colocadas en el homogeneizador *BeadBug* (Benchmark Scientific, USA) a máxima velocidad (4000rpm). Luego los tubos fueron colocados durante 3 minutos en hielo para repetir el proceso de homogeneización a máxima velocidad por 15 segundos. Posteriormente las muestras fueron incubadas durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación completa del complejo núcleo proteico. Luego se añadió 0,2 ml de cloroformo en cada tubo y se agitaron. Se incubaron las muestras por 2 a 3 minutos para luego ser centrifugadas durante 15 minutos a 12.000 rpm a 4°C, donde se obtuvo una fase acuosa que contenía el ARN la cual se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf libre de RNasas (1,5ml) teniendo cuidado de inclinar el tubo en 45° antes de pipetear la solución. Se agregó un volumen de Cloroformo equivalente a la fase acuosa de cada tubo, después se agitó por 30 segundos en el vórtex y se centrifugó durante 2 minutos a 14.000 rpm. Con cuidado se transfirió la nueva fase acuosa a un nuevo tubo Eppendorf evitando transferir cualquier capa orgánica o de interface al momento de pipetear. Luego se añadieron 0,5ml de Isopropanol en cada tubo por cada ml de “TRIzol™” añadido al inicio. Luego se volvieron a incubar durante 10 minutos a 4°C y centrifugar por 10 minutos a 12.000 rpm a 4°C. De ésta solución obtenida se deshecho el sobrenadante con una micropipeta y se resuspendió el sedimento en 1 mL de etanol al 75% para luego agitar las muestras brevemente en el Vórtex y centrifugar durante 5 minutos 7500 rpm a 4°C para luego volver a desechar el sobrenadante con una micropipeta y dejar cada uno de los tubos Eppendorf boca abajo para secar al aire el sedimento de ARN durante 5 a 10 minutos. Finalmente se suspendió el sedimento de ARN en 20µl de agua libre de RNasas pipeteando hacia arriba y abajo para homogeneizar la

solución para luego incubar en Thermo block a 60°C durante 10 minutos. Los 13 tubos fueron depositados en hielo para inmediatamente proceder a la cuantificación del ARN.

#### **5.4 Cuantificación de ARN:**

Con la finalidad de evaluar la pureza y cantidad de ARN extraído se realizó la cuantificación de ARN con el Espectrofotómetro “NanoDrop” (ThermoFisher Scientific, USA) evaluando la absorbancia a 260 nm y con el coeficiente 260/230 respectivamente. Se utilizó 1µl de cada muestra para determinar la concentración y pureza del ARN, el lector del espectrofotómetro fue limpiado con agua libre de ARNasas (ThermoFisher Scientific, USA) entre muestras. Las concentraciones fueron registradas en el Software NanoDrop para posteriormente ser analizadas. Para calcular la mínima concentración de ARN requerida para ser utilizada en un proceso de transcripción reversa efectiva, de las muestras obtenidas se verificó cuál fue la muestra con menor concentración. En base a esos datos se decidió utilizar una concentración 15 ng/µl de ARN. Al finalizar el proceso de cuantificación las muestras fueron guardadas en el refrigerador a -80°C.

#### **5.5 Transcripción reversa:**

El ARN fue transcrito a ADNc usando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems, USA) utilizando una solución con Buffer RT, Primers Oligo(dT), Primers aleatorios, la enzima de transcriptasa reversa “MultiScribe™” (Applied Biosystems, USA) e inhibidores de ARNasas según las indicaciones del fabricante “Applied Biosystems”. Para esto se realizó una dilución en 13 tubos (Libre de ARNasas) con agua libre de nucleasas de las 13 muestras previamente descongeladas en hielo, con el fin de obtener una solución de 30ul por muestra a una concentración de 15 ng/µl de ARN. Las muestras diluidas fueron dejadas en hielo. Posteriormente los reactivos del kit de transcripción reversa se descongelaron en hielo y se preparó en un tubo Eppendorf de 1,5ml el Master Mix

de Transcripción reversa al 2X pipeteando 76ul de RT Buffer al 10X, 30,4 µl de dNTP Mix al 25X (100mM), 76 ul de Primers aleatorios para RT al 10X, 38 µl de enzima de transcripción reversa “MultiScribe™” (Applied Biosystems, USA) y 159,6 µl de agua libre de nucleasas para obtener un total de 380 µl de Master Mix 2X. Luego se pipeteo 30µl de Master Mix 2X en cada uno de los 13 tubos PCR libre de ARNasas previamente rotulados con el número de muestra. Después se colocaron los 30µl de cada muestra diluida en los tubos de PCR con Master mix 2X correspondientes. para luego colocar los tubos en el termociclador (Axygen® MaxyGene II, USA) el cual fue configurado con un primer ciclo a 25°C por 10 minutos, el segundo ciclo a 37°C por 120 minutos, el tercer ciclo a 85°C por 4 minutos y finalmente un ciclo a 4°C hasta que sean retirados, además se configuró el volumen final por tubo de PCR a 60µl.

Finalmente se realizó una verificación de la eficiencia de la transcripción reversa a través de la cuantificación de 1µl de cada muestra de ADN complementario (ADNc) en el espectrofotómetro “NanoDrop” (ThermoFisher Scientific, USA) evaluando la absorbancia a 260 µm y el coeficiente 260/280 y se guardaron las muestras de ADNc en el refrigerador a -20° C.

### **5.6 PCR en tiempo real (RT-qPCR):**

El RT-qPCR se llevó a cabo en el termociclador (StepOnePlus; Applied Biosystems, USA). Los primers TaqMan correspondientes a los genes de interés a identificar, se descongelaron en hielo (Tabla 3). En 3 tubos Eppendorf de 1,5 ml (Libre de Rnasas) se preparó una solución con 280 µl de Master Mix para PCR Universal TaqMan, 28 µl de primer TaqMan específico para el gen de interés y 196ul de agua libre de nucleasas. Luego en una placa de 96 pocillos se organizaron las muestras del tejido gingival de ratones con ligadura y sin ella. Dentro de estas, en 26 pocillos fueron colocados 18µl de la solución PCR Master Mix del gen de interés. Debido a que el proceso de amplificación se realizó con duplicados de cada una de las 13 muestras, 24 pocillos fueron utilizados para éste procedimiento y 2 fueron

usados como control de la solución PCR Master Mix, Luego se colocaron 2µl de ADNc de cada una de las muestras en cada uno de los pocillos con PCR Master Mix. Después la placa de 96 pocillos fue sellada con una membrana adhesiva libre de DNasa, RNasas e inhibidores de PCR para en consiguiente hacer un Spin de 30 segundos a 10.000 xg en la microcentrífuga (ThermoFisher Scientific, USA) con rotor para placa de 96 pocillos con el fin de eliminar burbujas. Finalmente se colocó la placa en el termociclador para qPCR, el cual fue configurado para correr con una curva estándar y con el método de sondas TaqMan. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo de la siguiente manera: Primero el paso de desnaturalización a 95°C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C durante 3 segundos y a 60°C por 30 segundos. La muestra se normalizó utilizando el gen *Hprt* como control.

**Tabla 3 – Primers TaqMan (Ensayos de expresión génica TaqMan, Applied Biosystems).**

<b>Gen Objetivo</b>	<b>ID de ensayo</b>	<b>Longitud del amplicón</b>
<b><i>Il6st</i></b> m1	Mm00439665_	80
<b><i>Hprt</i></b> m1	Mm03024075_	131

### **5.7 Análisis Estadístico:**

Para el análisis cuantitativo se utilizó el método de cuantificación relativa  $2^{-\Delta\Delta CT}$  en donde se utilizó el gen *Hprt* como gen de expresión constitutiva o “housekeeping” para normalizar los datos obtenidos de los tejidos ligados y no ligados. En base al método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  se realizó un análisis estadístico comparativo para determinar si hubo variaciones significativas entre los niveles de expresión de *Il6st* en salud gingival y periodontitis. Adicionalmente se utilizó la fórmula  $2^{-\Delta CT}$  para determinar la expresión génica total en donde se analizó la diferencia de expresión entre los genes de interés

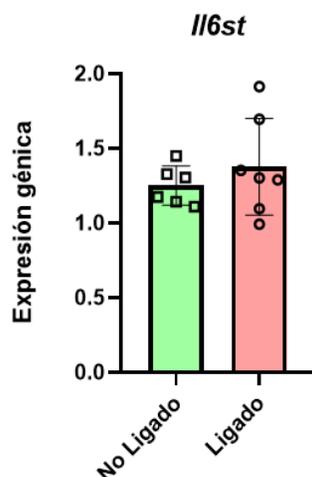
y el gen *housekeeping* (Schmittgen y Livak, 2008). La distribución de los datos se determinó por la prueba Shapiro-Wilk. Debido a que la distribución de los datos era paramétrica, la comparación de los resultados entre el grupo en salud y con inflamación se realizó utilizando la prueba t de Student.

Para detectar una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de animales experimentales y lograr una potencia estadística del 80% y una seguridad del 95%, se utilizó un tamaño de muestra de al menos 6 ratones por grupo. Los animales utilizados son singénicos y consideramos que la eficacia de la periodontitis inducida por ligadura es cercana al 100%. El tamaño de la muestra se calculó con el método propuesto por Charan y Kanthariaen en 2013, realizando el ajuste recomendado. (Charan y Kanthariaen, 2013). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas si el valor de  $p < 0,05$ . Los datos se analizaron utilizando el software Prism 9 (GraphPad Software, Inc).

## **6. RESULTADOS:**

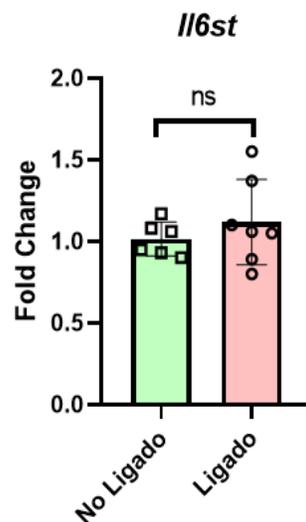
### **6.1 Expresión y expresión relativa del gen *I/6st***

Para evaluar la expresión génica presente en los tejidos, se realizó un análisis comparativo de la expresión génica ( $2^{-\Delta CT}$ ) del gen *I/6st* en salud (no ligado) y en periodontitis experimental (ligado) (Figura 4). Se observó que el promedio de la expresión ( $2^{-\Delta CT}$ ) del gen *I/6st* fue de 1.25 en el grupo no ligado y de 1.37 en el grupo ligado, presentando un aumento de 0.12 en el valor de  $2^{-\Delta CT}$ . Estadísticamente la expresión no presenta una diferencia significativa entre los grupos, sin embargo, se puede apreciar un aumento en la dispersión de los valores de  $2^{-\Delta CT}$  en las muestras extraídas de ratones ligados.



**Figura 4 - Expresión génica de *I/6st* en tejidos no ligados y ligados:** La expresión de ARNm se normalizó con el gen *Hprt*. Las barras representan la media de los niveles de expresión génica (1.25 y 1.37) y las líneas verticales el error estándar de 7 muestras del grupo ligado y 6 muestras del grupo no ligado, los círculos representan los valores de  $2^{-\Delta CT}$  de cada muestra analizada.

Analizamos también, la expresión relativa del gen *Ilg6st* en tejido gingival sano y con periodontitis experimental, evaluando los niveles relativos de expresión génica ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) de *Ilg6st* (Figura 5). En el gráfico 2 se puede observar que el gen *Ilg6st* en el grupo ligado se expresó 0.102 veces más en comparación al no ligado (promedios de 1.117 y 1.015 respectivamente). Estadísticamente no existe una diferencia significativa en la expresión relativa entre los grupos estudiados, no obstante, se vuelve a apreciar una dispersión aumentada de los datos del grupo ligado.



**Figura 5 - Expresión génica relativa de *Ilg6st* en muestras no ligadas y ligadas:** La expresión de ARNm se normalizó con el gen *Hprt*. Las barras representan la media de los niveles relativos de expresión génica (1.015 y 1.117) y las líneas verticales la error estándar de 7 muestras del grupo ligado en comparación a las 6 muestras del grupo no ligado. los círculos representan los valores de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  de cada muestra analizada.

## 7. DISCUSIÓN:

En este estudio hemos analizado la expresión del gen *Il6st*, que codifica para el receptor GP130 mediante PCR en tiempo real, en tejido gingival murino sano e inflamado mediante periodontitis inducida por ligadura, modelo que ha demostrado recrear un estado inflamatorio similar a la periodontitis (Abe y Hajishengallis, 2013). Esto con el fin de ampliar el conocimiento sobre el proceso de señalización involucrado en la progresión de la enfermedad periodontal, ya que GP130 participaría directamente en la activación de la vía de señalización JAK/STAT (Lokau y Garbers, 2018). Específicamente en periodontitis, el incremento en la activación de STAT3 y la gran cantidad de citoquinas pro-inflamatorias como IL-6, que utilizan este receptor para su señalización, permitiría la diferenciación de los linfocitos Th17 y con esto la producción y liberación de citoquinas efectoras como IL-17A, potenciando reacciones inflamatorias y favoreciendo la progresión de la enfermedad periodontal (Takahashi y cols., 2005; Chavez de Souza y cols., 2011; Chaves de Souza y cols., 2013; Kane y cols., 2014; Lokau y Garbers, 2018; Dutzan y cols., 2018).

Nuestros resultados muestran que en periodontitis experimental no se producen cambios significativos en el nivel de la expresión de *Il6st*, cuando los comparamos con tejido sano, sin embargo, hasta la fecha se desconoce en gran medida cómo se controlan los niveles de expresión o disponibilidad de GP130 (Flynn y cols., 2021), por lo que sería pertinente teorizar, de momento, sobre el posible comportamiento regulatorio de este receptor dentro de un contexto patológico como lo es la enfermedad periodontal. Para esto, creemos que es necesario ahondar en lo que se sabe con respecto a la internalización del complejo receptor en la que participa GP130 (IL-6/IL-6R/GP130), evento que sería crucial para la activación de la cascada de señalización mediante JAK/STAT (Flynn y cols., 2021; Lokau y Gabers, 2019).

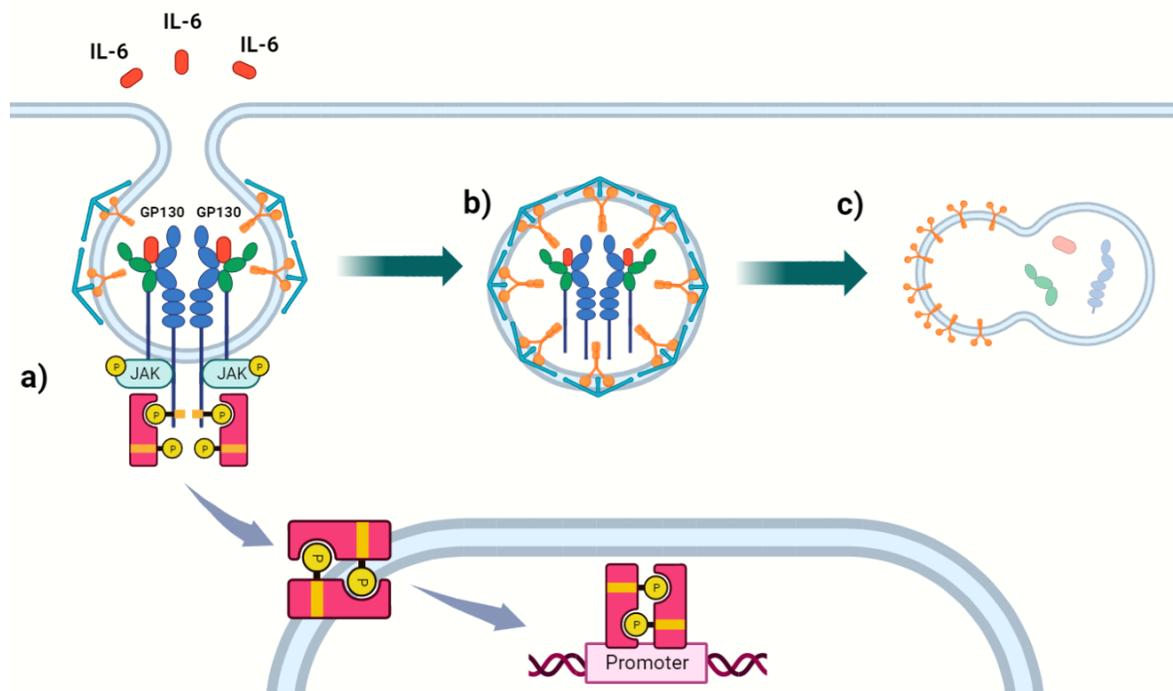
## **7.1 Internalización de GP130**

Un mecanismo bien reconocido que emplean muchos factores de crecimiento y citoquinas es la regulación negativa de sus señales mediante la internalización del complejo ligando-receptor. El complejo internalizado se dirige al lisosoma donde la degradación se produce con o sin receptor (Wang y Fuller, 1994). La endocitosis de las proteínas de señalización, cumple al menos dos funciones importantes: la eliminación del ligando de la circulación y la modulación de la expresión del receptor en la superficie celular (Heinrich y cols., 1998).

Nesbit y Fuller en 1992 sugirieron que esta vía podría ser el mecanismo de regulación de GP130 al estudiar la dinámica de la internalización y degradación de IL-6 en hepatocitos murinos. Esto motivó una serie de estudios posteriores relacionados con los factores reguladores de este proceso como el de Wang y Fuller en 1994 en los que indicaron que GP130 se degrada probablemente junto con la IL-6 y que las vías de regulación negativa implican la destrucción tanto del ligando como del receptor (Nesbit y Fuller, 1992; Wang y Fuller, 1994)

Thiel y cols en 1998 observaron que la internalización de GP130 no depende de la activación de la vía JAK/STAT, ya que, mutantes del receptor que carecen de la región citoplasmática de GP130, que se encarga de activar las proteínas JAK (la región box1), siguen siendo endocitados de forma eficiente (Thiel y cols., 1998). Además, demostraron que GP130 se internaliza de manera constitutiva, independientemente de la presencia del ligando o de un receptor específico de citoquina, como IL-6R, con una vida media de aproximadamente 2 horas. En este sentido, GP130 se asemeja más a los receptores de nutrientes, (lipoproteínas de baja densidad o transferrina) que a otros como el de insulina o factor de crecimiento epidérmico (Heinrich y cols., 1999).

Recientemente en 2021, Flynn y cols han demostrado que tanto el IL-6R como la GP130 se internalizan por endocitosis mediada por clatrina y dinamina de forma constitutiva e independiente de IL-6. Sin embargo, este proceso sería necesario para la transducción efectiva de la señalización mediada por esta citoquina (Figura 6) (Flynn y cols., 2021).

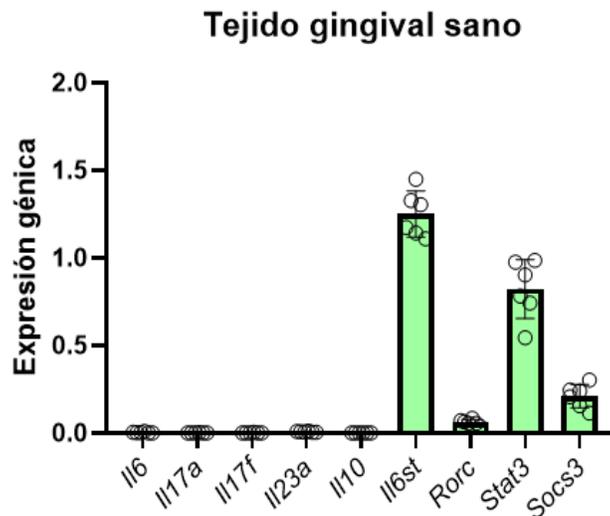


**Figura 6: Señalización mediada por IL-6 e Internalización del receptor GP130 mediante clatrina y dinamina. (a)** La internalización del complejo receptor sería un prerequisite para activación de la cascada de señalización, **(b)** luego de que esto se produce el receptor GP130 juntos con el ligando y el receptor específico (IL-6R) serían transportados hacia lisosomas, **(c)** en donde se produciría su degradación. Extraído de Flynn y cols., 2021.

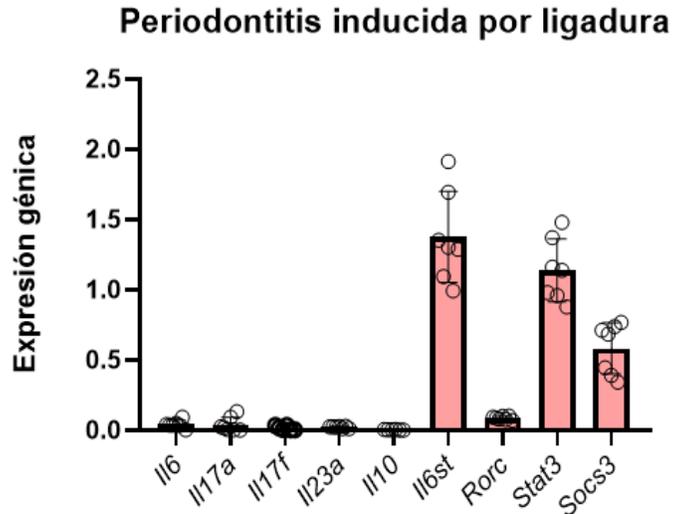
La internalización y degradación, independiente y constitutiva de GP130, podría explicar una expresión constante en el gen *IL6ST*, ya que como señalamos anteriormente, este receptor es necesario para la regulación de una amplia variedad de tejidos y sistemas cruciales para el correcto funcionamiento del organismo

(Kishimoto y cols., 1995). También nos permitiría entender este constante recambio como un posible doble seguro frente a mutaciones o señalizaciones no deseadas, como se han detectado en cáncer y en otras enfermedades inflamatorias graves (Susuky y cols., 2004; Xu y Neamati, 2013; Lokau y Garbers, 2019).

Nuestro estudio podría apoyar la idea de esta constante renovación de GP130, ya que gracias a resultados de otras investigaciones también pertenecientes al proyecto adscrito, constatamos que tanto en salud como en enfermedad, *Il6st* se expresa en un nivel mayor comparado con otros genes pro-inflamatorios relacionados con GP130 (Figura 7 y 8), esto probablemente debido a la ya descrita internalización constitutiva e independiente de este receptor, teniendo que ser remplazado por una síntesis de novo, tanto en procesos patológicos como homeostáticos (Espinoza y cols., 2022).



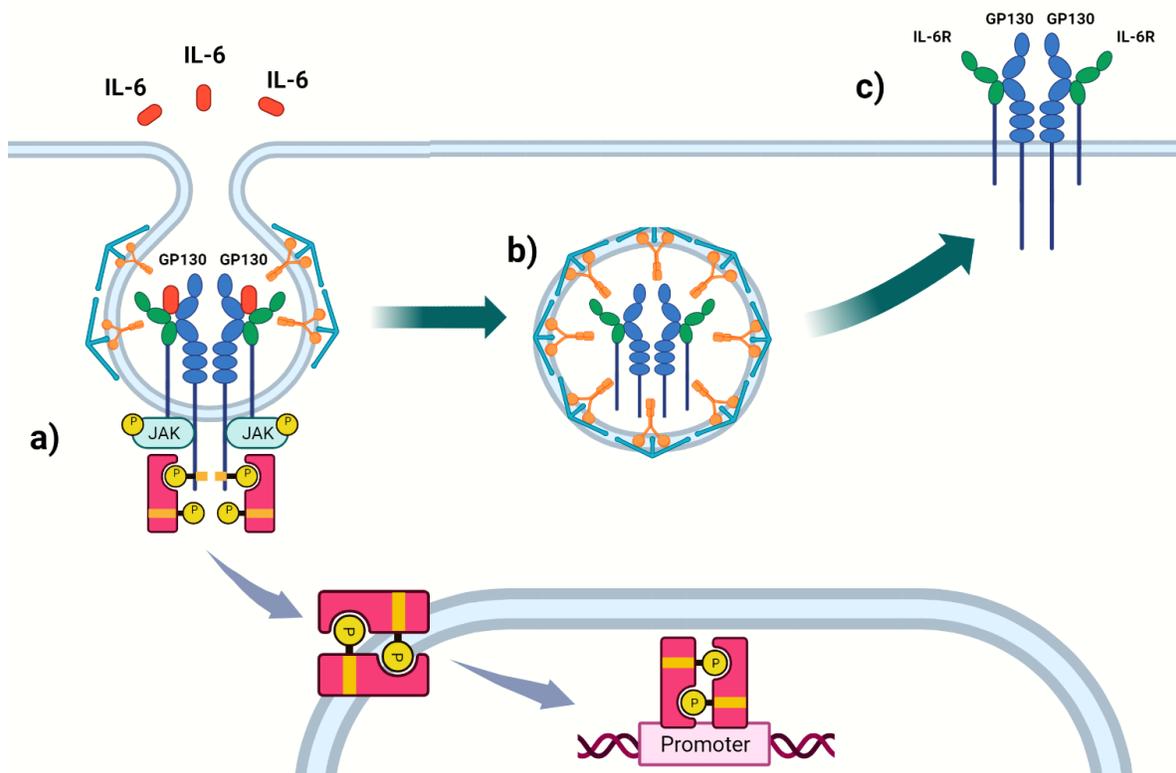
**Figura 7: Comparación de la expresión génica de *Il6*, *Il17a*, *Il17f*, *Il23a*, *Il10*, *Il6st*, *Stat3*, *Rorc*, *Socs3* en tejidos gingivales sanos.** La expresión de ARNm fue normalizada con el gen *Hprt*. Las barras representan la media de los niveles de expresión génica y las líneas verticales la error estándar de 7 muestras por grupo de genes. Tomado de Espinoza y cols., 2022



**Figura 8: Comparación de la expresión génica de *IL6*, *IL17a*, *IL17f*, *IL23a*, *IL10*, *IL6st*, *Stat3*, *Rorc*, *Socs3* en periodontitis inducida por ligadura.** La expresión de ARNm fue normalizada con el gen *Hprt*. Las barras representan la media de los niveles de expresión génica y las líneas verticales la error estándar de 7 muestras por grupo de genes. Tomado de Espinoza y cols., 2022

## **7.2 Reciclaje de GP130 y IL-6R**

Flynn y cols (2021) demostraron que los receptores GP130 e IL-6R tienen la capacidad de ser reciclados hacia la membrana superficial de la célula y este proceso de reciclaje se vería potenciado por la presencia de IL-6. Específicamente en su estudio, la estimulación con IL-6 provocó que las células (HeLa) con el receptor reciclado, fueran aproximadamente el doble, en comparación con las células no estimuladas (Figura 9) (Flynn y cols., 2021).



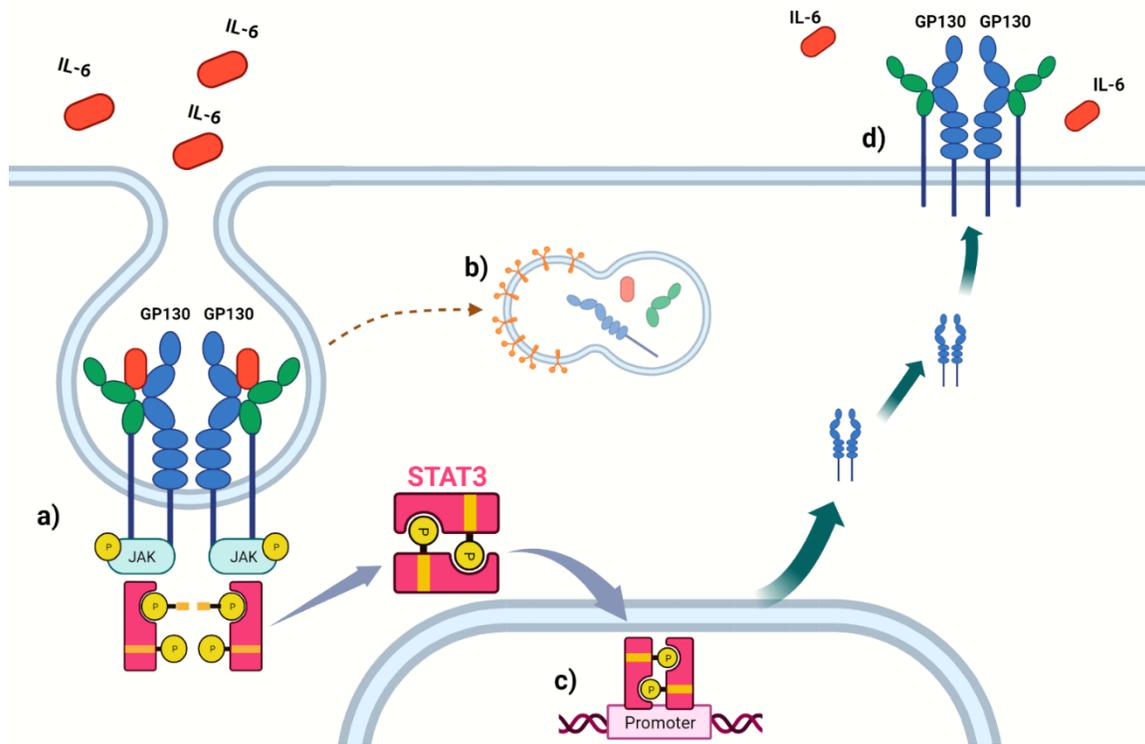
**Figura 9: Internalización y reciclaje del complejo receptor.** (a) Luego de la activación de la cascada de señalización, (b) tanto GP130 como IL-6R serían capaces de reciclarse, (c) retornando a la membrana superficial para ser utilizados nuevamente, esto se potenciaría en presencia de IL-6. Extraído de Flynn y cols., 2021.

Este estudio nos permitiría teorizar sobre posibles cambios celulares inducidos por la presencia de IL-6 u otras citoquinas de la familia, que proporcionarían un mecanismo para aumentar la respuesta celular a interleuquinas de tipo IL-6 y/o potenciar la activación de la vía de señalización JAK/STAT las cuales sabemos, están aumentadas en periodontitis (Naruishi y Nagata, 2018; Chavez de Souza cols., 2011). Esto sería posible si consideramos la capacidad que tendrían las proteínas STAT de promover la expresión del gen *IL6ST* (O'Brien y Manolagas, 1997).

### **7.3 Promoción del gen *IL6ST* por STAT**

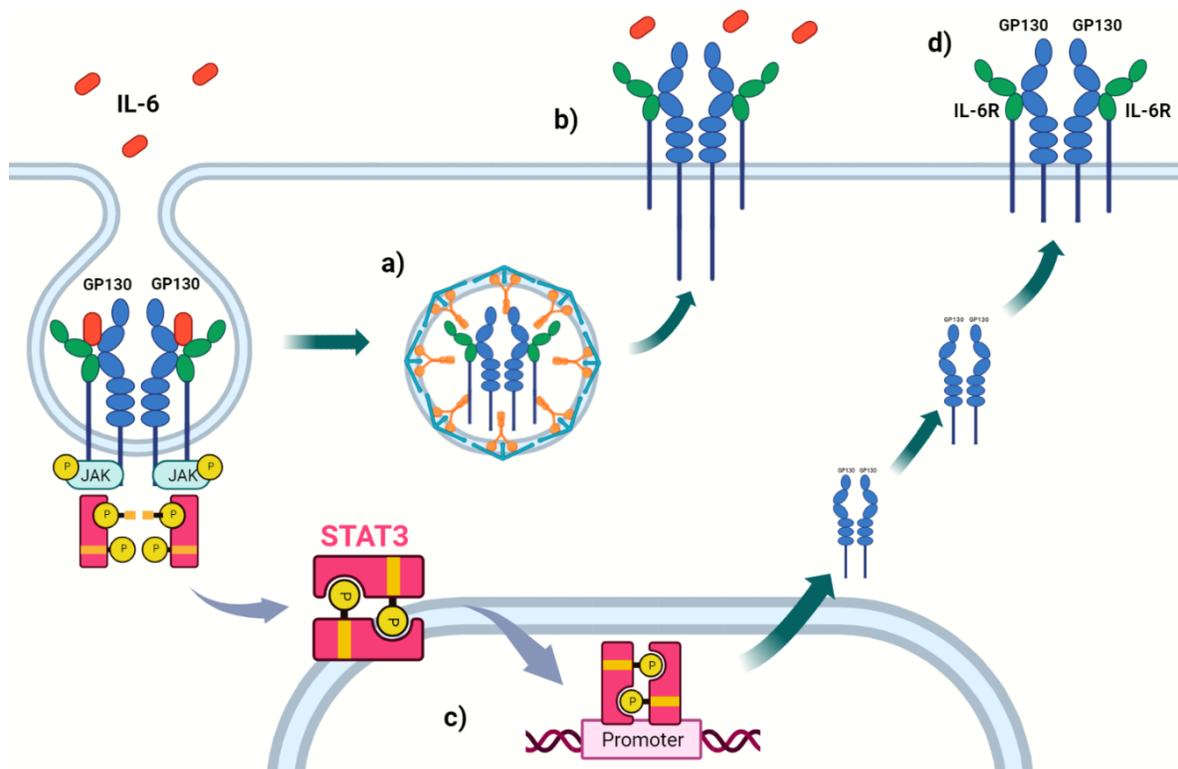
En 1997, O'Brien y Manolagas demostraron que una región del gen *IL6ST* humano funciona como un promotor transcripcional constitutivamente activo y que se ve estimulado por citoquinas de tipo IL-6, además, localizaron un sitio de unión de acción cis responsable de la inducción de este promotor por citoquinas y mostraron que se corresponde con el sitio de unión consensuado para los complejos STAT activados, sugiriendo que homodímeros de STAT3, y potencialmente otras proteínas STAT, puedan ser responsables de la estimulación de este promotor mediante la señalización de citoquinas del tipo IL-6 (O'Brien y Manolagas, 1997).

Debido a que varios tipos celulares expresan receptores para más de un miembro de la familia de citoquinas tipo IL-6 y todas estas utilizan GP130 (que luego será internalizado y degradado), la mantención de la capacidad celular de responder a otras citoquinas de la familia, después de haber sido estimulada por una de ellas, podría requerir la reposición de GP130, por lo tanto, el aumento de la actividad del promotor del gen *IL6ST* mediada por STAT puede formar parte de un mecanismo para lograr esta reposición (Figura 10) (O'Brien y Manolagas, 1997).



**Figura 10: Representación esquemática de la internalización y degradación de GP130 y la posible participación de STAT3 en la activación del promotor del gen *IL6ST*.** (a,b) Luego de la internalización y degradación del complejo receptor, (c) la señalización a través de STAT3 podría ser capaz de inducir la activación del promotor del gen *IL6ST*, (d) lo que permitiría reponer el receptor utilizado anteriormente. Extraído de O'Brien y cols 1997.

Esto sumado a la capacidad de GP130 y IL-6R de reciclarse en presencia de IL-6 podría proporcionar un mecanismo por el cual la célula sea capaz de aumentar su respuesta a este tipo de citoquinas sin modificar significativamente la expresión del gen *IL6ST* (Figura 11).



**Figura 11: Representación esquemática de la internalización, reciclaje y reposición de GP130 mediante la inducción del promotor del gen *IL6ST* por STATs.** (a, c) Gracias a la capacidad que tendría GP130 y IL-6R de ser recicladas en presencia de IL-6 y a la activación del promotor del gen *IL6ST* inducida por STAT3, (b, d) se podría mantener la expresión del gen y a la vez aumentar la respuesta a IL-6. Extraído de Flynn y cols., 2021; O'Brien y cols., 2000.

#### **7.4 Expresión de *IL6ST* en salud y periodontitis**

Según nuestro estudio la periodontitis experimental no estaría provocando cambios significativos en el nivel de la expresión de *IL6st*, al ser comparado con tejidos sanos, sin embargo, la señalización vía JAK/STAT podría potenciarse por la capacidad de IL-6 de promover el reciclaje de GP130. Este equilibrio degradación/reciclaje podría estar siendo modulado por los altos niveles de IL-6 presentes en periodontitis, aumentando el reciclaje de GP130 paralelamente a la activación del promotor del gen a través de STAT3, obteniendo una mayor respuesta celular manteniendo constante la expresión del gen *IL6st*.

Esta estabilidad en la expresión de *IL6ST* entre salud y enfermedad también fue descrita por Williams y cols en 2021. La información obtenida a partir de su atlas celular de mucosa oral humana concuerda con nuestros resultados ya que la expresión de *IL6ST* no presenta variaciones significativas cuando se comparan muestras de sujetos humanos sanos y con periodontitis. Además, nos permite identificar tipos celulares que presentan mayores niveles de expresión del gen *IL6ST* en periodontitis, de los cuales destacan los fibroblastos, específicamente los que presentan una firma génica correspondiente a las funciones prototípicas del tipo celular, incluyendo la síntesis de colágeno y la remodelación del tejido, también podemos encontrar células endoteliales venulares que mostraban una firma génica consistente con vías activas para el desarrollo del endotelio (Williams y cols., 2021), siendo capaz de guiar investigaciones futuras sobre GP130 y sus receptores asociados.

## **8. CONCLUSIÓN:**

En este estudio se analizó la expresión del gen *Il6st* en tejidos gingivales murinos mediante PCR en tiempo real. Nuestros resultados mostraron que no hay diferencias significativas en el nivel de expresión de *Il6st* en periodontitis experimental comparado con tejidos sanos. Esto sugiere que en tejido gingival la regulación de la disponibilidad del receptor podría no estar ligada a la expresión del gen.

La internalización constitutiva e independiente de este receptor y su posterior degradación, podrían explicar nuestros resultados. La expresión constitutiva del gen *Il6st* sería necesaria para que GP130 sea remplazado constantemente, tanto en procesos patológicos como homeostáticos.

Lo altos niveles de IL-6 presentes en periodontitis podrían aumentar el reciclaje de GP130 y IL6R, potenciando la respuesta celular a citoquinas sin modificar la expresión del gen *Il6st*.

Se plantean nuevas interrogantes sobre el papel de IL-6 en tejido gingival, siendo quizás una posible vía de regulación de la disponibilidad de GP130. Por esta razón creemos necesario continuar con las investigaciones sobre este receptor y su interacción con IL-6.

### **8.1 Consideraciones**

Es importante considerar que se conocen otros mecanismos de regulación de la señalización a través de GP130 que se relacionan con IL-6R y su trans-señalización, sIL-6R y sGP130 que no fueron profundizados en este trabajo.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Bauer, J., Bauer, T. M., Kalb, T., Taga, T., Lengyel, G., Hirano, T., . . . Gerok, W. (1989). Regulation of interleukin 6 receptor expression in human monocytes and monocyte-derived macrophages. Comparison with the expression in human hepatocytes. *J Exp Med*, 170(5), 1537-1549. doi:10.1084/jem.170.5.1537
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006 May 11;441(7090):235-8.
- Boulanger MJ, Chow DC, Brevnova EE, Garcia KC. Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science*. 2003 Jun 27;300(5628):2101-4. Erratum in: *Science*. 2003 Aug 15;301(5635):918. PMID: 12829785.
- Cherel, M., Sorel, M., Apiou, F., Lebeau, B., Dubois, S., Jacques, Y., & Minvielle, S. (1996). The human interleukin-11 receptor alpha gene (IL11RA): genomic organization and chromosome mapping. *Genomics*, 32(1), 49-53.
- Chapple, I. L. (2014). Time to take periodontitis seriously. *BMJ*, 348, g2645.
- Chaves de Souza, J. A., Nogueira, A. V., Chaves de Souza, P. P., Kim, Y. J., Silva Lobo, C., Pimentel Lopes de Oliveira, G. J., et al. (2013). SOCS3 expression correlates with severity of inflammation, expression of proinflammatory cytokines, and activation of STAT3 and p38 MAPK in LPS-induced inflammation in vivo. *Mediators Inflamm*, 2013, 650812.
- Chavez de Souza J. A., Nogueira A. V., Chavez de Souza P. P., Cirelli J. A., Garlet G. P., & Rossa C. (2011). Expression of suppressor of cytokine signaling 1 and 3 in ligature-induced periodontitis in rats. *Arch Oral Biol*, 56(10), 1120-1128.
- Chaves de Souza, J. A., Nogueira, A. V., Chaves de Souza, P. P., Kim, Y. J., Silva Lobo, C., Pimentel Lopes de Oliveira, G. J., Cirelli, J. A., Garlet, G. P., & Rossa, C., Jr (2013). SOCS3 expression correlates with severity of inflammation, expression of proinflammatory cytokines, and activation of STAT3 and p38 MAPK in LPS-induced inflammation in vivo. *Mediators of inflammation*, 2013, 650812.
- Charan J, Kantharia ND. How to calculate sample size in animal studies? *J Pharmacol Pharmacother*. 2013 Oct;4(4):303-6
- Dutzan, N., Kajikawa, T., Abusleme, L., Greenwell-Wild, T., Zuazo, C. E., Ikeuchi, T., et al. (2018). A dysbiotic microbiome triggers T. *Sci Transl Med*, 10(463).

- Dutzan, N., Konkell, J. E., Greenwell-Wild, T., & Moutsopoulos, N. M. (2016). Characterization of the human immune cell network at the gingival barrier. *Mucosal Immunol*, 9(5), 1163-1172.
- Dutzan, N., & Abusleme, L. (2019). T Helper 17 Cells as Pathogenic Drivers of Periodontitis. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1197).
- Espinoza, J. (2022). Expresión de genes blanco de STAT3 en tejidos gingivales durante periodontitis experimental [Trabajo de investigación requisito para obtener el grado de cirujano dentista]. Universidad de Chile.
- Ernst M, Gearing DP, Dunn AR. Functional and biochemical association of Hck with the LIF/IL-6 receptor signal transducing subunit gp130 in embryonic stem cells. *EMBO J*. 1994 Apr 1;13(7):1574-84. PMID: 8156996; PMCID: PMC394987.
- Falus, A., Biro, J., Rakasz, E., Brunner, T., & Bischoff, S. (1994). Separate regulation of a membrane protein, gp130, present in receptor complex specific for interleukin-6 and other functionally related cytokines. *J Mol Recognit*, 7(4), 277-281.
- Falus, A., Taga, T., Hibi, M., Murakami, M., & Kishimoto, T. (1992). Regulation of IL-6 receptor and gp130 expression on human cell lines of lymphoid and myeloid origin. *Cytokine*, 4(6), 495-499.
- Flynn, C. M., Kespohl, B., Daunke, T., Garbers, Y., Dusterhoft, S., Rose-John, S., . . . Garbers, C. (2021). Interleukin-6 controls recycling and degradation, but not internalization of its receptors. *J Biol Chem*, 296, 100434.
- Fujihashi, K., Beagley, K. W., Kono, Y., Aicher, W. K., Yamamoto, M., DiFabio, S., Xu-Amano, J., McGhee, J. R., & Kiyono, H. (1993). Gingival mononuclear cells from chronic inflammatory periodontal tissues produce interleukin (IL)-5 and IL-6 but not IL-2 and IL-4. *The American journal of pathology*, 142(4), 1239-1250.
- Gamonal, J., Mendoza, C., Espinoza, I., Muñoz, A., Urzúa, I., Aranda, W., et al. (2010). Clinical attachment loss in Chilean adult population: First Chilean National Dental Examination Survey. *J Periodontol*, 81(10), 1403-1410.
- Glowczyk, I., Wong, A., Potempa, B., Babyak, O., Lech, M., Lamont, R. J., Potempa, J., & Koziel, J. (2017). Inactive Gingipains from *P. gingivalis* Selectively Skews T Cells toward a Th17 Phenotype in an IL-6 Dependent Manner. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7.

- Hajishengallis, G. (2014). Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol*, 35(1), 3-11.
- Hajishengallis, G. (2015). Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol*, 15(1), 30-44.
- Heinrich, P. C., Behrman, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Muller-Newen, G., & Shaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochemical Journal*, 374(1), 1-20.
- Hernández-Caldera A, Vernal R, Paredes R, Veloso-Matta P, Astorga J, Hernández M. Human periodontal ligament fibroblasts synthesize C-reactive protein and Th-related cytokines in response to interleukin (IL)-6 trans-signalling. *Int Endod J*. 2018 Jun;51(6):632-640.
- Hibi, M., Murakami, M., Saito, M., Hirano, T., Taga, T., & Kishimoto, T. (1990). Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell*, 63(6), 1149-1157.
- Hirota, H., Chen, J., Betz, U. A., Rajewsky, K., Gu, Y., Ross, J., Müller, W., & Chien, K. R. (1999). Loss of a gp130 Cardiac Muscle Cell Survival Pathway Is a Critical Event in the Onset of Heart Failure during Biomechanical Stress. *Cell*, 97(2), 189-198.
- Jones SA, Richards PJ, Scheller J, Rose-John S. IL-6 transsignaling: the in vivo consequences. *J Interferon Cytokine Res*. 2005 May;25(5):241-53.
- Kane, A., Deenick, E. K., Ma, C. S., Cook, M. C., Uzel, G., & Tangye, S. G. (2014). STAT3 is a central regulator of lymphocyte differentiation and function. *Curr Opin Immunol*, 28, 49-57.
- Kida Y, Kobayashi M, Suzuki T, Takeshita A, Okamatsu Y, Hanazawa S, Yasui T, Hasegawa K. Interleukin-1 stimulates cytokines, prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase-1 production via activation of MAPK/AP-1 and NF-kappaB in human gingival fibroblasts. *Cytokine*. 2005 Feb 21;29(4):159-68.
- Kim, H., & Baumann, H. (1997). Transmembrane domain of gp130 contributes to intracellular signal transduction in hepatic cells. *J Biol Chem*, 272(49), 30741-30747. doi:10.1074/jbc.272.49.30741
- Kishimoto, T. (1994). Signal transduction through homo- or heterodimers of gp130. *Stem Cells*, 12 Suppl 1, 37-44; discussion 44-35.

- Kishimoto, T., Akira, S., Narazaki, M., & Taga, T. (1995). Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood*, 86(4), 1243–1254.
- Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*. 2009; 27:485-517.
- Kornman, K. S. (2018). Contemporary approaches for identifying individual risk for periodontitis. *Periodontology 2000*, 78(1), 12–29.
- Lamont, R. J., & Hajishengallis, G. (2015). Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease. *Trends in Molecular Medicine*, 21(3), 172–183.
- Levy, D. E., & Lee, C. K. (2002). What does Stat3 do? *J Clin Invest*, 109(9), 1143- 1148.
- Lokau J, Garbers C. Activating mutations of the gp130/JAK/STAT pathway in human diseases. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2019; 116:283-309. doi: 10.1016/bs.apcsb.2018.11.007. Epub 2018 Dec 27. PMID: 31036294.
- Morales A, Strauss FJ, Hämmerle CHF, Romandini M, Cavalla F, Baeza M, Sanz M, Gamonal J. Performance of the 2017 AAP/EFP case definition compared with the CDC/AAP definition in population-based studies. *J Periodontol*. 2021 Oct 8.
- Moutsopoulos, N. M., Chalmers, N. I., Barb, J. J., Abusleme, L., Greenwell-Wild, T., Dutzan, N., Paster, B. J., Munson, P. J., Fine, D. H., Uzel, G., & Holland, S. M. (2015). Subgingival Microbial Communities in Leukocyte Adhesion Deficiency and Their Relationship with Local Immunopathology. *PLoS Pathogens*, 11(3), e1004698.
- Moutsopoulos, N. M., Konkel, J., Sarmadi, M., Eskin, M. A., Wild, T., Dutzan, N., Abusleme, L., Zenobia, C., Hosur, K. B., Abe, T., Uzel, G., Chen, W., Chavakis, T., Holland, S. M., & Hajishengallis, G. (2014). Defective Neutrophil Recruitment in Leukocyte Adhesion Deficiency Type I Disease Causes Local IL-17-Driven Inflammatory Bone Loss. *Science Translational Medicine*, 6(229), 229ra40.
- Marz, P., Gadiant, R. A., & Otten, U. (1996). Expression of interleukin-6 receptor (IL6R) and gp130 mRNA in PC12 cells and sympathetic neurons: modulation by tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha). *Brain Res*, 706(1), 71-79. doi:10.1016/0006-8993(95)01210-9
- Naruishi, K., & Nagata, T. (2018). Biological effects of interleukin-6 on Gingival Fibroblasts: Cytokine regulation in periodontitis. *Journal of Cellular Physiology*, 233(9), 6393–6400.
- Nibali, L., Koidou, V. P., Hamborg, T., & Donos, N. (2019). Empirical or microbiologically guided systemic antimicrobials as adjuncts to non-surgical periodontal

- therapy? A systematic review. *Journal of Clinical Periodontology*, 46(10), 999–1012.
- Nesbitt, J. E., & Fuller, G. M. (1992). Dynamics of interleukin-6 internalization and degradation in rat hepatocytes. *J Biol Chem*, 267(9), 5739-5742.
- O'Shea, J. J., Schwartz, D. M., Villarino, A. V., Gadina, M., McInnes, I. B., & Laurence, A. (2015). The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention. *Annu Rev Med*, 66, 311-328.
- O'Brien, C. A., Lin, S. C., Bellido, T., & Manolagas, S. C. (2000). Expression levels of gp130 in bone marrow stromal cells determine the magnitude of osteoclastogenic signals generated by IL-6-type cytokines. *J Cell Biochem*, 79(4), 532-541. doi:10.1002/1097-4644(20001215)79:4<532::aid-jcb20>3.0.co;2-u
- O'Brien, C. A., & Manolagas, S. C. (1997). Isolation and characterization of the human gp130 promoter. Regulation by STATS. *J Biol Chem*, 272(23), 15003-15010. doi:10.1074/jbc.272.23.15003
- Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D. H., Flemmig, T. F., Garcia, R., Giannobile, W. V., Graziani, F., Greenwell, H., Herrera, D., Kao, R. T., Kerschull, M., Kinane, D. F., Kirkwood, K. L., Kocher, T., Kornman, K. S., Kumar, P. S., ... Tonetti, M. S. (2018). Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Periodontology*, 89(March), S173–S182. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0721>
- Peres, M. A., Macpherson, L. M. D., Weyant, R. J., Daly, B., Venturelli, R., Mathur, M. R., et al. (2019). Oral diseases: a global public health challenge. *Lancet*, 394(10194), 249-260
- Röhrig B, du Prel JB, Wachtlin D, Kwiecien R, Blettner M. Sample size calculation in clinical trials: part 13 of a series on evaluation of scientific publications. *Dtsch Arztebl Int*. 2010 Aug;107(31-32):
- Rose-John, S., & Heinrich, P. C. (1994). Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochemical Journal*, 300(2), 281–290.
- Saavedra Ramírez, Publio Giovanni, Vásquez Duque, Gloria María, & González Naranjo, Luis Alonso. (2011). Interleucina-6: ¿amiga o enemiga? Bases para comprender su utilidad como objetivo terapéutico. *Iatreia*, 24(2), 157-166. Retrieved May 29, 2021,

- Saito, M., Yoshida, K., Hibi, M., Taga, T., & Kishimoto, T. (1992). Molecular cloning of a murine IL-6 receptor-associated signal transducer, gp130, and its regulated expression in vivo. *J Immunol*, 148(12), 4066-4071.
- Sawada S, Chosa N, Ishisaki A, Naruishi K. Enhancement of gingival inflammation induced by synergism of IL-1 $\beta$  and IL-6. *Biomedical Research (Tokyo, Japan)*. 2013 Feb;34(1):31-40.
- Silva, N., Abusleme, L., Bravo, D., Dutzan, N., Garcia-Sesnich, J., Vernal, R., et al. (2015). Host response mechanisms in periodontal diseases. *J Appl Oral Sci*, 23(3), 329-355.
- Silver, J. S., & Hunter, C. A. (2010). gp130 at the nexus of inflammation, autoimmunity, and cancer. *Journal of Leukocyte Biology*, 88(6), 1145–1156.
- Schoester, M., Heinrich, P. C., & Graeve, L. (1994). Regulation of interleukin-6 receptor expression by interleukin-6 in human monocytes--a re-examination. *FEBS Lett*, 345(2-3), 131-134. doi:10.1016/0014-5793(94)00416-1
- Schootink, H., Schmitz-Van de Leur, H., Heinrich, P. C., & Rose-John, S. (1992). Up-regulation of the interleukin-6-signal transducing protein (gp130) by interleukin-6 and dexamethasone in HepG2 cells. *FEBS Lett*, 297(3), 263-265. doi:10.1016/0014-5793(92)80552-r
- Scheller, J., Grötzinger, J., & Rose-John, S. (2006). Updating interleukin-6 classic- and trans-signaling. *Signal Transduction*, 6(4), 240–259.
- Scheller, J., & Rose-John, S. (2006). Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside. *Medical Microbiology and Immunology*, 195(4), 173–183.
- Shili Xu & Nouri Neamati (2013) gp130: a promising drug target for cancer therapy, *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 17:11, 1303-1328,
- Snyers, L., & Content, J. (1992). Enhancement of IL-6 receptor beta chain (gp130) expression by IL-6, IL-1 and TNF in human epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 185(3), 902-908. doi:10.1016/0006-291x(92)91712-y
- Stahl, N., Boulton, T., Farruggella, T., Ip, N., Davis, S., Witthuhn, B., Quelle, F., Silvennoinen, O., Barbieri, G., Pellegrini, S., & et, A. (1994). Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science*, 263(5143), 92–95.
- Stuhlmann-Laeisz, C., Lang, S., Chalaris, A., Krzysztof, P., Enge, S., Eichler, J., Klingmüller, U., Samuel, M., Ernst, M., Rose-John, S., & Scheller, J. (2006). Forced Dimerization of gp130 Leads to Constitutive STAT3 Activation, Cytokine-

- independent Growth, and Blockade of Differentiation of Embryonic Stem Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 17(7), 2986–2995.
- Szalai, C., Toth, S., & Falus, A. (2000). Exon-intron organization of the human gp130 gene. *Gene*, 243(1-2), 161-166.
- Taga, T. (1992). IL6 signalling through IL6 receptor and receptor-associated signal transducer, gp130. *Research in Immunology*, 143(7), 737–739.
- Taga, T., Hibi, M., Hirata, Y., Yamasaki, K., Yasukawa, K., Matsuda, T., Hirano, T., & Kishimoto, T. (1989). Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell*, 58(3), 573–581.
- Taga, T., & Kishimoto, T. (1997). gp130 AND THE INTERLEUKIN-6 FAMILY OF CYTOKINES. *Annual Review of Immunology*, 15(1), 797–819.
- Takahashi, K., Takashiba, S., Nagai, A., Takigawa, M., Myoukai, F., Kurihara, H., & Murayama, Y. (1994). Assessment of Interleukin-6 in the Pathogenesis of Periodontal Disease. *Journal of Periodontology*, 65(2), 147–153.
- Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2014). IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(10), a016295.
- Takahashi, K. (2005). The potential role of interleukin 17 in the immunopathology of periodontal disease.
- Thiel, S., Behrmann, I., Dittrich, E., Muys, L., Tavernier, J., Wijdenes, J, Graeve, L. (1998). Internalization of the interleukin 6 signal transducer gp130 does not require activation of the Jak/STAT pathway. *Biochem J*, 330 ( Pt 1), 47-54.
- Thiel, S., Dahmen, H., Martens, A., Muller-Newen, G., Schaper, F., Heinrich, P. C., & Graeve, L. (1998). Constitutive internalization and association with adaptor protein-2 of the interleukin-6 signal transducer gp130. *FEBS Lett*, 441(2), 231-234. doi:10.1016/s0014-5793(98)01559-2
- Van Dyke TE, Sheilesh D. Risk factors for periodontitis. *J Int Acad Periodontol*. 2005 Jan;7(1):3-7. PMID: 15736889; PMCID: PMC1351013.
- Ward, L., Howlett, G., Discolo, G., Yasukawa, K., Hammacher, A., Moritz, R., & Simpson, R. (1994). High affinity interleukin-6 receptor is a hexameric complex consisting of two molecules each of interleukin-6, interleukin-6 receptor, and gp-130. *Journal of Biological Chemistry*, 269(37), 23286–23289.
- Wilensky, A., Segev, H., Mizraji, G., Shaul, Y., Capucha, T., Shacham, M., et al. (2014). Dendritic cells and their role in periodontal disease. *Oral Dis*, 20(2), 119-126.

- Xu Y, Kershaw NJ, Luo CS, Soo P, Pocock MJ, Czabotar PE, Hilton DJ, Nicola NA, Garrett TP, Zhang JG. Crystal structure of the entire ectodomain of gp130: insights into the molecular assembly of the tall cytokine receptor complexes. *J Biol Chem*. 2010 Jul 9;285(28):21214-8.
- Yoshida, K., Taga, T., Saito, M., Suematsu, S., Kumanogoh, A., Tanaka, T., Fujiwara, H., Hirata, M., Yamagami, T., Nakahata, T., Hirabayashi, T., Yoneda, Y., Tanaka, K., Wang, W. Z., Mori, C., Shiota, K., Yoshida, N., & Kishimoto, T. (1996). Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(1), 407–411.
- Wang, X. J., Taga, T., Yoshida, K., Saito, M., Kishimoto, T., & Kikutani, H. (1998). gp130, the cytokine common signal-transducer of interleukin-6 cytokine family, is downregulated in T cells in vivo by interleukin-6. *Blood*, 91(9), 3308-3314.
- Wang, Y., & Fuller, G. M. (1994). Phosphorylation and internalization of gp130 occur after IL-6 activation of Jak2 kinase in hepatocytes. *Mol Biol Cell*, 5(7), 819-828. doi:10.1091/mbc.5.7.819
- Williams, D. W., Greenwell-Wild, T., Brenchley, L., Dutzan, N., Overmiller, A., Sawaya, A. P., Moutsopoulos, N. M. (2021). Human oral mucosa cell atlas reveals a stromal-neutrophil axis regulating tissue immunity. *Cell*, 184(15), 4090-4104 e4015.

## 10. ANEXOS. Anexo 1:



N° 018/FONDECYT/518



Santiago, 30 de Octubre del 2018

Ref.: Proyecto N° 11180389

Señor  
NICOLAS DUTZAN MUÑOZ

Estimado señor DUTZAN:

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

En esta convocatoria concursaron 1.233 proyectos y se financiaron 363 (29,4%). Su propuesta fue evaluada en el Consejo de CIENCIA y calificada con 4,470 puntos, ubicándose en el lugar N° 5 del Grupo de Estudio de MEDICINA G1 - CS. BIOMÉDICAS. En este Grupo concursaron 49 proyectos, se evaluaron 39 y aprobaron 12 (24,5%). La calificación del último proyecto financiado en este Grupo fue de 3,960 puntos.

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

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

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

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

Saludan atentamente a usted,



EDGAR VOGEL GONZÁLEZ  
Presidente  
Consejo Superior de Ciencia



MARIO HAMUY WACKENHUT  
Presidente  
Consejo Superior de Desarrollo Tecnológico

# Documento de Aprobación de Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) (Anexo 2)



Santiago, a 24 de enero de 2019

Certificado n°: 19227-ODO-UCH

## CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica que en el Protocolo **FOUCH 181113**, del Proyecto de Investigación titulado: **“Estudiando el rol de STAT3 en periodontitis y su potencial uso terapéutico”**, del Investigador Responsable **Dr. Nicolás Raúl Dutzan Muñoz**, Profesor Asistente, 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 un total de **96** ratones, *Mus musculus*, C57BL/6, provenientes de la Plataforma Experimental Bioterio, Facultad de Odontología, Universidad de Chile, desde marzo de 2019 a enero de 2022, tiempo estimado de ejecución del estudio, el cual será financiado por **Proyecto Fondecyt de Iniciación Nro. 11180389**.

*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.*

  
Ronald Vargás Casanova  
Director  
CICUA – VID  
Universidad de Chile



  
Dr. Emilio Herrera Videla  
Presidente  
CICUA - VID  
Universidad de Chile

Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA)  
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo (VID) – Universidad de Chile  
www.uchile/cicua.cl email: coordinador.cicua@uchile.cl