



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

**ACTIVACIÓN DE STAT3 DURANTE LA PROGRESIÓN DE PERIODONTITIS
INDUCIDA POR LIGADURA**

Baltasar Fernández Ortega

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Nicolás Raúl Dutzan Muñoz

TUTORES ASOCIADOS

Dra. Loreto Andrea Abusleme Ramos

Dra. Montserrat Reyes Rojas

ASESORES

Dra. Marion Arce Paniagua

Dr. Marcelo Rodríguez Peña

Adscrito a Proyecto FONDECYT 11180389

Santiago – Chile

2023

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, M^a Eugenia por su amor incondicional y a Carlos por su nobleza y consejo.

A mi hermana y amiga Valentina, por su complicidad y alegría.

A mi abuelita Clotilde, por ser mi fortaleza.

A mi compañera Valentina, por su amor y ser fuente de admiración e inspiración.

A cada uno de mis profesores, por la construcción del andamiaje de mi educación.

A mis amigos Matías, Nicolás y Javiera por apoyarme siempre.

A mis amigos del Liceo Francisco, Antonio, Tomás, Sergio y Maximiliano por ser los primeros en obsequiarme su amistad.

A mi familia sanguínea, tata Chalaco, tías, tíos y primos por su cariño y afecto.

Al "Darle" y a los "Bachis", Rodri, Nati, Yaya, May, Pancho, Ariel, Mauro, Nacho, Fran, Joaquín, Leo y David, por ser la familia que me escogió para crecer junto a mí en la Odontología y en la Chile.

A mis cofrades de la séptima compañía de bomberos, Gustavo, Daniel, Felipe y Adonis por su hermandad.

A todos mis pacientes, en especial a Rodrigo, Rosa y Luis por confiar en mí.

A la Dra. Silvana Maggiolo por creer en mí.

A mis tutores, en especial al Dr. Nicolás Dutzan por su liderazgo.

Al equipo del Laboratorio de Inmunología y microbiología de las mucosas orales, por brindarme la ayuda necesaria para la realización de esta tesis.

A la agencia nacional de investigación y desarrollo (ANID) por hacer posible la realización de este proyecto.

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

INDICE

1. RESUMEN	6
2. INTRODUCCIÓN	8
3. MARCO TEÓRICO	10
3.1 Importancia de la periodontitis	10
3.2 Respuesta inmune y periodontitis	11
3.3 STAT3	12
3.4 Funciones de STAT3 en la respuesta inmune	15
3.5 STAT3 en periodontitis	16
3.6 Modelo experimental de periodontitis	17
3.7 Planteamiento del problema	19
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	20
4.1 HIPÓTESIS	20
4.2 OBJETIVO GENERAL	20
4.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
5. MATERIALES Y MÉTODOS	21
5.1 Animales	21
5.2 Modelo de periodontitis inducida por ligadura	21
5.3 Preparación de las muestras de tejidos gingivales	22
5.3.1 Extracción de proteínas	22
5.3.2 Cuantificación de proteínas totales	23
5.4 Evaluación de pSTAT3 en tejidos gingivales	23
5.4.1 Separación de proteínas mediante electroforesis :.....	23
5.4.2 Electro-Transferencia :.....	23
5.4.3 Bloqueo de la membrana :	24
5.4.4 Inmunoblot :.....	24
5.4.5 Revelado de p-STAT3	24
5.5 Mediciones de la pérdida ósea	24
5.6 Análisis y estadística	25
6. RESULTADOS	27

6.1 Detección de STAT3 fosforilada en tirosina en tejidos gingivales de ratones durante etapas tempranas y tardías de periodontitis experimental	27
6.2 Detección de STAT3 fosforilada en serina 727 en tejidos gingivales de ratones durante las etapas tempranas y tardías de periodontitis experimental	29
6.3 Detección de STAT3 total en tejidos gingivales murino durante las etapas tempranas y tardías de periodontitis experimental	31
6.4 Determinación de la pérdida ósea alveolar murina durante periodontitis experimental.....	33
7. DISCUSIÓN.....	35
7.1 Activación de STAT3 en etapas iniciales de la inflamación gingival.....	35
7.2 Activación de STAT3 en etapas tardías de la inflamación gingival	37
7.3 STAT3T en las etapas tempranas y tardías de la inflamación gingival	39
7.4 Perdida ósea alveolar durante las etapas tempranas y tardías de la inflamación gingival.	40
7.5 Activación de STAT3 y su asociación con la pérdida ósea alveolar.	40
8. CONCLUSIONES.....	43
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
10. ANEXO.....	60

1. RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La periodontitis es una enfermedad inflamatoria, crónica multifactorial, asociada a una disbiosis en la microbiota subgingival. Afecta a los tejidos de soporte dentales, en muchos casos está asociada a otras patologías y tiene una alta prevalencia a nivel global. La vía de señalización intracelular de STAT3 participa activamente en la respuesta inmunoinflamatoria de diferentes patologías inflamatorio-destructivas, sin embargo, hasta ahora no existen estudios concluyentes que describan la activación de STAT3 durante la progresión de periodontitis.

OBJETIVOS: Evaluar la activación de STAT3, en etapas tempranas (2 horas a 3 días) y tardías (5 a 7 días) de la inflamación gingival y la pérdida ósea alveolar en periodontitis experimental.

MATERIALES Y MÉTODOS: En un modelo experimental murino de periodontitis inducido por ligadura se evaluó, mediante la técnica de Western blot, la activación de STAT3 en sus formas no fosforilada, fosforilada en tirosina 705 (pTyrSTAT3) y fosforilada en serina 727 (pSerSTAT3). Además, se determinó la pérdida ósea alveolar mediante la medición de la distancia en milímetros entre el límite amelo cementario (LAC) y la cresta ósea alveolar (COA).

RESULTADOS: En etapas tempranas y tardías, hay mayor expresión de pTyrSTAT3 y pSerSTAT3 en ligados versus no ligados. En los ligados, pTyrSTAT3 tiene un aumento en la expresión en las etapas tempranas, que luego decrece en las etapas tardías, mientras que pSerSTAT3 se mantiene constante. Además, se observa pérdida ósea alveolar a partir del día 5 post-ligadura.

CONCLUSIONES: La fosforilación de STAT3 en las etapas tempranas y tardías, nos indica que esta proteína podría participar en los procesos inflamatorios y de destrucción ósea alveolar durante la progresión de la periodontitis experimental. La cinética de pSTAT3 descrita en nuestros resultados, nos entrega nuevos antecedentes para la investigación en torno al desarrollo de tratamientos que

proponen a STAT3 como posible blanco farmacológico en el tratamiento de la periodontitis.

2. INTRODUCCIÓN

Las patologías que afectan a la cavidad oral son entidades que comparten factores de riesgo con otras enfermedades no transmisibles (Petersen & Ogawa, 2012). Son altamente prevalentes y a lo largo del curso de la vida tienen grandes efectos negativos en los individuos, las comunidades y la sociedad en general, generando costos económicos y para la salud. Dentro de ellas, se destaca la periodontitis (Peres et al., 2019).

La periodontitis es una condición oral crónica que se manifiesta como sangrado de las encías, disminución de inserción clínica y reabsorción del hueso alveolar, como resultado de una inflamación localizada en el periodonto. En sus manifestaciones más severas, puede llegar a causar movilidad y/o pérdida dental. Tiene una etiología multifactorial, y se asocia a un desbalance en el equilibrio de la microbiota comensal, debido a cambios cuantitativos o cualitativos de su composición, cambios en su funcionamiento o actividades metabólicas, o bien, a cambios en su distribución (Hajishengallis, 2015; Papapanou et al., 2018).

Durante mucho tiempo, el tratamiento convencional se ha centrado principalmente en tratar de controlar la respuesta inflamatoria ejecutada por el hospedero, mediante la modificación de hábitos, factores locales y sistémicos. Sin embargo, este enfoque no resulta exitoso en todos los casos, pues en aproximadamente un 20 a 25% de las personas con periodontitis en etapas avanzadas, no se produce una respuesta favorable y la enfermedad continúa progresando después del tratamiento y la fase de mantención (Kornman, 2018).

Generar mejor y mayor conocimiento sobre los mecanismos moleculares involucrados en la patogénesis de la periodontitis resulta clave, para comprender y perfeccionar el manejo clínico de la enfermedad y sus consecuencias.

Nuevos enfoques pretenden complementar el tratamiento convencional, abordando las vías de señalización moleculares del hospedero que dirigen la respuesta inmunoinflamatoria de los tejidos (Hajishengallis, 2014), buscando desarrollar nuevas alternativas terapéuticas para aquellos casos donde la

progresión y severidad de la enfermedad no logra ser controlada por los tratamientos tradicionales (Albandar, 2014; De Benedetti et al., 2006).

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Importancia de la periodontitis

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria, crónica, multifactorial, asociada a una disbiosis en la microbiota subgingival (Hajishengallis, 2015). Se caracteriza por ser un proceso progresivo e irreversible de destrucción que afecta a los tejidos de soporte de los dientes. Su manifestación clínica es la pérdida de inserción, sangrado gingival, la formación del saco periodontal y disminución del hueso alveolar detectado a nivel radiográfico (Armitage, 1995; Chapple et al., 2018).

El año 2010 se estimaba que la periodontitis afectaba al 10,8% de la población global lo que equivale a setecientos cuarenta y tres millones de personas alrededor del mundo (Peres et al., 2019). En el mismo año, la población adulta en Chile mostraba una alta prevalencia y extensión de signos clínicos de destrucción de los tejidos periodontales, cuando la pérdida de inserción clínica ≥ 5 mm alcanzaba una prevalencia de 58,3% en los sujetos de 35 - 44 años y de 81,4% en los sujetos de 55 a 74 años (Gamonal et al., 2010).

Según el último reporte de salud oral de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2022), la periodontitis está muy extendida, con una prevalencia mundial de aproximadamente 19% en personas mayores de 15 años, lo que representa más de mil millones de casos en todo el mundo, existiendo una mayor carga de la enfermedad en poblaciones con nivel socioeconómico, ingresos o educación más bajos, así como entre aquellos que viven en zonas rurales.

Las consecuencias de la periodontitis pueden ser graves para quienes la padecen, ya que estas personas presentan dificultades para comer o hablar cuando los dientes están móviles y/o se han perdido, además puede ocasionar una disminución de la interacción social y pérdida de la autoestima, afectando el bienestar en general y deteriorando la calidad de vida (Chapple, 2014; Papapanou et al., 2018). Estas graves consecuencias y alta prevalencia, la vuelve un importante problema de salud pública.

Entre los factores de riesgo se encuentran la higiene oral deficiente, el tabaquismo (Schwendicke et al., 2018) y el mal control de otras enfermedades sistémicas. Diferentes estudios han demostrado una asociación entre periodontitis y otras patologías como enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus, artritis reumatoide, infecciones pulmonares, efectos adversos en el embarazo, enfermedad renal, obesidad, síndrome metabólico, cáncer y neurodegeneración, entre otros (Hu et al., 2021; Zhang et al., 2018). La periodontitis podría modificar el inicio, el desarrollo y la severidad de estas enfermedades (Linden et al., 2013; Sanz & Kornman, 2013; Tonetti et al., 2018). Aquí destaca la asociación bidireccional de la periodontitis con la diabetes mellitus tipo 2, donde el deterioro de la salud periodontal también podría ser un indicador temprano de una diabetes mal controlada (Sanz et al., 2018; Seitz et al., 2019).

Durante las últimas décadas, se han desplegado una gran cantidad de esfuerzos y recursos, para comprender los mecanismos moleculares involucrados en la patogénesis de la periodontitis (Peres et al., 2019). Muchos de estos esfuerzos se han realizado con el fin de desarrollar alternativas terapéuticas para aquellos casos donde la progresión y severidad de la enfermedad no logra ser controlada por los tratamientos tradicionales (Albandar, 2014; De Benedetti et al., 2006).

3.2 Respuesta inmune y periodontitis

La destrucción de los tejidos periodontales que caracteriza a la periodontitis está mediada por el sistema inmune del hospedero (Kinane et al., 2017). Durante la progresión de la periodontitis, la inmunidad innata interactúa con la respuesta inmune adquirida como una red extremadamente compleja y altamente regulada por células y moléculas (citoquinas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión y sus ligandos), constituyéndose como una asociación que va mucho más allá de ser un simple obstáculo para los microorganismos (Hajishengallis & Korostoff, 2017).

En periodontitis, se ha establecido a nivel de la respuesta inmune celular que los linfocitos T, principalmente los T CD4⁺ o también conocidos como linfocitos T helper (Th), tienen una función clave en la patogénesis de esta enfermedad

(Gaffen & Hajishengallis, 2008). Dentro de los linfocitos Th, las células Th17 son cruciales en la defensa del hospedero contra bacterias y hongos, pero también han sido asociadas a trastornos inflamatorios y autoinmunes, jugando un rol clave en el equilibrio salud-enfermedad (Gaffen, 2009). Las células Th17 están definidas por la producción de interleuquina-17A (IL-17) (Harrington et al., 2005) y expresan el factor de transcripción denominado receptor nuclear huérfano relacionado con el receptor de ácido retinoico gamma (ROR γ t) (Ivanov et al., 2006). IL-17 es el centro de muchas enfermedades complejas que integran mecanismos de la inmunidad innata y adaptativa (Yu & Gaffen, 2008). Y aunque IL-17 tiene un rol importante en la defensa y mantención e integridad de las barreras mucosas, el aumento de la actividad de IL-17 tiene una función destructiva en varias enfermedades mucocutáneas inflamatorias como psoriasis, lupus eritematoso sistémico, enfermedades inflamatorias intestinales colorrectal (principalmente enfermedad de Crohn) y cáncer (Lee et al., 2015; Malakouti et al., 2015; Pisarska et al., 2020).

Los estudios en tejidos gingivales humanos han demostrado que Th17 es la principal fuente de IL-17, tanto en salud como en periodontitis (Dutzan et al., 2016). Así mismo, estudios en modelos de animales, han demostrado que IL-17 y las células Th17 son esenciales en los procesos inmunodestructivos que caracterizan a la periodontitis (Dutzan et al., 2018; Tsukasaki et al., 2018).

Dada la relevancia de las células Th17 en la patogénesis de la periodontitis, el estudio de los factores que regulan su diferenciación puede entregar nuevos conocimientos que ayuden a entender mejor la enfermedad y llevar a posibles nuevas alternativas de tratamiento. Por lo tanto, uno de los factores que regulan la diferenciación de los linfocitos Th17, es el transductor de señal y activador de la transcripción 3, denominado STAT3.

3.3 STAT3

Las STAT (del inglés Signal transducer and activator of transcription) son proteínas que tienen la habilidad de transducir señales desde la membrana celular al núcleo para promover la transcripción de genes presentes en el ácido

desoxirribonucleico (ADN). Desempeñan funciones críticas en la señalización de citoquinas y factores de crecimiento (Darnell, 2002).

La familia de factores de transcripción conocida como STATs (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B, STAT6), comparte estructuralmente seis dominios. Un dominio N-terminal (NTD), un dominio de bobina enrollada (CCD), un dominio de unión al ADN (DBD), un dominio enlazador (LD), un dominio Src-homology-2 (Dominio SH2) y un dominio C-terminal (Dominio de transactivación (TAD))(Shao et al., 2004). Todos los STATs contienen un residuo de tirosina y uno de serina en el dominio transactivador, exceptuando STAT2 y STAT6, que carecen del residuo de serina (Lim & Cao, 2006).

En la vía JAK/STAT clásica, las citoquinas se unen a receptores de transmembrana que no poseen la capacidad de autofosforilar sus residuos de tirosina. Por este motivo, la actividad tirosina quinasa es proporcionada por proteínas citoplasmáticas asociadas a estos receptores conocidas como quinasas de Jano (JAK). La familia de JAKs son cuatro (JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2) y están asociadas a diferentes STATs (Aaronson & Horvath, 2002; Leonard, 2001). Las JAKs al activarse se fosforilan y, a su vez, transfosforilan a las tirosinas de los receptores. Estos residuos de tirosina fosforilados proveen sitios de anclaje para los STATs que son reclutados, uniéndose al receptor a través de su dominio SH2 y fosforilando, a su vez, sus residuos de tirosina. Posteriormente, ocurre la homo o heterodimerización, por unión recíproca de la tirosina fosforilada de un monómero de STAT con el dominio SH2 de otro monómero de STAT. Estos STATs dimerizados son liberados del receptor al citoplasma, desde donde translocan al núcleo vía importinas, uniéndose a elementos específicos del ADN, dirigiendo la transcripción a través de la regulación de actividad genética (Darnell et al., 1994; Ehret et al., 2001; Milner et al., 2015).

STAT3 está codificado en humanos por el gen *STAT3* (Akira et al., 1994), su localización citogénica en humanos es 17q21.2 (Choi et al., 1996). Se han descrito dos isoformas, que han sido identificadas como STAT3 α (770-aminoácidos y 92 kDa) y STAT3 β (722-aminoácidos y 84 kDa) (Caldenhoven et

al., 1996; Shao et al., 2001; Zhong et al., 1994). El dominio de transactivación de STAT3 β al estar truncado, sugiere un rol regulador dominante negativo de STAT3 α (Caldenhoven et al., 1996), además, STAT3 α desempeña un rol funcional más significativo (Ng et al., 2012). Por esta razón, centraremos nuestro estudio en STAT3 α , al cual llamaremos STAT3.

STAT3 se activa con la fosforilación del residuo de tirosina Tyr705, lo que le permite dimerizarse. Junto con la fosforilación de tirosina, STAT3 también se puede activar por medio de la fosforilación de serina (Ser727), comúnmente regulada por la familia de proteína quinasa C (PKC), proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la quinasa 5 dependiente de ciclina (CDK5) (Levy & Lee, 2002; Villarino et al., 2015). El efecto de la fosforilación de Ser727 en la transcripción del gen STAT3 es variado y depende de la quinasa fosforilante, así como del tipo de célula, lo que probablemente determina la disponibilidad de otros factores de transcripción y proteínas que ayudan a STAT3 a unirse a la quinasa (Avalle & Poli, 2018). En general, se sugiere que pSerSTAT3 trabaje con pTyrSTAT3 para activar la transcripción mediada por STAT3 (Wen et al., 1995; Abe et al., 2001; Shen et al., 2004) probablemente mediante el reclutamiento de proteínas coactivadoras (Lee et al., 2009; Lufei et al., 2007; Schuringa et al., 2001). Sin embargo, hay casos en los que pSerSTAT3 parece contrarrestar la función de pTyrSTAT3 (Mandal et al., 2014).

Además, de las fosforilaciones de tirosina (pTyrSTAT3) y serina (pSerSTAT3), STAT3 tiene otras modificaciones postraduccionales que incluyen acetilaciones, metilaciones y ubiquitinaciones (Bharadwaj et al., 2020). Se ha sugerido que la acetilación es fundamental para formar dímeros STAT3 estables que pueden unirse eficazmente al ADN (Yuan et al., 2005), también se ha relacionado con el silenciamiento de genes (Lee et al., 2012). Así mismo, la metilación postraducciona es un mecanismo por cuya actividad transcripcional STAT3 está regulada en algunas células cancerosas (Dasgupta et al., 2014; Yang et al., 2010). Por otro lado, STAT3 ha demostrado sufrir degradación mediante la vía ubiquitina-proteasoma (Aggarwal et al., 2009).

3.4 Funciones de STAT3 en la respuesta inmune

Una de las funciones más estudiadas de STAT3 es su rol regulador en la respuesta inmune (Fu, 2006). STAT3 forma parte de la vía de señalización de citoquinas tales como IL-6, IL-10, IL-21 e IL-23 (Woś & Tabarkiewicz, 2021) y es crítico en la diferenciación de los linfocitos Th17 (Durant et al., 2010). Estudios en animales y en humanos han demostrado que la ausencia o pérdida de la función de este factor de transcripción produce deficiencias severas en la diferenciación de los linfocitos Th17, aumentando el riesgo de infecciones mucocutáneas (Cypowyj et al., 2012; Li et al., 2018). Esto se debe a que STAT3 es un regulador positivo clave de la expresión de ROR γ t (Korn et al., 2009). Una vez activado por las citoquinas proinflamatorias, IL-6, IL-21 e IL-23, STAT3 regula positivamente la expresión de ROR γ t, IL-21 y el receptor de IL-23 (Halwani et al., 2017). Todas estas moléculas son cruciales en el desarrollo y estabilización de células Th17 (Laurence et al., 2007; Nishihara et al., 2007; Yang et al., 2007; Zhou et al., 2007). Además, STAT3 participa activamente en el desarrollo de la inmunidad innata (Welte et al., 2003). Aunque no es imprescindible para la granulopoyesis basal (Lee et al., 2002), también se ha demostrado que regula etapas críticas de ésta (Hillmer et al., 2016; Shah et al., 2018). La activación de STAT3 media la movilización de neutrófilos en la médula ósea (Boettcher et al., 2014; Cheers et al., 1988; Lieschke et al., 1994), la liberación de neutrófilos en la circulación (Nguyen-Jackson et al., 2010; Panopoulos et al., 2006) y la quimiotaxis de neutrófilos (Nguyen-Jackson et al., 2012) participando en las respuestas proinflamatorias (Gao et al., 2018). Además, mantiene la integridad de las barreras epiteliales a nivel intestinal, ovárico, tímico, entre otras (Levy & Lee, 2002; Takeda et al., 1999).

En estudios donde se evalúan a individuos con síndrome de hiper IgE autosómico dominante (HIES), quienes poseen una deficiencia autosómica en el gen que codifica para STAT3, se ha descrito también una muerte anticipada de neutrófilos (Farmand et al., 2018). Además, Taylor et al. (2016) demostraron que IL-6 e IL-23 inducen la fosforilación STAT3 en neutrófilos en un modelo *in vitro* animal de queratitis fúngica. También se ha descrito que la activación de STAT3 participa específicamente en la diferenciación de monocitos a macrófagos

(Vasamsetti et al., 2015). Por lo tanto, STAT3 podría cumplir un rol en periodontitis ya que participa en la diferenciación y regulación de células como Th17 y neutrófilos, implicadas en la destrucción de tejidos (Aujla et al., 2007).

3.5 STAT3 en periodontitis

Aunque la activación de STAT3 no ha sido evaluada en humanos, estudios *in vitro* han observado la activación de STAT3 en células del ligamento periodontal humano cuando se estimulan con IL-1 β e IL-6 (Ambili & Janam, 2017). Por otro lado, evaluaciones directas de STAT3 en tejidos gingivales en modelos de periodontitis inducida por ligadura en ratas Wistar, han determinado una activación significativa de este factor de transcripción con estados de inflamación periodontal (de Souza et al., 2011; Garcia de Aquino et al., 2009) indicando una asociación entre la inflamación de los tejidos periodontales y la activación de STAT3. A nivel óseo, se ha vinculado la pérdida de hueso alveolar al modelo de la ligadura (Abe & Hajishengallis, 2013; de Molon et al., 2018; Marchesan et al., 2018). Cabe agregar que estudios recientes han asociado la inhibición de STAT3 como factor protector en la pérdida de hueso alveolar en modelos experimentales de periodontitis inducidos por ligadura en ratas (Zhang et al., 2020) y en modelos experimentales de periodontitis inducida por *Porphyromonas gingivalis* en ratones (Zhang et al., 2021).

Estudios indirectos de STAT3 en periodontitis, como los trabajos realizados con *P. gingivalis*, importante patobionte asociado a periodontitis, han determinado que es capaz de disminuir la expresión del supresor de la expresión de citoquinas 3 (SOCS-3); proteína que inhibe la actividad de la vía JAK/STAT, modulando así un aumento en la activación de STAT3 (Li et al., 2020; Moffatt & Lamont, 2011). La calprotectina, macromolécula expresada durante la enfermedad periodontal, aumenta las expresiones de IL-6 y RANKL a través de las vías de señalización MAPK y STAT3 en células similares a los osteocitos (Takagi et al., 2020). En modelos de periodontitis apical, la activación de JAK2-STAT3 aumenta con la progresión de la inflamación en los tejidos periodontales y en áreas de infiltración de inflamación, jugando un rol importante en el proceso de resorción ósea

periapical y osteoclastogénesis (Wang et al., 2019). Por otro lado, se ha observado que la vitamina D (25-hidroxivitamina D3) disminuye la activación de TLR4 y JAK1/STAT3, atenuando así la destrucción de tejidos en un modelo de diabetes en ratones con periodontitis experimental inducida con *P. gingivalis* (Wang et al., 2013).

De estos trabajos se podría inferir que la activación de STAT3 podría estar asociada con la destrucción de los tejidos durante la periodontitis y que, por otro lado, la inhibición de STAT3 disminuiría la señalización de citoquinas inflamatorias, retrasando la destrucción de los tejidos periodontales (Bae et al., 2015).

3.6 Modelo experimental de periodontitis

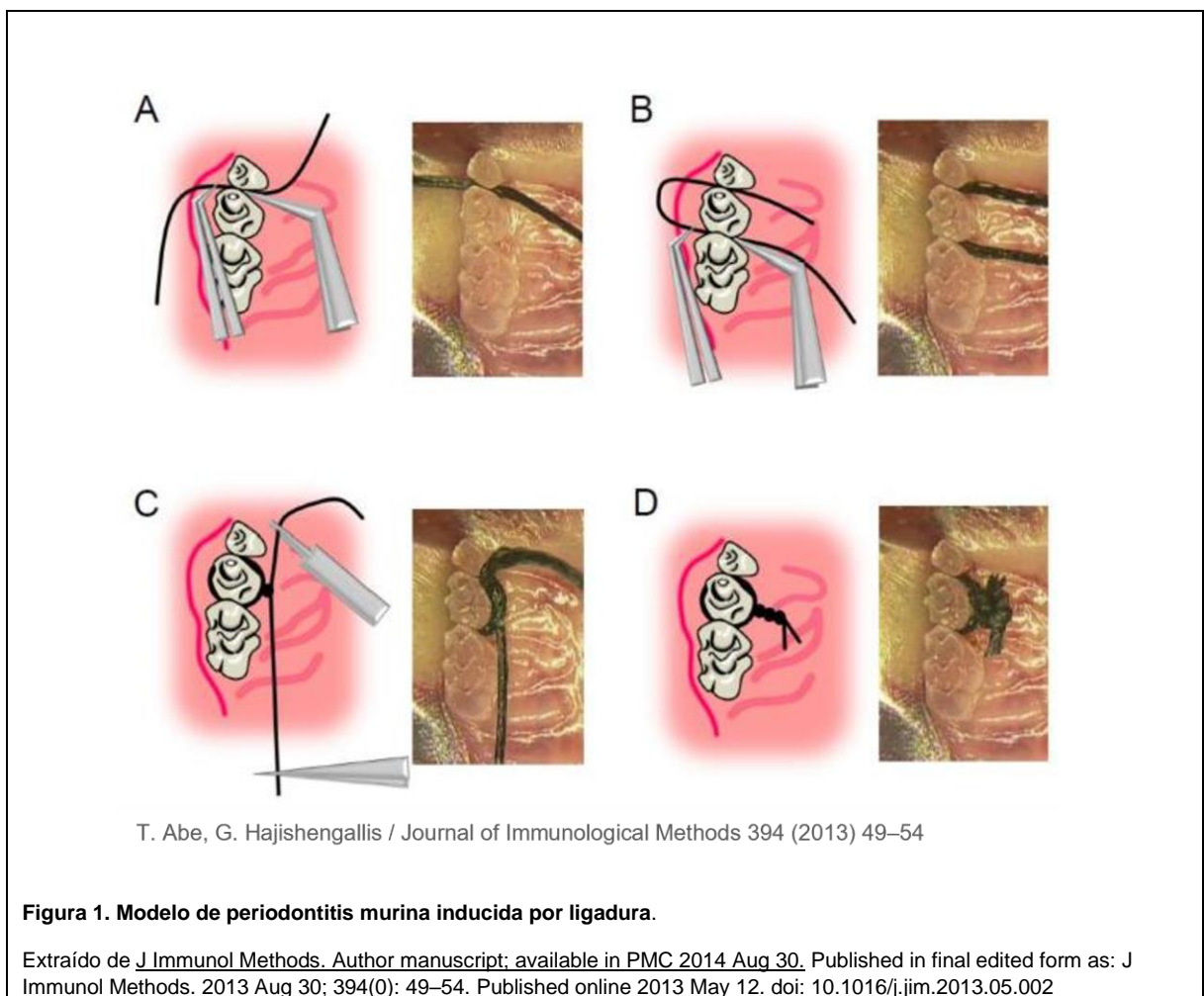
Los modelos animales experimentales son herramientas fundamentales para investigar mecanismos de la patogénesis periodontal y probar nuevos enfoques terapéuticos. Son útiles para lograr una aproximación a las relaciones de causa y efecto que no es posible realizar en estudios clínicos en humanos y que son difíciles de demostrar en estudios *in vitro* por su incapacidad de replicar la complejidad de las interacciones cruzadas que se producen entre la respuesta inmunitaria, el microbioma y el tejido del hospedero (Hajishengallis et al., 2015).

Existen distintos modelos animales de enfermedad periodontal y cada uno tiene sus ventajas y desventajas. Los primates no humanos son los más parecidos a la condición humana, sin embargo, su costo y problemas de cría impiden su uso generalizado. Mientras los roedores son menos costosos y más fáciles de manejar, aunque no reproducen todos los aspectos de la progresión de la periodontitis, constituyen el modelo más conveniente y versátil para la investigación de los mecanismos inmunopatológicos de esta patología (Oz & Puleo, 2011).

Un método sencillo es el modelo de periodontitis inducida por ligadura en ratón, presentado por Abe & Hajishengallis (2013), en el cual se identificó que el segundo molar superior es el sitio más apropiado para evaluar la pérdida ósea inflamatoria de una manera válida y reproducible (Figura 1). Este modelo permite

que la enfermedad pueda iniciarse en un momento conocido, con una secuencia predecible de eventos que culminan en la pérdida de hueso alveolar en unos pocos días en ratones y ratas (Abe et al., 2012; Bezerra et al., 2000; Graves et al., 2008; Li & Amar, 2007).

El modelo inducido por ligadura tiene un alto grado de semejanza con la entidad clínica y puede ser un complemento muy completo para ayudar a dilucidar la complejidad de la patología (Bosshardt, 2018). Se cree que las ligaduras son un factor promotor de la formación de placa y con esto facilitan la acumulación local de bacterias, aumentando los niveles de citoquinas proinflamatorias e infiltración celular, dando como resultando inflamación local, destrucción del tejido conectivo periodontal y la pérdida de hueso alveolar mediado por bacterias (Breivik & Rook, 2000; Graves et al., 2008; Holzhausen et al., 2002).



3.7 Planteamiento del problema

Estudios han demostrado que la vía de señalización STAT3 está involucrada en procesos mediados por el sistema inmune (Hillmer et al., 2016). Así también, STAT3 es un factor clave en la respuesta del hospedero durante el curso de la inflamación y de la destrucción de los tejidos de soporte de los dientes (Cavalcante et al., 2012; de Souza et al., 2011; Garcia de Aquino et al., 2009). Sin embargo, no se sabe si pSTAT3 podría estar expresada en estadios tempranos y/o tardíos de la inflamación gingival en periodontitis. Hasta el momento de realizar esta tesis, no existían estudios que investigaran pSTAT3 durante la progresión de la enfermedad periodontal, sólo investigaciones que han medido la expresión de pSTAT3 fosforilada en tirosina en modelos animales en otros contextos inflamatorios; como en lesiones de reperfusión en isquemia retiniana (RIRI) (Wang et al., 2022), malaria (Shi et al., 2008) y colitis (Wick et al., 2014). Además, la expresión de STAT3T junto a la activación de pSTAT3 no ha sido muy estudiada, más que en el modelo de malaria (Shi et al., 2008), en el modelo de RIRI (Wang et al., 2022) y en un modelo *in vitro* de células vasculares de musculatura lisa de pacientes con hipertensión (Sun et al., 2008). Es por esto, que la caracterización de la activación de STAT3 durante las distintas etapas de la inflamación de los tejidos periodontales nos podría proporcionar valiosa información sobre la cinética de este factor de transcripción en la patogénesis de la periodontitis para la mejor comprensión de esta vía de señalización molecular y para su posible elección como blanco terapéutico.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1 HIPÓTESIS

STAT3 se encuentra activado en etapas tempranas y en etapas tardías de la inflamación gingival durante periodontitis experimental.

4.2 OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la activación de STAT3, en etapas tempranas (2 horas a 3 días) y tardías (5 a 7 días) de la inflamación gingival durante periodontitis experimental.

4.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Detectar pSTAT3 mediante la fosforilación en Tyr705 (pTyrSTAT3) en tejidos gingivales durante etapas tempranas (2 horas a 3 días) y tardías (5 a 7 días) de periodontitis experimental y en tejidos sanos.
2. Detectar pSTAT3 mediante la fosforilación en Ser727 (pSerSTAT3) en tejidos gingivales durante etapas tempranas (2 horas a 3 días) y tardías (5 a 7 días) de periodontitis experimental y en tejidos sanos.
3. Determinar la pérdida ósea alveolar en ratones durante periodontitis experimental (en etapas tempranas y tardías) y salud periodontal.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

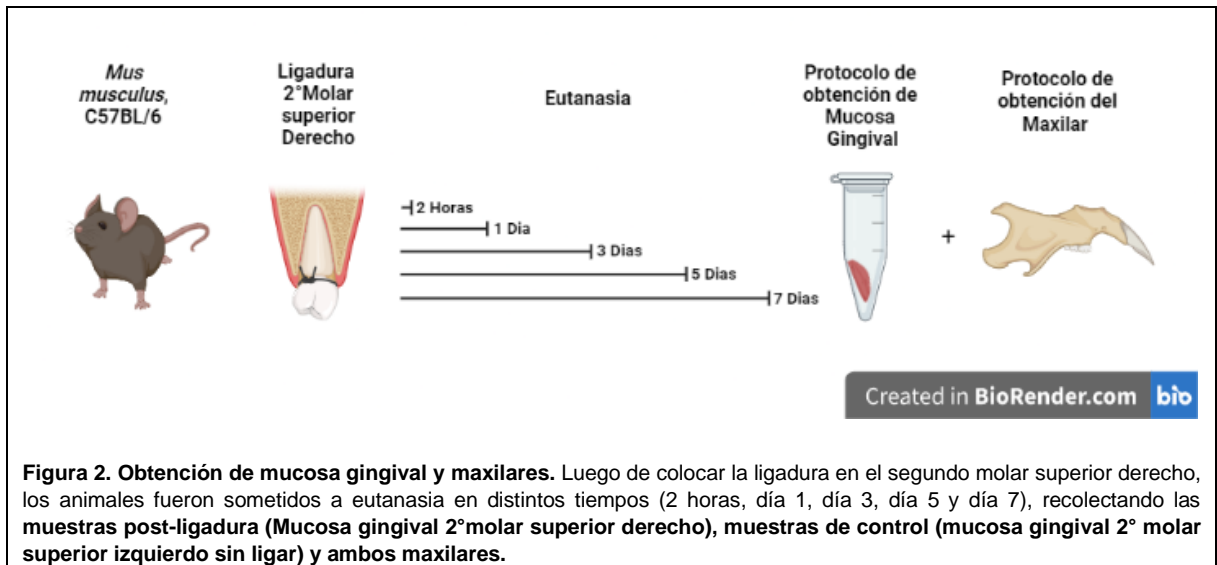
El presente anteproyecto se encuentra adscrito al proyecto FONDECYT Iniciación 11180389 (Anexo 1).

5.1 Animales

Las muestras de tejido gingival que se analizaron en la presente tesis se obtuvieron de experimentos que se realizaron en animales *Mus musculus*, 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), Universidad de Chile (Protocolo FOUCH 181113, anexo 2). 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 & Hajishengallis (2013), en el cual se situó una ligadura (seda 5-0) alrededor del segundo molar superior derecho, de esta manera la ligadura promovió la acumulación de placa con la subsecuente inflamación gingival. Los molares izquierdos se mantuvieron sin ligadura para el análisis de control en mucosa gingival sana. Luego, los animales fueron sometidos a eutanasia a las 2 horas, 1, 3, 5 y 7 días posteriores a la colocación de la ligadura, procediendo a recolectar la mucosa gingival y ambos maxilares para su análisis (Figura 2).



El tejido gingival inflamado y no inflamado fue diseccionado de forma estandarizada con un bisturí de hoja nº15, obteniendo el tejido que rodea los molares y la ligadura (Dutzan et al., 2018). Una vez obtenidas las muestras, fueron congeladas y mantenidas a -80°C hasta el momento de su análisis.

5.3 Preparación de las muestras de tejidos gingivales

5.3.1 Extracción de proteínas

En primer lugar, las muestras fueron descongeladas rápidamente, pesadas y sumergidas en buffer T-PER™ (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) en una solución de 1:20 (peso/volumen), al cual se le adicionó una mezcla de inhibidores de proteasa cOmplete™ (Sigma-Aldrich, Alemania) y fosfatasa PhosSTOP™ (Sigma-Aldrich, Alemania) según las indicaciones del fabricante y posteriormente se aclararon por centrifugación. A continuación, los tejidos se disgregaron utilizando primero un bisturí de hoja nº15 y luego un homogeneizador de mesa de alta energía BeadBug™ (Benchmark Scientific, EEUU). Los sobrenadantes se transfirieron a un nuevo tubo y se congelaron a -80°C para ser utilizados en análisis posteriores.

5.3.2 Cuantificación de proteínas totales

La cuantificación de las proteínas totales presentes en el sobrenadante se realizó a través del método del ácido bicinconínico (BCA). Este método combina la reducción de Cu^{+2} a Cu^{+1} por proteínas (Reacción de Biuret), con la alta sensibilidad y selectividad de la detección colorimétrica del catión Cu^{+1} usando un reactivo único que contiene BCA. El color producido por esta reacción es estable y aumenta de forma proporcional a concentraciones crecientes de proteínas (Smith et al., 1985). En un pocillo de una microplaca (rango de trabajo = 20-2000 $\mu\text{g/mL}$), se depositaron 25 μL de cada muestra, a continuación, se agregaron 200 μL de preparación del reactivo de trabajo BCA a cada pocillo, mezclando en un agitador de placas durante 30 segundos. Luego, cada placa se cubrió con una lámina de parafina y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente para medir la absorbancia a 562 nm en espectrofotómetro (Synergy). La concentración de proteínas se obtuvo utilizando una curva estándar realizada con concentraciones conocidas de proteínas. Finalmente, las muestras fueron resuspendidas en una concentración de 1 mg/mL.

5.4 Evaluación de pSTAT3 en tejidos gingivales

5.4.1 Separación de proteínas mediante electroforesis:

La separación de proteínas se realizó en condiciones denaturantes, utilizando el método de Laemmli. Las proteínas fueron solubilizadas llevándolas a una temperatura de 95°C , durante 5 minutos. Se agregaron 40 μg de proteína total a un buffer de carga que contenía Tris-HCl, glicerol, dodecilsulfato de sodio (SDS) y 2-Mercaptoetanol (2-ME). Posteriormente, todo el volumen de cada muestra se cargó en los pocillos de los geles de poliacrilamida-SDS al 10%. Las proteínas fueron separadas usando electroforesis en presencia de Buffer Tris-Glicina-SDS a 100 V (Voltaje cte.), durante 90 minutos.

5.4.2 Electro-Transferencia:

El gel de electroforesis se transfirió a membranas de nitrocelulosa de 0,45 μM utilizando corriente constante de 300 mA durante 60 min en buffer de Tris-

Glicina. La revisión de la transferencia se llevó a cabo mediante una incubación con rojo Ponceau 0,1% en un medio al 0,5% de ácido acético.

5.4.3 Bloqueo de la membrana:

La membrana se traspasó a un pocillo de bloqueo y se cubrió con solución de bloqueo que contenía 5% peso/volumen BSA, TBS y 0,1% Tween-20, dejando en movimiento durante 1 hora a temperatura ambiente.

5.4.4 Inmunoblot:

La fosforilación de STAT3 en los puntos de tiempo descritos se evaluó utilizando anticuerpos que reconocen STAT3 total y fosforilado en Tyr705 y Ser727 (Cell Signaling Technology, EE. UU.). Las membranas fueron incubadas durante toda la noche a 4°C en concentraciones de 1:1000 (STAT3 total), 1:2000 (Tyr705) y 1:1000 (Ser727) en una solución que contenía 5% peso/volumen BSA, TBS y 0,1% Tween-20. Como control de carga se utilizó un anticuerpo GAPDH a una concentración de 1:1000.

Una vez incubadas con el anticuerpo primario, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente asociado a la enzima HRP (Horseradish peroxidase). Previo a la incubación con el anticuerpo secundario, las membranas fueron lavadas 3 veces por 5 minutos con una solución TBS-Tween 20.

5.4.5 Revelado de p-STAT3

Las bandas se detectaron por quimioluminiscencia utilizando el reactivo Clarity Western ECL (BIO-RAD, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La señal quimioluminiscente fue detectada utilizando el documentador Omega Lum™ G imaging system. Las bandas obtenidas se cuantificaron por densitometría utilizando el software ImageJ (NIH, Bethesda, EE. UU.).

5.5 Mediciones de la pérdida ósea

Los maxilares superiores se limpiaron de todo el tejido blando para facilitar las mediciones de pérdida ósea, luego se sumergieron en tinciones de eosina y azul de metileno.

Para determinar la pérdida ósea alveolar murina durante la progresión de la periodontitis experimental, nos basamos en Abe & Hajishengallis (2013). Se analizó la pérdida ósea alveolar representada mediante la distancia medible en milímetros, presente entre el límite amelo cementario (LAC) y la cresta ósea alveolar (COA) que se obtuvo a partir de 6 puntos predeterminados. Ellos fueron CP3M; cúspide palatina tercer molar, CPD2M; cúspide palatino distal segundo molar, SP2M; surco palatino segundo molar, CPM2M; cúspide palatino mesial segundo molar, CPD1M; cúspide palatina distal primer molar, SPD1M; surco palatino distal primer molar (Figura 6A). Luego estas distancias LAC-COA fueron promediadas en cada muestra de los tejidos ligados y en las muestras de control.

Las imágenes se obtuvieron bajo un microscopio estereoscópico (Stemi 508, Carl Zeiss, Alemania) y una cámara (AxioCam 208, Carl Zeiss, Alemania) y se analizaron mediante el software ImageJ (NIH, Bethesda, EE.UU.).

5.6 Análisis y estadística

Para detectar una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de animales experimentales (ligados y control) y lograr una potencia estadística del 80% y una seguridad del 95%, se utilizó un tamaño de muestra de al menos 5 animales por grupo. Para obtener ese número, se consideró las medias y las desviaciones estándar informadas para Th17 en tejidos gingivales murinos (Dutzan et al., 2017). También consideramos que los animales son singénicos y la eficacia de la periodontitis inductora de ligaduras es cercana al 100%. El tamaño de la muestra se calculó con el software en línea OpenEpi (www.openepi.com).

Los datos obtenidos de STAT3 fosforilada en tirosina, serina y sin fosforilar fueron normalizados contra la señal de GAPDH (proteína de expresión constitutiva o housekeeping (HK)). Con estos datos se tabuló la cuantificación relativa de pTyrSTAT3, pSerSTAT3 y STAT3T de las muestras de tejido gingival murino obtenidas a las 2 horas, 1, 3, 5 y 7 días, posterior a la ligadura en el modelo de periodontitis experimental, versus la cuantificación relativa de pTyrSTAT3, pSerSTAT3 y STAT3T de las muestras control. Además, se tabuló la cuantificación relativa de pTyrSTAT3, pSerSTAT3 y STAT3T de las muestras de

tejido gingival murino agrupadas en las etapas tempranas (2 horas a 3 días) y en las etapas tardías (5 a 7 días) posterior a la ligadura en el modelo de periodontitis experimental, versus la cuantificación relativa pTyrSTAT3, pSerSTAT3 y STAT3T de las muestras control.

Con los datos obtenidos de las muestras de pérdida ósea, se tabularon los promedios de la distancia en milímetros entre el LAC y el COA de las muestras de tejido de los ligados a las 2 horas, 1, 3, 5 y 7 días posterior a la ligadura, versus la distancia en milímetros entre el LAC y el COA de los tejidos de control. Además, se tabularon los promedios de la distancia en milímetros entre el LAC y el COA, de las muestras de tejido de los ligados, agrupadas en las etapas temprana (2 horas a 3 días) y tardías (5 a 7 días), posterior a la ligadura, versus la distancia en milímetros entre el LAC y el COA de las muestras control.

Estos resultados se graficaron y analizaron estadísticamente utilizando el software Prism 9 (GraphPad Software, Inc.) y se informó como media \pm S.E.M. donde correspondió. El análisis de la distribución de datos se realizó mediante la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Además, las diferencias entre los grupos experimentales se determinaron mediante la prueba Ordinary one way ANOVA para comparaciones múltiples de datos no apareados, donde *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas si el valor de p < 0,05.

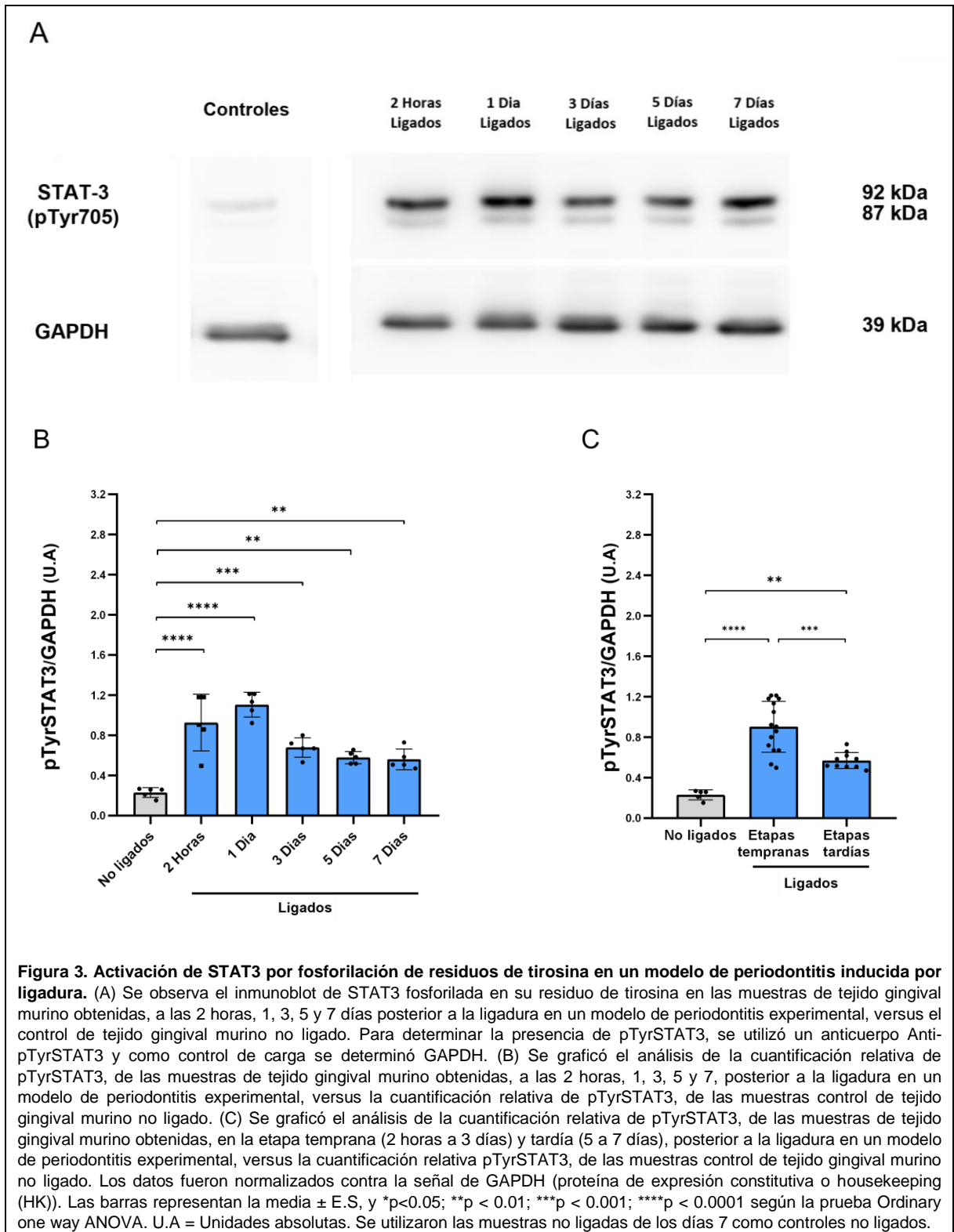
6. RESULTADOS

6.1 Detección de STAT3 fosforilada en tirosina en tejidos gingivales de ratones durante etapas tempranas y tardías de periodontitis experimental

Al revelar la membrana de nitrocelulosa obtenida del ensayo Western blot para pTyrSTAT3, se obtuvieron dos bandas (acorde al peso molecular de STAT3), éstas fueron: STAT3 α (92 kDa) y STAT3 β (84 kDa), y utilizando como control GAPDH (37 kDa). Con esto se confirmó la presencia de la proteína pTyrSTAT3 en sus dos isoformas y de la proteína GAPDH, en los tejidos gingivales ligados y en los tejidos gingivales de control. Como se puede apreciar en la imagen (Figura 3A), la cantidad de GAPDH es constante en todas las muestras, y la cantidad de pTyrSTAT3 es mayor en las muestras de los ligados que en las muestras de control, particularmente a las 2 horas, 1 y 7 días

La cuantificación relativa de pTyrSTAT3 de las muestras de tejido gingival ligado para cada uno de los tiempos estudiados, comparada con la cuantificación relativa de pTyrSTAT3 en los tejidos gingivales de control (Figura 3B), indicó que existe un aumento de pTyrSTAT3/GAPDH con diferencias significativas en cada uno de los días posteriores a la ligadura, con respecto a los controles. La mayor diferencia ocurrió en los dos primeros días y luego del día 2, hubo una disminución que se mantuvo constante.

La cuantificación relativa de pTyrSTAT3 de las muestras de tejido gingival ligado, agrupadas en las etapas tempranas (2 horas a 3 días) y etapas tardías (5 a 7 días), versus la cuantificación relativa pTyrSTAT3 de las muestras de control (Figura 3C), indicó que en las etapas tempranas y en las etapas tardías, la cantidad de pTyrSTAT3/GAPDH en los tejidos ligados, es significativamente mayor que la cantidad de pTyrSTAT3/GAPDH en los tejidos de control. Además, la cantidad de pTyrSTAT3/GAPDH de las etapas tempranas en los tejidos ligados, es significativamente mayor que la cantidad de pTyrSTAT3/GAPDH de las etapas tardías en los tejidos ligados.

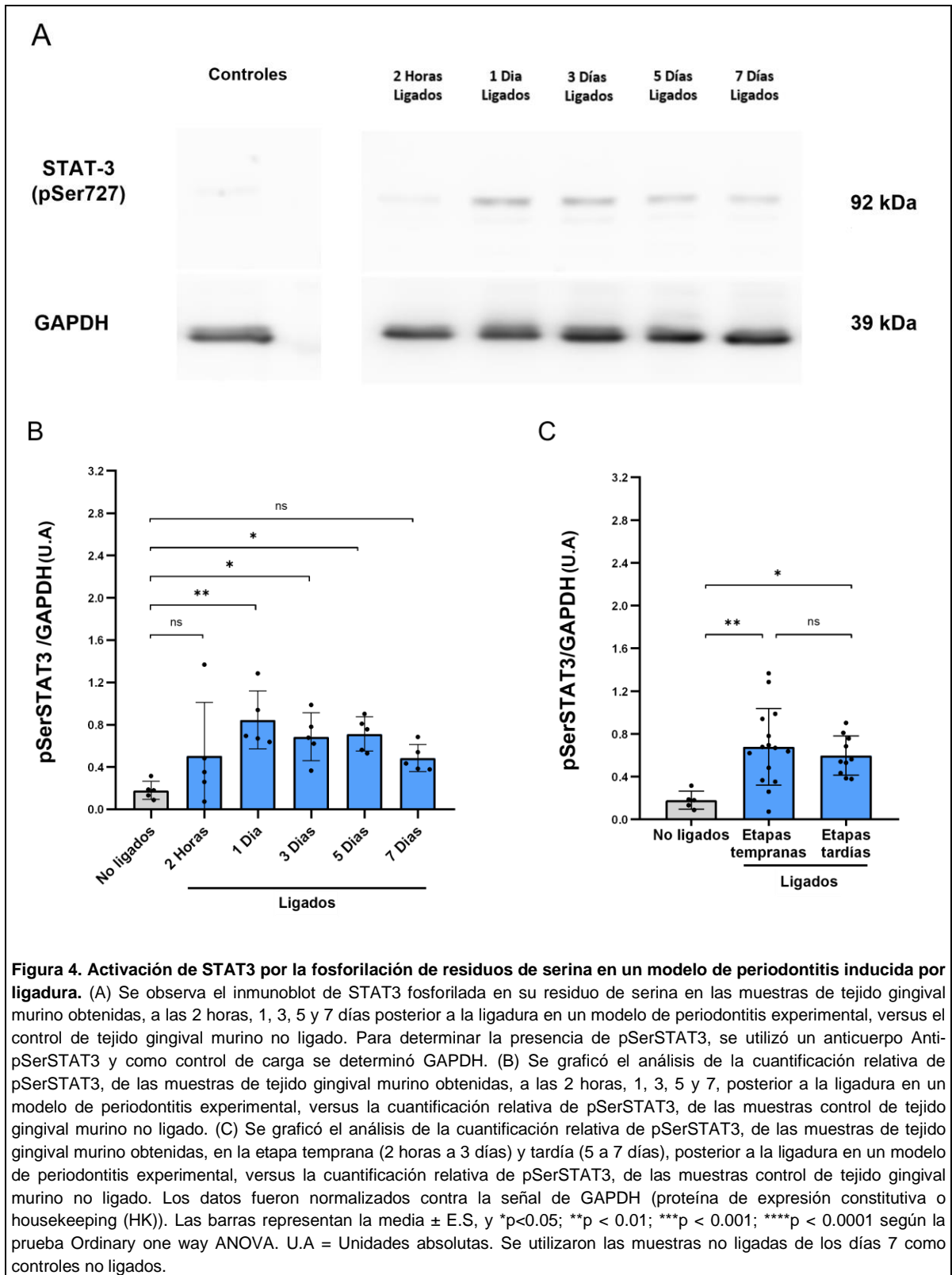


6.2 Detección de STAT3 fosforilada en serina 727 en tejidos gingivales de ratones durante las etapas tempranas y tardías de periodontitis experimental

Al revelar la membrana de nitrocelulosa obtenida del ensayo Western blot para pSerSTAT3, se obtuvo una banda de acorde al peso molecular de STAT3 α (92 kDa), además de la banda correspondiente a GAPDH (37 kDa). Con esto se confirmó la presencia de la proteína pSerSTAT3 en su isoforma α y de la proteína GAPDH, en los tejidos gingivales ligados y en los tejidos gingivales de control. Como se puede apreciar en la imagen (Figura 4A), la cantidad de GAPDH es constante en todas las muestras, y la cantidad de pSerSTAT3 es mayor en los tejidos ligados que en los controles, particularmente los días 1, 3 y 5.

La cuantificación relativa de pSerSTAT3 de las muestras de tejido gingival ligado para cada uno de los tiempos estudiados, comparada con la cuantificación relativa de pSerSTAT3 en los tejidos gingivales de control (Figura 4B), indicó que existe un aumento con diferencias significativas en los días 1, 3 y 5 y no significativas a las 2 horas ni al día 7, con respecto a los tejidos no ligados. En donde la mayor diferencia ocurrió en el día 1 y luego se mantuvo constante en los días 3 y 5.

La cuantificación relativa de pSerSTAT3 de las muestras de tejido gingival ligado, agrupadas en las etapas tempranas (2 horas a 3 días) y etapas tardías (5 a 7 días), versus la cuantificación relativa pSerSTAT3 de las muestras de control (Figura 4C), indicó que la cantidad de pSerSTAT3/GAPDH en las etapas tempranas y tardías en los tejidos ligados, es significativamente mayor que la cantidad de pSerSTAT3/GAPDH en los tejidos de control. Además, no hay diferencias significativas de la cantidad de pSerSTAT3/GAPDH, entre las etapas tempranas y las etapas tardías, en los tejidos ligados.



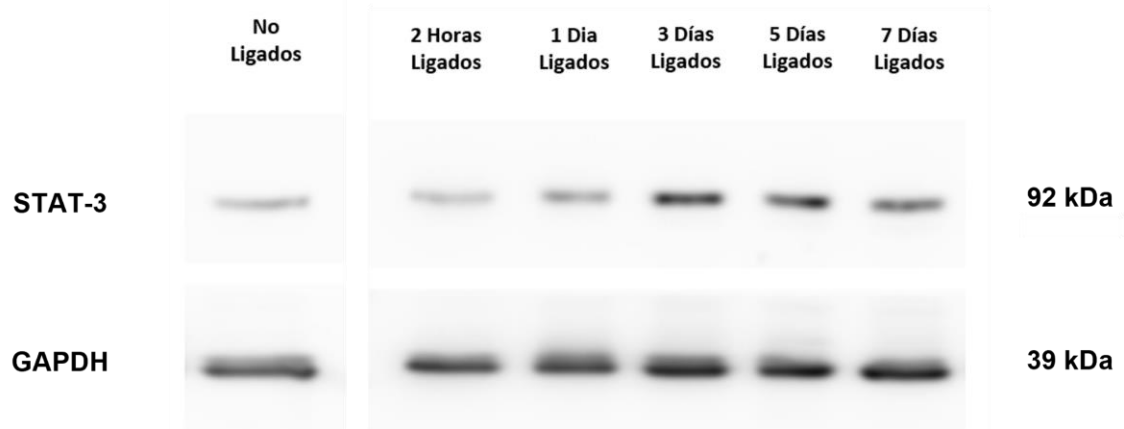
6.3 Detección de STAT3 total en tejidos gingivales murino durante las etapas tempranas y tardías de periodontitis experimental

Al revelar la membrana de nitrocelulosa obtenida del ensayo Western blot para STAT3T, se obtuvo una banda de acorde al peso molecular de STAT3 α (92 kDa), además de la banda correspondiente a GAPDH (37 kDa). Con esto se confirmó la presencia de la proteína STAT3T en sus dos isoformas y de la proteína GAPDH, en los tejidos gingivales ligados y en los tejidos gingivales de control. Como se puede apreciar en la imagen (Figura 5A), la cantidad de GAPDH es constante en todas las muestras y la cantidad de STAT3T tiene un leve aumento los días 3 y 5 en el grupo experimental respecto al grupo control.

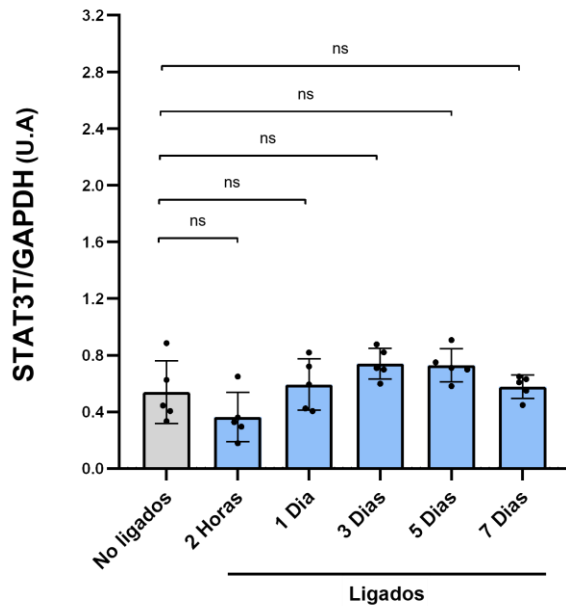
La cuantificación relativa de STAT3T de las muestras de tejido gingival ligado para cada uno de los tiempos estudiados, comparada con la cuantificación relativa de STAT3T en los tejidos gingivales de control (Figura 5B), indicó que, en los tejidos ligados, no ocurrió una diferencia significativa de STAT3T/GAPDH, en ninguno de los días posteriores a la ligadura con respecto a STAT3T/GAPDH de los controles.

La cuantificación relativa de STAT3T de las muestras de tejido gingival ligado, agrupadas en las etapas tempranas (2 horas a 3 días) y etapas tardías (5 a 7 días), versus la cuantificación relativa STAT3T de las muestras de control (Figura 5C), indicó que no hay diferencias significativas de STAT3T/GAPDH entre los tejidos ligados y no ligados, en etapas tempranas ni tardías. Tampoco existen diferencias significativas de STAT3T/GAPDH entre las etapas tempranas y tardías de los tejidos ligados.

A



B



C

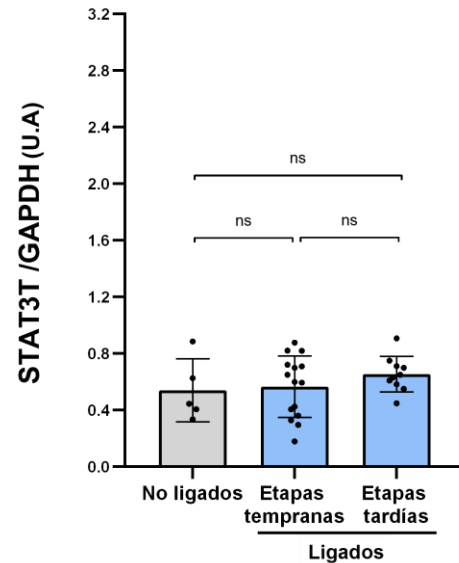


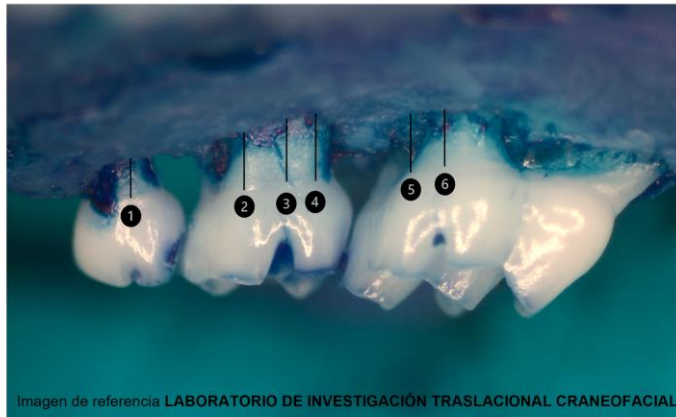
Figura 5. STAT3 total en un modelo de periodontitis inducida por ligadura. (A) Se observa el inmunoblot de STAT3 total en las muestras de tejido gingival murino obtenidas, a las 2 horas, 1, 3, 5 y 7 días posterior a la ligadura en un modelo de periodontitis experimental, versus el control de tejido gingival murino no ligado. Para determinar la presencia de STAT3T, se utilizó un anticuerpo anti-STAT3 y como control de carga se determinó GAPDH. (B) Se graficó el análisis de la cuantificación relativa de STAT3 total, de las muestras de tejido gingival murino obtenidas, a las 2 horas, 1, 3, 5 y 7, posterior a la ligadura en un modelo de periodontitis experimental, versus la cuantificación relativa de STAT3 total, de las muestras control de tejido gingival murino no ligado. (C) Se graficó el análisis de la cuantificación relativa de STAT3 total, de las muestras de tejido gingival murino obtenidas, en la etapa temprana (2 horas a 3 días) y tardía (5 a 7 días), posterior a la ligadura en un modelo de periodontitis experimental, versus la cuantificación relativa de STAT3 total, de las muestras control de tejido gingival murino no ligado. Los datos fueron normalizados contra la señal de GAPDH (proteína de expresión constitutiva o housekeeping (HK)). Las barras representan la media \pm E.S. y * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ según la prueba Ordinary one way ANOVA. U.A = Unidades absolutas. Se utilizaron las muestras no ligadas de los días 7 como controles no ligados.

6.4 Determinación de la pérdida ósea alveolar murina durante periodontitis experimental

La determinación de la distancia LAC-COA de las muestras de tejido óseo de los ligados para cada uno de los tiempos estudiados, comparada con la determinación de la distancia LAC-COA de las muestras de tejido óseo de los controles (Figura 6B), indicó que no existe una diferencia significativa entre las 2 horas y los 3 días posteriores a la ligadura, con respecto a los controles y a partir del día 5 aumenta la distancia de forma creciente y significativamente con respecto a los controles. Además, la diferencia de la distancia LAC-COA entre el día 5 y el día 7, también es significativa (Figura 6B).

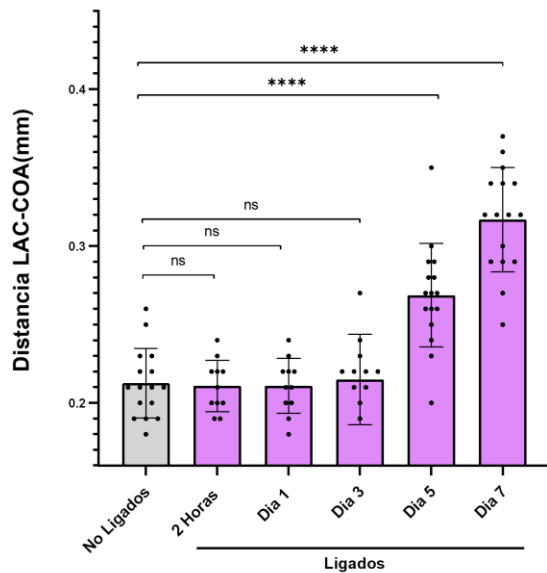
La determinación de la distancia LAC-COA de las muestras de tejido óseo de los ligados, agrupados en etapas tempranas (2 horas a 3 días) y etapas tardías (5 a 7 días), comparada con la determinación de la distancia LAC-COA de las muestras de tejido óseo de los controles (Figura 6C), indicó que la distancia LAC-COA de las muestras de las etapas tempranas de los ligados no aumentó significativamente con respecto a la distancia LAC-COA de los controles y la distancia LAC-COA de las muestras de las etapas tardías de los ligados, aumentó significativamente con respecto a la distancia LAC-COA de los controles. Además, la distancia LAC-COA de las muestras de las etapas tardías de los ligados, es significativamente mayor a la distancia LAC-COA de las muestras de las etapas tempranas de los ligados.

A



- ① CP3M ④ CPM2M
- ② CPD2M ⑤ CPD1M
- ③ SP2M ⑥ SPD1M

B



C

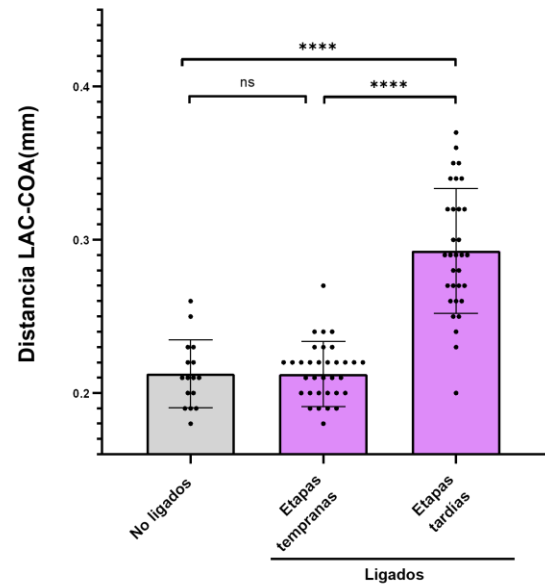


Figura 6. Promedio de las distancias LAC-COA, en un modelo de periodontitis inducida por ligadura. (A) Se observan las líneas de medición de la distancia desde el límite amelo cementario (LAC) hasta la cresta ósea alveolar (COA), en molares del lado ligado. CP3M; cúspide palatina tercer molar, CPD2M; cúspide palatino distal segundo molar, SP2M; surco palatino segundo molar, CPM2M; cúspide palatino mesial segundo molar, CPD1M; cúspide palatina distal primer molar, SPD1M; surco palatino distal primer molar. (B) Se graficó el análisis de los promedios de la distancia en milímetros entre el LAC y el COA, a las 2 horas, 1, 3, 5 y 7 días posterior a la ligadura, de tejido óseo alveolar murino durante la progresión de un modelo de periodontitis experimental, versus la distancia en milímetros entre el LAC y el COA del tejido óseo alveolar murino no ligado. (C) Se graficó el análisis de los promedios de la distancia en milímetros entre el LAC y el COA, en a las etapas tempranas (2 horas a 3 días) y tardías (5 días a 7 días) posterior a la ligadura, de tejido óseo alveolar murino durante la progresión de un modelo de periodontitis experimental, versus la distancia en milímetros entre el LAC y el COA del tejido óseo alveolar murino no ligado. Las barras representan la media \pm E.S, y * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ según la prueba Ordinary one way ANOVA. Se utilizaron las muestras no ligadas de los días 7 como controles no ligados.

7. DISCUSIÓN

Existe vasta evidencia que describe el rol de la proteína STAT3 como mediadora en la regulación de diferentes subtipos celulares de la respuesta inmune innata como adaptativa (Bharadwaj et al., 2020). Se postula que STAT3 participa en procesos inflamatorios y de destrucción ósea involucrados en periodontitis (Cavalcante et al., 2012; Souza et al., 2012). Sin embargo, los antecedentes que hemos encontrado en la literatura hasta el momento no son suficientes para hacer una descripción cuantitativa de STAT3 total y de sus formas fosforiladas durante la progresión de la periodontitis. Por lo anterior, este estudio evaluó la activación de STAT3, en sus etapas tempranas (2 horas a 3 días) y tardías (5 a 7 días) durante la inflamación gingival en un modelo de periodontitis experimental inducida por ligadura, logrando detectar una activación de STAT3 en Tyr705 y en Ser727 en los tejidos ligados durante etapas tempranas y tardías del modelo de periodontitis experimental en comparación con los tejidos sanos. Además, se determinó que, durante la progresión de la periodontitis experimental, existe una pérdida ósea alveolar significativa a partir de las etapas tardías (5 a 7 días) en comparación a los tejidos sanos.

7.1 Activación de STAT3 en etapas iniciales de la inflamación gingival

STAT3 desempeña un rol fundamental en muchos procesos biológicos celulares involucrados en las respuestas proinflamatorias (Gao et al., 2018). La activación de STAT3 mediante su fosforilación en tirosina es clave para que se lleven a cabo estos procesos (Bharadwaj et al., 2020; Yuan et al., 2005).

En nuestro análisis de la activación de STAT3 por fosforilación de tirosina en los tejidos ligados en el modelo de periodontitis experimental, constatamos que, a las 2 horas hay activación de STAT3 con respecto a los no ligados. Es probable que esta activación temprana, esté dada por el actuar del sistema inmune en las barreras epiteliales, mediante el desencadenamiento de reacciones proinflamatorias, en respuesta al estrés mecánico y a la acumulación de placa que genera la ligadura en los tejidos gingivales (Breivik & Rook, 2000; Graves et al., 2008; Holzhausen et al., 2002). Al respecto, se debe considerar la participación de

STAT3 en la protección y defensa de las barreras mucosas frente a infecciones en pacientes con AD-HIES (Bharadwaj et al., 2020). De igual modo, la evidencia indica que pTyrSTAT3 y pSerSTAT3 participan en la cicatrización de heridas en la fase inicial de las etapas inflamatorias que siguen a la lesión tisular (Dauer et al., 2005). Así también, se ha descrito que en procesos inflamatorios en donde las barreras mucosas se ven afectadas -tales como en colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn's-, en las cuales existe un aumento de los niveles de la proteína STAT3. Por último, se debe tomar en cuenta la correlación de mayores niveles de pTyrSTAT3 y el grado histológico de inflamación (Kasembeli et al., 2018; Mudter et al., 2005; Musso et al., 2005).

Esta respuesta temprana, en una primera instancia podría ser inespecífica y, por tanto, mediada por la inmunidad innata, lo que es respaldado por investigaciones que señalan que STAT3 se encuentra activado en células inmunes del estroma y queratinocitos, principalmente en procesos de diferenciación, proliferación e inhibición de la apoptosis (Fasanaro et al., 2015; Luo et al., 2014; Wu et al., 2003), también se ha asociado a vasodilatación y aumento de la permeabilidad de los capilares sanguíneos y junto a esto, mediante procesos de quimiotaxis, al aumento del reclutamiento de neutrófilos, monocitos, macrófagos, linfocitos y plasmocitos, en el tejido conectivo (Kurgan & Kantarci, 2018).

Dentro del contexto de la respuesta inmune innata, un estudio de Wick et al. (2014), en colitis por *Bacteroides fragilis enterotoxigénico* (ETBF), diseñado para investigar el curso temporal y la distribución celular de la activación de STAT3 en ratones colonizados con ETBF, describió que tanto la inflamación intestinal como la activación de pSTAT3 de las células epiteliales intestinales ocurrieron en ausencia de células T y B. Con estos resultados, los autores sugirieron que las células inmunitarias adaptativas no son necesarias para la inducción de la inflamación del colon por ETBF. Esto es coherente con la idea de que, en nuestro modelo de periodontitis animal, la activación de STAT3 en las etapas tempranas podría prescindir de la inmunidad adaptativa y, por tanto, en los primeros instantes donde se está desarrollando la inmunidad adaptativa, la respuesta del hospedero

podría estar mediada principalmente por la respuesta inmune innata. Sin embargo, estas conclusiones requieren más estudios al respecto.

Por otra parte, al analizar la fosforilación de STAT3 en serina 727, en nuestros resultados, podemos constatar que en los tejidos ligados hay mayor cantidad de pSerSTAT3 en las etapas tempranas y tardías en comparación con los no ligados, aunque esta activación en serina no ocurre previo al día 1 y decrece luego del día 5, lo cual sugiere que la fosforilación en serina podría jugar un rol como coadyuvante y de estabilización de la fosforilación en tirosina. Ello se explicaría debido a que la serina se fosforila previo al mayor grado de expresión de pTyrSTAT3 y se disipa luego del día 5 cuando la fosforilación en tirosina ha alcanzado una fase estacionaria. Autores como Schuringa et al. (2001) y Lufei et al. (2007), han postulado que la fosforilación de STAT3 en serina, en algunos casos trabajaría junto a la fosforilación en tirosina de forma sinérgica para activar la transcripción mediada por STAT3, otorgándole mayor eficiencia a STAT3 probablemente mediante el reclutamiento de proteínas coactivadoras (Lufei et al., 2007; Schuringa et al., 2001). Sin embargo, para aclarar esto, se requieren más antecedentes, lo cual puede ser un motivo de nuevas preguntas de estudio.

Estos resultados recopilados durante las etapas tempranas abren la posibilidad a futuras investigaciones que deseen conocer cuáles son las células en donde STAT3 se fosforila prematuramente y si estas células son las mismas encargadas de mantener la integridad de las barreras epiteliales y de la defensa inmune innata e inespecífica durante los inicios de la inflamación gingival.

7.2 Activación de STAT3 en etapas tardías de la inflamación gingival

Al analizar la activación de STAT3 por fosforilación en tirosina, en las etapas tardías, constatamos una significativa activación de STAT3 en tirosina durante toda la progresión de la periodontitis experimental. Sin embargo, cabe mencionar que a partir del tercer día en las muestras de tejidos ligados ocurre una disminución de la cantidad de pTyrSTAT3. Disminución que se estabiliza y mantiene relativamente constante durante las etapas tardías.

Estos resultados son bastante esperables debido a que, como ha sido descrito anteriormente, la fosforilación de la vía canónica de STAT3, es crítica en la diferenciación de los linfocitos Th17, formando parte de la vía de señalización de citoquinas tales como IL-6, IL-10, IL-21 e IL-23 (Kane et al., 2014). Esta diferenciación de las células Th17 sería necesaria en la progresión de los procesos proinflamatorios y de destrucción de los tejidos de soporte dentales durante la periodontitis (Huang et al., 2022).

Por otro lado, los resultados de la fosforilación de STAT3 en serina, nos indican que, en las muestras de los tejidos ligados, no hay diferencias significativas de pSerSTAT3 en las etapas tardías respecto a las etapas tempranas.

Estos datos nos indican que la activación de STAT3 es significativa durante toda la progresión de los procesos inflamatorios de la periodontitis experimental y de destrucción de los tejidos de soporte dentarios. Mas pTyrSTAT3 no es constante ni creciente a través del tiempo, sino que más bien existiría una etapa inicial de alta actividad y luego de estabilización de esta vía a partir de las etapas tardías.

Aunque hasta el momento no hay estudios que describan la activación de STAT3 en periodontitis a través del tiempo, Wang et al. (2022), mediante un modelo animal de lesión por reperfusión por isquemia retiniana (RIRI) describieron la activación de STAT3 en distintos tiempos; en donde la proteína activada pSTAT3 aumentó desde el tiempo 0 horas, alcanzando una expresión máxima entre las 6 y 72 horas, que luego disminuyó gradualmente. También Shi et al. (2008), en un modelo de malaria en ratones infectados con bacterias, que buscaba evaluar el balance dinámico entre pSTAT1 y pSTAT3; obtuvieron un aumento en la expresión de pSTAT3, en los días 1 y 3 y luego una disminución al día 7. Estos resultados son muy similares a los obtenidos por nosotros en el modelo de periodontitis animal a través del tiempo. Por su parte, en el trabajo citado previamente de Wick et al. (2014), al evaluar la inflamación de colon inducida por ETBF, describieron un aumento significativo en las expresiones de pSTAT3

mediante inmunohistoquímica con un comportamiento decreciente en las etapas tardías, lo cual igualmente es concordante con nuestras observaciones.

7.3 STAT3T en las etapas tempranas y tardías de la inflamación gingival

La cantidad relativa de STAT3 total se mantuvo constante sin diferencias significativas al comparar tanto las etapas tempranas y tardías de los tejidos ligados con no ligados, como al comparar las etapas tempranas y tardías de los ligados entre sí.

Estos resultados son consecuentes con lo descrito en la literatura con respecto a que las fosforilaciones de STAT3 en sus residuos de tirosina y serina, ya que dichas fosforilaciones son necesarias para ejercer sus funciones en la vía de señalización canónica de STAT3 (Levy & Lee, 2002), y por lo tanto, para su participación en la modulación en parte de los procesos inflamatorios que se desencadenan en la periodontitis (Hu et al., 2021). A partir de esta información podemos suponer que para ejercer su función no se requiere una mayor síntesis de STAT3T, ya que, la mayor actividad es dependiente de sus fosforilaciones y por eso en nuestros resultados no hay un aumento de STAT3T en el tiempo. Podemos contrastar lo obtenido con un estudio de Shi et al. (2008), en donde no se obtuvieron diferencias significativas en las cantidades de STAT3 entre los días 1 al 28, así mismo, Sun et al. (2008), utilizando un tiempo más acotado, describieron STAT3T entre 0 y 120 minutos, mediante Western blot, y al igual que nosotros, no obtuvieron un aumento STAT3T a través del tiempo. Por otra parte, en el trabajo de Wang et al. (2022), la intensidad de la expresión de proteínas STAT3 tuvo una tendencia similar a pSTAT3, observándose un aumento inicial y luego una disminución. Ambos estudios que podrían ser comparables con nuestro modelo en el tiempo son contradictorios, respecto al comportamiento de STAT3T en el tiempo, por lo cual resulta difícil llegar a una conclusión definitiva y deja abierta la pregunta a futuras investigaciones.

7.4 Pérdida ósea alveolar durante las etapas tempranas y tardías de la inflamación gingival.

Diversos estudios han analizado STAT3 y la disminución de la altura ósea en periodontitis experimental inducidas por ligadura, entre ellos, Abe y Hajishengallis (2013), quienes describieron una pérdida significativa desde el día 3 por palatino y desde el día 5 por vestibular, y que esta pérdida continuaba progresivamente hasta el día 8 (Abe & Hajishengallis, 2013). Lo mismo ha sido descrito por Marchesan et al. (2018), quienes determinaron que desde el día 6 se constató una variación significativa, y que ésta continuó hasta los 12 días post inducción de la enfermedad. De Molon et al. (2018), observaron desde el día 3, una pérdida significativa en la zona distal del segundo molar e interproximal con el primer molar.

Al observar lo que ocurre a nivel óseo, nuestros datos son concluyentes y están en la misma línea de los estudios que se han realizado hasta el momento sobre la vía STAT3 y la pérdida ósea alveolar en el contexto de la periodontitis. En nuestro análisis, la pérdida ósea mediante la medición de la distancia entre el límite amelo cementario (LAC) con la cresta ósea alveolar (COA) aumentó con el progreso de la enfermedad. A partir del día 5 la distancia LAC-COA se volvió significativamente mayor en las muestras de hueso alveolar del lado ligado versus sus controles, evidenciando una marcada destrucción ósea alveolar en las etapas tardías de la periodontitis experimental inducida por ligadura.

7.5 Activación de STAT3 y su asociación con la pérdida ósea alveolar.

Se ha vinculado la disminución de la altura ósea alveolar con el modelo animal de periodontitis inducida por ligadura (Abe & Hajishengallis, 2013; de Molon et al., 2018). También Zhang et al. (2020), mediante un modelo de periodontitis animal inducida por ligadura, investigaron el tratamiento intermitente de la hormona paratiroidea (1-34)(iPTH), inhibiendo a STAT3 y previniendo así, la pérdida de hueso alveolar al mejorar la osteogénesis y suprimir la resorción ósea durante los movimientos ortodónticos en ratas con periodontitis. Zhang et al. (2021), demostraron el efecto protector de la pérdida ósea, mediante C188-9,

inhibidor de STAT3, en un modelo de periodontitis animal en ratones inducida por *P. gingivalis*.

Estos antecedentes son concordantes con los resultados obtenidos por nuestro estudio, durante las etapas tempranas y tardías de la progresión de la periodontitis en el modelo de ligadura, donde encontramos que STAT3 se encuentra activada por fosforilación en tirosina y serina. Además, podemos confirmar que el proceso de destrucción ósea se establece en las etapas tardías del modelo de periodontitis y está asociado a la activación de la vía STAT3 que pudimos describir en los tejidos gingivales, en donde la activación que se obtiene en pTyrSTAT3 precede a la pérdida ósea, lo que se puede explicar debido a que la fosforilación de STAT3 está asociada a la diferenciación de los linfocitos Th17, los cuales participan en los procesos de destrucción de los tejidos de soporte durante la periodontitis (Huang et al., 2022).

Nuestros hallazgos sugieren que la activación de STAT3 no está asociada a un momento específico en la respuesta del hospedero frente a la periodontitis, sino más bien, participa transversalmente durante toda la respuesta inmune, con distintos grados de expresión en el tiempo. Esta posible participación transversal tanto del sistema inmune innato como adaptativo, podría ser la razón por la que hay altas cantidades de pTyrSTAT3 durante toda la progresión del modelo de periodontitis animal con mayores niveles en los días iniciales.

La cinética de pSTAT3 descrita en este trabajo, contribuye al conocimiento que se tienen actualmente en torno a la proteína STAT3 en la periodontitis y puede ayudar a la elaboración de futuras preguntas de investigación que se relacionen con esta vía de señalización. Además, aporta antecedentes a la actual discusión, en la que algunos autores proponen a la vía STAT3 como un posible blanco farmacológico para el manejo de la periodontitis, en aquellos casos donde los tratamientos tradicionales pueden no ser suficientes. Sin embargo, se requieren más estudios para comprender a cabalidad los mecanismos moleculares involucrados en la patogénesis de la enfermedad y así avanzar en una posible modulación.

Tomando en consideración la evidencia presentada podemos sugerir que el estudio y comprensión de los procesos patológicos de la periodontitis son claves para generar conocimiento que ayude a mejorar significativamente el bienestar individual y el de la población.

8. CONCLUSIONES

La fosforilación de STAT3 en las etapas tempranas y tardías, nos indica que esta proteína podría participar en los procesos inflamatorios y de destrucción ósea alveolar durante la progresión de la periodontitis experimental. La cinética de pSTAT3 descrita en nuestros resultados, nos entrega nuevos antecedentes para la investigación en torno al desarrollo de tratamientos que proponen a STAT3 como posible blanco farmacológico en el tratamiento de la periodontitis.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Aaronson, D. S., & Horvath, C. M. (2002). A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science*, 296(5573), 1653-1655. <https://doi.org/10.1126/science.1071545>
- Abe, T., & Hajishengallis, G. (2013). Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *J Immunol Methods*, 394(1-2), 49-54. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2013.05.002>
- Abe, T., Hosur, K. B., Hajishengallis, E., Reis, E. S., Ricklin, D., Lambris, J. D., & Hajishengallis, G. (2012). Local complement-targeted intervention in periodontitis: proof-of-concept using a C5a receptor (CD88) antagonist. *J Immunol*, 189(11), 5442-5448. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202339>
- Aggarwal, B. B., Kunnumakkara, A. B., Harikumar, K. B., Gupta, S. R., Tharakan, S. T., Koca, C., . . . Sung, B. (2009). Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship? *Ann N Y Acad Sci*, 1171, 59-76. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04911.x>
- Albandar, J. M. (2014). Aggressive and acute periodontal diseases. *Periodontol 2000*, 65(1), 7-12. <https://doi.org/10.1111/prd.12013>
- Ambili, R., & Janam, P. (2017). A critique on nuclear factor-kappa B and signal transducer and activator of transcription 3: The key transcription factors in periodontal pathogenesis. *J Indian Soc Periodontol*, 21(5), 350-356. https://doi.org/10.4103/jisp.jisp_301_16
- Armitage, G. C. (1995). Clinical evaluation of periodontal diseases. *Periodontol 2000*, 7, 39-53. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1995.tb00035.x>
- Aujla, S. J., Dubin, P. J., & Kolls, J. K. (2007). Th17 cells and mucosal host defense. *Semin Immunol*, 19(6), 377-382. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2007.10.009>
- Avalle, L., & Poli, V. (2018). Nucleus, Mitochondrion, or Reticulum? STAT3 à La Carte. *Int J Mol Sci*, 19(9). <https://doi.org/10.3390/ijms19092820>

- Bae, W. J., Shin, M. R., Kang, S. K., Zhang, J., Kim, J. Y., Lee, S. C., & Kim, E. C. (2015). HIF-2 Inhibition Suppresses Inflammatory Responses and Osteoclastic Differentiation in Human Periodontal Ligament Cells. *J Cell Biochem*, 116(7), 1241-1255. <https://doi.org/10.1002/jcb.25078>
- Bezerra, M. M., de Lima, V., Alencar, V. B., Vieira, I. B., Brito, G. A., Ribeiro, R. A., & Rocha, F. A. (2000). Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol*, 71(6), 1009-1014. <https://doi.org/10.1902/jop.2000.71.6.1009>
- Bharadwaj, U., Kasembeli, M. M., Robinson, P., & Tweardy, D. J. (2020). Targeting Janus Kinases and Signal Transducer and Activator of Transcription 3 to Treat Inflammation, Fibrosis, and Cancer: Rationale, Progress, and Caution. *Pharmacol Rev*, 72(2), 486-526. <https://doi.org/10.1124/pr.119.018440>
- Boettcher, S., Gerosa, R. C., Radpour, R., Bauer, J., Ampenberger, F., Heikenwalder, M., . . . Manz, M. G. (2014). Endothelial cells translate pathogen signals into G-CSF-driven emergency granulopoiesis. *Blood*, 124(9), 1393-1403. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-04-570762>
- Bosshardt, D. D. (2018). The periodontal pocket: pathogenesis, histopathology and consequences. *Periodontol* 2000, 76(1), 43-50. <https://doi.org/10.1111/prd.12153>
- Breivik, T., & Rook, G. A. (2000). Prevacination with SRL172 (heat-killed *Mycobacterium vaccae*) inhibits experimental periodontal disease in Wistar rats. *Clin Exp Immunol*, 120(3), 463-467. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2000.01231.x>
- Caldenhoven, E., van Dijk, T. B., Solari, R., Armstrong, J., Raaijmakers, J. A., Lammers, J. W., . . . de Groot, R. P. (1996). STAT3beta, a splice variant of transcription factor STAT3, is a dominant negative regulator of transcription. *J Biol Chem*, 271(22), 13221-13227. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.22.13221>
- Cavalcante, L. B., Tanaka, M. H., Pires, J. R., Apponi, L. H., Aparecida Giro, E. M., Valentini, S. R., . . . Scarel-Caminaga, R. M. (2012). Expression of the interleukin-10 signaling pathway genes in individuals with Down syndrome

- and periodontitis. *J Periodontol*, 83(7), 926-935.
<https://doi.org/10.1902/jop.2011.110056>
- Chapple, I. L. (2014). Time to take periodontitis seriously. *Bmj*, 348, g2645.
<https://doi.org/10.1136/bmj.g2645>
- Chapple, I. L. C., Mealey, B. L., Van Dyke, T. E., Bartold, P. M., Dommisch, H., Eickholz, P., . . . Yoshie, H. (2018). Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*, 89 Suppl 1, S74-s84. <https://doi.org/10.1002/jper.17-0719>
- Cheers, C., Haigh, A. M., Kelso, A., Metcalf, D., Stanley, E. R., & Young, A. M. (1988). Production of colony-stimulating factors (CSFs) during infection: separate determinations of macrophage-, granulocyte-, granulocyte-macrophage-, and multi-CSFs. *Infect Immun*, 56(1), 247-251.
<https://doi.org/10.1128/iai.56.1.247-251.1988>
- Choi, J. Y., Li, W. L., Kouri, R. E., Yu, J., Kao, F. T., & Ruano, G. (1996). Assignment of the acute phase response factor (APRF) gene to 17q21 by microdissection clone sequencing and fluorescence in situ hybridization of a P1 clone. *Genomics*, 37(2), 264-265.
<https://doi.org/10.1006/geno.1996.0556>
- Cypowyj, S., Picard, C., Maródi, L., Casanova, J. L., & Puel, A. (2012). Immunity to infection in IL-17-deficient mice and humans. *Eur J Immunol*, 42(9), 2246-2254. <https://doi.org/10.1002/eji.201242605>
- Darnell, J. E., Jr. (2002). Transcription factors as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2(10), 740-749. <https://doi.org/10.1038/nrc906>
- Darnell, J. E., Jr., Kerr, I. M., & Stark, G. R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, 264(5164), 1415-1421.
<https://doi.org/10.1126/science.8197455>
- Dasgupta, M., Unal, H., Willard, B., Yang, J., Karnik, S. S., & Stark, G. R. (2014). Critical role for lysine 685 in gene expression mediated by transcription

- factor unphosphorylated STAT3. *J Biol Chem*, 289(44), 30763-30771. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.603894>
- Dauer, D. J., Ferraro, B., Song, L., Yu, B., Mora, L., Buettner, R., . . . Haura, E. B. (2005). Stat3 regulates genes common to both wound healing and cancer. *Oncogene*, 24(21), 3397-3408. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208469>
- De Benedetti, F., Rucci, N., Del Fattore, A., Peruzzi, B., Paro, R., Longo, M., . . . Teti, A. (2006). Impaired skeletal development in interleukin-6-transgenic mice: a model for the impact of chronic inflammation on the growing skeletal system. *Arthritis Rheum*, 54(11), 3551-3563. <https://doi.org/10.1002/art.22175>
- de Molon, R. S., Park, C. H., Jin, Q., Sugai, J., & Cirelli, J. A. (2018). Characterization of ligature-induced experimental periodontitis. *Microsc Res Tech*, 81(12), 1412-1421. <https://doi.org/10.1002/jemt.23101>
- de Souza, J. A., Nogueira, A. V., de Souza, P. P., Cirelli, J. A., Garlet, G. P., & Rossa, C., Jr. (2011). Expression of suppressor of cytokine signaling 1 and 3 in ligature-induced periodontitis in rats. *Arch Oral Biol*, 56(10), 1120-1128. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.03.022>
- Durant, L., Watford, W. T., Ramos, H. L., Laurence, A., Vahedi, G., Wei, L., . . . O'Shea, J. J. (2010). Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. *Immunity*, 32(5), 605-615. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.003>
- Dutzan, N., Kajikawa, T., Abusleme, L., Greenwell-Wild, T., Zuazo, C. E., Ikeuchi, T., . . . Moutsopoulos, N. M. (2018). A dysbiotic microbiome triggers T(H)17 cells to mediate oral mucosal immunopathology in mice and humans. *Sci Transl Med*, 10(463). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat0797>
- Dutzan, N., Konkel, 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. <https://doi.org/10.1038/mi.2015.136>
- Ehret, G. B., Reichenbach, P., Schindler, U., Horvath, C. M., Fritz, S., Nabholz, M., & Bucher, P. (2001). DNA binding specificity of different STAT proteins.

- Comparison of in vitro specificity with natural target sites. *J Biol Chem*, 276(9), 6675-6688. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001748200>
- Farmand, S., Kremer, B., Häffner, M., Pütsep, K., Bergman, P., Sundin, M., . . . Henriques-Normark, B. (2018). Eosinophilia and reduced STAT3 signaling affect neutrophil cell death in autosomal-dominant Hyper-IgE syndrome. *Eur J Immunol*, 48(12), 1975-1988. <https://doi.org/10.1002/eji.201847650>
- Fasanaro, E., Staffieri, C., Cappelleso, R., Marino, F., Ottaviano, G., Val, M., . . . Marioni, G. (2015). Prognostic Significance of Serine-Phosphorylated STAT3 Expression in pT1-T2 Oral Tongue Carcinoma. *Clin Exp Otorhinolaryngol*, 8(3), 275-280. <https://doi.org/10.3342/ceo.2015.8.3.275>
- Fu, X. Y. (2006). STAT3 in immune responses and inflammatory bowel diseases. *Cell Res*, 16(2), 214-219. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310029>
- Gaffen, S. L. (2009). Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol*, 9(8), 556-567. <https://doi.org/10.1038/nri2586>
- Gaffen, S. L., & Hajishengallis, G. (2008). A new inflammatory cytokine on the block: re-thinking periodontal disease and the Th1/Th2 paradigm in the context of Th17 cells and IL-17. *J Dent Res*, 87(9), 817-828. <https://doi.org/10.1177/154405910808700908>
- Gamonal, J., Mendoza, C., Espinoza, I., Muñoz, A., Urzúa, I., Aranda, W., . . . Arteaga, O. (2010). Clinical attachment loss in Chilean adult population: First Chilean National Dental Examination Survey. *J Periodontol*, 81(10), 1403-1410. <https://doi.org/10.1902/jop.2010.100148>
- Gao, Y., Zhao, H., Wang, P., Wang, J., & Zou, L. (2018). The roles of SOCS3 and STAT3 in bacterial infection and inflammatory diseases. *Scand J Immunol*, 88(6), e12727. <https://doi.org/10.1111/sji.12727>
- Garcia de Aquino, S., Manzolli Leite, F. R., Stach-Machado, D. R., Francisco da Silva, J. A., Spolidorio, L. C., & Rossa, C., Jr. (2009). Signaling pathways associated with the expression of inflammatory mediators activated during the course of two models of experimental periodontitis. *Life Sci*, 84(21-22), 745-754. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.03.001>

- Graves, D. T., Fine, D., Teng, Y. T., Van Dyke, T. E., & Hajishengallis, G. (2008). The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *J Clin Periodontol*, 35(2), 89-105. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2007.01172.x>
- Hajishengallis, G. (2014). Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol*, 35(1), 3-11. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.09.001>
- Hajishengallis, G. (2015). Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol*, 15(1), 30-44. <https://doi.org/10.1038/nri3785>
- Hajishengallis, G., & Korostoff, J. M. (2017). Revisiting the Page & Schroeder model: the good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later. *Periodontol 2000*, 75(1), 116-151. <https://doi.org/10.1111/prd.12181>
- Hajishengallis, G., Lamont, R. J., & Graves, D. T. (2015). The enduring importance of animal models in understanding periodontal disease. *Virulence*, 6(3), 229-235. <https://doi.org/10.4161/21505594.2014.990806>
- Halwani, R., Sultana, A., Vazquez-Tello, A., Jamhawi, A., Al-Masri, A. A., & Al-Muhsen, S. (2017). Th-17 regulatory cytokines IL-21, IL-23, and IL-6 enhance neutrophil production of IL-17 cytokines during asthma. *J Asthma*, 54(9), 893-904. <https://doi.org/10.1080/02770903.2017.1283696>
- Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M., & Weaver, C. T. (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*, 6(11), 1123-1132. <https://doi.org/10.1038/ni1254>
- Hillmer, E. J., Zhang, H., Li, H. S., & Watowich, S. S. (2016). STAT3 signaling in immunity. *Cytokine Growth Factor Rev*, 31, 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2016.05.001>
- Holzhausen, M., Rossa Júnior, C., Marcantonio Júnior, E., Nassar, P. O., Spolidório, D. M., & Spolidório, L. C. (2002). Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature-induced

- periodontitis in rats. *J Periodontol*, 73(9), 1030-1036. <https://doi.org/10.1902/jop.2002.73.9.1030>
- Hu, Y., Zhang, X., Zhang, J., Xia, X., Li, H., Qiu, C., . . . Zhou, W. (2021). Activated STAT3 signaling pathway by ligature-induced periodontitis could contribute to neuroinflammation and cognitive impairment in rats. *J Neuroinflammation*, 18(1), 80. <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02071-9>
- Huang, D., Zhang, C., Wang, P., Li, X., Gao, L., & Zhao, C. (2022). JMJD3 Promotes Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide-Induced Th17-Cell Differentiation by Modulating the STAT3-RORc Signaling Pathway. *DNA Cell Biol*, 41(8), 778-787. <https://doi.org/10.1089/dna.2022.0149>
- Ivanov, I., McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelley, A., Lafaille, J. J., . . . Littman, D. R. (2006). The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*, 126(6), 1121-1133. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.035>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.01.015>
- Kasembeli, M. M., Bharadwaj, U., Robinson, P., & Tweardy, D. J. (2018). Contribution of STAT3 to Inflammatory and Fibrotic Diseases and Prospects for its Targeting for Treatment. *Int J Mol Sci*, 19(8). <https://doi.org/10.3390/ijms19082299>
- Kinane, D. F., Stathopoulou, P. G., & Papapanou, P. N. (2017). Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers*, 3, 17038. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.38>
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., & Kuchroo, V. K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*, 27, 485-517. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132710>
- Kornman, K. S. (2018). Contemporary approaches for identifying individual risk for periodontitis. *Periodontol* 2000, 78(1), 12-29. <https://doi.org/10.1111/prd.12234>

- Kurgan, S., & Kantarci, A. (2018). Molecular basis for immunohistochemical and inflammatory changes during progression of gingivitis to periodontitis. *Periodontol 2000*, 76(1), 51-67. <https://doi.org/10.1111/prd.12146>
- Laurence, A., Tato, C. M., Davidson, T. S., Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., . . . O'Shea J, J. (2007). Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity*, 26(3), 371-381. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.02.009>
- Lee, C. K., Raz, R., Gimeno, R., Gertner, R., Wistinghausen, B., Takeshita, K., . . . Levy, D. E. (2002). STAT3 is a negative regulator of granulopoiesis but is not required for G-CSF-dependent differentiation. *Immunity*, 17(1), 63-72. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(02\)00336-9](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(02)00336-9)
- Lee, H., Herrmann, A., Deng, J. H., Kujawski, M., Niu, G., Li, Z., . . . Yu, H. (2009). Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF-kappaB activity in tumors. *Cancer Cell*, 15(4), 283-293. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.02.015>
- Lee, H., Zhang, P., Herrmann, A., Yang, C., Xin, H., Wang, Z., . . . Yu, H. (2012). Acetylated STAT3 is crucial for methylation of tumor-suppressor gene promoters and inhibition by resveratrol results in demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(20), 7765-7769. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205132109>
- Lee, J. S., Tato, C. M., Joyce-Shaikh, B., Gulen, M. F., Cayatte, C., Chen, Y., . . . Cua, D. J. (2015). Interleukin-23-Independent IL-17 Production Regulates Intestinal Epithelial Permeability. *Immunity*, 43(4), 727-738. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.09.003>
- Leonard, W. J. (2001). Role of Jak kinases and STATs in cytokine signal transduction. *Int J Hematol*, 73(3), 271-277. <https://doi.org/10.1007/bf02981951>
- Levy, D. E., & Lee, C. K. (2002). What does Stat3 do? *J Clin Invest*, 109(9), 1143-1148. <https://doi.org/10.1172/jci15650>
- Li, C. H., & Amar, S. (2007). Morphometric, histomorphometric, and microcomputed tomographic analysis of periodontal inflammatory lesions in

- a murine model. *J Periodontol*, 78(6), 1120-1128. <https://doi.org/10.1902/jop.2007.060320>
- Li, J., Casanova, J. L., & Puel, A. (2018). Mucocutaneous IL-17 immunity in mice and humans: host defense vs. excessive inflammation. *Mucosal Immunol*, 11(3), 581-589. <https://doi.org/10.1038/mi.2017.97>
- Li, J., Li, L., Wang, X., & Xiao, L. (2020). Porphyromonas gingivalis Inhibition of MicroRNA-205-5p Expression Modulates Proinflammatory Cytokines in Gingival Epithelial Cells. *Biochem Genet*, 58(4), 566-579. <https://doi.org/10.1007/s10528-020-09957-y>
- Lieschke, G. J., Grail, D., Hodgson, G., Metcalf, D., Stanley, E., Cheers, C., . . . Dunn, A. R. (1994). Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood*, 84(6), 1737-1746.
- Lim, C. P., & Cao, X. (2006). Structure, function, and regulation of STAT proteins. *Mol Biosyst*, 2(11), 536-550. <https://doi.org/10.1039/b606246f>
- Linden, G. J., Lyons, A., & Scannapieco, F. A. (2013). Periodontal systemic associations: review of the evidence. *J Periodontol*, 84(4 Suppl), S8-s19. <https://doi.org/10.1902/jop.2013.1340010>
- Lufei, C., Koh, T. H., Uchida, T., & Cao, X. (2007). Pin1 is required for the Ser727 phosphorylation-dependent Stat3 activity. *Oncogene*, 26(55), 7656-7664. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210567>
- Luo, Z., Wang, H., Wu, Y., & Sun, Z. (2014). Clinical significance of IL-23 regulating IL-17A and/or IL-17F positive Th17 cells in chronic periodontitis. *Mediators Inflamm*, 2014, 627959. <https://doi.org/10.1155/2014/627959>
- Malakouti, M., Brown, G. E., Wang, E., Koo, J., & Levin, E. C. (2015). The role of IL-17 in psoriasis. *J Dermatolog Treat*, 26(1), 41-44. <https://doi.org/10.3109/09546634.2013.879093>
- Marchesan, J., Girnary, M. S., Jing, L., Miao, M. Z., Zhang, S., Sun, L., . . . Jiao, Y. (2018). An experimental murine model to study periodontitis. *Nat Protoc*, 13(10), 2247-2267. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0035-4>

- Milner, J. D., Vogel, T. P., Forbes, L., Ma, C. A., Stray-Pedersen, A., Niemela, J. E., . . . Cooper, M. A. (2015). Early-onset lymphoproliferation and autoimmunity caused by germline STAT3 gain-of-function mutations. *Blood*, *125*(4), 591-599. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-09-602763>
- Moffatt, C. E., & Lamont, R. J. (2011). Porphyromonas gingivalis induction of microRNA-203 expression controls suppressor of cytokine signaling 3 in gingival epithelial cells. *Infect Immun*, *79*(7), 2632-2637. <https://doi.org/10.1128/iai.00082-11>
- Mudter, J., Weigmann, B., Bartsch, B., Kiesslich, R., Strand, D., Galle, P. R., . . . Neurath, M. F. (2005). Activation pattern of signal transducers and activators of transcription (STAT) factors in inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol*, *100*(1), 64-72. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2005.40615.x>
- Musso, A., Dentelli, P., Carlino, A., Chiusa, L., Repici, A., Sturm, A., . . . Brizzi, M. F. (2005). Signal transducers and activators of transcription 3 signaling pathway: an essential mediator of inflammatory bowel disease and other forms of intestinal inflammation. *Inflamm Bowel Dis*, *11*(2), 91-98. <https://doi.org/10.1097/00054725-200502000-00001>
- Ng, I. H., Ng, D. C., Jans, D. A., & Bogoyevitch, M. A. (2012). Selective STAT3- α or - β expression reveals spliceform-specific phosphorylation kinetics, nuclear retention and distinct gene expression outcomes. *Biochem J*, *447*(1), 125-136. <https://doi.org/10.1042/bj20120941>
- Nguyen-Jackson, H., Panopoulos, A. D., Zhang, H., Li, H. S., & Watowich, S. S. (2010). STAT3 controls the neutrophil migratory response to CXCR2 ligands by direct activation of G-CSF-induced CXCR2 expression and via modulation of CXCR2 signal transduction. *Blood*, *115*(16), 3354-3363. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-240317>
- Nguyen-Jackson, H. T., Li, H. S., Zhang, H., Ohashi, E., & Watowich, S. S. (2012). G-CSF-activated STAT3 enhances production of the chemokine MIP-2 in bone marrow neutrophils. *J Leukoc Biol*, *92*(6), 1215-1225. <https://doi.org/10.1189/jlb.0312126>

- Nishihara, M., Ogura, H., Ueda, N., Tsuruoka, M., Kitabayashi, C., Tsuji, F., . . . Hirano, T. (2007). IL-6-gp130-STAT3 in T cells directs the development of IL-17+ Th with a minimum effect on that of Treg in the steady state. *Int Immunol*, *19*(6), 695-702. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxm045>
- Oz, H. S., & Puleo, D. A. (2011). Animal models for periodontal disease. *J Biomed Biotechnol*, *2011*, 754857. <https://doi.org/10.1155/2011/754857>
- Panopoulos, A. D., Zhang, L., Snow, J. W., Jones, D. M., Smith, A. M., El Kasmi, K. C., . . . Watowich, S. S. (2006). STAT3 governs distinct pathways in emergency granulopoiesis and mature neutrophils. *Blood*, *108*(12), 3682-3690. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-003012>
- Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D. H., . . . 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. *J Periodontol*, *89 Suppl 1*, 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., . . . Watt, R. G. (2019). Oral diseases: a global public health challenge. *Lancet*, *394*(10194), 249-260. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(19\)31146-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(19)31146-8)
- Petersen, P. E., & Ogawa, H. (2012). The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. *Periodontol 2000*, *60*(1), 15-39. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2011.00425.x>
- Pisarska, M. M., Dunne, M. R., O'Shea, D., & Hogan, A. E. (2020). Interleukin-17 producing mucosal associated invariant T cells - emerging players in chronic inflammatory diseases? *Eur J Immunol*. <https://doi.org/10.1002/eji.202048645>
- Sanz, M., Ceriello, A., Buyschaert, M., Chapple, I., Demmer, R. T., Graziani, F., . . . Vegh, D. (2018). Scientific evidence on the links between periodontal diseases and diabetes: Consensus report and guidelines of the joint workshop on periodontal diseases and diabetes by the International

- Diabetes Federation and the European Federation of Periodontology. *J Clin Periodontol*, 45(2), 138-149. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12808>
- Sanz, M., & Kornman, K. (2013). Periodontitis and adverse pregnancy outcomes: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Periodontol*, 84(4 Suppl), S164-169. <https://doi.org/10.1902/jop.2013.1340016>
- Schuringa, J. J., Schepers, H., Vellenga, E., & Kruijer, W. (2001). Ser727-dependent transcriptional activation by association of p300 with STAT3 upon IL-6 stimulation. *FEBS Lett*, 495(1-2), 71-76. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02354-7](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02354-7)
- Schwendicke, F., Dörfer, C. E., & Meier, T. (2018). Global smoking-attributable burden of periodontal disease in 186 countries in the year 2015. *J Clin Periodontol*, 45(1), 2-14. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12823>
- Seitz, M. W., Listl, S., Bartols, A., Schubert, I., Blaschke, K., Haux, C., & Van Der Zande, M. M. (2019). Current Knowledge on Correlations Between Highly Prevalent Dental Conditions and Chronic Diseases: An Umbrella Review. *Prev Chronic Dis*, 16, E132. <https://doi.org/10.5888/pcd16.180641>
- Shah, C. A., Broglie, L., Hu, L., Bei, L., Huang, W., Dressler, D. B., & Eklund, E. A. (2018). Stat3 and CCAAT enhancer-binding protein β (C/ebp β) activate Fanconi C gene transcription during emergency granulopoiesis. *J Biol Chem*, 293(11), 3937-3948. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000528>
- Shao, H., Quintero, A. J., & Tweardy, D. J. (2001). Identification and characterization of cis elements in the STAT3 gene regulating STAT3 alpha and STAT3 beta messenger RNA splicing. *Blood*, 98(13), 3853-3856. <https://doi.org/10.1182/blood.v98.13.3853>
- Shao, H., Xu, X., Mastrangelo, M. A., Jing, N., Cook, R. G., Legge, G. B., & Tweardy, D. J. (2004). Structural requirements for signal transducer and activator of transcription 3 binding to phosphotyrosine ligands containing the YXXQ motif. *J Biol Chem*, 279(18), 18967-18973. <https://doi.org/10.1074/jbc.M314037200>

- Shi, X., Qin, L., Liu, G., Zhao, S., Peng, N., & Chen, X. (2008). Dynamic balance of pSTAT1 and pSTAT3 in C57BL/6 mice infected with lethal or nonlethal *Plasmodium yoelii*. *Cell Mol Immunol*, 5(5), 341-348. <https://doi.org/10.1038/cmi.2008.42>
- Souza, J. A., Rossa, C., Jr., Garlet, G. P., Nogueira, A. V., & Cirelli, J. A. (2012). Modulation of host cell signaling pathways as a therapeutic approach in periodontal disease. *J Appl Oral Sci*, 20(2), 128-138. <https://doi.org/10.1590/s1678-77572012000200002>
- Sun, Y. X., Zhang, H. Y., Wei, Y. M., Zhu, F., Wang, M., & Liao, Y. H. (2008). The mechanism of signal transduction during vascular smooth muscle cell proliferation induced by autoantibodies against angiotensin AT1 receptor from hypertension. *Chin Med J (Engl)*, 121(1), 43-48.
- Takagi, R., Sakamoto, E., Kido, J. I., Inagaki, Y., Hiroshima, Y., Naruishi, K., & Yumoto, H. (2020). S100A9 Increases IL-6 and RANKL Expressions through MAPKs and STAT3 Signaling Pathways in Osteocyte-Like Cells. *Biomed Res Int*, 2020, 7149408. <https://doi.org/10.1155/2020/7149408>
- Takeda, K., Clausen, B. E., Kaisho, T., Tsujimura, T., Terada, N., Förster, I., & Akira, S. (1999). Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity*, 10(1), 39-49. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80005-9](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80005-9)
- Taylor, P. R., Roy, S., Meszaros, E. C., Sun, Y., Howell, S. J., Malemud, C. J., & Pearlman, E. (2016). JAK/STAT regulation of *Aspergillus fumigatus* corneal infections and IL-6/23-stimulated neutrophil, IL-17, elastase, and MMP9 activity. *J Leukoc Biol*, 100(1), 213-222. <https://doi.org/10.1189/jlb.4A1015-483R>
- Tonetti, M. S., Greenwell, H., & Kornman, K. S. (2018). Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol*, 89 Suppl 1, S159-s172. <https://doi.org/10.1002/jper.18-0006>
- Tsukasaki, M., Komatsu, N., Nagashima, K., Nitta, T., Pluemsakunthai, W., Shukunami, C., . . . Takayanagi, H. (2018). Host defense against oral

- microbiota by bone-damaging T cells. *Nat Commun*, 9(1), 701.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-03147-6>
- Vasamsetti, S. B., Karnewar, S., Kanugula, A. K., Thatipalli, A. R., Kumar, J. M., & Kotamraju, S. (2015). Metformin inhibits monocyte-to-macrophage differentiation via AMPK-mediated inhibition of STAT3 activation: potential role in atherosclerosis. *Diabetes*, 64(6), 2028-2041.
<https://doi.org/10.2337/db14-1225>
- Villarino, A. V., Kanno, Y., Ferdinand, J. R., & O'Shea, J. J. (2015). Mechanisms of Jak/STAT signaling in immunity and disease. *J Immunol*, 194(1), 21-27.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401867>
- Wang, L., Jin, H., Ao, X., Dong, M., Liu, S., Lu, Y., & Niu, W. (2019). JAK2-STAT3 signaling pathway is involved in rat periapical lesions induced by *Enterococcus faecalis*. *Oral Dis*, 25(7), 1769-1779.
<https://doi.org/10.1111/odi.13169>
- Wang, Q., Li, H., Xie, H., Fu, M., Guo, B., Ding, Y., . . . Yu, H. (2013). 25-Hydroxyvitamin D3 attenuates experimental periodontitis through downregulation of TLR4 and JAK1/STAT3 signaling in diabetic mice. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 135, 43-50.
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.01.008>
- Wang, S., Yu, A., Han, M., Chen, X., Li, Z., Ke, M., . . . Xing, Y. (2022). Pathological Changes and Expression of JAK-STAT Signaling Pathway Hallmark Proteins in Rat Retinas at Different Time Points After Retinal Ischemia Reperfusion Injury. *Pathol Oncol Res*, 28, 1610385.
<https://doi.org/10.3389/pore.2022.1610385>
- Welte, T., Zhang, S. S., Wang, T., Zhang, Z., Hesslein, D. G., Yin, Z., . . . Fu, X. Y. (2003). STAT3 deletion during hematopoiesis causes Crohn's disease-like pathogenesis and lethality: a critical role of STAT3 in innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(4), 1879-1884.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0237137100>
- Wick, E. C., Rabizadeh, S., Albesiano, E., Wu, X., Wu, S., Chan, J., . . . Sears, C. L. (2014). Stat3 activation in murine colitis induced by enterotoxigenic

- Bacteroides fragilis. *Inflamm Bowel Dis*, 20(5), 821-834.
<https://doi.org/10.1097/mib.0000000000000019>
- Woś, I., & Tabarkiewicz, J. (2021). Effect of interleukin-6, -17, -21, -22, and -23 and STAT3 on signal transduction pathways and their inhibition in autoimmune arthritis. *Immunol Res*, 69(1), 26-42. <https://doi.org/10.1007/s12026-021-09173-9>
- Wu, R., Sun, S., & Steinberg, B. M. (2003). Requirement of STAT3 activation for differentiation of mucosal stratified squamous epithelium. *Mol Med*, 9(3-4), 77-84. <https://doi.org/10.2119/2003-00001.wu>
- Yang, J., Huang, J., Dasgupta, M., Sears, N., Miyagi, M., Wang, B., . . . Stark, G. R. (2010). Reversible methylation of promoter-bound STAT3 by histone-modifying enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(50), 21499-21504. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016147107>
- Yang, X. O., Panopoulos, A. D., Nurieva, R., Chang, S. H., Wang, D., Watowich, S. S., & Dong, C. (2007). STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem*, 282(13), 9358-9363. <https://doi.org/10.1074/jbc.C600321200>
- Yu, J. J., & Gaffen, S. L. (2008). Interleukin-17: a novel inflammatory cytokine that bridges innate and adaptive immunity. *Front Biosci*, 13, 170-177. <https://doi.org/10.2741/2667>
- Yuan, Z. L., Guan, Y. J., Chatterjee, D., & Chin, Y. E. (2005). Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science*, 307(5707), 269-273. <https://doi.org/10.1126/science.1105166>
- Zhang, C., Li, T., Zhou, C., Huang, L., Li, Y., Wang, H., . . . Mei, L. (2020). Parathyroid hormone increases alveolar bone homeostasis during orthodontic tooth movement in rats with periodontitis via crosstalk between STAT3 and β -catenin. *Int J Oral Sci*, 12(1), 38. <https://doi.org/10.1038/s41368-020-00104-2>
- Zhang, P., Zhang, W., Zhang, D., Wang, M., Aprecio, R., Ji, N., . . . Wang, Q. (2018). 25-Hydroxyvitamin D(3) -enhanced PTPN2 positively regulates periodontal inflammation through the JAK/STAT pathway in human oral

- keratinocytes and a mouse model of type 2 diabetes mellitus. *J Periodontal Res*, 53(3), 467-477. <https://doi.org/10.1111/jre.12535>
- Zhang, X., Qiu, C., Shen, H., Zhang, H., He, Z., Song, Z., & Zhou, W. (2021). The imbalance of Th17/Treg via STAT3 activation modulates cognitive impairment in *P. gingivalis* LPS-induced periodontitis mice. *J Leukoc Biol*, 110(3), 511-524. <https://doi.org/10.1002/jlb.3ma0521-742rrr>
- Zhong, Z., Wen, Z., & Darnell, J. E., Jr. (1994). Stat3 and Stat4: members of the family of signal transducers and activators of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(11), 4806-4810. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.11.4806>
- Zhou, L., Ivanov, I., Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., . . . Littman, D. R. (2007). IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol*, 8(9), 967-974. <https://doi.org/10.1038/ni1488>

10. ANEXO



N° 018/FONDECYT/518

Programa
Fondecyt

Santiago, 30 de Octubre del 2018
Ref.: Proyecto N° 11180389

Señor
NICOLAS DUTZAN MUÑOZ

Estimado señor DUTZAN:

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

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

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

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

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

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

Saludos atentamente a usted,

EDGAR VOGEL GONZÁLEZ
Presidente
Consejo Superior de Ciencia

MARIO HAMUY WACKENHUT
Presidente
Consejo Superior de Desarrollo Tecnológico