



FACULTAD
DE **ODONTOLOGÍA**
UNIVERSIDAD FINIS TERRAE

UNIVERSIDAD FINIS TERRAE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESCUELA DE ODONTOLOGÍA

**RELACIÓN ENTRE CONCENTRACIÓN DE NANOVESÍCULAS Y PRESENCIA
DE ENFERMEDAD PERIODONTAL EN PACIENTES DE LA CLÍNICA DEL
ADULTO MAYOR Y SENESCENTE (CAS) DE LA UNIVERSIDAD FINIS TERRAE
EN EL AÑO 2022.**

LORETO SOLÍS ESPÍNDOLA
BETANIA TILLERÍA RUZ

Tesis presentada a la Facultad de Odontología de la Universidad Finis
Terrae, para optar al título profesional de Cirujano Dentista.

Profesor guía

Dr. Daniel Hevia Magaña

Santiago,
Chile 2022

AGRADECIMIENTOS

Agradecer a quienes me han acompañado en estos años, sobre todo a mi núcleo familiar por creer en mí e incentivarme a ser cada día mejor y nunca rendirme.

A mi abuela Filomena por ser el pilar más importante en mi vida y por brindarme de su apoyo en buenos y malos momentos, por ser mi mejor paciente y ayudarme a salir del paso en cada adversidad. Gracias también por ser mi fiel compañera de estudio y hacerme siempre las mejores comidas cuando me quedaba hasta tarde estudiando.

A mi hermana Tabatha por sacarme una sonrisa siempre y enseñarme de la vida aún siendo tan pequeña. A mi madre Lena por su apoyo incondicional.

A mi novio Daniel, por ser mi contención y mi pilar en la carrera, e incluso en la vida, por enseñarme a ser una mejor persona, a tener paciencia y perseguir mis sueños aún cuando salgan de la zona de confort. Gracias por siempre confiar en mí, ayudarme a estudiar, brindarme incluso los materiales de la carrera, y ser mi ejemplo a seguir. Te admiro y te amo para siempre.

A mi perrita Nalita por ser mi fiel compañera desde que llegó, sobre todo en esas noches de estudio y cuando la vida dolía. Gracias por hacerme una mejor persona, más sensible y feliz. A mi amiga Cami, por estar siempre ahí cuando la necesito, ser mi zona de refugio cuando no están bien las cosas y siempre alegrarse de mis logros.

A los pocos pero buenos amigos que la universidad me dio, gracias por hacer este proceso ameno y darle humor a mis días. Los llevo en el corazón para siempre. A mi eterna compañera de box Loreto, agradecida de todos estos años juntas y orgullosa de terminar este proceso a tu lado, eres una tremenda amiga y apoyo, te quiero muchísimo.

A cada uno de los pacientes que confió en mí, por cada palabra de apoyo y de agradecimiento en cada atención. A cada docente que me guió a lo largo de la carrera hasta ser la profesional que soy ahora, gracias por todo el conocimiento

entregado y por fomentar la ética que debemos tener en cada paciente.

Agradecer al Dr. Hevia, por su eterna motivación, su confianza en nosotras y por siempre tener la mejor disposición y humor en cada momento de la tesis desde el minuto uno. Todo esto se logró gracias a él.

Betania Tillería Ruz

A mi familia, mi pilar fundamental a lo largo de toda mi vida universitaria.

A mis papás que me ayudaron y contuvieron en los momentos malos y menos malos. Por estar a mi lado en los momentos buenos y bonitos. Gracias por enseñarme a afrontar todas las dificultades que se venían en el camino con la cabeza en alto y sin rendirse, todo esto, con el mayor cariño y amor del mundo.

A mis hermanos mayores. A Javiera, por demostrarme siempre cómo debe ser un profesional del área de la salud, apasionada y con un cariño y empatía enorme hacia sus pacientes. Espero haber aprendido un poco de ti y poder replicarlo en mi vida profesional.

A Tomás, por ser mi ejemplo de que con esfuerzo y estudio todo se puede. Gracias por tu apoyo y sabias palabras en momentos difíciles, por querer ser mi paciente y depositar tu confianza en mí siendo aún estudiante, te lo agradezco de todo corazón.

A Catalina, mi hermana gemela, por impulsarme a cumplir uno de los mayores sueños de mi vida. Por estar siempre a mi lado y creer en mí, incluso más que yo misma. Gracias por ser mi Pepe grillo aconsejandome en momentos donde yo lo veía todo nublado y negro.

A mis amigas de la vida, Camila, Catalina, Constanza, Isidora, Maria Paz y Sophia, que me han acompañado en este camino desde un inicio. Por querer estar siempre presentes, tanto en mis caídas como en mis celebraciones. Son a todo terreno amigas, gracias por siempre querer ayudarme, aun sin saber cómo. Les agradezco su amor a todas. Gracias a las que se atendieron conmigo, espero haberlas ayudado aunque sea un poco.

A los amigos que encontré a lo largo de la carrera. No tengo palabras para agradecerles todo el cariño y amor que me entregaron desde un inicio hasta el día

de hoy, sin ustedes mi vida universitaria hubiera sido muy diferente. Gracias por las papitas, todos los momentos que compartimos y reímos, mi paso por la carrera fue más feliz gracias a ustedes.

Betania, gracias por todos estos años no solo de compañerismo, sino también de amistad incondicional. Desde SMC I comparando nuestras primeras preparaciones en dientes hasta Módulo III siendo nuestras primeras compañeras de box, sin saber que en un futuro seguimos juntas lado a lado aprendiendo con nuestros pacientes. Le agradezco a SMC I por darme una amiga increíble, inteligente y con un amor enorme hacia sus pacientes. Espero seguir contando con tu bella amistad.

Gracias al Dr. Hevia, nuestro tutor de tesis, que desde el día uno nos entregó un enorme apoyo e ideas increíbles para nuestra investigación. Por estar siempre atento y presente ante cualquier duda que tuviéramos y apañándonos frente a todas las adversidades durante el desarrollo de nuestra tesis. Gracias por guiarnos con su enorme sabiduría que nos inspira a seguir aprendiendo y desarrollándonos en el área con todo lo que aprendimos de usted.

Loreto Solís Espíndola

1.ÍNDICE

1. Índice.....	5
2. Resumen	6-7
1. Abstract	8
3. Introducción	9-11
4. Marco teórico.....	12-20
5. Hipótesis.....	21
6. Objetivos.....	21
1. Objetivo general	21
2. Objetivos específicos.....	21
7. Metodología.....	21-23
1. Tipo y diseño de investigación.....	21
2. Población en estudio.....	21
3. Criterios de inclusión y exclusión.....	22
4. Variables de estudio.....	22-23
5. Instrumentos de recolección de datos.....	23-24
6. Análisis de tamaño y concentración de exosoma.....	24
7. Análisis e interpretación de datos.....	24
8. Aspectos éticos de investigación.....	25
9. Cronograma.....	25
10. Resultados.....	25-28
11. Discusión	28-31
12. Conclusión.....	31-32
13. Referencias Bibliográficas.....	33-41
14. Anexos.....	42-52

2. RESUMEN

Introducción: La enfermedad periodontal es una de las enfermedades más prevalentes en el mundo. Su diagnóstico oportuno y precoz, antes del inicio del daño, es fundamental para evitar la progresión de esta enfermedad. Las células sometidas al estrés ambiental se comunican entre sí mediante moléculas señal como lo son las nano vesículas extracelulares. Estas se encuentran en todos los fluidos biológicos, siendo útiles para el diagnóstico y pronóstico de distintas enfermedades, lo que nos puede orientar hacia un posible diagnóstico oportuno de la EP, con el objetivo de evitar la progresión de la enfermedad hacia estadios severos. **Objetivo general:** Establecer la relación entre concentración de nanovesículas y la presencia de enfermedad periodontal en pacientes de la clínica del adulto mayor y senescente (CAS) de la Universidad Finis Terrae , reclutados en el año 2022. **Metodología:** Esta investigación tiene un enfoque metodológico analítico transversal, las variables de estudio son Diagnóstico de enfermedad periodontal, concentración de nanovesículas y sexo. Para este estudio, se utilizaron muestras de saliva obtenidas de pacientes con diagnóstico de EP y sin diagnóstico de EP (sanos) provenientes de la clínica del adulto mayor y senescente, previa firma de consentimiento informado. **Procedimiento:** Pacientes depositaron su saliva en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. Las muestras fueron diluidas y adquiridas para su visualización en el equipo Nanosight NS300 de Malvern Panalytical. Como control negativo de la identificación de nanovesículas tipo exosomas por Nanosight se utilizó PBS, mientras que como control positivo se empleó una solución de partículas de Látex-Poliestireno (Malvern, Worcestershire, UK) de 100 nm de tamaño. Se comprobó si los datos presentan una distribución normal, mediante test shapiro wilk. Luego se realizaron pruebas de comparación de medianas utilizando t-student o U de Mann- Whitney. El estudio utilizó un nivel de significación de 0,05. **Resultado y análisis:** Se observó que los pacientes EP presentan nanovesículas de mayor tamaño en comparación al grupo de pacientes sanos, estos últimos también presentaron una mayor dispersión en cuanto a la concentración de nanovesículas de tamaño 40-160 nm, mientras que los pacientes EP expusieron una dispersión menor. Por otro lado se observa que, en este universo muestral de 20 pacientes analizados, los pacientes EP presentaron menores concentraciones de nanopartículas entre 40-160 nm respecto de los pacientes sanos. **Conclusión:** El estudio sugiere que los pacientes con EP presentan nanovesículas de mayor tamaño en comparación al grupo de pacientes sanos. Así como también que

pacientes con EP presentan menores concentraciones de nanovesículas tipo exosomas entre 40-160 nm respecto de los pacientes sanos. **Palabras clave:** Enfermedad periodontal, diagnóstico, pronóstico, nanovesículas, exosomas.

2.1 ABSTRACT

Introduction: Periodontal disease is one of the most prevalent diseases in the world. Its early diagnosis before the damage begins is essential, due to its progressive characteristics. Cells subjected to environmental stress communicate each other through signal molecules such as extracellular nanovesicles. These are found in all biological fluids, being useful for the diagnosis and prognosis of different diseases, which can guide us towards a possible timely diagnosis of periodontal disease, with the aim to avoid the progression of the disease to severe stages. **General objective:** to establish the relationship between the concentration of nanovesicles and the presence of periodontal disease in patients of the clinic for the elderly and senescent (CAS) of the Finis Terrae University recruited in 2022. **Methodology:** This research has a cross-sectional analytical methodological approach. The study variables are: Diagnosis of periodontal disease, concentration of nanovesicles, and gender. Saliva samples obtained from patients with a diagnosis of PD and without a diagnosis of PD (healthy) were used for this study, from the Clinic for the Elderly and Senescent Adults (CAS UFT) after signing informed consent. **Procedure:** Patients deposited their saliva in 1.5 mL microcentrifuge tubes. The samples were diluted and acquired for viewing in the Nanosight NS300 equipment from Malvern Panalytical. As a negative control for the analysis of the exosome-type nanovesicles, PBS was used, while a solution of 100 nm size Latex-Polystyrene particles (Malvern, Worcestershire, UK) was used as a positive control for the identification of particle's size by Nanosight. Shapiro Wilk test was used to verify the normal distribution of the data. Median comparison tests were then performed using Student's T or Mann-Whitney U test. The study used a significance level of 0.05. **Results and analysis:** PD patients present larger nanoparticles compared to the group of healthy patients. Healthy patients presented a greater dispersion in terms of the concentration of 40-160 nm size nanoparticles, while PD patients exhibited less dispersion. In addition, it is observed that in this sample universe of 20 patients analyzed, PD patients had lower concentrations of nanoparticles between 40-160 nm size compared to healthy patients. **Conclusion:** The study suggests that PD patients have larger nanovesicles compared to the healthy group. Also, patients with PD have lower concentrations of exosome-like nanovesicles between 40-160 nm compared to healthy patients. **Key words:** periodontal disease, diagnosis, prognosis, nanovesicles, exosomes.

3. INTRODUCCIÓN

La enfermedad periodontal (EP) es una enfermedad de carácter inflamatorio crónico de origen disbiótico y afecta al 11,2% de la población mundial adulta. Las formas más graves de EP son la principal causa de pérdida de piezas dentales impactando negativamente sobre la salud sistémica (1).

Las personas con EP presentan elevados niveles de anticuerpos plasmáticos, factores de coagulación, recuento total de Leucocitos (en especial neutrófilos), proteína C reactiva y citoquinas proinflamatorias como lo son INF- γ (Interferón gamma), TNF- α (Factor de Necrosis Tumoral-alfa), IL (Interleucina)-1 β , IL-2 e IL-6 (2). La sobreexpresión de estos factores conduce a un estado inflamatorio constante siendo un factor de riesgo importante para patologías sistémicas, teniendo una relación bidireccional entre EP y éstas (3)

Un ejemplo de estas patologías relacionadas a la EP son las enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus tipo II, trastornos respiratorios, neumonía fatal en pacientes hemodializados, enfermedad renal crónica, AR (artritis reumatoide) y lupus eritematoso sistémico, síndrome metabólico y complicaciones en el embarazo, como parto prematuro (4,5). Se ha demostrado que individuos con EP son más propensos a accidentes cardiovasculares, como consecuencia de procesos inflamatorios crónicos como lo es la EP, ya que promueve la activación del endotelio vascular favoreciendo la formación de ateromas. Por otro lado, la artritis reumatoide se caracteriza por cursar un cuadro crónico de inflamación de múltiples articulaciones. *Porphyromonas gingivalis*, uno de los principales periodontopatógenos asociados a EP, es capaz de promover la circulación de péptidos que gatilla la aparición de los anti-CCP (anticuerpos antipéptido cíclico citrulinado), los que resultan útiles como marcador de daño y severidad en la AR (2-5).

La etiología de la EP radica principalmente en la interacción de la microbiota oral y la respuesta del hospedero, donde se establece un biofilm celular que trata de agrupaciones bacterianas inmersas en una matriz adherida a la superficie dental (7). Inicialmente esta microbiota es comensal y benigna, la cual al ser inducida bajo determinadas condiciones como la falta de higiene conducen al aumento en la formación de biofilm en la superficie de las piezas dentales promoviendo la adhesión de las bacterias (6-8). El cúmulo descontrolado de bacterias se denomina

disbiosis y está relacionada con factores locales y la respuesta inmune del hospedero, lo cual genera una reacción de carácter inflamatorio que induce a la destrucción de los tejidos de soporte de las piezas dentales (7,9).

El diagnóstico de EP se lleva a cabo mediante un análisis que evalúa dos parámetros principales: la profundidad al sondaje (PB) (9) y el sangrado al sondaje (BOP), los cuales corresponden a valores de mayor o igual a 3 mm en el PB; sangrado al sondaje mayor o igual al 10% en el caso de un periodonto intacto. En casos de periodonto reducido se considera la pérdida de inserción clínica (9). Además, se contempla el índice de placa, nivel de recesión gingival, nivel de encía queratinizada y el nivel de inserción clínica, de modo que se obtiene toda la información relevante clínicamente para complementarse con el uso de las radiografías intraorales (8).

Actualmente, el diagnóstico de EP se basa principalmente en evaluaciones realizadas cuando el daño ya se encuentra establecido (8), por lo que, si no existe un diagnóstico precoz de la enfermedad, van a ocurrir cambios ecológicos disbióticos producto de esta respuesta inmune inflamatoria subyacente (34-37), presentándose un proceso ya irreversible en el paciente.

El establecer y tener información precoz respecto del inicio de la respuesta inmune inflamatoria, nos puede ayudar a tener un indicio sobre la instauración de la enfermedad de forma temprana, permitiendo maniobrar a tiempo y aplicar tratamientos preventivos eficaces en vez de tratamientos para reestablecer el cuadro (10).

Es muy relevante entonces conocer elementos que den cuenta del inicio del daño por inflamación y del estrés al que están sometidos los cementoblastos. De alguna forma, las células sometidas al estrés ambiental se comunican entre sí mediante varias moléculas señal, sin embargo, existe un tipo de comunicación especial que se basa en el tráfico de nanovesículas extracelulares llamados exosomas.

Los exosomas son pequeñas estructuras vesiculares, con un diámetro de entre 40 a 160 nm que son liberadas por casi todos los tipos celulares (11). Estos son importantes dado que contienen una amplia variedad de *cargo* que varían entre condiciones fisiológicas respecto de patológicas, como lo son: factores de transcripción, receptores de superficie celular, proteínas citosólicas y nucleares, microARN y ARNm (12). La idea de este tráfico de información es proporcionar a la

célula blanco una forma rápida de obtención de moléculas, evitando la síntesis *de novo* de estas (12,21). Por esta razón, se han estudiado los exosomas como una gran fuente de información de biomarcadores que pueden ayudar al estudio de la fisiología celular y la patología. En el caso del presente proyecto se utilizarán como biomarcadores salivales en pacientes con EP establecida, evaluando su abundancia y diversidad de tamaño, en comparación con pacientes controles sanos.

El estudio de exosomas se ha empleado en diversas áreas de investigación, en las que se han visto relacionados a distintos tipos de respuesta inmune (13), preeclampsia (14), progresión tumoral (15) y también en relación a alteraciones del sistema nervioso central (16), en donde, los metabolitos y ácidos nucleicos entregados por los exosomas a las células receptoras alteran efectivamente su respuesta biológica, induciendo apoptosis, inmunomodulación, o bien, por carga útil de fármacos para controlar ciertas condiciones sistémicas (12,21).

Para la identificación de exosomas se emplean variadas técnicas, tales como la identificación según proteínas de superficie, citometría de flujo, microscopía electrónica, o detección de pulso resistivo, entre otras (15,21). La técnica de estudio por Nanosight, según el tamaño de estos, proporciona un análisis combinado en el movimiento de las nanovesículas a través del uso de una dispersión de luz (9,16).

La ventaja del estudio de los exosomas es que se encuentran en todos los fluidos biológicos, ya sea saliva, semen, fluido amniótico o leche materna, entre otros (17). Así, es posible detectar estas nanovesículas que pueden ser de utilidad en el diagnóstico y pronóstico de pacientes con cáncer y otras enfermedades en una muestra de biopsia líquida (15,16), lo cual nos puede orientar hacia un posible diagnóstico oportuno de la EP, evitando la progresión de la enfermedad hacia estadios severos.

El propósito de este estudio es obtener información para el desarrollo de una nueva herramienta diagnóstica temprana de la EP y complementaria a los estudios clínicos y radiográficos, que permita evaluar aspectos de daño e inflamatorios que se desarrollen a una escala no detectable para los métodos convencionales y que indiquen la presencia de una patología, para optar a un tratamiento oportuno y eficiente.

4. MARCO TEÓRICO

La EP comprende un amplio espectro de condiciones inflamatorias que afectan estructuras de soporte de los dientes (23), ya sea la encía (24), hueso alveolar (25) y ligamento periodontal (26), que en su conjunto forman el periodonto. El periodonto está conformado por tejidos que confieren protección, como la encía, e inserción y anclaje en donde se encuentra el cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar. Entre las funciones del periodonto están la nutrición, función sensorial, unión de la pieza dental a su alvéolo, así como la protección frente al medio externo, actuando como una barrera frente a la entrada de patógenos, y apoyo para la distribución de fuerzas masticatorias, entre otras (27,28,29).

La EP es inducida por la presencia de bacterias gram-negativas microaerofílicas y anaeróbicas pertenecientes al llamado complejo rojo, que colonizan el área subgingival estimulando al sistema inmunológico a producir cantidades significativas de mediadores proinflamatorios (30-33). Sin embargo, el inicio y la progresión de la EP va a depender de los cambios ecológicos disbióticos en el microbioma en respuesta a los productos gingivales inflamatorios y de degradación tisular que pueden enriquecer la proliferación de cierto tipo de bacterias, como también la presencia de mecanismos antibacterianos que intentan contener la excesiva proliferación bacteriana dentro del surco gingival al haberse iniciado el proceso inflamatorio (34-37).

Dependiendo de los tejidos que se vean afectados durante el proceso inflamatorio, se pueden distinguir dos formas principales de EP: "Gingivitis" y "Periodontitis".

La gingivitis corresponde a una inflamación reversible del periodonto de protección, el cual está constituido por encía libre y encía adherida, formando la mucosa masticatoria queratinizada. En este caso, el aparato de inserción de la pieza dentaria no se encuentra comprometido (38). Por otro lado, la periodontitis se caracteriza por la pérdida de inserción clínica debido a la destrucción del ligamento periodontal, del hueso de soporte y la existencia de saco periodontal (39) que se define como la profundización anormal del surco gingivodentario, siendo este igual o mayor a 4 mm (40), esto a expensas de una migración apical del epitelio de unión con presencia de características inflamatorias.

Etiología de la EP

Para explicar la etiopatogenia de la EP, se ideó un modelo en que se menciona que al adquirir el hospedero propiedades etiopatogénicas, se podría frenar el proceso activo inflamatorio a través de la primera línea de defensa: los neutrófilos, limitando así la noxa a gingivitis (40).

Si se sobrepasa la primera línea de defensa, se activa una segunda línea defensiva, formada por el eje linfocito-monocito con la consecuente liberación de citoquinas y mediadores proinflamatorios, que además provocan la destrucción de los tejidos, reabsorción ósea y la formación de sacos periodontales (41), observándose así la evolución de un proceso inflamatorio reversible hacia uno irreversible (41)

Se ha descubierto que en la etiología de la EP confluyen varios factores de riesgo que van a favorecer la aparición y desarrollo de la patología, ya sea en severidad o en su extensión. Gracias a la evidencia actual, se ha determinado una causa infecciosa en la EP por la presencia de microorganismos periodontopatógenos, tanto en gingivitis como en periodontitis (42). Los periodontopatógenos son microorganismos que viven en comunidad y se encuentran adheridos a una superficie sólida y entre ellos. Se encuentran dentro de una matriz extracelular secretada por los mismos, lo que se conoce como biofilm (43).

Biofilm y su rol en la EP

Al nacer, la cavidad oral es estéril, sin embargo, es rápidamente colonizada por bacterias, constituyéndose la microbiota oral (44). Estas bacterias se encuentran en equilibrio con el hospedero, pero en determinadas situaciones, como por ejemplo la falta de higiene, este equilibrio se altera (45). Por lo tanto, las proporciones relativas de bacterias beneficiosas y dañinas del hospedero tienden a cambiar a medida que el biofilm va madurando y estableciéndose en las superficies de las piezas dentales (46).

El biofilm se compone entre un 15 a un 20% de bacterias que se encuentran dentro de un glicocálix, que corresponde al resto del volumen (un 80% aproximadamente). Dentro de esta estructura se forman canales de fluidos que permiten el transporte de sustancias (46), lo que favorece el *Quórum Sensing*, que corresponde a un tipo

de señalización célula-célula dependiente de la densidad de la población, y que desencadena cambios en el comportamiento cuando la población alcanza una densidad crítica (47).

Las comunidades de biofilm están compuestas por distintos tipos de bacterias que se encuentran yuxtapuestas a la superficie de la pieza dental. Socransky, SS y cols. (2002) definió los complejos bacterianos en los cuales representa las diversas asociaciones entre las especies bacterianas que colonizan la placa bacteriana:

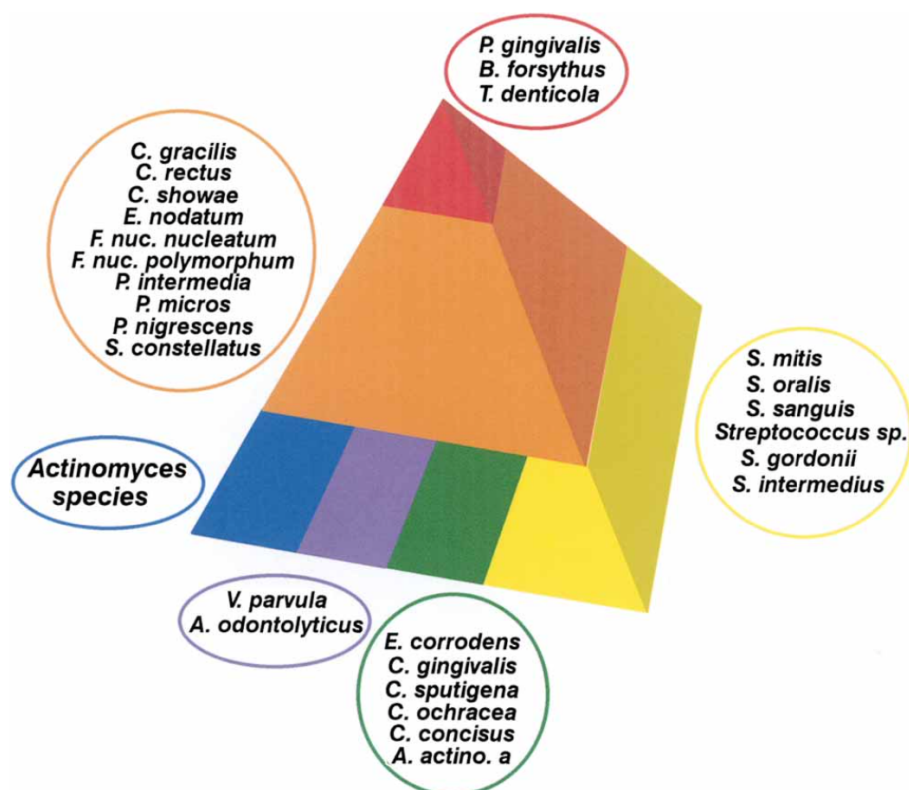


Figura 1. Diagrama de asociación entre especies subgingivales adaptado por Socransky (48).

- Complejo azul: *Especies de Actinomyces, exceptuando Actinomyces odontolyticus*
- Complejo amarillo: *Streptococcus gordonii, Streptococcus intermedius, Streptococcus mitis, Streptococcus sanguis.*
- Complejo morado: *A. odontolyticus y Veillonella parvula.*
- Complejo verde: *Eikenella corrodens, Capnocytophaga gingivalis, Capnocytophaga ochracea, Capnocytophaga sputigena, Aggregatibacter actinomycetemcomitans y Campylobacter concisus.*
- Complejo naranja: *Campylobacter gracilis, Campylobacter rectus, Campylobacter showae, Fusobacterium nucleatum subsp. vincentii, Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum, Fusobacterium periodonticum,*

Peptostreptococcus micros, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Streptococcus constellatus* y *Eubacterium nodatum*.

- Complejo rojo: *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* y *Porphyromona gingivalis* (48).

Las bacterias anaerobias gram negativas más importantes y prevalentes en el área subgingival de pacientes con EP son: el *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Prevotella intermedia* (Pi), *Treponema denticola* (Td), *Tannerella forsythia* (Tf) y *Porphyromona gingivalis* (Pg). Siendo esta última el agente más importante dentro de la EP ya que su proliferación descontrolada gatilla que el resto de las bacterias desarrollen disbiosis (49).

Esta condición de disbiosis promueve el daño y la formación del saco periodontal, que se define como un surco gingival patológicamente profundizado (50), destrucción de tejido conectivo y reabsorción del hueso alveolar a través de mecanismos inmunopatológicos.

Patogenia de la EP

La etiología de la EP es el biofilm que se establece a nivel del margen gingival, siendo varios los factores que influyen en su génesis. Por un lado influye la presencia de bacterias y por otro lado los factores propios del hospedero. Por lo tanto, la microbiota periodontopatígena mencionada anteriormente es necesaria pero no suficiente para que se produzca la enfermedad, ya que para esto se necesita a un hospedero susceptible a la enfermedad (51). Respecto de esto, estudios recientes han indicado que la periodontitis puede no ser el resultado de patógenos actuando de forma individual, sino de una disbiosis del microbioma comensal oral, que perturba la homeostasis del hospedero en la barrera oral (52).

El hospedero tiene diversos mecanismos de defensa frente a la acumulación de patógenos, por un lado, está el sistema de defensa innato del hospedero, que no requiere exposición previa de los patógenos para actuar. Este sistema lo conforma la barrera epitelial, los mecanismos de barrido de saliva y fluido gingival crevicular (FGC), el cual contiene lisozimas, neutrófilos e inmunoglobulinas (IgG, IgA, principalmente) (51). De esta forma se genera una primera línea de defensa en donde se encuentran, además, lactoferrina, proteínas del complemento, macrófagos y neutrófilos (52).

La respuesta inmune patológica comienza cuando se rompe el equilibrio entre los microorganismos y el hospedero, las bacterias van a proliferar y producir factores de virulencia como lipopolisacáridos (LPS) y ácido lipoteicoico. Estos factores al entrar en contacto con células del epitelio de unión desencadenan la liberación de mediadores de la inflamación como: defensinas, IL-1- β , TNF- α , e IL-8 (52).

Las células del hospedero reconocen microorganismos a través de la interacción de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), los cuales se expresan en la membrana de las células del hospedero, con los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) presentados por los microorganismos (54). Estos PAMPs corresponden a moléculas que se encuentran en las superficies de células preferentemente relacionadas a patógenos y no están presentes en las células del hospedero (54). Dentro de ellas se incluyen: Lipopolisacáridos (LPS), el principal componente de las paredes celulares de bacterias gram negativas (55) y el ácido lipoteicoico (LTA), principal componente de las paredes celulares de bacterias gram positivas (56).

El LPS es reconocido por los receptores tipo Toll (TLR), los que, a través de la activación de vías de señalización, produce IL-6, un potente activador de la inflamación (59). La sobre expresión de IL-6 desencadena la activación de janus cinasas (JAK) mediado por gp130, mejorando la expresión del ligando de receptor activador para el factor RANKL, produciendo un aumento en la expresión de este en los osteocitos (57).

El RANKL corresponde a una citoquina producida y liberada por los linfocitos T CD4 que interactúa con el receptor RANK en la superficie de precursores de osteoclastos, promoviendo su diferenciación en osteoclastos que reabsorben hueso (56), sirviendo como un regulador clave de la osteoclastogénesis.

Como consecuencia de la liberación de mediadores de la inflamación, los neutrófilos son atraídos al lugar en donde se encuentran acumuladas las bacterias, siendo esto uno de los mecanismos defensivos más importantes y primeros en actuar (58). Durante el trayecto de los neutrófilos hacia el epitelio de unión, van generando funciones de fagocitosis y destrucción bacteriana, como también liberando especies reactivas de oxígeno y enzimas como: catepsina G, lactoferrina, mieloperoxidasa, defensinas y metaloproteinasas (59).

Tras la persistencia de la inflamación, células de la inmunidad innata comenzarán a activar la respuesta inmune adaptativa, conformando así la segunda línea de defensa, que tiene por objetivo la memoria inmunológica y la expansión clonal (59). Estas actividades las regulan los linfocitos, entre los que se pueden destacar los

linfocitos B y linfocitos T, siendo los últimos aquellos que se diferencian a Helper (CD4⁺) y citotóxicos (CD8⁺) (58).

Si no se resuelve el perfil inflamatorio y aún no se logra volver a un equilibrio entre la microbiota de la cavidad oral y el hospedero, teniendo una microbiota más patogénica con presencia de bacterias Gram negativas anaerobias con fuerte dominancia del complejo rojo, puede iniciar el proceso de pérdida de inserción (53). En esta etapa, la enfermedad se vuelve irreversible y el proceso inflamatorio se vuelve crónico. Con esto, la producción de citoquinas inflamatorias (IL-1 β , TNF- α) continúa por largos periodos de tiempo, observándose a largo plazo acumulación de mediadores de la inflamación que en un inicio se disponían en el tejido conectivo subyacente al epitelio de unión, para luego avanzar hacia apical de la pieza dental hasta llegar a la inserción del tejido conectivo y hueso alveolar (53).

Bajo la presencia de EP, mediadores inflamatorios como TNF- α y IL-17 son expresados por células cercanas al hueso alveolar, dichos mediadores regulan el alza de producción del Ligando del Receptor Activador para el factor nuclear (NF) κ B (RANKL) (56). Como fue explicado anteriormente, la ruta TLR es clave en el desarrollo de la inflamación y además, permite activar RANKL, en donde la señalización RANKL-RANK activa la diferenciación y las funciones de los osteoclastos e inhiben la apoptosis de los osteoblastos, dando como resultado, una hiperfunción de los osteoclastos que conduce hacia la reabsorción ósea (57).

Es por lo anterior que RANKL, al ser una citoquina clave en la regulación de la osteoclastogénesis (57), sería un ejemplo de biomarcador de gran utilidad al momento de evaluar su presencia de forma temprana, siendo beneficioso poder controlar su expresión como potencial terapéutico mediante el uso de nanovesículas. Estas tienen la capacidad de regular la inflamación y la reabsorción ósea acondicionando TNF- α (58), siendo esto clave para un abordaje oportuno de la EP, permitiendo un diagnóstico precoz de la enfermedad.

El impacto del uso de nanovesículas en la EP está bien documentado en estudios recientes que han demostrado que el uso de exosomas derivados de células madre mesenquimales (MSC) ha disminuido significativamente la reabsorción periodontal y el número de osteoclastos activos, dado que mejora la expresión exosomal de CD73 que tiene potencial antiinflamatorio (60,72-73).

Nanovesículas: Exosomas en el control terapéutico de enfermedades

Los exosomas se definen como vesículas de un diámetro que bordea los 40 a 160 nm (11). En su citoplasma poseen una porción de su célula de origen, incluyendo factores de transcripción, receptores de superficie celular, proteínas citosólicas y nucleares, micro ARN y ARNm (11). En su superficie presentan marcadores característicos, como CD63, CD9, CD81 y TSG101. Estas proteínas en la superficie van a permitir la comunicación entre las distintas células, como también la entrega de proteínas y ARN. Siguiendo esta línea de razonamiento, el contenido de los exosomas podría ser utilizado como objeto de estudio en la búsqueda de biomarcadores celulares importantes en la modulación del funcionamiento celular. (12,13,21). Desde el punto de vista fisiológico, gracias al contenido rico en ácidos nucleicos y proteínas señales, estas nanovesículas influyen sobre la respuesta inmune, patogenicidad viral, embarazo, enfermedades cardiovasculares y sistema nervioso, además de relacionarse con la progresión del cáncer (12-16).

Por otro lado, se ha visto que los exosomas tienen un potencial en el diagnóstico de enfermedades, ya que se encuentran disponibles en todos los fluidos biológicos de los seres humanos como biopsias líquidas de fácil acceso, principalmente sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, saliva, derrame pleural, líquido de ascitis, líquido amniótico, leche materna, y líquido de lavado broncoalveolar (11,61).

Considerando lo anterior, el estudio de los exosomas los ha posicionado como elementos útiles en varias líneas de investigación asociadas al control terapéutico y biológico de una gran variedad de enfermedades. Bajo este punto, biomarcadores como el ARN de interferencia y citoquinas han mostrado un gran potencial en el diagnóstico de enfermedades, y su aplicación clínica (21,61).

Las nanovesículas regulan la función inmunológica por transferencia y presentación de antígenos (12). Una de las vías es mediante el Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo II, presentando directamente el antígeno a células T para inducir su activación (12). Además, pueden controlar la expresión genética y vías de señalización a través de la transferencia de ARN (16), siendo una alternativa para regular distintas enfermedades de manera terapéutica por esta vía. Respecto a la modulación del sistema inmune de células tumorales, los exosomas que contienen PD-L1 (Ligando de muerte celular programada), suprimen la función de las células T CD8⁺ antitumorales (13). Por lo que nanovesículas antitumorales se han diseñado

para modular esta última expresión y promover la maduración de las células dendríticas, resultando en una mayor actividad de células T y por ende, actividad antitumoral. Estas características pueden inhibir la angiogénesis y la metástasis del cáncer, que son los dos objetivos principales de la terapia contra el cáncer. Por lo que se utilizan potencialmente para detectar marcadores relacionados con el cáncer con la obtención de muestras líquidas y su posterior análisis (13,15).

Las nanovesículas desempeñan un papel importante en la homeostasis del ARN intracelular al promover la degradación de ARN mal plegado con el fin de degradar y expulsar moléculas dañadas fuera del citoplasma (12,13), siendo esto relevante a la hora de prevenir la aparición de patologías genéticas.

Por otro lado, los exosomas sirven como vehículos para la administración de fármacos y participan activamente como agentes terapéuticos, dado que tienen una alta biocompatibilidad, estabilidad e inmunogenicidad limitada, en comparación de vehículos sintéticos tradicionales donde su uso es más limitado al no poseer estas características (12,13). Las nano vesículas debido a su composición lipídica pueden cruzar las barreras biológicas sin ningún obstáculo siendo claves para la modulación de enfermedades neurodegenerativas al pasar la barrera hematoencefálica para la administración de fármacos (12,13).

Con respecto a exosomas y enfermedad periodontal, se realizó una búsqueda en el buscador Pubmed, en donde se colocaron palabras claves como "Exosomes" y "Periodontal disease" encontrando un total de 75 papers, por lo que, se encuentra poca evidencia con respecto al tema. Sin embargo, respecto a lo descrito en la literatura, con respecto a cáncer y respuesta inmune de células tumorales, los exosomas con PD-L1 suprimen la función de células T CD8⁺.

Se han diseñado nanovesículas antitumorales para enfrentar esto, a través de la maduración de células dendríticas, promoviendo el aumento en la actividad de células T y antitumorales (13,15), pudiendo ser utilizado para detectar marcadores relacionados con el cáncer. De esta forma, en pacientes con EP se podría proponer la búsqueda de marcadores que permitan un diagnóstico precoz de la enfermedad para su tratamiento oportuno.

Por otro lado, la literatura describe que patrones moleculares asociados a patógenos en conjunto con patrones moleculares asociados a daños (DAMP), inician una inflamación crónica (79). Estos estudios han demostrado que hay contenido y funciones alteradas de exosomas en casos de sepsis. (79) Por lo que,

el tener una condición de inflamación crónica ya instaurada, trae consigo un aumento en la cantidad de exosomas que transportan altas concentraciones de citocinas y DAMP (79). Teniendo así un papel proinflamatorio de exosomas que apoya en nuestra hipótesis propuesta, ya que la EP es una enfermedad inflamatoria crónica.

Análisis de exosomas

Para el análisis de exosomas en las patologías mencionadas se han empleado variadas técnicas de detección tales como: Citometría de flujo, microscopía electrónica o detección de pulso resistivo, entre otras. (15) Sin embargo, la técnica por nanosight (*Nanoparticle Tracking Assay*, NTA) proporciona un análisis combinado en el movimiento de las nano vesículas a través del uso de una dispersión de luz, por lo que este instrumento tiene la capacidad de contabilizar el flujo neto de cada partícula, lo que permite añadir a una bomba de jeringa al sistema, dando una mejor calidad en la medición de la muestra, ya que la cantidad de partículas a analizar es significativamente mayor (15). Considerando lo anterior, este instrumento permite dimensionar el tamaño y/o concentración de los exosomas en suspensión mediante la dispersión de la luz que estos originan. A la fecha, el estudio por NTA es considerado el Gold Standard en cuantificación de exosomas (15), debido a la versatilidad de muestras a utilizar, la escasa cantidad de muestra que se requiere y su alta sensibilidad (16).

Es por ello que el presente proyecto de tesis plantea el análisis de tamaño y abundancia de exosomas mediante estudios de Nanosight como investigación inicial y preliminar, como complemento para que genere la proyección hacia la búsqueda de biomarcadores y mediadores de la inflamación que sigan relacionando ambas variables, como también RANKL o miARNs, permitiendo conformar un abanico de agentes diagnósticos tempranos para EP.

5. HIPÓTESIS

Existe una menor concentración de nanovesículas en pacientes que no presentan enfermedad periodontal, en comparación a pacientes que padecen de enfermedad periodontal.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Establecer la relación entre concentración de nanovesículas y la presencia de enfermedad periodontal en pacientes de la clínica del adulto mayor y senescente (CAS) de la Universidad Finis Terrae en el año 2022.

6.2 Objetivos específicos

-Determinar la concentración de nanovesículas en pacientes sin presencia de enfermedad periodontal y pacientes con enfermedad periodontal.

-Comparar las concentraciones de nanovesículas en pacientes sin presencia de enfermedad periodontal y pacientes con enfermedad periodontal.

7. METODOLOGÍA

7.1 Diseño del estudio

El presente trabajo corresponde a un estudio observacional analítico de corte transversal.

7.2 Universo y cálculo de tamaño muestral

El tamaño muestral se calculó con el programa G*power (78) a través de la función de comparación de dos grupos independientes. Para el cálculo se consideraron los siguientes parámetros: (i) Tamaño del efecto moderado de 0,5, (ii) nivel de significación de 0,05 y (iii) un poder estadístico de 0.8. El tamaño muestral calculado fue de 102 casos, 51 para cada grupo. Luego de filtrar por los criterios de inclusión y exclusión, se llegó a un tamaño muestral de 78, de los cuales 42 eran pacientes con EP y 36 eran sanos. Finalmente, considerando la disponibilidad del equipo Nanosight, facilitado por la Universidad de Los Andes, y el costo asociado al uso del equipo, se analizó un total de 20 muestras, las cuales provienen de 10

individuos con EP y de 10 individuos sanos.

7.3 Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión:

- Todos aquellos pacientes que asistan a la clínica del adulto mayor y senescente I y II durante el año 2022 en la Facultad de Odontología de la Universidad Finis Terrae.
- Todos aquellos pacientes que firmen de manera voluntaria el consentimiento informado para hacer uso de su información registrada en la ficha clínica.
- Pacientes mayores de 50 años.

Criterios de exclusión:

- Pacientes que presenten enfermedades autoinmunes, como por ejemplo, síndrome de Sjögren, esclerosis múltiple, lupus sistémico eritematoso, artritis reumatoide, etc.
- Pacientes que presenten saliva con abundante sangrado durante la toma de muestra.
- Pacientes que estén bajo tratamiento farmacológico con antibióticos.
- Pacientes con algún grado de discapacidad cognitiva.

7.4 Variables

Tabla 1. Variables a considerar en el estudio.

Variable	Definición conceptual	Naturaleza de la variable	Nivel de medición	Instrumento o u obtención de datos	Indicador o codificador
1.Diagnóstico	Análisis concienzudo de la expresión clínica de la enfermedad periodontal	Cualitativa	Nominal	Datos de la ficha clínica	1:Sano 2. EP

2. Concentración de nano vesículas	Vesícula de diámetro que bordea entre 40 a 160 nm.	Cuantitativa	Discreta	Análisis por Nanosight	1: Tamaño 2: Concentración
3. Edad	Tiempo transcurrido desde la fecha de nacimiento	Cuantitativa	Discreta	Ficha clínica del paciente	1: 50- 64 años 2: 65 o > años

7.5 Técnica de recolección de datos

Previo al inicio del estudio, se solicitó la aprobación del Comité de ética científico de la Universidad Finis terrae, donde se obtuvo la aprobación con el N° 22-080 (Anexo 1).

Se elaboró un documento de consentimiento informado para los pacientes atendidos en la clínica del adulto mayor y senescente de la facultad de odontología, para participar de forma voluntaria e informada (Anexo 2).

Para realizar el estudio, se procedió a pedir autorización a los docentes encargados de las asignaturas de la clínica del adulto mayor y senescente I y II mediante una carta, explicando los objetivos del estudio (Anexo 3).

Los pacientes de la clínica del adulto mayor y senescente I y II que accedieron a participar firmaron el consentimiento informado, en el cual se les explicaron los objetivos y propósitos de la investigación, así como también el uso de su muestra de saliva.

Por otro lado, los datos de la ficha clínica se recolectaron a través de los alumnos tratantes de los pacientes de la clínica de CAS I y II de la Universidad Finis Terrae durante el año 2022.

Todos los participantes del estudio fueron anonimizados y codificados con un número de base de datos de Excel. Los datos y resultados del estudio fueron resguardados en dominio de los autores de la investigación, mientras que las fichas clínicas y su información fueron resguardadas por la Facultad de Odontología de la

7.6 Análisis de tamaño y concentración de exosomas

Los pacientes depositaron su saliva en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. Las muestras de saliva fueron diluidas 20 veces, obteniéndose 50 uL de cada una para su visualización en el equipo Nanosight NS300 de Malvern Panalytical.

La distribución de tamaño y concentración de Exosomas fue analizada mediante *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA) (15) usando el instrumento Nanosight NS300 (Malvern, Worcestershire, UK) en las dependencias de la Universidad de los Andes, según carta de autorización al tutor encargado de esta tesis (Anexo 4).

Los controles del análisis de los Exosomas incluyeron un control negativo consistente de PBS. Además, se utilizó una solución de partículas de Látex-Poliestireno (Malvern, Worcestershire, UK) de 100 nm de tamaño como control positivo de la identificación de tamaño de partículas por Nanosight. Por cada muestra se analizó >200 trazados (*tracks*) y se grabaron al menos 2 videos de 60 s cada uno.

7.7 Análisis e interpretación de datos

Los datos fueron registrados en un planilla Excel. Se realizó el manejo de datos donde se corroboró que no existieran celdas en blanco o valores fuera de rangos esperados. Posteriormente, los datos fueron exportados al programa Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) para su análisis. Se describió a los participantes mediante tablas de frecuencia de la variable concentración de nanovesículas y presencia de enfermedad periodontal. Posteriormente, se comprobó si los datos presentan una distribución normal, mediante test shapiro wilk. Luego se realizaron pruebas de comparación de medias, utilizando U de Mann-Whitney.. El estudio utilizó un nivel de significación de 0,05.

que no existen mayores diferencias en cuanto a la concentración de nanopartículas visualizadas. Se puede observar que con relación a los pacientes catalogados como sanos, se pesquisan 2 muestras analizadas que se encuentran dispersas del resto del grupo, observándose una mayor dispersión de las muestras en los pacientes sanos, mientras que los pacientes EP se encuentran con menos dispersión entre sí. Sin embargo se pudo dilucidar que entre los pacientes que tenían EP y presentaban menor dispersión, tenían en común su sexo femenino.

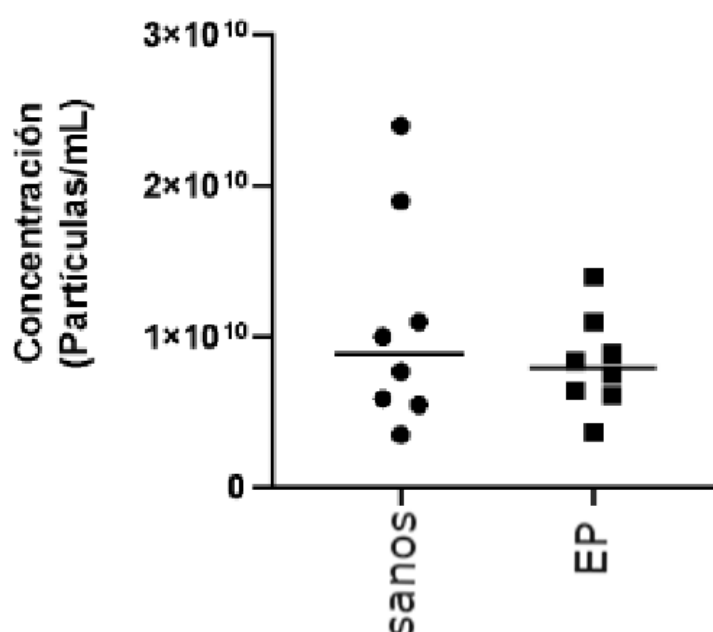


Figura 2. Niveles de partículas. Las muestras de saliva fueron recolectadas desde pacientes sanos (sin diagnóstico de enfermedad periodontal) y pacientes con diagnóstico de EP, enfermedad periodontal (Profundidad al sondaje (PB) mayor o igual a 3 mm y Sangrado al sondaje (BOP) mayor o igual al 10% de todos los sitios registrados). Se muestra la concentración total de nanopartículas/mL encontradas en la muestra de saliva de cada grupo. La línea horizontal en cada grupo representa la moda obtenida. La diferencia de concentración entre ambos grupos es no significativa ($p = 0,374$).

En la Figura 3, se grafica el tamaño de nanovesículas en el total de la muestra, y se observa que los pacientes EP presentan nanopartículas de mayor tamaño en comparación al grupo de pacientes sanos. Del mismo modo, se observa la presencia de partículas cuyos tamaños van más allá del rango de las nanopartículas tipo exosomas.

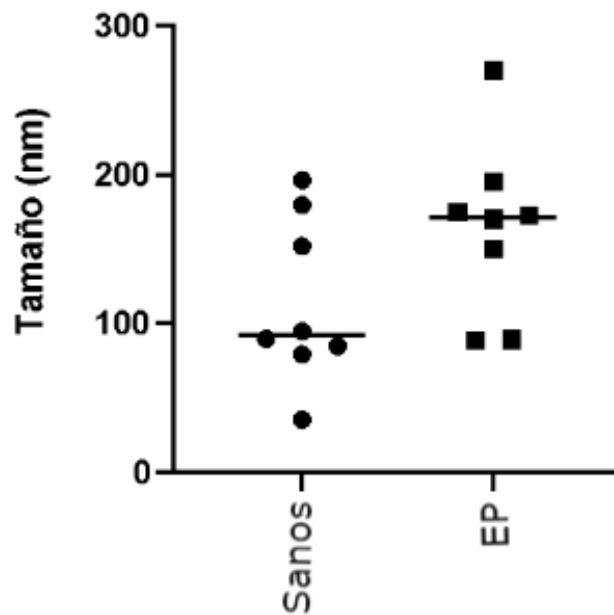


Figura 3. Tamaño total de nanovesículas en muestras de saliva (nm). Muestras de saliva recolectadas desde pacientes sanos (sin diagnóstico de enfermedad periodontal) y pacientes con diagnóstico de enfermedad periodontal. Se muestra el tamaño del total de nanopartículas encontradas en la muestra de saliva de cada grupo. En el grupo control hubo una muestra que no fue analizada debido a problemas en su adquisición. La línea horizontal en cada grupo representa la moda obtenida. La diferencia del tamaño de nanovesículas entre ambos grupos es no significativa ($p = 0,102$).

Con el objetivo de analizar la población de nanovesículas tipo exosomas, se evaluó la concentración de aquellas nanopartículas ubicadas en el rango de 40-160 nm, según lo descrito en la literatura (11). La Figura 4 muestra que los pacientes sanos presentaron una mayor dispersión en cuanto a la concentración de nanopartículas de 40-160 nm, mientras que los pacientes EP expusieron una dispersión menor. Por otro lado, se observa que los pacientes EP presentaron menores concentraciones de nanopartículas entre 40-160 nm respecto de los pacientes sanos.

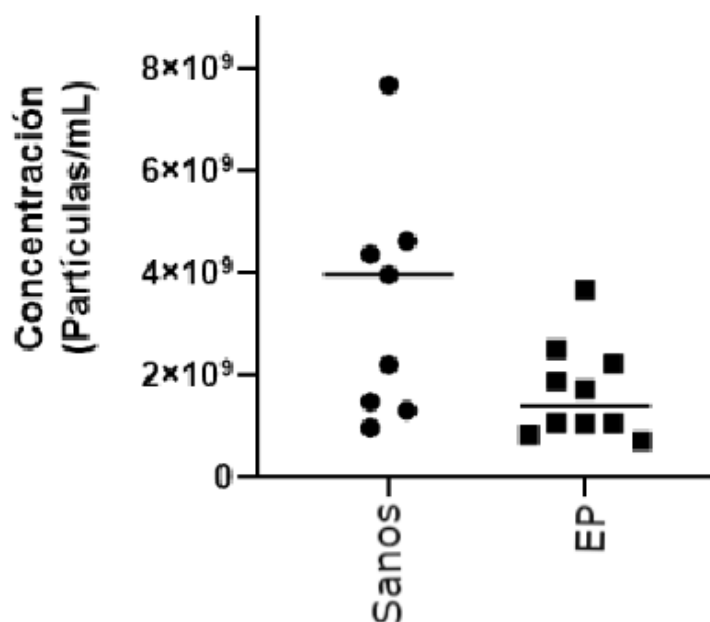


Figura 4. Concentración de nanovesículas tipo exosomas de 40-160 nm en muestras de saliva (partículas/mL). Muestras de saliva recolectadas desde pacientes sanos (sin diagnóstico de enfermedad periodontal) y pacientes con diagnóstico de enfermedad periodontal. Se muestra la concentración de nanopartículas del rango de tamaño de 40-160 nm, lo que está aceptado por la literatura para catalogar a los exosomas, en la muestra de saliva de cada grupo. En el grupo control hubo un muestra que no fue analizada debido a problemas en su adquisición. La línea horizontal en cada grupo representa la moda obtenida. La diferencia de concentración entre ambos grupos es no significativa ($p = 0,082$).

11. DISCUSIÓN

El presente estudio tuvo como objetivo principal establecer la relación entre concentración de nanovesículas y la presencia de enfermedad periodontal en pacientes de la clínica del adulto mayor y senescente (CAS) de la Universidad Finis Terrae, admitidos durante el año 2022.

De los 78 individuos reclutados, se examinó una muestra representativa total proveniente de 20 adultos, siendo 10 controles y 10 pacientes caracterizados con EP. Del grupo analizado, los individuos son mayores de 50 años; el 65% corresponde a mujeres y 35% a hombres. La edad de los pacientes a los cuales se

recopilaron las muestras se distribuyeron entre 50-64 años y mayor a 65 años. Donde la edad 50-65 años representa 67.7% de la población total. El 50% del total de la muestra representa un diagnóstico periodontal, mientras que el otro 50% son casos controlados, es decir, pacientes sanos.

La gran limitante en este estudio fue el bajo número de muestras que pudieron ser analizadas. Esto debido principalmente por no contar mayor presupuesto para usar el equipo por las horas necesarias para el total de muestras obtenidas, pudiendo analizar solo 20 muestras en total. La modalidad de uso del equipo Nanosight en la Universidad de Los Andes cambió durante el transcurso del proyecto, principalmente por cambios en la administración del *Facility Center* del Centro de Investigaciones Biomédicas (CIB-UAndes).

No obstante de lo anterior, los resultados obtenidos son muy esperanzadores en cuanto a las diferencias observadas entre ambos grupos de pacientes. A pesar de no haber diferencias significativas al comparar las variables de concentración (partículas/mL) y tamaño (nm) entre ambos grupos, los resultados sugieren diferencias entre ambos grupos. Sin embargo, con un aumento del N podrían establecerse las diferencias significativas entre ambos grupos.

Respecto de lo descrito en la literatura para patologías como el cáncer, problemas cardíacos, e incluso perfiles inflamatorios, se imaginó que los pacientes diagnosticados con EP presentarían mayores niveles de nanovesículas tipo exosomas en comparación a los pacientes sanos (13-16). Sin embargo, los resultados nos indicarían que la situación es contraria y que la hipótesis planteada para este proyecto estaría refutada. Cabe mencionar que dicha hipótesis fue elaborada según lo expuesto en la bibliografía y según lo proyectado al campo odontológico y enfermedad periodontal que se conoce actualmente. Respecto de este punto, es muy importante recalcar que la información que asocia el estudio de la concentración de exosomas con Enfermedad Periodontal es bastante escaso, y principalmente se han enfocado en la búsqueda de miRNAs, lo que tampoco ha resultado en algún resultado concluyente (61-64). Estudios recientes demostraron que exosomas obtenidos desde saliva de pacientes con EP presentaron bajos niveles de las tetraspaninas CD9 y CD81 en comparación con pacientes sanos, e incluso estos marcadores disminuían conforme avanzaba la severidad de la EP (65). Gracias a este tipo de investigación es posible suponer que la concentración de exosomas podría disminuir con el avance de la EP, sin embargo, faltan estudios

que asocien estos aspectos. Es sabido que previo al desarrollo de EP, el paciente cursa por un periodo de gingivitis, la cual al descontrolarse puede derivar en periodontitis. Estudios han demostrado que la saliva proveniente de individuos con gingivitis presenta más exosomas en comparación a la saliva de individuos sanos (66), sin embargo, es importante mencionar que el plasma contiene exosomas circulantes los cuales pudieron traspasar hacia la saliva a raíz del sangrado gingival, lo que pudo alterar el análisis de la muestra.

Tomando en cuenta entonces los estudios realizados a la fecha, hay muy poca evidencia que describa qué ocurre con la concentración de los exosomas en pacientes con EP. Una posible explicación radica en que, tras el establecimiento de la EP, aumenta el estrés oxidativo asociado a la inflamación que inicia y sostiene la periodontitis, reduce los niveles de las proteínas relacionadas con fusión de membranas: Proteínas relacionadas con Ras (Rab11a y Rab27a); suprimiendo la liberación de exosomas desde Células del Ligamento Periodontal (hPDLSCs) (68), un tipo de célula madre pluripotente que se ubica entre la raíz del diente y el bolsillo alveolar (69). Los exosomas secretados por las hPDLSCs cumplen una función protectora, están involucrados en la diferenciación osteogénica y en el remodelamiento de hueso alveolar (70-72). En otros estudios se han empleado exosomas provenientes de Células Madre Mesenquimales (MSCs) como agentes preventivos en la pérdida de hueso alveolar y como reductores de la inflamación que ocurre en las hPDLSCs (73- 76), reduciendo la probabilidad de desarrollar EP.

Otro tipo de estudios se han enfocado sobre el desarrollo de la EP desde el punto de vista de la modulación del sistema inmune, sugiriendo que determinados factores inmunosupresores podrían expresarse tras la disbiosis asociada a *P gingivalis*, como el caso de la expresión de PD-L1, una molécula que suprime la respuesta de Linfocitos T efectoras, reduciendo la respuesta inflamatoria del sistema inmune frente a los patógenos del complejo rojo. Se ha demostrado que exosomas salivales de pacientes con EP contienen mayores niveles de PD-L1 en comparación a sujetos sanos (77), pero no se menciona en este estudio lo que ocurre con la concentración de exosomas entre ambos grupos de pacientes pudiendo asociarse un aumento de PD-L1 con una reducción de los niveles de exosomas en pacientes con EP, lo que conduciría a un error en el análisis.

En resumen, los estudios sobre la relación entre exosomas y periodontitis se remontan al año 2019 cuando se describió que los exosomas provenientes de

Fibroblastos del Ligamento Periodontal (PDLFs) tenían un rol en la mantención de la homeostasis del periodonto. De ahí en adelante se ha observado que los miRNA de exosomas salivales podrían tener un rol como biomarcadores de la progresión de la EP, así como también el marcador PD-L1, mientras que las tetraspaninas CD9 y CD81 estarían disminuidas (77). Sin embargo, debe recalarse que estudios sobre la concentración de exosomas o nanovesículas tipo exosomas no se han realizado a la fecha, lo cual es muy importante de analizar para saber si los cambios mencionados y que aparecen en la literatura se deben a que hay variaciones en los niveles de exosomas, o bien, sobreexpresión de los biomarcadores.

Es importante destacar entonces el trabajo que se presenta con este proyecto de tesis donde se estaría marcando un punto de partida hacia una nueva línea de investigación que aún no ha sido explorada. Como se observa en los resultados, se sugiere que las nanovesículas tipo exosomas podrían disminuir en pacientes con EP principalmente debido a que el rol protector de las MSCs o las hPDLSCs no se estaría llevando a cabo y que el daño asociado sería muy severo a modo general. Posiblemente el incremento de los exosomas se produciría en estadios más tempranos del desarrollo de la EP. Si esto es cierto, entonces la continuación de estudios derivados de esta tesis permitiría establecer ventanas de observación para evaluar la progresión de la concentración de las nanovesículas tipo exosomas con el objetivo de contribuir al panel de biomarcadores que se describen en la literatura. Como investigadoras, estamos conscientes que aún resta aumentar el tamaño muestral y lograr diferencias estadísticas, pero de todas maneras los datos obtenidos son alentadores y promisorios de continuar con la investigación en la Facultad de Odontología de la Universidad Finis Terrae, lo que motivaría la inclusión de nuevos tesis y la generación de nuevos fondos para poder continuar con esta investigación.

12. CONCLUSIÓN

Nuestros resultados sugieren que los pacientes con EP presentan nanovesículas de mayor tamaño en comparación al grupo de pacientes sanos. Así como también sugieren que los pacientes con EP presentan menores concentraciones de nanovesículas tipo exosomas entre 40-160 nm respecto de los pacientes sanos. En base a lo observado, se concluye que es muy importante continuar con la investigación sobre el comportamiento de nanovesículas asociadas a la enfermedad

periodontal, ya que podría llegar a ser una herramienta precisa y confiable para enlentecer la progresión de dicha patología, tomando en consideración que existe poca literatura al respecto.

Para la obtención de mejores resultados es necesario la realización de un estudio completo de las muestras de saliva, con el uso de técnicas complementarias como microscopía electrónica e identificación de proteínas de superficie, para complementar el estudio de los exosomas.

Como proyecciones del presente estudio se sugiere en futuras investigaciones poder determinar una asociación de nanovesículas y EP en pacientes que no hayan tenido tratamiento periodontal previo, en comparación a pacientes que hayan comenzado la terapia periodontal no quirúrgico, esto con el objetivo también de demostrar el éxito del tratamiento.

13.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Sojod B, Périer J-M, Zalberg A, Bouzegza S, Halabi BE, Anagnostou F. Enfermedad periodontal y salud general. EMC - Tratado Med [Internet]. 2022;26(1):1–8.
- 2) Hegde R, Awan KH. Effects of periodontal disease on systemic health. Dis Mon [Internet]. 2019 [citado el 1 de julio de 2022];65(6):185–92. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30384973/>
- 3) León Regal M, Alvarado Borges A, de Armas García J, Miranda Alvarado L, Varens Cedeño J, Cuesta del Sol J. Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares: cifras alarmantes. Finlay [Internet]. 2015 [citado el 14 de diciembre de 2022];5(1):47–62. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2221-24342015000100006
- 4) Fischer RG, Lira Junior R, Retamal-Valdes B, Figueiredo LC de, Malheiros Z, Stewart B, et al. Periodontal disease and its impact on general health in Latin America. Section V: Treatment of periodontitis. Braz Oral Res [Internet]. 2020 [citado el 1 de julio de 2022];34(suppl 1):e026. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/bor/a/vCQnfzKf8Y3CrGRPMcCFPDz/?lang=en>
- 5) Graves DT, Corrêa JD, Silva TA. The oral Microbiota is modified by systemic diseases. J Dent Res [Internet]. 2019 [citado el 1 de julio de 2022];98(2):148–56. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30359170/>
- 6) Verma D, Garg PK, Dubey AK. Insights into the human oral microbiome. Arch Microbiol [Internet]. 2018 [citado el 9 de julio de 2022];200(4):525–40. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29572583/>
- 7) Curtis MA, Diaz PI, Van Dyke TE. The role of the microbiota in periodontal disease. Periodontol 2000 [Internet]. 2020 [citado el 1 de julio de 2022];83(1):14–25. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32385883/>
- 8) Khouly I, Strauss FJ, Jung RE, Froum SJ. Effect of alveolar ridge preservation on clinical attachment level at adjacent teeth: A randomized clinical trial. Clin Implant Dent Relat Res [Internet]. 2021 [citado el 1 de julio de 2022];23(5):716–25. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34448354/>
- 9) Highfield J. Diagnosis and classification of periodontal disease. Aust Dent J [Internet]. 2009 [citado el 16 de julio de 2022];54 Suppl 1:S11-26. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19737262/>

- 10) Ridgeway EE. Periodontal disease: diagnosis and management. *J Am Acad Nurse Pract* [Internet]. 2000 [citado el 16 de julio de 2022];12(3):79–84. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11033686/>
- 11) Yu J, Lin Y, Xiong X, Li K, Yao Z, Dong H, et al. Detection of exosomal PD-L1 RNA in saliva of patients with periodontitis. *Front Genet* [Internet]. 2019 [citado el 1 de julio de 2022];10:202. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30923536/>
- 12) Batrakova EV, Kim MS. Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery. *J Control Release* [Internet]. 2015 [citado el 9 de julio de 2022];219:396–405. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26241750/>
- 13) Tavasolian F, Hosseini AZ, Rashidi M, Soudi S, Abdollahi E, Momtazi-Borojeni AA, et al. The impact of immune cell-derived exosomes on immune response initiation and immune system function. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2021 [citado el 9 de julio de 2022];27(2):197–205. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33290196>
- 14) Matsubara K, Matsubara Y, Uchikura Y, Sugiyama T. Pathophysiology of preeclampsia: The role of exosomes. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 [citado el 9 de julio de 2022];22(5):2572. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33806480/>
- 15) Xu K, Zhang C, Du T, Gabriel ANA, Wang X, Li X, et al. Progress of exosomes in the diagnosis and treatment of lung cancer. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2021 [citado el 9 de julio de 2022];134(111111):111111. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33352449/>
- 16) Guo M, Hao Y, Feng Y, Li H, Mao Y, Dong Q, et al. Microglial exosomes in neurodegenerative disease. *Front Mol Neurosci* [Internet]. 2021 [citado el 9 de julio de 2022];14:630808. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34045943/>
- 17) Koritzinsky EH, Street JM, Star RA, Yuen PST. Quantification of exosomes: Quantification of exosomes. *J Cell Physiol* [Internet]. 2017 [citado el 1 de julio de 2022];232(7):1587–90. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27018079/>
- 18) Haidar ZS. Exosomes: Human saliva-derived nanoBiomarkers for use in clinical dentistry? *Int j odontostomatol* [Internet]. 2018 [citado el 8 de julio de 2022];12(1):5–6. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-381X201800010

0005

- 19) Wang Y, Xie Y, Zhang A, Wang M, Fang Z, Zhang J. Exosomes: An emerging factor in atherosclerosis. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2019 [citado el 9 de julio de 2022];115(108951):108951. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31078042/>
- 20) Vidal M. Exosomes: Revisiting their role as “garbage bags”. *Traffic* [Internet]. 2019 [citado el 9 de julio de 2022];20(11):815–28. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31418976/>
- 21) Zhang Y, Bi J, Huang J, Tang Y, Du S, Li P. Exosome: A review of its classification, isolation techniques, storage, diagnostic and targeted therapy applications. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2020 [citado el 9 de julio de 2022];15:6917–34. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33061359/>
- 22) Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science* [Internet]. 2020 [citado el 3 de julio de 2022];367(6478):eaau6977. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32029601/>
- 23) Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers* [Internet]. 2017 [citado el 2 de julio de 2022];3:17038. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28805207/>
- 24) de Jong T, Bakker AD, Everts V, Smit TH. The intricate anatomy of the periodontal ligament and its development: Lessons for periodontal regeneration. *J Periodontal Res* [Internet]. 2017 [citado el 9 de julio de 2022];52(6):965–74. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28635007/>
- 25) Berkovitz BK. Periodontal ligament: structural and clinical correlates. *Dent Update* [Internet]. 2004 [citado el 9 de julio de 2022];31(1):46–50, 52, 54. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15000009/>
- 26) Beertsen W, McCulloch CA, Sodek J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol 2000* [Internet]. 1997 [citado el 9 de julio de 2022];13(1):20–40. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9567922/>
- 27) Lindhe J. *Periodontologia clinica E implantologia odontologica - 4b: Edicion. Editorial Medica Panamericana; 2005.*
- 28) Hassell TM. Tissues and cells of the periodontium. *Periodontol 2000* [Internet]. 1993 [citado el 9 de julio de 2022];3(1):9–38. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9673156/>
- 29) Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease.

- Periodontol 2000 [Internet]. 2006 [citado el 9 de julio de 2022];40(1):11–28. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16398683/>
- 30) Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. J Periodontol [Internet]. 2008 [citado el 2 de julio de 2022];79(8 Suppl):1585–91. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18673014/>
- 31) Moore WE. Microbiology of periodontal disease. J Periodontol Res [Internet]. 1987 [citado el 9 de julio de 2022];22(5):335–41. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2961863/>
- 32) Mombelli A. Microbial colonization of the periodontal pocket and its significance for periodontal therapy. Periodontol 2000 [Internet]. 2018 [citado el 9 de julio de 2022];76(1):85–96. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29193304/>
- 33) Kajiya M, Kurihara H. Molecular mechanisms of periodontal disease. Int J Mol Sci [Internet]. 2021 [citado el 9 de julio de 2022];22(2):930. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33477754/>
- 34) Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. J Periodontol [Internet]. 2018 [citado el 2 de julio de 2022];89 Suppl 1:S159–72. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29926952/>
- 35) Socransky SS. Microbiology of periodontal disease -- present status and future considerations. J Periodontol [Internet]. 1977 [citado el 9 de julio de 2022];48(9):497–504. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/333085/>
- 36) Brandtzaeg P, Kraus FW. Autoimmunity and periodontal disease. Odontol Tidskr [Internet]. 1965 [citado el 9 de julio de 2022];73:281–393. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14317731/>
- 37) Pinto G, Silva MD, Peddey M, Sillankorva S, Azeredo J. The role of bacteriophages in periodontal health and disease. Future Microbiol [Internet]. 2016 [citado el 9 de julio de 2022];11:1359–69. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27633580/>
- 38) Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. Ann Periodontol [Internet]. 1999 [citado el 3 de julio de 2022];4(1):1–6. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10863370/>
- 39) Orientaciones técnicas para la prevención y tratamiento de las enfermedades gingivales y periodontales [Internet]. Minsal.cl. 2017 [citado el 3 de julio de 2022].
Disponible en: https://diprece.minsal.cl/wrdprss_minsal/wp-content/uploads/2018

/02/2018.01.23_OT-enfermedades-gingivales-y-periodontales.pdf

- 40) Escudero-Castaño N, Perea-García MA, Bascones-Martínez A. Revisión de la periodontitis crónica: Evolución y su aplicación clínica. Av periodoncia implantol oral [Internet]. 2008 [citado el 14 de diciembre de 2022];20(1):27–37. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-65852008000100003
- 41) Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. Ann Periodontol [Internet]. 1996 [citado el 3 de julio de 2022];1(1):821–78. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9118282/>
- 42) Carvajal P. Enfermedades periodontales como un problema de salud pública: el desafío del nivel primario de atención en salud. Rev clín periodoncia implantol rehabil oral [Internet]. 2016;9(2):177–83. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.piro.2016.07.001>
- 43) Salazar S. Actualización del Protocolo de Tratamiento Periodontal Del Ministerio de Salud Pública Del Ecuador. [Tesis de Grado para especialidad de periodoncia]. Quito. Facultad de Odontología, Instituto de Superior de Investigación y Posgrado, Universidad Central del Ecuador. [Internet]. 2017. [citado el 3 de julio de 2022] Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/9481>
- 44) Chandki R, Banthia P, Banthia R. Biofilms: A microbial home. J Indian Soc Periodontol [Internet]. 2011 [citado el 9 de julio de 2022];15(2):111–4. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21976832/>
- 45) Alvear F, Vélez M, Botero L. Factores de riesgo para las enfermedades periodontales. Rev Fac Odontol Univ Antioq [Internet]. 2010 Dic [cited 2017 Jun 06]; 22(1):109-116. available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-246X2010000200012&lng=es.
- 46) Heller D, Helmerhorst EJ, Gower AC, Siqueira WL, Paster BJ, Oppenheim FG. Microbial diversity in the early in vivo-formed dental biofilm. Appl Environ Microbiol [Internet]. 2016 [citado el 9 de julio de 2022];82(6):1881–8. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26746720/>
- 47) Abisado RG, Benomar S, Klaus JR, Dandekar AA, Chandler JR. Bacterial quorum sensing and microbial community interactions. MBio [Internet]. 2018 [citado el 3 de julio de 2022];9(3). Disponible en:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29789364/>
- 48) Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets: Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000* [Internet]. 2002 [citado el 3 de julio de 2022]; 28(1):12–55. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12013340/>
- 49) Bascones A, González Moles MA. Immunological mechanism of the periodontal and the periimplants diseases. *Av periodoncia implantol oral* [Internet]. 2003 [citado el 3 de julio de 2022]; 15(3):121–38. Disponible en: [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-6585200300030003 &lng=en&nrm=iso&tlng=en](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-6585200300030003&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
- 50) Bosshardt DD. The periodontal pocket: pathogenesis, histopathology and consequences. *Periodontol 2000* [Internet]. 2018 [citado el 3 de julio de 2022]; 76(1):43–50. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29194796/>
- 51) Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2015 [citado el 3 de julio de 2022]; 15(1):30–44. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nri3785>
- 52) Dale BA. Periodontal epithelium: a newly recognized role in health and disease: Role of periodontal epithelium in health and disease. *Periodontol 2000* [Internet]. 2002 [citado el 3 de julio de 2022]; 30(1):70–8. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12236897/>
- 53) Shimono M, Ishikawa T, Enokiya Y, Muramatsu T, Matsuzaka K-I, Inoue T, et al. Biological characteristics of the junctional epithelium. *J Electron Microsc (Tokyo)* [Internet]. 2003; 52(6):627–39. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/jmicro/52.6.627>
- 54) Bendelac A, Schwartz RH. Th0 cells in the thymus: the question of T-helper lineages. *Immunol Rev* [Internet]. 1991 [citado el 9 de julio de 2022]; 123(1):169–88. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1684778/>
- 55) Rodan GA. Bone homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1998; 95(23):13361–2. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.95.23.13361>
- 56) López Silva MC, Diz-Iglesias P, Seoane-Romero JM, Quintas V, Méndez-Brea F, Varela-Centelles P. Actualización en medicina de familia: patología periodontal. *Semergen* [Internet]. 2017 [citado el 3 de julio de 2022]; 43(2):141–8. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27068254/> Campbell L, Millhouse E, Malcolm

- J, Culshaw S. T cells, teeth and tissue destruction
 - what do T cells do in periodontal disease? *Mol Oral Microbiol* [Internet]. 2016;31(6):445–56. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/omi.12144>
- 57) Nakao Y, Fukuda T, Zhang Q, et al. Exosomes from TNF- α -treated human gingiva-derived MSCs enhance M2 macrophage polarization and inhibit periodontal bone loss. *Acta Biomater.* [Internet]. 2021; [citado el 9 de julio de 2022];122:306–324. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33359765/>
- 58) Tsukasaki M, Takayanagi H. Osteoimmunology: evolving concepts in bone-immune interactions in health and disease. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2019 [citado el 3 de julio de 2022];19(10):626–42. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41577-019-0178-8>
- 59) Zhang Q, Shi S, Liu Y, Uyanne J, Shi Y, Shi S, et al. Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *J Immunol* [Internet]. 2009;183(12):7787–98. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0902318>
- 60) Zhou B, Xu K, Zheng X, Chen T, Wang J, Song Y, et al. Application of exosomes as liquid biopsy in clinical diagnosis. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2020 [citado el 3 de julio de 2022];5(1):144. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32747657/>
- 61) Nik Mohamed Kamal NNS, Awang RAR, Mohamad S, Shahidan WNS. Plasma- and saliva exosome profile reveals a distinct MicroRNA signature in chronic periodontitis. *Front Physiol* [Internet]. 2020;11:587381. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2020.587381>
- 62) Fujimori K, Yoneda T, Tomofuji T, Ekuni D, Azuma T, Maruyama T, et al. Detection of salivary miRNAs reflecting chronic periodontitis: A pilot study. *Molecules* [Internet]. 2019;24(6):1034. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24061034>
- 63) Safari Z, Firouzi A, Rezaeikalantari N, Mohammadi S, Ranjbar N, Shahpori H, et al. The salivary exosomal microRNA as a potential biomarker in patients with periodontitis and oral cancers. *Chem Biol Drug Des* [Internet]. 2022 [citado el 9 de diciembre de 2022]; Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36301416/>
- 64) Tomofuji T, Yoneda T, Machida T, Ekuni D, Azuma T, Kataoka K, et al. MicroRNAs as serum biomarkers for periodontitis. *J Clin Periodontol* [Internet]. 2016 [citado el 9 de diciembre de 2022];43(5):418–25.

- Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26910654/>
- 65) Tobón-Arroyave SI, Celis-Mejía N, Córdoba-Hidalgo MP, Isaza-Guzmán DM. Decreased salivary concentration of CD9 and CD81 exosome-related tetraspanins may be associated with the periodontal clinical status. *J Clin Periodontol* [Internet]. 2019 [citado el 9 de diciembre de 2022];46(4):470–80. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/jcpe.13099>
- 66) Han P, Lai A, Salomon C, Ivanovski S. Detection of salivary small extracellular vesicles associated inflammatory cytokines gene methylation in gingivitis. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 [citado el 9 de diciembre de 2022];21(15):5273. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32722322/>
- 67) Chen Z, Lu M, Zhang Y, Wang H, Zhou J, Zhou M, et al. Oxidative stress state inhibits exosome secretion of hPDLCs through a specific mechanism mediated by PRMT1. *J Periodontal Res* [Internet]. 2022 [citado el 9 de diciembre de 2022] ;57(6):1101–15. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/jre.13040>
- 68) Rajan TS, Giacoppo S, Diomede F, Ballerini P, Paolantonio M, Marchisio M, et al. The secretome of periodontal ligament stem cells from MS patients protects against EAE. *Sci Rep* [Internet]. 2016 [citado el 9 de diciembre de 2022];6:38743. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27924938/>
- 69) Fei D, Xia Y, Zhai Q, Wang Y, Zhou F, Zhao W, et al. Exosomes regulate interclonal communication on osteogenic differentiation among heterogeneous osteogenic single-cell clones through PINK1/Parkin-mediated mitophagy. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2021 [citado el 9 de diciembre de 2022] ;9:687258. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2021.687258>
- 70) Liu C, Li Y, Han G. Advances of mesenchymal stem cells released extracellular vesicles in periodontal bone remodeling. *DNA Cell Biol* [Internet]. 2022 [citado el 9 de diciembre de 2022] ;41(11):935–50. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1089/dna.2022.0359>
- 71) Gegout P-Y, Stutz C, Olson J, Batool F, Petit C, Tenenbaum H, et al. Interests of exosomes in bone and periodontal regeneration: A systematic review. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2021 [citado el 9 de diciembre de 2022] ;1341:67–87. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1007/5584_2020_593
- 72) Nakao Y, Fukuda T, Zhang Q, Sanui T, Shinjo T, Kou X, et al. Exosomes from TNF- α -treated human gingiva-derived MSCs enhance M2 macrophage polarization and inhibit periodontal bone loss. *Acta Biomater* [Internet]. 2021 [citado el 9 de diciembre de 2022] ;122:306–24.

Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2020.12.046>

- 73) Sun J, Wang Z, Liu P, Hu Y, Li T, Yang J, et al. Exosomes derived from human gingival mesenchymal stem cells attenuate the inflammatory response in periodontal ligament stem cells. *Front Chem* [Internet]. 2022 [citado el 9 de diciembre de 2022];10:863364. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fchem.2022.863364>
- 74) Shimizu Y, Takeda-Kawaguchi T, Kuroda I, Hotta Y, Kawasaki H, Hariyama T, et al. Exosomes from dental pulp cells attenuate bone loss in mouse experimental periodontitis. *J Periodontal Res* [Internet]. 2022 [citado el 9 de diciembre de 2022];57(1):162–72. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/jre.12949>
- 75) Zhao Y, Gong Y, Liu X, He J, Zheng B, Liu Y. The experimental study of periodontal ligament stem cells derived exosomes with hydrogel accelerating bone regeneration on alveolar bone defect. *Pharmaceutics* [Internet]. 2022 [citado el 9 de diciembre de 2022];14(10):2189. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics14102189>
- 76) Yu J, Lin Y, Xiong X, Li K, Yao Z, Dong H, et al. Detection of exosomal PD-L1 RNA in saliva of patients with periodontitis. *Front Genet* [Internet]. 2019 [citado el 9 de diciembre de 2022];10:202. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2019.00202>
- 77) Nik Mohamed Kamal NNS, Shahidan WNS. Salivary exosomes: From waste to promising periodontitis treatment. *Front Physiol* [Internet]. 2021 [citado el 9 de diciembre de 2022];12:798682. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35069258/>
- 78) Kang H. Sample size determination and power analysis using the G*Power software. *J Educ Eval Health Prof* [Internet]. 2021;18:17. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3352/jeehp.2021.18.17>
- 79) Murao A, Brenner M, Aziz M, Wang P. Exosomes in sepsis. *Front Immunol* [Internet]. 2020 [citado el 15 de diciembre de 2022];11:2140. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33013905/>

14. ANEXOS

ANEXO 1

**ACTA DE APROBACIÓN NUEVO ESTUDIO COMITÉ
ÉTICO CIENTÍFICO UNIVERSIDAD FINIS TERRAE**
Acreditado por SEREMI de Salud
Resolución Exenta N°002681/2021 del 24 de febrero de 2021

Fecha y N° de Sesión: 03 de octubre de 2022, sesión extraordinaria n°4 **ID Protocolo:** 22-080

Título del Proyecto: Relación entre concentración de nano vesículas y presencia de enfermedad periodontal en pacientes de la clínica del adulto mayor y senescente (CAS) de la universidad Finis Terrae en el año 2022.

Investigador Responsable: Daniel Hevia Magaña

Facultad/Unidad Académica: Facultad de Odontología

Sitio de realización: Clínica del adulto mayor y senescente (CAS) de la universidad Finis Terrae

Financiamiento: Autofinanciado

Miembros del Comité que participaron en la aprobación del estudio:

Beatriz Shand Klagges, Presidente CEC-UFT

Karin Weinborn Astudillo, Vicepresidente CEC-UFT

Andrea Villagrán Torres, Secretaria Ejecutiva CEC-UFT

Ma. Verónica Romero, representante de la comunidad

Paulo López Soto, Instituto de Bioética

Pilar Busquet Losada, Escuela de Enfermería

Enrique Navarro, Abogado Facultad de Derecho

Francisca Valdivieso Undurraga, Facultad de Medicina

Documentos recibidos y revisados por el Comité:

- Proyecto de Investigación
- Curriculum vitae del investigador
- Anexo I “Ficha de presentación”
- Anexo II “Compromiso del Investigador”
- Anexo III “Respaldo Unidad Académica”
- Anexo IV “Resumen del proyecto de investigación para evaluación ética”
- Anexo V “Documento de consentimiento informado”

Considerando que:

1. El investigador responsable referida cuenta con la experiencia necesaria para la conducción y el desarrollo de este tipo de estudio;
2. La metodología descrita es apropiada para el cumplimiento del objetivo general del estudio que consiste en: *Establecer la relación entre concentración de nano vesículas y la presencia de*

UNIVERSIDAD FINIS TERRAE



enfermedad periodontal en pacientes de la clínica del adulto mayor y senescente (CAS) de la Universidad Finis Terrae en el año 2022 y los respectivos objetivos específicos, de acuerdo con los estándares internacionales de rigor científico;

3. Durante la conducción del estudio se garantiza un balance riesgo/beneficio favorable para los participantes;
4. El protocolo contempla todos los resguardos necesarios para la seguridad y bienestar de los participantes;
5. Se ha contemplado el resguardo de la confidencialidad de la información sensible e identificable en la difusión de los resultados, por lo que no introduce un riesgo de menoscabo para la intimidad de los participantes; y
6. Los participantes ingresarán voluntariamente luego de ser adecuadamente informados sobre los aspectos esenciales del estudio, sus deberes y derechos, y los plazos estipulados para el cumplimiento de los objetivos de la investigación.

Constatado que, el texto del documento de Consentimiento Informado contiene:

1. La descripción general de los objetivos de la investigación;
2. El detalle de los procedimientos que involucra la participación en este estudio;
3. Los antecedentes sobre el uso que se dará a la información obtenida a partir de cada procedimiento de la investigación;
4. El compromiso respecto a la utilización actual y futura de la información, la que sólo se realizará dentro de los marcos del presente estudio y para el logro de dichos objetivos;
5. El resguardo de la confidencialidad y el anonimato de la información recogida, según corresponde a cada procedimiento del estudio;
6. El detalle respecto del costo en tiempo que significa la participación en el estudio;
7. La información sobre los beneficios y derechos frente a riesgos por la participación en la investigación; y
8. La voluntariedad de la participación y la garantía para cada participante de hacer abandono del estudio, sin repercusión alguna.

Resolución CEC UFT:

Este proyecto ha sido **aprobado** por este Comité con fecha **03 de octubre** en la **sesión extraordinaria N°4**, la que tiene vigencia de un año.

El CEC solicita al investigador responsable que:

1.- Antes de iniciar el estudio, deberá contar con la autorización de la autoridad administrativa correspondiente a la institución en la cual se ejecute el estudio (Director Hospital, Centro de Salud, Colegio o quien corresponda). El no cumplimiento de esta obligación lo expone a sanciones administrativas de acuerdo a la legislación vigente.



2.- Para iniciar el proceso de consentimiento y de reclutamiento se debe disponer previamente de la última versión aprobada y timbrada por este Comité ***los documentos de Consentimiento Informado e instrumentos.***

3.- La presente aprobación ética tiene una **validez de un año**, al cabo del cual deberá solicitar su renovación, con al menos 45 días de anticipación si desea continuar con el estudio. Si no ha recibido la respuesta oficial a su solicitud, el investigador deberá detener las actividades del proyecto, no podrá enrolar a ningún nuevo participante y no podrá proceder con el análisis de los datos.

4.- En la eventualidad de requerir cualquier modificación al estudio o a los documentos aprobados originalmente, el investigador deberá notificarlo al Comité por medio de una enmienda al correo cec@uft.cl para la evaluación y emisión de una nueva acta de resolución ética.

Muy cordialmente,

Mg. Andrea Villagrán Torres
Klagges Secretaria Ejecutiva CEC-UFT



Dra. Beatriz Shand
Presidenta CEC-UFT

EN CASO DE CUALQUIER DUDA SE LE SOLICITA CONTACTARSE CON EL CEC-UFT

Se certifica que la información contenida en el presente documento es correcta y que refleja el Acta del Comité Ético Científico de la Universidad Finis Terrae (CEC-UFT). Este Comité adhiere a los principios éticos de la Universidad Finis Terrae que considera como eje fundamental el respeto a la dignidad de la persona humana en cualquier condición. Este Comité cumple además con las Guías de buena práctica clínica definidas por la Conferencia Internacional de Armonización (GCP-ICH); y con las leyes chilenas 19.628; 20.120; 20.584 y 20.850 que modifica el Código Sanitario.

ANEXO 2

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Nombre del Estudio: Relación entre concentración de nano vesículas y presencia de Enfermedad periodontal en pacientes de la clínica del adulto mayor y senescente (CAS) de la Universidad Finis Terrae en el año 2022.

**Patrocinador/
Financiamiento** Autofinanciado

Investigador Responsable: Nombre: Daniel Hevia Magaña

Correo electrónico:

dheviam@uft.edu

Teléfono: +569 9396 6957

Unidad académica Facultad de odontología

El propósito de esta información es ayudarle a tomar la decisión de participar -o no- en una investigación, y, si es el caso, para autorizar el uso de muestras humanas o información personal (por ejemplo, información de la ficha clínica). Lea cuidadosamente este documento, puede hacer todas las preguntas que necesite al investigador y tomarse el tiempo necesario para decidir.

Este estudio está siendo financiado por autofinanciamiento.

1. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Usted ha sido invitado/invitada a participar en este estudio, dado a que es paciente de la clínica del adulto mayor y senescente I y II del año 2022 en la universidad Finis Terrae. Se estudiará la relación de los exosomas presentes en su saliva y la enfermedad periodontal; estudio que se realizará por las alumnas tesistas Loreto Solís Espíndola y Betania Tillería Ruz, pertenecientes al pregrado de la Universidad Finis Terrae. El objetivo de este estudio es establecer la relación entre concentración de nano vesículas y la presencia de enfermedad periodontal en pacientes de la clínica del adulto mayor y senescente (CAS) de la Universidad Finis Terrae en el año 2022.



2 PROCEDIMIENTOS DE LA INVESTIGACIÓN: METODOLOGÍA

La recolección de datos se realiza por los alumnos tesistas mediante el alumno tratante, en donde se recolectarán los datos de la ficha clínica, datos periodontales y datos como profundidad al sondaje, índice de sagrado e índice de higiene. Todos estos datos serán anotados a partir de la inspección clínica del alumno. Las alumnas tesistas no tendrán acceso a las fichas clínicas de los pacientes. Posteriormente se obtendrá una muestra de una gota de su saliva para realizar dicho estudio de nano vesículas. El consentimiento informado solicita la autorización del acceso a los datos recopilados por el alumno tratante para utilizar esta información en la investigación. Todo esto bajo el margen del anonimato.

Si usted acepta participar de este estudio se le hará lo siguiente:

- Se recolectarán datos de su ficha clínica mediante el alumno tratante, como algunos datos odontológicos relevantes de sus atenciones anteriores, los que serán anotados a partir de la inspección clínica que se realiza habitualmente.
- Posteriormente, se tomará una muestra de saliva, aproximadamente una gota. Se le pedirá escupir en un vaso para la obtención de esta.
- Estas muestras se almacenarán a -20°C en las dependencias de la universidad por un tiempo de 2 años bajo responsabilidad del Dr. Daniel Hevia. Las muestras obtenidas serán usadas únicamente para el propósito de esta investigación. Si en el futuro son usadas para propósitos diferentes a los de esta investigación, se le solicitará un nuevo consentimiento.

BENEFICIOS

Usted no se beneficiará por participar en esta investigación. Sin embargo, la información que se obtendrá gracias a su participación será de utilidad para conocer más acerca de la relación entre concentración de nano vesículas y la presencia de enfermedad periodontal.

3 RIESGOS

La investigación no tiene ningún riesgo adicional a lo esperado en su atención odontológica,



ya que la recolección de datos es una actividad rutinaria dentro de la atención clínica y la muestra de saliva es un procedimiento muy poco invasivo y no provee riesgos para usted. Tampoco generará un retraso en su tratamiento. La investigación no reviste ningún costo monetario para usted. La información obtenida se mantendrá en forma confidencial, no serán compartidas con personas externas a la investigación, ni entre los pacientes seleccionados.

5. COSTOS

Todos aquellos procedimientos/tratamientos/gastos necesarios por la participación del sujeto del estudio serán pagados por el patrocinante



6. CONFIDENCIALIDAD DE LA INFORMACIÓN

Los resultados obtenidos tras el estudio de las muestras, serán trabajados en una unidad de almacenamiento física al que tendrán acceso exclusivamente las alumnas tesistas; esto permite que la información se trabaje de manera segura, imposibilitando la invasión a los datos o posibles hackeos a sufrir si estuvieran almacenados en una nube.

Es posible que los resultados obtenidos sean presentados en revistas y conferencias médicas, sin embargo, su participación en esta investigación es completamente voluntaria, resguardando su anonimato por medio de la codificación de su identidad. Dicha codificación será generada con su género y su número de participante asignado, permitiendo que durante el estudio de las muestras se resguarde su anonimato.

7. VOLUNTARIEDAD

Su participación en esta investigación es completamente voluntaria. Usted tiene el derecho a no aceptar participar o a retirar su consentimiento y retirarse de esta investigación en el momento que lo estime conveniente. Al hacerlo, usted no pierde ningún derecho que le asiste como paciente de esta institución y no se verá afectada la calidad de la atención médica que merece. Si usted retira su consentimiento, su información será eliminada y la información obtenida no será utilizada.

Si tiene preguntas acerca de esta investigación médica puede contactar o llamar al investigador responsable del estudio. Investigador responsable: Dr. Daniel Hevia Magaña
Correo electrónico: dheviam@uft.edu teléfono:
+56993966957.

Este estudio fue aprobado por el Comité Ético Científico de la Universidad Finis Terrae. Si tiene preguntas acerca de sus derechos como participante en una investigación médica, usted puede escribir al correo electrónico: cec@uft.cl del Comité ético Científico, para que la presidenta, Beatriz Shand.

8. DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO



- Se me ha explicado el propósito de esta investigación, los procedimientos, los riesgos, los beneficios y los derechos que me asisten y que me puedo retirar de ella en el momento que lo desee.
- Firmo este documento voluntariamente, sin ser forzado/forzada a hacerlo.
- No estoy renunciando a ningún derecho que me asista.
- Se me comunicará de toda nueva información relacionada con el estudio del fármaco / equipo / otro que surja durante la investigación y que pueda tener importancia directa para mí o mi representado
- Se me ha informado que tengo el derecho a reevaluar mi participación en esta investigación según mi parecer y en cualquier momento que lo desee. En el caso de retiro, no sufriré sanción o pérdida de derechos a la atención sanitaria.
- Yo autorizo al investigador responsable y sus colaboradores a acceder y usar los datos contenidos en mi ficha clínica para los propósitos de esta investigación. Y el uso de material humano de mi propiedad si el estudio lo amerita.
- Al momento de la firma, se me entrega una copia firmada de este documento.

FIRMAS

Participante:

- Nombre: _____ Fecha: _____

- Firma: _____

Investigador Responsable:

Fecha: _

- Nombre: _____

- Firma: _____

Director de la Institución o su delegado:

- Nombre: _____ Fecha: _____

- Firma: _____



ANEXO 3

Carta a los docentes encargados de CAS-404, CAS-509



Estimado profesor encargado:

Junto con saludarle, nos dirigimos a usted con el propósito de solicitar su autorización para realizar nuestro proyecto de investigación titulado “ Relación entre concentración de nano vesículas y enfermedad periodontal en pacientes de la clínica del adulto mayor y senescente (CAS) de la Universidad Finis Terrae en el año 2022, este estudio se realizará en pacientes mayores de 50 años que tengan diagnóstico de enfermedad periodontal y que acepten voluntariamente en participar, previo consentimiento informado.

La recopilación de datos la realizarán los tesisistas por medio de los alumnos tratante mediante una planilla Excel, en donde se registrará edad, profundidad al sondaje, índice de higiene, índice de sangrado de los pacientes.

Este estudio no pretende causar inconveniente alguno ni alterar los tiempos clínicos de tratamiento de los alumnos.

Dicho estudio está siendo guiado por el docente Dr. Daniel Hevia y el gestor de línea de biología humana Dra. Estefanía Castillo.

Esperando una buena recepción ante dicha actividad.

Loreto Solis y Betania Tilleria

Alumnos de odontología

Docente encargado:

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Daniel Hevia Magaña', written in a cursive style.

Daniel Hevia Magaña

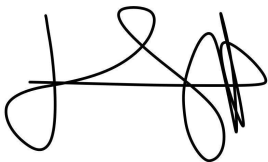
▪

Investigador: Betania Tillería Ruz

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Betania', written in a cursive style.

▪

Investigador: Loreto Solís Espíndola

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Loreto Solís Espíndola', written in a cursive style.

Sr. Daniel Hevia M.

Mediante la siguiente carta, se informa que su solicitud recibida el 12 de Septiembre del presente año en la cual solicita autorización para la utilización del equipo Nanosight (NS300, Malvern Instruments), fue autorizada por la dirección del centro de investigación biomédica de la Universidad de los Andes, en el marco del desarrollo de la Tesis de Pregrado: *"Relación entre concentración de nanovesículas y presencia de Enfermedad periodontal en pacientes de la clínica del adulto mayor y senescente (CAS) de la Universidad Finis Terrae en el año 2022"*.

Para efectos prácticos, podrá comenzar a utilizar el equipo previa notificación con 2 semanas de antelación. Para acceder al uso del equipo se realizará la coordinación mediante la plataforma electrónica "QReserve" cuya autorización será gestionada por el administrador del centro de investigación y en los horarios que estén disponibles en base a la utilización de los usuarios internos del centro de investigación, adicionalmente esta autorización efectuará como carta de compromiso a: reposición, reparación de hardware/software u otros insumos que se puedan ver afectados por incidentes asociados al mal manejo del equipo por parte del usuario solicitante.



Nicolás Muñoz R.

Jefe de Administración & Finanzas
Centro Investigación e Innovación Biomédica
(CiiB) Universidad de los Andes