

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESCUELA DE GRADUADOS**



**“ROL DE IL-35 EN LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE
LOS LINFOCITOS T REGULADORES EN LOS
LINFOCITOS T NAÏVE MEDIANTE LA
SEÑALIZACIÓN GP130 Y IL-12r β 2”**

JEARITZA ALEJANDRA RÍOS MUÑOZ

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS**

Director de Tesis: Prof. Dr. Rolando Vernal Astudillo

Co- Directora: Dra. Samanta Melgar Rodríguez

Santiago – Chile

2024

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

Se informa al Consejo de la Escuela de Graduados de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, que la Tesis de Magíster en Ciencias Odontológicas presentada por la candidata.

JEARITZA ALEJANDRA RÍOS MUÑOZ

ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Odontológicas, en examen rendido el día 26 de julio de 2024.

COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS



Dr. Mauricio Budini



Dr. Diego Catalán



Dr. Fermín González

(Presidente Comisión de Examen)

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, profesores, amigos y colegas, que durante estos tres años formaron parte de éste proceso, ayudando en mi formación académico, brindando enseñanzas y apoyo en los momentos felices y aún más en los difíciles. En particular:

A mis padres, por su apoyo incondicional, por enseñarme que los límites no existen, que toda meta se puede lograr, que los momentos difíciles son los que más aprendizajes aportan. Que me enseñaron que rendirse no es una opción, que el éxito depende de uno y que como guerrera se enfrentan los desafíos.

A mi pareja, pese a llegar en el momento más turbulento del proceso decidió quedarse. Por ser quien me acompañó y alimentó en largos días de experimentos, por emocionarse de los pequeños logros, entender el contenido de estas páginas y en los momentos de frustración apoyarme y amarme incondicionalmente.

A mis tutores, Rolando pese a lo complejo que puede ser la relación tutor – alumna, me enseñaste a pensar y analizar las cosas de esa manera tan peculiar que tú tienes, me llevaste al límite de mis capacidades, demostrándome que puedo. Samanta, has sido mi maestra del inicio, me formaste en el laboratorio enseñándome todo lo que sabes, has sido una tutora excepcional, brindando tu apoyo incondicionalmente y hoy más que tutora me complace llamarte mi amiga.

A todos, muchas gracias.

PRODUCTOS DERIVADOS DE LA TESIS

- Presentación formato Póster: “Rol de IL-35 en la capacidad inhibitoria de los linfocitos T reguladores vía IL12rβ2/gp130”. VI Jornada de Investigación Facultad de Medicina UV 2 de noviembre 2023
- Presentación formato Póster: “Rol de IL-35 en la capacidad inhibitoria de los linfocitos T reguladores vía IL12rβ2/gp130”. Simposio de Medicina Periodontal y Regenerativa. Universidad de los Andes y Sociedad de Periodoncia de Chile. 1 y 2 de diciembre 2023.
- Conferencia: “Efecto de IL-35 en la función de los linfocitos T reguladores mediante la señalización IL-12rb2/gp130.” Universidad de Valparaíso, Centro de investigaciones Biomédicas (CIB) 1,5 horas.
- Presentación formato Póster: “Rol de IL-35 en la capacidad inhibitoria de los linfocitos T reguladores en los linfocitos T naïve vía IL12rβ2/gp130”. Simposio “Desde las ciencias fundamentales a la arena clínica en medicina”, 30 de abril, 2024. Universidad de Valparaíso. (Éste póster obtuvo el 2° lugar en la competencia).

ÍNDICE

ÍNDICE.....	6
ÍNDICE DE FIGURAS	8
Figuras	8
RESUMEN EN ESPAÑOL	9
ABSTRACT (ENGLISH)	10
INTRODUCCIÓN	11
Respuesta linfocitaria en contexto periodontal.....	11
Interleuquina 35 (IL-35)	12
Planteamiento del problema.....	15
HIPÓTESIS	16
OBJETIVOS	17
Objetivo general.....	17
Objetivo específico	17
MATERIALES Y MÉTODOS	18
Purificación de linfocitos T CD4 ⁺ naïve.....	18
Diferenciación de linfocitos T CD4 ⁺ naïve.....	18
Caracterización fenotípica	18
Neutralización de los receptores gp130 / IL-12rβ2	19
Estimulación con IL-35	19
Expresión de citoquinas	19
Producción de citoquinas	20
Ensayo de supresión T naïve	20
Análisis estadístico	20
RESULTADOS	22
Purificación de linfocitos T naïve y diferenciación de linfocitos Tregs	22

Niveles de expresión de los mRNAs de las citoquinas IL-10, IL-35 y TGF- β 1 en los linfocitos Tregs estimulados con IL-35, con o sin neutralización de las subunidades gp130 y IL-12r β 2 del receptor de IL-35.....	23
Producción de la citoquina IL-10 en los linfocitos Tregs estimulados con IL-35, con o sin neutralización de las subunidades gp130 y IL-12r β 2 del receptor de IL35.....	26
Activación de linfocitos T naïve en un co-cultivo con linfocitos Tregs estimulados con IL-35, con o sin neutralización de las subunidades gp130 y IL-12r β 2 del receptor de IL-3527	
CONCLUSIONES	33
PROYECCIONES	34
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
ANEXOS Y APÉNDICES	43
Anexo 1: Anticuerpos y sondas específicas para identificación celular mediante citometría de flujo.....	43
Anexo 2: Figura 1: Esquema explicativo de la metodología experimental	44
Anexo 3: Marcajes utilizados en citómetro BD LSR Fortessa X-20 para fenotipificación de linfocitos <i>T</i> naïve.	45
Anexo 4: Marcajes utilizados en citómetro BD LSR Fortessa X-20 para fenotipificación de linfocitos Tregs.	46
Anexo 5: Partidores para amplificación mediante RT-qPCR.....	47
Anexo 6: Replicado biológico por condición para cada experimento	47
Anexo 7: Estrategias de selección	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras

Figura 1: Purificación de los linfocitos T naïve y su diferenciación a linfocitos Tregs	19
Figura 2: Niveles de expresión de IL-10, TGF- β y las subunidades de IL-35 (Ebi3 y p35) en los linfocitos Tregs estimulados con IL-35.	20
Figura 3: Niveles de expresión de IL-10, TGF- β y las subunidades de IL-35 (Ebi3 y p35) en los linfocitos Tregs estimulados con IL-35.....	21
Figura 4: Niveles de expresión de Foxp3 en los linfocitos Tregs estimulados con IL-35..	24
Figura 5: Producción de citoquina IL-10 en los linfocitos Tregs estimulados con IL-35.....	25
Figura 6: Activación de los linfocitos T naïve en presencia de linfocitos Tregs estimulados con IL-35.....	27
Figura 7: Dinámica de los receptores de IL-35.....	30

RESUMEN EN ESPAÑOL

Introducción: Los linfocitos T CD4⁺ naïve pueden diferenciarse en distintos fenotipos tales como los linfocitos T reguladores (Tregs) que expresan IL-35, los cuales promueven la supresión de la inflamación y la resorción ósea patológica. En este contexto, IL-35 se ha propuesto como estrategia para el control de procesos inflamatorios y osteolíticos. En un modelo animal de periodontitis experimental, IL-35 induce un incremento en la función de los Tregs, lo que promueve el control de la inflamación y la resorción ósea alveolar. Por lo tanto, el objetivo de este estudio es explicar, al menos en parte, como IL-35 ejerce su acción sobre los Tregs y afecta la activación de los linfocitos T naïve mediante la activación de la vía de señalización gp130 y/o IL-12rβ2.

Metodología: De ratones C57BL/6 wild-type, se purificaron linfocitos T CD4⁺ naïve esplénicos totales y se diferenciaron in vitro a linfocitos Tregs. Luego, se estimuló con 20 o 50 ng/ml de IL-35, en presencia o ausencia de los anticuerpos neutralizantes anti-gp130 y/o anti-IL-12rβ2. Después de 72 hrs, se cuantificó los niveles de expresión de IL-10, TGF-β1, p35 y Ebi3 mediante RT-qPCR y los niveles de secreción de IL-10 mediante ELISA. Seguido, se co-cultivaron los linfocitos T naïve y los Tregs, previamente estimulados con 20 ng/mL de IL-35 e incubados con los anticuerpos neutralizantes anti-gp130 y/o anti-IL-12rβ2, para evaluar la activación mediante la detección de los marcadores CD62L, CD69 y CD44 por citometría de flujo.

Resultados: Los linfocitos T naïve CD4⁺CD45⁺CD62L⁺CD44⁻ purificados se diferenciaron a linfocitos Tregs CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺. En los Tregs estimulados con 20 o 50 ng/ml de IL-35 se observó un aumento en la expresión de IL-10 y Ebi3 en comparación a las condiciones con los anticuerpos neutralizantes de gp130 y/o IL-12rβ2. Finalmente, IL-35 incrementó la capacidad supresora de los linfocitos Tregs inhibiendo la activación de los linfocitos T naïve mediante la activación de los receptores gp130 y/o IL-12rβ2, evidenciado por un menor incremento en la expresión de CD69 y CD44.

Conclusiones: En el presente estudio se estableció que IL-35 incrementa la función supresora de los linfocitos Tregs mediante la activación de la vía de señalización gp130 y/o IL-12rβ2, lo que promueve la sobreexpresión de IL-10 y Ebi3 y la supresión de la activación de los linfocitos T naïve. El incremento de la función supresora y la sobreexpresión de Ebi3 inducida por IL-35 permite inferir la diferenciación de los linfocitos Tregs hacia un perfil iT_{Tr35}.

ABSTRACT (ENGLISH)

Introduction: Naïve CD4⁺ T lymphocytes can differentiate into different phenotypes, such as regulatory T lymphocytes (Tregs), which promote suppression of inflammation and pathological bone resorption. IL-35 has been proposed as a strategy for controlling inflammatory and osteolytic processes in this context. In an animal model of experimental periodontitis, IL-35 increases the function of Tregs, which promotes the control of inflammation and alveolar bone resorption. Therefore, this study aims to explain, at least in part, how IL-35 exerts its action on Tregs and affects naïve T cell activation through activation of the gp130 or IL-12r β 2 signaling pathway.

Methodology: Total splenic naïve splenic CD4⁺ T cells were purified from C57BL/6 wild-type mice and differentiated in vitro to Tregs. They were then stimulated with 20 or 50 ng/ml IL-35 and neutralizing anti-gp130 or anti-IL-12r β 2 antibodies. After 72 hr, IL-10, TGF- β 1, p35, and Ebi3 expression levels were quantified by RT-qPCR and IL-10 secretion levels by ELISA. Next, naïve T cells and Tregs were co-cultured pre-stimulated with 20 ng/mL IL-35 and neutralizing anti-gp130 or anti-IL-12r β 2 antibodies for activation assay with CD62L, CD69, and CD44 markers by flow cytometry.

Results: Purified CD4⁺CD45⁺CD62L⁺CD44⁻ naïve T cells were differentiated to CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺ Tregs. Tregs stimulated with 20 or 50 ng/ml IL-35 were observed to over-express IL-10 and Ebi3 compared to conditions with neutralizing gp130 or IL-12r β 2. Finally, IL-35 increases the suppressive capacity of Tregs by inhibiting naïve T cell activation through activation of gp130 or IL-12r β 2 receptors, as evidenced by decreased CD69 and CD44.

Conclusions: The present study established that IL-35 increases the suppressor function of Tregs through activation of the gp130 or IL-12r β 2 signaling pathway, which promotes over-expression of IL-10 and Ebi3 and suppression of CD62L⁻CD69⁺CD44⁺ naïve T lymphocyte activation. The IL-35-induced increase in suppressor function and over-expression of Ebi3 allows inferring the differentiation of Tregs towards an iTr35 profile.

INTRODUCCIÓN

Respuesta linfocitaria en contexto periodontal

La periodontitis es una enfermedad que afecta a los tejidos que rodean y sostienen al diente, se caracteriza por la pérdida de inserción del diente y del hueso (Cárdenas-Valenzuela, 2021; Papapanou et al., 2018). Actualmente, se definió que el modelo polimicrobiano y sinérgico integra aspectos de diversas propuestas de etiología de la periodontitis, que permiten comprender la naturaleza compleja de la patología e incluir el rol de la microbiota oral sinérgica, los patógenos claves y la desregulación del sistema inmune, así como los factores ambientales (Sedghi et al., 2021).

El componente celular del sistema inmune colabora en la homeostasis, manteniendo una salud gingival con ausencia de inflamación. Desde este punto de vista, la patogénesis de la periodontitis se explica por un desbalance entre linfocitos T Helper 17 (Th17) y T reguladores (Tregs), que además ha sido descrito como la causa de diferentes enfermedades inmune inflamatorias y osteodestructivas (Chapple et al., 2018; Parra-Ortega et al., 2019).

Durante la presentación antigénica, los linfocitos T son activados y adquieren una función efectora, polarizando la respuesta inmune debido a señales co-estimuladoras; estas señales pueden situarse en el órgano linfoide secundario o en el tejido blanco de la respuesta (Chapple et al., 2018; Parra-Ortega et al., 2019). Dependiendo de diversas señales co-estimuladoras, los linfocitos T CD4⁺ pueden diferenciarse, entre otros perfiles inflamatorios, a linfocitos Th1 y Th17, con su subsecuente producción de citoquinas como interferón gamma (IFN- γ) e interleuquina 17 (IL-17), respectivamente, o bien, a perfiles reguladores como Tregs y/o Th2 (Huang et al., 2021; Parra-Ortega et al., 2019).

Los linfocitos T CD4⁺ efectores poseen el fenotipo CD45RA⁺, CD62L⁺ y CCR7⁺ cuando se encuentran en el tejido linfoide secundario, y posteriormente pierden las moléculas CD62L y CCR7 y adquieren un fenotipo CD4⁺CD25⁻CD62L⁻CD69⁺CD44⁺, lo que les permite migrar al sitio afectado, en este contexto a los tejidos de soporte periodontal, para realizar la función efectora (Egwuagu et al., 2015; Parra-Ortega et al., 2019).

Los linfocitos Tregs corresponden al 4% de los linfocitos T CD4⁺ localizados en la sangre periférica de los adultos, presentan un fenotipo CD4⁺CD25⁺ y son estimuladas por el factor de

crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1) vía factor de transcripción Forkhead Box P3 (Foxp3) para generar citoquinas antiinflamatorias o supresoras como IL-10 y TGF- β 1 (Hao et al., 2018; Zhu and Shan, 2020; Alvarez et al., 2020). Además, poseen función inmunosupresora al contribuir al mantenimiento de la tolerancia periférica, previenen la autoinmunidad, limitan la inflamación crónica, mantienen la homeostasis por supresión de la función de otras células y participan modulando la inmunidad innata y adaptativa (Alvarez et al., 2020). Se han confirmado 2 tipos de linfocitos Tregs, aquellos que se producen naturalmente o desde el timo (nTreg o tTreg) y los inducidos (iTreg) que se diferencian desde linfocitos convencionales (Tconv), naïve o periféricos (pTreg). De estos últimos se han descrito tres subtipos según el tipo de citoquina que los induce: iTr-TGF- β , iTr-IL-10 e iTr-IL-35 (también llamados iTr35) (Alvarez et al., 2018; Cafferata et al., 2020; Hao et al., 2018; Wang et al., 2020; Yang et al., 2023).

Los mecanismos supresores de los Tregs incluyen liberación de citoquinas supresoras, como IL-10 y TGF- β 1, la regulación de mecanismos celulares como la expresión de CTLA-4, la supresión de la activación y expansión de células T naïve y la inhibición de la activación de células T efectoras, células T CD4⁺ de memoria, células CD8⁺, NK, NKT, células presentadoras de antígenos y células B (Alvarez et al., 2018; Wang et al., 2020). Son los propios Tregs que secretan cantidades ínfimas de IL-35 soluble o mediante vesículas extracelulares, los que inducen la conversión de células transeúntes como Tconv y linfocitos B, hacia perfiles reguladores del tipo Tregs y B regulador (Breg), respectivamente. Esto incrementa aún más la secreción de IL-35 por estas células, dando lugar a la generación iTr35, cuyo fenotipo se caracteriza por ser Foxp3⁺Ebi3⁺ (Mitani et al., 2015; Cafferata et al., 2020; Sullivan et al., 2020).

Interleuquina 35 (IL-35)

La IL-35 fue descubierta en el 2007 y pertenece a un grupo de citoquinas de la familia de IL-12 con características inmunosupresoras y/o antiinflamatorias (Köseoğlu et al., 2015; Floss et al., 2017; Maboudi et al., 2019; Luo et al., 2019). IL-35 es un heterodímero formado por dos subunidades denominadas IL-12 α (también llamada p35) y Ebi3 β (Luo et al., 2019; Kamiya et al., 2020; Liu et al., 2021; Schmidlin et al., 2021; Cafferata et al., 2020; Sullivan et al., 2020; Zhu and Shan; 2020). Cumple la función de regular la actividad celular de linfocitos Tregs a través de la activación de Foxp3, lo que determina la diferenciación de los linfocitos Tregs Foxp3⁺ estimulando su diferenciación y actividad inmuno-supresora (Jin et al., 2017; Luo et al.,

2019; Zhu and Shan; 2020; Cafferata et al., 2020). IL-35 es la única citoquina de la familia de las IL-12 con función estrictamente inhibitoria que actúa en la supresión de los linfocitos Tconv y su diferenciación a iTr35 como célula supresora (Hildenbrand et al., 2023). Esta citoquina es secretada por linfocitos Tregs, células CD8⁺, células dendríticas activadas, monocitos y células Breg y posee un rol modulador en varias enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias, tumores y en enfermedades infecciosas por bacterias y virus (Zhang et al., 2019).

La IL-35 está compuesta por las subunidades Ebi3 y p35 que están compuestas de metioninas y cisteínas. En particular, la subunidad Ebi3 posee 3 metioninas y 4 cisteínas, mientras que p35 posee 10 metioninas y 7 cisteínas (Egwuagu et al., 2015). Las subunidades al ser producidas pueden ser almacenadas en el retículo endoplasmático para facilitar su secreción (Egwuagu et al., 2015). Estudios recientes establecen que la subunidad p35 es altamente secretada en presencia de Ebi3, y además ésta solo se sobreexpresa en presencia de p35 (Hildenbrand et al., 2023). Además, sólo el 4% de toda la producción de Ebi3 secretado puede co-precipitarse y unirse a p35, mientras que el 24% de p35 co-precipita y se une a Ebi3 (Hildenbrand et al., 2023).

IL-35 al unirse a su receptor gp130/IL-12rβ2, activa la cascada de señalización JAK-STAT, lo que induce la inhibición de la proliferación de las células T y por lo tanto, impide su función efectora (Liu et al., 2021; Osuna-Gómez et al., 2023; Schmidlin et al., 2021; Zhu & Shan, 2020). Otras de las funciones es detener la mitosis, lo que permite la inhibición de la proliferación linfocitaria y favorece la secreción de IL-35 y la subsecuente diferenciación a iTr35 (Cafferata et al., 2020; Schmidlin et al., 2021; Yang et al., 2023), lo que favorece la inhibición de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias como IFN-γ e IL-17 (Zhu and Shan; 2020). Por lo tanto, al inhibir la proliferación y secreción de linfocitos T efectores como Th1 y Th17, incrementa la secreción de IL-10 y TGF-β1 que promueven la generación de linfocitos T y B reguladores e induce la diferenciación de los linfocitos T naïve a iTr35, lo que permite cumplir un rol inmunomodulador (Osuna-Gómez et al., 2023; Yang et al., 2023; Zhu & Shan, 2020).

Receptores de IL-35

Los receptores de IL-35 en los linfocitos T son: gp130/IL-12r β 2, IL-12r β 2/IL-12r β 2, gp130/gp130, WSX-1/gp130 e IL-12r β 1/WSX-1 (Sawant et al., 2015; Floss et al., 2017; Luo et al., 2019; Zhang et al., 2019), que promueven patrones de activación de las proteínas STAT. El receptor heterodimérico IL-12r β 2/gp130 activa la vía de señalización STAT1 y STAT4 e induce la supresión de linfocitos T y la diferenciación de Tregs a iT β 35 (Floss et al., 2017; Sawant et al., 2015; Zhu & Shan, 2020). Mientras que el receptor homodimérico gp130/gp130 activa la vía STAT1 y el receptor homodimérico IL-12r β 2/IL-12r β 2 activa la vía STAT4, ambos receptores suprimen la proliferación de linfocitos T efectores pero no pueden inducir la diferenciación de Tregs a iT β 35 (Floss et al., 2017; Sawant et al., 2015; Zhu & Shan, 2020).

En particular, la subunidad del receptor gp130 se expresa en células como monocitos, macrófagos, células dendríticas, NK y células T y B y la subunidad IL-12r β 2 se expresa predominantemente en células T y NK activas, además en células dendríticas y células B. Una característica importante de IL-12r β 2 es que es poco detectable en la mayoría de las células T, pero ante la presencia de IL-2, IFN γ , IL-12, IL-27 es rápidamente inducible (Song and Ma, 2016; Jafarzadeh et al., 2021). La subunidad del receptor IL-12r β 2 es compartido por citoquinas de la familia de IL-12 y pueden activar a las células Tconv y, además, puede ser activado por IL-12 e IL-27; en ambos casos, se ha demostrado que dicha activación incrementa la sensibilidad ante la producción de IL-35 (Collison et al., 2012). Estudios recientes han demostrado que IL-6 (10 ng/ml) pueden estimular al gen PIM-1 y activar STAT3 en células Ba/F3 por la vía IL-12r β 1, gp130 y WSX-1, así como IL-12 (4 ng/ml) tiene el mismo efecto vía IL-12r β 1 y IL-12r β 2 (Floss et al., 2017). Estos datos podrían demostrar que existen varias citoquinas que permiten la activación de gp130 y IL-12r β 2.

Diversos estudios describen que la subunidad p35 presenta afinidad por el receptor IL-12r β 2, mientras que la subunidad Ebi3 presenta afinidad por gp130 (Mahfooz et al., 2023), y además que el receptor IL-12r β 2 es compartido por IL-12, lo que puede ocasionar que las citoquinas compitan por los mismos sitios de unión. Se ha comprobado que la unión de IL-35 al receptor IL-12r β 2 promueve la disminución en la unión con IL-12, permitiendo la producción persistente de IL-35 en un ambiente regulador (Mahfooz et al., 2023). Por el contrario, el receptor gp130 es un componente común en los receptores de diversas citoquinas, entre ellas IL-6 e IL-11, factor

inhibidor leucocitario (LIF), oncostatina M, factor neurotrópico ciliar (CNTF) y cardiotrombina 1 (Collison et al., 2012).

Planteamiento del problema

Los linfocitos T son células del sistema inmune que se activan al reconocer antígenos, lo que permite su función efectora y la polarización de la respuesta inmune en perfiles pro-inflamatorios o reguladores (Sawant et al., 2015; Parra-Ortega et al., 2019; Huang et al., 2021).

IL-35 es una citoquina que pertenece a la familia de IL-12 pero que tiene características inmunosupresoras, está formada por las subunidades IL-12 α (p35) y Ebi3 β , y se caracteriza por la generación de un subtipo de linfocito Tregs conocido como iTr35 Foxp3⁺Ebi3⁺ (Floss et al., 2017; Maboudi et al., 2019; Luo et al., 2019; Alvarez et al., 2018; Hao et al., 2018; Cafferata et al., 2020; Sullivan et al., 2020; Wang et al., 2020; Kamiya et al., 2020; Liu et al., 2021; Schmidlin et al., 2021; Hildenbrand, Bohnacker et al. 2023). Los receptores homodiméricos gp130 e IL-12r β 2 que reconocen a IL-35 inducen la supresión de la proliferación de linfocitos T efectores, mas no pueden inducir la diferenciación de linfocitos Tregs a iTr35, mientras que el heterodímero gp130/IL-12r β 2 cumple ambas funciones (Sawant et al., 2015). La producción de IL-35 por los linfocitos Tregs podría promover la restitución del equilibrio del ambiente regulador, que ha sido perturbado por el perfil osteodestructivo de los linfocitos Th17 en un proceso inflamatorio como el de la periodontitis (Huang et al., 2021).

Los receptores de IL-35 son complejos de estudiar tanto a nivel *in vivo* como *in vitro*, debido a que ambas conformaciones (heterodímero y homodímeros) se expresan en la célula de manera indistinta y aislar la función de uno de ellos resulta complejo. Al estudiar *in vitro* la neutralización de las subunidades de los receptores de IL-35 se pretende comprender con detalle su mecanismo asociado a la activación de los Tregs. En el contexto de la periodontitis los linfocitos T naïve tiene un alto potencial de diferenciación hacia un perfil pro-inflamatorio y osteodestructivo. Así, IL-35 al promover la diferenciación y activación de los Tregs, reduce la activación de estos perfiles, lo que promueve un ambiente regulador-modulador para disminuir la inflamación y osteodestrucción.

HIPÓTESIS

La capacidad de los linfocitos Tregs de inhibir la activación de los linfocitos T naïve es estimulada por IL-35 a través de las subunidades gp130 y IL-12r β 2 de su receptor.

OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar si IL-35, a través de las subunidades gp130 y IL-12r β 2 de su receptor, estimula la capacidad de los linfocitos T reguladores de inhibir a los linfocitos T naïve.

Objetivo específico

- Determinar los niveles de expresión de IL-35, IL-10 y TGF- β 1 y los niveles de secreción de IL-10 en los linfocitos Tregs estimulados con IL-35, con o sin neutralización de las subunidades gp130 y IL-12r β 2 de su receptor.
- Determinar la capacidad supresora de los linfocitos Tregs estimulados con IL-35 en un co-cultivo con los linfocitos T naïve con o sin neutralización de las subunidades gp130 y IL-12r β 2 del receptor de IL-35.

MATERIALES Y MÉTODOS

Purificación de linfocitos T CD4⁺ naïve

A partir del bazo de ratones C57BL/6 silvestres de 6 a 8 semanas de edad, se purificaron linfocitos T CD4⁺ naïve, los bazos se disgregaron mecánicamente con un filtro celular de 40µm y se realizó conteo celular en cámara de Neubauer. El volumen de células no debe superar los 1 x 10⁹ y se llevaron a un volumen de 1 ml para utilizar un kit de depleción celular inmunomagnética (EasySep Mouse Naïve CD4⁺ T cell, Stemcell) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posterior al uso del kit, las células obtenidas se cuantificaron en cámara de Neubauer y su fenotipo celular se ratificó mediante citometría de flujo (ver el ítem caracterización fenotípica).

Diferenciación de linfocitos T CD4⁺ naïve

Los linfocitos T CD4⁺ naïve obtenidos se diferenciaron a linfocitos Tregs siguiendo un protocolo estandarizado (Rojas, 2023; Yang et al., 2020). En el cual, los linfocitos T CD4⁺ naïve se sembraron en placa de 24 pocillos previamente tratada con 200 µl/pocillo de solución de *coating* que contiene los anticuerpos anti-CD3 (10 µg/ml) y anti-CD28 (1 µg/ml). Las células se sembraron en medio RPMI suplementado y se incorporaron las citoquinas IL-2 (1 µg/ml), TGF-β1 (1 µg/ml) y ácido retinoico (1 µg/ml), y luego se incubaron por 6 días a 37°C. Cada 2 días se comprobaba la proliferación celular y se incorporaba IL-2 (1 µg/ml) al medio. Finalmente, al paso de los 6 días la diferenciación celular se ratificó por citometría de flujo (ver el ítem caracterización fenotípica).

Caracterización fenotípica

Los fenotipos linfocitarios se caracterizaron por citometría de flujo (BD LSR Fortessa X-20) en 2 ocasiones durante la investigación: 1) La purificación de los linfocitos T CD4⁺ naïve esplénicos se identificaron con los marcadores de superficie CD4, CD45, CD62L y CD44 (Anexo 1 y 2). La diferenciación de los linfocitos Tregs se ratificó con los marcadores de superficie CD4 y CD25 e intracelular Foxp3 (Anexo 1). Para cada una de las citometrías se realizan los conteos celulares y se colocan 500.000 células por pozo en placa de 96 pocillos, las células se tiñen con 50 µl de tinción de viabilidad (Zombie NIRTM Fixable Viability en APCCy7) incubándolas por 30 minutos, luego las células se lavan con 200 µl de PBS 1x y FACS para ser

teñidas con los marcadores extracelulares de la primera caracterización (anti-CD4 FITC, anti-CD8 BUV395, anti-CD45 BV421, anti-CD44 PECy7 y anti-CD62L APC) o con los marcadores celulares de la segunda caracterización (anti-CD4 FITC y anti-CD25 APC), incubando por 30 minutos a 4°C. Se continúa con lavados de 200 µl de FACS y se centrifugan a 500 rpm por 3 minutos, se agregan 100 µl de Fix/Perm Buffer por 45 minutos a 4°C, se lavan con 200 µl de Perm Buffer se centrifuga a 500 rpm por 3 minutos y se aplican 100 µl de solución de bloqueo y se incuba por 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se agregan 2 µl de tinción intracelular (anti-Foxp3 PE) y se incuba toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las células se lavan con 100 µl de Perm Buffer y se centrifugan a 500 rpm por 3 minutos, luego las células se resuspenden en 350 µl de Buffer Facs/EDTA y se procede a realizar la lectura en el citómetro.

Neutralización de los receptores gp130 / IL-12rβ2

En los cultivos de los linfocitos Tregs se neutralizaron las subunidades del receptor de IL-35 utilizando anticuerpos monoclonales de neutralización. En particular, se neutralizaron las proteínas gp130 e IL-12rβ2 de manera independiente o combinada. Para ello, las células se incubaron con los anticuerpos anti-gp130 (250 ng/ml) y/o anti-IL-12rβ2 (10 ng/ml) durante 2 hrs a 37°C (DePaolo et al., 2011; Weinstock et al., 2021). Considerando los grupos de estudio Treg + IL-35, Treg + IL-35 + anti-gp130, Treg + IL-35 + anti-IL-12rβ2 y Treg + IL-35 + anti-gp130/ anti-IL-12rβ2.

Estimulación con IL-35

Luego de neutralizar selectivamente las subunidades del receptor de IL-35 en los grupos de estudio Treg + IL-35 + anti-gp130, Treg + IL-35 + anti-IL-12rβ2 y Treg + IL-35 + anti-gp130/ anti-IL-12rβ2. Todos cultivos de linfocitos Tregs (excepto el control Tregs) se estimularon con 20 ng/ml o 50 ng/ml de IL-35 durante 72 hrs (Zhang et al., 2018). Luego, se analizó la producción de las citoquinas mediante RT-qPCR y ELISA respectivamente. Como controles positivos, los linfocitos Tregs sin estímulo de IL-35 se estimularon con 4 ng/ml de IL-12 (Anexo 2) y como controles negativos se utilizaron linfocitos Tregs sin estimular (Floss et al., 2017).

Expresión de citoquinas

Las células se extraen de las placas de cultivo a eppendorf y se centrifugan a 1.500 rpm por 5 minutos para formar un pellet, luego se extrae el sobrenadante y se colocan 100 µl de trizol

sobre el pellet, se incuban por 3 minutos y se añaden 200 µl de cloroformo, los eppendorf deben ser agitados manualmente, se incuban por 3 minutos y se centrifugan a 12.000 g a 4°C por 15 minutos. Luego se transfiere la fase acuosa con RNA a un nuevo tubo eppendorf y se colocan 500 µl de isopropanol, se mezclan bien y se incuban por 10 minutos a temperatura ambiente, luego se centrifugan a 12.000 g a 4°C por 10 minutos. Posteriormente, se elimina el sobrenadante y se añade 1 ml de etanol frío con pirocarbonato de dietilo (DEPC) y se centrifuga a 7.500 g a 4°C por 5 minutos, al terminar se elimina el sobrenadante y se agregan 30 µl de agua miliQ. Continuando, se toma 1 µl de RNA en miliQ y se realiza conteo de RNA en Quantifluor RNA Dye, con el RNA citoplasmático total se utiliza el kit de transcripción reversa (iScript™ reverse transcription Supermix, BIO-RAD) para obtener la cadena de cDNA. Finalmente, se realiza el PCR con el kit Sso Advanced Universal SyBR Green Supermix (BIO-RAD) para cuantificar los niveles de expresión de los mRNA de IL-10, TGF-β1, subunidad Ebi3 y subunidad p35 utilizando los partidores específicos (Anexo 5).

Producción de citoquinas

En el momento de extracción las células de las placas de cultivo, se separa el sobrenadante para medir el nivel de secreción de la citoquina IL-10 mediante un test de ELISA (Mouse IL-10 Quantikine ELISA Kit, R&D system) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Ensayo de supresión T naïve

Los Tregs diferenciados, estimulados y neutralizados se co-cultivaron con linfocitos T naïve (1:10) durante 72 horas. Luego de las 72 horas, la activación de los linfocitos T naïve se analizó utilizando los marcadores extracelulares anti-CD62L APC, anti-CD44 PECy7 y anti-CD69 BV421 mediante citometría de flujo (ver ítem caracterización fenotípica) (Anexo 1 y 2).

Análisis estadístico

Los datos de citometría de flujo se analizaron mediante software FlowJo. Se determinó el porcentaje de la población celular de interés y la expresión de los marcadores de superficie extracelulares e intracelulares. Los datos de RT-qPCR y ELISA se analizaron mediante software R versión 4.1.3 (2022). Para los datos de RT-qPCR se realizó estadística robusta de los datos, impugnación de datos extremos influyentes con técnica ROUT (robust regression and outlier removal) con un Q=1%. Para el análisis estadístico se realizó normalización de los datos con

\log_2 , la normalidad se midió con la prueba de Shapiro-Wilk para cada condición experimental, curtosis y gráfico QQ. Luego, se midió la homocedasticidad con la prueba de Bartlett y la prueba de Levene. Finalmente, se realizó ANOVA de Welch de una vía y post-hoc Games-Howell para comparaciones múltiples. Para los datos de ELISA la normalidad se midió con la prueba de Shapiro-Wilk para cada condición experimental resultando normales. Luego, se midió homocedasticidad determinando varianzas iguales, por lo cual se realizó ANOVA y prueba post-hoc Tukey. La significancia estadística se establece con $p < 0,05$.

RESULTADOS

Purificación de linfocitos T naïve y diferenciación de linfocitos Tregs

A partir del bazo de ratones C57BL/6 silvestres se obtuvo una población enriquecida de linfocitos T que expresan niveles elevados de los marcadores CD45⁺ (81,8%) y CD4⁺ (97,4%) (**Figura 1A**). A partir de ellos, se obtuvieron linfocitos T naïve CD4⁺CD45⁺CD62L⁺CD44⁻ con un 68,8% de pureza (**Figura 1B**). En presencia de ácido retinoico, IL-2 y TGF-β1, un 40,8% de los linfocitos T naïve se diferenciaron a linfocitos Tregs CD4⁺CD45⁺Foxp3⁺CD25⁺ (**Figura 1C**). En el **Anexo 7** se observa la estrategia de selección de las células para obtener la **Figura 1**. En los criterios de selección primero se clasificó a las células por parámetros físicos de tamaño y regularidad interna, luego se seleccionó en base a la presencia de unidades celulares únicas y finalmente, se obtuvieron las células CD25⁺Foxp3⁺.

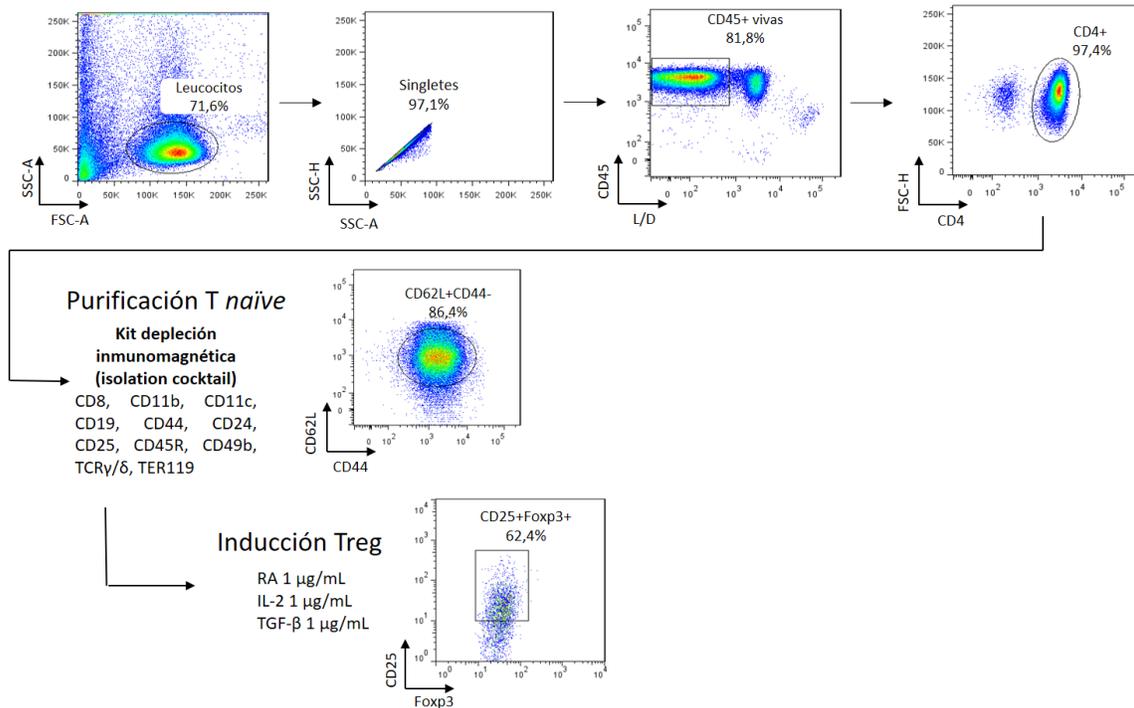


Figura 1. Purificación de los linfocitos T naïve y su diferenciación a linfocitos Tregs. A: Purificación inicial de linfocitos T CD45⁺CD4⁺. B: Mediante purificación inmunomagnética, a partir de los linfocitos T CD45⁺CD4⁺ se obtuvieron linfocitos T naïve CD4⁺CD45⁺CD62L⁺CD44⁻. C: De estos linfocitos T naïve se diferenció una población de Tregs CD4⁺CD45⁺Foxp3⁺CD25⁺.

Niveles de expresión de los mRNAs de las citoquinas IL-10, IL-35 y TGF- β 1 en los linfocitos Tregs estimulados con IL-35, con o sin neutralización de las subunidades gp130 y IL-12r β 2 del receptor de IL-35

La **Figura 2** muestra los niveles de expresión de IL-10, TGF- β 1 y las subunidades de IL-35 (Ebi3 y p35) en los linfocitos Tregs estimulados con 20 ng/ml de IL-35. Los datos se representan como niveles relativos a la condición no estimulada con valor 0. En los gráficos de caja y clavija se muestra la mediana como medida de tendencia central, el recorrido intercuartílico y el recorrido interpercentílico entre 10% y 90%. Los análisis se realizaron con seis replicados biológicos (n) y en el **Anexo 6** se observa el n por condición posterior a la impugnación de los datos. IL-35 induce en los linfocitos Tregs la sobreexpresión de las citoquinas IL-10 y TGF- β 1 y las subunidades Ebi3 y p35 ($p < 0,001$) (**Figura 2**). Los linfocitos Tregs al ser neutralizados con el neutralizante anti-gp130 muestran una disminución en los niveles de expresión de IL-10 en comparación con las células sin neutralización ($p = 0,013$), lo que no se observa con el neutralizante anti-IL-12r β 2. Además, ésta disminución se incrementa cuando las células son neutralizadas de manera combinada en comparación con las células sin neutralización ($p = 0,009$) (**Figura 2A**). Los niveles de expresión de Ebi3 disminuyen en las condiciones con los neutralizantes anti-gp130 ($p = 0,012$) o anti-IL-12r β 2 ($p = 0,06$) y con la combinación de ambos ($p = 0,004$), en comparación a las células sin neutralización (**Figura 2C**). Por el contrario, no se observan diferencias significativas en los niveles de expresión de TGF- β 1 y p35 en las condiciones experimentales (**Figuras 2B y 2D**).

20 ng/ml de IL-35

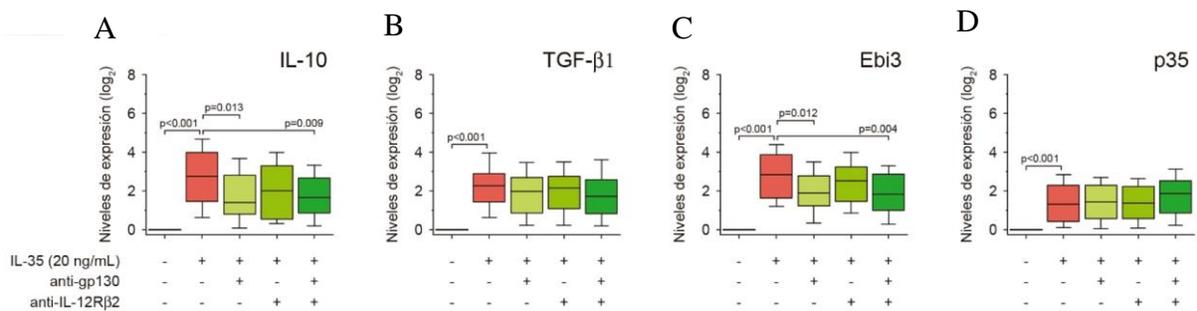


Figura 2: Niveles de expresión de IL-10, TGF- β 1 y las subunidades de IL-35 (Ebi3 y p35) en los linfocitos Tregs estimulados con IL-35. Niveles de expresión de IL-10, TGF- β 1, Ebi3 y p35 en los linfocitos Tregs estimulados con 20 ng/ml de IL-35 sin neutralizante, con neutralizante anti-gp130, con neutralizante anti-IL-12r β 2 y con la combinación de ambos. Los análisis se realizaron con un n de seis (ver Anexo 6). Los datos se representan como niveles relativos a la condición no estimulada con valor 0 y se muestra la mediana en gráfico de caja y clavija de las condiciones experimentales. **A.** Niveles de expresión de IL-10. **B.** Niveles de expresión de TGF- β 1. **C.** Niveles de expresión de Ebi3. **D.** Niveles de expresión de p35.

La **Figura 3** muestra los niveles de expresión de IL-10, TGF- β 1 y las subunidades de IL-35 (Ebi3 y p35) en los linfocitos Tregs estimulados con 50 ng/ml de IL-35. Los datos se representan como niveles relativos a la condición no estimulada con valor 0, en los gráficos de caja y clavija se muestra la mediana como medida de tendencia central, el recorrido intercuartílico y el recorrido interpercentílico entre 10% y 90%. Los análisis se realizaron con seis replicados biológicos (n) y en el **Anexo 6** se observa el n por condición posterior a la impugnación de los datos. IL-35 induce en los linfocitos Tregs la sobreexpresión de las citoquinas IL-10 y TGF- β 1 y las subunidades Ebi3 y p35 ($p < 0,001$) (**Figura 3**). Los linfocitos Tregs al ser neutralizados con anti-gp130 muestran una disminución en los niveles de expresión de IL-10 en comparación con las células sin neutralización ($p = 0,013$), lo que no se observa con el neutralizante anti-IL-12r β 2. Además, ésta disminución se incrementa cuando las células son neutralizadas de manera combinada en comparación con las células sin neutralización ($p = 0,002$) (**Figura 3A**). Los niveles de expresión de Ebi3 disminuyen en las condiciones con los neutralizantes anti-gp130 ($p = 0,017$) o anti-IL-12r β 2 ($p = 0,022$) y con la combinación de ambos ($p = 0,007$), en comparación a las células sin neutralización (**Figura 3C**). Por el contrario, no se observan diferencias significativas en los niveles de expresión de TGF- β 1 y p35 en las condiciones experimentales (**Figuras 3B y 3D**).

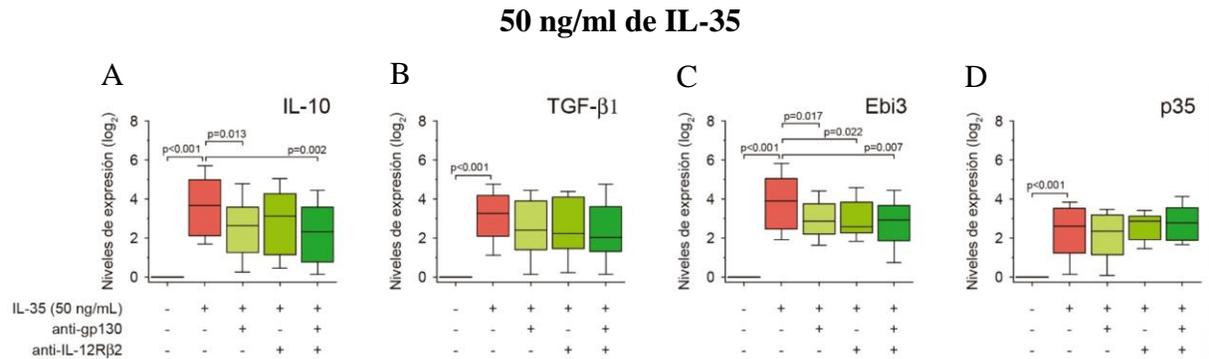


Figura 3: Niveles de expresión de IL-10, TGF- β y las subunidades de IL-35 (Ebi3 y p35) en los linfocitos Tregs estimulados con IL-35. Niveles de expresión de IL-10, TGF- β , Ebi3 y p35 en los linfocitos Tregs estimulados con 50 ng/ml de IL-35, sin neutralizante, con neutralizante anti-gp130, con neutralizante anti-IL-12r β 2 y con la combinación de ambos. Los análisis se realizaron con un n de seis (ver Anexo 6). Los datos se representan como niveles relativos a la condición no estimulada con valor 0 y se muestra la mediana en gráfico de caja y clavija de las condiciones experimentales. **A.** Niveles de expresión de IL-10. **B.** Niveles de expresión de TGF- β . **C.** Niveles de expresión de Ebi3. **D.** Niveles de expresión de p35.

La **Figura 4** muestra los niveles de expresión de Foxp3 en los linfocitos Tregs estimulados con 20 y 50 ng/ml de IL-35. Los datos se representan como niveles relativos a la condición no estimulada con valor 0, en los gráficos de caja y clavija se muestra la mediana como medida de tendencia central, el recorrido intercuartílico y el recorrido interpercentílico entre 10% y 90%. Los análisis se realizaron con seis replicados biológicos (n) y en el **Anexo 6** se observa el n por condición posterior a la impugnación de los datos. IL-35 induce en los linfocitos Tregs la sobreexpresión de Foxp3 al ser estimulados con 20 y 50 ng/ml de IL-35 ($p < 0,001$) (**Figura 4A y Figura 4B**). Los linfocitos Tregs estimulados con IL-35 (20 y 50 ng/ml), al ser neutralizados con anti-gp130 y/o anti-IL-12rβ2, no presentan diferencias significativas en los niveles de expresión de Foxp3 (**Figura 4A y Figura 4B**).

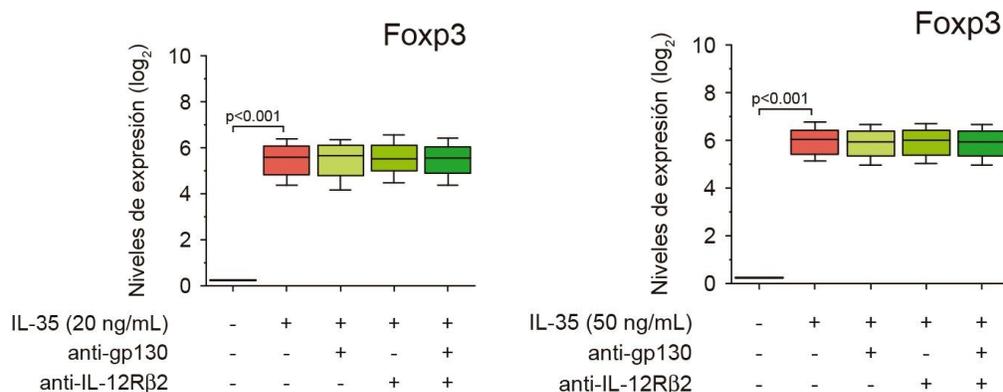


Figura 4: Niveles de expresión de Foxp3 en los linfocitos Tregs estimulados con IL-35. Niveles de expresión de Foxp3 en los linfocitos Tregs estimulados con 20 y 50 ng/ml de IL-35 sin neutralizante, con neutralizante anti-gp130, con neutralizante anti-IL-12rβ2 y con la combinación de ambos. Los análisis se realizaron con un n de seis (ver Anexo 6). Los datos se representan como niveles relativos a la condición no estimulada con valor 0 y se muestra la mediana en gráfico de caja y clavija.

Producción de la citoquina IL-10 en los linfocitos Tregs estimulados con IL-35, con o sin neutralización de las subunidades gp130 y IL-12rβ2 del receptor de IL35

De los resultados del análisis del RT-qPCR se obtuvieron diferencias significativas en los niveles de expresión de IL-10 de los cultivos estimulados con IL-35 (20 ng/ml y 50 ng/ml) en comparación con la condición de neutralización de las subunidades del receptor de IL-35. Por lo tanto, se analizaron los niveles de secreción de IL-10 de los cultivos estimulados con 20 ng/ml de IL-35. La **Figura 5** muestra los niveles de secreción de IL-10 en los linfocitos Tregs estimulados con 20 ng/ml de IL-35. Los datos se representan en gráficos de caja y clavija, se muestra la mediana como medida de tendencia central, el recorrido intercuartílico y el recorrido interpercentílico entre 10% y 90%. (**Figura 5**). El experimento se realizó con un replicado biológico de seis en todas las condiciones estimuladas con 20 ng/ml de IL-35 (**Anexo 6**). Los linfocitos Tregs al ser estimulados con 20 ng/ml de IL-35 incrementan significativamente la secreción de IL-10 en comparación a los linfocitos Tregs sin estímulo ($p < 0,001$). Además, los niveles de secreción de IL-10 disminuyen significativamente en las condiciones con neutralizantes anti-gp130 ($p = 0,017$), con el neutralizante anti-IL-12rβ2 ($p = 0,023$) y con la combinación de ambos neutralizantes ($p = 0,019$).

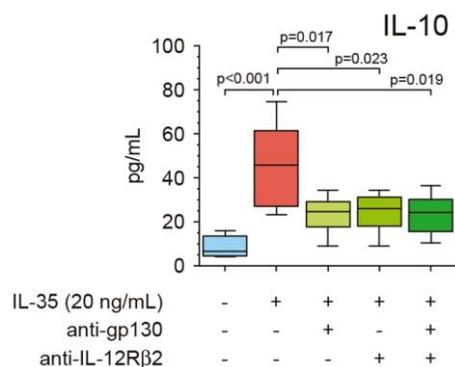
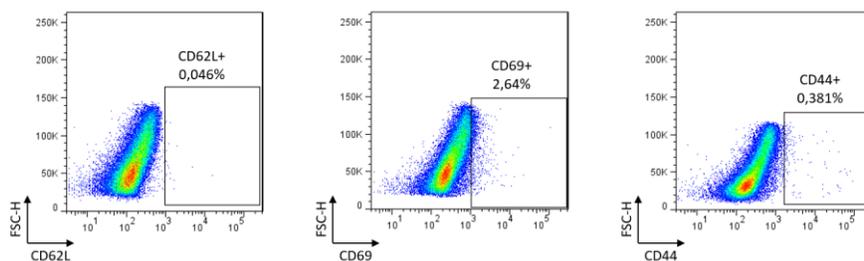


Figura 5: Producción de IL-10 en los linfocitos Tregs estimulados con IL-35. Niveles de secreción de IL-10 en los Tregs estimulados con 20 ng/ml de IL-35 sin neutralizante, con neutralizante anti-gp130, con neutralizante anti-IL-12rβ2 y con la combinación de ambos. El experimento se realizó con un n de 6 en cada condición (ver anexo 6). Los datos se representan como niveles relativos a la condición no estimulada y se muestra la mediana en gráfico de caja y clavija.

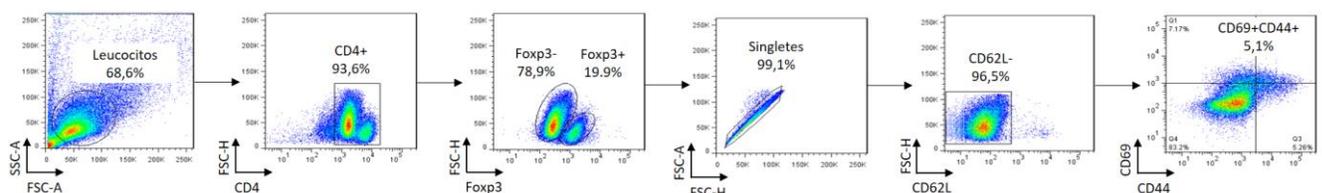
Activación de linfocitos T naïve en un co-cultivo con linfocitos Tregs estimulados con IL-35, con o sin neutralización de las subunidades gp130 y IL-12rβ2 del receptor de IL-35

La **Figura 6** muestra la supresión de la activación de linfocitos T naïve en presencia de linfocitos Tregs estimulados con 20 ng/ml de IL-35. El experimento se realizó con un único replicado biológico por condición (**Anexo 6**). La activación de los linfocitos T naïve fue evaluada analizando los niveles de expresión de los marcadores de superficie CD69 y CD44. En la **Figura 6** se observa los criterios de selección para clasificar a las células por parámetros físicos de tamaño y regularidad interna, luego se seleccionó en base a la población celular CD4⁺ y Foxp3⁻, finalmente, se seleccionó la población celular CD62L⁻CD69⁺CD44⁺. En la **Figura 6A** se observa los FMO de los marcadores CD62L, CD69 y CD44 de los cuales se determinó el área de positividad para la estrategia de selección celular. En la **Figura 6B** se observa la estrategia de selección de los linfocitos T naïve CD4⁺Foxp3⁻CD62L⁻CD69⁺CD44⁺ que permite la comparación de los cultivos estimulados con IL-35 con y sin neutralizantes. En la **Figura 6C** se observa que un 4,39% de los linfocitos T naïve co-cultivados con Tregs estimulados con 20 ng/ml de IL-35 muestran un perfil CD62L⁻CD69⁺CD44⁺, en comparación con los linfocitos T naïve co-cultivados con Tregs no tratados con IL-35, de los cuales 5,1% muestran el perfil activado. Finalmente, los linfocitos T naïve co-cultivados con los linfocitos Tregs estimulados con IL-35 y los neutralizantes anti-gp130 y/o anti-IL-12rβ2 se observa un incremento en la población de linfocitos T naïve activos CD62L⁻CD69⁺CD44⁺ (**Figura 6C**).

A FMO



B Co-cultivo linfocitos Tregs y linfocitos T naïve



C Marcadores de activación de linfocitos T *naïve* CD62L⁻CD69⁺CD44⁺

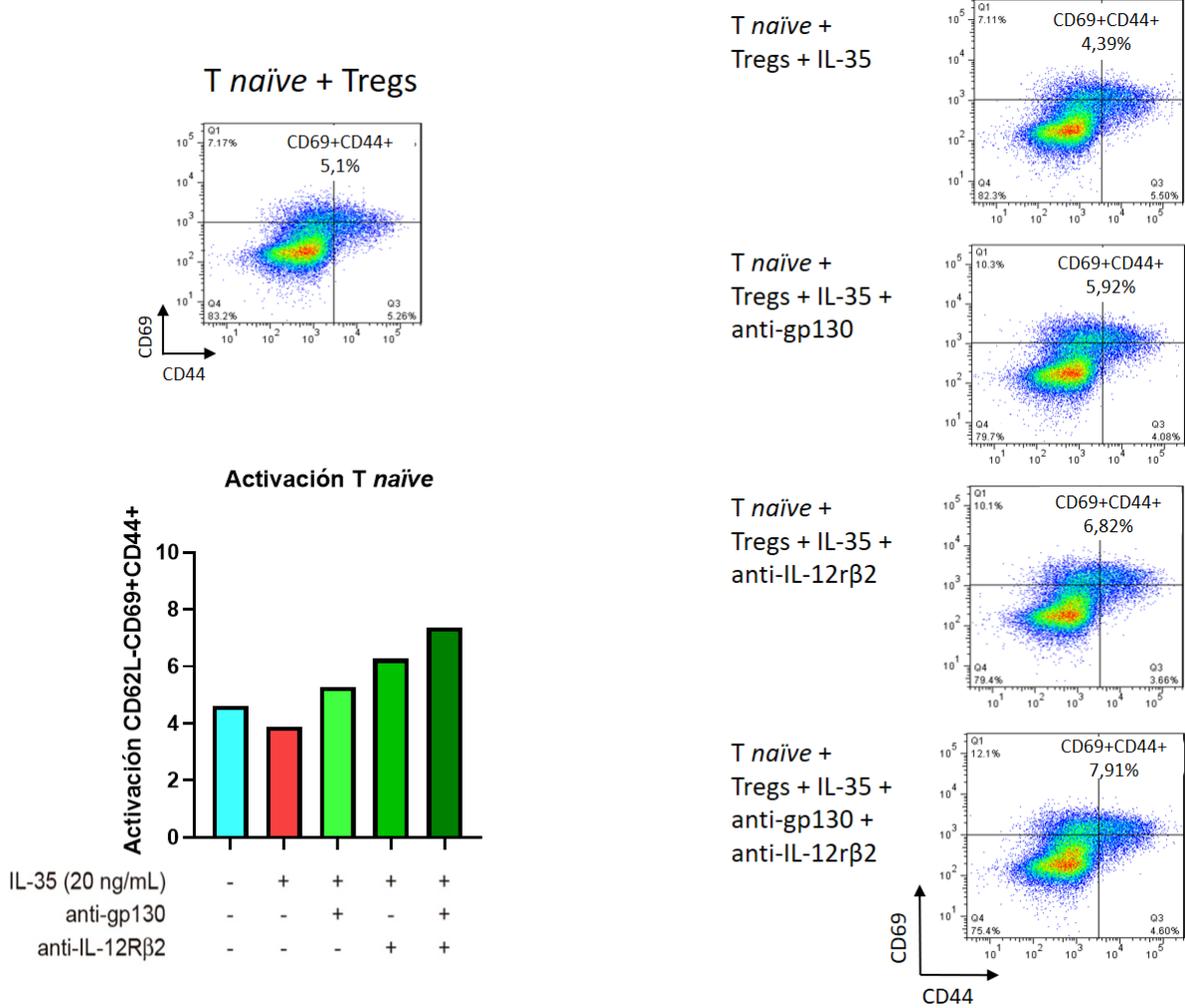


Figura 6: Activación de los linfocitos T *naïve* en presencia de linfocitos Treg estimulados con IL-35. En el co-cultivo con linfocitos T *naïve* CD4⁺Foxp3⁻CD62L⁻CD69⁺CD44⁺ y Tregs CD4⁺CD45⁺Foxp3⁺ se analizó la activación de los linfocitos T *naïve* mediante citometría de flujo. El experimento se realizó con un único replicado biológico (ver anexo 6). A: FMO de los marcadores de activación CD62L, CD69 y CD44 del linfocito T *naïve*. B: Estrategia de selección de los linfocitos T *naïve* CD4⁺Foxp3⁻CD62L⁻CD69⁺CD44⁺ del co-cultivo de linfocitos Tregs + T *naïve*. C: Expresión de CD62L⁻CD69⁺CD44⁺. Se utilizaron las siguientes condiciones experimentales: sin IL-35 y con IL-35 sin neutralización, con neutralización anti-gp130, con neutralización anti-IL-12rβ2 y con neutralización combinada de ambas.

DISCUSIÓN

La citoquina IL-35 pertenece a la familia de IL-12, que se caracteriza por compartir las subunidades proteicas Ebi3, p35, p40, p19 y p28 que conforman las citoquinas IL-23, IL-27, IL-12 e IL-35 y los receptores heterodiméricos IL-12rβ1/IL-12rβ2, gp130/IL-12rβ2, WSX-1/gp130 y homodiméricos IL-12rβ1/IL-12rβ1, IL-12rβ2/IL-12rβ2 y gp130/gp130 (Collison et al., 2012; Hildenbrand et al., 2023; Liu et al., 2019; Floss et al., 2017; Luo et al., 2019; Sawant et al., 2015; Egwuagu et al., 2015). IL-35 está compuesta por las subunidades Ebi3 y p35 y es reconocida por el homodímero gp130, el homodímero IL-12rβ2 y el heterodímero gp130/IL-12rβ2 (Collison et al., 2012, Sawant et al., 2015; Köseoğlu et al., 2015; Floss et al., 2017; Luo et al., 2019; Maboudi et al., 2019; Mahfooz et al., 2023; Li et al., 2023; Li et al., 2020; Wang et al., 2020; Zhu et al., 2020).

Los receptores homodiméricos y el heterodímero están presentes en diversas células, entre ellas linfocitos T, linfocitos B y macrófagos. En efecto, los linfocitos Tregs estimulados con IL-35, mediante el heterodímero gp130/IL-12rβ2 incrementan su función supresora (Maboudi et al., 2019; Zhang et al., 2021; Cafferata et al., 2020). Además, los linfocitos Tregs estimulados con IL-35 inducen una sobreexpresión de las subunidades Ebi3 y p35, que promoverían la diferenciación hacia un fenotipo regulador iTr35 (Asad et al., 2019; Jiang et al., 2021; Collison et al., 2012; Egwuagu et al., 2015; Hildenbrand et al., 2023). En este estudio, los linfocitos Tregs extraídos de bazo de ratones C57BL/6, al ser estimulados con 20 y 50 ng/ml de IL-35 evidencian una sobreexpresión de la subunidad Ebi3, resultado similar a lo descrito en la literatura y que nos permite inferir la diferenciación hacia un fenotípico iTr35.

En estudios recientes, en los co-cultivos de linfocitos iTr35 y linfocitos Tconv se evidencia la inhibición de la activación de los linfocitos Tconv y la disminución de los marcadores de activación CD69 y CD44 (Wang et al., 2020; Yang et al., 2023). En este estudio, el ensayo de activación se realizó en co-cultivos de linfocitos T naïve y linfocitos Tregs estimulados con IL-35 (con un único replicado biológico). Nuestros resultados son similares a los de la literatura, debido a que los linfocitos Tregs estimulados con IL-35 promueven la inhibición de la activación de los linfocitos T naïve. Sin embargo, en los co-cultivos con linfocitos Tregs estimulados con IL-35 y neutralizados con anti-gp130 y/o anti-IL-12rβ2 se produce un incremento en el porcentaje de linfocitos T naïve CD62L⁻CD69⁺CD44⁺, lo que demuestra la disminución de la inhibición de la activación.

Se ha descrito que mediante la activación del heterodímero gp130/IL-12r β 2, IL-35 promueve un incremento en los niveles de secreción de TGF- β 1 en macrófagos (Liu et al., 2021). Sin embargo, la neutralización de las subunidades del heterodímero de manera independiente o en su conjunto producían una disminución significativa de los niveles de secreción de TGF- β 1 (Liu et al., 2021). Por otra parte, en nuestro estudio no hubo cambios en los niveles del mensajero TGF- β 1 pero sí hubo un incremento en la producción del mensajero IL-10 en ambas concentraciones (20 ng/ml y 50 ng/ml), y en los linfocitos Tregs estimulados con 20 ng/ml de IL-35 se produjo un incremento en la secreción de IL-10. Además, la neutralización de las subunidades del heterodímero de manera independiente o en su conjunto produjo una disminución significativa de los niveles de secreción de IL-10. El presente estudio demuestra que el estímulo de IL-35 en los linfocitos Tregs permite aumentar su capacidad supresora incrementando los niveles de expresión de IL-10 y TGF- β 1, y son necesarias ambas conformaciones del receptor para generar la acción supresora de IL-35.

Los resultados de este estudio permiten inferir que IL-35 induce una diferenciación de linfocitos Tregs hacia iTr35, fundamentado por la sobreexpresión de Ebi3 y de Foxp3. Por el contrario, en los cultivos de linfocitos Tregs estimulados con IL-35 y en presencia de los neutralizantes anti-gp130 y/o anti-IL-12r β 2 se produce una disminución en la expresión de Ebi3. Sin embargo, es incierto si el efecto de IL-35 puede atribuirse a la participación única o en su conjunto de los homodímeros y/o heterodímero.

Una de las limitaciones del estudio es la inviabilidad de neutralizar el heterodímero y los homodímeros de manera independiente, por lo tanto, atribuir el efecto supresor de IL-35 sólo al heterodímero gp130/IL-12r β 2 sería erróneo, incluso es necesaria la función de ambos receptores para ejercer el efecto supresor esperado. Otra limitación del estudio es la omisión del análisis de las proteínas STAT en su estado fosforilado, lo cual impidió comprobar la función de estas proteínas en el proceso de activación de la función reguladora de los Tregs. A partir de los resultados de este estudio, se sugiere analizar las vías de señalización STAT1 y STAT4 en su estado fosforilado y no fosforilado, por ejemplo, con la técnica de Western blot y/o RT-qPCR, para esclarecer las posibles vías de activación y segundos mensajeros de IL-35, así también evaluar otras proteínas STAT que podrían dar indicios de la participación de otras vías. Además, en el ensayo de proliferación del co-cultivo de linfocitos Tregs y T naïve se produjo una sobreposición de las poblaciones celulares a determinar. Esto nos empuja a buscar soluciones de mejora mediante la realización de una separación preliminar de las poblaciones celulares

previo al ensayo de proliferación. Otra sugerencia al estudio es realizar la técnica de inmunofluorescencia o inmunohistoquímica para localizar las subunidades de los receptores de IL-35. Además, realizar cultivos condicionados con patógenos periodontales para evaluar la función y actividad de Tregs estimulados con IL-35, simulando un ambiente con características asociadas a enfermedades inflamatorias y osteodestructivas, así como incluir otras subunidades de receptores pertenecientes a la familia de IL-12, como WSX-1 e IL-12rβ1, que permitan esclarecer la vía de señalización de IL-35.

Finalmente, podemos proponer un modelo según el cual IL-35 induce la diferenciación de linfocitos Tregs a iTr35, fenotipo que se caracteriza por la sobreexpresión de Ebi3 mediante la activación del receptor heterodimérico gp130/IL-12rβ2 o los correspondientes homodímeros (Maboudi et al., 2019; Zhang et al., 2021; Cafferata et al., 2020). Por lo tanto, los resultados de este estudio confirman la hipótesis de manera parcial, debido a que el estímulo de IL-35 promueve la sobreexpresión de Ebi3, eventualmente por la activación del heterodímero gp130/IL-12rβ2. Sin embargo, no se puede concluir que la participación de los homodímeros y heterodímero sea independiente, es necesaria la participación de ambos para promover la sobreexpresión de Ebi3 y producir un incremento en la respuesta supresora de los linfocitos Tregs y la diferenciación hacia iTr35.

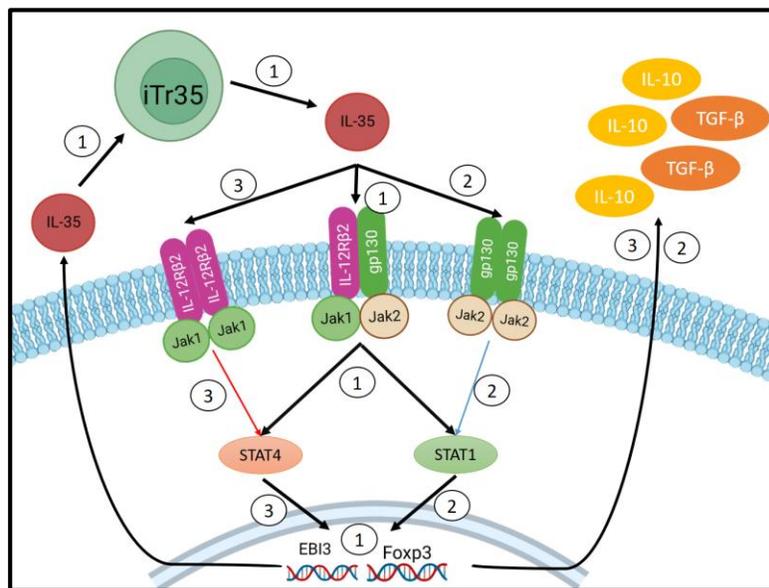


Figura 7: Dinámica de los receptores de IL-35. En el esquema se observan los dos receptores homodiméricos, en rosado IL-12rβ2 y en verde gp130, y el heterodímero gp130/IL-12rβ2. (1) IL-35 sensibiliza a la célula a través del heterodímero gp130/IL-12rβ2, esto activa a las proteínas STAT1 y STAT4, las cuales activan al factor de transcripción Foxp3 y la subunidad Ebi3, que promueven la secreción de IL-35 y el cambio fenotípico de Tregs a iTr35, generando incremento en la secreción de IL-35 y un efecto autocrino. (2) IL-35 sensibiliza a la célula a través del homodímero gp130, esto activa a la proteína STAT1, que activa al factor de transcripción Foxp3 y que promueve la secreción de IL-10 y TGF-

β . (3) IL-35 sensibiliza a la célula a través del homodímero IL-12r β 2, esto activa a la proteína STAT4, que activa al factor de transcripción Foxp3 y que promueve la secreción de IL-10 y TGF- β . Como se observa en la imagen al compartir subunidades, resulta imposible neutralizar sólo una subunidad sin neutralizar tanto al homodímero como al heterodímero, lo que dificulta analizar si el linfocito Tregs promueve su respuesta supresora por efecto sólo del heterodímero o con participación de alguno o ambos homodímeros.

CONCLUSIONES

1. Los linfocitos Tregs estimulados con IL-35 promueven la sobreexpresión de IL-10, Ebi3 y FoxP3, y los niveles de secreción de IL-10, que permiten inducir la diferenciación de iT_H35.
2. Los linfocitos Tregs estimulados con IL-35 suprimen la activación de los linfocitos T naïve al disminuir la expresión de los marcadores CD69 y CD44 mediante las subunidades gp130 y IL-12r β 2 del receptor de IL-35.
3. La hipótesis se comprueba de forma parcial, con la capacidad de los linfocitos Tregs estimulados con IL-35 de inhibir la activación de los linfocitos T naïve mediante las subunidades gp130 y IL-12r β 2 del receptor de IL-35.

PROYECCIONES

1. Realizar nuevas técnicas que permitan complementar los hallazgos ya realizados en este estudio y perfeccionar algunos de los experimentos como el análisis de proliferación y activación del co-cultivo de los Tregs con los T naïve. El estudio de proteínas STAT fosforiladas y no fosforiladas mediante la técnica de Western blot y/o RT-qPCR y conocer la localización de las subunidades gp130 y IL-12r β 2 del receptor de IL-35 mediante inmunofluorescencia o inmunohistoquímica.
2. Nuevos estudios *in vitro* con condiciones cercanas a las patológicas, podrían permitirnos entender de mejor manera los mecanismos supresores de Tregs estimulados con IL-35 y la participación de nuevas vías de señalización.
3. Estudios *in vivo* permitirían evaluar la función y actividad de IL-35 y los linfocitos Tregs en un ambiente con características patogénicas similares a las enfermedades inflamatorias y osteodestructivas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvarez, C., Rojas, C., Rojas, L., Cafferata, E. A., Monasterio, G., & Vernal, R. (2018). Regulatory T lymphocytes in periodontitis: A translational view. *Mediators Inflamm*, 7806912. <https://doi.org/10.1155/2018/7806912>

Alvarez, C., Suliman, S., Almarhoumi, R., Vega, M. E., Rojas, C., Monasterio, G., Galindo, M., Vernal, R., & Kantarci, A. (2020). Regulatory T cell phenotype and anti-osteoclastogenic function in experimental periodontitis. *Sci Rep*, 10(1), 19018. <https://doi.org/10.1038/s41598020-76038-w>.

Asad, M., Sabur, A., Shadab, M., Das, S., Kamran, M., Didwania, N., & Ali, N. (2019). Ebi3 Chain of IL-35 Along With TGF- β Synergistically Regulate Anti-leishmanial Immunity. *Front Immunol*, 10, 616. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00616>

Asila, A., Liu, J., Liu, J., Li, L., & Liao, J. (2022). Immunomodulatory effects of berberine on Staphylococcus aureus-induced septic arthritis through down-regulation of Th17 and Treg signaling pathways. *Acta Biochim Pol*, 69(1), 215-226. https://doi.org/10.18388/abp.2020_5948.

Bouillon, C., F. Guérif, P. Monget, M. C. Maurel and E. Kara (2020). Effect of cryopreservation on human granulosa cell viability and responsiveness to gonadotropin. *Cell Tissue Res* 379(3): 635-645. <https://doi.org/10.1007/s00441-019-03123-6>.

Cafferata, E. A., Terraza-Aguirre, C., Barrera, R., Faúndez, N., González, N., Rojas, C., MelgarRodríguez, S., Hernández, M., Carvajal, P., Cortez, C., González, F. E., Covarrubias, C., & Vernal, R. (2020). Interleukin-35 inhibits alveolar bone resorption by modulating the Th17/Treg imbalance during periodontitis. *J Clin Periodontol*, 47(6), 676-688. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13282>.

Campos-Mora, M., De Solminihac, J., Rojas, C., Padilla, C., Kurte, M., Pacheco, R., Kaehne, T., Wyneken, Ú., & Pino-Lagos, K. (2022). Neuropilin-1 is present on Foxp3⁺ T regulatory cell-derived small extracellular vesicles and mediates immunity against skin transplantation. *J Extracell Vesicles*, 11(6), e12237. <https://doi.org/10.1002/jev2.12237>

Carbotti, G., Dozin, B., Martini, S., Giordano, C., Scordamaglia, F., Croce, M., Filaci, G., Ferrini, S., & Fabbi, M. (2021). IL-27 mediates PD-L1 expression and release by human mesothelioma cells. *Cancers (Basel)*, *13*(16). <https://doi.org/10.3390/cancers13164011>.

Carow, B., & Rottenberg, M. E. (2014). SOCS3, a Major Regulator of Infection and Inflammation. *Frontiers in immunology*, *5*, 58. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00058>

Chaturvedi, V., Collison, L. W., Guy, C. S., Workman, C. J., & Vignali, D. A. (2011). Cutting edge: Human regulatory T cells require IL-35 to mediate suppression and infectious tolerance.

J Immunol, *186*(12), 6661-6666. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100315>.

Collison, L. W., Delgoffe, G. M., Guy, C. S., Vignali, K. M., Chaturvedi, V., Fairweather, D., Satoskar, A. R., Garcia, K. C., Hunter, C. A., Drake, C. G., Murray, P. J., & Vignali, D. A. (2012). The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional. *Nat Immunol*, *13*(3), 290-299. <https://doi.org/10.1038/ni.2227>.

DePaolo, R. W., Abadie, V., Tang, F., Fehlner-Peach, H., Hall, J. A., Wang, W., Marietta, E. V., Kasarda, D. D., Waldmann, T. A., Murray, J. A., Semrad, C., Kupfer, S. S., Belkaid, Y., Guandalini, S., & Jabri, B. (2011). Co-adjutant effects of retinoic acid and IL-15 induce inflammatory immunity to dietary antigens. *Nature*, *471*(7337), 220-224. <https://doi.org/10.1038/nature09849>.

Egwuagu, C. E., Yu, C. R., Sun, L., & Wang, R. (2015). Interleukin 35: Critical regulator of immunity and lymphocyte-mediated diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*, *26*(5), 587-593. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.07.013>

Floss, D. M., Schönberg, M., Franke, M., Horstmeier, F. C., Engelowski, E., Schneider, A., Rosenfeldt, E. M., & Scheller, J. (2017). IL-6/IL-12 cytokine receptor shuffling of extra- and intracellular domains reveals canonical STAT activation via synthetic IL-35 and IL-39 signaling. *Sci Rep*, *7*(1), 15172. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15173-3>.

Goto, H., Kikuchi, T., Takayanagi, Y., Kamiya, Y., Suzuki, Y., Kawamura, S., Sawada, N., Hayashi, J. I., & Mitani, A. (2023). Ebi3 knockout aggravates experimental periodontitis via Th17 polarization. *J Clin Periodontol*, *50*(10), 1406-1418. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13859>

Hajishengallis, G. (2014). Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol*, 35(1), 3-11. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.09.001>.

Hajishengallis, G., Darveau, R. P., & Curtis, M. A. (2012). The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol*, 10(10), 717-725. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2873>.

Hao, S., Chen, X., Wang, F., Shao, Q., Liu, J., Zhao, H., Yuan, C., Ren, H., & Mao, H. (2018). Breast cancer cell-derived IL-35 promotes tumor progression via induction of IL-35-producing induced regulatory T cells. *Carcinogenesis*, 39(12), 1488-1496. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgy136>.

Hildenbrand, K., Bohnacker, S., Menon, P. R., Kerle, A., Prodjinotho, U. F., Hartung, F., Strasser, P. C., Catichi, D. A. M., Rührnößl, F., Haslbeck, M., Schumann, K., Müller, S. I., da Costa, C. P., Esser-von Bieren, J., & Feige, M. J. (2023). Human interleukin-12 α and EBI3 are cytokines with anti-inflammatory functions. *Sci Adv*, 9(43), eadg6874. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adg6874>

Huang, N., Dong, H., Luo, Y., & Shao, B. (2021). Th17 cells in periodontitis and its regulation by A20. *Front Immunol*, 12, 742925. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.742925>.

Jafarzadeh, A., Nemati, M., Jafarzadeh, S., Chauhan, P., & Saha, B. (2021). The immunomodulatory potentials of interleukin-27 in airway allergies. *Scand J Immunol*, 93(2), e12959. <https://doi.org/10.1111/sji.12959>.

Jamison, B. L., T. Neef, A. Goodspeed, B. Bradley, R. L. Baker, S. D. Miller and K. Haskins (2019). Nanoparticles containing an insulin-ChgA hybrid peptide protect from transfer of autoimmune diabetes by shifting the balance between effector T cells and regulatory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 203(1), 48–57. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900127>.

Jiang, Q., Yang, G., Liu, Q., Wang, S., & Cui, D. (2021). Function and Role of Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol*, 12, 626193. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.626193>

Jin, Y., Liu, D., & Lin, X. (2017). IL-35 may maintain homeostasis of the immune microenvironment in periodontitis. *Exp Ther Med*, 14(6), 5605-5610. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5255>.

Kamiya, Y., Kikuchi, T., Goto, H., Okabe, I., Takayanagi, Y., Suzuki, Y., Sawada, N., Okabe, T., Suzuki, Y., Kondo, S., Hayashi, J. I., & Mitani, A. (2020). IL-35 and RANKL synergistically induce osteoclastogenesis in RAW264 mouse monocytic cells. *Int J Mol Sci*, 21(6). <https://doi.org/10.3390/ijms21062069>.

Korn, T., & Hiltensperger, M. (2021). Role of IL-6 in the commitment of T cell subsets. *Cytokine*, 146, 155654. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155654>.

Köseoğlu, S., Sağlam, M., Pekbağrıyanık, T., Savran, L., & Sütçü, R. (2015). Level of Interleukin-35 in gingival crevicular fluid, saliva, and plasma in periodontal disease and health. *J Periodontol*, 86(8), 964-971. <https://doi.org/10.1902/jop.2015.140666>.

Li, X., J. Xie, Q. Wang, H. Cai, C. Xie and X. Fu (2020). miR-21 and pellino-1 expression profiling in autoimmune premature ovarian insufficiency. *Journal of immunology research*, 2020, 3582648. <https://doi.org/10.1155/2020/3582648>.

Li, Y., E. Mateu and I. Díaz (2021). Impact of cryopreservation on viability, phenotype, and functionality of porcine PBMC. *Frontiers in immunology*, 12, 765667.. Liu, W., Zeng, Q., Wen, Y., Tang, Y., Yan, S., Li, Y., Zhou, L., & Luo, R. (2021). Inhibited interleukin 35 expression and interleukin 35-induced regulatory T cells promote type II innate lymphoid cell response in allergic rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 126(2), 152-161.e151. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2020.08.005>.

Luo, M., Peng, H., Chen, P., & Zhou, Y. (2019). The immunomodulatory role of interleukin-35 in fibrotic diseases. *Expert Rev Clin Immunol*, 15(4), 431-439. <https://doi.org/10.1080/1744666x.2019.1564041>.

Maboudi, A., Eghbalian-Nouzanizadeh, A., Seifi, H., Bahar, A., Mohadese, M., Ali Mohammadpour, R., Abediankenari, S., Poorbaghi, S. L., & Sepehrimanesh, M. (2019). Serum levels of interleukin-23 and 35 in patients with and without type 2 diabetes mellitus and chronic periodontitis. *Caspian J Intern Med*, 10(3), 295-302. <https://doi.org/10.22088/cjim.10.3.295>.

Mahfooz, N. S., Merling, M. R., Claeys, T. A., Dowling, J. W., Forero, A., & Robinson, R. T. (2023). Human IL-35 Inhibits the Bioactivity of IL-12 and Its Interaction with IL-12rβ2. *Immunohorizons*, 7(6), 431-441. <https://doi.org/10.4049/immunohorizons.2300039>

Mitani, A., Niedbala, W., Fujimura, T., Mogi, M., Miyamae, S., Higuchi, N., Abe, A., Hishikawa, T., Mizutani, M., Ishihara, Y., Nakamura, H., Kurita, K., Ohno, N., Tanaka, Y., Hattori, M., & Noguchi, T. (2015). Increased expression of interleukin IL-35 and IL-17, but not IL-27, in gingival tissues with chronic periodontitis. *J Periodontol*, 86(2), 301-309. <https://doi.org/10.1902/jop.2014.140293>.

Monasterio, G., Castillo, F., Rojas, L., Cafferata, E. A., Alvarez, C., Carvajal, P., Núñez, C., Flores, G., Díaz, W., & Vernal, R. (2018). Th1/Th17/Th22 immune response and their association with joint pain, imagenological bone loss, RANKL expression and osteoclast activity in temporomandibular joint osteoarthritis: A preliminary report. *J Oral Rehabil*, 45(8), 589-597. <https://doi.org/10.1111/joor.12649>.

Nakajima, Y., K. Chamoto, T. Oura and T. Honjo (2021). Critical role of the CD44^{low}CD62L^{low} CD8⁺ T cell subset in restoring antitumor immunity in aged mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(23), e2103730118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2103730118>.

Okada, K., Fujimura, T., Kikuchi, T., Aino, M., Kamiya, Y., Izawa, A., Iwamura, Y., Goto, H., Okabe, I., Miyake, E., Hasegawa, Y., Mogi, M., & Mitani, A. (2017). Effect of interleukin IL-35 on IL-17 expression and production by human CD4⁺ T cells. *PeerJ*, 5, e2999. <https://doi.org/10.7717/peerj.2999>.

Papapanou, P. N., M. Sanz, N. Buduneli, T. Dietrich, M. Feres, D. H. Fine, T. F. Flemmig, R. Garcia, W. V. Giannobile, F. Graziani, H. Greenwell, D. Herrera, R. T. Kao, M. Kerschull, D. F. Kinane, K. L. Kirkwood, T. Kocher, K. S. Kornman, P. S. Kumar, B. G. Loos, E. Machtei, H. Meng, A. Mombelli, I. Needleman, S. Offenbacher, G. J. Seymour, R. Teles and M. S. Tonetti (2018). "Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of periodontal and peri-Implant diseases and conditions." *J Periodontol* 89 Suppl 1: S173-s182. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0721>.

Parra-Ortega, I., Salceda-Rangel, K. S., Nájera-Martínez, N., López-Martínez, B., OrtizNavarrete, V., & Olvera-Gómez, I. (2019). Detection and quantification of T-cell subpopulations and NK cells in peripheral blood from healthy individuals. *Bol Med Hosp Infant Mex*, 76(2), 66-78. <https://doi.org/10.24875/bmhim.18000083>.

Qin, Y., Tu, K., Teng, Q., Feng, D., Zhao, Y., & Zhang, G. (2021). Identification of novel Tcell epitopes on infectious bronchitis virus N protein and development of a multi-epitope vaccine. *J Virol*, 95(17), e0066721. <https://doi.org/10.1128/jvi.00667-21>.

Osuna-Gómez, R., Castellví, I., Mulet, M., Ortiz, M., Brough, D. E., Sabzevari, H., Semnani, R. T., & Vidal, S. (2023). Impaired Regulation by IL-35 in Systemic Sclerosis. *Int J Mol Sci*, 24(13). <https://doi.org/10.3390/ijms241310567>

Rajendran, S., Y. Li, E. Ngoh, H. Y. Wong, M. S. Cheng, C. I. Wang and H. Schwarz (2019). Development of a bispecific antibody targeting CD30 and CD137 on hodgkin and reedsternberg cells. *Frontiers in oncology*, 9, 945. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00945>.

Rojas, C. (2023). "Efecto de las vesículas extracelulares derivadas de linfocitos T reguladores inducidos con ácido retinoico en la respuesta inmune y la resorción ósea durante la periodontitis rol de CD73." Tesis de doctorado no publicada: Universidad de Chile.

Sawant, D. V., Hamilton, K., & Vignali, D. A. (2015). Interleukin-35: Expanding its job profile. *J Interferon Cytokine Res*, 35(7), 499-512. <https://doi.org/10.1089/jir.2015.0015>.

Scheller, J., Berg, A., Moll, J. M., Floss, D. M., & Jungesblut, C. (2021). Current status and relevance of single nucleotide polymorphisms in IL-6-/IL-12-type cytokine receptors. *Cytokine*, 148, 155550. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155550>.

Schmidlin, P. R., Dehghannejad, M., & Fakheran, O. (2021). Interleukin-35 pathobiology in periodontal disease: a systematic scoping review. *BMC Oral Health*, 21(1), 139. <https://doi.org/10.1186/s12903-021-01515-1>.

Schmidt, T., Luebbe, J., Kilian, C., Riedel, J. H., Hiekmann, S., Asada, N., Ginsberg, P., Robben, L., Song, N., Kaffke, A., Peters, A., Borchers, A., Flavell, R. A., Gagliani, N., Pelzcar, P., Huber, S., Huber, T. B., Turner, J. E., Paust, H. J., . . . Panzer, U. (2021). IL-17 receptor C signaling

- controls CD4⁺ Th-17 immune responses and tissue injury in immune-mediated kidney diseases. *J Am Soc Nephrol*, 32(12), 3081-3098. <https://doi.org/10.1681/asn.2021030426>.
- Silva, N., Abusleme, L., Bravo, D., Dutzan, N., Garcia-Sesnich, J., Vernal, R., Hernandez, M., & Gamonal, J. (2015). Host response mechanisms in periodontal diseases. *J Appl Oral Sci*, 23(3), 329-355. <https://doi.org/10.1590/1678-775720140259>.
- Song, M., & Ma, X. (2016). The immunobiology of interleukin-35 and its regulation and gene expression. *Adv Exp Med Biol*, 941, 213-225. https://doi.org/10.1007/978-94-024-0921-5_10.
- Stremska, M. E., C. Dai, R. Venkatadri, H. Wang, V. Sabapathy, G. Kumar, S. Jose, S. Mohammad, S. J. Sung, S. M. Fu and R. Sharma (2019). IL23, an IL-2-IL-33 hybrid cytokine induces prolonged remission of mouse lupus nephritis by targeting Treg cells as a single therapeutic agent. *J Autoimmun* 102: 133-141 <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.05.005>.
- Sullivan, J. A., AlAdra, D. P., Olson, B. M., McNeel, D. G., & Burlingham, W. J. (2020). Infectious tolerance as seen with 2020 vision: The role of IL-35 and extracellular vesicles. *Front Immunol*, 11, 1867. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01867>.
- Tonetti, M. S., H. Greenwell and K. S. Kornman (2018). Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Clin Periodontol* 45 Suppl 20: S149-s161. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0006>.
- Wang, W., Wei, C., Cheng, Z., & Yang, J. (2020). Aberrant Th2 immune responses are associated with a reduced frequency of IL-35-induced regulatory T cells after allergen exposure in patients with allergic asthma. *Allergy Asthma Immunol Res*, 12(6), 1029-1045. <https://doi.org/10.4168/aair.2020.12.6.1029>.
- Weinstock, A., Rahman, K., Yaacov, O., Nishi, H., Menon, P., Nikain, C. A., Garabedian, M. L., Pena, S., Akbar, N., Sansbury, B. E., Heffron, S. P., Liu, J., Marecki, G., Fernandez, D., Brown, E. J., Ruggles, K. V., Ramsey, S. A., Giannarelli, C., Spite, M., . . . Fisher, E. A. (2021). Wnt signaling enhances macrophage responses to IL-4 and promotes resolution of atherosclerosis. *Elife*, 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.67932>.
- Xiang, X. G., & Xie, Q. (2015). IL-35: a potential therapeutic target for controlling hepatitis B virus infection. *J Dig Dis*, 16(1), 1-6. <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12218>.

Yang, W., Chen, X., & Hu, H. (2020). CD4⁽⁺⁾ T-cell differentiation in vitro. *Methods Mol Biol*, 2111, 91-99. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0266-9_8.

Yang, C., Lu, C., Pan, J., Zhao, C., Chen, Z., Qin, F., Wen, J., Wei, W., & Lei, L. (2023). The role of iTr35 cells in the inflammatory response and fibrosis progression of systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*, 62(10), 3439-3447. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kead053>

Yu, S., Tripod, M., Atasoy, U., & Chen, J. (2021). HuR plays a positive role to strengthen the signaling pathways of CD4⁺ T cell activation and Th17 cell differentiation. *J Immunol Res*, 2021, 9937243. <https://doi.org/10.1155/2021/9937243>.

Zhang, J., Zhang, Y., Wang, Q., Li, C., Deng, H., Si, C., & Xiong, H. (2019). Interleukin-35 in immune-related diseases: Protection or destruction. *Immunology*, 157(1), 13-20. <https://doi.org/10.1111/imm.13044>.

Zhang, L., Liu, M., Liu, W., Hu, C., Li, H., Deng, J., Cao, Q., Wang, Y., Hu, W., & Li, Q. (2021). Th17/IL-17 induces endothelial cell senescence via activation of NF-κB/p53/Rb signaling pathway. *Lab Invest*, 101(11), 1418-1426. <https://doi.org/10.1038/s41374-021-00629y>.

Zhang, X., Zhang, Z., He, Z., Ju, M., Li, J., Yuan, J., Jing, Y., Li, K., Liu, Y., & Li, G. (2018). Interleukin 35 induced Th2 and Tregs bias under normal conditions in mice. *PeerJ*, 6, e5638. <https://doi.org/10.7717/peerj.5638>.

Zhu, J. J., & Shan, N. N. (2020). Immunomodulatory cytokine interleukin-35 and immune thrombocytopaenia. *J Int Med Res*, 48(12), 300060520976477. <https://doi.org/10.1177/0300060520976477>.

ANEXOS Y APÉNDICES

Anexo 1: Anticuerpos y sonda de viabilidad específicas para identificación celular mediante citometría de flujo

Linfocito T naïve	Linfocito Treg	Linfocitos activados
anti-CD4 FITC	Anti-CD4 FITC	Anti-CD69 BV421
anti-CD8 BUV395	Anti-CD25 APC	Anti-CD62L APC
anti-CD45 BV421	Anti-Foxp3 PE	Anti-CD44 PECy7
anti-CD44 PECy7	Zombie NIR™ Fixable Viability APCCy7	Zombie NIR™ Fixable Viability APCCy7
anti-CD62L APC		
Zombie NIR™ Fixable Viability APCCy7		

Anexo 2: Figura 1: Esquema explicativo de la metodología experimental

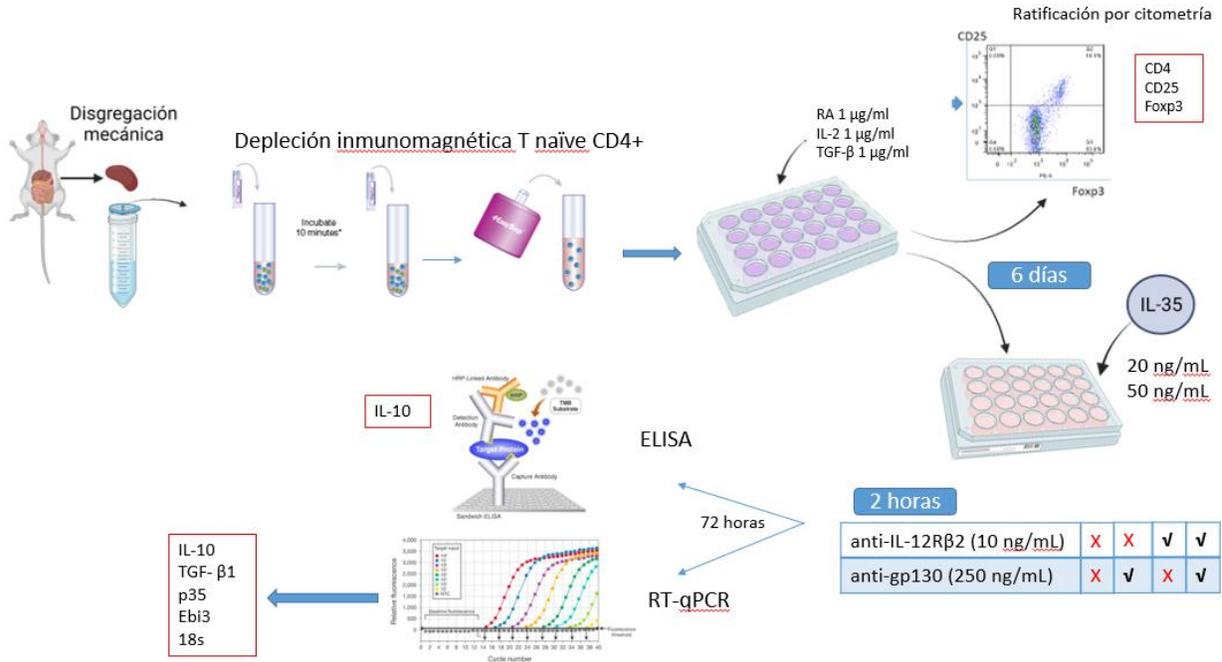


Figura 1: Esquema explicativo de la metodología experimental: A partir de los bazos de ratones C57BL/6 se realizó una disgregación mecánica para utilizar un kit de depleción inmunomagnética y obtener linfocitos T naíve CD4⁺. A continuación, se indujo la diferenciación de los linfocitos T naíve CD4⁺ a linfocitos Tregs con ácido retinoico (1 µg/ml), IL-2 (1 µg/ml) y TGF-β1 (1 µg/ml) para luego ratificar el fenotipo celular por citometría de flujo con anticuerpos anti-CD4, anti-CD25 y anti-Foxp3. A los 6 días se neutralizaron las subunidades del receptor de IL-35 con los anticuerpos anti-gp130 (250 ng/ml) y/o anti-IL-12rβ2 (10 ng/ml), para luego estimular a los linfocitos Tregs con 20 ng/ml y 50 ng/ml de IL-35. Posterior a las 72 horas se recuperaron las células y el sobrenadante y se realizaron ensayos de RT-qPCR de las citoquinas IL-10 y TGF-β1 y de las subunidades de IL-35, Ebi3 y p35, además del ensayo de ELISA para IL-10.

Anexo 3: Marcajes utilizados en citómetro BD LSR Fortessa X-20 para fenotipificación de linfocitos *T* naïve.

Célula / marcador	FITC	BUV395	BV421	PECy7	APC	APCCy7
Sin marca (S/M)						
Single staining CD4 (SS CD4)	X					
Single staining CD8 (SS CD8)		X				
Single staining CD45 (SS CD45)			X			
Single staining CD44 (SS CD44)				X		
Single Staining CD62L (SS CD62L)					X	
Single Staining Zombie NIR (SS LD)						X
Full Mix 1	X	X	X	X	X	X

Anexo 4: Marcajes utilizados en citómetro BD LSR Fortessa X-20 para fenotipificación de linfocitos Tregs.

Célula / marcador	FITC	APC	PE	APCCy7
Sin marca (S/M)				
Single staining CD4 (SS CD4)	X			
Single staining CD25 (SS CD25)		X		
Single Staining Foxp3 (SS Foxp3)			X	
Single Staining Zombie NIR (SS LD Vivas/Muertas)				X
Full Mix	X	X	X	X

Anexo 5: Partidores para amplificación mediante RT-qPCR

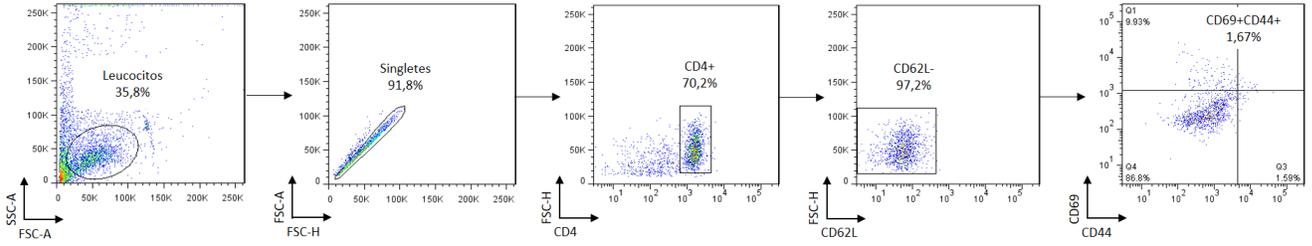
Objetivo	Forward primer (3'-5')	Reverse primer (5'-3')
Foxp3	AGAAGCTGGGAGCTATGCAG	ACTGGTGGCTACGATGCAG
TGF- β 1	TGGAGCAACATGTGGA ACTC	GTCAGCAGCCGGTTACCA
IL-10	GCTTCATCCCTGAAA ACTGTC	TGCTACAAAGGCAGACAAACA
Ebi3	GCTCCCCTGGTTACTGAA	ACGGGATACCGAGAAGCAT
p35	GCAGAGCTTCATTTTCACTCTGT	CATCGATGAGCTGATGCAGT
18S rRNA	GCAATTATCCCCATGAACG	GGGACTTAATCAACGCAAGC

Anexo 6: Replicado biológico por condición para cada experimento

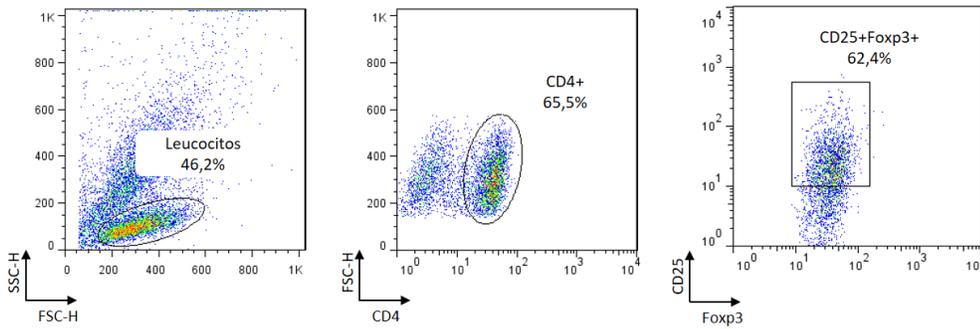
Experimento/ N° por condición	Target	Treg + IL-35	Treg + IL-35 + anti-gp130	Treg + IL-35 + anti-IL-12r β 2	Treg + IL-35 + anti-IL-12r β 2 / anti-gp130
RT-qPCR (20 ng/ml)	IL-10	6	7	7	8
	TGF- β 1	6	6	7	7
	Ebi3	7	7	7	7
	p35	7	6	7	7
	Foxp3	8	8	8	6
RT-qPCR (50 ng/ml)	IL-10	6	8	7	8
	TGF- β 1	8	7	7	7
	Ebi3	5	6	7	8
	p35	7	8	7	7
	Foxp3	6	6	7	8
ELISA (20 ng/ml)	IL-10	6	6	6	6
Activación linfocitos T naïve (20 ng/ml)		1	1	1	1

Anexo 7: Estrategias de selección

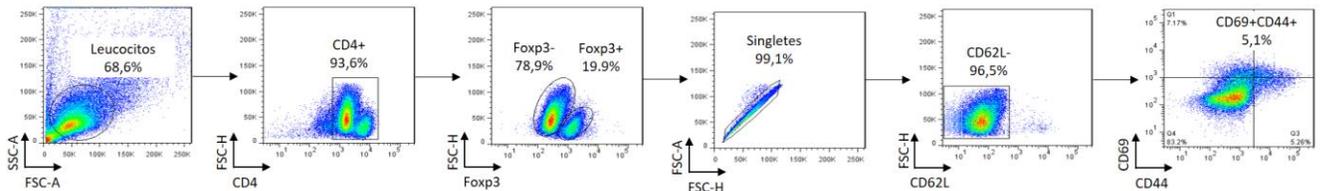
Purificación de linfocitos T *naïve*



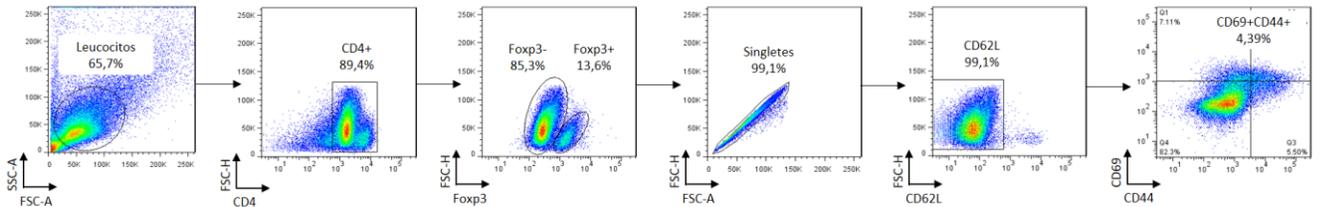
Inducción de linfocitos Tregs



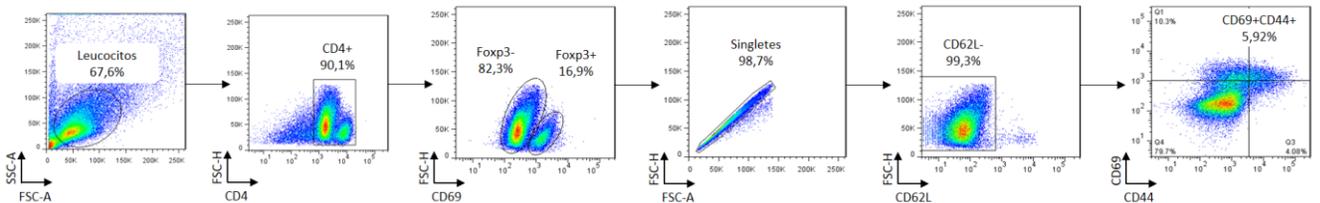
Condición co-cultivo T *naïve* + Tregs



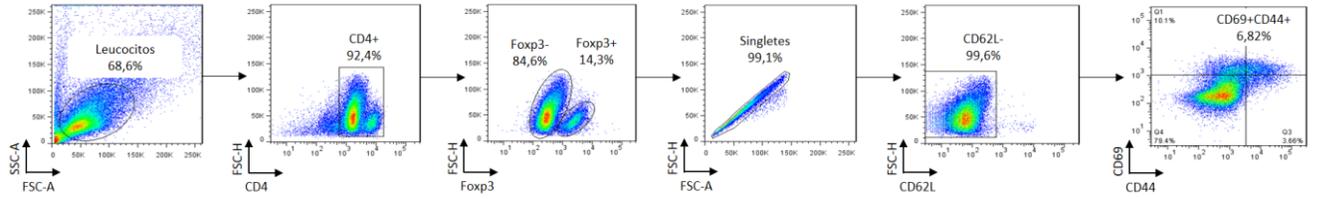
Condición co-cultivo T *naïve* + Tregs + IL-35



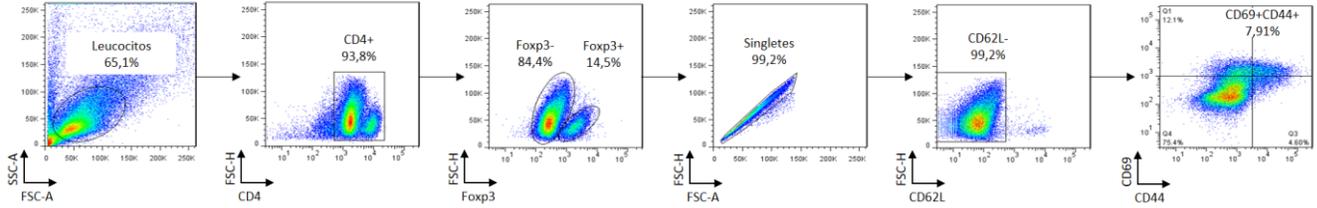
Condición co-cultivo T *naïve* + Tregs + IL-35 + anti-gp130



Condición co-cultivo T *naïve* + Tregs + IL-35 + anti-IL-12 β 2



Condición co-cultivo T *naïve* + Tregs + IL-35 + anti-gp130 + anti-IL-12 β 2



Santiago, 24 de mayo de 2022

Certificado N°: **22578 – ODO – UCH**

CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica que en el Protocolo **FOUCH 020522** del Proyecto de Investigación titulado **“Efectos terapéuticos de las vesículas extracelulares derivadas de linfocitos T reguladores e inducidas con ácido retinoico en la periodontitis: Inhibición de la reabsorción ósea alveolar y promoción de su formación mediante la modulación de la respuesta inmune periodontal”**, del investigador **Dr. Rolando Vernal**, Profesor Titular, Departamento de Odontología Conservadora, Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, no se plantean acciones en sus procedimientos que contravengan las normas bioéticas de manejo y cuidado de animales. Así mismo, la metodología experimental planteada satisface lo estipulado en el Programa Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.

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

Se otorga la presente certificación para el uso de **490 ratones**, especie *Mus musculus*, 400 ratones correspondientes a la cepa C57BL/6, 50 a la cepa NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ y 40 a la cepa C57BL/6 Foxp3GFP, provenientes de la **Plataforma Experimental Bioterio**, Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, desde el **24 de mayo del 2022 hasta el 31 de enero del 2026**, tiempo estimado de ejecución del estudio, el cual será financiado por el proyecto **FONDECYT Regular N° 1220999**.

El CICUA de la Universidad de Chile, forma parte de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, y está constituido por 53 miembros: 5 médicos veterinarios, 39 académicos (12 de ellos médicos veterinarios), y 9 miembros no asociados a la academia o investigación, y que cuentan con experiencia en bioética relacionada a mantención y uso de animales. El certificado que emite el Comité

procede de la aprobación del “Protocolo de Manejo y Cuidado de Animales” después de un estudio acucioso y de la acogida de los investigadores de las observaciones



exigidas por el Comité.

Claudia Delgado Acevedo Dr. Emilio Herrera Videla
Directora Ejecutiva CICUA – VID Presidente
Universidad de Chile CICUA - VID

Universidad de Chile

Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA)

Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo (VID) – Universidad de Chile

<http://www.uchile.cl/portal/investigacion/152120/comite-institucional-de-cuidado-y-uso-de-animales-cicua> email: coordinador.cicua@uchile.cl



FDO Nº 159 Santiago, 19 de mayo de 2022.

CERTIFICADO

El Comité Institucional de Bioseguridad (CIB) ha analizado el Proyecto de Investigación Fondecyt Regular N°1220999, titulado **“The therapeutic effects of RA- induced Tregderived extracellular vesicles in periodontitis: Inhibition of alveolar bone resorption and promotion of its formation through the modulation of the periodontal immune response”**. El Investigador Responsable de este proyecto es Dr. Rolando Vernal Astudillo, Académico del Departamento de Odontología Conservadora, perteneciente a la Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

Los ensayos propuestos en este Proyecto principalmente se realizarán en el Laboratorio de Biología Periodontal, Laboratorio de Anatomía Patológica y en la Plataforma Experimental, todos ellos pertenecientes a la Unidad Académica mencionada anteriormente. Los ensayos involucran el manejo de:

- **Manejo de Sustancias Químicas Peligrosas:**
 - Se utilizarán agentes químicos de riesgo de tipo inflamable, oxidante, corrosivo, tóxico agudo y peligro (grave) para la salud y el medio ambiente.

- **Material Biológico:**
 - Muestras animales: se utilizará Mucosa de la lesión periodontal palatina; Biopsia de bazo y linfonodos; Biopsia de maxilar y, Fluido crevicular gingival. Todas ellas provenientes de ratones C57BL/6 y NOD.Cg-Prkdcscid II2rgtm1Wjl/Szj.
 - Cultivos celulares: se utilizará Cultivo primario de linfocitos T CD4+ purificados de bazo de ratones C57BL/6, cuyo nivel de seguridad corresponde a 2.

- **Organismos Genéticamente Modificados:**
 - Ratones NOD.Cg-Prkdcscid II2rgtm1Wjl/Szj, cuyas características son: depletados en células presentadoras de antígeno y linfocitos T. Reemplazo de fragmento

genómico de 1356 pb del gen Rag1 por cassette de neomicina. Las medidas de contención y seguridad corresponden a nivel de riesgo 2. ○ **Radiaciones Ionizantes:**

- Se utilizará Micro-CT: utiliza radiación ionizante del tipo rayos X a una dosis ultra baja; cabe destacar que este equipo se encuentra blindado.

El personal que manipulará el material biológico, sustancias químicas peligrosas, organismos genéticamente modificados y radiación ionizante, se encuentra debidamente entrenado en estas áreas. Además, técnicos de laboratorio, estudiantes de pregrado o posgrado que trabajarán con el equipo de investigación, estarán bajo la supervisión del Dr. Vernal.

El CIB certifica que la Facultad de Odontología cuenta con las facilidades para el manejo y desecho del material biológico y químico a utilizar en el proyecto de acuerdo al Manual de Normas de Bioseguridad y Riesgos Asociados, Conicyt 2018. Además, el investigador se compromete a velar por el cumplimiento de las normas de bioseguridad junto al Manual de Procedimientos para el Manejo y Desechos de Residuos biológicos y RESPEL de la Facultad, durante el desarrollo del proyecto.

Se extiende el presente certificado a solicitud del Dr. Vernal para ser presentado en el Concurso Fondecyt Regular 2022 (ANID).

Carla Lozano



Dra. Carla Lozano M.

Presidenta

Facultad de Odontología. Sergio Livingstone P. 943, Independencia, Fono 29781792-29781816, Fax: 29781748, Santiago. <http://odontologia.uchile.cl>

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Sergio Livingstone P. 1007, Independencia, Fono 29781793 Fax: 29781748, Santiago. <http://www.quimica.uchile.cl/>

