



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

**Efecto de la interleuquina (IL)-35 sobre la respuesta linfocitaria Th17 y la
resorción ósea alveolar durante la periodontitis**

Nicolás Faúndez Alarcón

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

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Rolando Vernal Astudillo

TUTOR EXPERTO

Dr. Emilio A. Cafferata Chea

Adscrito a Proyecto FONDECYT Regular 1181780

Santiago - Chile

2019



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

**Efecto de la interleuquina (IL)-35 sobre la respuesta linfocitaria Th17 y la
resorción ósea alveolar durante la periodontitis**

Nicolás Faúndez Alarcón

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

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Rolando Vernal Astudillo

TUTOR EXPERTO

Dr. Emilio A. Cafferata Chea

Adscrito a Proyecto FONDECYT Regular 1181780

Santiago - Chile

2019

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todo quien de una u otra forma hizo que mi paso por la carrera fuera más ameno.

A mis padres, quienes han vivido para que ni a mi ni a mis hermanos nunca nos faltara algo y, de hecho, que pudieramos cumplir todas nuestras brillantes y especiales ocurrencias (dieta, viajes, cursos, hobbies, celebraciones, salidas). Además por soportar mis cambios de humor por trasnoche, mi desorden y permitirme estudiar sin tener mayores preocupaciones ni deberes.

A mis hermanos: mi Yoyi, mi Cotito y mi Papelio, ya que al crecer junto a cada una de sus peculiares personalidades completamente distintas una de otra pude aprender algo diferente, dándome cuenta de que tener hermanos es de lo mejor que te puede pasar.

A la princess, por supuesto.

A mis amigos, que aguantaron mis ataques de nerviosismo y drama cuando parecía que los provisorios y la clínica me la iban a ganar. Mención al Pepo por todo lo que pasamos durante los años de pediatría, de proyecto, de grupo de adulto; y por ser un apoyo en más de una ocasión.

Y a mis tutores, Dr. Rolando Vernal y Dr Emilio Cafferata, por dejarme ser parte de este proyecto y por las enseñanzas que me entregaron sobre la investigación en odontología.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
Resorción ósea alveolar durante la periodontitis	1
Rol de los linfocitos T colaboradores (Th) durante la periodontitis	2
Linfocitos Treg y su rol en la regulación de la respuesta Th17	3
Interleuquina-35	4
2. HIPÓTESIS	6
3. OBJETIVO GENERAL	6
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
5. MATERIALES Y MÉTODOS	7
Animales	7
Periodontitis experimental	7
Inoculación con IL-35	7
Cuantificación de la resorción ósea alveolar	8
Detección de RANKL y OPG en lesiones periodontales	8
Expresión de los mRNA de las citoquinas Th1, Th17 y Tregs y de RANKL y OPG en las lesiones periodontales	8
Producción de RANKL y OPG en el fluido crevicular gingival	10
6. RESULTADOS	11
Cuantificación de la resorción ósea alveolar	11
Expresión de RANKL y OPG	12
Expresión de mRNA de citoquinas Th1, Th17 y Treg	14
7. DISCUSIÓN	16
8. CONCLUSIONES	19
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20

RESUMEN

Antecedentes: La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica que se caracteriza por la destrucción progresiva de los tejidos periodontales y; en consecuencia, la pérdida de los dientes. La patogenia de la enfermedad se asocia principalmente a la expresión de factores pro-inflamatorios y osteo-destructivos durante la respuesta inmune periodontal generada por el hospedero ante la disbiosis microbiana. Por un lado, la actividad pro-inflamatoria y osteodestructiva de los linfocitos T colaboradores tipo 1 (Th1) y los linfocitos Th17 se encuentra aumentada y; por otro lado, la actividad inmunoreguladora y osteoprotectora de los linfocitos T reguladores (Treg) se encuentra disminuida. Este desbalance favorece la resorción ósea patológica mediante el incremento de la razón RANK/OPG y la activación de los osteoclastos. En este contexto, la interleuquina (IL)-35, una citoquina producida por los linfocitos Treg con efecto inmunoregulador, puede inhibir la proliferación y actividad de linfocitos T, e inducir la expansión y diferenciación de una subpoblación de Treg productores de IL-35, denominada iTr35; sin embargo, su efecto durante la periodontitis no ha sido determinado.

Materiales y Métodos: Se analizó el efecto de IL-35 durante la resorción ósea en un modelo animal de periodontitis experimental mediante la inoculación local o sistémica de IL-35 en distintas concentraciones. Se cuantificó el volumen de resorción ósea en los maxilares mediante microtomografía computarizada (μ CT). Se evaluó la expresión de RANKL y OPG mediante inmunofluorescencia y qPCR. Además, se analizó la expresión de mRNA de citoquinas del perfil Th1, Th17 y Treg en lesiones periodontales mediante qPCR. Finalmente, se detectaron los niveles de RANKL y OPG en fluido crevicular gingival mediante ELISA.

Resultados: Los ratones inoculados con IL-35 presentaron menores niveles de resorción ósea alveolar, menores niveles de expresión de citoquinas asociadas al fenotipo Th1 y Th17, y una disminución de la expresión y producción de RANKL de manera dependiente de la dosis. Además presentaron mayores niveles de expresión de citoquinas asociadas al fenotipo Treg y de OPG. **Conclusiones:** La inoculación con IL-35 inhibe la resorción ósea, la expresión de RANKL y de

citoquinas del perfil Th1 y Th17, y aumenta la expresión de OPG y de citoquinas del perfil Treg.

1. INTRODUCCIÓN

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica que se caracteriza por la destrucción progresiva de los tejidos periodontales y la consecuente pérdida de los dientes. La disbiosis y sinergia polimicrobiana de la microbiota subgingival han sido identificadas como las causantes de la periodontitis; así, el cambio patológico entre las proporciones e interacciones bacterianas subgingivales conducen a una respuesta inmune desregulada del hospedero, capaz de llevar a la resorción ósea alveolar (Hajishengallis, 2015). Si bien las bacterias en la microbiota subgingival son necesarias para el inicio y progresión de la periodontitis, la patogenia de la enfermedad se asocia principalmente a la liberación de factores pro-inflamatorios y osteo-destructivos durante la respuesta inmune periodontal generada por el hospedero ante la disbiosis microbiana (Graves y cols., 2011)

Resorción ósea alveolar durante la periodontitis

La resorción ósea alveolar requiere de la activación de los osteoclastos periodontales (Bruzzaniti y Baron, 2006). Durante este proceso, la señalización vía el receptor activador del factor nuclear κ B (RANK), presente en su membrana celular, por parte del ligando del receptor activador del factor nuclear κ B (RANKL), expresado por osteoblastos, osteocitos, fibroblastos y linfocitos Th17, es el determinante clave de la diferenciación de los precursores de osteoclastos y la activación de los osteoclastos maduros (Teitelbaum, 2000; Okamoto y Takayanagi, 2019). En particular, la unión de RANKL a RANK induce la activación de la vía de señalización intracelular $\text{NF}\kappa\text{B}$, que a su vez es regulada por la osteoprotegerina (OPG) (McGrath, 2011) receptor señuelo de RANKL capaz de inhibir la unión de RANKL a RANK y, en consecuencia, la activación de los osteoclastos y la resorción ósea (Anandarajah y Schwarz, 2006).

Durante la periodontitis, se detectan niveles incrementados de RANKL en las lesiones periodontales, la saliva y el fluido crevicular gingival (Cochran, 2008).

A su vez, estos niveles incrementados de RANKL se asocian a la presencia y actividad de los linfocitos T Th17 (Vernal y cols., 2006; Kikuta y cols., 2013).

Rol de los linfocitos T colaboradores (Th) durante la periodontitis

Los linfocitos T CD4⁺ son uno de los componentes principales de la respuesta inmune. Posterior a la presentación antigénica, los linfocitos T *naïve* proliferan y son capaces de diferenciarse en distintos subtipos: linfocitos T colaboradores tipo-1 (Th1), Th2, Th17 y T reguladores (Treg) (Vernal y Garcia-Sanz, 2008). Los linfocitos Th1 promueven la actividad de fagocitos y participan en la respuesta ante patógenos intracelulares (Abbas y cols., 1996). Se diferencian en presencia de interleuquina (IL)-12 e interferón (IFN)- γ , los cuales a su vez inducen la expresión del factor de transcripción fenotipo específico denominado *T-box expressed in T cells* (T-bet) (Mullen y cols., 2001). Los linfocitos Th1 se caracterizan por producir IFN- γ , IL-1 β , IL-12 y factor de necrosis tumoral (TNF)- α (Gonzales, 2015). En cambio, la diferenciación de los linfocitos Th2 requiere de la presencia de IL-4, la cual induce la expresión de su factor de transcripción característico *GATA-binding protein 3* (GATA3) (Abbas y cols., 1996). Una vez diferenciados, los linfocitos Th2 participan en la eliminación de microorganismos extracelulares y se caracterizan por producir principalmente IL-4 y en menores proporciones IL-5, IL-9, e IL-13 (Gonzales, 2015)

Los linfocitos Th17 son un subtipo de linfocitos Th, llamados así por ser los principales secretores de IL-17A (Harrington y cols., 2005). Para su diferenciación es necesaria la presencia de factor de crecimiento transformante (TGF)- β 1 e IL-6 (Wang y cols., 2013). Además, IL-23 es necesaria para la supervivencia de los linfocitos Th17 y es crítica para la estabilización y mantención del fenotipo funcional (Vernal y Garcia-Sanz, 2008; Yago y cols., 2017). La señalización de IL-6 y TGF- β 1 induce la expresión del factor de transcripción característico de los linfocitos Th17 llamado *Retinoid acid receptor-related orphan receptor gamma-t* (ROR γ t) (Ivanov y cols., 2006). Una vez diferenciados, los linfocitos Th17 son capaces de migrar preferentemente a las mucosas y expresar IL-17A, IL-23 y RANKL (Acosta-Rodriguez y cols., 2007). En este contexto, IL-17A induce la

expresión de IL-6 y RANKL en fibroblastos, osteoblastos y osteocitos, pudiendo amplificar la respuesta Th17 y la consecuente osteoclastogénesis (Yao y cols., 1995; van Hamburg y cols., 2011; Miossec y Kolls, 2012).

Durante la periodontitis, los linfocitos Th17 participan directa e indirectamente en la resorción ósea alveolar mediante la expresión de RANKL e IL-17A (Tsukasaki y cols., 2018). A su vez, la expresión de RANKL producida por los Th17 permite la activación directa de los osteoclastos (Okamoto y Takayanagi, 2011; Kikuta y cols., 2013). En efecto, un incremento en los niveles de IL-17A y un aumento en el número de linfocitos Th17 funcionales se observa en las lesiones periodontales (Vernal y cols., 2005; Adibrad et al., 2012; Cheng y cols., 2014; Dutzan y cols., 2018). Además, alteraciones genéticas asociadas a una mayor expresión de IL-17A o IL-23 son más frecuentemente detectadas en pacientes con periodontitis (Corrêa y cols., 2012).

Linfocitos Treg y su rol en la regulación de la respuesta Th17

Los linfocitos Treg son un subtipo de linfocitos T con un rol principal en la tolerancia inmunológica, la supresión de respuestas autoinmunes y la resolución de la inflamación mediante la supresión y regulación de la función efectora de otros subtipos de células inmunes (de Rezende y cols., 2010). La actividad reguladora de los Treg se asocia a la sobre-expresión en conjunto de su factor de transcripción característico *forkhead box p3* (Foxp3) y de la cadena α del receptor de la IL-2 (CD25) (Vernal y Garcia-Sanz, 2008; Liberal y cols., 2015). Interesantemente, la expresión de Foxp3 puede inhibir la expresión de otros factores de transcripción, tal como ROR γ t y NF κ B, favoreciendo la diferenciación y función del fenotipo Treg (Kitoh y cols., 2009).

Los linfocitos Treg son capaces de regular la respuesta inmune mediante distintos mecanismos, principalmente mediante la producción de las citoquinas inmunoreguladoras TGF- β 1, IL-10 e IL-35, las cuales inhiben la proliferación de linfocitos Th y la producción de sus citoquinas (Liberal y cols., 2015). Los pacientes afectados de periodontitis presentan mayores niveles de linfocitos Treg,

IL-10 y TGF- β 1 en comparación con pacientes afectados de gingivitis; lo que se ha asociado a un intento inefectivo de regular la respuesta inmune durante la periodontitis (Nakajima y cols., 2005). Así, en un modelo animal de periodontitis experimental carente de linfocitos Treg funcionales se observó una reducción significativa de los niveles de IL-10 y TGF- β 1, junto con una mayor resorción ósea alveolar, comparado con ratones con Treg funcionales (Garlet y cols., 2010). Por lo tanto, a pesar del aumento en el número y actividad de linfocitos Treg durante la periodontitis, es posible que una parte de estas células pierda su funcionalidad supresora debido al ambiente periodontal inflamatorio enriquecido en IL-6, lo que eventualmente lleva a su transdiferenciación a linfocitos Th17 (Alvarez y cols., 2018). En efecto, se ha identificado un subtipo de linfocitos Treg en el que disminuye la expresión de Foxp3 y, en cambio, aumenta la expresión de IL-17A y RANKL (Okui y cols., 2012; Tsukasaki y cols., 2018) .

Interleuquina-35

La IL-35 es una citoquina perteneciente a la familia de la IL-12 (Vignali y Kuchroo, 2012) formada por las cadenas IL-12p35 y EBI3 y producida principalmente por los linfocitos Treg (Sawant y cols., 2015). Los efectos inmunoreguladores más importantes de IL-35 son la supresión de la proliferación de linfocitos Th y la inducción de linfocitos T *naïve* hacia una población de Treg caracterizada por la producción específica de IL-35, denominada iTr35 (Collison y cols., 2012). De esta manera, IL-35 es capaz de inducir su propia diferenciación, favoreciendo la actividad inmunoreguladora de los linfocitos iTr35 mediante la producción de IL-35, independiente de la producción de IL-10 y TGF- β 1 (Collison y cols., 2010). En este contexto, IL-35 no se expresa de manera constitutiva, sino que es inducida en un ambiente pro-inflamatorio, tal como la periodontitis (Li y cols., 2012).

La función de IL-35 se ha evaluado en estudios tanto *in vitro* como *in vivo*. La exposición a IL-35 induce la proliferación de linfocitos Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ *in vitro* (Niedbala y cols., 2007). Por otro lado, en ratones deficientes de EBI3, una de las cadenas de IL-35, se observó un aumento significativo en el número y

actividad de los linfocitos Th17 (Yang y cols., 2008). Además, en un modelo *in vivo* de encefalitis autoinmune, se observó un aumento en la respuesta de los linfocitos Th17 y mayor severidad de la enfermedad en ratones deficientes de EBI3 (Liu y cols., 2012). Más aún, en pacientes asmáticos y ratones con asma experimental deficientes de las cadenas IL-12p35 y EBI3 se observó menores niveles de IL-35 en sangre, mayor grado de inflamación de la vía aérea y mayor producción de IL-17A (Gao y cols., 2017). De manera interesante, la inoculación de IL-35 inhibió las manifestaciones clínicas de la artritis reumatoide experimental, mediante la supresión de la actividad de los linfocitos Th17 (Wirtz y cols., 2011).

En el contexto de la periodontitis, se ha observado que la expresión de IL-35 aumenta en lesiones periodontales y en fluido crevicular de pacientes con periodontitis (Kalburgi y cols., 2013; Jin y cols., 2017). Además, la inoculación de IL-35 en células del ligamento periodontal estimuladas con IL-17A inhibió la producción de IL-6 e IL-8 (Shindo y cols., 2019). De esta manera, IL-35 podría tener un efecto inmunoregulador sobre la respuesta Th17 durante la periodontitis e inhibir, al menos en parte, la resorción ósea alveolar.

Por lo tanto, usando un modelo *in vivo* de periodontitis experimental, en este estudio se analizó el efecto de la inoculación de IL-35 sobre la resorción ósea alveolar, los niveles de la razón RANKL/OPG y la producción de las citoquinas características de los fenotipos Th1, Th17 y Treg en las lesiones periodontales.

3. HIPOTESIS

La inoculación de IL-35 inhibe la resorción ósea alveolar durante la periodontitis experimental, lo que se asocia con menores niveles de la razón RANKL/OPG, menor expresión de las citoquinas tipo Th1 y Th17, y mayor expresión de las citoquinas tipo Treg.

4. OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de IL-35 sobre la resorción ósea alveolar, la razón RANKL/OPG y la expresión de las citoquinas tipo Th1, Th17 y Treg en las lesiones periodontal durante la periodontitis experimental.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar la resorción ósea alveolar mediante la cuantificación del volumen óseo perdido en las lesiones periodontales de animales afectados de periodontitis y tratados con IL-35.
2. Cuantificar los niveles de expresión de RANKL y OPG, así como la razón RANKL/OPG, en las lesiones periodontales de animales afectados de periodontitis y tratados con IL-35.
3. Cuantificar los niveles de expresión de las citoquinas IFN- γ , IL-1 β y TNF- α (Th1), IL-6, IL-17A e IL-23 (Th17), e IL-10, IL-35 EBI3 y TGF- β 1 (Treg) en las lesiones periodontales de animales afectados de periodontitis y tratados con IL-35.
4. Cuantificar los niveles de producción de RANKL y OPG en el fluido crevicular gingival de ratones afectados de periodontitis y tratados con IL-35.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo corresponde a un estudio experimental exploratorio.

Animales. Se utilizaron 48 ratones C57BL/6 de 8 semanas de edad, disponibles en la Plataforma Experimental Bioterio de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Todos los procedimientos se realizaron siguiendo las pautas del “*Council of the American Psychological Society 1980*” y las recomendaciones de la “*American Veterinary Medical Association*”. El protocolo de experimentación fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile (Protocolo #061601).

Periodontitis experimental. La inducción de la periodontitis se realizó usando el método de ligadura (Abe y Hajishengallis, 2013). Los animales se anestesiaron con ketamina 10% y xilacina 2% vía intraperitoneal (i.p.), luego se colocaron sobre un soporte de fijación y apertura oral específicamente diseñado y, finalmente, se colocó una sutura de seda negra 5-0 usando pinzas castroviejo (*Fine Science Tools, CA, EE.UU.*) alrededor de los segundos molares maxilares, en posición yuxtagingival sin afectar traumáticamente los tejidos adyacentes usando una lupa estereoscópica. Al día 15 posterior a la colocación de las ligaduras, los animales fueron eutanasiados por sobredosis de anestesia para la obtención de las muestras biológicas.

Inoculación con IL-35. La IL-35 se administró de manera sistémica e intra-gingival (i.g.) usando jeringas 26s de 5 μ L. La administración de IL-35 se realizó 1 vez al día durante 15 días. Así, se establecieron aleatoriamente los siguientes grupos experimentales, con 8 ratones cada uno: Animales afectados de periodontitis y administración i.g. de IL-35 1 ng/ μ L (IL-35 ig1), 10 ng/ μ L (IL-35 ig10) o 100 ng/ μ L (IL-35 ig100), administración i.p. de IL-35 2 μ g en 100 μ L (IL-35 ip2), sobre la base de concentraciones descritas previamente (Niedbala et al., 2007). Como controles, se utilizaron animales afectados de periodontitis sin tratamiento con IL-35 (inoculación de sólo el vehículo) y animales sin periodontitis.

Cuantificación de la resorción ósea alveolar. Se obtuvieron los maxilares separando el tejido blando del duro y se escanearon mediante micro-tomografía computarizada (μ CT) para la cuantificación del volumen óseo perdido (Park y cols., 2007; Monasterio y cols., 2018). Para esto se utilizaron los siguientes parámetros de detección: 59 kV, 588 μ A y una rotación de 0.5° y 360° de rango angular (Equipo *SkyScan 1278, Bruker, Kontich, Belgica*). Las muestras se escanearon en los tres planos espaciales y las imágenes digitalizadas 3D se generaron utilizando un algoritmo de haz cónico modificado y el software de reconstrucción *Dataviewer, Bruker*. Todos los datos fueron recolectados por un único observador, el que estuvo ciego a las condiciones experimentales de las muestras.

Detección de RANKL y OPG en lesiones periodontales. La inmuno-detección de RANKL y OPG se evaluó en cortes histológicos obtenidos de biopsias maxilares fijadas en formalina 10% pH 7,4 por 24 horas a 4°C, desmineralizadas en EDTA 14% (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.*) por 60 días, deshidratadas secuencialmente en etanol y embebidas en parafina. Cortes de 8 μ m de grosor se incubaron en pepsina al 0,2% por 30 minutos a 37°C para el desenmascaramiento antigénico y, luego, se incubaron con un anticuerpo primario policlonal de cabra anti-RANKL o anti-OPG (*R&D Systems, Minneapolis, EE.UU.*) toda la noche a 4°C. Posteriormente, se incubaron con un anticuerpo secundario policlonal de burro anti-cabra conjugado a IgG H&L Alexa Fluor 555 (*Abcam, Cambridge, Inglaterra*) por 1 hora a 4°C y se tiñeron con DAPI por 1 minuto a temperatura ambiente. Los controles negativos consistieron en omitir el anticuerpo primario y omitir tanto anticuerpo primario como el secundario, usando en cambio Buffer Fosfato Salino (PBS)/Seroalbúmina Bovina (BSA). Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio confocal y fueron analizadas con el software Leica LAS X (*Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania*).

Expresión de los mRNA de las citoquinas Th1, Th17 y Tregs y de RANKL y OPG en las lesiones periodontales Los niveles de expresión de mRNA de IFN- γ , IL-1 β y TNF- α (Th1), IL-6, IL-17A e IL-23 (Th17), IL-10, IL-35 EBI3 y TGF- β 1

(Treg), RANKL y OPG se analizaron mediante qPCR. Para ello, las biopsias de las lesiones periodontales fueron homogenizadas en 1 ml de Trizol (*TRIZOL Plus; Invitrogen, Barcelona, España*) para la obtención del RNA citoplasmático total, tal como fue descrito previamente (Monasterio y cols., 2018). Después, las muestras se incubaron por 10 minutos a 4°C, se agregó 200 µL de cloroformo y se incubaron a 4°C durante 10 minutos, bajo agitación vigorosa. Luego se centrifugó a 12,000 xg durante 20 minutos y la fase acuosa se transfirió a un frasco libre de RNAasas. El RNA citoplasmático total se lavó con 1 mL de etanol al 75% y, finalmente, el RNA purificado se resuspendió en 10 µL de agua milli-Q libre de RNAasas para ser cuantificado. Luego de sintetizada la primera cadena de cDNA utilizando un kit de transcripción reversa (*SuperScript III; Invitrogen, Grand Island, NY, EE.UU.*), 10 ng de cDNA se amplificaron usando partidores de PCR específicos (Tabla 1). El protocolo de amplificación fue el siguiente: Un primer ciclo de 95°C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 3 segundos y 60°C por 30 segundos. Para la detección de productos inespecíficos, se realizó una curva de melting de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto y 95°C por 15 segundos. Como control endógeno, se cuantificaron los niveles de expresión de la subunidad 18S de rRNA.

Tabla 1: Partidores utilizados para la amplificación de mRNA de distintas citoquinas mediante qPCR.

Objetivo	Forward primer	Reverse primer
IFN- γ	GGAGGAACTGGCAAAGGAT	TTCAAGACTTCAAAGAGTCTGAGG
IL-1 β	AGTTGACGGACCCCAAAG	TTTGAAGCTGGATGCTCTCAT
TNF- α	CTGTAGCCCACGTCTAGC	TTGAGATCCATGCCGTTG
IL-6	TGATGGATGCTACCAAAGTGG	TTCATGTAAGTCCAGGTAGCTATGG
IL-17A	CAGGGAGAGCTTCATCTGTGT	GCTGAGCTTTGAGGGATGAT
IL-23	GAAGGGCAAGGACACCATTA	TTCTTCTTCTCCAGCTCCTTTC
IL-10	GCTTCATCCCTGAAAAGTGTG	TGCTACAAAGGCAGACAAACA
IL-35 EBI3	GCTCCCCTGGTTACTGAA	ACGGGATACCGAGAAGCAT
TGF- β 1	TGGAGCAACATGTGGAAGTCTC	GTCAGCAGCCGGTTACCA
RANKL	TGAAGACACACTACCTGACTCCTG	CCCACAATGTGTTGCAGTTC
OPG	GTTTCCCGAGGACCACAAT	CCATTCAATGATGTCCAGGAG
18S rRNA	GCAATTATTCCCCATGAACG	GGGACTTAATCAACGCAAGC

Producción de RANKL y OPG en el fluido crevicular gingival. Se obtuvieron muestras de fluido crevicular gingival usando un protocolo previamente descrito (*Matsuda et al., 2016*). Brevemente, luego de retirar la ligadura, se colocó un nuevo hilo de seda de 2 cm de longitud alrededor de los mismos molares. Después de 10 minutos se retiraron y se sumergieron las ligaduras en 100 μ l de solución fosfato salino pH 7,4 suplementado con Tween 20 al 0,05% durante 30 min a 4°C. Las muestras contaminadas con sangre fueron descartadas. Los niveles de RANKL y OPG se cuantificaron mediante ELISA usando kits específicos (*Quantikine, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, EE.UU.*).

RESULTADOS

1.- Cuantificación de la resorción ósea alveolar

La figura 1 muestra las imágenes representativas de los maxilares de animales afectados de periodontitis inoculados o no con IL-35 y de animales no inducidos, obtenidas mediante μ CT (Figura 1). Los animales inoculados con IL-35 presentaron menores niveles de resorción ósea, de manera dependiente de la dosis, en comparación con los animales afectados de periodontitis que no recibieron IL-35 (Figura 2). Los niveles de resorción ósea fueron similares entre las dosis de IL-35 2 μ g/100 μ L i.p. y 1 ng/ μ L i.g. de IL-35, y al mismo tiempo, estos niveles fueron menores que en animales no tratados afectados de periodontitis (Figura 2).

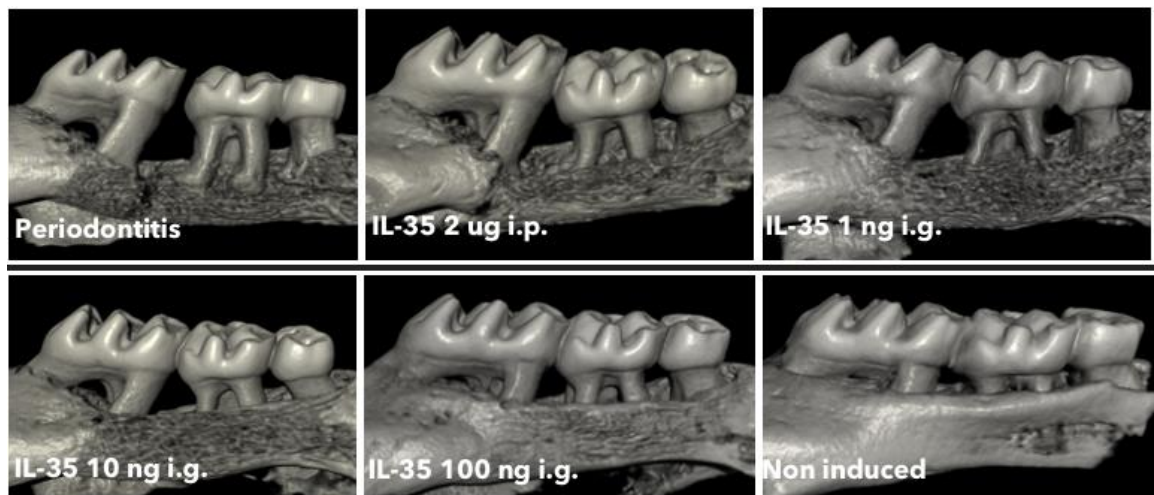


Figura 1. Resorción ósea alveolar. Imágenes representativas de μ CT de ratones afectados de periodontitis sin tratamiento, ratones con inoculación i.p. de IL-35 2 ug /100 μ L, inoculación i.g. de IL-35 (1 ng/ μ L, 10 ng/ μ L, 100 ng/ μ L) y ratones no inducidos (n.i.).

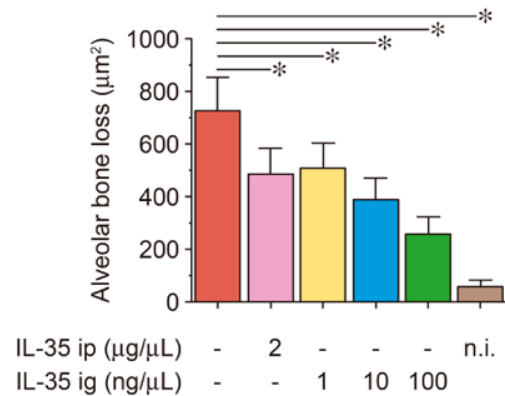


Figura 2. Cuantificación del área ósea perdida. Área de pérdida de hueso alveolar de ratones afectados de periodontitis sin tratamiento, con inoculación i.p. de IL-35 2 ug /100 µL, inoculación i.g. de IL-35 (1 ng/µL, 10 ng/µL, 100 ng/µL) y ratones no inducidos (n.i.), cuantificados mediante µCT. Los datos son presentados como µm² y se muestran como media± desviación estándar (DE) de 8 experimentos independientes. **p* < 0,05.

2.- Expresión de RANKL y OPG.

Los niveles de expresión y secreción de RANKL detectados en las lesiones periodontales y el fluido crevicular mediante qPCR y ELISA, respectivamente, fueron significativamente menores y; al contrario, los niveles de expresión y secreción de OPG fueron significativamente mayores en los ratones tratados con IL-35 comparados con los ratones no tratados, de manera dependiente de la dosis (Figura 3 y 4). De manera similar, el tratamiento con IL-35 indujo una menor inmuno-detección de RANKL y mayor para OPG en las lesiones periodontales (Figura 5).

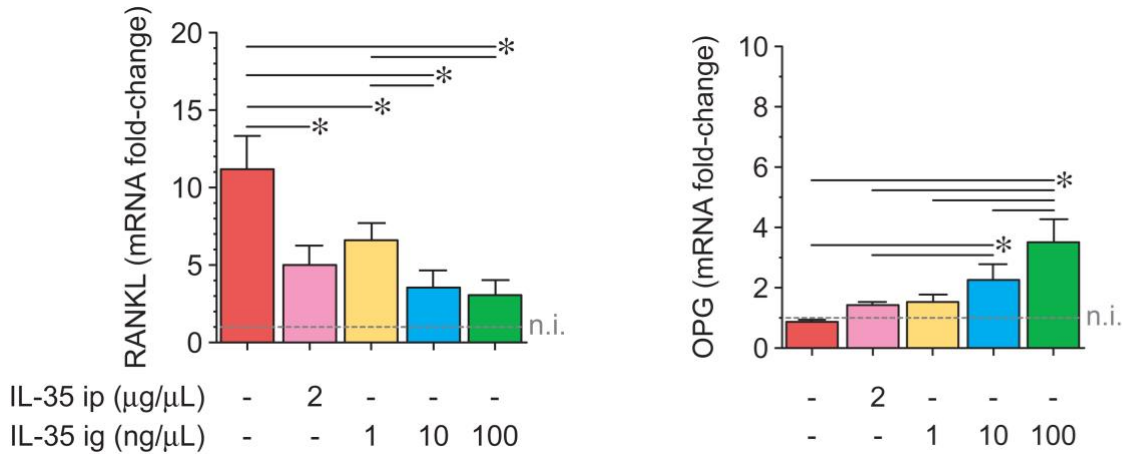


Figura 3. Niveles de expresión de RANKL y OPG. Expresión de mRNA de RANKL y OPG en lesiones periodontales de ratones afectados de periodontitis sin tratamiento, con inoculación i.p. de IL-35 2 ug /100 µL, inoculación i.g. de IL-35 (1 ng/µL, 10 ng/µL, 100 ng/µL) y ratones no inducidos (n.i.). Para la expresión relativa, la expresión de RANKL y OPG en ratones no inducidos (n.i.) fue considerada como “1”, siendo referencia *de fold-change* de la expresión. Los datos son presentados como mRNA *fold change* y se muestran como media ± DE de 8 experimentos independientes. * $p < 0,05$

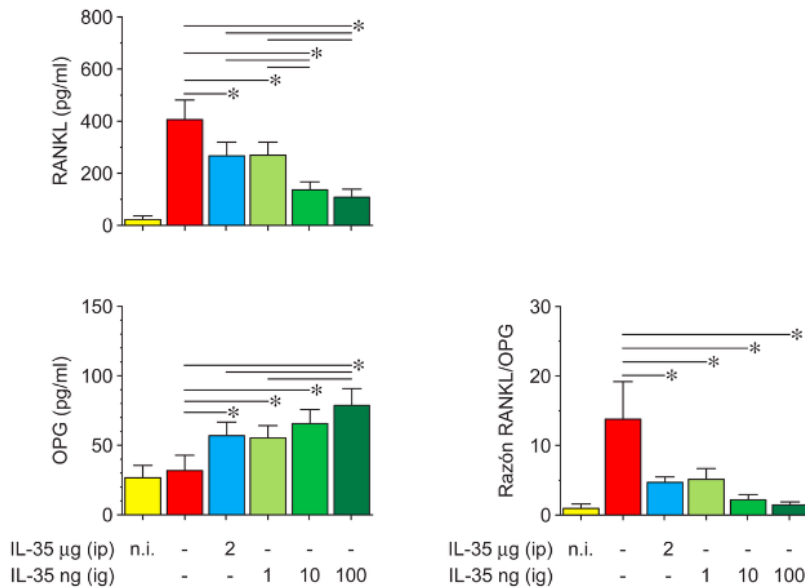


Figura 4. Secreción de RANKL y OPG. Niveles de RANKL, OPG y razón RANKL/OPG detectados en fluido crevicular gingival de ratones afectados de periodontitis sin tratamiento, con inoculación i.p. de IL-35 2 ug /100 µL, inoculación i.g. de IL-35 (1 ng/µL, 10 ng/µL, 100 ng/µL) y ratones no inducidos (n.i.). Los datos son presentados como pg/mL y se muestran como media ± DE de 8 experimentos independientes. * $p < 0,05$

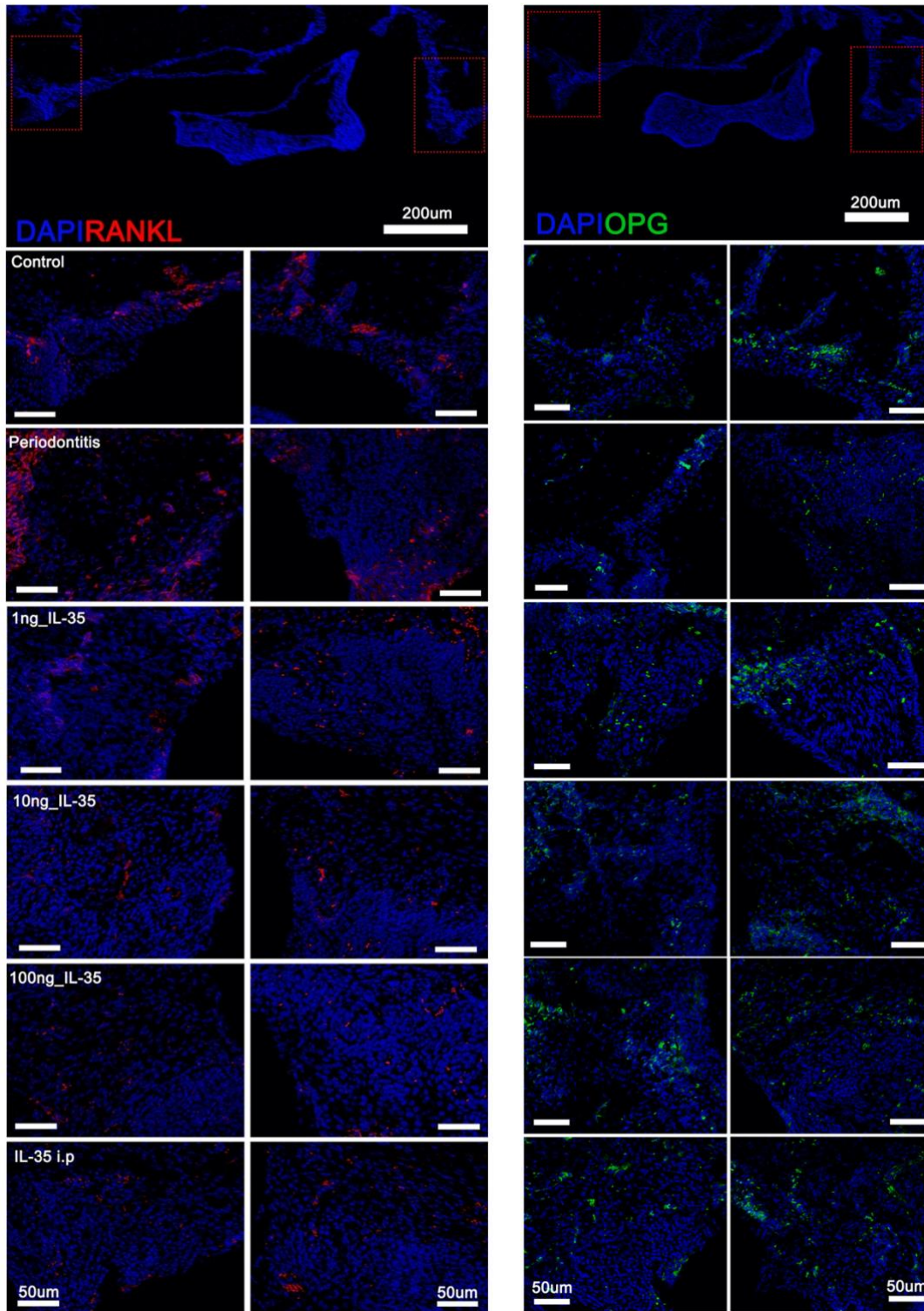


Fig 5. Detección de RANKL y OPG: Imágenes representativas de lesiones periodontales obtenidas mediante microscopia confocal que muestran la inmunopositividad para RANKL (rojo), OPG (verde) y DAPI (azul), para visualizar los núcleos, de ratones afectados de periodontitis sin tratamiento, con inoculación i.p. de IL-35 2 μg /100 μL , inoculación i.g. de IL-35 (1 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$) y ratones no inducidos (n.i.). Barra = 50 μm .

3.- Expresión de mRNA de citoquinas Th1, Th17 y Treg.

La inoculación con IL-35 disminuyó la expresión en conjunto de los mRNA de citoquinas asociadas al perfil Th1 (IL-1 β , IFN- γ y TNF- α) y Th17 (IL-6, IL-17A e IL-23), de manera dependiente de la dosis. Los niveles de expresión de IL-6 e IL-17A presentaron una diferencia mayor entre las concentraciones de 1 y 10 ng/ μ L intragingival. Además, se obtuvieron niveles de expresión similares de TNF- α y de IL-1 β en los grupos que recibieron IL-35 2 μ g/100 μ L i.p. y 1 ng/ μ L i.g. En contraparte, los niveles de expresión de las citoquinas Treg (IL-10, TGF- β 1 e IL-35 Ebi3), presentaron una mayor expresión en ratones inoculados con IL-35, también de manera dependiente de la dosis. Asimismo, se obtuvieron niveles similares de expresión de IL-10 y de TGF- β 1 en los grupos que recibieron IL-35 2 μ g /100 μ L i.p. y 1 ng/ μ L i.g.

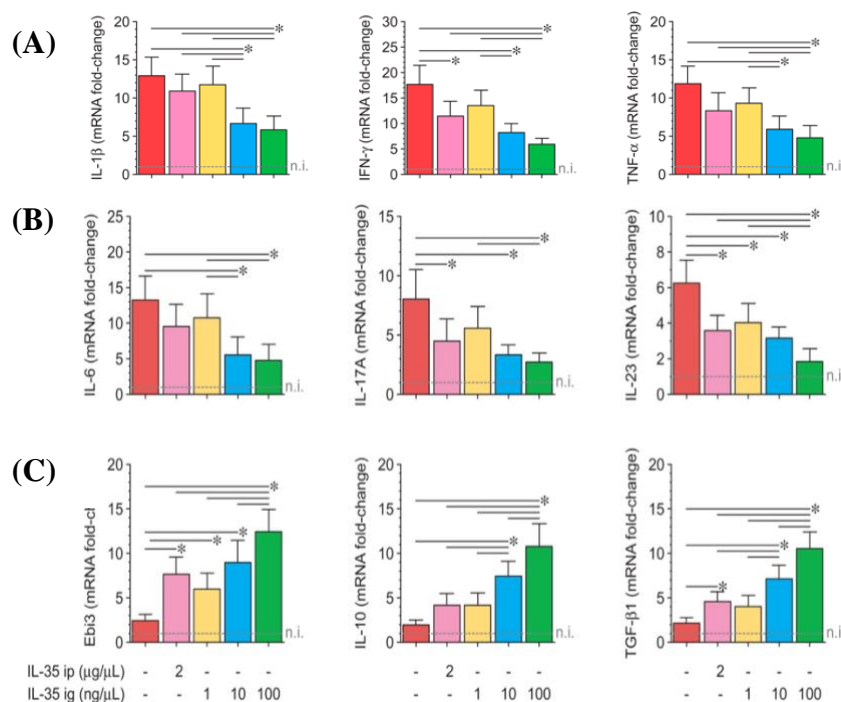


Figura 6. Expresión de citoquinas Th1, Th17 y Treg. Niveles de expresión de mRNA de citoquinas Th1 (A), Th17 (B) y Treg (C) en lesiones periodontales de ratones afectados de periodontitis sin tratamiento, con inoculación i.p. de IL-35 2 μ g /100 μ L, inoculación i.g. de IL-35 (1 ng/ μ L, 10 ng/ μ L, 100 ng/ μ L) y ratones no inducidos (n.i.). Para la expresión relativa, la expresión de citoquinas en los ratones no inducidos fue considerada como “1”, como referencia para “*fold-change*” de la expresión. Los datos son presentados como mRNA *fold-change* y se muestran como media \pm DE de 8 experimentos independientes. * $p < 0,05$.

DISCUSIÓN

Durante la periodontitis, existe una respuesta inmuno-inflamatoria desregulada frente a la disbiosis del microbioma subgingival, caracterizada por la sobre-expresión de RANKL y la activación de osteoclastos mediada por la actividad de los linfocitos Th17, lo que finalmente provoca la resorción ósea patológica alrededor de los dientes (Tsukasaki y cols., 2018). Contrariamente, la actividad de los linfocitos Treg contribuye a la regulación de la homeostasis e inhibición de la osteoclastogénesis, mediante la producción de citoquinas con acción antiinflamatoria como IL-35 y osteo-protectora como OPG (Dutzan y cols., 2009) (Joosten y Ottenhoff, 2008). Sin embargo, se ha detectado una pérdida de la expresión de *Foxp3*, el factor de transcripción canónico de los Treg asociado a su actividad reguladora, y una disminución de la actividad de los Treg durante la periodontitis, debido posiblemente al ambiente inflamatorio. Esto podría inducir un posible cambio fenotípico de los Treg, volviéndolos pro-inflamatorios y productores de RANKL, lo que favorecería aún más el desbalance Th17/Treg y la resorción ósea (Tsukasaki y cols., 2018). En el presente estudio, la inoculación con IL-35 inhibió la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y osteo-destructivas correspondientes a los perfiles linfocitarios Th1 y Th17 y favoreció la expresión de citoquinas osteo-protectoras asociadas al perfil Treg, resultando en la restauración del balance RANKL/OPG y en la inhibición de la resorción ósea.

El balance RANKL/OPG se encuentra alterado en pacientes afectados de periodontitis; sin embargo, ésta razón no se reduce ni se recupera luego de recibir una terapia periodontal inicial, siendo indicativo de que los mecanismos moleculares asociados con la resorción ósea no son eliminados y que existe un riesgo potencial de una mayor resorción ósea en el futuro (Buduneli y Kinane, 2011). Esto resalta la necesidad de considerar el estudio de terapias complementarias capaces de recuperar el balance RANKL/OPG, por ejemplo, mediante la supresión de células que promuevan la sobre-expresión de RANKL, como los linfocitos Th17 (Belibasakis y Bostanci, 2012). En un modelo experimental de artritis reumatoide, la inoculación con IL-35 suprimió la actividad

de los linfocitos Th17, atenuando las manifestaciones clínicas de la enfermedad (Wirtz y cols., 2011). Además, la capacidad de IL-35 de disminuir los niveles de expresión de citoquinas asociadas al fenotipo Th17, como IL-6, IL-17A y RANKL, concuerda también con los resultados del estudio *in vitro* realizado por Shindo & cols (2019), donde IL-35 inhibió la producción de IL-6 e IL-8 por células de ligamento periodontal estimuladas con IL-17A, además de inhibir la señalización intracelular NF- κ B, de la cual depende la expresión de RANKL (Shindo y cols., 2019). En este contexto, Niedbala y cols (2007) reportaron en otro modelo experimental de artritis reumatoide, que la inoculación de IL-35 vía intraperitoneal indujo una menor producción de IL-17A y mayores niveles de IL-10 e IFN- γ en células del bazo, atenuando los signos clínicos asociados al progreso de la enfermedad (Niedbala y cols., 2007). En concordancia con estos estudios, en lesiones periodontales, la inoculación de IL-35 en animales afectados de periodontitis fue capaz de disminuir la expresión de citoquinas Th17 y de recuperar el balance RANKL/OPG, disminuyendo la expresión y producción de RANKL y aumentando la expresión y producción de OPG.

Además de inhibir la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y osteodestructivas, el efecto supresor de IL-35 se potencia al inducir la diferenciación de células iT_{reg} productoras de IL-35 (Collison y cols., 2012). Estas células aumentan la disponibilidad de IL-35 en los tejidos periodontales, favoreciendo aún más la respuesta linfocitaria T_{reg} mediante la expresión de sus citoquinas con acción inmunoreguladora y osteoprotectora y mediante la supresión de la respuesta Th17.

La presencia de IL-35 se ha detectado en la sangre, el fluido crevicular y la encía de pacientes afectados de periodontitis (Kalburgi ., 2013; Jin y cols., 2017). En este sentido, los niveles de IL-35 correlacionan negativamente con los niveles de IL-17A (Mitani y cols., 2015) y con los signos clínicos de inflamación periodontal (Jin y cols., 2017), pudiendo indicar un rol protector, lo que concuerda con los resultados obtenidos en este estudio, donde la inoculación de IL-35 inhibió significativamente la pérdida de hueso alveolar mediante la inhibición de la expresión de citoquinas con acción osteo-destructiva y mediante el aumento de

citoquinas con acción osteo-protectora. Así, este es el primer estudio en el que se analiza el potencial efecto terapéutico de IL-35 en un modelo experimental de periodontitis, detectándose la inhibición de la resorción ósea, ya que devuelve el balance Th17/Treg y en consecuencia el balance RANKL//OPG que se encuentra alterado durante la periodontitis experimental.

En términos generales, la inoculación con IL-35 podría considerarse como un potencial tratamiento inmunoregulador para la periodontitis, coadyuvante a la remoción mecánica y química de la biopelícula bacteriana. Si bien nuestros resultados sugieren el efecto inhibitor de la resorción ósea de IL-35 en periodontitis, se requieren más estudios que evalúen su posible aplicación a concentraciones seguras para producir el efecto deseado en humanos. Además, para su uso en humanos, se deberá evaluar una manera de administración farmacéutica eficaz y que logre la mayor adherencia al tratamiento; por ejemplo, disminuyendo el número de inoculaciones de la molécula, pero logrando la misma concentración efectiva dentro de los tejidos periodontales. No obstante, los estudios que proponen el uso terapéutico de IL-35 son relativamente pocos y los mecanismos de acción por los cuales logra su efecto inmunoregulador no están completamente dilucidados, la inoculación con IL-35 demuestra un alto potencial para controlar la inflamación y la resorción ósea patológica durante la periodontitis.

CONCLUSIONES

1. La inoculación con IL-35 inhibe la resorción ósea durante la periodontitis experimental.
2. La inoculación con IL-35 disminuye la expresión y producción de RANKL y aumenta la expresión y producción de OPG, devolviendo el balance RANKL/OPG durante la periodontitis experimental.
3. La inoculación con IL-35 disminuye la expresión de mRNA de citoquinas asociadas al perfil linfocitario Th1 y Th17 y aumenta la expresión de mRNA de citoquinas asociadas al fenotipo Treg durante la periodontitis experimental

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, A. K., Murphy, K. M., & Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383(6603), 787-93.

Abe, T., & Hajishengallis, G. (2013). Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *J Immunol Methods*, 394(1-2), 49-54.

Acosta-Rodriguez, E. V., Napolitani, G., Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2007). Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol*, 8(9), 942-9.

Adibrad, M., Deyhimi, P., Ganjalikhani Hakemi, M., Behfarnia, P., Shahabuei, M., & Rafiee, L. (2012). Signs of the presence of Th17 cells in chronic periodontal disease. *J Periodontal Res*, 47(4), 525-31.

Alvarez, C., Rojas, C., Rojas, L., Cafferata, E. A., Monasterio, G., & Vernal, R. (2018). Regulatory T Lymphocytes in Periodontitis: A Translational View. *Mediators Inflamm*, 2018, 7806912..

Anandarajah, A. P., & Schwarz, E. M. (2006). Anti-RANKL therapy for inflammatory bone disorders: Mechanisms and potential clinical applications. *J Cell Biochem*, 97(2), 226-32.

Belibasakis, G. N., & Bostanci, N. (2012). The RANKL-OPG system in clinical periodontology. *J Clin Periodontol*, 39(3), 239-48.

Bruzzaniti, A., & Baron, R. (2006). Molecular regulation of osteoclast activity. *Rev Endocr Metab Disord*, 7(1-2), 123-39.

Buduneli, N., & Kinane, D. F. (2011). Host-derived diagnostic markers related to soft tissue destruction and bone degradation in periodontitis. *J Clin Periodontol*, 38 Suppl 11, 85-105.

Cheng, W. C., Hughes, F. J., & Taams, L. S. (2014). The presence, function and regulation of IL-17 and Th17 cells in periodontitis. *J Clin Periodontol*, 41(6), 541-9.

Cochran, D. L. (2008). Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol*, 79(8 Suppl), 1569-76.

Collison, L. W., Chaturvedi, V., Henderson, A. L., Giacomini, P. R., Guy, C., Bankoti, J., et al. (2010). IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat Immunol*, 11(12), 1093-101.

Collison, L. W., Delgoffe, G. M., Guy, C. S., Vignali, K. M., Chaturvedi, V., Fairweather, D., et al. (2012). The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional. *Nat Immunol*, 13(3), 290-9.

Corrêa, J. D., Madeira, M. F., Resende, R. G., Correia-Silva, J. e. F., Gomez, R. S., de Souza, D. a. G., et al. (2012). Association between polymorphisms in interleukin-17A and -17F genes and chronic periodontal disease. *Mediators Inflamm*, 2012, 846052.

de Rezende, L. C., Silva, I. V., Rangel, L. B., & Guimarães, M. C. (2010). Regulatory T cell as a target for cancer therapy. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 58(3), 179-90.

Dutzan, N., Gamonal, J., Silva, A., Sanz, M., & Vernal, R. (2009). Over-expression of forkhead box P3 and its association with receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand, interleukin (IL) -17, IL-10 and transforming growth factor-beta during the progression of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, 36(5), 396-403.

Dutzan, N., Kajikawa, T., Abusleme, L., Greenwell-Wild, T., Zuazo, C. E., Ikeuchi, T., et al. (2018). A dysbiotic microbiome triggers T. *Sci Transl Med*, 10(463).

Gao, P., Su, Z., Lv, X., & Zhang, J. (2017). Interleukin-35 in Asthma and Its Potential as an Effective Therapeutic Agent. *Mediators Inflamm*, 2017, 5931865.

Garlet, G. P., Cardoso, C. R., Mariano, F. S., Claudino, M., de Assis, G. F., Campanelli, A. P., et al. (2010). Regulatory T cells attenuate experimental periodontitis progression in mice. *J Clin Periodontol*, 37(7), 591-600.

Gonzales, J. R. (2015). T- and B-cell subsets in periodontitis. *Periodontol 2000*, 69(1), 181-200.

Graves, D. T., Oates, T., & Garlet, G. P. (2011). Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol*, 3.

Hajishengallis, G. (2015). Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol*, 15(1), 30-44.

Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M., et al. (2005). Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*, 6(11), 1123-32.

Ivanov, I. I., McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelley, A., Lafaille, J. J., et al. (2006). The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell*, 126(6), 1121-33.

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.

Joosten, S. A., & Ottenhoff, T. H. (2008). Human CD4 and CD8 regulatory T cells in infectious diseases and vaccination. *Hum Immunol*, 69(11), 760-70.

Kalburgi, N. B., Muley, A., Shivaprasad, B. M., & Koregol, A. C. (2013). Expression profile of IL-35 mRNA in gingiva of chronic periodontitis and aggressive periodontitis patients: a semiquantitative RT-PCR study. *Dis Markers*, 35(6), 819-23.

Kikuta, J., Wada, Y., Kowada, T., Wang, Z., Sun-Wada, G. H., Nishiyama, I., et al. (2013). Dynamic visualization of RANKL and Th17-mediated osteoclast function. *J Clin Invest*, 123(2), 866-73.

Kitoh, A., Ono, M., Naoe, Y., Ohkura, N., Yamaguchi, T., Yaguchi, H., et al. (2009). Indispensable role of the Runx1-Cbfbeta transcription complex for in vivo-suppressive function of FoxP3+ regulatory T cells. *Immunity*, 31(4), 609-20.

Li, X., Mai, J., Virtue, A., Yin, Y., Gong, R., Sha, X., et al. (2012). IL-35 is a novel responsive anti-inflammatory cytokine--a new system of categorizing anti-inflammatory cytokines. *PLoS One*, 7(3), e33628.

Liberal, R., Grant, C. R., Longhi, M. S., Mieli-Vergani, G., & Vergani, D. (2015). Regulatory T cells: Mechanisms of suppression and impairment in autoimmune liver disease. *IUBMB Life*, 67(2), 88-97.

Liu, J. Q., Liu, Z., Zhang, X., Shi, Y., Talebian, F., Carl, J. W., et al. (2012). Increased Th17 and regulatory T cell responses in EBV-induced gene 3-deficient mice lead to marginally enhanced development of autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 188(7), 3099-106.

Matsuda, S., Movila, A., Suzuki, M., Kajiya, M., Wisitrasameewong, W., Kayal, R., et al. (2016). A novel method of sampling gingival crevicular fluid from a mouse model of periodontitis. *J Immunol Methods*, 438, 21-25.

McGrath, E. E. (2011). OPG/RANKL/RANK pathway as a therapeutic target in cancer. *J Thorac Oncol*, 6(9), 1468-73.

Miossec, P., & Kolls, J. K. (2012). Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nat Rev Drug Discov*, 11(10), 763-76.

Mitani, A., Niedbala, W., Fujimura, T., Mogi, M., Miyamae, S., Higuchi, N., et al. (2015). Increased expression of interleukin (IL)-35 and IL-17, but not IL-27, in gingival tissues with chronic periodontitis. *J Periodontol*, 86(2), 301-9.

Monasterio, G., Castillo, F., Ibarra, J. P., Guevara, J., Rojas, L., Alvarez, C., et al. (2018). Alveolar bone resorption and Th1/Th17-associated immune response triggered during *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced experimental periodontitis are serotype-dependent. *J Periodontol*, 89(10), 1249-1261.

Mullen, A. C., High, F. A., Hutchins, A. S., Lee, H. W., Villarino, A. V., Livingston, D. M., et al. (2001). Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science*, 292(5523), 1907-10.

Nakajima, T., Ueki-Maruyama, K., Oda, T., Ohsawa, Y., Ito, H., Seymour, G. J., et al. (2005). Regulatory T-cells infiltrate periodontal disease tissues. *J Dent Res*, 84(7), 639-43.

Niedbala, W., Wei, X. Q., Cai, B., Hueber, A. J., Leung, B. P., McInnes, I. B., et al. (2007). IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *Eur J Immunol*, 37(11), 3021-9.

Okamoto, K., & Takayanagi, H. (2011). Regulation of bone by the adaptive immune system in arthritis. *Arthritis Res Ther*, 13(3), 219.

Okamoto, K., & Takayanagi, H. (2019). Osteoimmunology. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 9(1).

Okui, T., Aoki, Y., Ito, H., Honda, T., & Yamazaki, K. (2012). The presence of IL-17+/FOXP3+ double-positive cells in periodontitis. *J Dent Res*, 91(6), 574-9.

Park, C. H., Abramson, Z. R., Taba, M., Jin, Q., Chang, J., Kreider, J. M., et al. (2007). Three-dimensional micro-computed tomographic imaging of alveolar bone in experimental bone loss or repair. *J Periodontol*, 78(2), 273-81.

Sawant, D. V., Hamilton, K., & Vignali, D. A. (2015). Interleukin-35: Expanding Its Job Profile. *J Interferon Cytokine Res*, 35(7), 499-512.

Shindo, S., Hosokawa, Y., Hosokawa, I., & Shiba, H. (2019). Interleukin (IL)-35 Suppresses IL-6 and IL-8 Production in IL-17A-Stimulated Human Periodontal Ligament Cells. *Inflammation*, 42(3), 835-840.

Teitelbaum, S. L. (2000). Bone resorption by osteoclasts. *Science*, 289(5484), 1504-8.

Tsukasaki, M., Komatsu, N., Nagashima, K., Nitta, T., Pluemsakunthai, W., Shukunami, C., et al. (2018). Host defense against oral microbiota by bone-damaging T cells. *Nat Commun*, 9(1), 701.

van Hamburg, J. P., Asmawidjaja, P. S., Davelaar, N., Mus, A. M., Colin, E. M., Hazes, J. M., et al. (2011). Th17 cells, but not Th1 cells, from patients with early rheumatoid arthritis are potent inducers of matrix metalloproteinases and proinflammatory cytokines upon synovial fibroblast interaction, including autocrine interleukin-17A production. *Arthritis Rheum*, 63(1), 73-83.

Vernal, R., Dutzan, N., Chaparro, A., Puente, J., Antonieta Valenzuela, M., & Gamonal, J. (2005). Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in

supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, 32(4), 383-9.

Vernal, R., Dutzan, N., Hernández, M., Chandía, S., Puente, J., León, R., et al. (2006). High expression levels of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand associated with human chronic periodontitis are mainly secreted by CD4+ T lymphocytes. *J Periodontol*, 77(10), 1772-80.

Vernal, R., & Garcia-Sanz, J. A. (2008). Th17 and Treg cells, two new lymphocyte subpopulations with a key role in the immune response against infection. *Infect Disord Drug Targets*, 8(4), 207-20.

Vignali, D. A., & Kuchroo, V. K. (2012). IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat Immunol*, 13(8), 722-8.

Wang, M., Tian, T., Yu, S., He, N., & Ma, D. (2013). Th17 and Treg cells in bone related diseases. *Clin Dev Immunol*, 2013, 203705.

Wirtz, S., Billmeier, U., Mchedlidze, T., Blumberg, R. S., & Neurath, M. F. (2011). Interleukin-35 mediates mucosal immune responses that protect against T-cell-dependent colitis. *Gastroenterology*, 141(5), 1875-86.

Yago, T., Nanke, Y., Kawamoto, M., Kobashigawa, T., Yamanaka, H., & Kotake, S. (2017). IL-23 and Th17 Disease in Inflammatory Arthritis. *J Clin Med*, 6(9).

Yang, J., Yang, M., Htut, T. M., Ouyang, X., Hanidu, A., Li, X., et al. (2008). Epstein-Barr virus-induced gene 3 negatively regulates IL-17, IL-22 and RORgamma t. *Eur J Immunol*, 38(5), 1204-14.

Yao, Z., Fanslow, W. C., Seldin, M. F., Rousseau, A. M., Painter, S. L., Comeau, M. R., et al. (1995). Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity*, 3(6), 811-21.

