



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

**“Asociación entre el desbalance de los linfocitos Treg/Th17 y la
progresión de la resorción ósea durante la periodontitis”**

María Elena Vega Reyes

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

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Rolando Vernal Astudillo

TUTORAS EXPERTAS

Dra. Carla Álvarez Rivas

Dra. Carolina Rojas Pérez

Adscrito a Proyecto FONDECYT 1181780

Santiago – Chile

2019



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

**“Asociación entre el desbalance de los linfocitos Treg/Th17 y la
progresión de la resorción ósea durante la periodontitis”**

María Elena Vega Reyes

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Rolando Vernal Astudillo

TUTORAS EXPERTAS

Dra. Carla Álvarez Rivas

Dra. Carolina Rojas Pérez

Adscrito a Proyecto FONDECYT 1181780

Santiago – Chile

2019

Agradecimientos

A mis madres las Marías Elenas, eternas guerreras de la vida, mujeres luchadoras, mujeres ejemplares. Gracias por el apoyo y amor incondicional, por ustedes soy lo que soy, por ustedes sigo y seguiré creciendo. Gracias por lo enseñado, por la entrega a diario, lo han dado todo. No todos tenemos la suerte de tener 2 madres, gracias, por tanto.

A mi familia, tías, primos, hermanos de corazón, a Darwin. Gracias por demostrarme siempre que todo es posible, gracias por los consejos, por no dejar que me rindiera antes de tiempo. Les juro que cada abrazo, cada palabra de aliento valieron la pena, ustedes son parte de este logro también.

A Iván, por el inmenso amor y comprensión día a día desde que nos conocemos. No han sido años fáciles y hemos sabido estar para el otro incondicionalmente. Gracias por levantarme el ánimo en mis peores momentos, por darme el valor una y otra vez de luchar por mis metas, por hablarme con la verdad siempre. Gracias por estar en mis mejores momentos también, por ser un increíble compañero de vida, por entregarme una familia nueva que adoro, la calidez de tu tierra los hace diferentes y únicos. Gracias infinitas.

A mis amigos y amigas, universitarios, del colegio y a los de la vida. Gracias por su sincera amistad, por las personas maravillosas que son y en que se siguen convirtiendo día a día y que me hacen sentir orgullosa. No dimensionan el valor que tienen para mí todas esas conversaciones, risas y penas compartidas; tener la complicidad que tengo con cada uno de ustedes, es impagable. Me gustaría nombrarlos a todos, pero afortunadamente son muchos. Gracias totales.

A la Dani, Daniela Poblete. Mención especial a quién ayudó a ponerle fin a esta etapa que parecía interminable. Gracias por los conocimientos entregados, por la ayuda diaria desde que trabajamos juntas, por los momentos compartidos, por todos esos té y cafecitos en tu oficina. Gracias por ser la excelente persona que eres, gracias por tu amistad.

A mis tutores, el doctor Rolando Vernal Astudillo, Carla Álvarez Rivas y Carolina Rojas Pérez. Gracias por guiarme en este proceso, por todo el conocimiento entregado y los momentos compartidos. Aprendí y crecí muchísimo con cada uno de ustedes.

A lo largo de estos 7 años he estado acompañada de una manera inesperada. He conocido gente increíble, gente que se ha querido quedar y ser parte de mi vida y compartir

conmigo a diario. Si hay algo que le agradezco a la Odontología es la familia que me entregó, la calidad humana de amigos, amigas y profesores. Gracias hoy y siempre.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Resorción ósea alveolar durante las periodontitis	1
1.2	Linfocitos Th17.....	2
1.3	Linfocitos Tregs	3
1.4	Desbalance Th17/Treg durante las periodontitis.....	5
1.5	Modelos animales de periodontitis experimental.....	6
1.6	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	7
2.	HIPÓTESIS	8
3.1	OBJETIVO GENERAL.....	8
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
4.	METODOLOGÍA.	9
4.1	Inducción de la periodontitis experimental	9
4.2	Análisis de la resorción ósea: Micro-CT y SEM	9
4.3	Obtención de las muestras de mucosa palatina y purificación de RNA citoplasmático	11
4.4	Síntesis de la primera cadena de cDNA y Qpcr	11
4.5	Obtención de una suspensión celular a partir de linfonodos cervicales y bazo	12
4.6	Análisis mediante citometría de flujo	13
4.7	Análisis de datos.....	14
5.	RESULTADOS.....	15
5.1	Estandarización del modelo murino de periodontitis inducida por ligadura. 15	
5.2	Progresión de la resorción ósea alveolar en periodontitis experimental.....	17

5.3 Expresión de mRNA de IL-2, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-17F, TGF- β 1, RANK-L, CD25 α , CTLA-4, GITR y los factores de transcripción Foxp3 y ROR γ t. 20	
5.4 Detección de linfocitos Th17IL-17 ⁺ en linfonodos cervicales (CLn) mediante citometría de flujo.	24
5.5 Detección de linfocitos Treg en linfonodos cervicales (CLn) y bazo mediante citometría de flujo.	26
5.6 Detección de linfocitos Treg productores de IL-17 en linfonodos cervicales (CLn).	28
6. DISCUSIÓN	30
7. CONCLUSIONES	33
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

RESUMEN

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica de etiología multifactorial asociada a la disbiosis de la biopelícula subgingival. Las complejas interacciones entre esta biopelícula subgingival disbiótica y el sistema inmune del hospedero inducen una respuesta inmuno-inflamatoria crónica y desregulada, que resulta en la destrucción progresiva de los tejidos de inserción de los dientes: ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar. La resorción ósea alveolar es la característica distintiva de la periodontitis y el factor determinante de la pérdida dentaria, y la respuesta inmuno-inflamatoria del hospedero está directamente involucrada en los procesos osteo-destructivos periodontales. En particular, el desbalance de dos subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ (los linfocitos Th17 productores de IL-17A y RANK-L y los linfocitos T reguladores (Tregs) productores de IL-10 y TGF-β1) es clave en la pérdida del equilibrio entre la resorción y la formación del hueso alveolar. Sin embargo, los cambios en el balance Th17/Treg no han sido totalmente descritos durante la progresión de la destrucción tisular periodontal.

El objetivo de este estudio fue determinar la respuesta de los linfocitos Th17 y Tregs en las lesiones periodontales y su asociación con la progresión de la resorción ósea durante la periodontitis. Con este propósito, se utilizó el modelo animal de periodontitis experimental inducida mediante ligadura durante 5, 10 y 15 días. Como controles negativos, se analizaron animales sanos. La progresión de la pérdida de hueso alveolar se analizó mediante micro-tomografía computarizada y microscopía electrónica de barrido. En las lesiones periodontales progresivas, se analizaron los niveles de expresión de los mRNA de IL-2, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-17F, RANK-L, TGF-β1, CD25 α , CTLA-4, GITR, Foxp3 y ROR γ t mediante qPCR. Además, en los linfonodos cervicales y el bazo, mediante citometría de flujo, se cuantificaron las células CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ (Tregs), CD4⁺CD25⁺ROR γ t⁺ (linfocitos Th17) y CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺IL-17A⁺ (Tregs que han sufrido plasticidad a linfocitos T productores de IL-17A).

Durante la progresión de la periodontitis experimental, se observó un incremento en la expresión de las citoquinas y factores de transcripción asociados a los perfiles linfocitarios Th17 y Treg. Por otro lado, se detectó un aumento de linfocitos Th17 CD4⁺CD25⁺RORγt⁺, tanto en frecuencia como en número, y una disminución en la frecuencia de Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ en los linfonodos cervicales que drenan las lesiones periodontales. Además, se detectó el incremento de linfocitos T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺IL-17A⁺. Por lo tanto, existe un desbalance Treg/Th17 en las lesiones periodontales con resorción ósea alveolar progresiva, y este desbalance podría ser explicado, al menos en parte, por la inestabilidad fenotípica de los Tregs, los que expresan Foxp3, sin embargo, producen IL-17A.

1. INTRODUCCIÓN

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica que se caracteriza por la destrucción de los tejidos de soporte de los dientes: hueso alveolar, cemento radicular y ligamento periodontal. Como consecuencia de esta destrucción tisular, se manifiestan los signos clínicos de la enfermedad: pérdida de inserción clínica, formación del saco periodontal y, en última instancia, pérdida de los dientes (Papapanou, Sanz y cols., 2018).

La periodontitis es una patología de etiología compleja y multifactorial. Aun así, el pre-requisito central para el inicio y progresión de la periodontitis es la disbiosis de la biopelícula sub-gingival (Hajishengallis, 2015). En este contexto, la patogenicidad de la biopelícula sub-gingival se debe al cambio ecológico entre las comunidades microbianas que la componen, las cuales inducen una respuesta inmuno-inflamatoria crónica y desregulada en el hospedero (Lamont y Hajishengallis, 2015). Así, si bien el componente microbiano es fundamental y necesario para iniciar y perpetuar la periodontitis, es la respuesta inmuno-inflamatoria del hospedero la que determina la destrucción tisular y, por tanto, el inicio y progresión de la enfermedad (Hajishengallis y Korostoff, 2017).

1.1 Resorción ósea alveolar durante las periodontitis

La resorción ósea alveolar es la característica distintiva la periodontitis y la respuesta inmuno-inflamatoria desplegada por el hospedero ante la biopelícula subgingival disbiótica está directamente involucrada en los procesos osteo-destructivos periodontales, mediante mecanismos celulares y moleculares circunscritos en el ámbito de la osteo-inmunología (Kajiyu, Giro y cols., 2010; Hienz, Paliwal, y cols., 2015).

En condiciones patológicas, la pérdida del equilibrio entre la formación y la resorción del hueso alveolar se debe a la diferenciación desregulada de osteoclastos a partir de sus precursores hematopoyéticos de la línea monocito-macrófago (Teitelbaum, 2000). Durante esta diferenciación, los osteoclastos adquieren marcadores específicos, como la fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP, del inglés *tartate-resistant acid phosphatase*), se fusionan para formar

células gigantes multinucleadas y se polarizan al adherirse a la superficie ósea (Boyle, Simonet y cols., 2003). En este contexto, la diferenciación de los osteoclastos depende de señales moleculares clave, tal como la otorgada por el ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B (RANK-L, del inglés *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*). Así, múltiples mediadores pro-inflamatorios favorecen la diferenciación de osteoclastos mediada por RANK-L, tales como interleuquina (IL)-1 β , IL-6, IL-11, factor de necrosis tumoral (TNF)- α , TNF- β y prostaglandina (PG)E₂, particularmente en estados de osteólisis inflamatoria como ocurre durante la periodontitis (Hienz, Paliwal y cols., 2015).

RANK-L pertenece a la superfamilia de proteínas de TNF y genera su función al activar el receptor RANK, expresado por los precursores de osteoclastos y los osteoclastos maduros (Boyle, Simonet y cols., 2003). En condiciones fisiológicas, RANK-L y su factor bloqueante soluble llamado osteoprotegerina (OPG) son secretados por los osteoblastos, con el objetivo de mantener el balance entre la resorción y la formación de hueso alveolar de manera dependiente de la razón RANK-L/OPG. En condiciones patológicas, RANK-L es producido por fibroblastos, osteoblastos y osteocitos en respuesta a los mediadores pro-inflamatorios, en particular IL-1 β , IL-6 y IL-17A (Pacios, Xiao, y cols, 2015). Además, los linfocitos Th17 sobre-expresan RANK-L en condiciones patológicas, de tal manera que estas células se transforman en el determinante central de la diferenciación y activación de los osteoclastos en las lesiones periodontales activas al alterar de manera osteoblasto-independiente la razón RANK-L/OPG (Kawai, Matsuyama y cols., 2006; Tsukasaki y cols., 2018).

1.2 Linfocitos Th17

Los linfocitos Th17 son un subtipo de linfocito T CD4⁺ que se caracteriza distintivamente por la expresión del factor de transcripción RORC2 (ROR γ t en ratones) y la producción de IL-17A (Ivanov, McKenzie y cols., 2006). Los linfocitos Th17 cumplen un rol clave en la respuesta inmuno-inflamatoria del hospedero al inducir la generación de péptidos antibacterianos, reclutar neutrófilos y promover la inflamación local mediante la producción de citoquinas y quimioquinas, que contribuyen a la patogénesis de diversas enfermedades inflamatorias (Zenobia y

Hajishengallis, 2015). Los linfocitos Th17 se diferencian a partir de los linfocitos T CD4⁺ *naïve* en presencia de IL-6 y factor de crecimiento transformante (TGF)-β1 (Wang, Wang y cols., 2014). Poseen propiedades osteoclastogénicas debido a su capacidad de inducir la expresión de RANK-L por osteoblastos y células estromales, tal como fibroblastos del ligamento periodontal y fibroblastos gingivales (Tsukasaki y cols., 2018) y, principalmente, por expresar constitutivamente RANK-L y, por tanto, estimular directamente la diferenciación y activación de osteoclastos (Sato y cols., 2006).

En contraposición a las funciones de los linfocitos Th17, se describe otra subpoblación de linfocito T CD4⁺ conocido como linfocito T regulador (Treg). Los Tregs se especializan en mantener la homeostasis inmune mediante el control de las respuestas inmuno-inflamatorias efectoras a través la regulación y supresión de los linfocitos T, particularmente los linfocitos Th17 (Barbi, Pardoll y cols., 2014; Alroqi y Chatila, 2016).

1.3 Linfocitos Tregs

Los linfocitos Tregs cumplen un rol esencial en la tolerancia inmunológica, mediante la regulación de la interacción hospedero-microorganismo y la inducción de la reparación de los tejidos dañados durante las enfermedades (Barbi, Pardoll y cols., 2014; Alroqi y Chatila, 2016). Representan entre el 5 al 10% de las células circulantes T CD4⁺ totales y se caracterizan por expresar constitutivamente el receptor de IL-2, llamado CD25α, y su factor de transcripción característico Foxp3 (Alroqi y Chatila, 2016).

Foxp3 es el factor de transcripción maestro de los Tregs, debido a que su activación induce la expresión de los genes canónicos del perfil regulador, tales como CD25α, IL-10 y el antígeno-4 de linfocito T citotóxico (CTLA-4, del inglés *cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*); así, Foxp3 se utiliza como marcador específico de la población Treg (Hori y cols., 2017). Junto a Foxp3, para identificar a los Tregs se utilizan otros marcadores, tal como CD25α, CTLA-4, CD39, CD73, CCR4, CCR9 y/o el gen relacionado a la familia TNFR inducido por glucocorticoide (GITR, del inglés *glucocorticoid-induced TNFR family related gen*) (Garlet y cols, 2014; Liberal

y cols., 2015; Alroqi y Chatila, 2016), de tal manera que la diferente combinación de ellos contribuye a ratificar la función reguladora.

Desde un punto de vista funcional, los Tregs pueden suprimir la activación, proliferación y función de un amplio espectro de células inmunes, incluyendo linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, células natural killer (NK), células NK tipo T (NKT), linfocitos B, células presentadoras de antígenos y osteoclastos, motivo por el cual se les considera células inmunoreguladoras y osteo-protectoras (Zaiss y cols., 2007; Alroqi y Chatila, 2016). En este sentido, los Tregs ejercen su función reguladora mediante 4 mecanismos: 1) modulación de la maduración y función de células presentadoras de antígeno, 2) apoptosis de las células blanco, 3) disrupción metabólica de las células inflamatorias y 4) producción de mediadores inmuno-supresores (Liberal y cols., 2015).

En el contexto de los mediadores inmuno-supresores, los Tregs expresan en su superficie CTLA-4, que interactúa con los receptores CD80 y CD86 en las células presentadoras de antígeno y el receptor CD28 en los linfocitos T, inhibiendo su función (Walker y cols., 2013). CTLA-4 también induce la expresión de la enzima idoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) en las células dendríticas y los precursores de osteoclastos, la que cataliza la conversión de triptófano a kinurenina, provocando su apoptosis (Liberal y cols., 2015). La disrupción metabólica se debe a la alta expresión de CD25 α en los Tregs, por lo que compite con otras células T por el consumo de IL-2, provocando finalmente su apoptosis (Liberal y cols., 2015). Finalmente, los Tregs producen citoquinas anti-inflamatorias como TGF- β 1, IL-10 e IL-35, las cuales inhiben la diferenciación de osteoclastos y las respuestas pro-inflamatorias en las células inmunes, en especial los linfocitos Th17 (Garlet y cols., 2010a; Liberal y cols., 2015).

1.4 Desbalance Th17/Treg durante las periodontitis

La respuesta inmuno-inflamatoria desplegada ante la biopelícula disbiótica sub-gingival tiene por objetivo central proteger al hospedero de la infección. En este contexto, la cronicidad de la inflamación resulta en la destrucción de los tejidos periodontales, en particular el hueso alveolar (Garlet, 2010b). Estudios recientes han demostrado que los linfocitos Th17 son reclutados en los tejidos periodontales inflamados (Tsukasaki y cols., 2018); de manera similar, diferentes estudios evidencian el enriquecimiento de Tregs en tejidos periodontales infectados, identificados por la expresión de sus marcadores fenotípicos Foxp3, CTLA-4, IL-10, TGF- β 1 y GITR (Dutzan y Vernal, 2009; Nakajima y cols., 2005).

En términos generales, los Tregs cumplen un rol protector durante la periodontitis. Utilizando un modelo murino de periodontitis experimental inducida por inoculación oral de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, se inhibió la función de los Tregs mediante la inyección de anticuerpos anti-GITR (Garlet y cols., 2010a). Como resultado, los niveles de expresión de IL-10, TGF- β 1 y CTLA-4 fueron bajos, se incrementó la severidad de la periodontitis y aumentó la resorción del hueso alveolar (Garlet y cols., 2010a). En este contexto, el enriquecimiento de Tregs en los tejidos periodontales de pacientes con periodontitis se atribuyó al intento de contener la respuesta inmuno-inflamatoria desproporcionada (Dutzan y Vernal, 2009; Garlet, 2010b). Controversialmente, en las lesiones periodontales activas se detecta mayor expresión de mRNA de T-bet, RORC2, IL-17A, IL1 β , IFN- γ y RANK-L en comparación a lesiones inactivas, donde además existe un incremento en la expresión de mRNA de Foxp3, TGF- β 1 e IL-10 (Dutzan y Vernal, 2009). Por otro lado, se ha descrito que en lesiones periodontales con resorción ósea alveolar activa hay menor infiltración de linfocitos CD25⁺Foxp3⁺ (Okui y cols., 2012). Por tanto, se ha especulado que una fracción de los Tregs pierden sus propiedades inmunosupresoras debido al contexto periodontal inflamatorio en donde predomina IL-6 (Bettelli y cols., 2007). En efecto, se ha identificado una población de linfocitos Foxp3⁺IL-17A⁺ en las lesiones periodontales de pacientes con periodontitis, indicando una posible trans-diferenciación de Tregs hacia Th17 (Okui y cols., 2012). De hecho, usando un modelo de periodontitis experimental inducida por ligadura,

se demostró la existencia de células que pierden la expresión de Foxp3 para convertirse en células Th17 en las lesiones periodontales y que juegan un rol clave en la resorción ósea alveolar (Tsukasaki y cols., 2018).

1.5 Modelos animales de periodontitis experimental

En años recientes, se han utilizado diferentes modelos experimentales con el objetivo de estudiar los mecanismos involucrados en la resorción ósea alveolar durante las periodontitis y establecer propuestas terapéuticas innovadoras (Kantarci y Van Dyke, 2015). Entre ellos, desde un punto de vista microbiológico, el modelo de la periodontitis inducida por ligadura ha sido claramente definido (Abe y Hajishengallis, 2013). La técnica implica la colocación de una ligadura de seda (sutura 5.0) alrededor del segundo molar superior del animal, con el objetivo de favorecer la acumulación de placa bacteriana y provocar una disbiosis microbiana, cuya consecuencia es la formación de lesiones periodontales caracterizadas por inflamación y resorción ósea alveolar (Abe y Hajishengallis, 2013).

Una de las ventajas de esta técnica es la rapidez y predictibilidad del resultado obtenido, ya que en pocos días se genera la pérdida de hueso alveolar, signo patognomónico de la periodontitis experimental en murinos (Hajishengallis, 2014; Fontana y cols., 2018; Tsukasaki y cols., 2018). Cabe destacar que la técnica no genera trauma mecánico, por tanto, en un animal libre de microorganismos comensales no provoca inflamación ni osteodestrucción. Además, es un modelo que no requiere la utilización de microorganismos y sólo produce una respuesta local, a diferencia de otros modelos que inoculan oralmente bacterias periodontopatógenas (Abe y Hajishengallis, 2013). De esta manera, el modelo con ligadura es el que más se asemeja a la periodontitis en humanos y, por lo tanto, será utilizado en este estudio.

1.6 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La homeostasis asociada a salud periodontal requiere una respuesta inflamatoria regulada, en donde la presencia de Tregs es esencial para minimizar los daños tisulares colaterales inducidos por los linfocitos Th17 (Garlet, 2010b). Sin embargo, se ha descrito que en las lesiones periodontales con activa resorción ósea alveolar hay menor infiltración de linfocitos CD25⁺Foxp3⁺ (Okui y cols., 2012), lo que hace pensar que un porcentaje de linfocitos Tregs pierden sus propiedades supresoras como consecuencia del contexto inflamatorio periodontal en donde predomina IL-6. Es más, durante la periodontitis se han identificado linfocitos Foxp3⁺IL-17A⁺ y linfocitos que pierden la expresión de Foxp3 para convertirse en Th17 (Okui y cols, 2012; Tsukasaki y cols., 2018), lo que indica un posible cambio fenotípico de los Tregs, que favorecería el desbalance Treg/Th17 y la concomitante resorción ósea alveolar.

En este estudio se analizará si la progresión de la resorción ósea alveolar se relaciona con la pérdida del balance Treg/Th17 en las lesiones periodontales durante la periodontitis experimental.

2. HIPÓTESIS

El desbalance entre la respuesta inmune de tipo Th17 y Treg en las lesiones periodontales se asocia a la progresión de la resorción ósea durante la periodontitis experimental.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la respuesta de los linfocitos Th17 y Treg en las lesiones periodontales y su asociación con la progresión de la resorción ósea durante la periodontitis experimental.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cuantificar los niveles de expresión de mRNA de IL-2, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-17F, TNF- β , RANK-L, CD25 α , CTLA-4, GITR y los factores de transcripción Foxp3 y ROR γ t en las lesiones periodontales inducidas durante la periodontitis experimental, mediante qPCR.
2. Determinar frecuencia y número de linfocitos CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Treg) y CD4⁺CD25⁺ROR γ t⁺ (Th17) en los linfonodos cervicales que drenan las lesiones periodontales inducidas durante la periodontitis experimental, mediante citometría de flujo.
3. Determinar la progresión de resorción ósea alveolar en las lesiones periodontales inducidas durante periodontitis experimental, mediante microtomografía computarizada y microscopía electrónica de barrido.
4. Asociar los niveles de respuesta Treg y Th17 con la progresión de la resorción ósea durante la periodontitis experimental.

4. METODOLOGÍA.

4.1 Inducción de la periodontitis experimental

Se utilizaron ratones cepa C57BL/6 de entre 6 a 10 semanas de edad de una colonia establecida en la plataforma experimental de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, utilizando el protocolo experimental previamente aprobado por el Comité de Bioética para Investigación en Animales de la Facultad de Odontología de la Universidad.

Con el objetivo de inducir la acumulación de placa bacteriana alrededor del margen gingival de los molares superiores y la posterior disbiosis por bacterias comensales orales, se generó la periodontitis experimental mediante la técnica de la ligadura (Abe y Hajishengallis, 2013). Brevemente, se ataron ligaduras de seda 5-0 alrededor los segundos molares maxilares bilaterales, utilizando una lupa estereoscópica (Olympus, Japón) con una magnificación 2,5x e instrumentos de microcirugía: fórceps castro-viejo de 9 mm, tijera de 5 mm y pinza larga de 14 mm (Fine Science Tools, Canadá). Las ligaduras se mantuvieron por 5, 10, 15 o 20 días con el objetivo de analizar la progresión de la pérdida ósea alveolar. Animales sin ligadura fueron utilizados como control. Una vez finalizado el experimento, los animales fueron eutanasiados utilizando una sobre-dosis de anestesia intraperitoneal con ketamina y xylacina al 2%, cada una en dosis de 8 mg por kg.

4.2 Análisis de la resorción ósea: Micro-CT y SEM

Para el análisis de la resorción ósea se obtuvieron los maxilares superiores los cuales fueron tratados con hipoclorito de sodio 2,5% por 24 horas para eliminar los restos de tejidos blandos. Posteriormente los maxilares fueron lavados en agua destilada y fijados en glutaraldehído al 2%.

El análisis de la pérdida ósea se realizó mediante micro-tomografía computarizada (μ CT), utilizando un microtomógrafo Skyscan 1272 (Bruker, Kontich, Bélgica), utilizando los siguientes parámetros de análisis: 80 kV, 125 μ A, 0,3° de rotación y 360° de rango angular. La reconstrucción tridimensional se realizó utilizando el programa NRecon (Bruker, Kontich, Bélgica). Para la visualización y

establecimiento del margen de las imágenes se utilizó el programa Data Viewer (Extron Electronics, NY, EEUU).

La cuantificación de la pérdida ósea se determinó mediante la comparación de la distancia promedio en milímetros entre la unión amelo-cementaria y la cresta ósea alveolar en 3 puntos (un punto por cada molar) en zona vestibular y palatina utilizando los programas ImageJ (National Institutes of Health, MD, EEUU) y Paraview (Kitware Inc., NY, EEUU). Para la obtención de imágenes transversales y visualización 3D se utilizaron los programas CTan y CTvox (Bruker, Kontich, Bélgica) respectivamente.

Para la obtención de imágenes a través de microscopía electrónica de barrido (SEM) maxilares derechos de día 10, 15 y 20 fueron fijados en glutaraldehído al 2,5% en un buffer de cacodilato de sodio al 0,1 M por 2 horas. Se lavaron las muestras 3 veces durante 5 minutos en agua bidestilada, para luego ser lavadas nuevamente 3 veces en un búfer de cacodilato de sodio al 0,1 M por 5 minutos. Las muestras fueron deshidratadas en alcoholes ascendentes de 50°,70°,95°,100° I y 100° II por 5 minutos cada uno y posteriormente secadas en el secador de punto crítico Autosamdri®-815 Series A Overview (Tousimis®, MD, EEUU) durante aproximadamente 30 minutos. Una vez secas, se montaron los maxilares en portamuestras de aluminio y fueron metalizadas con oro en el metalizador Denton Vacuum Desk V (Denton Vacuum Lda., Moorestown, NJ, EEUU). Finalmente, se realizó la visualización en el microscopio electrónico de barrido JSM IT300LV (Jeol Inc., MA, EEUU).

4.3 Obtención de las muestras de mucosa palatina y purificación de RNA citoplasmático

Se extrajo el RNA total de las mucosas palatinas utilizando el reactivo Trizol (TRIzol® Plus, Invitrogen Corp., Barcelona, España). Brevemente, se homogeneizaron las muestras con un homogeinizador de vidrio y 1 mL de Trizol, se agregaron 200 µL de cloroformo y se agitaron vigorosamente durante 15 segundos a 4°C para luego incubar las muestras durante 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se separaron las fases centrifugando a 12.000 xg por 15 minutos a 4°C y se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo, para precipitar el RNA total con 1 µL de glicógeno y 500 µL de isopropanol. Luego de una nueva centrifugación a 12.000 xg por 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y re-suspendió el pellet en 1 mL de etanol al 75%. Finalmente, el RNA total obtenido se suspendió en 10 µL de agua milli-Q y cuantificó utilizando un espectrofotómetro (Synergy HT; Bio-Tek Instrument Inc., VT, EEUU).

4.4 Síntesis de la primera cadena de cDNA y Qpcr

A partir de 1 µg de RNA, se sintetizó la primera cadena de cDNA utilizando un kit de transcripción reversa (SuperScrip™ III; Invitrogen, Grand Island, NY, EEUU) según las instrucciones del fabricante. Los niveles de expresión de mRNA para las citoquinas IL-10, IL-2, IL-6, IL-17A, IL-17F y TGF-β, los receptores CD25α, CTLA-4, GITR, los factores de transcripción Foxp3 y RORγt y el factor RANK-L se cuantificaron mediante qPCR utilizando partidores específicos (**Tabla 1**).

Se utilizaron 5 ng de cDNA para cada reacción usando el kit KAPA™ SYBR® Fast qPCR (KAPA Biosystems, Woburn, MA, EEUU) y el equipo StepOnePlus® (Applied Biosystems, Singapur), siguiendo el siguiente protocolo: 95°C por 3 minutos, 40 ciclos de 95°C por 3 segundos y 60°C por 30 segundos. Finalmente se realizó una curva de degradación del producto amplificado de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto y 95°C por 15 segundos, para la detección de amplificación inespecífica. Se cuantificó la expresión de la subunidad 18S de rRNA como control endógeno para realizar la cuantificación relativa.

Tabla 1. Partidores utilizados para la amplificación del mRNA de distintas citoquinas IL-2, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-17F, TGF- β 1, los receptores CD25 α , CTLA-4, GITR, los factores de transcripción Foxp3 y ROR γ t y el factor RANK-L.

	Partidor 5'-3'	Partidor 3'-5'
IL-2	GCTGTTGATGGACCTACAGGA	TTCAATTCTGTGGCCTGCTT
IL-6	GCTACCAAACCTGGATATAATCAGGA	CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA
IL-10	CAGAGCCACATGCTCCTAGA	TGTCCAGCTGGTCCTTTGTT
IL-17A	CATGAGTCCAGGGAGAGCTT	GCTGAGCTTTGAGGGATGAT
IL-17F	CCCAGGAAGACATACTTAGAAGAAA	CAACAGTAGCAAAGACTTGACCA
TGF-β1	TGGAGCAACATGTGGAACTC	GTCAGCAGCCGGTTACCA
CD25α	TGTGCTCACAATGGAGTATAAGG	CTCAGGAGGAGGATGCTGAT
CTLA-4	GACGCAGATTTATGTCATTGCTA	GGCTGAAATTGCTTTTCACAT
GITR	GAAGTCATGGCTCTTGTGCAT	CAGGACTCGATGGCAGTTG
FOXP3	GCACTGTGCCTGGTATATGCT	CTTCCAAGTCTCGTCTGAAGG
RORγt	ACTGCCAGCTGTGTGCTGT	CATTGCCAATCCAAAGCAG
RANK-L	AGCCATTTGCACACCTCAC	CGTGGTACCAAGAGGACAGAGT
18s rRNA	GCAATTATTCCCATGAACG	GGGACTTAATCAACGCAAGC

4.5 Obtención de una suspensión celular a partir de linfonodos cervicales y bazo

Inmediatamente a su obtención los linfonodos cervicales y los bazos se transportaron en PBS + SBF 5% en hielo, para luego ser disgregados mecánicamente usando el émbolo de jeringa desechable de 10 mL, sobre un filtro de tamaño de poro 70 μ m (Corning[®] cell strainer, Sigma-Aldrich, Alemania). Las células filtradas se lavaron 2 veces en PBS + SBF 5%.

Luego se realizó la lisis de eritrocitos utilizando 2 mL de buffer de lisis por 3 minutos. Luego, se lavaron las células nuevamente con PBS + SBF 5% y centrifugando a 300 xg a 4°C por 5 minutos. Finalmente, las células fueron contadas en un contador de células automatizado (LUNA-II[™], Logos Biosystem, Corea del Sur) y se determinó viabilidad celular mediante el método de exclusión con azul de Tripán.

4.6 Análisis mediante citometría de flujo

Las células totales obtenidas se analizaron mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos específicos (**Tabla 2**). Primero, se realizó la activación de las células utilizando PMA (50 ng/mL), Ionomicina (1 μ n/mL) a 37°C por 5 horas en medio de RPMI 1640 + SBF 10% + penicilina y estreptomicina 1%. Luego, se realizó el marcaje de viabilidad lavando las células en PBS sin suero y utilizando el kit LIVE/DEAD™ Fixable Yellow (TermoFisher Scientific, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En seguida se realizó el marcaje extracelular incubando las células en PBS + SFB 5% con las siguientes concentraciones de anticuerpos conjugados con distintos fluorocromos: 1/200 anti-CD4, anti-CD25, por 30 min a 4°C en oscuridad. Posteriormente, las células se lavaron con 200 μ L de PBS+SFB 5% y se fijaron y permeabilizaron para el marcaje intracelular utilizando el kit Flow Cytometry Permeabilization/Wash Buffer (R&D Systems, MI, EEUU), según las instrucciones del fabricante. Se realizó el marcaje con los anticuerpos intracelulares en las siguientes concentraciones: 1/200 anti-ROR γ t, anti-Foxp3, anti-IL-10 y anti-IL-17A, por 12 horas a 4°C en oscuridad. Finalmente, las células fueron lavadas en PBS y re-suspendidas en 100 μ L de paraformaldehído al 1% para ser posteriormente analizadas en el citómetro de flujo (BD LSR Fortessa X-20; Becton, Dickinson and Company, CA, EEUU) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Tabla 2. Anticuerpos específicos para identificación celular mediante citometría de flujo.

ANTICUERPO	IDENTIFICACIÓN
CD4⁺	Linfocitos T-helper
CD25α⁺	Activación/T reguladores
Foxp3	T reguladores
RORγt	Linfocitos Th17
IL-10	T reguladores
IL-17A	Linfocitos Th17
Live/Dead	Viabilidad celular

Se evaluó la frecuencia de linfocitos T CD4⁺CD25^α⁺ activos a los 5, 10 y 15 días y a partir de ellos se analizó la frecuencia de expresión de los marcadores de caracterización fenotípica ROR γ t (Th17), Foxp3 (Treg), IL-10 (Treg) e IL-17A (Th17).

4.7 Análisis de datos

El análisis de los datos obtenidos de la citometría de flujo se realizó usando el software FlowJo[®] v.7.0 (Becton, Dickinson and Company, CA, EEUU). Las frecuencias de las diferentes poblaciones celulares fueron expresadas como porcentaje promedio \pm desviación estándar de células positivas sobre el total. Los datos fueron analizados estadísticamente usando el software SPSS v.22 (IBM Corp., Armonk, NY, EEUU). La normalidad de la distribución de los datos fue determinada usando la prueba de Kolgomorov-Smirnov y dependiendo de la distribución de los datos se utilizaron pruebas paramétricas o no paramétricas comparando las diferencias entre las muestras de animales control versus grupos experimentales, considerando como estadísticamente significativo $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Estandarización del modelo murino de periodontitis inducida por ligadura.

Estandarizamos el método de inducción de periodontitis experimental en modelo murino utilizando la técnica de la ligadura de acuerdo al protocolo estandarizado en el laboratorio *Applied Oral Sciences* (The Forsyth Institute, Boston, EEUU). Para ello se construyó un soporte que permite angular la cabeza del animal y mantener la apertura bucal máxima, con el objetivo de visualizar el maxilar superior (**Fig. 1A y B**).

Se posicionaron las ligaduras de seda 5-0 en los segundos molares bilaterales utilizando instrumentos de microcirugía (**Fig. 1C y E**). Confirmamos que es posible realizar la técnica de forma mínimamente traumática, sin causar daño a los tejidos duros o blandos. Además, observamos que los animales se alimentan normalmente luego de posicionar las ligaduras.

Al realizar la obtención de los linfonodos cervicales observamos que estos aumentan de 2 a 3 veces su tamaño en los animales con periodontitis, independiente del número de días con ligadura en comparación con los animales control. No obstante, no observamos cambios evidentes de tamaño de otros linfonodos regionales ni de los bazo de animales con periodontitis en comparación con los controles (**Fig. 1D**).

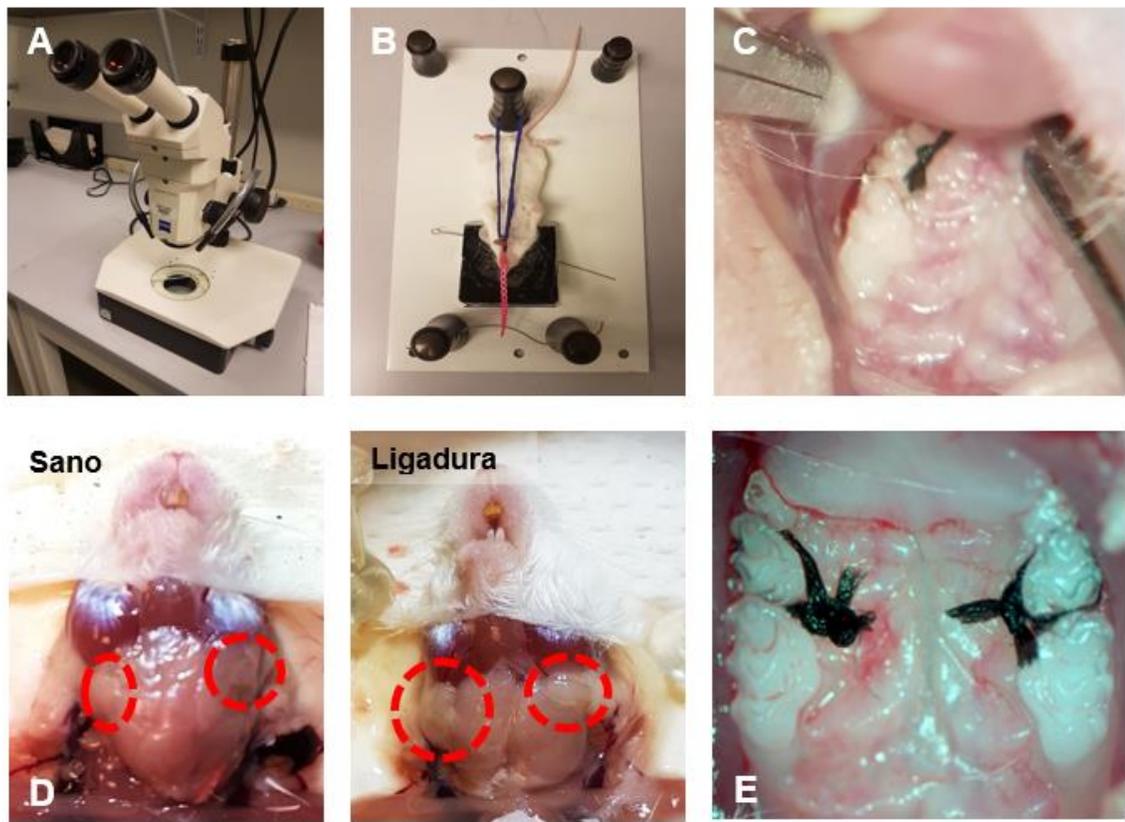


Fig.1 Estandarización del modelo de periodontitis experimental inducida con ligadura.

A) Lupa con sistema de iluminación en frío acoplado. B) Soporte para sujeción y apertura bucal del animal anestesiado. C) Imagen *in vivo* de la ligadura utilizando magnificación y con micro instrumentos. D) Comparación del linfonodos cervicales de un animal sano y uno al día 10 post colocación de la ligadura. E) Imagen *ex vivo* de las ligaduras colocadas en los segundos molares superiores bilaterales.

5.2 Progresión de la resorción ósea alveolar en periodontitis experimental

La progresión de la resorción ósea fue analizada tanto mediante microtomografía computarizada (μ CT) como con microscopía electrónica de barrido (SEM) (**Fig. 2A y B**).

Se cuantificó la distancia lineal entre la unión amelo-cementaria y cresta alveolar ósea en 3 puntos (un punto por cada molar), por vestibular y palatino. (**Fig. 2B**).

Se detectó el incremento de la distancia a día 10, 15 y 20 post-infección en comparación a muestras sanas de manera significativa ($P < 0,001$). La diferencia entre las distancias medidas en maxilares con ligadura no arroja diferencias significativas (**Fig. 2C y 3B**). Además, a partir de las reconstrucciones 3D de maxilares sanos y con periodontitis inducida por ligadura, se observaron diferencias en el trabeculado óseo de los maxilares a medida que la enfermedad progresa, siendo los maxilares de día 10 y 15 post-ligadura los que presentan mayor pérdida del trabeculado óseo, así como también mayor pérdida de altura ósea observable en las imágenes transversales. Al día 20 las imágenes 3D y transversales se observan similares a día 10 (**Fig. 3B y C**).

Según lo observado, al obtener los ejemplares óseos, la ligadura se debilita posterior a día 10. Es más, a partir de dicho día post-ligadura se observa movilidad tanto del segundo molar como de molares adyacentes a la ligadura. A día 15 y 20 la movilidad de los molares es excesiva, lo que dificultó el procesamiento de dichas muestras ya que, en varias de ellas, al obtenerlas, se perdía el tercer molar maxilar por esta razón. Es más, es posible que algunos ratones hayan perdido la ligadura producto de este motivo. Es así que para las mediciones solo se utilizaron animales que al momento de la eutanasia conservaran la ligadura alrededor del segundo molar maxilar de manera bilateral.

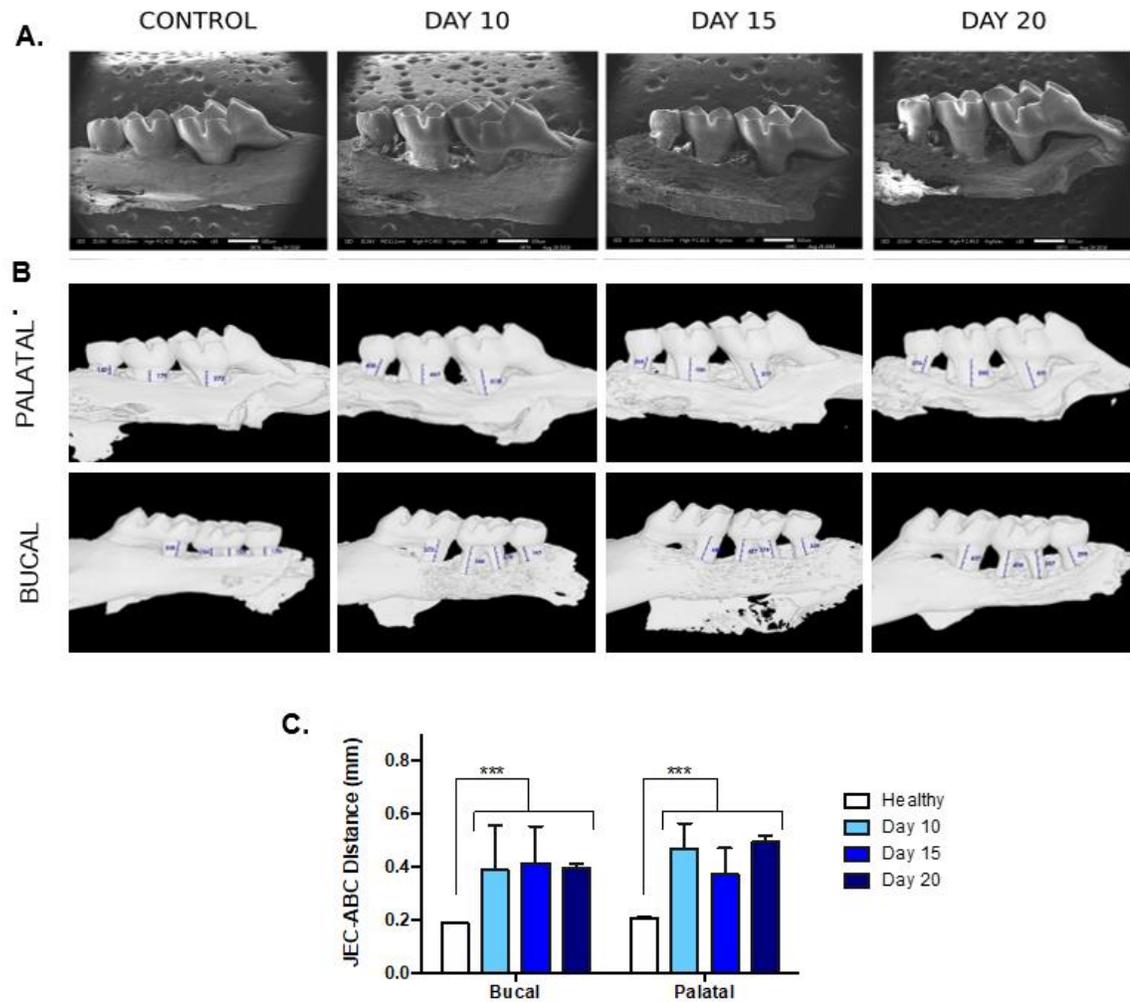


Fig.2 Análisis de la destrucción ósea alveolar mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y μ CT. A) Imágenes correspondientes a la visión palatina de maxilares superiores derechos por SEM. n=2. B) Imágenes correspondientes a la visión bucal y palatina de maxilares superiores derechos con mediciones lineales entre la unión amelo-cementaria (JEC) y cresta ósea alveolar (ABC) por μ CT. C) Distancia lineal entre CEJ y la cresta alveolar AC medida a los días 10, 15 y 20 post colocación de la ligadura, controles animales sin ligadura (healthy) (n=4) por μ CT. Análisis estadístico paramétrico (prueba de normalidad Shapiro-Wilk), ANOVA, Post Hoc Tukey. *** P < 0.001.

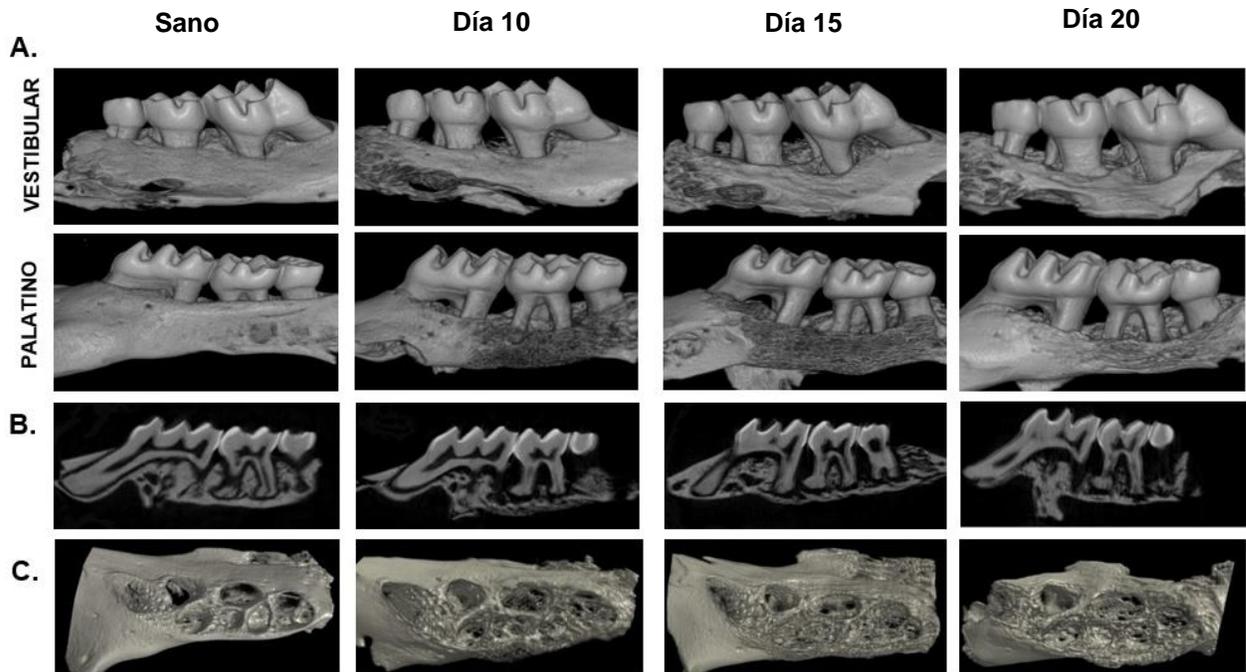


Fig.3 Reconstrucción 3D e imágenes transversales de maxilares derechos de ratones a partir de imágenes de μ CT. A) Imágenes correspondientes a la visión bucal y palatina de maxilares superiores derechos de ratones a los días 10, 15 y 20 post colocación de la ligadura y control de animal sin ligadura. B) Imágenes correspondientes a cortes transversales de maxilares derechos de ratones a día 10, 15 y 20 post colocación de ligadura y control de animal sin ligadura. C) Imágenes correspondientes a hueso alveolar de maxilares superiores derechos de ratones a los días 10, 15 y 20 post colocación de la ligadura y control de animal sin ligadura.

5.3 Expresión de mRNA de IL-2, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-17F, TGF- β 1, RANK-L, CD25 α , CTLA-4, GITR y los factores de transcripción Foxp3 y ROR γ t.

A partir de las lesiones periodontales, se cuantificaron los niveles de expresión de mRNA de las citoquinas, receptores y factores de transcripción asociados a los perfiles linfocitarios de Treg y Th17 mediante RT-qPCR. **(Fig. 4).**

Para las citoquinas, receptores y factor de transcripción asociados al perfil inmuno-regulador de Treg, IL-10, TGF- β , GITR, CTLA-4, CD25, IL-2 y Foxp3 observamos un incremento de su expresión en mucosa luego de la inducción de periodontitis. Es así como se detectó un aumento significativo de IL-10 al día 10 ($P = 0,038$) y a día 15 ($P < 0,001$) en comparación con animales sanos; además, al día 15 es posible distinguir un aumento en relación a días 5 ($P = 0,025$) y 10 ($P = 0,007$) post-infección. Para TGF- β , se detectó un incremento al día 15 en comparación con muestras de animales sanos ($P < 0,001$), así como también en comparación con muestras de día 5 y 10 post-infección ($P < 0,001$). **(Fig. 4A)**

En cuanto a los receptores característicos de Treg, para GITR se detectaron diferencias significativas al día 15 ($P < 0,001$) en comparación con animales no infectados, así como también comparándolo con día 5 ($P = 0,02$) y día 10 ($P = 0,007$). Situación similar se detectó para CTLA-4, donde se observaron diferencias significativas al día 15 ($P < 0,001$) y de igual manera comparándolo con los días 5 ($P = 0,002$) y 10 ($P = 0,006$). **(Fig. 4A)**

Para el factor de transcripción Foxp3 solo se detectaron diferencias significativas a día 15 post-ligadura ($P = 0,037$) comparado con muestras de animales sanos. **(Fig. 4A)**

En relación a CD25 como mecanismo regulador de Treg, denominada también IL-2 α (o subunidad α del receptor de IL-2), se detectó un aumento significativo a día 5 ($P = 0,005$), 10 ($P = 0,002$) y 15 ($P < 0,001$) post-infección en comparación con muestras de animales no inducidos; a su vez, se pueden distinguir diferencias significativas al comparar día 15 con días 5 ($P = 0,011$) y 10 ($P = 0,003$). Fenómeno similar es posible observar para la citoquina IL-2 (que estimula el

crecimiento y proliferación de linfocitos) ya que aumenta su expresión al día 5, 10 ($P = 0,005$) y 15 ($P < 0,001$), mostrando sus niveles máximos a día 15. Es factible además distinguir un aumento significativo a día 15 en comparación con día 5 ($P < 0,001$) y día 10 ($P < 0,001$) post-infección. **(Fig. 4A)**

Los niveles de expresión de las citoquinas pro-inflamatorias asociadas a Th17 y su correspondiente factor de transcripción se ven incrementados en mucosa; es así, como en lesiones periodontales se detectaron mayores niveles de expresión de IL-6, IL-17A, IL-17F, RANK-L y ROR γ t **(Fig. 4B)**. De este modo, pudimos detectar un aumento significativo IL-6 a día 5 ($P = 0,004$), 10 y 15 ($P < 0,001$) post-infección en comparación con animales no infectados; sus niveles en mucosa se incrementaron aproximadamente 19 veces. A su vez, se detectó un aumento progresivo en los niveles de expresión de IL-17A, observando diferencias significativas al día 5 ($P = 0,004$), 10 y 15 ($P < 0,001$) post-infección; su expresión aumentó aproximadamente 16 veces. Para IL-17F se detectó un aumento similar, no solo obteniendo diferencias significativas a día 5 ($P = 0,003$), 10 y 15 ($P < 0,001$) post-infección comparados con animales no infectados (donde se observó un incremento de expresión de aproximadamente 10 veces), sino que también a día 15 ($P = 0,011$) en comparación a día 5 **(Fig. 4B)**.

Para el factor de transcripción de Th17, ROR γ t, se detectaron mayores niveles de expresión a día 5 ($P = 0,015$), 10 y 15 ($P < 0,001$) en comparación con controles **(Fig. 4B)**.

Finalmente, para RANK-L se detectaron mayores niveles de expresión en el grupo infectado en relación al no infectado, pero, a diferencia de las citoquinas mencionadas anteriormente, es posible observar diferencias significativas solo a día 10 y 15 ($P < 0,001$), expresándose aproximadamente 8 veces más que en controles; además, se observaron diferencias significativas a día 10 y 15 ($P = 0,003$) post-infección en comparación con los niveles de expresión de RANK-L a día 5 **(Fig. 4B)**. El aumento de esta citoquina ratifica su importante rol en la destrucción ósea alveolar, al ser un factor fundamental en la diferenciación de osteoclastos.

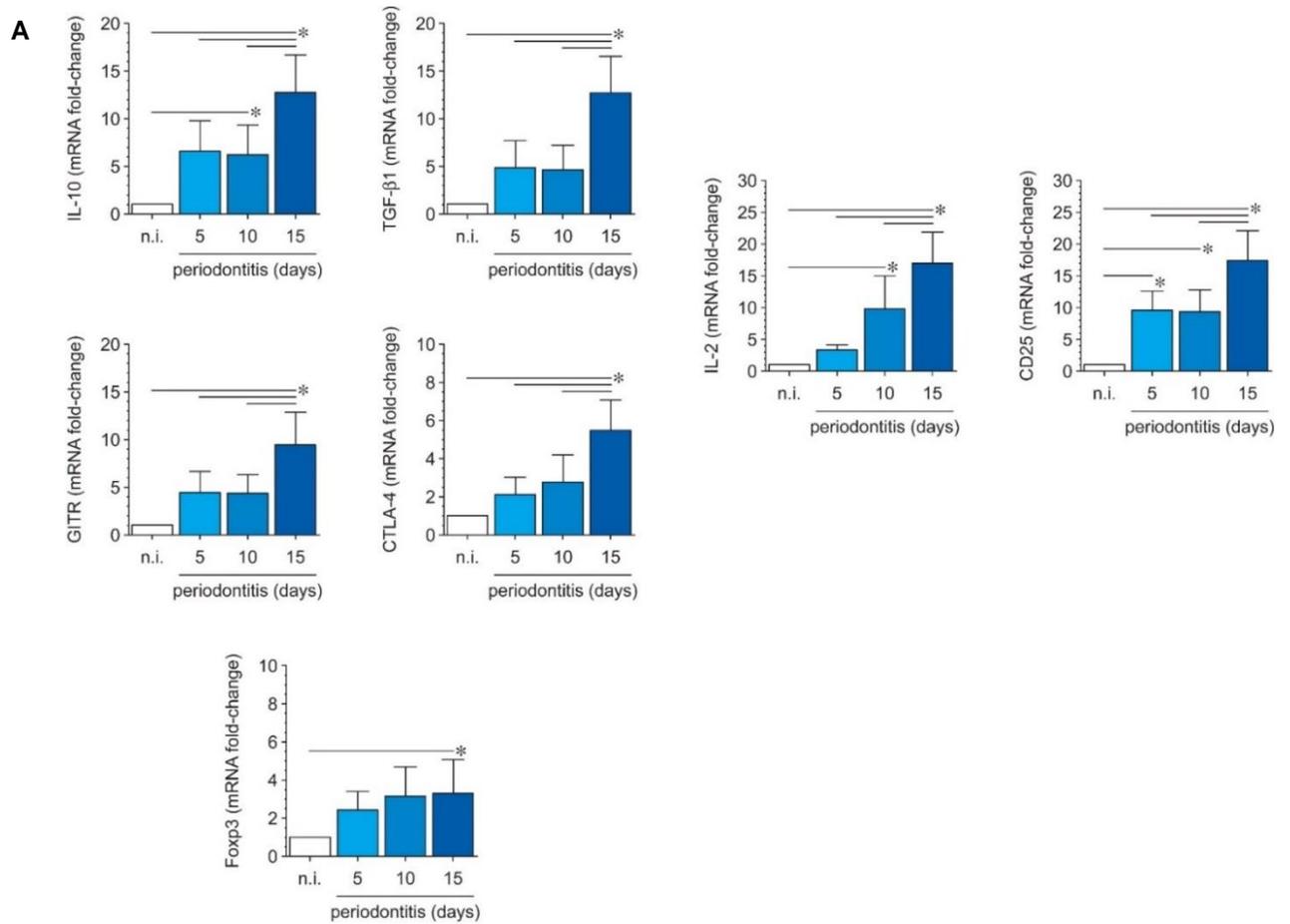


Fig.4A. Expresión de mRNA de citoquinas, factores de transcripción y receptores asociados a los perfiles Treg y Th17 en mucosa gingival de animales con periodontitis experimental inducida con ligadura por 5, 10 o 15 días y controles. (Control n=6; Día 5 n=4; Día 10 n=6; Día 15 n=3). Análisis estadístico paramétrico (prueba de normalidad Shapiro-Wilk), ANOVA, Post Hoc Tukey o Games-Howell (en caso de varianzas no homogéneas). * $p < 0.05$. **A) Expresión de mRNA de citoquinas y factores asociados a Treg:** Expresión de mRNA de IL-10, TGF- β , GITR, CTLA-4, CD25, IL-2 y Foxp3 en mucosa

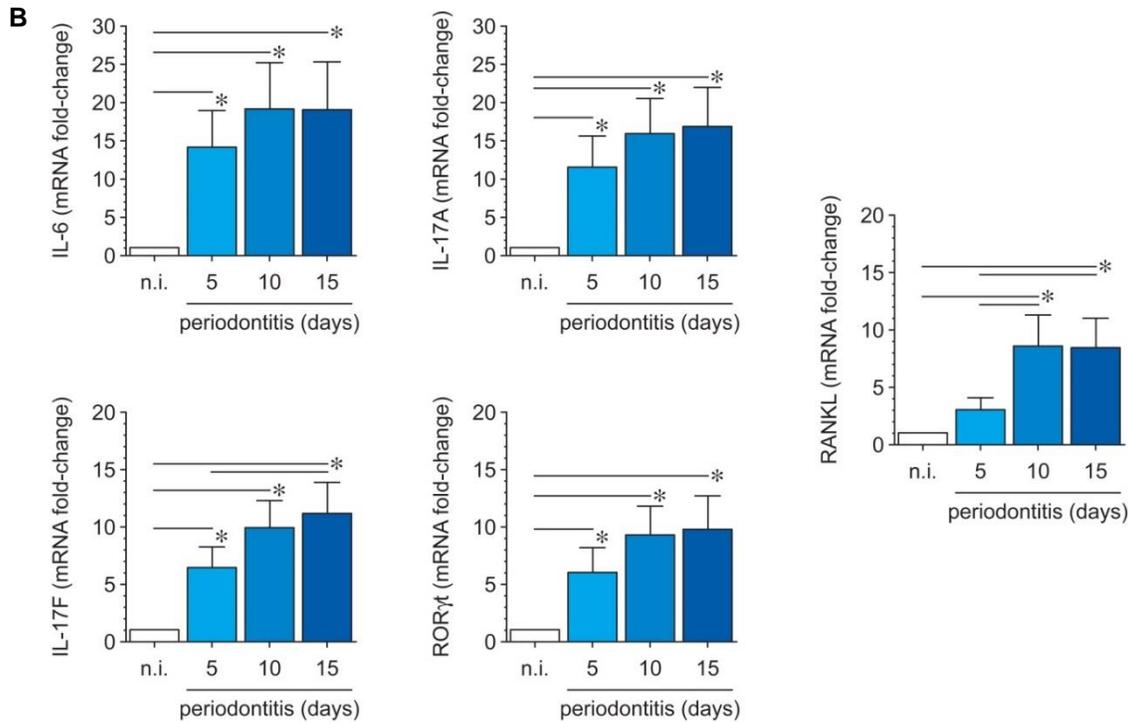


Fig.4B. Expresión de mRNA de citoquinas, factores de transcripción y receptores asociados a los perfiles Treg y Th17 en mucosa gingival de animales con periodontitis experimental inducida con ligadura por 5, 10 o 15 días y controles. (Control n=6; Día 5 n=4; Día 10 n=6; Día 15 n=3). Análisis estadístico paramétrico (prueba de normalidad Shapiro-Wilk), ANOVA, Post Hoc Tukey o Games-Howell (en caso de varianzas no homogéneas). * $p < 0.05$.

B) Expresión de mRNA de citoquinas y factores asociados a Th17: Expresión de mRNA de IL-6, IL-17A, IL-17F, RANK-L y ROR γ t en mucosa gingival de animales con periodontitis experimental inducida con ligadura por 5, 10 o 15 días y controles

5.4 Detección de linfocitos Th17IL-17⁺ en linfonodos cervicales (CLn) mediante citometría de flujo.

Los linfonodos cervicales que drenan lesiones periodontales se utilizaron para analizar la respuesta inmune inducida durante la periodontitis con la intención de ratificar el fenotipo linfocitario osteo-destructivo.

A partir de linfocitos T CD4⁺ se determinó la frecuencia y número de linfocitos Th17 totales según la expresión del factor de transcripción ROR γ t y producción de IL-17 (**Fig. 5**). Es así como se detectó un incremento de la frecuencia y número de los linfocitos CD4⁺ROR γ t⁺ totales post-infección. En cuanto a frecuencia, se detectó aumento significativo a día 10 ($P < 0,001$) y 15 ($P < 0,01$) en comparación a muestras de animales sanos, así como también comparando día 15 con día 5 post-ligadura ($P < 0,01$). Del mismo modo, en relación al número de linfocitos CD4⁺ROR γ t⁺ se detectó aumento significativo a día 10 ($P < 0,05$) y 15 ($P < 0,05$) en comparación a muestras de animales sanos (**Fig. 5C**). No obstante, en relación a la producción de IL-17A a partir de células CD4⁺ROR γ t⁺, no se observa un aumento estadísticamente significativo de la frecuencia, más sí del número total de células CD4⁺ROR γ t⁺IL-17⁺ tanto a día 10 ($P < 0,05$) como a día 15 ($P < 0,05$) post infección (**Fig. 5D**).

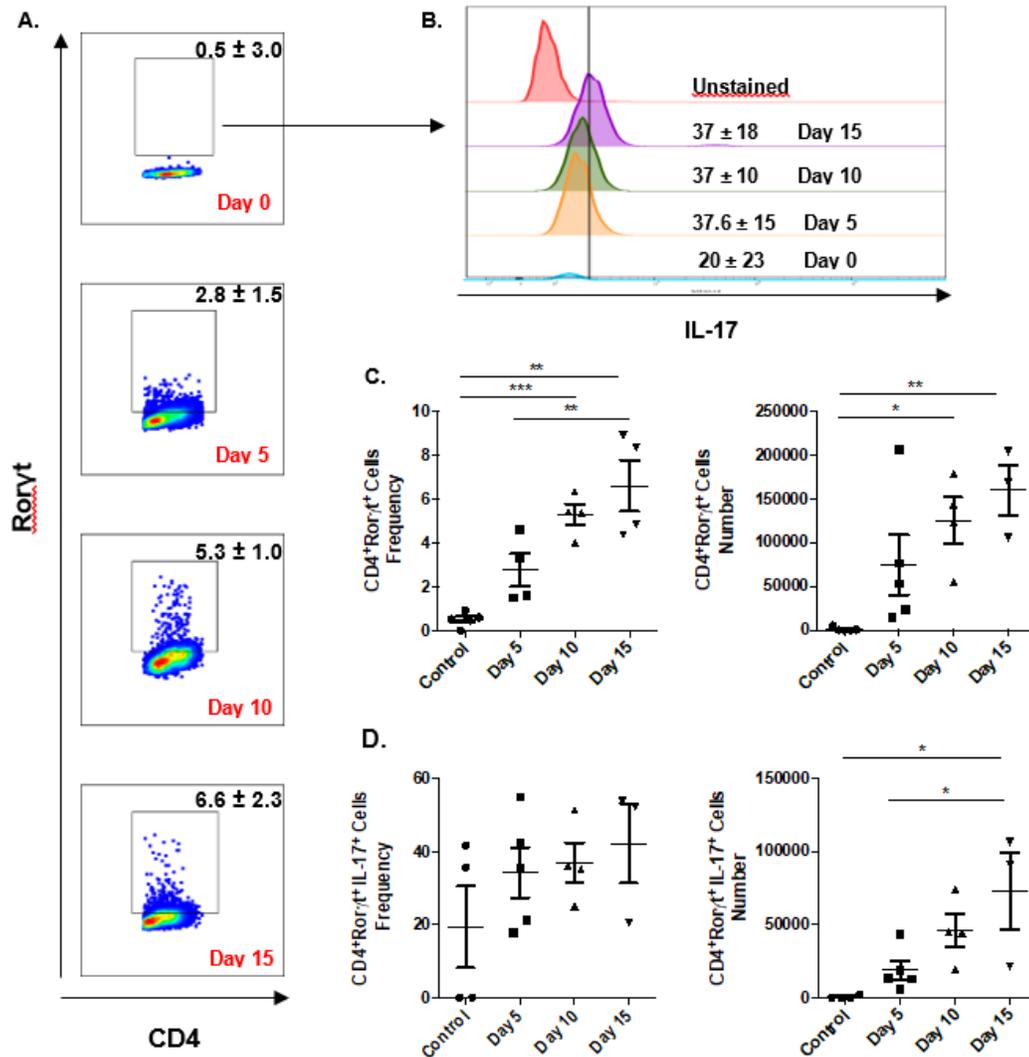


Fig.5 Detección de células Th17 en linfonodos cervicales de animales con periodontitis inducida con ligadura a los días 5, 10, 15 y control (sin ligadura). A,B) Datos representativos con promedio \pm DS (Día 0 n=4; Día 5 n=5; Día 10 n=4; experimentos independientes). C) Análisis de la frecuencia de células $CD4^+Ror\gamma^+$ y número de células $CD4^+Ror\gamma^+IL-17^+$. D) Análisis del número de células $CD4^+Ror\gamma^+$ de y número células $CD4^+Ror\gamma^+IL-17^+$. Análisis estadístico paramétrico, ANOVA, Post Hoc Tukey. *P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001.

5.5 Detección de linfocitos Treg en linfonodos cervicales (CLn) y bazo mediante citometría de flujo.

Los linfonodos cervicales y bazos de animales sanos y ratones con ligadura a día 5 y día 10 se utilizaron para analizar la respuesta inmune inducida durante la periodontitis con la intención de ratificar el fenotipo linfocitario inmunoregulador.

A partir de linfocitos T CD4⁺ se determinó la frecuencia y número de linfocitos Treg totales según la expresión del factor de transcripción Foxp3 y de CD25 α (high), determinando así la activación de los linfocitos. Asimismo, se analizó la intensidad de fluorescencia media (MFI) del factor de transcripción Foxp3 en los Treg totales detectados (**Fig. 6**). Es así como se detectó un aumento en la frecuencia de linfocitos CD4⁺Foxp3⁺ post-infección, observando diferencias significativas a día 10 en linfonodos ($P < 0,05$) y a día 5 ($P < 0,05$) y 10 ($P < 0,05$) en bazo comparados con muestras de animales sanos. Por otro lado, se detectó una disminución en la frecuencia de linfocitos CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ (Treg) en linfonodos cervicales, pudiendo distinguir diferencias significativas a día 10 post-infección en comparación tanto con controles como con muestras de animales a día 5 post infección ($P < 0,001$). A pesar de que se observa un fenómeno similar en bazo en relación a la frecuencia de células CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺, no se apreciaron diferencias significativas (**Fig. 6B y C**).

Para el número de linfocitos Treg se detectó un aumento tanto a nivel de linfonodos cervicales como de bazo, sin embargo, este aumento no fue estadísticamente significativo. (**Fig. 6B y C**).

Además, se detectó una disminución de la intensidad de fluorescencia media de Foxp3 conforme la enfermedad periodontal progresa en muestras de linfonodos cervicales, mostrando diferencias estadísticamente significativas a día 5 y 10 ($P < 0,001$) post-infección en comparación a controles. Dicho efecto también se observó en el bazo, pero en menor medida (día 5 y 10 ($P < 0,05$)). (**Fig. 6B y C**).

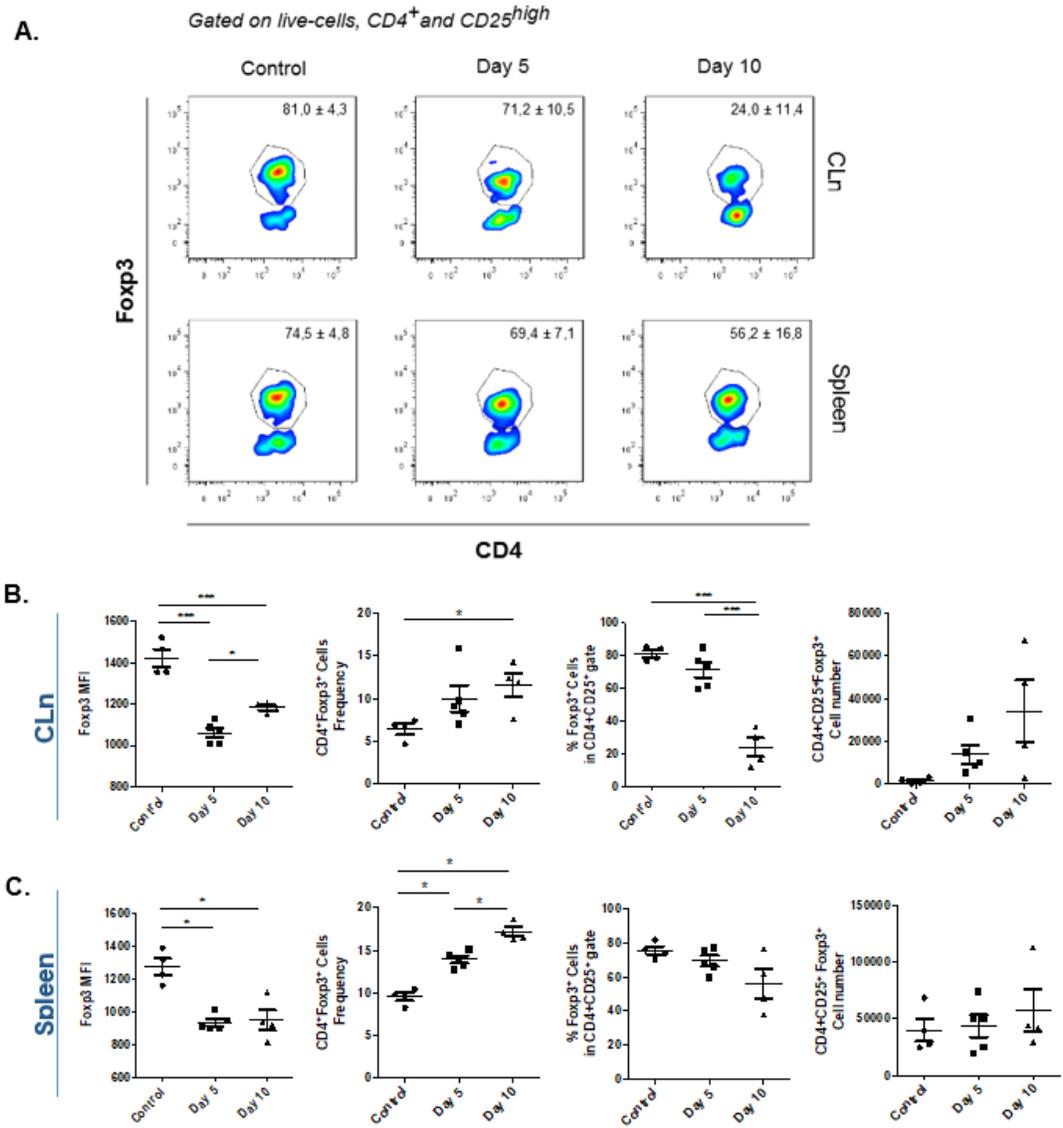


Fig.6 Detección de Tregs en linfonodos cervicales (CLn) y Bazo (Spleen) de animales con periodontitis inducida con ligadura a los días 5, 10 y control (sin ligadura). A) Células CD4⁺ Fopx3⁺ en *gate* células vivas/CD4⁺/CD25^{high}, datos representativos con el promedio ± DS (Día 0 n=4; Día 5 n=5; Día 10 n=4; experimentos independientes). Análisis de la intensidad de fluorescencia promedio (MFI), la frecuencia de células Fopx3⁺ en *gate* células vivas/CD4⁺, el número de células CD4⁺CD25^{high} Fopx3⁺, la frecuencia de Fopx3⁺ en el *gate* células vivas/CD4⁺/CD25⁺ y su número en B) linfonodos cervicales y C) Bazo . Análisis estadístico paramétrico, (prueba de normalidad Shapiro-Wilk), ANOVA, Post Hoc Tukey. *P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001.

5.6 Detección de linfocitos Treg productores de IL-17 en linfonodos cervicales (CLn).

Se utilizaron linfonodos cervicales de ratones sanos y ratones con ligadura a día 5,10 y 15 post-infección para detectar la presencia de linfocitos T CD4⁺CD25^αFOXP3⁺ a partir de los cuales se cuantificó la expresión de la citoquina IL-17A (**Fig. 7A y B**).

Se detectó un aumento significativo de linfocitos Treg productores de IL-17A en ratones con periodontitis en comparación con muestras de ratones sanos tanto en frecuencia como en número de células. En cuanto a frecuencia, se observaron diferencias a día 5 ($P < 0,05$), 10 y 15 ($P < 0,001$) post-infección. En cuanto a número de células, se observaron diferencias significativas a día 5 y 10 ($P < 0,05$). (**Fig. 7C**), lo que da cuenta de la plasticidad de linfocitos Treg y sugiere una posible transdiferenciación de este perfil inmunoregulador hacia un perfil osteodestructor.

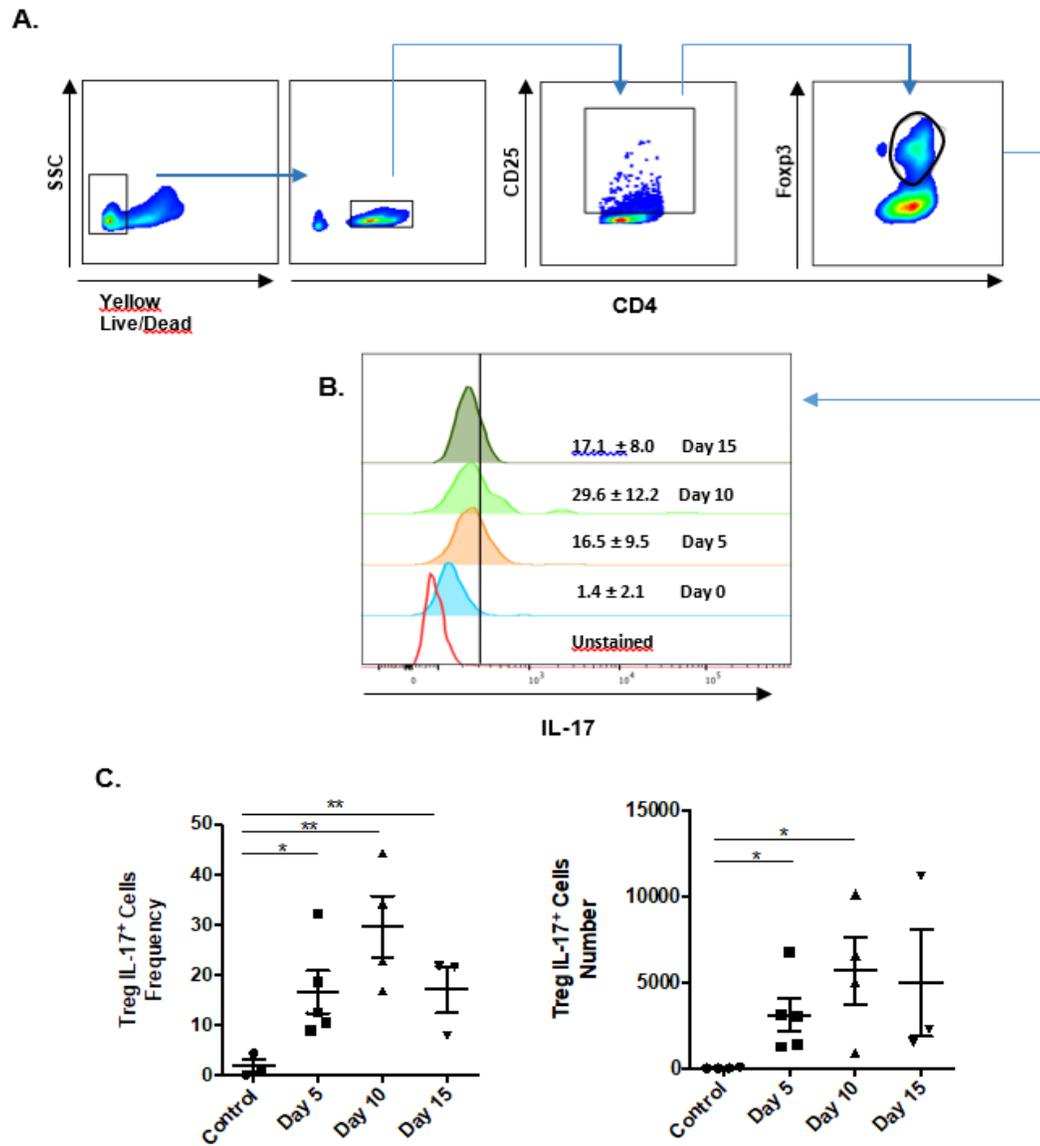


Fig.7 Detección de células Treg IL-17⁺ en linfonodos cervicales de animales con periodontitis inducida con ligadura a los días 5, 10, 15 y control (sin ligadura). A) Estrategia de *gating*. B) Datos representativos de la expresión de IL-17 en Tregs con promedio ± DS (control n=4; Día 5 n=5; Día 10 n=4; Día 15 n=3 experimentos independientes). C) Análisis de la frecuencia de células Treg IL-17⁺ y número de células Treg IL-17⁺. Análisis estadístico paramétrico ANOVA, Post Hoc Tukey o Games-Howell (en caso de varianzas no homogéneas). *P < 0.05, ** P < 0.01.

6. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio han demostrado un aumento tanto en la frecuencia como el número de linfocitos Th17 CD4⁺RORγt⁺IL-17⁺ en lesiones periodontales (Tsukasaki y cols., 2018). En contraparte, la frecuencia y número de Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ disminuye, dando cuenta del desbalance entre linfocitos Th17 y Tregs en los linfonodos cervicales que drenan las lesiones periodontales. Es importante destacar que la disminución en la frecuencia y número de linfocitos T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ detectada a nivel de linfonodos y no en bazo se asocia a un efecto inmunitario local en respuesta a la infección periodontal, sin compromiso sistémico. Además, se detectó que, conforme la expresión de Foxp3 disminuye en los Tregs en términos de MFI, incrementa la expresión de IL-17A, hecho que se ha asociado a una inestabilidad fenotípica y funcional de los Tregs. Este fenómeno recientemente ha sido descrito en periodontitis, donde se evidencia que la presencia linfocitos Treg Foxp3⁺IL-17A⁺ en lesiones periodontales aumentan más aún el daño tisular (Okui y cols., 2012).

El aumento de linfocitos Th17 en periodontitis podría estar dando cuenta, al menos en parte, del fenómeno osteo-destructivo detectado. Estas células constituyen una fuente significativa de IL-17A en los tejidos periodontales, la que posee potentes propiedades osteoclastogénicas por su capacidad para estimular la expresión de RANK-L en osteoblastos y células estromales. Sumado a lo anterior, los linfocitos Th17 son capaces de secretar constitutivamente RANK-L (Hahishengallis y Korostoff, 2017). Por ello, el mayor número de los linfocitos Th17 CD4⁺RORγt⁺IL17⁺ en las lesiones periodontales contribuye no sólo a una mayor producción de IL-17A, sino que también a un incremento en la producción de otros mediadores, como RANK-L (Tsukasaki y cols., 2018). De esta manera, los linfocitos Th17 inducen directamente la diferenciación de los precursores de osteoclastos y la activación de los osteoclastos maduros y, además, contribuyen a un loop positivo, que favorece la transdiferenciación de linfocitos Treg hacia Th17 debido a que perpetúa el microambiente inflamatorio que se desarrolla en periodontitis, siendo IL-6 uno de los determinantes de este proceso (Tsukasaki y cols. 2018). Esta citoquina se sobreexpresa en lesiones periodontales y, en nuestros resultados, se observó que sus

niveles incrementaron en mucosa aproximadamente 19 veces, lo que concuerda con reportes previos (Okui y cols., 2012; Komatsu y cols., 2014, Tsukasaki y cols. 2018).

De acuerdo con nuestros hallazgos, al establecerse la respuesta inmuno-inflamatoria en periodontitis, tanto factores pro-inflamatorios como asociados al perfil de Treg aumentaron en mucosa. Aquellos factores asociados a los linfocitos Th17, como lo son IL-6, IL-17A, IL-17F y RANK-L, aumentaron sus niveles 10 veces en comparación con animales libres de infección. Sin embargo, luego del día 10 post-infección mantienen sus niveles estables (Molon y cols., 2018). Por otro lado, las citoquinas y marcadores asociados a Tregs, CTLA-4, GITR, IL-10 y TGF- β 1, al día 15 post-infección aumentan de manera significativa en comparación con día 5 y 10 (Garlet y cols., 2010a). Estos resultados nos sugieren una probable estabilización de la respuesta inmune pro-inflamatoria en las lesiones periodontales experimentales.

Cabe destacar que, a diferencia de lo anteriormente mencionado Foxp3, a pesar de haber aumentado sus niveles en animales infectados versus no infectados, no presentó diferencias significativas en sus niveles entre días 5, 10 y 15 post-infección, manteniéndose niveles estables de este marcador según progresa la periodontitis. Creemos que esto daría indicios del mantenimiento de una respuesta inmuno-inflamatoria exacerbada y del desbalance entre el perfil Treg y Th17, considerando además el aumento observado de ROR γ t, en las lesiones periodontales.

En cuanto a la resorción ósea alveolar, se observaron diferencias significativas a los días 10,15 y 20 post-infección periodontal en comparación con animales libres de infección, con una estabilización de la pérdida ósea a partir del día 10, tal como ha sido previamente reportado (Marchesan y cols., 2018). Considerando esto, sugerimos que durante la periodontitis experimental inducida mediante ligadura es posible distinguir 2 fases patológicas: (1) una fase aguda, que se caracteriza por niveles altos de expresión de factores pro-inflamatorios en las lesiones periodontales y resorción ósea acelerada y (2) una fase crónica, que se caracteriza por una estabilización de la resorción ósea alveolar, además de la estabilización de la respuesta inmune que

involucra niveles génicos similares de citoquinas pro-inflamatorias entre días 10 y 15 post-infección (Molon y cols., 2018). Sumado a lo anterior, recientemente se han descrito células exFoxp3 Th17 en lesiones periodontales, lo que daría cuenta de una inestabilidad fenotípica efectora linfocitaria, provocando un posible desbalance entre los perfiles Treg/Th17 que se asocia a la progresión de la resorción ósea durante la periodontitis (Tsukasaki y cols., 2018).

7. CONCLUSIONES

En términos generales, en este estudio se puede concluir que existe un desbalance en la diferenciación y actividad de los linfocitos Th17 y Treg que se asocia a la progresión de la resorción ósea durante la periodontitis experimental, el cual puede estar asociado, al menos en parte, a la inestabilidad fenotípica de los linfocitos Treg, que pierden la expresión de Foxp3 y producen IL-17A. De esta manera, la recuperación del balance entre ambos tipos celulares podría restablecer la homeostasis ósea y prevenir la progresión de la periodontitis experimental. En base a ello se podrían considerar posibles terapias complementarias al tratamiento periodontal convencional, teniendo como blanco inmuno-terapéutico el balance Th17/Treg.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe T. and Hajishengallis G, (2013). "Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice." *Journal of Immunology Methods* 394(1-2): 49-54.

Alroqi F. J. & Chatila T. A. (2016). "T regulatory cell biology in health and disease." *Current Allergy and Asthma Reports* 16(4):1-8.

Barbi J., Pardoll D. & Pan, F. (2014). "Treg functional stability and its responsiveness to the microenvironment." *Immunological Reviews*, 259(1): 115-139.

Bettelli E., Oukka M., & Kuchroo V. K. (2007). "Th-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity". *Nature Immunology* 8(4): 345-350.

Boyle W. J., Scott S. & Lacey D. (2003). "Osteoclast differentiation and activation". *Nature* 423(5): 337-342

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- κ B ligand, interleukin (IL) -17, IL-10 and transforming Growth Factor- β during the progression of chronic periodontitis." *Journal of Clinical Periodontology* 36(5): 396-403.

Fontana C. R., Grecco C., Bagnato V. S., De Freitas L. M., Boussios C. I., & Soukos N. S. (2018). "Molecular analyses of two bacterial sampling methods in ligature-induced periodontitis in rats." *Clinical and Experimental Dental Research* 4(1): 19-24.

Garlet G. P. (2010b). "Critical reviews in oral biology & medicine: destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: A re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints." *Journal of Dental Research* 89(12): 1349-1363.

Garlet G.P., Cardoso C. R., Mariano F. S., Claudino M., De Assis G. F., Campanelli, A. P., Silva, J. S. (2010a). "Regulatory T cells attenuate experimental periodontitis progression in mice." *Journal of Clinical Periodontology* 37(7): 591-600.

Garlet G. P, Sfeir C. S. and Little S. R. (2014). "Restoring host-microbe homeostasis via selective chemoattraction of Tregs." *Journal of Dental Research*, 93 (9): 834-839.

Hajishengallis, G. (2014). "Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response". *Trends in Immunology*, 35(1), 3-11.

Hajishengallis G. (2015). "Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation". *Nature Reviews Immunology* 15(1), 30-44.

Hajishengallis G. & Korostoff J. M. (2017). "Revisiting the Page & Schroeder Model: the good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later". *Periodontology 2000*, 75(1): 116-151.

Hienz S. A., Paliwal S. & Ivanovski, S. (2015). "Mechanisms of bone resorption in periodontitis". *Journal of Immunology Research*, www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4433701/.

Ivanov I. I., McKenzie B. S., Zhou L., Tadokoro C. E., Lepelley A., Lafaille J. J., Littman D. R. (2006). "The orphan nuclear receptor ROR γ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells". *Cell* 126(6): 1121-1133.

Kajiya M., Giro G., Taubman M. A., Han X., Mayer M. P. A. & Kawai T. (2010). "Role of periodontal pathogenic bacteria in RANKL-mediated bone destruction in periodontal disease". *Journal of Oral Microbiology* 190(3): 1-17.

Kantarci A., Hasturk H. & Van Dyke, T. E. (2015). "Animal models for periodontal regeneration and peri-implant responses". *Periodontology 2000*, 68(1): 66-82.

Kawai T., Matsuyama T., Hosokawa Y., Makihira S., Seki M., Karimbux N. Y., Taubman M. A. (2006). "B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease". *American Journal of Pathology*, 169(3): 987-998.

Komatsu N., Okamoto K., Sawa S., y cols. (2014) "Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis". *Nature Medicine Journal*, 20 (1): 62-8.

Lamont R. J & Hajishengallis G. (2015). "Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease". *Trends in Molecular Medicine*, 21(3): 172-183.

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.

Marchesan J, Ginary MS, Jing L, Miao MZ, Zhang S, Sun L y cols. (2018). "An experimental murine model to study periodontitis". *Nature Protocols* 13(10): 2247-2267.

Molon RS, Park CH, Jin Q, Sugai J, Cirelli JA (2018). "Characterization of ligature-induced experimental periodontitis" *Microscopy Research and Technique* 81(12): 1412-1421.

Nakajima T. et al., "Regulatory T-cells infiltrate periodontal disease tissues" (2005). *Journal of Dental Research*, 84(7): 639-643.

Okui T., Aoki Y., Ito H., Honda T. & Yamazaki K. (2012). "The presence of IL-17+/FOXP3+ double-positive cells in periodontitis". *Journal of Dental Research* 91(6): 574-579.

Pacios S., Xiao y cols (2015). "Osteoblast lineage cells play an essential role in periodontal bone loss through activation of nuclear factor-kappa B". *Sci Rep*, 5: 16694.

Papapanou PN, Sanz M y cols. (2018). "Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions". *Journal of Clinical Periodontology*, 45 Suppl 20: S162-s70.

Sato K., Suematsu A., Okamoto, K., Yamaguchi, A., Morishita, Y., Kadono, Y. y cols. (2006). "Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction". *The Journal of Experimental Medicine* 203(12): 2673-2682.

Teitelbaum, S. L. (2000). "Bone resorption by osteoclasts". *Science* 289(5484): 1504-1508.

Tsukasaki, M., Komatsu, N., Nagashima, K., Nitta, T., Pluemsakunthai, W., Shukunami C., Takayanagi, H. (2018). "Host defense against oral microbiota by bone-damaging T cells". *Nature Communications* 9(1): 1-11.

Walker, LS. (2013). "Treg and CTLA-4: two intertwining pathways to immune tolerance". *Journal of Auinmunology* 45: 49-57.

Wang, L., Wang, J., Jin, Y., Gao, H., & Lin, X. (2014). "Oral administration of all- trans retinoic acid suppresses experimental periodontitis by modulating the Th17/Treg imbalance". *Journal of Periodontology* 85(5): 740-750.

Yang X., Chung Y., Pappu B., Shah B., Chang S., Schluns K., y cols. (2008). "Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs". *Cell Press Journal. Immunity* 29: 44-56