

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
ESCUELA DE GRADUADOS



“Efecto de las vesículas extracelulares derivadas de linfocitos T reguladores inducidos con ácido retinoico en la respuesta inmune y la resorción ósea durante la periodontitis, rol de CD73”

Carolina Isabel Rojas Pérez

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

Director de Tesis:

Dr. Rolando Vernal Astudillo

Codirectora de Tesis:

Dra. Karina Pino Lagos

Directora pasantía internacional:

Dra. Lesley Smyth

Santiago – Chile, 2023

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESCUELA DE GRADUADOS

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
ESCUELA DE GRADUADOS**



“Efecto de las vesículas extracelulares derivadas de linfocitos T reguladores inducidos con ácido retinoico en la respuesta inmune y la resorción ósea durante la periodontitis, rol de CD73”

Carolina Isabel Rojas Pérez

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

Director de Tesis:

Dr. Rolando Vernal Astudillo

Codirectora de Tesis:

Dra. Karina Pino Lagos

Directora pasantía internacional:

Dra. Lesley Smyth

Santiago – Chile, 2023

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESCUELA DE GRADUADOS**

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS

Se informa al Consejo de Posgrado de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, que la Tesis de Doctorado en Ciencias Odontológicas presentada por la candidata

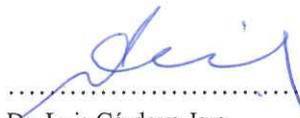
Carolina Isabel Rojas Pérez

ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias Odontológicas, el examen rendido el 29 MARZO DE 2023.

COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS



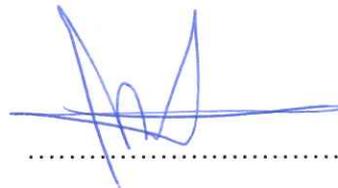
.....
Dr. Nicolás Dutzan Muñoz
Académico del Departamento de
Odontología Conservadora
Facultad de Odontología



.....
Dr. Luis Córdova Jara
Académico del Departamento de Cirugía
y Traumatología Máxilo Facial
Facultad de Odontología



.....
Dr. Vicente Torres Gómez
Académico del Instituto de Investigación
en Ciencias Odontológicas
Facultad de Odontología
(Presidente Comisión Examinadora)



.....
Dr. Marcelo Kogan Bocian
Académico del Departamento de Química
Farmacológica y Toxicológica
Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas.

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores Rolando, Karina y Lesley les agradezco de corazón por ser mis mentores y guías durante todo este proceso. Muchas gracias por su dedicación, por la paciencia y por hacerme creer en mis capacidades. Gracias a sus enseñanzas tanto científicas como personales, soy la profesional en la que me he convertido el día de hoy y de la cual me siento bastante orgullosa. Aun cuando a veces no es tan evidente, día a día aplico mucho de lo que me han inculcado durante estos años, tal como la rigurosidad, pensamiento crítico, organización y trabajo en equipo. Ustedes son responsables de mi despertar científico y gracias a eso creo haber encontrado mi rumbo profesional en esta vida. Ahora que se me vienen nuevos desafíos, agradezco enormemente todas las herramientas que me entregaron y espero hacerlos sentir orgullosos de la persona que han formado.

A mi familia por su amor incondicional. Gracias por haber estado siempre ahí para mí. Creo que no existen personas en este mundo más admirables que ustedes. Definitivamente son mi ejemplo a seguir en todo sentido. Me inculcaron hermosos principios y me dieron todas las herramientas para alcanzar mis metas. Desde que era una niña me enseñaron a trabajar duro, pero sin dejar de priorizar mi bienestar personal y felicidad. Sin su cariño, dedicación y apoyo nada de esto sería posible. Me ilusiona ver como nuestra familia se va agrandando y espero poder retribuirles con el mismo amor y entrega que ustedes me han brindado.

A Luis, por el enorme cariño que me entregas a diario. Siempre he admirado tu curiosidad por todo lo que nos rodea y tu forma de ver la vida. Desde el comienzo me inspiraste e impulsaste a perseguir mis sueños a pesar de las dificultades. Gracias por apoyarme todos estos años en mis proyectos y por hacerme inmensamente feliz. Te amo.

A mis amigos y compañeros de laboratorio que estuvieron ahí a mi lado en las buenas y en las malas. Que vivieron conmigo los momentos más difíciles y que, gracias a su apoyo y amistad, logré sacar adelante. Nadie más que ustedes entienden lo complejo que ha sido este camino y por esa misma razón, agradezco enormemente a la vida por haberlos puesto en mi camino. Creo que el regalo más lindo que me dejó el doctorado fueron las hermosas personas que llegaron a mi vida, lo cual atesoraré por siempre.

A mis amigos de la vida, que crecieron conmigo y me acompañaron todos estos años. Soy muy afortunada por seguir compartiendo con ustedes aventuras, risas, llantos, conversaciones, carretes y nuestros sueños. Desde que comencé este doctorado ustedes me han impulsado a seguir adelante y a creerme el cuento. Espero tenerlos en mi vida para siempre, los quiero muchísimo.

A scout, por convertirme en la persona que soy el día de hoy. Por enseñarme valores, sentido de entrega social, consciencia por el cuidado del planeta en que vivimos y por despertar en mi la convicción de dejar el mundo mejor de cómo lo encontramos.

Y, por último, a la Universidad de Chile. No ha existido día en el que me arrepienta de mi elección. Su formación dirigida hacia el servicio público, el pluralismo, la

participación y hacia la libertad de pensamiento y expresión, me incentivan a seguir creciendo como profesional y como persona. Este no es el final de una etapa, sino solamente el comienzo...

PRODUCTOS DERIVADOS DE LA TESIS

PUBLICACIONES

- a) Alvarez C, Rojas C, Rojas L, Cafferata EA, Monasterio G, Vernal R. Regulatory T lymphocytes in Periodontitis: A translational View. *Mediators Inflamm.* 2018;2018:7806912.
- b) Rojas L, Melgar-Rodríguez S, Díaz-Zúñiga J, Alvarez C, Monasterio G, Rojas C, Carvajal P, Vernal R. Serotype a of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* down-regulates the increased serotype b-induced cytokine and chemokine production in dendritic cells. *Arch Oral Biol.* 2018;93:155–162.
- c) Monasterio G, Fernández B, Castillo F, Rojas C, Cafferata EA, Rojas L, Álvarez C, Fernández A, Hernández M, Bravo D, Vernal R. Capsular-defective *Porphyromonas gingivalis* mutant strains induce less alveolar bone resorption than W50 wild-type strain due to a decreased Th1/Th17 immune response and less osteoclast activity. *J Periodontol.* 2019; 90(5):522-534.
- d) Monasterio G, Budini V, Fernández B, Castillo F, Rojas C, Alvarez C, Cafferata EA, Vicencio E, Cortés BI, Cortez C, Vernal R. IL-22-expressing CD4⁺AhR⁺ T lymphocytes are associated with RANKL-mediated alveolar bone resorption during experimental periodontitis. *J Periodontal Res.* 2019;54(5):513-524.

- e) Campos-Mora M, Contreras-Kallens P, Gálvez-Jirón F, Rojas M, Rojas C, Refisch A, Cerda O, Pino-Lagos K. CD4⁺Foxp3⁺ T regulatory cells promote transplantation tolerance by modulating effector CD4⁺ T Cells in a Neuropilin-1-dependent manner. *Front Immunol.* 2019;10:822.
- f) Cafferata EA, Terraza-Aguirre C, Barrera R, Faúndez N, González N, Rojas C, Melgar-Rodríguez S, Hernández M, Carvajal P, Cortez C, González FE, Covarrubias C, Vernal R. Interleukin-35 inhibits alveolar bone resorption by modulating the Th17/Treg imbalance during periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2020;47(6):676-688.
- g) Rojas C, Campos-Mora M, Cárcamo I, Villalón N, Elhusseiny A, Contreras-Kallens P, Refisch A, Gálvez-Jirón F, Emparán I, Montoya-Riveros A, Vernal R, Pino-Lagos K. T regulatory cells-derived extracellular vesicles and their contribution to the generation of immune tolerance. *J Leukoc Biol.* 2020;108(3):813-824.
- h) Alvarez C, Suliman S, Almarhoumi R, Vega ME, Rojas C, Monasterios G, Galindo M, Vernal R, Kantarci A. Regulatory T cell phenotype and anti-osteoclastogenic function in experimental periodontitis. *Sci Rep.* 2020 4; 10(1):190118.
- i) González-Osuna L, Sierra-Cristancho A, Rojas C, Cafferata EA, Melgar-Rodríguez S, Cárdenas AM, Vernal R. Premature Senescence of T-cells favors bone loss during osteolytic diseases. A new concern in the osteoimmunology arena. *Aging Dis.* 2021;12(5):1150-1161.

- j) Rojas C, García MP, Polanco AF, González-Osuna L, Sierra-Cristancho A, Melgar-Rodríguez S, Cafferata EA, Vernal R. Humanized mouse models for the study of periodontitis: an opportunity to elucidate unresolved aspects of its immunopathogenesis and analyze new immunotherapeutic strategies. *Front. Immunol.* 2021;12:663328.
- k) Melgar-Rodríguez S, Cafferata EA, Díaz NI, Peña MA, González-Osuna L, Rojas C, Sierra-Cristancho A, Cárdenas AM, Díaz-Zúñiga J, Vernal R. Natural killer T (NKT) cells and periodontitis: potential regulatory role of NKT10 Cells. *Mediators Inflamm.* 2021; 2021:5573937.
- l) González-Osuna L, Sierra-Cristancho A, Cafferata EA, Melgar-Rodríguez S, Rojas C, Carvajal P, Cortez C, Vernal R. Senescent CD4⁺CD28⁻ T lymphocytes as a potential driver of Th17/Treg imbalance and alveolar bone resorption during periodontitis. *Int J Mol Sci.* 2022 25;23(5).
- m) Sierra-Cristancho A, González-Osuna L, Balanta-Melo J, Cafferata EA, Rojas C, Melgar-Rodríguez S, Carvajal P, Vernal R. A micro-CT analysis of radicular dentine thickness in mandibular first premolars presenting C-shaped root canals: Identification of potential danger zones. *Int Endod J.* 2022;55(6):672-684.
- n) Rojas C, Gálvez-Jirón F, De Solminihaç J, Padilla C, Cárcamo I, Villalón N, Kurte M, Pino-Lagos K. Crosstalk between body microbiota and the regulation of immunity. *J Immunology Res.* 2022; 2022:6274265.

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

CONGRESOS INTERNACIONALES

- a) Rojas C, Vega ME, Yañez P, Alvarez C, Vernal R. “Chemokine receptor CCR7 in ectopic lymphoid-cluster formation during periodontitis”. 96th General Session & Exhibition of the IADR/PAN European Regional Congress. 25-28 de julio, 2018. Londres, UK.
- b) Rojas C, Vega ME, Vallejos C, Vernal R, Alvarez C. “Effect of regulatory T-lymphocyte phenotypic stability loss on their suppressive function during experimental periodontitis”. IADR, VII Latin American Region Congress. 30-31 de agosto y 1^{ro} de septiembre, 2018. Montevideo, Uruguay.
- c) **Vega ME**, Rojas C, Vernal R, Alvarez C. “Treg/Th17 imbalance and bone-resorption progression during ligature-induced experimental periodontitis”. Co-autor. IADR, VII Latin American Region Congress. 30-31 de agosto y 1^{ro} de septiembre, 2018. Montevideo, Uruguay.
- d) **Alvarez C**, Vega ME, Rojas C, Galindo M, Kantarci A, Vernal R. “Treg/Th17 Phenotypic plasticity during Experimental Periodontitis”. Co-autor.

IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition. 19-22 de junio, 2019.
Vancouver, Canadá.

- e) **Rojas C**, Campos-Mora M, Gálvez-Jirón F, Vega ME, Pino- Lagos K, Vernal R. “Regulatory T cell-derived extracellular vesicles regulate Th17/Treg imbalance in experimental Periodontitis”. LAMIG-SMI MUCOSAL IMMUNOLOGY SYMPOSIUM. 4-6 de septiembre, 2019. Ciudad de México, México.
- f) **Rojas C**, Terraza C, Cafferata EA, Campos-Mora M, Gálvez-Jirón F, Vega ME, Pino-Lagos K, Vernal R. “Regulatory T cell-derived extracelular vesicles modulate Th1/Th17/Treg imbalance in experimental Periodontitis”. 98th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research (IADR). 18-21 de marzo, 2020. Washington D.C USA.
- g) **Rojas C**, Campos-Mora M, Gálvez-Jirón F, Cafferata EA, Terraza C, Pino-Lagos K, Vernal R. “Isolation, characterization, and immunomodulatory capacity of CD73⁺ Regulatory T cell-derived Extracellular Vesicles”. Extracellular Vesicles in Biomedicine Workshop. 11-13 de enero, 2021. Santiago, Chile.
- h) **Rojas C**, García M, González-Osuna M, Gálvez-Jirón F, De Solminihaç J, Pulgar L, Smyth L, Pino-Lagos K, Vernal R. “CD73-bearing induced Treg-derived extracellular vesicles modulate immune response and prevent alveolar

bone loss during periodontitis”. UK EV Forum. 14-15 de diciembre, 2021. Londres, Reino Unido.

- i) **Rojas C**, García M, González-Osuna M, De Solminihaç J, Pulgar L, Pino-Lagos K, Vernal R. “Enzymatically active CD73-bearing RATreg-derived extracellular vesicles modulate immune response and prevent alveolar bone loss during periodontitis”. 13th Latin American and Caribbean Congress of Immunology ALACI 22/ 7th Congress of Cuban Society for Immunology”. 6-10 de junio, 2022. Varadero, Cuba.
- j) **Rojas C**, García M, González-Osuna M, Gálvez-Jirón F, Cafferata EA, Pino-Lagos K, Vernal R. “CD73-bearing Treg-derived extracellular vesicles modulate in vitro and in vivo immune response and prevent alveolar bone loss during periodontitis”. 100th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research (IADR)/ 5th Meeting of the IADR Asia Pacific Region. 20-25 de junio, 2022.Chengdu, China.

CONGRESOS NACIONALES

- a) Coquidán M, Barrera R, Segura J, **Rojas C**, Vernal R. “Immunomodulator effect of regulatory T lymphocytes-derived exosomes and their potential role in Periodontitis”. International Association of Dental Research, IADR, Young Researchers Symposium. Universidad Andrés Bello. 7 de julio, 2018. Santiago, Chile.

- b) **Rojas C**, Campos-Mora M, Gálvez-Jirón F, Elhusseiny A, Refisch A, Vernal R, Pino-Lagos K. “Characterization and Immunosuppressive effect of extracellular vesicles derived from natural and induced Regulatory T lymphocytes”. III Scientific Health Symposium. 1-2 de agosto, 2019. Universidad de los Andes. Santiago, Chile.
- c) **Rojas C**, Terraza C, Cafferata EA, Campos-Mora M, Gálvez-Jirón F, Vega ME, Pino-Lagos K, Vernal R. “Regulatory T cell-derived extracellular vesicles modulate Th1/Th17/Treg imbalance during experimental periodontitis”. XXXI Annual Meeting of the International Association of Dental Research. 29-30 de agosto, 2019. Universidad de Los Andes. Santiago, Chile.
- d) **Cafferata EA**, Terraza C, Barrera R, Faúndez N, González N, Cortés B, Cortés C, Vernal R, **Rojas C**, Melgar-Rodríguez S. “Interleukin-35 inhibits alveolar bone resorption during periodontitis by modulating the Treg/Th17 imbalance. Co-autor. XXXI Annual Meeting of the International Association of Dental Research. 29-30 de agosto, 2019. Universidad de Los Andes. Santiago, Chile.
- e) **Rojas C**, Campos-Mora M, Gálvez-Jirón F, Cafferata EA, Terraza C, Pino-Lagos K, Vernal R. “Regulatory T-cell-derived extracellular vesicles suppress T-cell proliferation and modulate the Th1/Th17/Treg imbalance during periodontitis.” III Annual ASOCHIN (Asociación Chilena de Inmunología) Meeting. 18-20 de noviembre, 2020, Santiago, Chile.

- f) **Rojas C**, García M, González-Osuna Luis, Gálvez-Jirón F, Cafferata E, Pino-Lagos K, Vernal, Rolando. “CD73-bearing Treg-derived extracellular vesicles modulate *in vitro* and *in vivo* immune response and prevent alveolar bone loss during periodontitis”. XXXIII Annual Meeting of International Association of Dental Research, IADR. 20 de agosto, 2021. Santiago, Chile.
- g) **Rojas C**, García M, González-Osuna L, Gálvez-Jirón F, De Solminihac J, Vernal R, Pino-Lagos K. CD73-bearing retinoic acid-induced Treg-derived extracellular vesicles modulate immune response and prevent alveolar bone loss during periodontitis. 4th Annual Meeting ASOCHIN. 23-25 de noviembre, 2021. Santiago de Chile.
- h) **Rojas C**, García M, González-Osuna L, Smyth L, Pino-Lagos K, Vernal R. CD73-bearing Treg-derived extracellular vesicles modulate *in vitro* and *in vivo* immune response and prevent alveolar bone loss during periodontitis. XXXIV Annual Meeting of International Association of Dental Research, IADR. 5 de noviembre, 2022. Santiago, Chile.
- i) **Rojas C**, García M, González-Osuna L, Sierra-Cristancho A, De Solminihac J, Smyth L, Pino-Lagos K, Vernal R. RATreg-derived extracellular vesicles promote immune suppression and prevent alveolar bone loss during periodontitis: potential role of CD73-mediated adenosine production. 5th Annual Meeting ASOCHIN. 20 y 21 de noviembre, 2022. Pirque, Chile.

- j) **Rojas C**, García M, González-Osuna L, Sierra-Cristancho A, De Solminihac J, Pino-Lagos K, Vernal R. RATreg-derived extracellular vesicles promote T cell suppression and prevent alveolar bone loss during periodontitis: role of CD73-mediated adenosine production. XXXIV Reunión Anual Sociedad de Biología Celular de Chile. 12 al 16 de diciembre, 2022. Puerto Varas, Chile.
- k) **Rojas C**, García M, González-Osuna L, Sierra-Cristancho A, De Solminihac J, Pino-Lagos K, Vernal R. RATreg-derived extracellular vesicles promote T cell suppression and prevent alveolar bone loss during periodontitis: role of CD73-mediated adenosine production. II Workshop “Extracellular Vesicles in Biomedicine”. 11 y 12 de enero, 2023. Universidad de los Andes, Santiago de Chile.

PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

- a) Proyecto FONDECYT regular 1181780 (2018-2022): “Role of IL-35, all-trans retinoic acid, and T regulatory-derived exosomes in inhibiting the tooth-supporting bone resorption during periodontitis through modulation of the Th17/Treg imbalance”.

Investigador responsable: Dr. Rolando Vernal Astudillo.

Calidad de participación: Tesista.

- b) Proyecto FONDECYT Regular 1160347 (2016-2020): “Neuropilin-1 and IL-33: two targets of study to comprehend the biology of regulatory T cells in transplantation tolerance”.

Investigador responsable: Dra. Karina Pino Lagos.

Calidad de participación: Apoyo en el desarrollo experimental.

- c) Proyecto FONDECYT Regular 1210654 (2021-2025): “Small extracellular vesicles obtained from Neuropilin-1⁺ T regulatory cells as a new tool for the induction of transplantation tolerance”.

Investigador responsable: Dra. Karina Pino Lagos.

Calidad de participación: Apoyo en el desarrollo experimental.

- d) Proyecto FONDECYT regular 1220999 (2022-2026): “The therapeutic effects of RA-induced Treg-derived extracellular vesicles in periodontitis: Inhibition of alveolar bone resorption and promotion of its formation through the modulation of the periodontal immune response.”

Investigador responsable: Dr. Rolando Vernal Astudillo.

Calidad de participación: Apoyo en el desarrollo experimental.

BECAS Y DISTINCIONES

- a) Beca de Doctorado Nacional de la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID). Período 2018-2022.
- b) The Histochemical Society Travel Award for oral presentation on the LAMIG-SMI MUCOSAL IMMUNOLOGY SYMPOSIUM. Ciudad de México, México.
- c) Society for Leukocyte Biology Trainee Award for best poster presentation on the LAMIG-SMI MUCOSAL IMMUNOLOGY SYMPOSIUM. Ciudad de México, México.
- d) Chilean Division Hatton Basic Science Research Distinction for oral presentation: “Regulatory T cell-derived extracellular vesicles modulate Th1/Th17/Treg imbalance during experimental periodontitis”. XXXI Annual Meeting of International Association of Dental Research, IADR. 29 y 30 de Agosto 2019. Santiago, Chile.
- e) Tercer lugar en el “XIV Congreso Regional de la Ciencia y Tecnología” por el trabajo “Efecto del extracto de boldo en la regeneración del hueso. Proyecto EXPLORA, Protagonistas de la Ciencia, Región Metropolitana Surponiente. 2019.
- f) Beca de Gastos Operacionales como beneficio complementario de Beca de Doctorado Nacional ANID. Período 2020 y 2021.

- g) “2020 IADR Unilever Hatton Award Competitor”. IADR Centennial, Washington, D.C USA. Marzo 18-21 2020.
- h) “Most Viewed Video-poster”. Workshop “Extracellular Vesicles in Biomedicine”. 13 de Enero 2021.
- i) Chilean Division Hatton Basic Science Research Distinction for oral presentation: “CD73-bearing Treg-derived extracellular vesicles modulate *in vitro* and *in vivo* immune response and prevent alveolar bone loss during periodontitis”. XXXIII Annual Meeting of International Association of Dental Research, IADR. 20 de Agosto 2021. Presentación oral. Santiago, Chile.
- j) Beca para pasantías en el extranjero como beneficio complementario de Beca de Doctorado Nacional ANID. Londres, Reino Unido. Período 2021-2022.
- k) LAMIG-SMI Travel Award Scholarship para asistir al congreso “13th Latin American and Caribbean Congress of Immunology ALACI 22/ 7th Congress of Cuban Society for Immunology”. Junio 6-10, 2022. Varadero, Cuba.
- l) First Place Senior Basic Science Category- IADR Hatton Competition. “100th General Session & Exhibition of the IADR/ 5th Meeting of the IADR Asia Pacific Region.”. June 20-25, 2022. Chengdu, China.

- m) Beca de Estudiante de Doctorado para asistencia a XXXIV Reunión Anual de la Sociedad de Biología Celular de Chile (SBCCCh). 12-16 de diciembre, 2022. Puerto Varas, Chile.
- n) Premio a la mejor presentación de póster en la categoría “Mucosal Immunology”. 5th Annual Meeting ASOCHIN. 20 y 21 de noviembre, 2022. Pirque, Chile.
- o) Premio IADR para la mejor presentación de póster en la categoría de “Investigación odontológica”, otorgado por la International Association for Dental Research- División Chile. 5th Annual Meeting ASOCHIN. 20 y 21 de noviembre, 2022. Pirque, Chile.
- p) Medalla Hermann Niemeyer. Reconocimiento por excelencia y trayectoria científica otorgada por la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile (SBBMCh). Hotel Colinas de Cuncumén, V Región, Chile.

PASANTÍAS INTERNACIONALES

- a) Pasantía Internacional. Health, Sports and Biosciences School, University of East London. Londres, Reino Unido. Desde el 17 de octubre 2021 al 31 de marzo 2022. Bajo la tutela de la Dra. Lesley Smyth.

OTRAS ACTIVIDADES

- a) Proyecto Arte y Ciencia. Fundación Arte y Ciencia. Laboratorio de Inmunología, Universidad de los Andes. Abril-septiembre 2019.

- b) Programa “Protagonistas de la Ciencia” (PAR) Explora Región Metropolitana Sur Poniente. Asesoría Científica en el desarrollo de la investigación escolar “Efecto del extracto de boldo en la remodelación del hueso”, enseñanza básica. Mayo-octubre, 2019.
- c) Conformación del Consejo de delegados de postgrado y postítulo. Facultad de Odontología, Universidad de Chile. 2020
- d) Curso “Herramientas introductorias para el desarrollo de docencia universitaria”. Centro de estudios y Desarrollo de Educación Continua para el magisterio, SABERES DOCENTES. Facultad de filosofía y humanidades, Universidad de Chile. Desde el 5 de agosto hasta 6 de octubre 2020. Santiago de Chile.
- e) Taller “Imaginando Juntos el Futuro de la Ciencia”. Proyecto PIA SOC180039 “PRODUCCIÓN DE CONOCIMIENTO EN EL CHILE CONTEMPORÁNEO”.
- f) Feria Científica Colegio Antilhue. Jurado de proyectos de ciencia y tecnología desarrollado por estudiantes de la categoría 5^{to} y 6^{to} básico. Expositora de charla a 1^{ros} medios “¿Cómo y porque cuidar nuestra salud oral?”. 20 de octubre 2022. La Florida, Santiago de Chile.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
Linfocitos T reguladores como moduladores de la respuesta inmune	1
Inestabilidad fenotípica de los Tregs durante la inflamación crónica.....	3
Periodontitis y resorción ósea alveolar	3
Macrófagos durante la periodontitis.....	4
Rol del desbalance Th17/Treg durante la periodontitis	7
Vesículas extracelulares derivadas de Tregs como agentes inmunomoduladores	10
Actividad supresora de los Tregs y TEVs mediada por CD73	13
Planteamiento del problema.....	16
II. HIPÓTESIS.....	18
III. OBJETIVOS	19
III.1 OBJETIVO GENERAL	19
III.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	20
Animales	20
Inducción de RATregs	20

Purificación de vesículas extracelulares derivadas de RATregs (RATEVs)	21
Caracterización de las VEs.....	21
Imaging Flow cytometry de células y VEs.	22
Ensayo de bio-distribución.....	23
Evaluación de la actividad de CD73	24
Ensayo de supresión sobre leucocitos	26
Ensayo de supresión con RATEVs sobre LTs CD4 ⁺ CD73 ⁻ y CD73 ⁺ en presencia de AMP ± APCP (inhibidor de CD73)	27
Inducción de la periodontitis experimental	28
Análisis de la frecuencia y fenotipo de LTs (Th17/Treg) y Macs (M1/M2)	29
Análisis de la pérdida ósea alveolar	30
Detección de OCs mediante análisis histológico	32
Análisis estadísticos	32
V. RESULTADOS.....	34
Los Tregs inducidos en presencia de ácido retinoico (RATregs) expresan altos niveles de FoxP3, CD25 y CD73.	34

Caracterización de las VEs derivadas de RATregs (RATEVs). Tamaño, presencia de CD73, CD81, y bio-distribución.	37
Evaluación de la actividad AMPasa de CD73 presente en RATregs y RATEVs.....	43
OBJETIVO 1: Caracterizar el rol de CD73 como mecanismo inmunomodulador de las VEs derivadas de RATregs mediante la evaluación de su efecto sobre la proliferación, activación y fenotipo de linfocitos T CD4 ⁺ <i>in vitro</i> en presencia de su inhibidor.	47
OBJETIVO 2: Analizar el efecto de las vesículas extracelulares derivadas de RATregs en la frecuencia y fenotipo de Macs (M1/M2) y linfocitos T CD4 ⁺ (Th17/Treg) durante la periodontitis.....	60
OBJETIVO 3: Analizar el efecto de las VEs derivadas de RATregs en la resorción ósea alveolar durante la periodontitis.....	71
VI. DISCUSIÓN	76
VII. CONCLUSIONES	92
VIII. FIGURAS SUPLEMENTARIAS	95
IX. BIBLIOGRAFÍA	102
X. ANEXOS	126
X.2. ANEXO 1: Carta de Aprobación Comité de Bioética Animal.....	126

X.3. ANEXO 2: Paneles de Anticuerpos para caracterización fenotípica de Macs y LTs en el modelo de periodontitis experimental.....	127
---	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Los RATregs presentan el fenotipo característico de los Tregs (CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ CD25 ^{high}) y una alta expresión superficial de CD73.	36
Figura 2: Las RATEVs presentan las características canónicas de las VEs, una alta expresión de CD73 y permanecen en el sitio de administración tras su inoculación gingival por al menos 7 días.....	41
Figura 3: La ectoenzima CD73 presente en RATregs y RATEVs genera fosfato y adenosina a partir de la hidrólisis de AMP.	46
Figura 4: Las RATEVs suprimen y estimulan la proliferación/ activación de LTs CD4 ⁺ y CD8 ⁺ , respectivamente.....	51
Figura 5: La función AMPasa de CD73 presente en las RATEVs es determinante para su efecto inmunosupresor sobre LTs CD4 ⁺	58
Figura 6: Las RATEVs modulan la respuesta de LTs CD4 ⁺ presentes en la mucosa gingival durante la periodontitis suprimiendo su activación, secreción de IL-17A y expresión de RANKL.....	63
Figura 7: El tratamiento con RATEVs durante la periodontitis promueve la expresión de CD73 en los LTs presentes en los linfonodos cervicales.....	67
Figura 8: El tratamiento con RATEVs durante la periodontitis disminuye la expresión de CD86 y CD206 en Macs infiltrantes de la mucosa gingival.....	69

Figura 9: El tratamiento con RATEVs previene la resorción ósea alveolar durante la periodontitis.	74
Figura 10: Detección de OCs TRAP ⁺ durante la periodontitis y ante el tratamiento con RATEVs.....	75
Figura Suplementaria 1: Estrategia de <i>gating</i> para la caracterización de linfocitos RATregs.....	95
Figura Suplementaria 2: Estrategia de <i>gating</i> para <i>cell sorting</i> y pureza <i>post sort</i> de LTs CD4 ⁺ CD73 ⁺ y CD4 ⁺ CD73 ⁻	96
Figura Suplementaria 3: Estrategia de <i>gating</i> para linfocitos T aislados de la mucosa gingival.....	97
Figura Suplementaria 4: Estrategia de <i>gating</i> para LT aislados del linfonodos cervicales.	98
Figura Suplementaria 5: Estrategia de <i>gating</i> para macrófagos aislados de la mucosa gingival.....	99
Figura Suplementaria 6: Modelo propuesto sobre el efecto <i>in vivo</i> de RATEVs en periodontitis experimental e <i>in vitro</i>	100

RESUMEN (español)

Introducción: La hidrólisis del AMP extracelular gatillada por la ecto-5'-nucleotidasa CD73 genera adenosina (ADO), una potente molécula inmunosupresora que limita la inflamación. Los linfocitos T (LTs) reguladores murinos inducidos en presencia de ácido retinoico (RATregs) y sus vesículas extracelulares secretadas (RATEVs) están enriquecidas en CD73, lo que podría dotarlas de funciones inmuno-moduladoras acelulares. La naturaleza inflamatoria de la periodontitis desencadenada por una respuesta inmune desregulada promueve la resorción ósea. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de las RATEVs sobre la respuesta inmune y la resorción ósea alveolar inducida durante la periodontitis. Paralelamente, exploramos la capacidad inmunosupresora de las RATEVs sobre la función efectora de los LTs *in vitro*, así como el rol de CD73 en este efecto.

Métodos: RATregs y RATEVs se aislaron y caracterizaron. El enriquecimiento de CD73 en las RATEVs se caracterizó por Western Blot, citometría de flujo de generación de imágenes (IFC) y convencional (FC), mientras que su actividad enzimática (AMPasa) se estudió mediante ensayos de producción de ADO y fosfato. El efecto de las RATEVs sobre la respuesta inmune y la pérdida de hueso alveolar asociados a la periodontitis se evaluó en un modelo murino mediante FC y análisis morfométrico/histológico, respectivamente. Por último, la capacidad inmunosupresora de las RATEVs se caracterizó evaluando su efecto sobre la proliferación y activación de LTs, mientras que

la relevancia de CD73 cargada en las RATEVs se estudió a través del bloqueo de su actividad AMPasa utilizando un inhibidor específico de CD73.

Resultados: Los RATregs y las RATEVs mostraron una alta expresión de CD73 y actividad AMPasa. Durante la periodontitis, las RATEVs redujeron la activación de los LTs CD4⁺, la secreción de IL-17A, la expresión de RANKL, y previnieron la resorción ósea alveolar. Además, en presencia de AMP, las RATEVs suprimieron a los LTs CD4⁺, efecto que fue parcialmente revertido ante la adición del inhibidor de CD73.

Conclusión: Los RATregs secretan VEs enriquecidas en CD73 enzimáticamente activa. Las RATEVs suprimen la respuesta efectora de los LTs CD4⁺ y previenen la pérdida ósea alveolar inducida por la periodontitis, proceso que depende de la actividad AMPasa de CD73.

ABSTRACT (inglés)

Introduction: Extracellular AMP hydrolysis prompted by CD73 ecto-5'-nucleotidase generates adenosine, a potent immune suppressor that limits inflammation. Murine T regulatory cells induced in the presence of retinoic acid (RATregs) and their secreted extracellular vesicles (RATEVs) are enriched in CD73, which might endow them acellular immunomodulatory functions. The inflammatory nature of periodontitis triggered by a deregulated immune response promotes bone resorption. Therefore, we aimed to evaluate RATEV's effect over periodontitis-induced immune response and alveolar bone resorption. In addition, we explored RATEV's immunosuppressive capacity on T cells effector function *in vitro*, as well as CD73's involvement.

Methods: RATregs and RATEVs were isolated and characterized. CD73 enrichment on RATEVs was characterized by Western Blot, imaging (IFC), and conventional Flow Cytometry (FC), whereas its enzymatic (AMPase) activity was studied by adenosine and phosphate production assays. RATEVs effect on periodontitis-associated immune response and alveolar bone loss were evaluated on murine model using FC and morphometric/histological analysis, respectively. Finally, RATEVs immunosuppressive capacity was assessed evaluating their effect on T cells proliferation and activation, whereas the relevance of RATEVs-derived CD73 was tested by blocking their AMPase activity with a specific CD73 inhibitor.

Results: RATregs and RATEVs showed high CD73 expression and AMPase activity. During periodontitis, RATEVs reduced CD4⁺ T cells activation, IL-17A secretion, RANKL expression, and prevented alveolar bone resorption. Moreover, in the presence of AMP, RATEVs suppressed CD4⁺ T cells, effect that was partially reverted by the addition of CD73 inhibitor.

Conclusion: RATregs release EVs enriched in enzymatically active CD73. RATEVs suppress CD4⁺ T cells effector responses and prevent periodontitis-induced alveolar bone loss, process that largely relies on CD73's AMPase activity.

I. INTRODUCCIÓN

Linfocitos T reguladores como moduladores de la respuesta inmune

Los linfocitos T (LTs) son células inmunes capaces de reconocer un amplio rango de antígenos mediante su receptor TCR (T cell receptor) e iniciar una respuesta ante ellos. Luego de la interacción del TCR con el complejo MHC-antígeno, expuesto por las células presentadoras de antígeno (APCs) en un microambiente de citoquinas particular, los LTs vírgenes (*naïve*) se activan y diferencian en LT efectores o reguladores. En este sentido, se pueden clasificar en LT colaboradores (CD4⁺), reguladores (Tregs) o T citotóxicos (CD8⁺), dependiendo si presentan un fenotipo efector, supresor o citotóxico, respectivamente (1).

El sistema inmune es capaz de proteger al hospedero ante un amplio rango de antígenos exógenos y, a la vez, de no reaccionar ante antígenos propios, previniendo respuestas desreguladas, proceso conocido como tolerancia inmune. La tolerancia inmune involucra la actividad de células específicas con propiedades inmunosupresoras, entre las cuales los Tregs han demostrado ser los más relevantes (2). Su función consiste en restaurar y mantener la homeostasis inmune, controlando la autoinmunidad y la inflamación exacerbada, evitando así que las células inmunes activadas causen daño (3, 4). Los Tregs se caracterizan fenotípicamente por la expresión de Forkhead box P3 (FoxP3), factor de transcripción maestro que determina su perfil genético, diferenciación, estabilización fenotípica y función (5). Además, expresan constitutivamente la cadena alfa del receptor

de interleuquina (IL)-2, conocido como CD25, al cual se une IL-2, citoquina necesaria para la diferenciación, activación y expansión de los LTs, incluyendo los Tregs (5).

Según su ontogenia, los Tregs se clasifican en tímicos (tTregs) o periféricos (pTregs) (6), ambos considerados como Tregs naturales (nTregs) que cumplen funciones biológicas esenciales (7-9). Los tTregs se desarrollan en el timo a partir de interacciones de alta afinidad con antígenos auto-reactivos expresados por los timocitos, pasando a la circulación periférica con un fenotipo $CD4^{+}FoxP3^{+}CD25^{high}$, por lo que son particularmente importantes en la prevención de trastornos autoinmunes (10, 11). Por otro lado, los pTregs se generan en los tejidos periféricos a partir de LTs *naïve* tras la presentación antigénica en presencia de IL-2 y el factor de crecimiento transformante (TGF)- β 1, presentando un fenotipo $CD4^{+}Foxp3^{+}CD25^{+}$ (12). Debido a que el número de nTregs fisiológicamente disponibles es limitado, se han desarrollado estrategias de generación de Tregs *in vitro*. Estos Tregs son inducidos a partir de precursores *naïve* en presencia de las citoquinas previamente mencionadas, es decir, TGF- β 1 e IL-2 (13). Adicionalmente, otros factores, tales como el ácido retinoico *all trans* (ATRA), metabolito activo derivado de la vitamina A, han demostrado potenciar la inducción y diferenciación de Tregs en distintos contextos biológicos y experimentales (14, 15). En particular, el ATRA contribuye a la consolidación del linaje y función supresora de los Tregs mediante la estabilización de FoxP3 (16), motivo por el cual en el presente estudio trabajamos con Tregs inducidos en presencia de RA (RATregs).

Inestabilidad fenotípica de los Tregs durante la inflamación crónica

Una de las características de los Tregs es que, luego de su diferenciación, mantienen cierta plasticidad funcional. Es así como en condiciones particulares como la inflamación crónica, los Tregs tienden a perder su función reguladora (17). De esta manera, los Tregs pueden volverse inestables o disfuncionales frente a la exposición a ciertas citoquinas proinflamatorias, las que pueden influir en el estado de FoxP3 a nivel epigenético o postraducciona (18, 19). Bajo ciertas circunstancias, los Tregs también pueden adquirir características del tipo efector sin perder la expresión de FoxP3, generando fenotipos híbridos, tal como FoxP3⁺Tbet⁺IFN γ ⁺ o Foxp3⁺ROR γ t⁺IL-17A⁺, con funciones similares a los LTs efectores tipo Th1 y Th17 que secretan citoquinas proinflamatorias tales como IFN γ e IL-17A, respectivamente (17). Este proceso se vuelve altamente relevante en patologías como la periodontitis, enfermedad inflamatoria crónica en la cual el efecto inmunomodulador, y por lo tanto la estabilidad de los Tregs, es crítica en la patogenia de la enfermedad.

Periodontitis y resorción ósea alveolar

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica cuya etiología se ha atribuido a un proceso disbiótico polimicrobiano responsable de desencadenar una respuesta inmune local desregulada, la cual induce la destrucción de los tejidos de soporte de los dientes (20). La resorción ósea alveolar es una de las características distintivas de la

periodontitis, la cual se manifiesta clínicamente como pérdida de inserción periodontal, formación del saco periodontal y, eventualmente, la pérdida de los dientes (21).

Los osteoclastos (OCs) son las células responsables de la resorción ósea alveolar (22). La diferenciación, actividad y supervivencia de los OCs es regulada fundamentalmente por una tríada de proteínas: el receptor activador del factor nuclear κ B (RANK), su ligando (RANKL) y el inhibidor soluble específico de RANKL denominado osteoprotegerina (OPG). RANKL induce la osteoclastogénesis al interactuar con el receptor RANK expresado en células precursoras, mientras que OPG inhibe esta interacción mediante el secuestro de RANKL, evitando su unión a RANK. De esta manera, el balance entre los niveles de RANKL/OPG determina el número de OCs diferenciados y la magnitud de la pérdida ósea (23).

En el contexto periodontal, para mantener la homeostasis tisular, incluida la del tejido óseo, el sistema inmune patrulla proactivamente el periodonto que está en contacto constante con la microbiota unida al diente (20). Así, en salud, se constituye un infiltrado celular rico en macrófagos y LTs que mantienen la homeostasis periodontal y, en caso de patología, orquestan la inmunidad.

Macrófagos durante la periodontitis

Los macrófagos (Macs) ($CD45^{+}F4/80^{+}$) son células inmunes innatas que responden rápidamente ante la infección, presentando distintas respuestas ante los microorganismos. En este contexto, exhiben múltiples funciones claves en el desarrollo

y resolución de patologías asociadas a inflamación crónica, tales como: la fagocitosis (24), presentación antigénica, estimulación de LTs (25) y secreción de citoquinas que amplifican la respuesta inmune (24). En los tejidos periodontales, los Macs pueden presentarse como residentes tisulares o células infiltrantes derivadas de monocitos atraídos por quimioquinas. Ambos tipos contribuyen significativamente a la homeostasis celular y defensa ante microorganismos (26). Sin embargo, distintos productos bacterianos, tales como las endotoxinas, pueden activar el sistema monocito/macrófago incrementando el número de Macs en el periodonto y la producción de factores proinflamatorios, causando inflamación y destrucción tisular (27).

Según su mecanismo de activación, los Macs se polarizan y exhiben distintos fenotipos funcionales, tradicionalmente clasificándose en M1 (vía clásica) o M2 (alternativa). Los M1 expresan niveles altos de CD86 (molécula co-estimuladora, indicadora de activación celular) y se pueden inducir por componentes microbianos o citoquinas proinflamatorias, tales como lipopolisacáridos (LPS) e interferón (IFN)- γ . Funcionalmente, favorecen la fagocitosis de patógenos y estimulan la activación de neutrófilos y LTs a través de la producción de IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) y factor de necrosis tumoral (TNF)- α (28, 29). Por otro lado, los M2 expresan altos niveles de CD206 (receptor de manosa) y son inducidos por citoquinas antiinflamatorias como IL-4 e IL-13. Así, están involucrados principalmente en la resolución de la inflamación y la regeneración tisular mediante la secreción de citoquinas antiinflamatorias y pro-

angiogénicas, como IL-10 y TGF- β (30, 31). Cabe destacar que, en las enfermedades inflamatorias, la función de los Macs responde a un equilibrio dinámico entre las funciones proinflamatorias y antiinflamatorias de los fenotipos M1 y M2; sin embargo, también existe un amplio espectro de fenotipos mixtos entre ellos (32). Considerando esto y debido a la basta complejidad y distintas capacidades que presentan los Macs, en la actualidad se propone clasificarlos como inflamatorios (iMacs) o asociados a la resolución de la inflamación (rMacs) (32-35).

Durante la periodontitis, los iMacs (tipo M1) fagocitan microorganismos y fragmentos tisulares y, además, expresan altos niveles de MHC II y moléculas co-estimuladoras (tales como CD80/CD86), por lo que tienen una alta capacidad de presentación antigénica (36, 37). Además, producen citoquinas proinflamatorias, metaloproteinasas de matriz MMP-1 y MMP-2, iNOS y ciclooxigenasa (COX-2). Dado las citoquinas que producen, los Macs tipo M1 inducen respuestas inmunes del tipo linfocitario Th1 y Th17 en los LTs residentes de memoria, incrementando la inflamación. Adicionalmente, el fenotipo tipo M1 está estrechamente relacionado con el fenómeno de resorción ósea, dado que potencian la osteoclastogénesis mediante la secreción de TNF- α , prostaglandina (PGE₂), IL-1 β , IL-6 e IL-12 (37, 38), jugando un rol destructivo durante la periodontitis.

Durante la resolución de la inflamación, los monocitos infiltrados se diferencian a rMacs (tipo M2), los que comparten características funcionales tanto de tipo M1 como de tipo

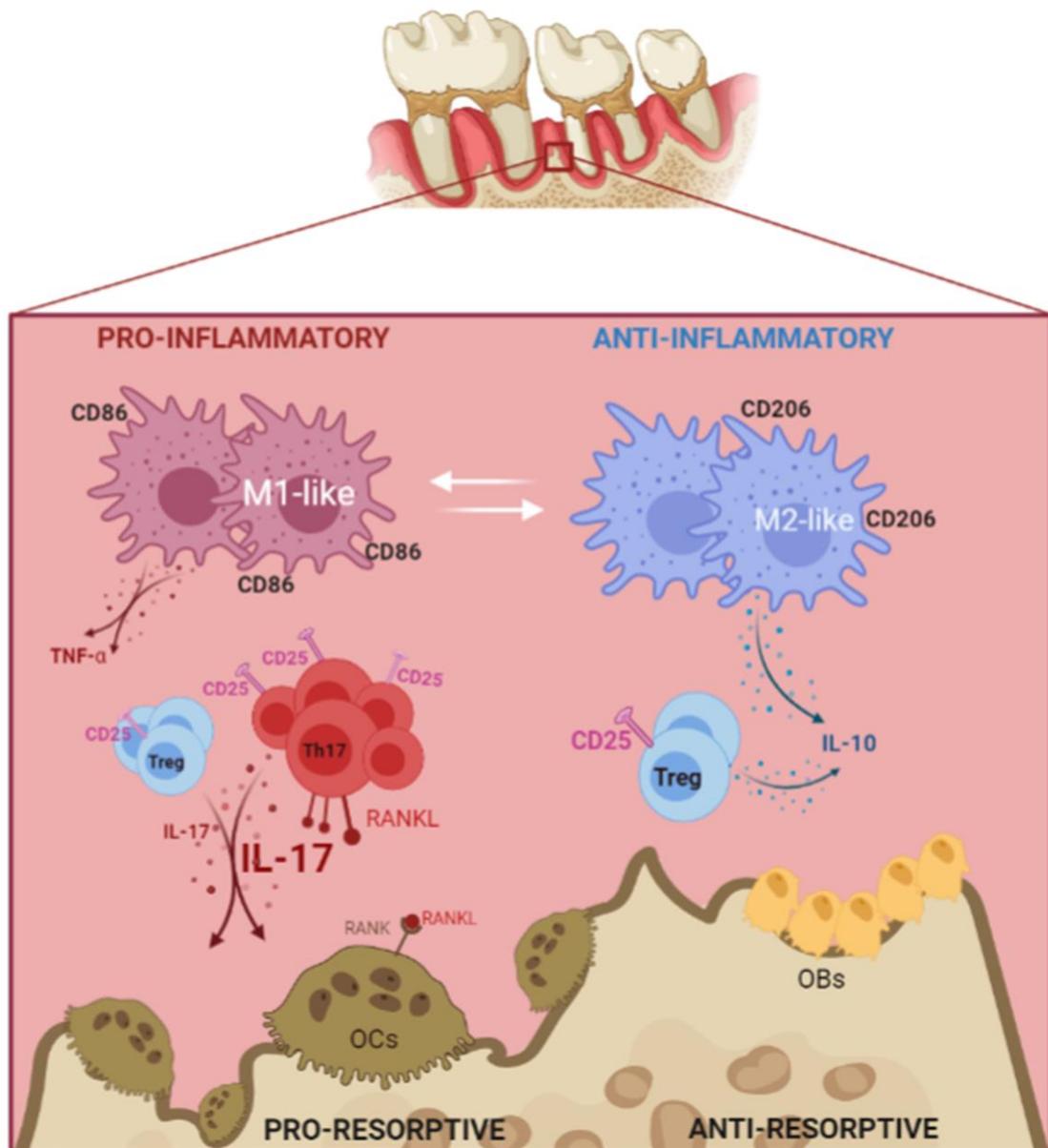
M2. Así, producen citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias, procesan y presentan antígenos y fagocitan células apoptóticas (eferocitosis) (39, 40). Esto último implica la remoción de una importante fuente de factores proinflamatorios, favoreciendo la reparación tisular (41). En este sentido, durante la periodontitis, se establecería un predominio de actividades proinflamatorias, favoreciendo el fenómeno osteo-destructivo, debido a que los Macs no serían capaces de ejecutar funciones pro-resolutivas eficientemente (42).

Rol del desbalance Th17/Treg durante la periodontitis

En los tejidos periodontales sanos, los LTs son la población celular dominante dentro del compartimiento linfocitario, y durante la periodontitis, los LTs pueden aumentar hasta 10 veces más (43, 44). Entre los LTs colaboradores, los del tipo Th17 son determinantes clave de la resorción ósea alveolar durante la periodontitis (44-46). Ellos expresan el factor de transcripción ROR γ t y producen cantidades importantes de citoquinas, incluyendo IL-17A, motivo por el cual reciben ese nombre. Los LTs Th17 pueden activar la osteoclastogénesis de manera directa mediante la expresión de RANKL o indirecta mediante la producción de IL-17A, la que a su vez induce la expresión de RANKL en osteoblastos y fibroblastos (47, 48). Sin embargo, los Th17 no son los únicos LTs CD4⁺ productores de IL-17A. Recientemente, se han identificado LTs FoxP3⁺IL-17A⁺ en los tejidos periodontales afectados de periodontitis, sugiriendo un rol de los Tregs en la patogénesis de la enfermedad (49-51).

En condiciones de homeostasis, los Tregs están asociados a salud periodontal (52, 53) y cumplen un rol protector óseo controlando el daño tisular mediante la supresión de células proinflamatorias (54, 55). No obstante, el número de Tregs aumenta durante la periodontitis, en un intento de controlar la actividad de las células proinflamatorias, incluyendo a los LTs Th17, y de esta forma el daño tisular (56, 57). Los linfocitos Th17 y Tregs poseen una vía de diferenciación común dependiente de la presencia de TGF- β 1 (58). En este sentido, la detección de LTs FoxP3⁺IL-17⁺ podría implicar una transdiferenciación de Tregs hacia un perfil Th17, lo cual potenciaría la actividad proinflamatoria y osteodestructiva. Así, un equilibrio entre Th17 y Tregs favorecería la salud periodontal; en cambio, el desbalance Th17 >Tregs favorecido por las condiciones inflamatorias locales promovería la resorción ósea alveolar durante la periodontitis. Los eventos inmunológicos previamente mencionados, desarrollados durante la periodontitis, se representan en el **Esquema 1**.

Esquema 1: Respuesta inmune de Macs y LTs durante la periodontitis.

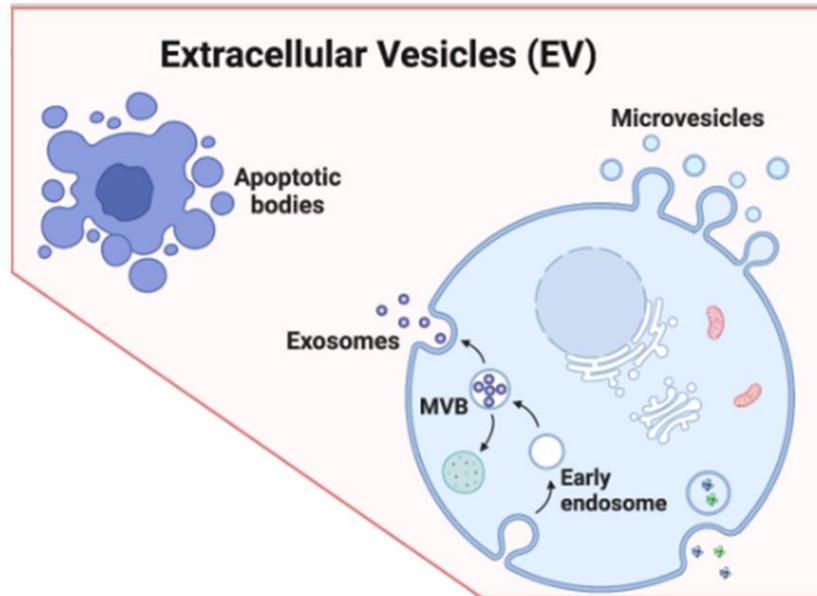


Vesículas extracelulares derivadas de Tregs como agentes inmunomoduladores

En los últimos años, la acción de las vesículas extracelulares (VEs) derivadas de Tregs (TEVs) se han identificado como un nuevo mecanismo mediante el cual los Tregs ejercen la inmunosupresión de manera independiente al contacto célula a célula (59).

Las VEs se definen como estructuras membranosas que encierran citoplasma en una bicapa lipídica, liberadas por, esencialmente, todos los tipos celulares (60). Son consideradas como mediadores de la comunicación intercelular ya que actúan transportando lípidos, proteínas y material genético, capaces de generar una respuesta en las células receptoras participando en diferentes procesos tanto fisiológicos como patológicos (61, 62). Basado en el mecanismo de biogénesis, las VEs se clasifican principalmente en dos categorías: Microvesículas (MVs) y Exosomas (Exos) (60, 63), lo cual se representa en el **Esquema 2**.

Esquema 2: Biogénesis de las vesículas extracelulares.



Las MVs (también llamadas micropartículas o ectosomas), se desprenden directamente de la membrana plasmática al espacio extracelular y tienen un amplio rango de tamaños, llegando hasta 1 μm (64). Al contrario, los Exos son VEs pequeñas de <200 nm de diámetro de origen endosomal, formados como vesículas intraluminales al interior de cuerpos multivesiculares (MVBs) que son liberados una vez que éstas se fusionan con la membrana celular (65-67). Los Exos se generan y secretan gracias a la actividad de la maquinaria celular ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*) (68), que consiste en una familia de proteínas que se asocian en complejos sucesivos (ESCRT 0, I, II y III) en la membrana de los MVBs, para regular el contenido y la formación de vesículas intraluminales (69). Por otro lado, también pueden formarse mediante

mecanismos dependientes de ceramidas (70) o por la acción de proteínas de la familia de las tetraspaninas. En particular, CD9, CD63 y CD81 se han caracterizado como tetraspaninas potencialmente acumuladas en los MVBs y, en consecuencia, en los Exos (60). Por esta razón, la presencia de proteínas pertenecientes al complejo ESCRT o tetraspaninas, se utilizan para caracterizar a los Exos como prueba de su origen endosomal (71).

Las TEVs pueden ejercer funciones inmunoregulatoras directas en las células blanco (72-75) y, además, pueden potenciar la capacidad inmunosupresora de los Tregs preexistentes. Así, pueden suprimir a los LTs efectoras e incluso favorecer en ellos la adquisición de funciones reguladoras, proceso denominado “tolerancia infecciosa” (76). Además, han mostrado la capacidad de modular la actividad de las APCs, en las que se induce un fenotipo tolerogénico (77). Estos mecanismos pueden causar un impacto relevante en patologías osteodestructivas, tal como en artritis reumatoide, donde fueron capaces de modular el desbalance Th17/Tregs y la destrucción ósea articular (78).

Al provenir de los Tregs, las TEVs poseen distintas moléculas en su cargo relacionadas con funciones reguladoras, entre las cuales se encuentran los micro-RNAs (miRNAs), (75, 77-79), citoquinas (80) y enzimas de superficie (73). Dentro de estas últimas, la ectoenzima CD73 se ha asociado en gran medida a su capacidad inmunosupresora. En efecto, CD73 presente en las TEVs ha mostrado ser fundamental para la supresión de la

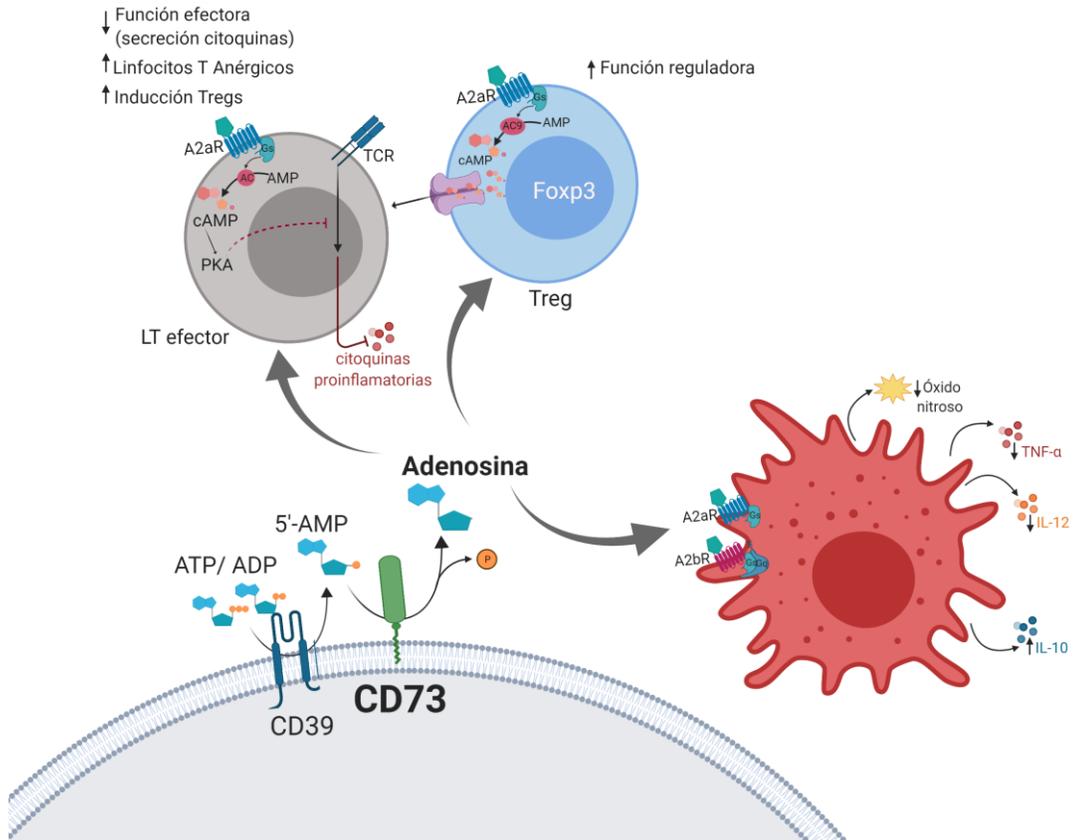
proliferación de LTs CD4⁺ y de la producción de IL-2 e IFN- γ , mientras que las TEVs deficientes en CD73 obtenidas de Tregs CD73KO no presentaron esta capacidad (73).

Actividad supresora de los Tregs y TEVs mediada por CD73

En condiciones fisiológicas, la concentración de ATP en el espacio extracelular (eATP) es baja (10^4 veces menor que en el ambiente intracelular). No obstante, al ocurrir daño celular durante la injuria tisular, hipoxia o inflamación, el ATP se libera al espacio extracelular y es censado por las células inmunes, evocando efectos principalmente proinflamatorios (81) tal como la inducción de LTs Th17 (82). CD39 y CD73, dos ectoenzimas de superficie, actúan de manera secuencial desfosforilando el ATP/ADP y AMP, respectivamente. De esta manera, controlan los niveles de eATP y generan adenosina (ADO), molécula altamente antiinflamatoria (83). En efecto, CD39 (llamado ecto-apirasa) degrada el ATP y el ADP a 5'-AMP (adenosina-5'-monofosfato), lo cual provee el sustrato para CD73. Por su parte, CD73 (ecto-5'-nucleotidasa) cataliza la hidrólisis de 5'-AMP a ADO y fosfato inorgánico (84). La ADO generada en el espacio extracelular es un potente factor inmuno-regulador que protege a las células y a los tejidos del daño generado durante respuestas inmunes excesivas, como ocurre durante la colitis (85), diabetes (86), asma (87) y sepsis (88). En particular, la ADO interactúa con cuatro tipos de receptores (ARs) acoplados a proteína G (GPCRs) del tipo purinérgico, denominados A₁R, A_{2A}R, A_{2B}R y A₃R (89) expresados por células inmunes y no inmunes (90-92).

Los Macs expresan los 4 tipos de ARs, donde A_{2A}R y A_{2B}R son los de mayor expresión. Cuando se activan los receptores A_{2A} y A_{2B}, se inhibe la diferenciación del tipo M1 y, en consecuencia, disminuye la liberación de iNOS, IL-6, IL-12 y TNF- α , entre otras (93-96). En contraste, la ADO aumenta la producción de la citoquina antiinflamatoria IL-10 (97), efecto mediado principalmente por A_{2A}R (98, 99). Por otro lado, los LTs expresan predominantemente el receptor de alta afinidad a ADO A_{2A}R, el cual incrementa su expresión luego de la activación celular (100). La señalización vía A_{2A}R estimula la producción de AMP cíclico (cAMP) intracelular y la activación de la proteína quinasa A (PKA), que a su vez inhibe la señalización vía TCR (101). De esta forma, se inhibe la activación, proliferación y secreción de citoquinas efectoras por parte de los LTs (84). Adicionalmente, la estimulación de A_{2A}R en Tregs incrementa la proliferación celular y actividad inmunosupresora (102). En el **Esquema 3**, se resume la actividad de CD73 y el efecto de ADO sobre los Macs y LTs.

Esquema 3: Mecanismo de acción de CD73/adenosina sobre Macs y LTs.



Planteamiento del problema

La acción supresora de los Tregs ha demostrado ser fundamental para la mantención de la homeostasis inmune. Sin embargo, en distintos contextos patológicos, la estabilidad fenotípica y funcional de los Tregs se ve comprometida debido a la presencia de abundantes mediadores proinflamatorios en los tejidos afectados. En este contexto, los Tregs pueden disminuir su capacidad inmunosupresora y/o trans-diferenciarse a un perfil efector, capaz de secretar citoquinas proinflamatorias, contribuyendo más aún a la patogenia de la enfermedad. En efecto, la conversión patogénica de Tregs durante la periodontitis hacia un perfil secretor de IL-17A ante condiciones inflamatorias enriquecidas en IL-6 ha sido demostrada. Esto último, promueve la diferenciación de OCs y, consecuentemente, la resorción ósea alveolar (50, 51).

Las TEVs, en cambio, una vez que son secretadas, no son susceptibles a modificar su cargo y función ante un microambiente inflamatorio (103). Por lo tanto, se presentan como una opción más estable para su uso como inmunoterapia, pudiendo ser utilizadas para favorecer la regulación inmune y, a la vez, disminuir los fenómenos pro-osteodestructivos en condiciones de inflamación crónica. Sin embargo, baja frecuencia de nTregs y su lenta tasa de expansión *in vitro* (en comparación con aquellos inducidos), dificulta la aislación de altas cantidades de TEVs y, en consecuencia, su potencial uso terapéutico.

Tomando en consideración estos antecedentes, en el presente estudio nos propusimos aislar, caracterizar y evaluar la capacidad inmunosupresora de las VEs (RATEVs) derivadas de Tregs inducidos *in vitro* en presencia de ácido retinóico (RATregs). Específicamente, el efecto de las RATEVs sobre la función efectora de LTs CD4⁺, la respuesta inmune de LTs y Macs y la resorción ósea alveolar en un modelo de periodontitis experimental. Adicionalmente, considerando la alta expresión de CD73 que detectamos tanto en los RATregs y como en las RATEVs secretadas (**Figura 1**), además del potente efecto antiinflamatorio asociado a la ADO producida a partir de la actividad AMPasa de esta enzima, evaluamos el rol de CD73 en la potencial función supresora de las RATEVs.

II. HIPÓTESIS

Las vesículas extracelulares derivadas de RATregs modulan la respuesta inmuno-inflamatoria M1/M2 y Th17/Tregs y previenen la resorción ósea alveolar durante la periodontitis mediante la actividad de CD73.

III. OBJETIVOS

III.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de las vesículas extracelulares derivadas de RATregs y el rol de CD73 en la respuesta inmuno-inflamatoria de macrófagos (M1/M2) y linfocitos T CD4⁺ (Th17/Treg) y la resorción ósea alveolar durante la periodontitis.

III.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Caracterizar el rol de CD73 como mecanismo de inmuno-modulación de las vesículas extracelulares derivadas de RATregs mediante la evaluación de su efecto sobre la proliferación, activación y fenotipo de linfocitos T CD4⁺ *in vitro* en presencia o no de su inhibidor específico.
- 2) Analizar el efecto de las vesículas extracelulares derivadas de RATregs en la frecuencia y fenotipo de macrófagos (M1/M2) y linfocitos T CD4⁺ (Th17/Treg) durante la periodontitis.
- 3) Analizar el efecto de las vesículas extracelulares derivadas de RATregs en la resorción ósea alveolar durante la periodontitis.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Para la inducción de los RATregs y purificación de las VEs, se utilizaron ratones transgénicos de 8 a 12 semanas de edad de la cepa C57BL/6 que expresan la proteína fluorescente verde (GFP) bajo el control del promotor FoxP3. Para la evaluación del efecto del tratamiento con RATEVs en el modelo de periodontitis experimental y ensayos funcionales, se utilizaron ratones silvestres de la cepa C57BL/6 de entre 8 a 12 semanas de edad. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Bioética CICUA de la Universidad de Chile (**Anexo 2**) y se realizó siguiendo las normas de conducta de los bioterios de la Universidad de Chile y la Universidad de los Andes.

Inducción de RATregs

A partir de bazo obtenidos de los ratones FoxP3-GFP, se realizó la purificación de LTs CD4⁺ utilizando el kit EasySepTM mouse CD4⁺ T cell isolation (#19852, Stem Cell Technologies). Los LTs CD4⁺ purificados fueron cultivados en medio RPMI, suplementado con suero bovino fetal (SBF) (GibcoTM, #10437028) depletado de VEs, en placas de cultivo previamente tratadas con solución de *coating* con 10 µg/mL de anticuerpo anti-CD3 (Clon 145-2C11, #BE0001-1, BioXcell) y 1 µg/ml de anti-CD28 (Clon 37.51, #102116, Biolegend). Para la inducción de RATregs, los LT CD4⁺ fueron tratados con 100 IU/mL de IL-2 recombinante humana (#200-02, Preprotech), 10 ng/ml

de TGF- β 1 recombinante humana (#100-21, Preprotech) y 10 nM de ácido retinoico (ATRA) (#R2625, Sigma) durante 5 días. Luego, se recuperó el medio condicionado para la posterior obtención de las VEs. Los RATregs fueron recuperados y caracterizados mediante citometría de flujo (CF) evaluando la expresión de FoxP3, CD25 y CD73.

Purificación de vesículas extracelulares derivadas de RATregs (RATEVs)

Para la obtención de las VEs, el medio condicionado recuperado del cultivo de los RATregs fue sometido a centrifugación diferencial a tiempos y velocidades secuenciales de 300 g por 5 minutos, 2.000 g por 20 minutos y 10.000 g por 30 minutos, 2 veces, finalizando con dos ciclos de ultracentrifugación a 100.000 g por 90 minutos. Tras el último ciclo, el pellet de las VEs fue resuspendido en PBS1X estéril para los ensayos *in vivo* (modelo de periodontitis) o medio RPMI completo libre de VEs para los ensayos *in vitro* (ensayo de supresión en presencia del inhibidor de CD73) y almacenado a 4°C o -80°C, respectivamente, para su posterior uso.

Caracterización de las VEs

Para determinar la concentración, el número total y la distribución del tamaño de las VEs, las muestras se sometieron a *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA) en el equipo NanoSight NS500, siguiendo un protocolo recomendado por el fabricante (104). La concentración de proteínas totales se determinó utilizando el kit Pierce™ BCA protein assay (#23225, Thermo Scientific), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Posteriormente, se realizó la detección de la ectoenzima CD73 (Invitrogen, #MA5-15537) y el marcador CD81 (#sc-166029, Santa Cruz) mediante Western Blot (105). Además, se ratificó la expresión de CD73 por CF, uniéndolas previamente a microesferas (MEs) de látex aldehído/sulfato (#A37304, Molecular Probes Life Technologies), siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se incubaron $2,1 \times 10^9$ VEs con 1 μ L de MEs por 10 minutos a temperatura ambiente y por 16 horas a 4°C en agitador rotatorio. Al día siguiente, se agregó 1 M de glicina por 1 hora y BSA 10% por 45 minutos a temperatura ambiente, en agitador rotatorio. Luego, según la condición, las muestras se incubaron con el anticuerpo primario anti-CD73 (#MA5-15537, clon 1D7, Invitrogen) y el anticuerpo secundario IgG1 anti-mouse AlexaFluor 488 (#406626, Biolegend), definiendo las siguientes condiciones experimentales: (a) MEs+RATEVs, (b) MEs+RATEVs+anticuerpo secundario anti-mouse AF488, y (c) MEs+RATEVs+anticuerpo primario anti-CD73+anticuerpo secundario anti-mouse AF488. La adquisición se realizó en un citómetro FACSCanto II (BD).

Imaging Flow cytometry de células y VEs.

Con el fin de complementar la caracterización de los RATregs y las RATEVs, éstas se analizaron mediante *Imaging Flow Cytometry* (IFC). Para esto, los LTs CD4⁺ (pre-inducción) y los RATregs (post-inducción) fueron incubados con los anticuerpos anti-CD73-PE, CD4-PerCP-Cy5.5 y CD25-PE-Cy7 durante 30 minutos a 4°C en la oscuridad. Por otro lado, las RATEVs obtenidas a partir de los RATregs previamente

teñidos con CFSE (#C34554, ThermoFisher) fueron incubadas con un anticuerpo anti-CD73-PE 1:20 por 1 hora (106). Ambas muestras fueron trasladadas al John Vane Science Centre, de la Queen Mary University of London, Inglaterra, para ser analizadas en el equipo AMNIS ImageStreamX Mark II. Para los RATregs, los parámetros de adquisición fueron: magnificación 40x, velocidad adquisición baja y opción de *remove beads* desactivada. Para las RATEVs, los parámetros de adquisición fueron: magnificación 60x, velocidad de adquisición bajo, intensidad de los láseres al máximo, tamaño del “*core central*” de 7 μm y opción de *remove beads* desactivada. Las imágenes obtenidas se analizaron con el software IDEAS v.6.2 (107).

Ensayo de bio-distribución

Dado que las RATEVs serían utilizadas para su inoculación en el periodonto en ratones afectados de periodontitis experimental, previamente, se analizó su bio-distribución y tiempo de permanencia en el sitio de punción, para ratificar que se encuentran disponibles en el periodonto para cumplir su efecto. Para esto, las RATEVs fueron teñidas durante 1 hora a 37°C con 71 μM DiR (DiIC₁₈(7): 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindotricarbocyanine iodide) (Biotum, #60017), sonda fluorescente lipofílica que tiñe estructuras compuestas de membrana citoplasmática, tales como las VEs. Tras su excitación a λEx 748 nm, la sonda emite fluorescencia en el espectro *near-infrared* (λEm 780 nm) (108). En ratones C57BL/6, $1,3 \times 10^8$ de RATEVs teñidas se inocularon en un volumen de 1,2 μl intragingivalmente por palatino en relación al segundo molar,

utilizando una jeringa Hamilton. Como control negativo, se inoculó 1,2 μ L de PBS DiR 71 μ M, libre de RATEVs. Luego, se procedió a realizar la excitación y detección de la sonda en un equipo LI-COR Odyssey[®] Clx Imaging System a los siguientes tiempos: 0 min, 30 min, 24 h, 48 h, 72 h y 7 días. Al día 7, se realizó la eutanasia de los animales y la extracción del maxilar, los linfonodos cervicales, los linfonodos axilares, el bazo, el hígado y los riñones, para realizar la detección de la señal de DiR *ex vivo*. Para el análisis, los parámetros utilizados fueron: profundidad $\mu=169$ μ m, calidad *in vivo* Q=lowest, calidad *ex vivo* Q=highest y foco de 2,0 mm.

Evaluación de la actividad de CD73

Con el fin de establecer si la ectoenzima CD73 expresada en los RATregs y presente en las RATEVs se encontraba enzimáticamente activa, se evaluó la generación de fosfato inorgánico y ADO a partir del sustrato 5'-AMP mediante ensayos independientes detallados a continuación.

Análisis de la producción de fosfato

Para medir la producción de fosfato inorgánico, se realizó el ensayo colorimétrico Malachite green utilizando el kit SensoLyte (AnaSpec, Fremont, CA, EEUU). Previo a la realización del ensayo, los RATregs y las RATEVs se lavaron y resuspendieron en solución tampón libre de fosfato (TLF). Esto último para eliminar cualquier traza de fosfato en el medio que pudiera confundirse con el fosfato generado a partir de la hidrólisis de AMP mediada por CD73 (109). Asimismo, se preparó 50 μ M de 5'-AMP

(#A2252, Sigma) y 100 μM de ADO 5'-(α , β -methylene) diphosphate (Inhibidor de CD73. #M3763, Sigma) en solución TLF.

En placas de 96 pocillos, 2,5, 5 o 10×10^5 RATregs o RATEVs obtenidas a partir de 1 o 2×10^6 RATregs (nombradas EV-1 y EV-2, respectivamente) se incubaron en presencia de 50 μM de 5'-AMP (Sigma, #A2252) durante 30 min a temperatura ambiente. Para evaluar qué proporción de la producción de fosfato era dependiente de la actividad de CD73, en algunas condiciones se agregó 100 μM del inhibidor de CD73 previamente mencionado. Como control, para determinar la producción basal de fosfato por parte de las células y VEs, se incluyeron las condiciones de células o partículas en ausencia del sustrato 5'-AMP e inhibidor de CD73. Luego de la incubación, las muestras fueron expuestas a 20 μL del reactivo colorimétrico Malachite green el cual se incubó en agitación por 10 min, siguiendo las indicaciones del kit. Finalmente, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 600 nm. Para cuantificar los niveles de fosfato, los valores de absorbancia fueron comparados con una curva estándar incluida en el kit.

Análisis de la producción de adenosina

Para medir la producción de ADO, 1 o 2×10^5 RATregs o las RATEVs obtenidas a partir de 2×10^6 RATregs fueron cultivadas en medio RPMI suplementado con 10% SBF libre de VEs en presencia de 5 mM de 5'-AMP, 10 μM de 6-((4-Nitrobenzyl)thio)9- β -D-ribofuranosylpurine (NBTI, Sigma #N2255) y 50 μM erythro-9-(2-Hydroxy-3-nonyl)-adenine hydrochloride (EHNA-HCl, Sigma #E114) a 37°C por 1 hora. Para evaluar si la

producción de ADO está dada por la actividad específica de CD73, se incluyeron las condiciones de células o partículas incubadas con 1 mM del inhibidor de CD73 previo a la adición del sustrato 5'-AMP. Luego de 1 h de incubación, 10 μ L del sobrenadante fue utilizado para medir los niveles de ADO utilizando el ensayo PathHunter ADORA2B (DiscoverX), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ADO producida fue calculada utilizando como referencia una curva estándar de adenosina (Sigma, #A9251).

Ensayo de supresión sobre leucocitos

Para evaluar la capacidad inmunosupresora de las RATEVs, leucocitos totales de bazo depletados de eritrocitos se aislaron de ratones C57BL/6 utilizando un amortiguador de lisis (Red blood cell lysis buffer #420302, Biolegend). Luego, los leucocitos fueron teñidos utilizando el kit CellTrace™ Violet Cell Proliferation (CTV #C34557, Thermofisher), en el cual se usa un marcador que permite detectar los ciclos de proliferación celular mediante su dilución secuencial. Las células teñidas se activaron con el anticuerpo anti-CD3 ϵ (clon 145-2C11, #BE0001-1, BioXcell) para estimular la proliferación específica de los LTs, los cuales fueron expuestos a distintas concentraciones de RATEVs: 1,3, 2,6 y 5,2 x 10⁸ partículas (EV-1/EV-2/EV-3, respectivamente). Como control, se utilizaron células no activadas o activadas expuestas a PBS 1X, utilizado como vehículo. Luego de 72 h, las células fueron recuperadas, teñidas con los anticuerpos correspondientes y analizadas por CF evaluando la expresión

de CD4 (APC Cy7, clon RM4-5 Biologend #100525) y CD8 (BV510, clon 53-6.7 Biologend #100751) para diferenciar entre ambos subtipos de LTs, CD25 (PerCP Cy5.5, clon PC61 Biologend #102029) para determinar el efecto sobre la activación y CTV para el análisis de proliferación celular.

Ensayo de supresión con RATEVs sobre LTs CD4⁺ CD73⁻ y CD73⁺ en presencia de AMP ± APCP (inhibidor de CD73)

Para evaluar si CD73 es determinante en la función supresora de las RATEVs sobre LTs, realizamos un ensayo de supresión sobre LTs CD4⁺CD73⁻ (para prevenir cualquier efecto asociado a CD73 unido a la membrana de los LTs respondedores), en presencia de AMP. Asimismo, a modo de comparación, el ensayo también fue llevado a cabo sobre LTs CD4⁺CD73⁺.

Para obtener las células respondedoras, se aislaron LTs CD4⁺CD73⁻ y CD4⁺CD73⁺ mediante FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*). Tras su purificación, con el objetivo de inducir su activación, 1×10^5 células respondedoras fueron estimuladas con 10 µg/mL de anti-CD3 ϵ (Clon 145-2C11, #BE0001-1, BioXcell) y 2 µg/mL de anti-CD28 (Clon 37.51, #102116, Biologend) incubados previamente por 3-4 h a 37°C en la placa de cultivo como solución de *coating*. Todas las células fueron cultivadas en presencia del inhibidor de adenosina deaminasa (ADA), EHNA (10 µM) y el inhibidor del transportador de adenosina, NBTI (10 µM). En las condiciones correspondientes, se agregó 5'-AMP 50 µM (#A2252, Sigma), alguno de los inhibidores de CD73, APCP1

(#M8386, Sigma) o APCP2 (#M3763, Sigma) y/o RATEVs ($1,3 \times 10^8$ o $2,6 \times 10^8$ partículas. EV-1 y EV-2, respectivamente). Las células fueron cultivadas en RPMI suplementado con 1% de penicilina-estreptomicina, 1% HEPES y 10% suero bovino fetal libre de VEs a 37°C y 5% CO₂ por 3 días en placas de 96 pozos fondo U.

Para evaluar la capacidad supresora de las RATEVs en presencia de AMP y la relevancia de CD73, al momento de la recuperación de las células, se analizó el efecto de los RATEVs \pm AMP y de la inhibición de CD73 sobre la expresión del marcador de activación CD25 mediante CF.

Inducción de la periodontitis experimental

La periodontitis experimental fue inducida en ratones C57BL/6, atando una ligadura de seda 5-0 alrededor de los 2°s molares maxilares, con el objetivo de provocar la acumulación local de bacterias orales que emule la generación de la periodontitis en humanos, de acuerdo al protocolo descrito por Abe et al. (110). Como control, se utilizaron animales sanos sin ligadura (control Sano). Para evaluar el efecto de las RATEVs sobre la respuesta inmuno-inflamatoria y la resorción ósea alveolar generada durante la periodontitis, las RATEVs se inocularon en la encía palatina en relación al 2° molar maxilar al día 3 y 6 de generada la periodontitis, en concentraciones de $1,3 \times 10^8$ partículas (grupo EV-1) o $2,6 \times 10^8$ partículas (grupo EV-2). En los ratones control del tratamiento, se inoculó el vehículo PBS 1X estéril (grupo Periodontitis no tratado). Luego de 10 días, los animales se eutanasiaron mediante sobredosis de

ketamina/xylacina y se realizó la colección de la mucosa gingival palatina, los linfonodos cervicales y los huesos maxilares para su posterior análisis.

Análisis de la frecuencia y fenotipo de LTs (Th17/Treg) y Macs (M1/M2)

Para el análisis de la respuesta inmuno-inflamatoria, se utilizó la mucosa gingival palatina y los linfonodos cervicales, los cuales fueron procesados siguiendo protocolos descritos previamente (111, 112). Brevemente, la mucosa gingival se separó del tejido óseo y se desorganizó mediante digestión enzimática en medio de cultivo RPMI libre de suero, suplementado con 3,2 mg/mL de colagenasa tipo IV (#17104-019, Gibco) y 0,15 µg/mL de DNAsa I (#DN25, Sigma) durante 1 h en agitación. En los últimos 5 minutos, se agregó 50 µL de EDTA 0,5 M y, finalmente, se procedió a la disgregación mecánica de las muestras para obtener una suspensión de células totales, utilizando el émbolo de una jeringa y un filtro celular de 70 µm. Las células obtenidas se lavaron en medio RPMI suplementado con SBF y se cuantificaron utilizando un contador automático (Luna IITM, logos Biosystems). Los linfonodos cervicales se disgregaron mecánicamente como se describió para la mucosa, sin necesidad de realizar previamente el paso de digestión enzimática. De igual manera, las células obtenidas se cuantificaron utilizando el contador automático. Las células obtenidas se estimularon con 50 ng/mL de PMA, 1 µg/mL de ionomicina y 3 ng/mL de brefeldina durante 4 h a 37°C.

Consecutivamente, las células se marcaron con anticuerpos específicos para la identificación de Macs M1 o M2 y LTs Th17 o Tregs (**Anexo 3**). Finalmente, para

detectar la expresión de estos marcadores, y así cuantificar la frecuencia de los distintos fenotipos celulares, las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo BD LSR Fortessa X-20 (BD). En el caso de las muestras de linfonodos, los datos fueron analizados y expresados mediante la visualización algorítmica (viSNE) de *t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding*, método estadístico para visualización de alta dimensionalidad en el cual a cada evento se le asigna una ubicación en un mapa bidimensional. De esta manera se genera una reducción no lineal de la dimensionalidad para la visualización de múltiples parámetros. Específicamente, se modela cada objeto de alta dimensionalidad de manera tal que aquellos eventos similares se modelan como puntos cercanos y los no similares como puntos distantes.

Análisis de la pérdida ósea alveolar

La pérdida ósea alveolar fue analizada morfométricamente basándonos en los parámetros descritos por Abe *et al.* (110). Tras la remoción de la mucosa gingival, los huesos maxilares se fijaron en paraformaldehído al 4% por 24 h. Luego, los huesos se lavaron con PBS 1X, se hirvieron en agua destilada por 5 min para eliminar cualquier resto de tejido blando y se almacenaron en etanol 70%. Un día antes de ser fotografiados, los huesos se rehidrataron en suero fisiológico por aproximadamente 24 h. Posteriormente, los huesos maxilares se hemiseccionaron y montaron sobre fondo negro opaco, para ser fotografiados desde su superficie vestibular y palatina con una cámara Nikon D5600, con un lente macro AF-S DX Micro-Nikkor de 85 mm f/3.5G ED VR y

un *flash* Yongnuo YN14EX II. Las tomas fotográficas fueron estandarizadas con los siguientes parámetros: f29, S 1/60, ISO 200, *flash* 1/32 +0.7 y una magnificación de 1:1. Para lograr un enfoque estable, se utilizó trípode y un riel de enfoque Manfrotto 454. Todas las fotografías fueron tomadas en formato RAW y JPG para su análisis utilizando el programa Image J (NIH, EEUU). La pérdida ósea se calculó de 2 formas: como área de resorción y como distancia lineal. Para calcular el área de resorción ósea, los parámetros utilizados para definir el área de interés fueron: el límite amelo-cementario (LAC), la superficie mesial del 1^{er} molar, la cresta óseo alveolar (COA) y la superficie distal del 3^{er} molar. Para determinar el área de resorción ósea alveolar se cuantificó el área ósea promedio del grupo control sin ligadura (Sano) y se sustrajo del área calculada en los grupos con periodontitis sin tratamiento (Perio) o tratados con las 2 dosis de RATEVs indicadas anteriormente (EV-1 y EV-2). Para el cálculo lineal de la pérdida ósea, se trazaron líneas guía entre el LAC y el COA en 9 sitios anatómicos: En el 1^{er} molar (5 sitios): cúspide mesio-palatina o mesio-vestibular, surco palatino o vestibular, cúspide disto-palatina o disto-vestibular, surco disto-palatino o disto-vestibular y cúspide distal. En el 2^o molar (3 sitios): cúspide mesio-palatina o mesio-vestibular, surco palatino o vestibular y cúspide disto-palatina o disto-vestibular. En el 3^{er} molar (1 sitio): cúspide palatina o vestibular. Para la cuantificación de la resorción ósea, se midió la distancia LAC-COA en cada uno de estos 9 sitios anatómicos y los datos obtenidos fueron registrados como distancia lineal promedio.

Detección de OCs mediante análisis histológico

Con el objetivo de apoyar el análisis morfométrico, realizamos la detección *in situ* de OCs presentes en los tejidos periodontales de los ratones de los grupos control (Sano y Perio) y experimentales (EV-1 y EV-2). Para esto, se obtuvieron biopsias maxilares, las cuales fueron procesadas para su posterior tinción y análisis histológico siguiendo un protocolo previamente descrito (113). Brevemente, los especímenes fueron fijados en formalina al 10%, pH 7.4 durante 24 h, desmineralizados en EDTA 5% (Sigma-Aldrich) por 60 días y embebidos en parafina. Luego, los bloques de parafina con el tejido embebido se cortaron utilizando un micrótopo para obtener secciones de 8 μm de grosor. Los cortes fueron teñidos utilizando el kit de tinción histoquímica para TRAP “Acid phosphatase, leukocyte (TRAP) kit” (Sigma-Aldrich, #387A) siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. Las secciones teñidas fueron analizadas y fotografiadas con un microscopio óptico (AxioStarPlus, Carl Zeiss). Las células TRAP⁺ multinucleadas que se encontraran en contacto con el tejido óseo subyacente fueron consideradas como OCs.

Análisis estadísticos

Los datos se analizaron utilizando el software SPSS v.22.0 (IBM Corp). La normalidad de la distribución de los datos se estableció utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias entre las distintas condiciones experimentales se determinaron utilizando las pruebas ANOVA y post-hoc Bonferroni. El nivel de significancia se

estableció como $\alpha < 0.05$. En las figuras, los valores de p se indican como * para p-valor $< 0,05$; ** para p-valor $< 0,01$ y como *** para p-valor $< 0,001$. La ausencia de significancia estadística se indicó como ns.

V. RESULTADOS

Los Tregs inducidos en presencia de ácido retinoico (RATregs) expresan altos niveles de FoxP3, CD25 y CD73.

Con la finalidad de generar Tregs para el posterior aislamiento de sus VEs, lo primero que realizamos fue la inducción de Tregs *in vitro* en presencia de ATRA a partir de LTs CD4⁺ (pureza >90%, **Figura Suplementaria 1**), los cuales denominamos RATregs. Estas células se caracterizaron evaluando la expresión de Foxp3, CD25 y CD73 al día 0 previo a la exposición de citoquinas polarizantes (**Figura 1A y B, fila superior**) y luego de los 5 días de cultivo bajo los estímulos de inducción a RATregs (**Figura 1A y B, fila inferior**). Al día 0, previo al proceso de inducción, la expresión de FoxP3, CD25 y CD73 fue de 12,1%; 10,9% y 62%, respectivamente. Luego de los 5 días de inducción, más del 97% de las células cultivadas expresaron FoxP3 (>97%), CD25 (>99%) y CD73 (>99%), y una elevada densidad de las moléculas CD25 y CD73 representada por la intensidad de fluorescencia media (MFI). Mediante esta caracterización confirmamos que, luego de la exposición a las citoquinas polarizantes y ATRA, los RATregs presentaron el fenotipo característico de los nTregs (CD4⁺FoxP3⁺CD25^{high}) y que, además, expresaron un alto nivel de CD73.

Para complementar estos hallazgos e identificar la distribución topográfica de las moléculas de interés, realizamos el análisis de estas células por IFC. Al igual que los resultados obtenidos por CF, en la **Figura 1B** se muestra que los RATregs, tras su

diferenciación (fila inferior), aumentan su expresión de CD73 y CD25 en comparación a los LT CD4⁺ previo al proceso de inducción (fila superior). La expresión de CD73 se presentó preferencialmente en superficie, en relación a la membrana celular, no así CD25, el cual se distribuye tanto en citoplasma como en membrana celular.

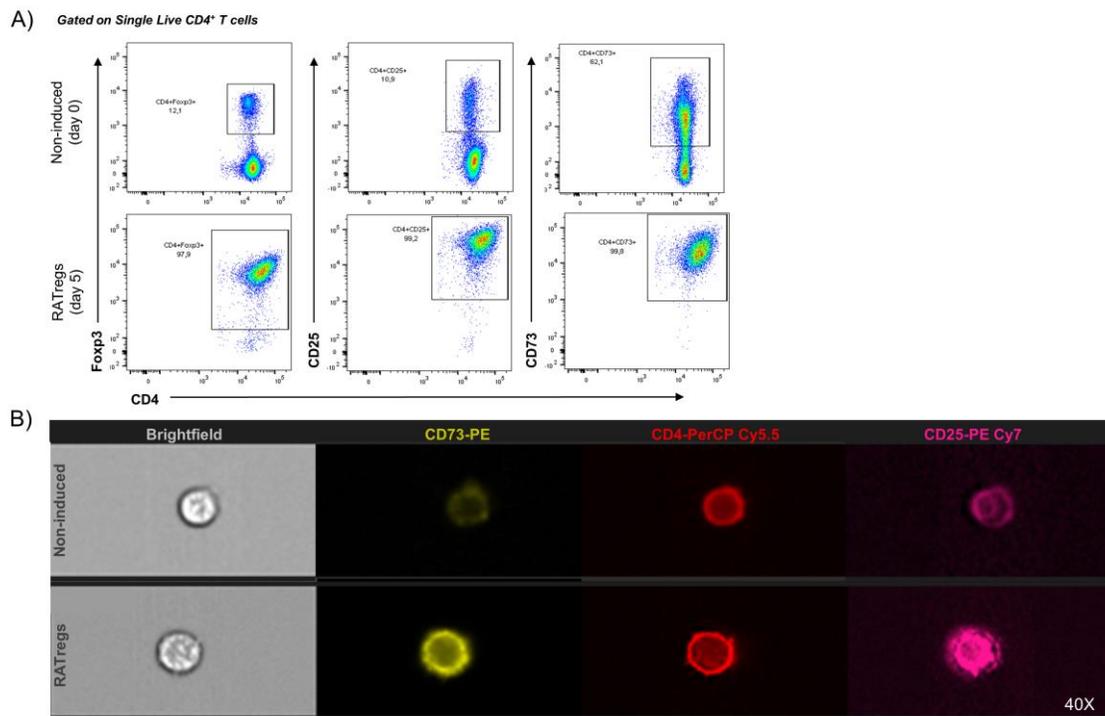


Figura 1: Los RATregs presentan el fenotipo característico de los Tregs (CD4⁺FoxP3⁺CD25^{high}) y una alta expresión superficial de CD73.

(A) Análisis por FC de la expresión de Foxp3 (GFP reportero), CD25 (PE) y CD73 (APC) en LT CD4⁺ aislados por separación inmuno-magnética (fila superior) y RATregs post inducción en presencia de citoquinas polarizantes y ATRA (fila inferior). Las células fueron previamente seleccionadas como *Singlets/Live/CD4⁺*. (B) Imaging Flow Cytometry, marcaje de superficie de CD73 (PE), CD4 (PerCP-Cy5.5) y CD25 (PE-Cy7). Fila superior: LTs CD4⁺ aislados al día 0, previo al cultivo en condiciones de diferenciación. Fila inferior: RATregs inducidos luego de 5 días de cultivo en presencia de TGF-β1, IL-2 y RA.

Caracterización de las VEs derivadas de RATregs (RATEVs). Tamaño, presencia de CD73, CD81, y bio-distribución.

A partir del medio condicionado recuperado del cultivo de los RATregs, se aislaron VEs (RATEVs) las cuales fueron caracterizadas mediante NTA para determinar el tamaño promedio, la distribución de tamaños y concentración.

A partir del análisis por NTA, se observó que el tamaño promedio de las partículas fue de 141 nm ($\pm 71,1$) (**Figura 2A**), lo cual indica que las RATEVs son VEs principalmente pequeñas, término acuñado como “*small extracellular vesicles*” o sEVs (71). Adicionalmente, detectamos que la muestra estudiada contiene poblaciones heterogéneas de partículas de distintos tamaños, es decir, que la muestra puede contener tanto Exos (30-200 nm) (68) de origen endocítico como MVs (50-1000 nm) generadas directamente de la evaginación de la membrana plasmática. Es relevante mencionar que los rangos de tamaño entre ambos tipos de VEs presentan un amplio tramo de superposición, por lo que no es posible identificar su origen únicamente mediante el análisis de su tamaño. No obstante, tanto Exos como MVs, han sido reconocidas como agentes de comunicación intercelular biológicamente activos (71, 114), por lo que para los consecuentes experimentos y ensayos funcionales se utilizó el aislado completo de VEs derivadas del cultivo de RATregs.

Al detectar una alta expresión de CD73 en los RATregs y, considerando que esta enzima es una molécula asociada a inmunosupresión, hipotetizamos que las RATEVs también

podrían cargar altas cantidades de CD73. Por lo tanto, mediante la utilización de diferentes técnicas, evaluamos la presencia de CD73 en las RATEVs. Por un lado, se realizó el análisis de IFC en el cual se identificaron VEs aisladas de células RATregs previamente teñidas con CFSE y posteriormente incubadas con el anticuerpo CD73-PE. En la **Figura 2B**, en el primer recuadro, se visualiza la morfología de la VEs presentada en la imagen en campo claro (*brightfield*). En el segundo y tercer recuadro se detecta la tinción con CFSE y CD73-PE respectivamente, lo cual confirma la presencia de la ectoenzima en las RATEVs.

Con la finalidad de complementar la caracterización y corroborar la expresión de CD73 previamente detectada por IFC, se procedió a evaluar su presencia por CF convencional. Para que las VEs adquirieran un tamaño detectable por CF, éstas fueron acopladas a beads de látex (LBs) y posteriormente teñidas con los anticuerpos correspondientes. La señal de fluorescencia para CD73-AF488 fue detectada únicamente en aquellas muestras de RATEVs teñidas para aquel marcador (**Figura 2C, histograma celeste**). A modo de comparación se realizaron los siguientes controles: RATEVs unidas a LBs (**Figura 2C, gris claro**) o RATEVs unidas a LBs incubadas únicamente con el anticuerpo 2^o AF488 *anti-mouse* (**Figura 2C, gris oscuro**) para descartar la presencia de autofluorescencia basal o unión inespecífica del anticuerpo secundario, respectivamente. Ante estos resultados, confirmamos lo detectado por IFC. Al igual que los RATregs, las RATEVs presentaron un alto nivel de expresión de CD73.

Para explorar el origen de las VEs presentes en nuestra muestra, evaluamos la expresión de la tetraspanina CD81. Por otro lado, nos planteamos comparar los niveles de expresión de CD73 en las RATEVS con VEs obtenidas de otras fuentes celulares. Para esto, se aislaron VEs a partir de Tregs inducidos en ausencia de RA (iTregs) y de células de bazo (*Spleen*, en inglés). Para las tres muestras se realizó la detección de ambas proteínas (CD73 y CD81) mediante *Western blot* (WB) (**Figura 2D**). A partir de los resultados obtenidos confirmamos que las RATEVs están enriquecidas en CD73 (**Figura 2D, fila superior**) y que, además, su presencia fue considerablemente mayor a la detectada en las muestras de VEs de iTregs y *Spleen*, lo cual se visualiza como una banda con mayor intensidad de fluorescencia. Por otro lado, las RATEVs presentaron una alta presencia de la tetraspanina CD81 (**Figura 2D, fila inferior**), indicando que se encuentran enriquecidas en VEs de origen endosomal del tipo Exos.

Como parte de su caracterización y debido a que las RATEVs serían utilizadas posteriormente en el modelo de periodontitis, analizamos su patrón de biodistribución y permanencia en el sitio de punción luego de su inoculación palatina. Tanto RATEVs teñidas con DiR como el control PBS 1X + DiR fueron inoculados en la mucosa gingival para luego evaluar la presencia de fluorescencia infrarroja en el sitio de punción a distintos tiempos post-inoculación (**Figura 2E**). Ante esta aproximación, detectamos la señal de las RATEVs teñidas con DiR en lecturas de cuerpo completo hasta las 24 h post inoculación. Luego de 7 días, los ratones fueron eutanasiados y distintos órganos fueron

colectados para evaluar la presencia de señal de fluorescencia *ex vivo*. Al analizar el maxilar aislado, detectamos señal fluorescente en el sitio de punción donde se realizó la inoculación con RATEVs teñidas con DiR, no así en la muestra inoculada con el vehículo. No se detectó señal infrarroja en el resto de los órganos analizados.

Todos estos resultados indican que las RATEVs aisladas del cultivo de RATregs corresponden a VEs de tamaño nanométrico enriquecidas en Exos CD81⁺ que, al igual que las células de origen, presentan altos niveles de la ectoenzima CD73 en su superficie. Por otro lado, las RATEVs permanecen en el sitio de administración (mucosa gingival) por al menos 7 días luego de ser inoculadas de manera local en condiciones no inflamatorias.

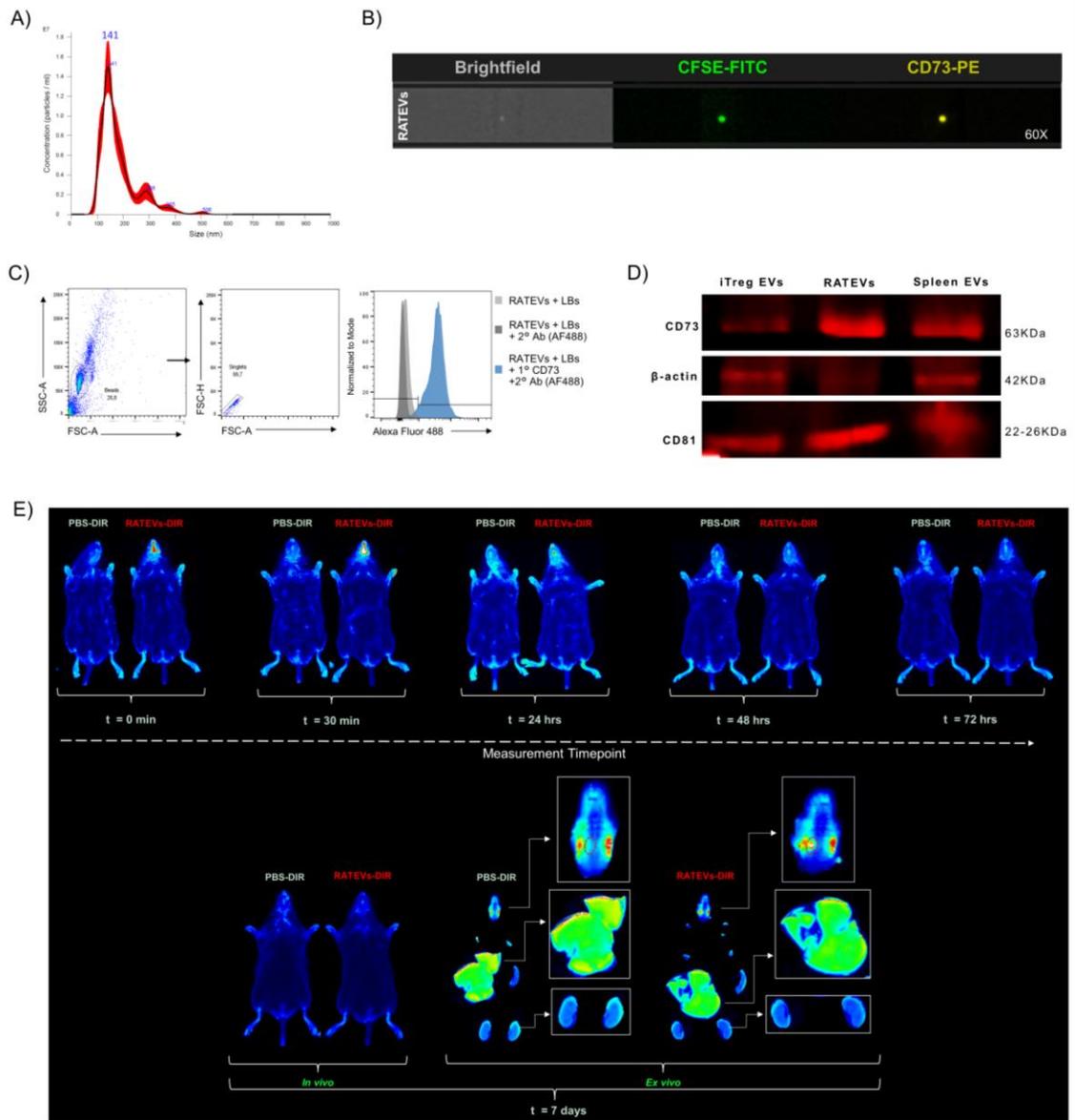


Figura 2: Las RATEVs presentan las características canónicas de las VEs, una alta expresión de CD73 y permanecen en el sitio de administración tras su inoculación gingival por al menos 7 días.

(A) Distribución de tamaño de RATEVs determinada mediante *Nanoparticle Tracking Analysis*. (B) *Imaging Flow Cytometry*, imagen de campo claro (izquierda), marcaje con CFSE-FITC (medio) y CD73-

PE (derecha). (C) Caracterización de la expresión de CD73 en RATEVs por FC mediante la unión de VEs a LBs. Se presenta la estrategia de *gating* para identificar las RATEVs acopladas a LBs (izquierda). En el histograma, el gris claro representa el control de RATEVs acopladas a LBs sin marcaje y en gris oscuro el control de RATEVs acopladas a LBs incubadas únicamente con anticuerpo secundario AF488. El histograma azul muestra la expresión de CD73 en RATEVs acopladas a LBs incubadas con el anticuerpo primario CD73 y secundario anti-mouse AF488. (D) Detección de CD73 y CD81 en VEs derivadas de iTregs (inducidos en ausencia de RA), RATregs (RATEVs) y de esplenocitos (Spleen) mediante Western Blot, técnica de revelado por quimioluminiscencia. (E) Análisis de la bio-distribución y permanencia en el sitio de punción de RATEVs marcadas con DiR tras su inoculación gingival. Evaluación a los tiempos: 0 min, 30 min., 24 h, 48 h, 72 h y 7 días. A los 7 días se realizó el análisis *ex vivo* de los órganos a los cuales potencialmente podrían distribuirse las RATEVs. Se presenta el acercamiento de las imágenes obtenidas de maxilar, hígado y riñones. En el maxilar, el círculo con línea discontinua roja exhibe el sitio de punción donde se realizó la inoculación de RATEVs teñidas con DIR o la solución control.

Evaluación de la actividad AMPasa de CD73 presente en RATregs y RATEVs

Dado los altos niveles de CD73 detectados tanto en RATregs como RATEVs, nos planteamos evaluar si ésta se encontraba enzimáticamente activa, caracterizando su actividad AMPasa. Es decir, la capacidad de CD73 de producir independientemente fosfato inorgánico y ADO a partir de AMP exógeno.

Para medir la producción de fosfato (**Figura 3A-B**) se utilizó el ensayo colorimétrico *Malachite green* descrito en la sección de materiales y métodos. Adicionalmente, para determinar si la generación de fosfato estaba principalmente mediada por la enzima CD73, en ciertas condiciones utilizamos el inhibidor específico de CD73 (APCP1). A modo de control, las células y VEs se incubaron en ausencia del sustrato AMP.

Ante la exposición a AMP, los RATregs indujeron la producción de fosfato ($62,23 \pm 27,07 \mu\text{M}$ / $83,22 \pm 39,44 \mu\text{M}$ / $87,37 \pm 31,07 \mu\text{M}$) en todas las concentraciones evaluadas (25.000 / 50.000 / 100.000 células, respectivamente) (**Figura 3A, barras negras**). Este efecto fue revertido parcialmente ante la adición del inhibidor de CD73 ($8,8 \pm 6,74 \mu\text{M}$ / $16,4 \pm 8,85 \mu\text{M}$ / $23,9 \pm 11,86 \mu\text{M}$, respectivamente) (**Figura 3A, barras grises**). Por otro lado, y de manera similar a los RATregs, las RATEVs expuestas a AMP promovieron la producción de fosfato ($8,08 \pm 3,73 \mu\text{M}$ / $14,5 \pm 6,58 \mu\text{M}$) en ambas concentraciones evaluadas (EV-1 y EV-2, respectivamente) (**Figura 3B, barras negras**). Asimismo, la producción de fosfato fue parcialmente

revertida ante la adición del inhibidor de CD73 ($1,15 \pm 1,64 \mu\text{M}$ / $1,61 \pm 1,93 \mu\text{M}$) (**Figura 3B, barras grises**). En todos los casos, en ausencia de AMP (**Figura 3A-B, barras blancas**), la producción basal de fosfato fue mínima; menor a $4 \mu\text{M}$ y $1 \mu\text{M}$ para RATregs y RATEVs, respectivamente.

La capacidad de generar ADO a partir de AMP fue evaluada realizando el ensayo PathHunter ADORA2B (115). Al igual que en el ensayo de fosfato, para determinar la especificidad de la actividad enzimática, se utilizó el inhibidor de CD73. A modo de control, las células y VEs se incubaron en ausencia del sustrato. Como se esperaba, ante la exposición a AMP, los RATregs generaron ADO ($42,42 \pm 19,96 \mu\text{M}$ / $59,97 \pm 7,02 \mu\text{M}$) en ambas concentraciones utilizadas (100.000 / 200.000 células, respectivamente) (**Figura 3C, barra roja**). La adición del inhibidor de CD73 previno casi completamente la generación de ADO ($0,46 \pm 0,52 \mu\text{M}$ / $1,37 \pm 1 \mu\text{M}$) (**Figura 3C, barra gris**). Este mismo efecto fue detectado para las RATEVs, las cuales también produjeron ADO ante la exposición a AMP ($50,3 \pm 11,2 \mu\text{M}$) (**Figura 3D, barra roja**). En contraste al fosfato, la adición del inhibidor de CD73 previno casi completamente la generación de ADO ($2,3 \pm 1,7 \mu\text{M}$) (**Figura 3D, barra gris**). En todos los casos, se produjeron cantidades mínimas o nulas de ADO en ausencia de AMP (**Figura 3A-B, barras blancas**).

Ante estos resultados comprobamos que CD73 presente tanto en los RATregs como en las RATEVs se encuentra enzimáticamente activa y es capaz de producir fosfato y ADO a partir de AMP.

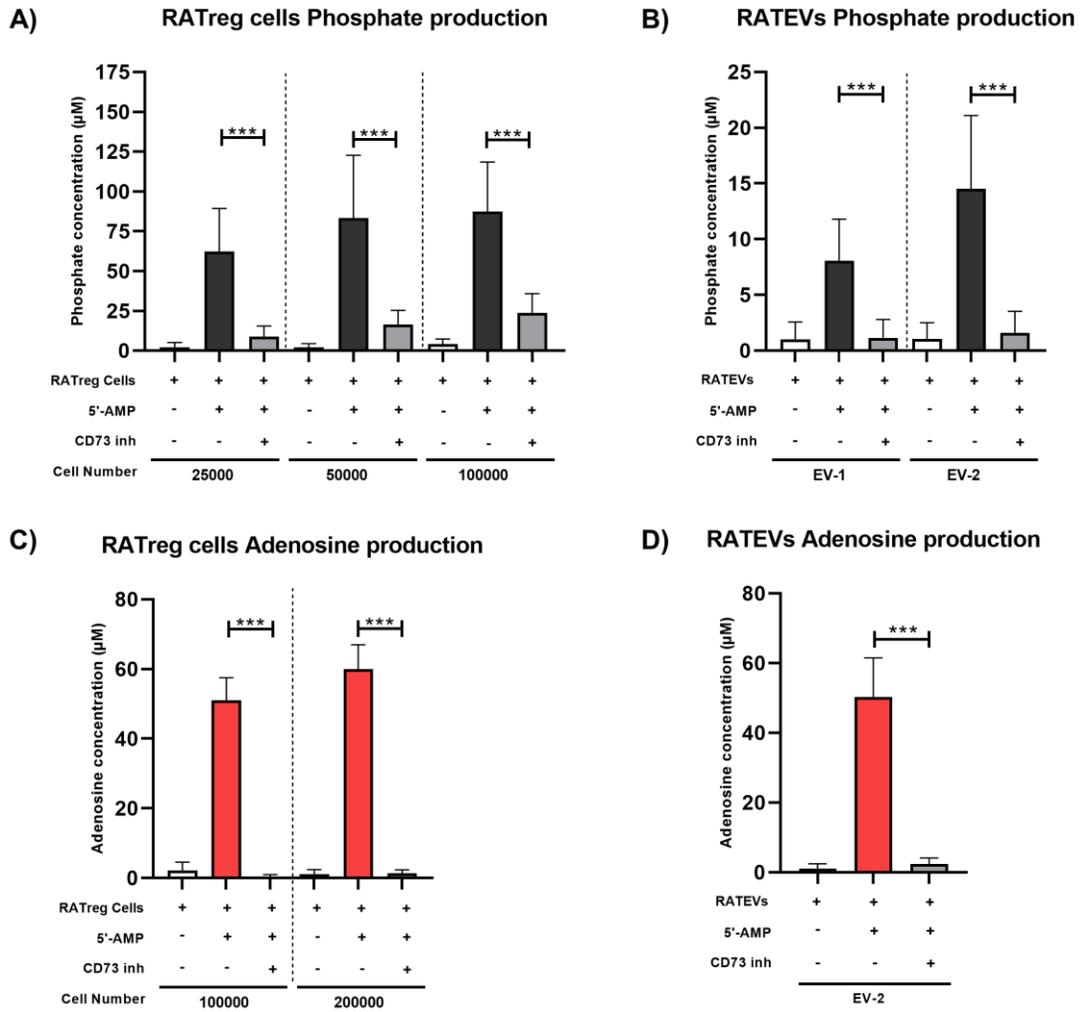


Figura 3: La ectoenzima CD73 presente en RATregs y RATEVs genera fosfato y adenosina a partir de la hidrólisis de AMP.

RATregs (A) y RATEVs (B) resuspendidas en solución tampón libre de fosfato a distintas concentraciones fueron incubadas solas o en presencia de AMP (50 μ M) y en presencia o ausencia del inhibidor de CD73 (100 μ M). Luego, para determinar la generación de fosfato inorgánico, se agregó el reactivo colorimétrico Malachite Green. Tras su incubación, se midió la absorbancia a 600 nm para cada una de las condiciones. Para cuantificar la concentración de fosfato los valores se compararon con una curva estándar. Los resultados representan la cantidad de fosfato producido por sobre el nivel basal (células o VEs incubadas en ausencia de AMP) y se muestran como promedio \pm SD de 5 experimentos independientes. (C-D) Medición de los niveles de ADO producidos a partir de AMP utilizando el ensayo DiscoverX PathHunter β -Arrestin para el receptor ADORA2B transfectado en una línea celular reportera. Se evaluaron los niveles de ADO generados por 100.000 o 200.000 células RATregs (C) y RATEVs (D) obtenidas a partir de 2×10^6 RATregs. Las muestras fueron incubadas solas o en presencia de 5 mM de 5'-AMP y en presencia o ausencia del inhibidor de 1 mM de CD73. Las condiciones control incluyeron medio de cultivo solo, medio con 5'-AMP o en presencia de 5'-AMP e inhibidor de CD73 (datos no mostrados). Para cuantificar la cantidad de ADO producida los valores fueron comparados con una curva estándar. El ensayo fue realizado en duplicado para cada muestra. Los datos se presentan como promedio \pm SD de 4 muestras conglomeradas. Las diferencias entre las condiciones experimentales se determinaron utilizando las pruebas ANOVA y post-hoc Bonferroni, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; $p < 0,001$; *ns*= non significant.

OBJETIVO 1: Caracterizar el rol de CD73 como mecanismo inmunomodulador de las VEs derivadas de RATregs mediante la evaluación de su efecto sobre la proliferación, activación y fenotipo de linfocitos T CD4⁺ *in vitro* en presencia de su inhibidor.

Una vez caracterizadas las RATEVs, nos planteamos explorar su capacidad inmunosupresora evaluando su efecto sobre la proliferación y activación de LTs. Para evaluar la proliferación, aislamos y teñimos leucocitos de bazo con CTV, marcador que permite caracterizar los ciclos proliferación. El principio mediante el cual se evalúa la proliferación se basa en que, luego de cada división celular, las células hijas reciben la mitad de la marca fluorescente de sus células progenitoras, lo que permite analizar el número de divisiones celulares según las intensidades de fluorescencia detectadas por CF. Tras la tinción, se efectuó la activación de los LTs vía TCR con el anticuerpo anti-CD3 γ para luego realizar el tratamiento con RATEVs en 3 distintas concentraciones (1,3/ 2,6/ 5,2 x 10⁸ partículas, nombradas EV-1/ EV-2 y EV-3, respectivamente). A modo de control se adicionó el vehículo PBS 1X estéril (grupo activado sin tratamiento).

Los resultados indican que, como se esperaba, tanto los LTs CD4⁺ como los CD8⁺ aumentan significativamente su frecuencia ante la activación con anti-CD3 γ (35,97 \pm 4,44% y 41,63 \pm 6,53%, respectivamente) (**Figura 4A, barra con cuadros rojos**) en comparación al control sin activar (28,4 \pm 14,99% y 26,34 \pm 15,69%, respectivamente)

(Figura 4A, barras con círculos grises). No obstante, ambos subtipos linfocitarios respondieron de manera distinta ante la exposición a RATEVs. Por un lado, los LTs CD4⁺ redujeron su frecuencia a medida que aumentaba la concentración de VEs (34,03 ± 5,97% / 27,20 ± 8,72% / 25,80 ± 13,58%, para EV-1/EV-2/EV-3, respectivamente) **(Figura 4A gráfico central, barras con puntos y triángulos celestes/ azules)** en comparación al grupo activado sin tratamiento (35,97 ± 4,44%) **(Figura 4A gráfico central, barras con cuadros rojos)** y, por el otro, la frecuencia de LTs CD8⁺ fue aumentando (55,07 ± 10,57% / 62,03 ± 12,36% / 59,85 ± 17,89% versus 41,63 ± 6,53%) **(Figura 4A, gráfico a la derecha, barras con puntos y triángulos celestes/ azules versus cuadros rojos).**

Al evaluar la dilución de CTV, se identificó el número de ciclos celulares definidos como cada *peak* de fluorescencia identificado en los histogramas representativos de la **Figura 4B**. Se observa que el porcentaje de LTs CD4⁺ proliferantes fue similar en todos los grupos activados **(Figura 4B, % Prolif. CD4⁺ T cells)**. No obstante, ante el tratamiento con RATEVs, el índice de proliferación disminuyó a medida que fue aumentando la concentración de RATEVs (1,92 ± 0,08 versus 1,71 ± 0,06 / 1,65 ± 0,12 / 1,53 ± 0,01) **(Figura 4B, Prolif. Index CD4⁺ T cells)**, comprobando su efecto supresor. En el caso de los LTs CD8⁺, tanto el porcentaje de células proliferantes **(Figura 4B, % Prolif. CD8⁺ T cells)** (85,6 ± 14,41 versus 94,4 ± 4,92 / 95,7 ± 3,56 / 95,9 ± 1,2) como el índice de proliferación (2,52 ± 0,31 versus 3,12 ± 0,44 / 3,44 ± 0,31

/ $3,8 \pm 0,98$) aumentó ante el tratamiento con RATEVs (**Figura 4B, Prolif. Index CD8⁺ T cells**).

Asimismo, analizamos el porcentaje de células presentes en cada generación de proliferación (**Figura 4C**). Ante lo cual detectamos que, en el caso de los LTs CD4⁺ (**Figura 4C, izquierda**) activados sin tratamiento (rojo), el mayor porcentaje de células proliferantes se encuentra entre la tercera y cuarta generación (G3-G4) de células generadas a partir de las células parentales, presentando también un importante porcentaje en G5. Sin embargo, ante el tratamiento con RATEVs (barras azules), el mayor porcentaje de LTs CD4⁺ se concentró entre el primer y segundo ciclo de proliferación (G1-G2). En contraparte, los LTs CD8⁺ (**Figura 4C, derecha**) presentaron el efecto contrario. En el grupo activado sin tratamiento (rojo), las células proliferantes se concentraron en el cuarto y quinto ciclo de proliferación (G4-G5), en comparación con los grupos tratados con RATEVs, los cuales, al estimular la proliferación, presentan la mayor cantidad de células entre el quinto y séptimo ciclo (G5-G7).

Finalmente, evaluamos el estado de activación de LTs CD4⁺ y T CD8⁺ tras el tratamiento con RATEVs cuantificando la expresión del marcador de activación CD25 (**Figura 4D-E, respectivamente**). En concordancia con los resultados anteriores, los LTs CD4⁺ (**Figura 4D**) disminuyeron la expresión de CD25 ante el tratamiento con RATEVs, representada por una menor frecuencia de células CD4⁺CD25⁺ ($8,95 \pm 2,39\%$ versus $4,55 \pm 1,11\%$ / $4,56 \pm 1,01\%$ / $5,54 \pm 2,57\%$). Al contrario, los LTs CD8⁺

(Figura 4E) aumentaron significativamente la expresión de CD25 ante el tratamiento con RATEVs en comparación al grupo activado sin tratamiento ($4,3 \pm 1,32\%$ versus $18,64 \pm 5,88\%$ / $26,51 \pm 4,7\%$ / $26,69 \pm 15,1\%$).

Sobre la base de estos hallazgos podemos concluir que las RATEVs son capaces de disminuir la proliferación y activación de LTs CD4⁺, ratificando su potencial inmunosupresor *in vitro*. En contraparte, promueven la proliferación y activación de LTs CD8⁺.

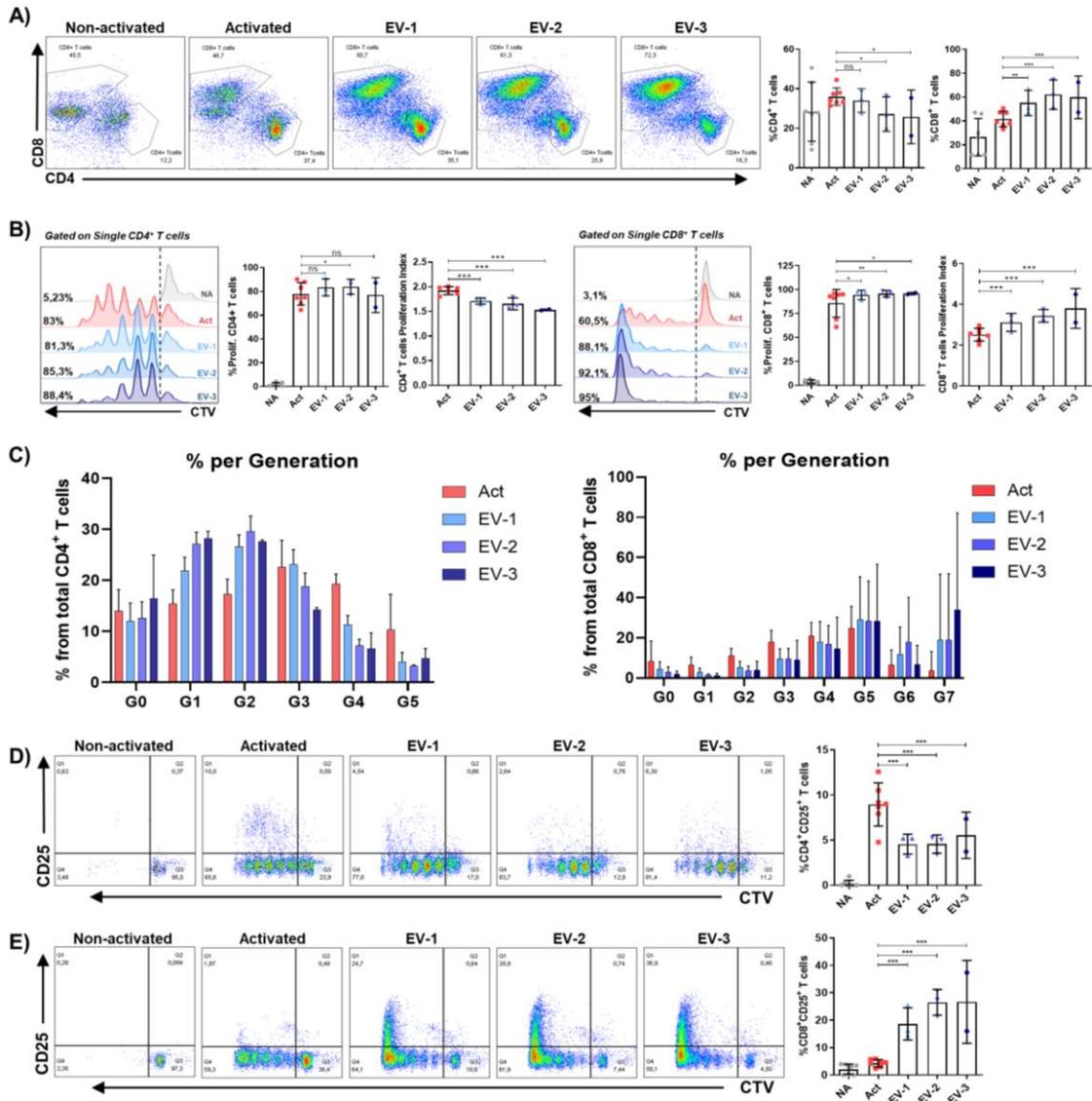


Figura 4: Las RATEVs suprimen y estimulan la proliferación/ activación de LTs CD4⁺ y CD8⁺, respectivamente.

Células totales de bazo depletadas de eritrocitos fueron marcadas con CTV, activadas *in vitro* con anti-CD3 soluble (1µg/mL), tratadas o no con RATEVs en 3 concentraciones distintas (EV-1/EV-2/EV-3, 1,3/2,6/5,2 x10⁸ respectivamente) y cultivadas en medio cRPMI libre de VEs por 72 h. A modo de

control, en la condición de activación, se adicionó el vehículo PBS1X. (A) *Dotplot* representativo (izquierda) y gráficos de cuantificación que expresan la frecuencia de LTs CD4⁺ (medio) y CD8⁺ (derecha) ante las distintas condiciones experimentales. (B) Histogramas representativos que muestran la proliferación de linfocitos T CD4⁺ (izquierda) o CD8⁺ (derecha) no activados (gris), activados + PBS 1X (rojo) o activados + RATEVs en concentraciones crecientes (azules). Los gráficos presentan el porcentaje de células proliferantes e índice de proliferación. (C) Gráfico que expresa el porcentaje de LTs CD4⁺ (izquierda) o CD8⁺ (derecha) en cada generación de replicación celular. (D) *Dotplot* representativo de la expresión de CD25 en LTs CD4⁺ y CD8⁺ (E) junto con los gráficos de la frecuencia de LTs CD4⁺CD25⁺ o CD4⁺CD8⁺ respectivamente. Para todas las figuras se presentan datos conglomerados de dos experimentos independientes. Las diferencias entre las condiciones experimentales se determinaron utilizando las pruebas ANOVA y post-hoc Bonferroni, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; $p < 0,001$; ns = non significant.

Luego de haber caracterizado la capacidad inmunosupresora de las RATEVs sobre LTs CD4⁺, nos planteamos explorar el potencial mecanismo mediante el cual éstas modulan la respuesta inmune. Considerando que la ectoenzima CD73 cargada en VEs derivadas tanto de Tregs como de otros tipos celulares ha sido ampliamente asociada a inmunosupresión (73, 116-118), hipotetizamos que la actividad de CD73 podría ser un componente determinante para la función de las RATEVs. Además, nuestros resultados previos indican que CD73 presente en las RATEVs se encuentra activa enzimáticamente siendo capaz de generar ADO a partir de AMP. Al ser ADO una molécula altamente antiinflamatoria, nos propusimos explorar el rol de esta enzima en la capacidad inmunosupresora de las RATEVs. Para abordar esta interrogante

realizamos un ensayo de supresión con RATEVs en presencia de AMP, simulando un ambiente proinflamatorio enriquecido en ATP extracelular susceptible a ser rápidamente degradado en ADP/AMP y éste, a su vez, en ADO a partir de la acción de CD73. En este contexto, utilizamos LTs CD4⁺CD73⁻ como células respondedoras con el fin de eliminar cualquier otra fuente de CD73 del sistema. Para develar la participación de CD73, en ciertas condiciones se añadió uno de los dos tipos de inhibidores de CD73 (nombrados como APCP1 y APCP2). De esta manera evaluamos si al bloquear la capacidad de las RATEVs de hidrolizar AMP y generar ADO disminuye su capacidad inmunosupresora. A modo de comparación, se realizó el mismo ensayo sobre LTs CD4⁺CD73⁺. La pureza de ambos subtipos de LTs aislados mediante *cell sorting* se muestra en la **Figura Suplementaria 2**.

Inicialmente, corroboramos que, en ausencia de estimulación con α CD3/ α CD28, no se indujera la activación de LTs CD4⁺CD73⁻ (**Figura 5A, barras blancas**) ni de CD4⁺CD73⁺ (**Figura 5B, barras blancas**). Para todas las condiciones sin activar, el porcentaje de expresión de CD25 fue menor al 3%, comprobando que las células no se activaron de manera espontánea en ausencia de estímulo. Tras la estimulación, se indujo la expresión de CD25 en ambos subtipos LTs (**Figura 5A y 5B, primera barra roja**), presentándose un $69,8 \pm 19,7\%$ y $39,3 \pm 24,2\%$ de células CD25⁺, respectivamente. No obstante, la adición de AMP disminuyó drásticamente la expresión de CD25 en los LTs CD4⁺CD73⁻ ($5,42 \pm 4\%$) (**Figura 5A, segunda**

barra roja) y totalmente en los LTs CD4⁺CD73⁺ ($0,9 \pm 0,7\%$) (**Figura 5B, segunda barra roja**). Considerando estos resultados, analizamos si la estimulación pudo haber inducido la expresión de CD73 en los LTs CD4⁺CD73⁻, la cual estaría hidrolizando el AMP, generando ADO y, en consecuencia, e inhibiendo la activación de éstos. En la **Figura 5C** se muestra que la estimulación con α CD3/ α CD28 por sí sola indujo la expresión de CD73 en los LTs CD4⁺CD73⁻ (desde un $0,42 \pm 0,6\%$ en ausencia de estimulación a un $43,22 \pm 13,4\%$ post activación), por lo que los hace susceptibles a ser suprimidos en presencia de AMP. En contraste, y como era de esperar, más del 90% de los LTs CD4⁺CD73⁺ expresaron CD73 en todas las condiciones (**Figura 5D**), lo que explicaría su supresión total ante la adición de AMP.

Tras definir el efecto del AMP sobre los LTs activados, evaluamos su respuesta a la adición de los inhibidores de CD73 previo a la incubación con AMP. En este contexto, detectamos que, al bloquear CD73, se recuperó casi totalmente ($37,58 \pm 19,4\%$ y $39,22 \pm 22,8\%$ para APCP1 y APCP2, respectivamente) (**Figura 5A, tercera y cuarta barra roja**) o incluso aumentó ($57,7 \pm 1,3\%$ y $60,9 \pm 1,9\%$ para APCP1 y APCP2, respectivamente) (**Figura 5B, tercera y cuarta barra roja**) la activación de los LTs (expresión de CD25) (**Figura 5A y 5B, tercera y cuarta barra de puntos rojos**). Es decir, la adición de AMP (tras la inhibición de CD73) no suprimió su activación.

Una vez caracterizada la respuesta basal de ambos subtipos de LTs estimulados con α CD3/ α CD28, en presencia o no de AMP e inhibidores de CD73, analizamos el efecto de la adición de RATEVs y de la inhibición de CD73 sobre la activación de LTs. Lo primero que detectamos fue que la adición de RATEVs en ausencia de AMP no fue capaz de suprimir la activación ni de los LTs. En el caso de los LTs CD4⁺CD73⁻, no hubo diferencias en la expresión de CD25 entre aquellas condiciones de células activadas tratadas con RATEVs en ausencia de AMP ($69,42 \pm 15,9\%$ y $72 \pm 14,7\%$ para EV-1 y EV-2, respectivamente) (**Figura 5A, primeras barras celeste y azul**) y aquellas activadas sin RATEVs ni AMP ($69,87 \pm 19,7\%$) (**Figura 5A, primera barra roja**). En el caso de los LTs CD4⁺CD73⁺, la expresión de CD25 incluso aumentó ante el tratamiento con RATEVs en ausencia de AMP ($44,4 \pm 12,3\%$ y $48,6 \pm 22,1\%$ para EV-1 y EV-2, respectivamente) (**Figura 5B, primeras barras celeste y azul**) en comparación al grupo activado sin RATEVs ni AMP ($39,3 \pm 24,2\%$) (**Figura 5B, primera barra roja**). Sin embargo, las RATEVs en conjunto con AMP, suprimieron completamente la activación de ambos subtipos de LTs, suprimiendo casi totalmente la expresión de CD25 tanto en LTs CD4⁺CD73⁻ ($0,47 \pm 0,67\%$ y $0,67 \pm 1,57\%$ para EV-1 y EV-2, respectivamente) (**Figura 5A, segundas barras celeste y azul**) como en LTs CD4⁺CD73⁺ ($1 \pm 0,6\%$ y $1,9 \pm 2,8\%$ para EV-1 y EV-2, respectivamente) (**Figura 5B, segundas barras celeste y azul**).

La adición de los inhibidores de CD73 tuvieron un efecto de distinta magnitud sobre los LTs CD4⁺CD73⁻ que sobre los CD73⁺. Por un lado, el bloqueo de CD73 en el contexto de los LTs CD4⁺CD73⁻ en presencia de las RATEVs y AMP (**Figura 5A, tercera y cuarta barra celeste y azul**) recuperó solo parcialmente la capacidad de estas células de activarse y expresar CD25 ($12 \pm 11,5\%$ y $7,22 \pm 7,08\%$ para EV-1 y EV-2 en presencia de APCP1 y $11,9 \pm 11\%$ y $7,2 \pm 7\%$ para EV-1 y EV-2 en presencia de APCP2), en comparación con el efecto del bloqueo de CD73 previo a la adición de AMP y en ausencia de las RATEVs ($37,5 \pm 19,4\%$ para APCP1 y $39,22 \pm 22,8\%$ para APCP2) (**Figura 5A, tercera y cuarta barra roja, respectivamente**). En el caso de los LTs CD4⁺CD73⁺, este efecto fue aún más marcado. La adición de los inhibidores de CD73 en presencia de RATEVs y AMP recuperó en menor medida la capacidad de estas células de activarse, logrando un porcentaje de expresión de CD25 del $10,4 \pm 15,1\%$ y $2 \pm 1\%$ para EV-1 y EV-2 ante la inhibición con APCP1 (**Figura 5B, tercera barra celeste y azul**) y del $8,3 \pm 8,3\%$ y $2,9 \pm 2,3\%$ para EV-1 y EV-2 ante la inhibición con APCP2 (**Figura 5B, cuarta barra celeste y azul**). En contraste, la inhibición de CD73 previo a la adición de AMP en ausencia de las RATEVs incluso estimuló la expresión de CD25 por sobre la condición de activación basal ($39,3 \pm 24,2\%$) (**Figura 5B, primera barra roja**), donde la expresión de CD25 ante el uso de APCP1 fue $57,7 \pm 1,3\%$

(Figura 5B, tercera barra roja) y $60,9 \pm 1,9\%$ para APCP2 (Figura 5B, cuarta barra roja).

En resumen, podemos concluir que la actividad AMPasa mediada por CD73 presente en las RATEVs es fundamental para que éstas puedan ejercer su actividad inmunosupresora sobre LTs CD4⁺.

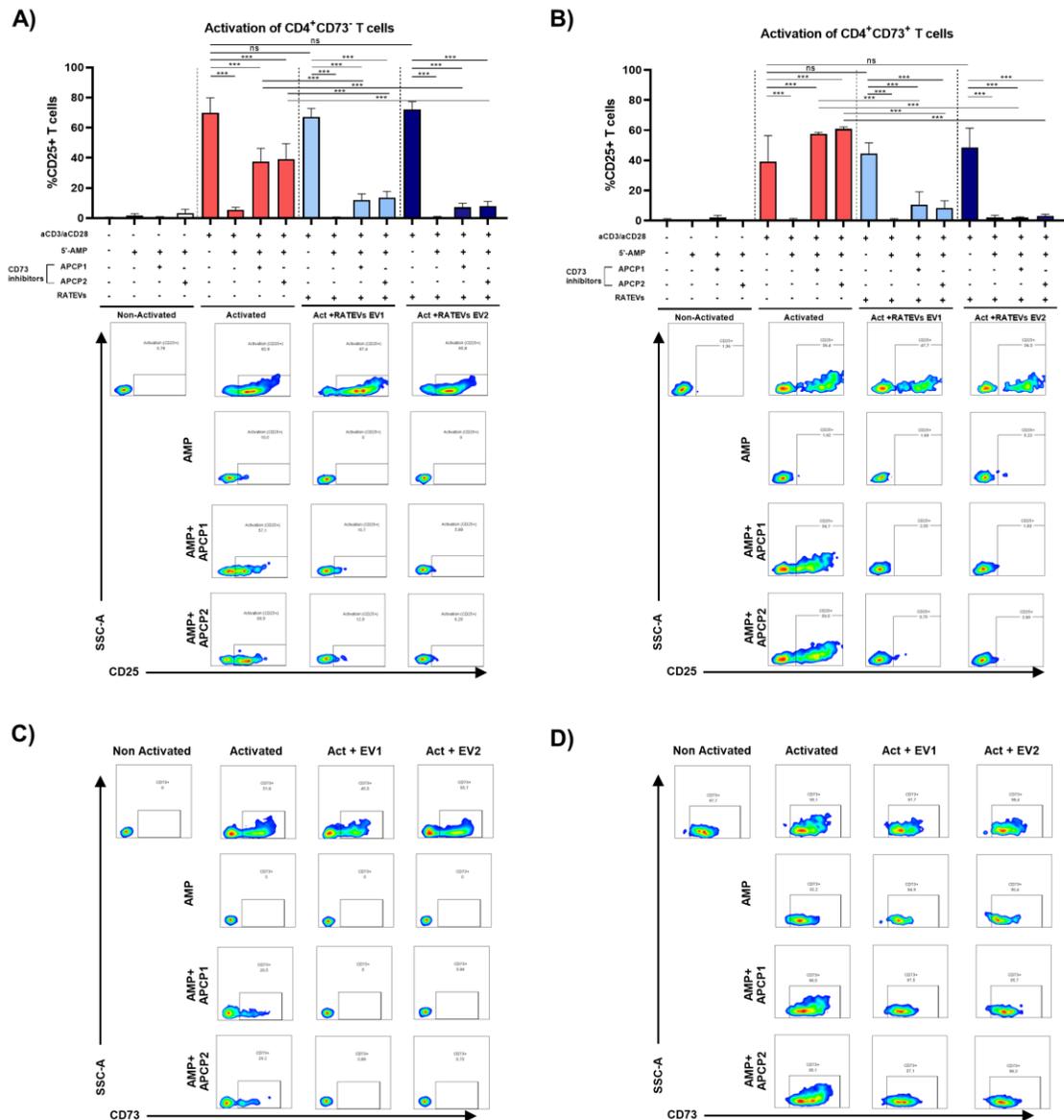


Figura 5: La función AMPasa de CD73 presente en las RATEVs es determinante para su efecto inmunosupresor sobre LTs CD4⁺.

LTs respondedores CD4⁺CD73⁻ (A y C) o CD73⁺ (B y D) fueron estimulados con α CD3/ α CD28 (10 y 2 μ g/mL, respectivamente) en presencia de EHNA (10 μ M) y NBTI (10 μ M) e incubados con AMP (50

μM), RATEVs ($1,3 \times 10^8$ o $2,6 \times 10^8$ representadas como EV-1 y EV-2, respectivamente) y alguno de los inhibidores de CD73 ($100\mu\text{M}$) APCP1 o APCP2 según la condición correspondiente. Luego de 72 h, se evaluaron los niveles de activación de los LTs de acuerdo a la expresión de CD25 (A-B) y a la expresión de CD73 (C-D), mediante FC. (A) Gráfico de datos conglomerados donde se exhibe el porcentaje de LTs CD25⁺ inicialmente CD4⁺CD73⁻. Bajo los gráficos, se muestran *smoothed dotplots* representativos para cada condición. (B) Gráfico de datos conglomerados donde se exhibe el porcentaje de LTs CD25⁺ inicialmente CD4⁺CD73⁺. Bajo los gráficos, se muestran *smoothed dotplots* representativos para cada condición. (C-D) *Smoothed dotplots* representativos que muestran el porcentaje de células CD73⁺ para cada condición en LTs CD4⁺CD73⁺ y CD4⁺CD73⁻, respectivamente. Los datos se presentan como promedio \pm SEM de 2 experimentos independientes. Las diferencias entre las condiciones experimentales se determinaron utilizando las pruebas ANOVA y post-hoc Bonferroni, * $p < 0,05$; ** $p < 0.01$; $p < 0,001$; *ns*= non significant.

OBJETIVO 2: Analizar el efecto de las vesículas extracelulares derivadas de RATregs en la frecuencia y fenotipo de Macs (M1/M2) y linfocitos T CD4⁺ (Th17/Treg) durante la periodontitis.

Las VEs derivadas de Tregs han demostrado regular la respuesta de distintos tipos de células inmunes tanto *in vitro* como *in vivo* (72, 75, 79, 80, 119). Asimismo, nuestros resultados previos confirman que las RATEVs son capaces de suprimir la respuesta efectora de LTs. Considerando estos antecedentes, nos planteamos investigar el efecto de las RATEVs sobre la respuesta inmune gatillada durante la periodontitis. Para esto, utilizamos el modelo experimental de inducción por ligadura (descrito en la sección de materiales y métodos). El esquema general del modelo y los días en los cuales se realizaron las inoculaciones de RATEVs o PBS 1X (vehículo) se presentan en la **Figura 6A**. Transcurridos los 10 días, caracterizamos el efecto del tratamiento con RATEVs sobre la respuesta inmune local en la mucosa gingival y linfonodos cervicales. Para esto, evaluamos los cambios en la frecuencia y fenotipo de distintas poblaciones leucocitarias, con especial enfoque en LTs CD4⁺ (**Figura 6 y 7**) y Macs (**Figura 8**).

Para distinguir las distintas poblaciones de LTs en la mucosa gingival y linfonodos cervicales definimos una estrategia de *gating* (**Figura Suplementaria 3 y 4**, respectivamente) que nos permitió identificar los LTs CD4⁺, CD8⁺ y Tregs. Luego, en

aquellas poblaciones celulares, evaluamos las distintas moléculas de interés tales como marcadores de superficie, factores de transcripción y citoquinas.

Inicialmente, en la mucosa gingival, evaluamos al estado de activación de los LTs CD4⁺ según la expresión del marcador de activación CD25 (**Figura 6B**) (120). En este contexto, detectamos una menor expresión de CD25 en los grupos tratados con RATEVs (EV-1 y EV-2) en comparación al grupo con periodontitis no tratado (Perio) ($19,58 \pm 6,01\%$ y $27,63 \pm 14,07\%$ versus $43,05 \pm 14,39\%$, respectivamente). Luego, evaluamos las poblaciones linfocitarias asociadas con el proceso de destrucción ósea, es decir, LTs CD4⁺ secretores de IL-17A y/o que expresen RANKL. Ante el tratamiento con las dos dosis de RATEVs, la frecuencia de LTs CD4⁺IL-17A⁺ disminuyó significativamente en comparación al grupo no tratado ($12,24 \pm 4,72\%$ y $13,42 \pm 6,8\%$ versus el control $31,16 \pm 14,18\%$) (**Figura 6C**). La misma tendencia se observó para la población de LTs CD4⁺ROR γ t⁺ ($10,66 \pm 6,44\%$ y $12,3 \pm 8,49\%$ versus el control $31,86 \pm 28,47\%$) (**Figura 6C**) y CD4⁺RANKL⁺ ($42,07 \pm 11,22\%$ y $44,97 \pm 14,96\%$ versus $58,21 \pm 11,01\%$) (**Figura 6D**). Por otro lado, estudiamos el efecto de las RATEVs sobre los Tregs (CD4⁺FoxP3⁺) (**Figura 6E, gráfico izquierdo**). En este caso, detectamos que el tratamiento con RATEVs en ambas concentraciones disminuyó la frecuencia total de Tregs ($19,92 \pm 7,9\%$ y $24,39 \pm 13,29\%$ versus el control $37,49 \pm 10,29\%$). Ante estos resultados y, teniendo en cuenta que los Tregs en respuesta al microambiente proinflamatorio local, son susceptibles a perder su capacidad inmunosupresora y a

adquirir funciones proinflamatorias que contribuyen a la patogénesis de la enfermedad mediante, por ejemplo, la secreción de citoquinas proinflamatorias, evaluamos la presencia de Tregs secretores de IL-17A (51, 121). Al igual que en el caso de los LTs Th17 (ROR γ ⁺), la frecuencia de Tregs IL-17A⁺ aumentó durante la periodontitis; no obstante, el tratamiento con RATEVs disminuyó significativamente su frecuencia (24,67 \pm 4,26% y 28,05 \pm 6,77% versus el control 46,21 \pm 21,86%) (**Figura 6E, gráfico derecho**).

Finalmente, basado en antecedentes que describen que las VEs pueden transportar y transferir sus moléculas cargo a las células blanco, nos planteamos analizar si el tratamiento con RATEVs generó algún cambio en la expresión de CD73 en los LTs CD4⁺ presentes en la mucosa gingival (**Figura 6F**). En este sentido, no detectamos cambios significativos entre los grupos tratados con RATEVs y el control sin tratamiento en cuanto a la frecuencia de LTs CD4⁺CD73⁺ (34,4 \pm 8,4% y 39,8 \pm 11,8% versus el control 36,2 \pm 14,4%) ni la MFI de CD73 (572,8 \pm 119,5 y 658,3 \pm 179,9 versus 591,7 \pm 200,9). Por esta razón procedimos a evaluar su expresión en los LTs presentes en los linfonodos cervicales drenantes de los tejidos periodontales.

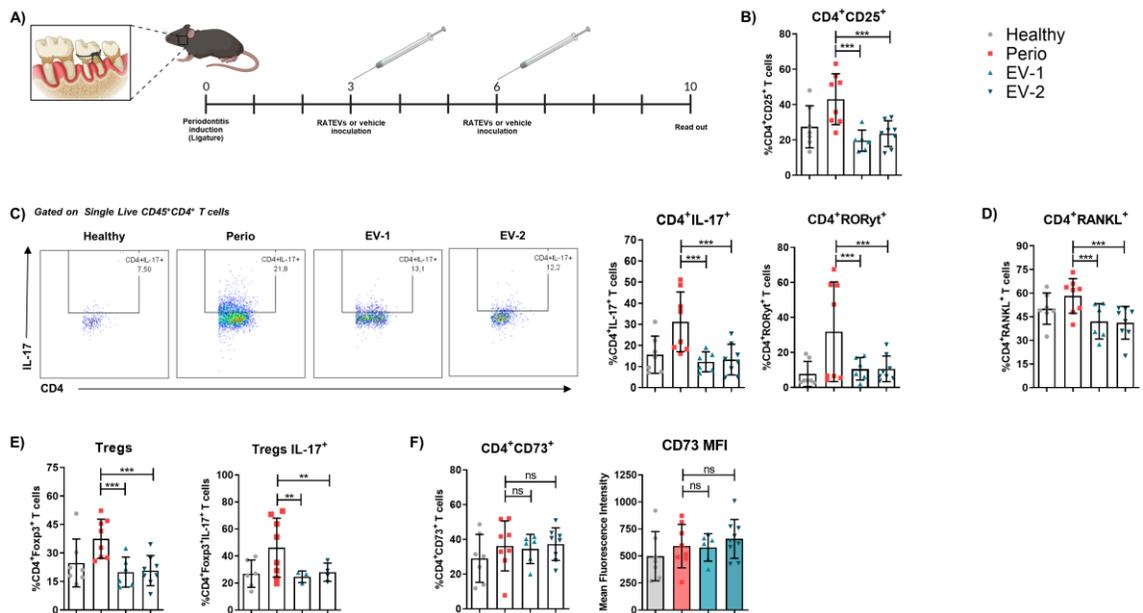


Figura 6: Las RATEVs modulan la respuesta de LTs CD4⁺ presentes en la mucosa gingival durante la periodontitis suprimiendo su activación, secreción de IL-17A y expresión de RANKL.

(A) Esquema del modelo de inducción de periodontitis experimental y pauta de inoculación de RATEVs/ PBS 1X. (B) Frecuencia de LTs CD4⁺CD25⁺. (C) *Dot plot* representativo de la expresión de IL-17A en LTs CD4⁺ (izquierda) y gráfico de datos conglomerados de la frecuencia de LTs CD4⁺IL-17A⁺ y CD4⁺RORγt⁺ (gráfico central y derecho, respectivamente) (D) Frecuencia de LTs CD4⁺RANKL⁺ (E) Frecuencia de Tregs totales (CD4⁺FoxP3⁺) y Tregs secretores de IL-17A (CD4⁺FoxP3⁺IL-17A⁺) (gráfico a la izquierda y a la derecha, respectivamente) (F) Frecuencia de LTs CD4⁺CD73⁺ y MFI para CD73 (gráfico a la izquierda y a la derecha, respectivamente). Los datos que se presentan son a partir de 3 experimentos independientes donde cada punto representa un ratón. Los grupos Sano y EV-1 tienen un n = 6 y los grupos Perio y EV-1 un n = 8. De manera excepcional, debido al reducido número de eventos, en el análisis de los Tregs IL-17A⁺, los grupos EV-1 y EV-2 presentan un n = 3. Los gráficos se expresan en promedio ± desviación estándar (SD). Las diferencias entre las condiciones experimentales se

determinaron utilizando las pruebas ANOVA y post-hoc Bonferroni, * $p < 0,05$; ** $p < 0.01$; $p < 0,001$; ns = non significant.

Ante los resultados obtenidos en la mucosa gingival, nos planteamos a evaluar los niveles de expresión de CD73 en tres poblaciones celulares de LTs: CD4⁺, CD8⁺ y Tregs (CD4⁺FoxP3⁺) presentes en los linfonodos cervicales. Para su visualización, se realizó un análisis de alta dimensionalidad t-SNE siguiendo los pasos previamente descritos (122) En la **Figura 7A (superior)** se presenta uno de los mapas generados del análisis donde se representa, en código de color, el área donde se encuentra cada una de las poblaciones de interés. Es decir, los LTs CD8⁺ (amarillo), LTs CD4⁺ (rojo) y Tregs CD4⁺FoxP3⁺ (verde).

En los mapas viSNE (**Figura 7A, inferior**) se muestra la distribución de expresión de los marcadores analizados representados en escala de color tipo mapa de calor para todos los grupos experimentales. En las primeras tres columnas podemos identificar los subtipos celulares de LTs CD4⁺, CD8⁺ y Tregs, respectivamente. En la cuarta columna se exhiben los niveles de expresión de CD73 para cada uno de los subtipos celulares de interés. Adicionalmente, la expresión de CD73 también se expresa como *dot plots* representativos y gráficos de datos conglomerados en las **Figuras 7B-D**. Tanto en los LTs CD4⁺ totales (**Figura 7B**) como en los Tregs (**Figura 7C**) identificamos una subpoblación que presentó una alta expresión de CD73, la cual definimos como CD73^{high}. Por esta razón, para los LTs CD4⁺ y Tregs, separamos el análisis en la

población CD73⁺ total y CD73^{high}. En contraparte, en los LTs CD8⁺ (**Figura 6D**) se presenta únicamente la población CD73⁺ total ante la ausencia de una población CD8⁺CD73^{high}.

En los linfonodos cervicales, el tratamiento con RATEVs en ambas concentraciones (EV-1 y EV-2) aumentó significativamente la frecuencia de LTs CD4⁺CD73⁺ ($32,04 \pm 5,57\%$ y $31,76 \pm 10,21\%$ versus $25,7 \pm 8,45\%$) y CD4⁺CD73^{high} ($6,8 \pm 1,68\%$ y $6,55 \pm 3,26\%$ versus $5,05 \pm 2,45\%$) en comparación al grupo con periodontitis no tratado (Perio) (**Figura 7B**). En el caso de los Tregs (CD4⁺FoxP3⁺), el tratamiento con RATEVs no generó cambios en la frecuencia total de Tregs CD73⁺, sino que aumentó los niveles de expresión de CD73, incrementando la frecuencia de Tregs CD73^{high} ($55,33 \pm 13,04\%$ y $53,18 \pm 18,47\%$ versus $41,73 \pm 17,94\%$) (**Figura 7C**). De manera similar, en los LTs CD8⁺ también aumentó la frecuencia de células CD73⁺ en los grupos tratados con RATEVs ($61,72 \pm 5,71\%$ y $56,2 \pm 18,68\%$ versus $52,05 \pm 18,14\%$) en comparación al grupo de Perio sin tratamiento (**Figura 7D**).

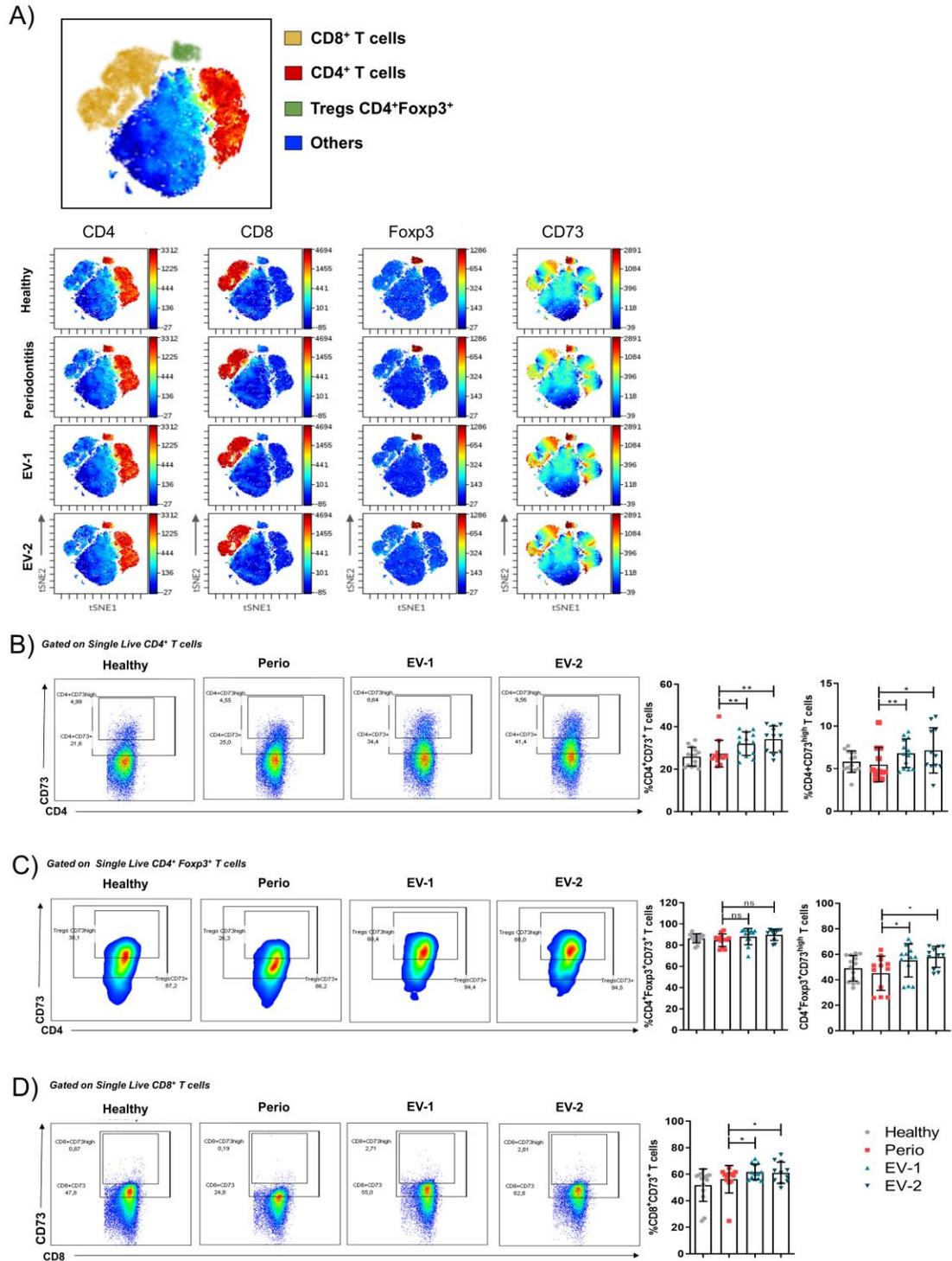


Figura 7: El tratamiento con RATEVs durante la periodontitis promueve la expresión de CD73 en los LTs presentes en los linfonodos cervicales.

(A, superior) Esquema de mapa viSNE que muestra, mediante código de color, la localización topográfica de las poblaciones celulares en las cuales se evaluó la expresión de CD73 (LT CD4⁺, CD8⁺, Tregs y otros). (A, inferior) Mapas representativos del análisis viSNE de 10.000 células preseleccionadas como *single live* donde se analiza la expresión de distintos marcadores de linaje (CD4 y CD8) y de caracterización fenotípica (FoxP3 y CD73) representados en escala de color tipo mapa de calor para cada grupo. Los mapas viSNE muestran en rojo tres poblaciones celulares: LTs CD4⁺ (primera columna), CD8⁺ (segunda columna) y Tregs CD4⁺FoxP3⁺ (tercera columna). En la cuarta columna se muestran los niveles de expresión de CD73 en cada una de las subpoblaciones celulares. (B) *Dot plot* representativo y gráfico de datos conglomerados de la frecuencia de LTs CD4⁺CD73⁺ y CD4⁺CD73^{high}. (C) *Dot plot* representativo y gráfico de datos conglomerados de la frecuencia de Tregs CD4⁺Foxp3⁺CD73⁺ y CD4⁺FoxP3⁺CD73^{high}. (D) *Dot plot* representativo y gráfico de datos conglomerados de la frecuencia de linfocitos T CD8⁺CD73⁺. Los datos que se presentan son a partir de 4 experimentos independientes con un n = 15 para el grupo Sano; n = 13 para el grupo Perio y EV-1; n = 12 para el grupo EV-2. Los gráficos se expresan en promedio ± SD. Las diferencias entre las condiciones experimentales se determinaron utilizando las pruebas ANOVA y post-hoc Bonferroni, * $p < 0,05$; ** $p < 0.01$; $p < 0,001$; *ns*= non significant.

Complementando los resultados obtenidos en LTs, en la mucosa gingival, evaluamos el efecto del tratamiento con RATEVs sobre la frecuencia total de Macs y la expresión de marcadores asociados a los perfiles M1 (CD86) y M2 (CD206). La estrategia de *gating* que utilizamos para identificar estas poblaciones se presentan en la **Figura Suplementaria 5**. En este contexto, identificamos que, ante el tratamiento con la

RATEVs no se generaron cambios significativos en la frecuencia total de Macs (CD45⁺MHC-II⁺F4/80⁺) en comparación al grupo con periodontitis (6,39 ± 2,44% y 4,51 ± 3,87% versus 18 ± 4,92%, respectivamente) (**Figura 8A**).

Como se mencionó en la introducción, en el contexto *in vivo* se ha descrito que es posible que los Macs expresen moléculas asociadas tanto al perfil M1 como M2 de manera simultánea, existiendo fenotipos híbridos. Al evaluar la expresión de CD86, comúnmente asociado al perfil M1, detectamos que sobre el 90% de los Macs CD45⁺MHC-II⁺F4/80⁺ expresaron esta molécula de co-estimulación. Por otro lado, el marcador CD206, comúnmente asociado al perfil M2, presentó distintos niveles de expresión dentro de la población CD86⁺, por lo que consideramos como M2 a aquellos Macs que presentaron la expresión más alta de CD206. Es decir, definimos nuestra población M1-like como CD45⁺MHC-II⁺F4/80⁺CD86⁺CD206^{mid/low} y a la población M2-like como CD45⁺ MHC-II⁺F4/80⁺CD86⁺CD206^{high} (**Figura 8B**).

Una vez definidas las estrategias de fenotipificación, procedimos a evaluar la frecuencia de ambos subtipos de Macs (**Figura 8C y 8E**) y los niveles de expresión de CD86 y CD206 (**Figura 8D y 8F**, respectivamente). En este contexto, no detectamos cambios en la frecuencia de Macs M1-like ni M2-like entre las condiciones evaluadas (**Figura 8C y 8E**, respectivamente). No obstante, hubo cambios en los niveles de expresión de ambos marcadores fenotípicos: en el grupo de periodontitis sin tratamiento, se presentó una mayor MFI de CD86 en comparación a los grupos tratados con RATEVs (4201 ± 600

versus 2795 ± 650 y 3154 ± 435 , respectivamente) (**Figura 8D**). Asimismo, y contrario a lo que esperábamos, en el grupo de periodontitis sin tratamiento también detectamos un aumento en el MFI de CD206 en comparación a los grupos tratados con RATEVs (2969 ± 1182 versus 1466 ± 308 y 1506 ± 1089) (**Figura 8F**). Estos resultados indican que el tratamiento con RATEVs generó en una menor expresión de CD86 y CD206, lo cual podría estar asociado a un efecto supresor generalizado.

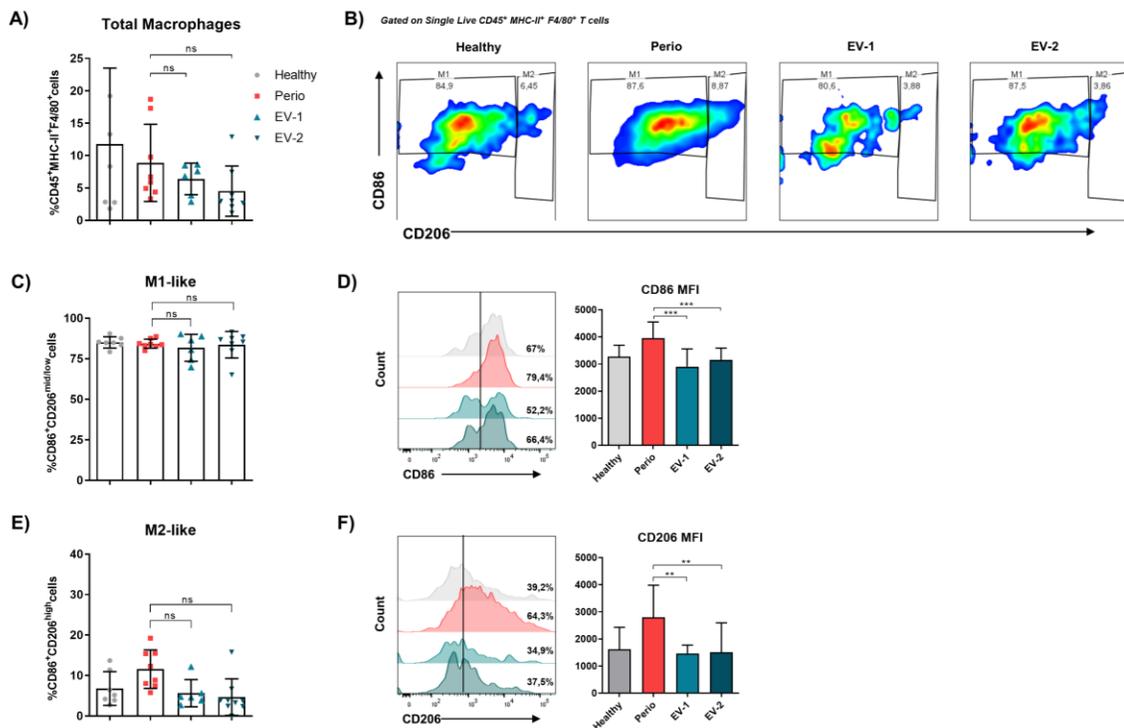


Figura 8: El tratamiento con RATEVs durante la periodontitis disminuye la expresión de CD86 y CD206 en Macs infiltrantes de la mucosa gingival.

(A) Frecuencia total de Macs (CD45⁺MHC-II⁺F4/80⁺). (B) *Smoothed dot plot* representativo para la coexpresión de CD86 y CD206. En los recuadros se enmarcan las poblaciones de Macs M1-like y M2-like

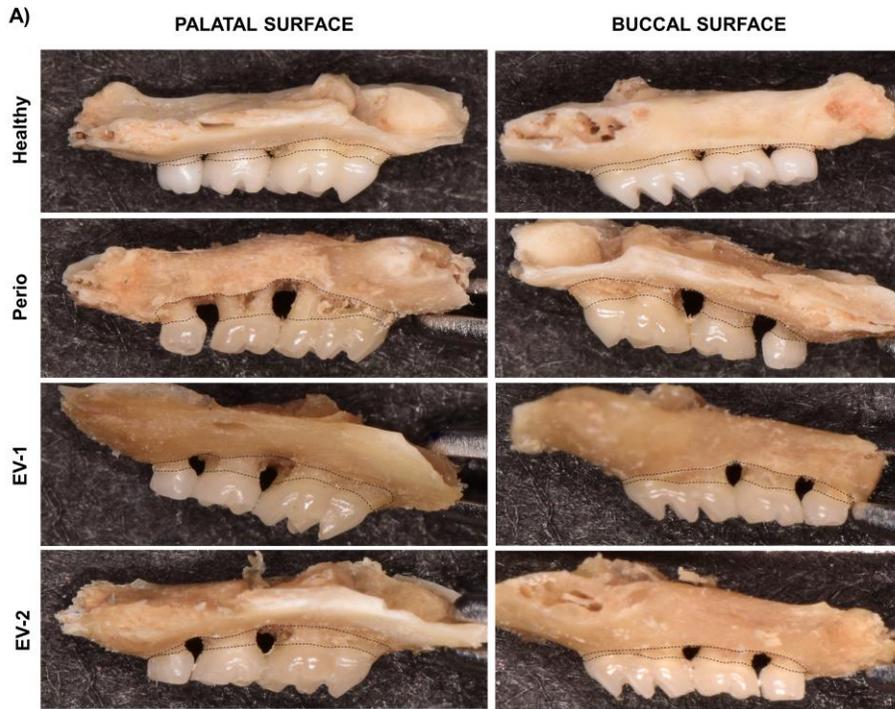
definidas según el nivel de expresión de CD206. (C) Frecuencia de Macs M1-like (CD45⁺MHC-II⁺F4/80⁺CD86⁺CD206^{mid/low}). (D) MFI de CD86 en Macs. (E) Frecuencia de Macs M2-like (CD45⁺MHC-II⁺F4/80⁺CD86⁺CD206^{high}). (F) MFI de CD206 en Macs. Los datos que se presentan son a partir de 3 experimentos independientes con un n=6 para el grupo Sano y EV-1 y n=8 para el grupo Perio y EV-2. Los gráficos se expresan en promedio \pm SD. Las diferencias entre las condiciones experimentales se determinaron utilizando las pruebas ANOVA y post-hoc Bonferroni, * $p < 0,05$; ** $p < 0.01$; $p < 0,001$; *ns*= non significant.

OBJETIVO 3: Analizar el efecto de las VEs derivadas de RATregs en la resorción ósea alveolar durante la periodontitis.

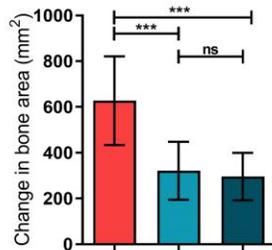
Finalmente, debido a que la resorción ósea alveolar es una de las características de la periodontitis asociada directamente con la exacerbada respuesta inmuno-inflamatoria, evaluamos el efecto de las RATEVs en la inhibición de ésta. Para ello, los maxilares fueron fotografiados y los cambios óseos cuantificados siguiendo el protocolo descrito en la sección de materiales y métodos. En la **Figura 9A** se muestran fotografías representativas para cada uno de los grupos. En la primera fila se encuentra la condición sana sin ligadura, donde se muestra el nivel basal en el cual se encuentra el hueso alveolar. El área promedio comprendida entre LAC-COA de la condición sana sin ligadura se tomó como referencia y se sustrajo a los valores obtenidos en las otras condiciones (Perio/EV-1/EV-2). En las fotografías destaca la extensa área de resorción que se presenta en el grupo de periodontitis sin tratamiento en la cual se presenta exposición del área de furca (entre raíces) en la superficie palatina y vestibular, fenómeno que no detectamos tras el tratamiento con RATEVs.

Los parámetros de cuantificación fueron el área de resorción (**Figura 9B**) y las distancias entre el LAC y COA (**Figura 9C**) en 9 sitios anatómicos de la superficie palatina o vestibular (bucal) de los huesos maxilares. Se compararon los cambios del área de resorción ósea entre los animales del grupo con periodontitis no tratada (Perio) versus los grupos con periodontitis tratados con RATEVs (EV-1 y EV-2). En este

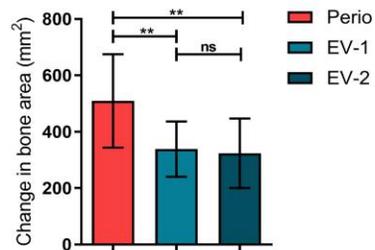
contexto, se observó una menor área de resorción en los grupos tratados con RATEVs en comparación con el grupo Perio, tanto en la superficie palatina (**Figura 9B, izquierda**) ($321 \pm 160,9\text{mm}^2$ y $295,8 \pm 103,54 \text{ mm}^2$ versus $627,5 \pm 321,5 \text{ mm}^2$) como vestibular (**Figura 9B, derecha**) ($338 \pm 97,9 \text{ mm}^2$ y $323,44 \pm 123,4 \text{ mm}^2$ versus $509,4 \pm 165,5 \text{ mm}^2$), respectivamente. Asimismo, se detectó una menor distancia LAC-COA ante el tratamiento con RATEVs en todos los sitios evaluados (**Figura 9C**). En el análisis de la superficie palatina, la mayor distancia LAC-COA se observó en el grupo Perio en relación a la cúspide distal del primer molar ($393,5 \pm 81,3 \mu\text{m}$), a diferencia de los grupos tratados con RATEVs, en los cuales los valores fueron $289,6 \pm 72,4 \mu\text{m}$ y $314,8 \pm 39,5 \mu\text{m}$, respectivamente. En el análisis de la superficie vestibular, la mayor distancia LAC-COA igualmente fue en el grupo Perio, sin embargo, en este caso se presentó en relación a la fosa central vestibular del segundo molar ($287,4 \pm 80,3 \mu\text{m}$), a diferencia de los grupos tratados con RATEVs, en los cuales los valores fueron $248,9 \pm 62,4 \mu\text{m}$ y $241 \pm 67,7 \mu\text{m}$, respectivamente. Las diferencias fueron más discretas en los sitios más extremos. No se detectaron diferencias significativas entre las dos concentraciones de RATEVs utilizadas.



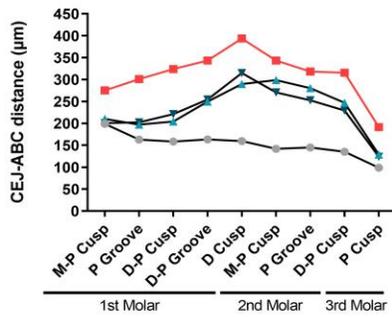
B) Resorption area Palatal surfaces



Resorption area Buccal surfaces



C) Palatal CEJ-ABC distance



Buccal CEJ-ABC distance

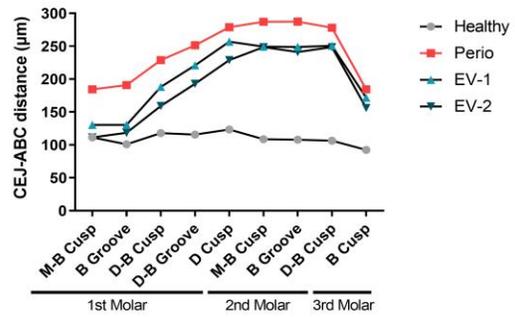


Figura 9: El tratamiento con RATEVs previene la resorción ósea alveolar durante la periodontitis.

(A) Imágenes representativas de los maxilares fotografiados para cada condición. La línea negra punteada delimita el área situada entre el LAC y la COA. (B) Cuantificación del área de resorción ósea evaluada en la superficie palatina (gráfica izquierda) y vestibular (gráfica derecha) expresada en mm². Los datos se expresan como cambio en el área ósea tras sustraer el valor de área promedio obtenida de la condición control sin ligadura establecida como referencia. (C) Cuantificación de la distancia lineal LAC-COA evaluada en la superficie palatina (gráfica izquierda) y vestibular (gráfica derecha) expresada en µm. Las mediciones se realizaron evaluando la distancia entre el LAC y la COA en 9 sitios anatómicos. Cada punto representa el valor promedio para la distancia obtenida para cada uno de los sitios anatómicos evaluados. Las diferencias entre las condiciones experimentales se determinaron utilizando las pruebas ANOVA y post-hoc Bonferroni, * $p < 0,05$; ** $p < 0.01$; $p < 0,001$; ns = non significant.

Posteriormente, con el objetivo de ratificar los hallazgos anteriores, evaluamos la presencia de las células responsables del proceso osteodestructivo, es decir, los OCs. Mediante análisis histológico, evaluamos la presencia de OCs definiéndolos como TRAP⁺, multinucleados y ubicados en relación al tejido óseo (**Figura 10, indicados con cabezas de flecha rojas**). En este sentido, pudimos observar de manera no cuantitativa, una alta presencia de OCs en la condición Perio, lo cual no se detectó ante el tratamiento con RATEVs.

En conjunto, estos hallazgos indican que las RATEVs previenen la resorción ósea alveolar, efecto que podría potencialmente asociarse a la inhibición de la diferenciación de OCs.

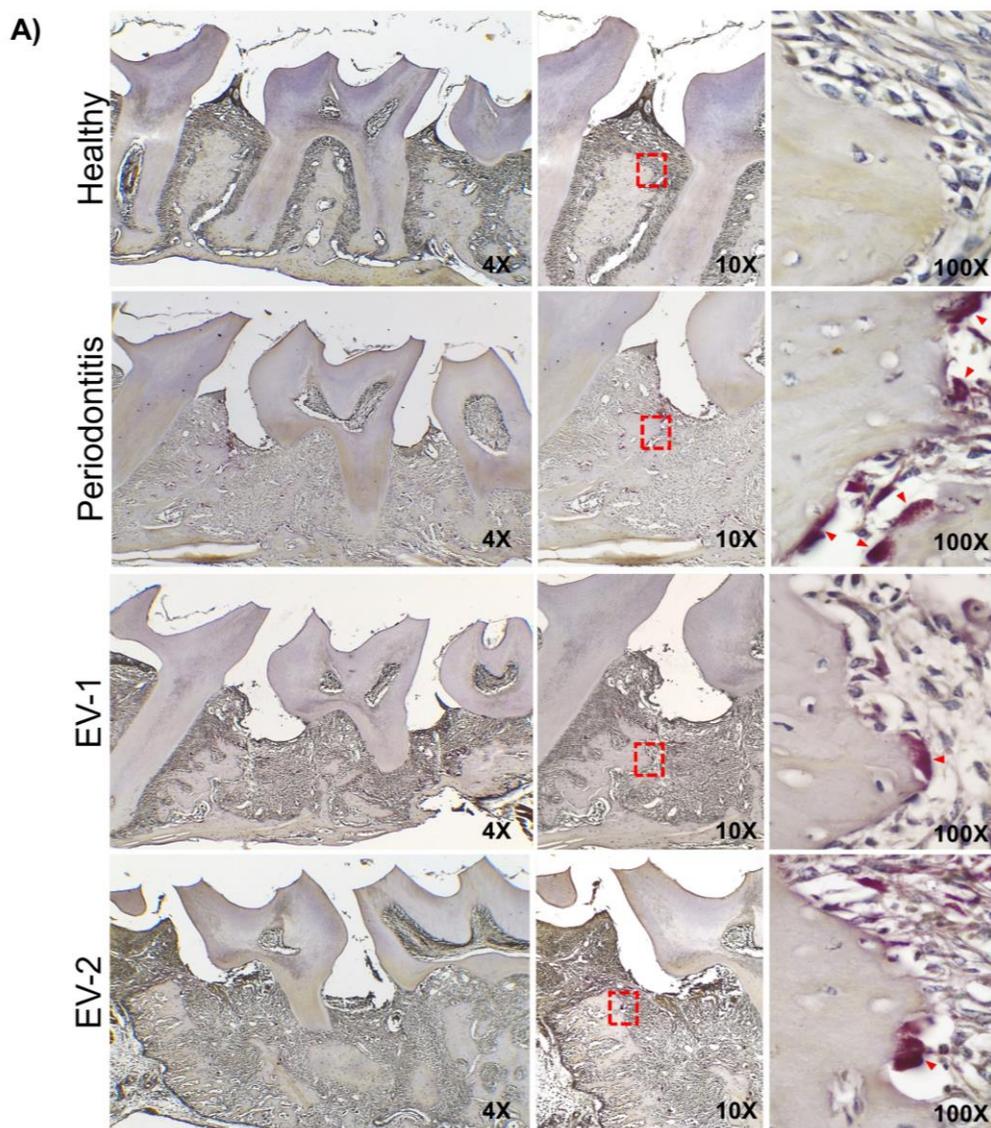


Figura 10: Detección de OCs TRAP⁺ durante la periodontitis y ante el tratamiento con RATEVs.

(A) Imágenes de los cortes histológicos adquiridas a los aumentos 4X (columna izquierda), 10X (columna central) y 100X (columna derecha). En el recuadro de línea discontinua roja se delimita el área seleccionada para el aumento 100X. Las cabezas de flecha roja indican la localización de los OCs definidos como células multinucleadas TRAP⁺.

VI. DISCUSIÓN

Las VEs son estructuras membranosas pequeñas liberadas por las células, las cuales actúan como mediadoras de la comunicación intercelular. Las VEs pueden ejercer un efecto en la célula receptora mediante el transporte e intercambio de mediadores biológicamente activos tales como proteínas, lípidos y material genético (63). Desde su descubrimiento, múltiples estudios describen la participación de las VEs en procesos fisiológicos y patológicos, razón por la cual, en los últimos años, han generado especial atención por su potencial uso como biomarcador diagnóstico y terapéutico. En particular, las VEs derivadas de Tregs (TEVs), tienen la capacidad de suprimir respuestas efectoras y proinflamatorias mediante la modulación de células inmunes (72, 123). No obstante, el número de Tregs naturalmente disponibles para aislación de VEs es limitado, lo cual dificulta su obtención y, por lo tanto, su proyección terapéutica. Considerando esta limitante, en este proyecto aislamos VEs (RATEVs) derivadas de Tregs inducidos *in vitro* (RATregs), para posteriormente evaluar y caracterizar su potencial inmunosupresor sobre LTs efectores y en un modelo animal de periodontitis. En el presente estudio demostramos que los RATregs liberan RATEVs capaces de generar cambios inmunes como la supresión de los LTs CD4⁺ y prevenir la pérdida ósea alveolar característica de la periodontitis. Asimismo, detectamos que la actividad AMPasa catalizada por la ectoenzima CD73, presente en las RATEVs, es determinante su función inmunosupresora.

Debido al estrés celular y daño tisular característico de una condición inflamatoria como la periodontitis, se liberan altas cantidades de ATP al espacio extracelular (124), lo que favorece la muerte celular y la inflamación excesiva o descontrolada (125). Una vez en el espacio extracelular, el ATP es susceptible a ser hidrolizado secuencialmente por las ectoenzimas CD39 y CD73. Esta última cataliza la hidrólisis de AMP a ADO, molécula altamente inmunosupresora que al interactuar con el receptor A_{2a}R expresado en LTs inhibe la activación y secreción de citoquinas mediante el aumento de cAMP intracelular (126). En la periodontitis, el ATP extracelular se asocia a la pérdida ósea alveolar al inducir un incremento en la producción de citoquinas proinflamatorias (127), motivo por el cual se ha propuesto como blanco terapéutico para prevenir la inflamación y la pérdida de hueso alveolar (127, 128).

Basándonos en las primeras observaciones expuestas en este estudio en el cual detectamos una expresión sustancialmente alta de CD73 tanto en RATregs como RATEVs, hipotetizamos que la actividad de esta enzima podría ser determinante para la función inmunosupresora de las RATEVs. Particularmente, planteamos que la generación de ADO mediada por CD73 podría explicar, al menos en parte, la supresión de LTs CD4⁺ gatillada por las RATEVs que detectamos en este trabajo tanto *in vivo* como *in vitro*.

Tras la caracterización de las RATEVs, nuestro primer objetivo fue evaluar el efecto de las RATEVs sobre la proliferación y activación de LTs CD4⁺ y CD8⁺ estimulados policlonalmente en una suspensión de esplenocitos totales aislados de bazo. Esta primera aproximación se sustenta en estudios previos que han reportado que, en ratones, los esplenocitos presentan proporciones de APCs que asimilan aquellos presentes en el tejido gingival (129, 130). En este ensayo, detectamos una disminución en la proliferación y activación de LTs CD4⁺ ante la exposición con RATEVs, confirmando su efecto inmunosupresor. Este resultado está en concordancia con estudios anteriores en los cuales se evaluó el efecto de la exposición a TEVs sobre los LTs. En todos los casos, se generó la supresión de la proliferación, activación y/o secreción de citoquinas (73, 75, 79).

Posteriormente, con el fin de abordar nuestra hipótesis donde planteamos que la actividad de CD73 cumple un rol fundamental en la función de las RATEVs, montamos un ensayo de supresión sobre dos poblaciones de LTs CD4⁺ estimulados policlonalmente: (1) CD73⁻ (para que el único CD73 del sistema proviniera de las RATEVs) y (2) CD73⁺ a modo de comparación. En ciertas condiciones agregamos AMP, el sustrato de CD73, para promover su hidrólisis y consecuente generación de ADO, de manera tal que se favoreciera la actividad de esta enzima. Ante la adición de AMP, se potenció significativamente la capacidad supresora de las RATEVs, las cuales indujeron una supresión total de la activación de ambos subtipos de LTs CD4⁺. No

obstante, en ausencia de AMP, a diferencia del ensayo anterior en el cual los LTs CD4⁺ se encontraban en presencia de otros subtipos de células inmunes que podrían estar generando AMP extracelular susceptible a ser hidrolizado, las RATEVs no fueron capaces de suprimir a los LTs CD4⁺ aislados. Estos hallazgos sugieren que la presencia de AMP, es fundamental para que las RATEVs puedan suprimir la activación de los LTs CD4⁺.

Asimismo, exploramos la relevancia de la actividad AMPasa de CD73 en la función supresora de las RATEVs, evaluando el efecto de su inhibición sobre la activación de los LTs. La adición de alguno de los inhibidores de CD73 a los LTs que inicialmente eran CD4⁺CD73⁻ (en los cuales se gatilló la expresión de CD73 tras su estimulación policlonal) previo a la exposición a AMP, permitió que estas células conservaran en gran medida su capacidad de activarse. No obstante, cuando expusimos a los LTs a los inhCD73 en conjunto con las RATEVs y AMP, la capacidad de activarse de estas células fue considerablemente menor, incluso nula en el caso de los LTs inicialmente CD4⁺CD73⁺. Esto último nos reveló que, al sumar el CD73 expresado por las células junto con el CD73 proveniente de las RATEVs, la adición del inhCD73 a la concentración utilizada no fue suficiente para inhibir completamente la actividad AMPasa de todo el CD73 presente en el sistema, por lo que la mayoría de las células se suprimieron de todas formas. Es decir, el CD73 expresado tanto en las RATEVs como en las células respondedoras, ante la exposición a AMP, estaría generando un ambiente

altamente enriquecido en ADO y, en consecuencia, suprimido. En conjunto, estos resultados corroboran la relevancia de la actividad AMPasa mediada por CD73 cargada en las RATEVs en su función supresora, la cual fue necesaria para que éstas pudieran inhibir la activación de los LTs CD4⁺.

La actividad AMPasa de CD73 cargada en las TEVs fue el primer mecanismo de acción propuesto para explicar su función. En este contexto, se observó que aquellas TEVs derivadas de LTs CD4⁺CD73⁻ no exhiben capacidad supresora (73). Posteriormente, otros estudios corroboraron la presencia de CD73 en las TEVs en conjunto con otras moléculas asociadas a inmunosupresión, tales como IL-35 (80) y Neuropilina-1 (Nrp1) (131). En este último trabajo, los autores realizaron la caracterización proteómica de VEs derivadas de nTregs *wild type* (*wt*) o *knock-out* para Nrp-1 (Nrp1KO). A partir de aquel análisis, dilucidaron que las VEs derivadas de los Tregs Nrp1KO, además de la Nrp-1, poseían un menor enriquecimiento de CD73 en contraste con las VEs derivadas de Tregs *wt*. Más importante aún, las VEs derivadas de los Tregs Nrp1KO deficientes en CD73, a diferencia de las TEVs *wt*, no fueron capaces de suprimir la proliferación de LTs efectores *in vitro* ni de inducir tolerancia a trasplante de piel. Estos antecedentes nos permiten especular que la expresión de CD73 es necesaria para que las TEVs puedan desplegar su acción inmunosupresora.

Además de las TEVs, VEs derivadas de otras fuentes celulares distintas a los Tregs pueden contener CD73. Por ejemplo, algunas células tumorales liberan VEs CD73⁺, las

cuales contribuyen a la inmunosupresión local del microambiente tumoral y a la evasión inmune (117, 118, 132, 133). En un modelo murino de xenoinjerto para leucemia linfocítica aguda, la inhibición específica de la actividad enzimática de CD73 presente en altas concentraciones en VEs derivadas de células tumorales resultó en un aumento en la apoptosis de células tumorales, menor quimio resistencia y retraso en el crecimiento tumoral. Es decir, al bloquear CD73, disminuye la inmunosupresión mediada por las VEs tumorales y se potencia la actividad antitumoral (134). Por otro lado, VEs CD73⁺ derivadas de células mesenquimales (MSCs) también se relacionan, entre otras funciones, a la supresión inmune (135). El eje CD73/ADO asociado a VEs derivadas de MSCs ha demostrado promover la polarización de Macs hacia un perfil M2 (136), poseer un efecto protector ante el daño renal isquémico (137) e incluso inhibir la pérdida de hueso alveolar inducida por periodontitis (138). Asimismo, se ha reportado que CD73 puede estar presente en VEs derivadas de otras células inmunes, tales como linfocitos B (LBs) (139) y LTs CD8⁺ (116). En este contexto, recientemente se demostró que las VEs CD73⁺ derivadas de LTs CD8⁺ humanos actúan en colaboración con la enzima CD39 presente en los Tregs para inducir la generación de ADO extracelular, y que este mecanismo de supresión inmune es necesario para el control de la inflamación (116). Todos estos antecedentes respaldan los hallazgos detectados en nuestro trabajo.

Sin embargo, aun cuando nuestros resultados indican que la actividad de CD73 presente en las RATEVs es determinante para su función supresora sobre LTs CD4⁺, no

descartamos la posibilidad de que éstas puedan contener otros componentes que influyan en la supresión inmune. Múltiples estudios han mostrado que las TEVs contienen miRNAs capaces de generar un cambio en la función de las células blanco mediante silenciamiento génico (123). Algunos miRNAs tales como Let-7d, Let-7b, miR-155 y miR-146a-5p contenidos en TEVs demostraron dirigirse a los LTs y disminuir su activación (75, 140). Más recientemente, y en concordancia con nuestros resultados, se reportó que las VEs derivadas de Tregs inducidos con TGF- β (iTreg-EVs) también poseen un efecto supresor tanto *in vitro* como *in vivo*. En un modelo murino de artritis autoinmune, los autores observaron que las iTreg-EVs administradas sistémicamente infiltraron las articulaciones con desarrollo activo de la patología y previnieron eficientemente el desbalance Th17/Treg. No obstante, en este estudio proponen que el control de la respuesta inflamatoria fue dependiente de la modulación de la expresión de Notch1 asociado a la función de miR-449a-5p (78).

Las TEVs también pueden cargar otras moléculas tales como enzimas y citoquinas. En TEVs obtenidas a partir de un tipo específico de Tregs (CD4⁺ dnIKK2-Tregs), la capacidad immuno-moduladora se atribuyó a la enzima iNOS, la cual, una vez transmitida a LTs *naïve* bloqueó su progresión del ciclo celular induciendo apoptosis, exponiendo su capacidad antiproliferativa y citotóxica (79). Por otro lado, se ha visto que los Tregs secretan VEs decoradas con ambos componentes de IL-35 (Ebi3 y p35), los cuales son capaces de ser adquiridos pasivamente por linfocitos no-Tregs (LTs y

LBs) y ser expuestos en su superficie. Este efecto estimula la producción de esta citoquina por parte de los linfocitos no-Tregs e impone en ellos un fenotipo inmunosupresor resultando en supresión inmune secundaria, proceso denominado tolerancia infecciosa (80).

Según su origen, los Tregs presentan rasgos fenotípicos y funcionales comunes y distintivos (141). En este sentido, las VEs derivadas de Tregs naturales e inducidos podrían presentar diferencias en su cargo, lo cual estaría directamente asociado a su función. Los estudios previamente expuestos revelan heterogeneidad en cuanto al tipo de Tregs utilizado, método de aislación y caracterización, lo que dificulta analizar los hallazgos en conjunto y obtener conclusiones generales. Por lo tanto, aun cuando es posible que las RATEVs posean moléculas cargo en común con las TEVs mencionadas, es altamente probable que presenten componentes aún no descritos. En este sentido, sería muy interesante, a futuro, caracterizar y contrastar el cargo y función de VEs derivadas de los distintos subtipos de Tregs.

A la fecha, diversos estudios han evaluado el potencial terapéutico de las TEVs en modelos a preclínicos. Por ejemplo, en un modelo murino $Rag2^{-/-}$ de colitis e inflamación sistémica, las TEVS fueron capaces suprimir la activación de los LTs Th1 y disminuir la inflamación asociada a la colitis (75). Por otro lado, en un modelo de trasplante de riñón, la administración de TEVs obtenidas de ratones donantes previo al trasplante indujo tolerancia al aloinjerto, efecto que no se detectó ante la administración

de TEVs obtenidas de los mismos ratones recipientes (74). Asimismo, en un modelo de trasplante de piel en ratón humanizado, se demostró que las TEVs humanas protegieron el tejido ante la injuria mediada por la respuesta alo-inmune, limitando la infiltración de células inmunes (142). Adicionalmente, el desarrollo de ciertos desórdenes autoinmunes se ha asociado a anormalidades en la síntesis de TEVs inmunosupresores, es decir, a la liberación de TEVs defectuosas. Las TEVs producidas por Tregs de pacientes afectados por esclerosis múltiple remitente, presentaron una actividad supresora disminuida (143). Esto último nos abre la posibilidad de proyectar el uso de TEVs como herramienta diagnóstica ya que, si podemos detectar cambios en su composición ante cierta patología, podríamos utilizarlas como biomarcador. En conclusión, estos estudios indican que las TEVs son eficientes en la regulación de respuestas alogénicas asociadas a trasplantes e inflamatorias y sugieren que son capaces de generar un cambio en el microambiente de manera tal que se facilite la recuperación de la homeostasis.

Los Tregs son células inmunosupresoras por excelencia, sin embargo, pueden modificar su función reguladora hacia una proinflamatoria en respuesta a señales del microambiente en el cual se ven inmersos, pudiendo contribuir a la inflamación y/o daño tisular (17). En contraste a sus células de origen, las TEVs no son susceptibles a modificar su función en condiciones inflamatorias, sino que son capaces de regular las respuestas inmunes de manera acelular, es decir, de manera independiente a la presencia de las células progenitoras. En este sentido, se presentan como importantes candidatas

para su uso en enfermedades asociadas a desregulación inmune. Por lo tanto, considerando estos antecedentes, evaluamos el efecto de las RATEVs durante la periodontitis, proyectando un primer acercamiento a su potencial uso terapéutico en enfermedades orales.

De acuerdo con la “Global Burden of Disease Study”, la periodontitis severa es la 11va condición más prevalente en el mundo (144). Según el país, la prevalencia de periodontitis se encuentra entre el rango del 20-50% de la población afectada (145) y es una de las mayores causas de pérdida de dientes, lo cual compromete la función masticatoria, tiene repercusiones estéticas y de calidad de vida (146). Actualmente, el tratamiento se basa en la remoción mecánica de la biopelícula microbiana supra y subgingival con la finalidad de eliminar el factor etiológico. Sin embargo, muchas veces no es suficiente para lograr una salud periodontal estable perpetuada en el tiempo. Por definición, la periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por una desregulación inmune y destrucción de los tejidos de soporte periodontal (20). El evento patológico clave de la periodontitis es la resorción ósea alveolar, fenómeno que conlleva a la pérdida dentaria. Por lo tanto, la regulación inmune contribuiría a la eliminación de factores proinflamatorios que conllevan a la destrucción tisular.

De acuerdo nuestros resultados, la administración local de RATEVs indujo la supresión de la respuesta efectora de los LTs CD4⁺ presentes en los tejidos periodontales, lo cual se relacionó con menores niveles de activación (definidos por la expresión de CD25) y

una menor producción de IL-17A. Asimismo, detectamos una reducción en la expresión de RANKL, lo cual podría asociarse a una menor inducción de OCs periodontales. Paralelamente, evaluamos el efecto de las RATEVs sobre la infiltración de Macs y la expresión de los marcadores asociados al perfil M1 (CD86) y M2 (CD206). Sin embargo, nuestros resultados no fueron completamente concluyentes. Aparentemente, y contrario a lo que esperábamos, las RATEVs provocaron la disminución de la expresión tanto de CD86 como CD206, alcanzando niveles similares a aquellos observados en los controles sanos. Estos resultados sugieren que las RATEVs suprimieron a ambos fenotipos de Macs.

En línea con nuestra hipótesis propuesta, es posible que, en el microambiente local, las RATEVs hayan propiciado un enriquecimiento en ADO la cual sería capaz de interactuar con cualquier célula que exprese alguno de sus receptores. Los LTs CD4⁺ expresan predominantemente el receptor A_{2a}R, el cual al interactuar con la ADO extracelular promueve la inhibición de su activación, proliferación y secreción de citoquinas (84). Esto podría explicar, al menos en parte, los resultados obtenidos en cuanto a los LTs. No obstante, los Macs expresan principalmente los receptores A_{2a}R y A_{2b}R (147). Los que, al interactuar con ADO, inhiben la polarización hacia el fenotipo M1 y promueven la conversión hacia el perfil M2. Otros trabajos han reportado que las VEs CD73⁺ promueven la inducción de Macs hacia el perfil M2, favoreciendo la regeneración y/o reparación tisular (138), lo cual no detectamos en nuestro estudio. En

este contexto, creemos que las RATEVs podrían haber propiciado una inmunosupresión generalizada, lo que explicaría la inhibición tanto de LTs como Macs. Más aún, no descartamos la posibilidad de que otros componentes de las RATEVs, no evaluados en este trabajo, puedan haber ejercido un efecto modulador específico sobre los Macs más allá de su inhibición.

Es importante destacar que durante nuestro análisis detectamos que más del 90% de las células $CD45^+MHC-II^+F4/80^+$ expresaron CD86. Por lo que es posible que los Macs que nosotros definimos como M2 ($CD86^+CD206^{high}$), posean un fenotipo compatible con el perfil M1. En este sentido, proponemos una evaluación más a profundidad del efecto de las RATEVs sobre los Macs, complementando nuestros hallazgos mediante una caracterización más completa de ambos subtipos. Sería interesante explorar el efecto de las RATEVs sobre la funcionalidad de los Macs evaluando, por ejemplo, su acción sobre moléculas efectoras tales como citoquinas, iNOS y Arg-1.

La resorción ósea durante la periodontitis se asocia a una alteración del balance dinámico entre la actividad de OBs y OCs. Las condiciones inflamatorias características de la periodontitis conllevan a una activación desregulada de OCs modulada principalmente por el eje RANK/RANKL/OPG (148). Además, la respuesta inmune del hospedero gatillada ante la infección promueve la destrucción persistente de los tejidos periodontales aún luego de la remoción del factor etiológico. Por lo tanto, la regulación

inmune es fundamental para recuperar la homeostasis tisular y permitir una adecuada reparación de la estructura y función de los tejidos periodontales.

En este estudio observamos que el tratamiento con RATEVs redujo significativamente la pérdida de hueso alveolar. Este fenómeno podría estar asociado a la modulación inmuno-inflamatoria, la cual, al reducir las señales pro-osteoclastogénicas, conllevarían a una menor diferenciación y actividad de los OCs. Por otro lado, las RATEVs, mediante la actividad de CD73/ADO, podrían generar una acción directa sobre las células del metabolismo óseo. La ADO inhibe la osteólisis inflamatoria y promueve la reparación a través de la estimulación de A_{2a}R. En particular, la estimulación de A_{2a}R expresado en monocitos inhibe la diferenciación y función de OCs mediada por M-CSF/RANKL *in vitro*, en parte, mediante la reducción de la secreción de IL-1 β y TNF- α (149). La estimulación de A_{2a}R promueve la regeneración ósea, incrementando el número de OBs fosfatasa-alcalina positivos y reduciendo el número de OCs TRAP⁺ de manera similar a la BMP-2 (del inglés, *bone morphogenetic protein-2*) (150). Estos eventos podrían favorecer la formación ósea mediante la estimulación de la diferenciación, proliferación y/o actividad de los OBs a partir de la acción de ADO. Adicionalmente, se ha descrito que el receptor A_{2b}R está implicado y juega un rol inductor de la proliferación de OBs, no así en su diferenciación (151, 152). Adicionalmente, es posible que las RATEVs puedan contener otros factores promotores de la reparación y regeneración ósea. Mediadores tales como OPN, MMP-9 e IL-5 han

sido detectados en VEs derivadas de DCs, las cuales se asociaron a una menor resorción ósea (153).

Finalmente, cabe mencionar que la respuesta inmune desplegada en los tejidos periodontales durante el desarrollo de la periodontitis comprende una compleja red de distintas células inmunes y no inmunes en conjunto con diversos mediadores moleculares pro y antiinflamatorios (20). Con el objetivo de contextualizar nuestros hallazgos en la respuesta inmune periodontal global, en la **Figura Suplementaria 6** representamos otras poblaciones celulares que, aun no siendo el foco de este estudio, podrían estar siendo moduladas por las RATEVs, al igual que los LTs CD4⁺ y Macs.

Durante la periodontitis, los LTs CD8⁺ cumplen un rol osteo-protector ya que disminuyen la osteoclastogénesis y potencian la actividad de los OBs, lo que favorece la inhibición de la resorción ósea y promueve su formación. En nuestro estudio observamos que, *in vitro* las RATEVs promueven la activación y proliferación de LTs CD8⁺. Aun cuando no analizamos en profundidad este tipo celular en el modelo de periodontitis, a partir los resultados obtenidos de nuestro ensayo *in vitro*, podemos especular que su estimulación por parte de las RATEVs contribuiría al control de esta enfermedad. Adicionalmente, las RATEVs podrían actuar sobre otras poblaciones celulares inmunes relevantes en la patogénesis de la periodontitis, tal como los neutrófilos (PMNN) y APCs. Entre estas últimas, destacamos a los linfocitos B (LBs), los cuales, tanto en salud como durante la periodontitis, actúan como APCs y secretan

anticuerpos con el fin de neutralizar a los microorganismos periodontales. Una población particular de LBs denominados Bregs, caracterizados por producir citoquinas antiinflamatorias y/o expresar PD-1, CD39 y CD73, se ha asociado a inmunosupresión (154). En este contexto, las RATEVs podrían promover la generación de linfocitos Bregs CD73⁺, lo cuales contribuirían a la regulación de la inflamación y/o protección tisular mediante los mecanismos ya mencionados.

En conclusión, en este estudio dilucidamos que las RATEVs actúan como reguladoras inmunes suprimiendo a los LTs CD4⁺, efecto directamente asociado con la actividad AMPasa de la ectoenzima CD73, la cual contienen como cargo. En línea con estos hallazgos, detectamos que durante la periodontitis las RATEVs suprimen la respuesta efectora de los LTs CD4⁺ y previenen la resorción ósea alveolar. Ante estos resultados, proponemos que la función AMPasa de las RATEVs mediada por CD73 es el principal mecanismo mediante el cual los RATregs promueven una respuesta antiinflamatoria de manera acelular.

En comparación con la terapia celular convencional, el uso de VEs ofrece ventajas únicas, razón por la cual ha ido ganando cada vez más interés. Las VEs poseen una alta biocompatibilidad, mayor estabilidad independiente al estado inflamatorio en que se encuentre el tejido al que van dirigidas, permiten diferentes rutas de administración e implican un menor riesgo de efectos adversos (155, 156). Este trabajo consta de un primer acercamiento al uso terapéutico de VEs derivadas de Tregs inducidos en el

contexto de la periodontitis. En particular, nuestros resultados contribuyen con los fundamentos teóricos que podrían, en el futuro, permitir el desarrollo una terapia acelular basada en RATEVs dirigida al tratamiento de enfermedades asociadas a la desregulación inmune y/o a los fenómenos osteo-destructivos.

VII. CONCLUSIONES

1. Tras el proceso de inducción, los RATregs presentan un fenotipo propio de Tregs ($CD4^+Foxp3^+CD25^{high}$) y presentaron una alta expresión superficial de CD73.
2. Luego de su activación, los RATregs liberan VEs (RATEVs) de un tamaño alrededor de los 150 nm que expresan la tetraspanina CD81 y la ectoenzima CD73.
3. CD73 expresada por los RATregs y las RATEVs se presenta enzimáticamente activa y es capaz de ejecutar su función AMPasa a través de la cual genera fosfato inorgánico y ADO mediante la hidrólisis de AMP.
4. En el contexto de un cultivo de leucocitos totales, las RATEVs suprimieron la proliferación y activación de los LTs $CD4^+$ y estimularon a los LTs $CD8^+$.
5. La actividad AMPasa mediada por CD73 es necesaria para que las RATEVs ejerzan su efecto supresor sobre LTs $CD4^+$.
6. El tratamiento con RATEVs durante la periodontitis redujo, en los tejidos periodontales afectados, la frecuencia de LTs $CD4^+$ activados ($CD25^+$), productores de IL-17A y RANKL⁺. Adicionalmente, promovieron la expresión de CD73 en LTs $CD4^+$, Tregs ($CD4^+Foxp3^+$) y $CD8^+$ presentes en los linfonodos cervicales.

7. El tratamiento con RATEVs durante la periodontitis disminuyó la expresión de CD86 y CD206 en Macs infiltrantes de los tejidos periodontales, marcadores comúnmente asociados a los perfiles M1 y M2, respectivamente.
8. El tratamiento con RATEVs durante la periodontitis previno la resorción ósea alveolar.

Como conclusión general, podemos afirmar que nuestra hipótesis se confirma parcialmente. Las vesículas extracelulares derivadas de RATregs modularon la respuesta inmuno-inflamatoria de LTs Th17/Tregs y previnieron la resorción ósea alveolar durante la periodontitis mediante la actividad de CD73. No obstante, ante el tratamiento con RATEVs durante la periodontitis, no detectamos el efecto esperado sobre macrófagos. Es decir, las RATEVs no promovieron la polarización de macrófagos hacia un fenotipo del tipo M2.

VIII. FIGURAS SUPLEMENTARIAS

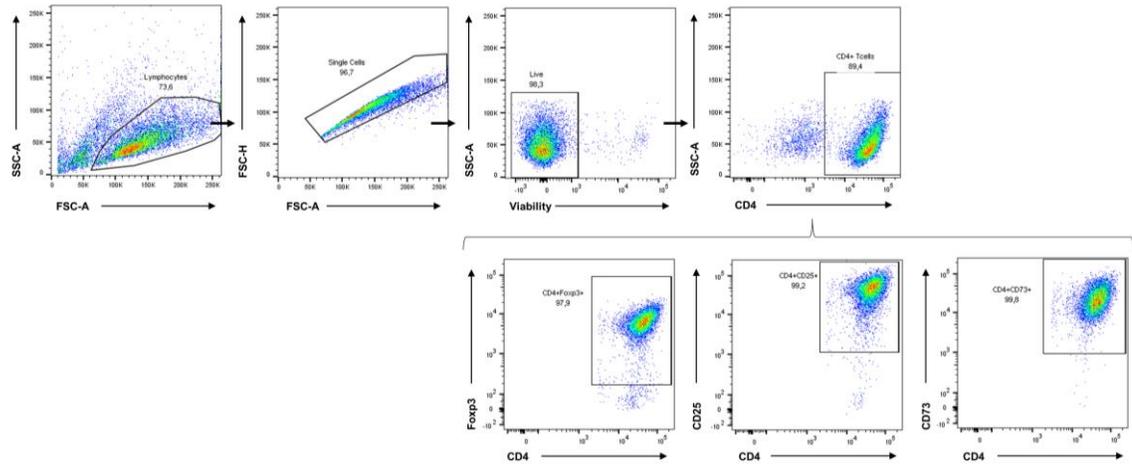


Figura Suplementaria 1: Estrategia de *gating* para la caracterización de linfocitos RATregs.

Figura representativa de la secuencia de *gating* para la caracterización de LTs RATregs luego de su proceso de inducción. Inicialmente se seleccionaron las células según sus características morfológicas determinadas por los ejes SSC-A y FSC-A. Se descartaron los dobletes según la permanencia en el eje central de la diagonal formadas al anteponer FSC-H vs FSC-A y células muertas seleccionando las células negativas para el marcador de viabilidad (98% de las células vivas). A partir de las células vivas se seleccionó la población CD4⁺ (89,4%) y a partir de esta última se evaluaron los niveles de expresión de Foxp3 (GFP-reportero), CD25 (PE) y CD73 (APC).

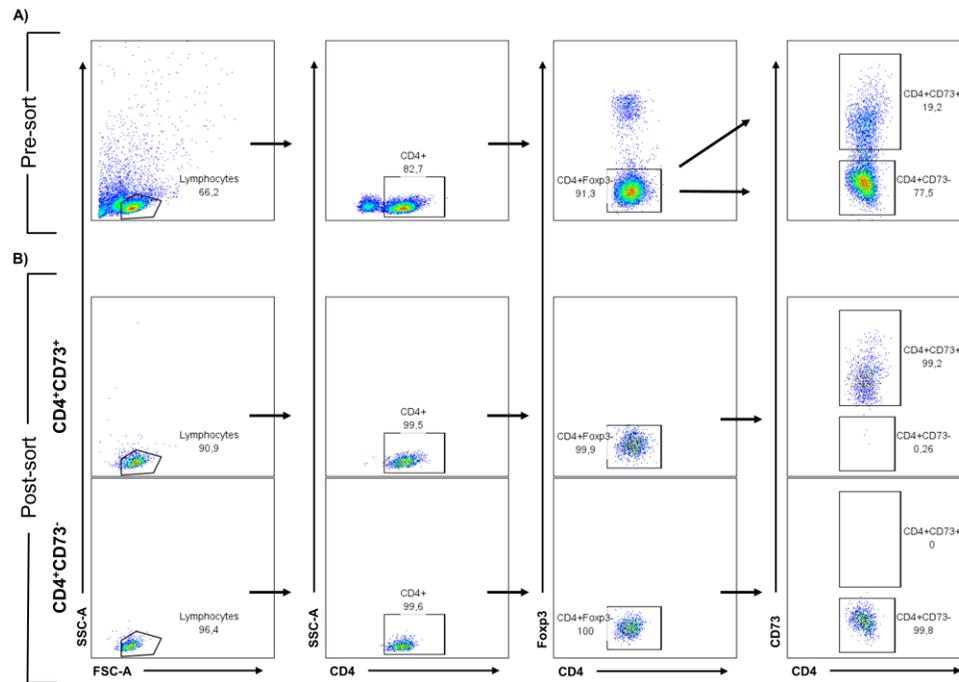


Figura Suplementaria 2: Estrategia de *gating* para *cell sorting* y pureza *post sort* de LTs CD4⁺CD73⁺ y CD4⁺CD73⁻.

A partir de una suspensión celular previamente enriquecida en LTs CD4⁺ mediante selección inmuno-magnética y marcada con los anticuerpos ad-hoc, se realizó la aislación de células respondedoras por *cell sorting* para ser posteriormente utilizadas en el ensayo de supresión con RATEVs en presencia de los inhibidores de CD73. (A) Secuencia de *gating* empleada, el primer *gate* se definió de acuerdo a las características morfométricas de los eventos, determinadas por los ejes SSC-A y FSC-A. En esta selección incluimos células de pequeño tamaño y complejidad, característica distintiva de los LTs. Luego, se seleccionaron las células CD4⁺ y FcγR3⁻ para descartar la presencia de Tregs que pudiesen ejercer un efecto inmunosupresor adicional al ejercido por las RATEVs. Finalmente, basados en la expresión de CD73, seleccionamos las dos de células respondedoras a aislar: CD4⁺CD73⁺ y CD4⁺CD73⁻. (B) Análisis *post sort* de cada una de las poblaciones seleccionadas donde se muestra la pureza de éstas, la cual es sobre el 99% para ambas.

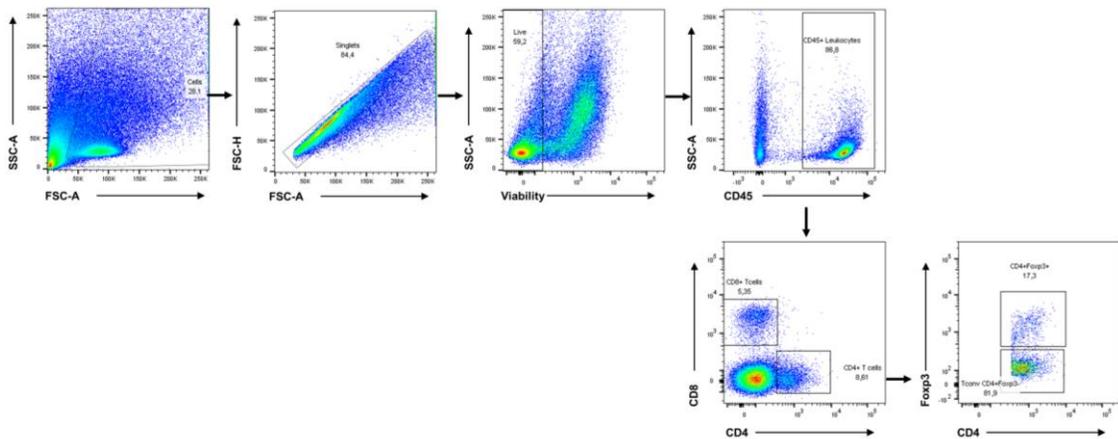


Figura Suplementaria 3: Estrategia de *gating* para linfocitos T aislados de la mucosa gingival.

Figura representativa de la secuencia de *gating* para la caracterización de LTs aislados de la mucosa gingival. Inicialmente se seleccionaron las células según sus características morfológicas determinadas por los ejes SSC-A y FSC-A. Luego, se descartaron los dobletes y se seleccionaron las células vivas mediante la exclusión de células muertas marcadas por el marcador de viabilidad (~60% de las células vivas). A partir de las células vivas se seleccionaron los leucocitos (CD45⁺) y se procedió a identificar las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Finalmente, a partir de la población de LT CD4⁺ y según la expresión de Foxp3, se distinguieron los Tregs (CD4⁺Foxp3⁺) de los LTs convencionales (Tconv, CD4⁺Foxp3⁻), para luego, identificar citoquinas y otras moléculas de interés.

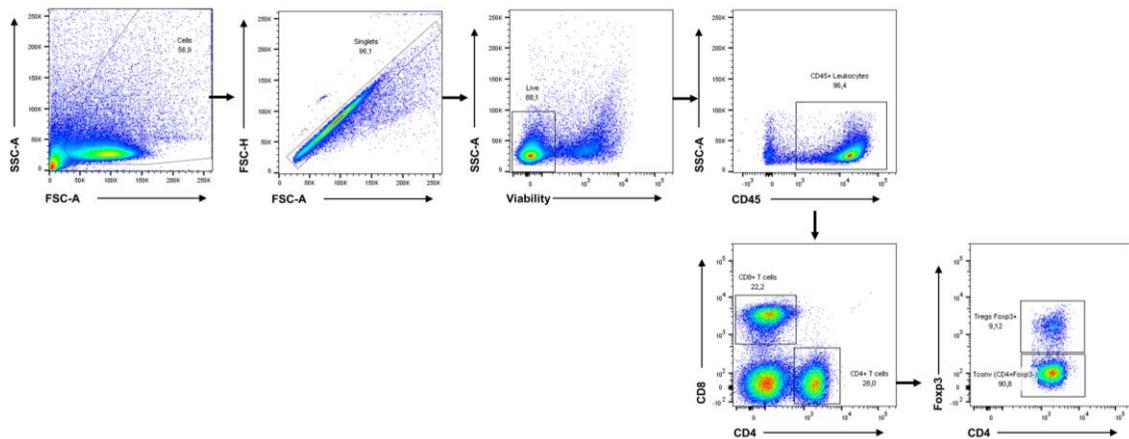


Figura Suplementaria 4: Estrategia de *gating* para LT aislados del linfonodos cervicales.

Figura representativa de la secuencia de *gating* para la caracterización de LTs aislados de los linfonodos cervicales. Inicialmente se seleccionaron las células según sus características morfométricas determinadas por los ejes SSC-A y FSC-A. Luego, se descartaron los dobletes y se seleccionaron las células vivas mediante la exclusión de células muertas marcadas por el marcador de viabilidad (>80% de las células vivas). A partir de las células vivas se seleccionaron los leucocitos (CD45⁺) y se procedió a identificar las poblaciones de LTs CD4⁺ y CD8⁺. Finalmente, dentro de la población de LTs CD4⁺ y según la expresión de Foxp3, se distinguieron los Tregs (CD4⁺Foxp3⁺) de los LTs convencionales (Tconv, CD4⁺Foxp3⁻), para luego, identificar citoquinas y otras moléculas de interés.

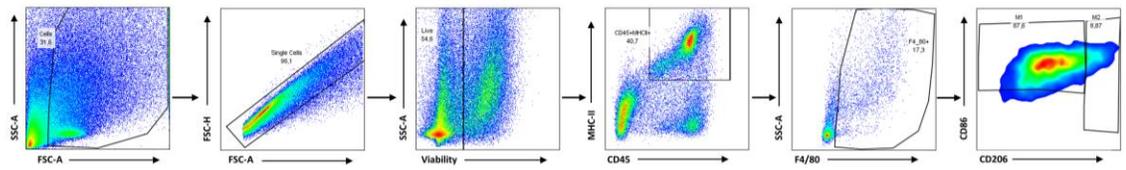


Figura Suplementaria 5: Estrategia de *gating* para macrófagos aislados de la mucosa gingival.

Figura representativa de la secuencia de *gating* utilizada para la caracterización Macs aislados de la mucosa gingival. Inicialmente se seleccionaron las células según sus características morfométricas determinadas por los ejes SSC-A y FSC-A. En este caso, la selección fue poco restrictiva, por lo que incluimos células de mayor tamaño y complejidad, en concordancia con las características morfológicas de los Macs. Luego, se descartaron los dobletes y células muertas mediante la selección de células negativas para el marcador de viabilidad (~ 50% de las células vivas). A partir de las células vivas se seleccionó la población CD45⁺MHC-II⁺ para restringirnos a las APCs y descartar la presencia de neutrófilos. Consecutivamente, seleccionamos las células F4/80⁺, marcador de linaje de Macs. Finalmente, y debido a que más del 90% de las células se eran CD86⁺, se definieron los subtipos de Macs de acuerdo a la expresión de CD206. Las poblaciones M1-*like* y M2-*like* se definieron como CD45⁺MHC-II⁺F4/80⁺CD86⁺CD206^{mid/low} y CD45⁺MHC-II⁺F4/80⁺CD86⁺CD206^{high}, respectivamente.

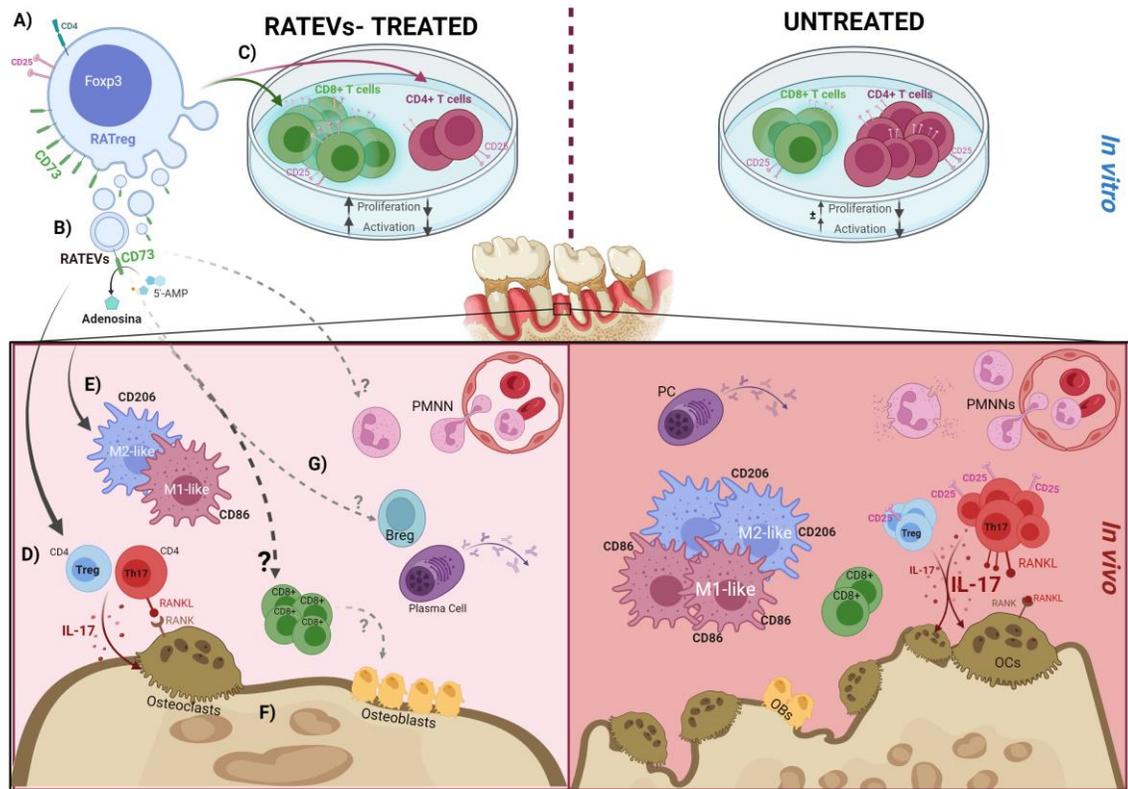


Figura Suplementaria 6: Modelo propuesto sobre el efecto *in vivo* de RATEVs en periodontitis experimental e *in vitro*.

Esquema que representa parte de los hallazgos de este estudio. (A) Los RATregs presentan características fenotípicas propias de Tregs ($CD4^+CD25^{high}CD73^{high}$). (B) Secretadas por los RATregs, se representan las RATEVs cargadas de CD73 enzimáticamente activa, capaz de hidrolizar AMP y generar ADO. (C) En el ensayo de supresión *in vitro* sobre leucocitos totales de bazo, las RATEVs modularon a los LTs $CD4^+$ y $CD8^+$ de manera diferencial. Por un lado, disminuyeron la proliferación y activación a los LTs $CD4^+$ en comparación con la condición no tratada, denotando su capacidad inmunosupresora. En contraste, estimularon la proliferación y activación de los LTs $CD8^+$.

(D) Durante la periodontitis, el tratamiento con RATEVs provocó disminuyó la frecuencia de LT CD4⁺ activados (CD25⁺), la expresión de RANKL e IL-17A. (E) Asimismo, provocaron una disminución en la expresión de CD86 y CD206 en Macs sin alterar la frecuencia de los subtipos M1-*like* y M2-*like*. (F) El tratamiento con RATEVs favoreció una menor pérdida ósea en comparación con su contraparte no tratada. (G) Células inmunes potencialmente moduladas por el tratamiento con RATEVs.

Abreviaciones: RATregs: LTs reguladores inducidos en presencia de ácido retinóico; RATEVs: Vesículas extracelulares derivadas de RATregs; Tregs: Linfocitos T reguladores⁺; PMNN: polimorfonuclear neutrófilo OBs: osteoblastos; OCs: osteoclastos; PC: célula plasmática.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Gonzales JR. T- and B-cell subsets in periodontitis. *Periodontol* 2000. 2015;69(1):181-200.
2. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol*. 2009;21(10):1105-11.
3. Waldmann H, Cobbold S. Regulatory T cells: context matters. *Immunity*. 2009;30(5):613-5.
4. Sakaguchi S. Regulatory T cells: history and perspective. *Methods Mol Biol*. 2011;707:3-17.
5. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003;299(5609):1057-61.
6. Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annual review of immunology*. 2012;30:531-64.
7. Haribhai D, Williams JB, Jia S, Nickerson D, Schmitt EG, Edwards B, et al. A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity. *Immunity*. 2011;35(1):109-22.
8. Haribhai D, Lin W, Edwards B, Ziegelbauer J, Salzman NH, Carlson MR, et al. A central role for induced regulatory T cells in tolerance induction in experimental colitis. *J Immunol*. 2009;182(6):3461-8.

9. Abbas AK, Benoist C, Bluestone JA, Campbell DJ, Ghosh S, Hori S, et al. Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. *Nat Immunol.* 2013;14(4):307-8.
10. Alroqi FJ, Chatila TA. T Regulatory Cell Biology in Health and Disease. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2016;16(4):27.
11. Hoeppli RE, Wu D, Cook L, Levings MK. The environment of regulatory T cell biology: cytokines, metabolites, and the microbiome. *Front Immunol.* 2015;6:61.
12. Kanamori M, Nakatsukasa H, Okada M, Lu Q, Yoshimura A. Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications. *Trends Immunol.* 2016;37(11):803-11.
13. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3⁺ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity.* 2009;30(5):626-35.
14. Mucida D, Pino-Lagos K, Kim G, Nowak E, Benson MJ, Kronenberg M, et al. Retinoic acid can directly promote TGF-beta-mediated Foxp3(+) Treg cell conversion of naive T cells. *Immunity.* 2009;30(4):471-2; author reply 2-3.
15. Sun CM, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M, Mora JR, et al. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med.* 2007;204(8):1775-85.

16. Pino-Lagos K, Guo Y, Noelle RJ. Retinoic acid: a key player in immunity. *Biofactors*. 2010;36(6):430-6.
17. Hori S. Lineage stability and phenotypic plasticity of Foxp3(+) regulatory T cells. *Immunol Rev*. 2014;259(1):159-72.
18. Sakaguchi S, Vignali DA, Rudensky AY, Niec RE, Waldmann H. The plasticity and stability of regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(6):461-7.
19. Schadenberg AW, Vastert SJ, Evens FC, Kuis W, van Vught AJ, Jansen NJ, et al. FOXP3+ CD4+ Tregs lose suppressive potential but remain anergic during transient inflammation in human. *Eur J Immunol*. 2011;41(4):1132-42.
20. Hajishengallis G, Korostoff JM. Revisiting the Page & Schroeder model: the good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later. *Periodontol 2000*. 2017;75(1):116-51.
21. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17038.
22. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science*. 2000;289(5484):1504-8.
23. Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, Makihira S, Seki M, Karimbux NY, et al. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol*. 2006;169(3):987-98.

24. Sun X, Gao J, Meng X, Lu X, Zhang L, Chen R. Polarized Macrophages in Periodontitis: Characteristics, Function, and Molecular Signaling. *Front Immunol.* 2021;12:763334.
25. Nestle FO, Thompson C, Shimizu Y, Turka LA, Nickoloff BJ. Costimulation of superantigen-activated T lymphocytes by autologous dendritic cells is dependent on B7. *Cell Immunol.* 1994;156(1):220-9.
26. Yang J, Zhu Y, Duan D, Wang P, Xin Y, Bai L, et al. Enhanced activity of macrophage M1/M2 phenotypes in periodontitis. *Arch Oral Biol.* 2018;96:234-42.
27. Locati M, Curtale G, Mantovani A. Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity. *Annual review of pathology.* 2020;15:123-47.
28. Sima C, Viniegra A, Glogauer M. Macrophage immunomodulation in chronic osteolytic diseases-the case of periodontitis. *J Leukoc Biol.* 2019;105(3):473-87.
29. Huang Y, Tian C, Li Q, Xu Q. TET1 Knockdown Inhibits Porphyromonas gingivalis LPS/IFN- γ -Induced M1 Macrophage Polarization through the NF- κ B Pathway in THP-1 Cells. *Int J Mol Sci.* 2019;20(8).
30. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004;25(12):677-86.

31. Zhou D, Huang C, Lin Z, Zhan S, Kong L, Fang C, et al. Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways. *Cellular signalling*. 2014;26(2):192-7.
32. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdts S, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*. 2014;41(1):14-20.
33. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(11):762-74.
34. Ginhoux F, Schultze JL, Murray PJ, Ochando J, Biswas SK. New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. *Nat Immunol*. 2016;17(1):34-40.
35. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime reports*. 2014;6:13.
36. Atri C, Guerfali FZ, Laouini D. Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. *Int J Mol Sci*. 2018;19(6).
37. Huynh NC, Everts V, Pavasant P, Ampornaramveth RS. Interleukin-1 β induces human cementoblasts to support osteoclastogenesis. *International journal of oral science*. 2017;9(12):e5.

38. Papadopoulos G, Weinberg EO, Massari P, Gibson FC, 3rd, Wetzler LM, Morgan EF, et al. Macrophage-specific TLR2 signaling mediates pathogen-induced TNF-dependent inflammatory oral bone loss. *J Immunol.* 2013;190(3):1148-57.
39. Ikeda N, Asano K, Kikuchi K, Uchida Y, Ikegami H, Takagi R, et al. Emergence of immunoregulatory Ym1(+)Ly6C(hi) monocytes during recovery phase of tissue injury. *Science immunology.* 2018;3(28).
40. Stables MJ, Shah S, Camon EB, Lovering RC, Newson J, Bystrom J, et al. Transcriptomic analyses of murine resolution-phase macrophages. *Blood.* 2011;118(26):e192-208.
41. Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(6):427-39.
42. Yu T, Zhao L, Huang X, Ma C, Wang Y, Zhang J, et al. Enhanced Activity of the Macrophage M1/M2 Phenotypes and Phenotypic Switch to M1 in Periodontal Infection. *J Periodontol.* 2016;87(9):1092-102.
43. Dutzan N, Konkel JE, Greenwell-Wild T, Moutsopoulos NM. Characterization of the human immune cell network at the gingival barrier. *Mucosal immunology.* 2016;9(5):1163-72.

44. Dutzan N, Kajikawa T, Abusleme L, Greenwell-Wild T, Zuazo CE, Ikeuchi T, et al. A dysbiotic microbiome triggers T(H)17 cells to mediate oral mucosal immunopathology in mice and humans. *Science translational medicine*. 2018;10(463).
45. Zenobia C, Hajishengallis G. Basic biology and role of interleukin-17 in immunity and inflammation. *Periodontol 2000*. 2015;69(1):142-59.
46. Peters A, Pitcher LA, Sullivan JM, Mitsdoerffer M, Acton SE, Franz B, et al. Th17 cells induce ectopic lymphoid follicles in central nervous system tissue inflammation. *Immunity*. 2011;35(6):986-96.
47. Liao C, Zhang C, Yang Y. Pivotal Roles of Interleukin-17 as the Epicenter of Bone Loss Diseases. *Curr Pharm Des*. 2017;23(41):6302-9.
48. Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11(10):763-76.
49. Parachuru VPB, Coates DE, Milne TJ, Rich AM, Seymour GJ. FoxP3(+) regulatory T cells, interleukin 17 and mast cells in chronic inflammatory periodontal disease. *J Periodontal Res*. 2018;53(4):622-35.
50. Bittner-Eddy PD, Fischer LA, Costalonga M. Transient Expression of IL-17A in Foxp3 Fate-Tracked Cells in Porphyromonas gingivalis-Mediated Oral Dysbiosis. *Front Immunol*. 2020;11:677.

51. Okui T, Aoki Y, Ito H, Honda T, Yamazaki K. The presence of IL-17+/FOXP3+ double-positive cells in periodontitis. *J Dent Res.* 2012;91(6):574-9.
52. Alvarez C, Rojas C, Rojas L, Cafferata EA, Monasterio G, Vernal R. Regulatory T Lymphocytes in Periodontitis: A Translational View. *Mediators Inflamm.* 2018;2018:7806912.
53. Ebersole JL, Kirakodu S, Novak MJ, Stromberg AJ, Shen S, Orraca L, et al. Cytokine gene expression profiles during initiation, progression and resolution of periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2014;41(9):853-61.
54. Garlet GP, Sfeir CS, Little SR. Restoring host-microbe homeostasis via selective chemoattraction of Tregs. *J Dent Res.* 2014;93(9):834-9.
55. Dutzan N, Gamonal J, Silva A, Sanz M, Vernal R. 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.* 2009;36(5):396-403.
56. Parachuru VP, Coates DE, Milne TJ, Hussaini HM, Rich AM, Seymour GJ. Forkhead box P3-positive regulatory T-cells and interleukin 17-positive T-helper 17 cells in chronic inflammatory periodontal disease. *J Periodontal Res.* 2014;49(6):817-26.
57. Gao L, Zhao Y, Wang P, Zhang L, Zhang C, Chen Q, et al. Detection of Th17/Treg cells and related factors in gingival tissues and peripheral blood of rats with

experimental periodontitis. Iranian journal of basic medical sciences. 2017;20(3):294-300.

58. Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, Kang HS, Chung Y, Pappu BP, et al. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity*. 2008;29(1):44-56.

59. Chatila TA, Williams CB. Regulatory T cells: exosomes deliver tolerance. *Immunity*. 2014;41(1):3-5.

60. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(4):213-28.

61. Anderson HC, Mulhall D, Garimella R. Role of extracellular membrane vesicles in the pathogenesis of various diseases, including cancer, renal diseases, atherosclerosis, and arthritis. *Lab Invest*. 2010;90(11):1549-57.

62. Greening DW, Gopal SK, Xu R, Simpson RJ, Chen W. Exosomes and their roles in immune regulation and cancer. *Semin Cell Dev Biol*. 2015;40:72-81.

63. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of cell biology*. 2013;200(4):373-83.

64. Tricarico C, Clancy J, D'Souza-Schorey C. Biology and biogenesis of shed microvesicles. *Small GTPases*. 2017;8(4):220-32.

65. Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G, Thery C. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat Cell Biol.* 2019;21(1):9-17.
66. Harding C, Heuser J, Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *The Journal of cell biology.* 1983;97(2):329-39.
67. Pan BT, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone RM. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *The Journal of cell biology.* 1985;101(3):942-8.
68. Colombo M, Raposo G, Thery C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014;30:255-89.
69. Hurley JH. ESCRTs are everywhere. *Embo j.* 2015;34(19):2398-407.
70. Palmulli R, van Niel G. To be or not to be... secreted as exosomes, a balance finely tuned by the mechanisms of biogenesis. *Essays Biochem.* 2018;62(2):177-91.
71. Thery C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles.* 2018;7(1):1535750.

72. Rojas C, Campos-Mora M, Cárcamo I, Villalón N, Elhusseiny A, Contreras-Kallens P, et al. T regulatory cells-derived extracellular vesicles and their contribution to the generation of immune tolerance. *J Leukoc Biol.* 2020.
73. Smyth LA, Ratnasothy K, Tsang JY, Boardman D, Warley A, Lechler R, et al. CD73 expression on extracellular vesicles derived from CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T cells contributes to their regulatory function. *Eur J Immunol.* 2013;43(9):2430-40.
74. Yu X, Huang C, Song B, Xiao Y, Fang M, Feng J, et al. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells-derived exosomes prolonged kidney allograft survival in a rat model. *Cell Immunol.* 2013;285(1-2):62-8.
75. Okoye IS, Coomes SM, Pelly VS, Czieso S, Papayannopoulos V, Tolmachova T, et al. MicroRNA-Containing T-Regulatory-Cell-Derived Exosomes Suppress Pathogenic T Helper 1 Cells. *Immunity.* 2014;41(3):503.
76. Kendal AR, Waldmann H. Infectious tolerance: therapeutic potential. *Current opinion in immunology.* 2010;22(5):560-5.
77. Tung SL, Boardman DA, Sen M, Letizia M, Peng Q, Cianci N, et al. Regulatory T cell-derived extracellular vesicles modify dendritic cell function. *Sci Rep.* 2018;8(1):6065.
78. Chen J, Huang F, Hou Y, Lin X, Liang R, Hu X, et al. TGF- β -induced CD4⁺ FoxP3⁺ regulatory T cell-derived extracellular vesicles modulate Notch1 signaling

through miR-449a and prevent collagen-induced arthritis in a murine model. *Cellular & molecular immunology*. 2021;18(11):2516-29.

79. Aiello S, Rocchetta F, Longaretti L, Faravelli S, Todeschini M, Cassis L, et al. Extracellular vesicles derived from T regulatory cells suppress T cell proliferation and prolong allograft survival. *Sci Rep*. 2017;7(1):11518.

80. Sullivan JA, Tomita Y, Jankowska-Gan E, Lema DA, Arvedson MP, Nair A, et al. Treg-Cell-Derived IL-35-Coated Extracellular Vesicles Promote Infectious Tolerance. *Cell Rep*. 2020;30(4):1039-51.e5.

81. Resta R, Yamashita Y, Thompson LF. Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunol Rev*. 1998;161:95-109.

82. Atarashi K, Nishimura J, Shima T, Umesaki Y, Yamamoto M, Onoue M, et al. ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. *Nature*. 2008;455(7214):808-12.

83. Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T, Thompson LF. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal*. 2006;2(2):351-60.

84. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*. 2007;204(6):1257-65.

85. Naganuma M, Wiznerowicz EB, Lappas CM, Linden J, Worthington MT, Ernst PB. Cutting edge: Critical role for A2A adenosine receptors in the T cell-mediated regulation of colitis. *J Immunol.* 2006;177(5):2765-9.
86. Németh ZH, Bleich D, Csóka B, Pacher P, Mabley JG, Himer L, et al. Adenosine receptor activation ameliorates type 1 diabetes. *Faseb j.* 2007;21(10):2379-88.
87. Fan M, Jamal Mustafa S. Role of adenosine in airway inflammation in an allergic mouse model of asthma. *International immunopharmacology.* 2006;6(1):36-45.
88. Csóka B, Németh ZH, Rosenberger P, Eltzschig HK, Spolarics Z, Pacher P, et al. A2B adenosine receptors protect against sepsis-induced mortality by dampening excessive inflammation. *J Immunol.* 2010;185(1):542-50.
89. Jacobson KA, Gao ZG. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(3):247-64.
90. Antonioli L, Blandizzi C, Pacher P, Haskó G. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nature reviews Cancer.* 2013;13(12):842-57.
91. Chen JF, Eltzschig HK, Fredholm BB. Adenosine receptors as drug targets--what are the challenges? *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12(4):265-86.
92. Fredholm BB. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell death and differentiation.* 2007;14(7):1315-23.

93. Csoka B, Nemeth ZH, Selmeczy Z, Koscsó B, Pacher P, Vizi ES, et al. Role of A(2A) adenosine receptors in regulation of opsonized E. coli-induced macrophage function. *Purinergic Signal*. 2007;3(4):447-52.
94. Hasko G, Kuhel DG, Chen JF, Schwarzschild MA, Deitch EA, Mabley JG, et al. Adenosine inhibits IL-12 and TNF-[alpha] production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms. *Faseb j*. 2000;14(13):2065-74.
95. Kreckler LM, Wan TC, Ge ZD, Auchampach JA. Adenosine inhibits tumor necrosis factor-alpha release from mouse peritoneal macrophages via A2A and A2B but not the A3 adenosine receptor. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;317(1):172-80.
96. Nemeth ZH, Lutz CS, Csoka B, Deitch EA, Leibovich SJ, Gause WC, et al. Adenosine augments IL-10 production by macrophages through an A2B receptor-mediated posttranscriptional mechanism. *J Immunol*. 2005;175(12):8260-70.
97. Haskó G, Linden J, Cronstein B, Pacher P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7(9):759-70.
98. Csóka B, Németh ZH, Selmeczy Z, Koscsó B, Pacher P, Vizi ES, et al. Role of A(2A) adenosine receptors in regulation of opsonized E. coli-induced macrophage function. *Purinergic Signal*. 2007;3(4):447-52.

99. Németh ZH, Lutz CS, Csóka B, Deitch EA, Leibovich SJ, Gause WC, et al. Adenosine augments IL-10 production by macrophages through an A2B receptor-mediated posttranscriptional mechanism. *J Immunol.* 2005;175(12):8260-70.
100. Koshiba M, Rosin DL, Hayashi N, Linden J, Sitkovsky MV. Patterns of A2A extracellular adenosine receptor expression in different functional subsets of human peripheral T cells. Flow cytometry studies with anti-A2A receptor monoclonal antibodies. *Molecular pharmacology.* 1999;55(3):614-24.
101. Allard B, Turcotte M, Stagg J. CD73-generated adenosine: orchestrating the tumor-stroma interplay to promote cancer growth. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:485156.
102. Ohta A, Ohta A, Madasu M, Kini R, Subramanian M, Goel N, et al. A2A adenosine receptor may allow expansion of T cells lacking effector functions in extracellular adenosine-rich microenvironments. *J Immunol.* 2009;183(9):5487-93.
103. They C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(8):569-79.
104. Comfort N, Cai K, Bloomquist TR, Strait MD, Ferrante AW, Jr., Baccarelli AA. Nanoparticle Tracking Analysis for the Quantification and Size Determination of Extracellular Vesicles. *J Vis Exp.* 2021(169).

105. Gomez-Molina C, Sandoval M, Henzi R, Ramirez JP, Varas-Godoy M, Luarte A, et al. Small Extracellular Vesicles in Rat Serum Contain Astrocyte-Derived Protein Biomarkers of Repetitive Stress. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2019;22(3):232-46.
106. Tertel T, Bremer M, Maire C, Lamszus K, Peine S, Jawad R, et al. High-Resolution Imaging Flow Cytometry Reveals Impact of Incubation Temperature on Labeling of Extracellular Vesicles with Antibodies. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2020;97(6):602-9.
107. Tertel T, Görgens A, Giebel B. Analysis of individual extracellular vesicles by imaging flow cytometry. *Methods in enzymology*. 2020;645:55-78.
108. Figueroa-Valdés AI, de la Fuente C, Hidalgo Y, Vega-Letter AM, Tapia-Limonchi R, Khoury M, et al. A Chemically Defined, Xeno- and Blood-Free Culture Medium Sustains Increased Production of Small Extracellular Vesicles From Mesenchymal Stem Cells. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2021;9:619930.
109. Bismuth G, Theodorou I, Gouy H, Le Gouvello S, Bernard A, Debré P. Cyclic AMP-mediated alteration of the CD2 activation process in human T lymphocytes. Preferential inhibition of the phosphoinositide cycle-related transduction pathway. *Eur J Immunol*. 1988;18(9):1351-7.
110. Abe T, Hajishengallis G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *J Immunol Methods*. 2013;394(1-2):49-54.

111. Mizraji G, Segev H, Wilensky A, Hovav AH. Isolation, processing and analysis of murine gingival cells. *J Vis Exp*. 2013(77):e50388.
112. Monasterio G, Budini V, Fernandez B, Castillo F, Rojas C, Alvarez C, et al. IL-22-expressing CD4(+) AhR(+) T lymphocytes are associated with RANKL-mediated alveolar bone resorption during experimental periodontitis. *J Periodontal Res*. 2019;54(5):513-24.
113. Cafferata EA, Terraza-Aguirre C, Barrera R, Faúndez N, González N, Rojas C, et al. Interleukin-35 inhibits alveolar bone resorption by modulating the Th17/Treg imbalance during periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2020;47(6):676-88.
114. Chen C, Skog J, Hsu CH, Lessard RT, Balaj L, Wurdinger T, et al. Microfluidic isolation and transcriptome analysis of serum microvesicles. *Lab on a chip*. 2010;10(4):505-11.
115. Regateiro FS, Howie D, Nolan KF, Agorogiannis EI, Greaves DR, Cobbold SP, et al. Generation of anti-inflammatory adenosine by leukocytes is regulated by TGF-beta. *Eur J Immunol*. 2011;41(10):2955-65.
116. Schneider E, Winzer R, Rissiek A, Ricklefs I, Meyer-Schwesinger C, Ricklefs FL, et al. CD73-mediated adenosine production by CD8 T cell-derived extracellular vesicles constitutes an intrinsic mechanism of immune suppression. *Nat Commun*. 2021;12(1):5911.

117. Wang M, Jia J, Cui Y, Peng Y, Jiang Y. CD73-positive extracellular vesicles promote glioblastoma immunosuppression by inhibiting T-cell clonal expansion. *Cell death & disease*. 2021;12(11):1065.
118. Lu T, Zhang Z, Zhang J, Pan X, Zhu X, Wang X, et al. CD73 in small extracellular vesicles derived from HNSCC defines tumour-associated immunosuppression mediated by macrophages in the microenvironment. *J Extracell Vesicles*. 2022;11(5):e12218.
119. Agarwal A, Fanelli G, Letizia M, Tung SL, Boardman D, Lechler R, et al. Regulatory T cell-derived exosomes: possible therapeutic and diagnostic tools in transplantation. *Front Immunol*. 2014;5:555.
120. Hosono M, de Boer OJ, van der Wal AC, van der Loos CM, Teeling P, Piek JJ, et al. Increased expression of T cell activation markers (CD25, CD26, CD40L and CD69) in atherectomy specimens of patients with unstable angina and acute myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2003;168(1):73-80.
121. Tsukasaki M, Komatsu N, Nagashima K, Nitta T, Pluemsakunthai W, Shukunami C, et al. Host defense against oral microbiota by bone-damaging T cells. *Nat Commun*. 2018;9(1):701.
122. Becher B, Schlitzer A, Chen J, Mair F, Sumatoh HR, Teng KW, et al. High-dimensional analysis of the murine myeloid cell system. *Nat Immunol*. 2014;15(12):1181-9.

123. Asemani Y, Najafi S, Ezzatifar F, Zolbanin NM, Jafari R. Recent highlights in the immunomodulatory aspects of Treg cell-derived extracellular vesicles: special emphasis on autoimmune diseases and transplantation. *Cell & bioscience*. 2022;12(1):67.
124. Lüthje J. Origin, metabolism and function of extracellular adenine nucleotides in the blood. *Klinische Wochenschrift*. 1989;67(6):317-27.
125. Trautmann A. Extracellular ATP in the immune system: more than just a "danger signal". *Science signaling*. 2009;2(56):pe6.
126. Romio M, Reinbeck B, Bongardt S, Hüls S, Burghoff S, Schrader J. Extracellular purine metabolism and signaling of CD73-derived adenosine in murine Treg and Teff cells. *American journal of physiology Cell physiology*. 2011;301(2):C530-9.
127. Binderman I, Bahar H, Jacob-Hirsch J, Zeligson S, Amariglio N, Rechavi G, et al. P2X4 is up-regulated in gingival fibroblasts after periodontal surgery. *J Dent Res*. 2007;86(2):181-5.
128. Binderman I, Gadban N, Yaffe A. Extracellular ATP is a key modulator of alveolar bone loss in periodontitis. *Arch Oral Biol*. 2017;81:131-5.
129. Hensel JA, Khattar V, Ashton R, Ponnazhagan S. Characterization of immune cell subtypes in three commonly used mouse strains reveals gender and strain-specific variations. *Lab Invest*. 2019;99(1):93-106.

130. Monasterio G, Castillo F, Astorga J, Hoare A, Terraza-Aguirre C, Cafferata EA, et al. O-Polysaccharide Plays a Major Role on the Virulence and Immunostimulatory Potential of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* During Periodontal Infection. *Front Immunol.* 2020;11:591240.
131. Campos-Mora M, De Solminihaç J, Rojas C, Padilla C, Kurte M, Pacheco R, et al. Neuropilin-1 is present on Foxp3+ T regulatory cell-derived small extracellular vesicles and mediates immunity against skin transplantation. *J Extracell Vesicles.* 2022;11(6):e12237.
132. Ploeg EM, Ke X, Britsch I, Hendriks M, Van der Zant FA, Kruijff S, et al. Bispecific antibody CD73xEpCAM selectively inhibits the adenosine-mediated immunosuppressive activity of carcinoma-derived extracellular vesicles. *Cancer letters.* 2021;521:109-18.
133. Scholl JN, de Fraga Dias A, Pizzato PR, Lopes DV, Moritz CEJ, Jandrey EHF, et al. Characterization and antiproliferative activity of glioma-derived extracellular vesicles. *Nanomedicine (London, England).* 2020;15(10):1001-18.
134. Kellner M, von Neubeck B, Czogalla B, Feederle R, Vick B, Jeremias I, et al. A Novel Anti-CD73 Antibody That Selectively Inhibits Membrane CD73 Shows Antitumor Activity and Induces Tumor Immune Escape. *Biomedicines.* 2022;10(4).

135. Monguió-Tortajada M, Prat-Vidal C, Martínez-Falguera D, Teis A, Soler-Botija C, Courageux Y, et al. Acellular cardiac scaffolds enriched with MSC-derived extracellular vesicles limit ventricular remodelling and exert local and systemic immunomodulation in a myocardial infarction porcine model. *Theranostics*. 2022;12(10):4656-70.
136. Watanabe Y, Fukuda T, Hayashi C, Nakao Y, Toyoda M, Kawakami K, et al. Extracellular vesicles derived from GMSCs stimulated with TNF- α and IFN- α promote M2 macrophage polarization via enhanced CD73 and CD5L expression. *Sci Rep*. 2022;12(1):13344.
137. Grignano MA, Bruno S, Viglio S, Avanzini MA, Tapparo M, Ramus M, et al. CD73-Adenosinergic Axis Mediates the Protective Effect of Extracellular Vesicles Derived from Mesenchymal Stromal Cells on Ischemic Renal Damage in a Rat Model of Donation after Circulatory Death. *Int J Mol Sci*. 2022;23(18).
138. Nakao Y, Fukuda T, Zhang Q, Sanui T, Shinjo T, Kou X, et al. Exosomes from TNF- α -treated human gingiva-derived MSCs enhance M2 macrophage polarization and inhibit periodontal bone loss. *Acta biomaterialia*. 2021;122:306-24.
139. Zhang F, Li R, Yang Y, Shi C, Shen Y, Lu C, et al. Specific Decrease in B-Cell-Derived Extracellular Vesicles Enhances Post-Chemotherapeutic CD8(+) T Cell Responses. *Immunity*. 2019;50(3):738-50.e7.

140. Torri A, Carpi D, Bulgheroni E, Crosti MC, Moro M, Gruarin P, et al. Extracellular MicroRNA Signature of Human Helper T Cell Subsets in Health and Autoimmunity. *The Journal of biological chemistry*. 2017;292(7):2903-15.
141. Sharma A, Rudra D. Emerging Functions of Regulatory T Cells in Tissue Homeostasis. *Front Immunol*. 2018;9:883.
142. Tung SL, Fanelli G, Matthews RI, Bazoer J, Letizia M, Vizcay-Barrena G, et al. Regulatory T Cell Extracellular Vesicles Modify T-Effector Cell Cytokine Production and Protect Against Human Skin Allograft Damage. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2020;8:317.
143. Azimi M, Ghabaee M, Moghadasi AN, Noorbakhsh F, Izad M. Immunomodulatory function of Treg-derived exosomes is impaired in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Immunol Res*. 2018;66(4):513-20.
144. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet (London, England)*. 2017;390(10100):1211-59.
145. Nazir M, Al-Ansari A, Al-Khalifa K, Alhareky M, Gaffar B, Almas K. Global Prevalence of Periodontal Disease and Lack of Its Surveillance. *TheScientificWorldJournal*. 2020;2020:2146160.

146. Tonetti MS, Jepsen S, Jin L, Otomo-Corgel J. Impact of the global burden of periodontal diseases on health, nutrition and wellbeing of mankind: A call for global action. *J Clin Periodontol*. 2017;44(5):456-62.
147. Haskó G, Pacher P. Regulation of macrophage function by adenosine. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2012;32(4):865-9.
148. Algate K, Haynes DR, Bartold PM, Crotti TN, Cantley MD. The effects of tumour necrosis factor- α on bone cells involved in periodontal alveolar bone loss; osteoclasts, osteoblasts and osteocytes. *J Periodontal Res*. 2016;51(5):549-66.
149. Mediero A, Kara FM, Wilder T, Cronstein BN. Adenosine A(2A) receptor ligation inhibits osteoclast formation. *Am J Pathol*. 2012;180(2):775-86.
150. Mediero A, Wilder T, Perez-Aso M, Cronstein BN. Direct or indirect stimulation of adenosine A2A receptors enhances bone regeneration as well as bone morphogenetic protein-2. *Faseb j*. 2015;29(4):1577-90.
151. Costa MA, Barbosa A, Neto E, Sá-e-Sousa A, Freitas R, Neves JM, et al. On the role of subtype selective adenosine receptor agonists during proliferation and osteogenic differentiation of human primary bone marrow stromal cells. *Journal of cellular physiology*. 2011;226(5):1353-66.

152. He W, Mazumder A, Wilder T, Cronstein BN. Adenosine regulates bone metabolism via A1, A2A, and A2B receptors in bone marrow cells from normal humans and patients with multiple myeloma. *Faseb j.* 2013;27(9):3446-54.
153. Silva AM, Almeida MI, Teixeira JH, Maia AF, Calin GA, Barbosa MA, et al. Dendritic Cell-derived Extracellular Vesicles mediate Mesenchymal Stem/Stromal Cell recruitment. *Sci Rep.* 2017;7(1):1667.
154. Jansen K, Cevhertas L, Ma S, Satitsuksanoa P, Akdis M, van de Veen W. Regulatory B cells, A to Z. *Allergy.* 2021;76(9):2699-715.
155. Coumans FAW, Brisson AR, Buzas EI, Dignat-George F, Drees EEE, El-Andaloussi S, et al. Methodological Guidelines to Study Extracellular Vesicles. *Circulation research.* 2017;120(10):1632-48.
156. Rani S, Ryan AE, Griffin MD, Ritter T. Mesenchymal Stem Cell-derived Extracellular Vesicles: Toward Cell-free Therapeutic Applications. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy.* 2015;23(5):812-23.

X. ANEXOS

X.2. ANEXO 1: Carta de Aprobación Comité de Bioética Animal



Santiago, a 25 de junio de 2018

Certificado n°: 18173-ODO-UCH

CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica que el Proyecto de Investigación titulado: **“Rol de la citoquina IL-35, el ácido retinoico y los exosomas derivados de linfocitos T reguladores en la resorción del hueso de soporte dentario durante la periodontitis experimental, mediante la modulación del balance Th17/Treg.”**, del Investigador Responsable **Dr. Rolando Vernal Astudillo**, del Laboratorio de Biología Periodontal, Departamento de Odontología Conservadora, Facultad de Odontología, Universidad de Chile, no se plantean acciones en sus procedimientos que contravengan las normas de Bioética de manejo y cuidado de animales, así mismo la metodología experimental planteada satisface lo estipulado en el Programa Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.

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

Se otorga la presente certificación para el uso de **430** ratones *Mus musculus* cepa Balb/c, C57BL/6 y B6.129S7-Rag1^{tm1 Mom1}, provenientes de la Plataforma Experimental Bioterio, Facultad de Odontología, Universidad de Chile: Balb/c, C57BL/6; y The Jackson Laboratory los animales de cepa B6.129S7-Rag1^{tm1 Mom1}, desde julio de 2018 hasta julio de 2022, tiempo estimado de ejecución del estudio, el cual será financiado por **Proyecto Fondecyt Regular Nro. 1181780**.

El CICUA de la Universidad de Chile, forma parte de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, y está constituido por 53 miembros: 5 médicos veterinarios, 39 académicos (12 de ellos médicos veterinarios), y 9 miembros no asociados a la academia o investigación, y que cuentan con experiencia en bioética relacionada a mantención y uso de animales. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del “Protocolo de Manejo y Cuidado de Animales” después de un estudio acucioso y de la acogida de los investigadores de las observaciones exigidas por el Comité.

Dr. Cristián Ugaz Ruiz
Director Ejecutivo
CICUA - VID
Universidad de Chile



MV Pía Ocampos Toro
Presidente Subrogante
CICUA - VID
Universidad de Chile

Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA)
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo (VID) – Universidad de Chile
www.uchile/cicua.cl email: coordinador.cicua@uchile.cl

X.3. ANEXO 2: Paneles de Anticuerpos para caracterización fenotípica de Macs y LTs en el modelo de periodontitis experimental

PANEL MACRÓFAGOS				
Anticuerpo	Clon	Marca comercial	Código	Fluorocromo
CD86	GL-1	Biolegend	105005	FITC
MHC II	M5/114-15.2	Biolegend	107607	PE
CD73	eBioTY/11.8 (TY/11.8)	Invitrogen	46-0731-82	PerCP eFluor 710
CD206	C068C2	Biolegend	141719	PE Cy7
F4/80	BM8	Biolegend	123115	APC
Viability	-	Biolegend	423105	APC Cy7
CD19	6D5	Biolegend	115545	BV510
CD45	30-F11	BD Biosciences	748371	BUV737

PANEL LINFOCITOS				
Anticuerpo	Clon	Marca comercial	Código	Fluorocromo
Foxp3	150D	Biolegend	320012	Alexa Fluor 488
RANKL	IK22/5	Biolegend	510006	PE
ROR γ t	Q31-378	BD Biosciences	562684	PECF594
CD73	eBioTY/11.8 (TY/11.8)	Invitrogen	46-0731-82	PerCP eFluor 710
IL-17	TC11-18H10.1	Biolegend	506922	PE Cy7
IFN- γ	XMG1.2	Biolegend	505810	APC
IL-10	JES5-16E3	Biolegend	505036	APC Cy7
CD25	PC61	Biolegend	102034	BV421
CD4	GK1.5	Biolegend	100451	BV605
CD45	30-F11	Biolegend	103147	BV711
CD8 α	53-6.7	BD Biosciences	563786	BUV396
Viability	-	Biolegend	423108	BUV496