



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

**Rol del balance IL-6/IL-35 y los linfocitos iTr35 durante la periodontitis**

**Nicolás González González**

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

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Dr. Rolando Vernal Astudillo**

**TUTOR EXPERTO**

**Dr. Emilio A. Cafferata Chea**

**Adscrito a Proyecto FONDECYT Regular 1181780**

**Santiago – Chile**

**2020**





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

**Rol del balance IL-6/IL-35 y los linfocitos iTr35 durante la periodontitis**

**Nicolás González González**

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

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Dr. Rolando Vernal Astudillo**

**TUTOR EXPERTO**

**Dr. Emilio A. Cafferata Chea**

**Adscrito a Proyecto FONDECYT Regular 1181780**

**Santiago – Chile**

**2020**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer primero que todo a mi mamá Gladys y a mi tía Carmen por ser las principales artífices de que yo pudiera llegar a ser un profesional, con su amor y apoyo incondicional.

Agradezco a mi familia, mi prima, mis tías, mis tíos y mi abuela que me han entregado cariño toda mi vida, y me han ayudado en los momentos difíciles.

A mi polola Diane, que fue mi soporte principal en la universidad, sin su ayuda y amor no podría haber llegado hasta esta instancia.

A mi mejor amigo y compañero del día a día, mi perro Cacique, que llena mis días de alegría y amor.

A mis amigos de la vida Diego y Pablo, a mis amigos de universidad Carolina, Andrea, Grace, Javiera, Edgardo, Manuel, Camila, Rocío, Nicolás Faúndez y muchos más, que siempre tuvieron una palabra de aliento cuando los momentos se volvían difíciles y me instaban a seguir adelante.

A los profesores que fueron parte de mi formación, a los trabajadores de la facultad y a mis tutores de tesis por permitirme ser parte de su proyecto y finalizar mi carrera.

Y finalmente, a todos los estudiantes que lucharon el 2011 por lograr una educación gratuita y de calidad, y que me permitió a mí y a muchos otros estudiar sin la necesidad de endeudarse.

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>3</b>
2.1 Introducción .....	3
2.2 Periodontitis, respuesta inmune y resorción ósea alveolar .....	4
2.3 Rol de IL-6 y linfocitos Th17 en la periodontitis .....	5
2.4 IL-35 y linfocitos iTr35.....	5
2.5 Receptores y señalización de IL-35 e IL-6.....	6
2.6 Planteamiento del problema científico .....	7
<b>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>9</b>
3.1 Hipótesis.....	9
3.2 Objetivo general.....	9
3.3 Objetivos específicos.....	9
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>10</b>
4.1 Tipo de estudio .....	10
4.2 Animales.....	10
4.3 Periodontitis experimental.....	10
4.4 Inoculación con IL-35.....	11
4.5 Cuantificación de la resorción ósea alveolar.....	11
4.6 Expresión de RANKL, OPG, de las citoquinas IL-6 e IL-35, y de los receptores IL-6R, gp130, WSX-1 e IL-12R $\beta$ 2 en las lesiones periodontales .....	11
4.7 Detección de linfocitos Th17 e iTr35.....	13
4.8 Análisis estadísticos.....	14
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>15</b>
5.1 Resorción ósea alveolar .....	15
5.2 Niveles de expresión de mRNA de RANKL, OPG, las citoquinas IL-6 e IL-35, y de los receptores IL-6R, gp130, WSX-1 e IL-12R $\beta$ 2 en las lesiones periodontales. ....	16
5.3. Detección de linfocitos Th17 e iTr35.....	19
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	<b>21</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	<b>25</b>
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>26</b>
<b>9. ANEXOS</b> .....	<b>33</b>

## 1. RESUMEN

**Introducción:** La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica causada por la sinergia polimicrobiana y la disbiosis de la microbiota subgingival. Esta se caracteriza por la destrucción progresiva de los tejidos periodontales, que lleva eventualmente a la pérdida de los dientes. La patogenia de esta enfermedad se encuentra asociada fundamentalmente a la expresión de factores proinflamatorios y osteodestructivos durante la respuesta inmune periodontal. Por un lado, se encuentra aumentada la actividad proinflamatoria y osteodestructiva de los linfocitos T colaboradores, principalmente los linfocitos T colaboradores tipo 17 (Th17); y por otro lado, se encuentra disminuida la actividad inmunoreguladora y osteoprotectora de los linfocitos T reguladores (Treg). Este desbalance Th17/Treg favorece la resorción ósea patológica, debido al incremento de la razón RANKL/OPG y la consecuente activación de los osteoclastos. En este contexto, la interleuquina (IL)-35, citoquina producida por los linfocitos Treg, y que interactúa con receptores comunes con IL-6, es capaz de cumplir una serie de funciones inmunoreguladoras, como inhibir la proliferación y actividad de linfocitos T, inducir la expansión y activación de los linfocitos B reguladores y estimular la expansión y diferenciación de una subpoblación recientemente descrita de Treg, denominada iTr35. Estos linfocitos iTr35 tienen como particularidad producir específicamente IL-35; no obstante, el rol de IL-35 en la periodontitis aún no ha sido determinado.

**Materiales y Métodos:** Se analizó el efecto de IL-35 durante la resorción ósea en un modelo animal de periodontitis experimental, mediante la inoculación local o sistémica de IL-35 en distintas concentraciones. Se cuantificó la magnitud de la resorción ósea en los huesos maxilares mediante microtomografía computarizada (micro-CT). Además, se analizó la expresión de mRNA de RANKL, OPG, IL-6 e IL-35 y de los receptores IL-6R, gp130, WSX-1 e IL-12R $\beta$ 2 en las lesiones periodontales mediante qPCR. Finalmente, se detectó la presencia de linfocitos Th17 y Treg en los linfonodos cervicales mediante citometría de flujo.

**Resultados:** Los ratones inoculados con IL-35 presentaron menores niveles de resorción ósea alveolar, menores niveles de expresión de IL-6 y sus receptores, y una disminución de la expresión y producción de RANKL. Además, presentaron mayores niveles de expresión de IL-35, de sus receptores no comunes con IL-6 y de OPG. Por otra parte, se detectó menor presencia de células Th17 y una mayor presencia de Treg.

**Conclusiones:** La inoculación con IL-35 inhibe la resorción ósea y los niveles de RANKL/OPG. Además, IL-35 lleva a la menor detección de linfocitos Th17 y mayor detección de linfocitos Treg en las lesiones periodontales.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Introducción

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica cuya causa es la sinergia polimicrobiana y la disbiosis de la microbiota subgingival (Hajishengallis, 2015). Ante estos cambios microbiológicos, el hospedero responde desencadenando una respuesta inmune desregulada (Alvarez y cols., 2019). A su vez, esta respuesta inmune desregulada causa la destrucción de los tejidos de soporte de los dientes, en especial la resorción de hueso alveolar, y eventualmente la pérdida de los dientes (Alvarez y cols., 2019). Clínicamente, la periodontitis se manifiesta con la pérdida de inserción clínica y la formación de sacos periodontales, como consecuencia directa de la resorción ósea alveolar (Alvarez y cols., 2019). Además, la periodontitis se asocia a una serie de afecciones sistémicas con componente inflamatorio, como las enfermedades cardiovasculares, la diabetes mellitus y la artritis reumatoide (Kirst y cols., 2015).

Aunque las bacterias que conforman la microbiota subgingival son necesarias para el inicio y progresión de la periodontitis y pueden causar, en parte, daño directo en los tejidos periodontales, la patogenia de la enfermedad se asocia principalmente a la respuesta inmune desregulada del hospedero en respuesta a la disbiosis de la microbiota subgingival (Hajishengallis, 2015). En este contexto, los linfocitos T colaboradores tipo 17 (Th17) juegan un rol central en la patogenia de la periodontitis (Chen y cols., 2016). Los linfocitos Th17 promueven la resorción ósea alveolar mediante la producción de citoquinas proinflamatorias como la interleuquina (IL)-6 e IL-17A, las que inducen en osteoblastos y células estromales la expresión del factor promotor de la osteoclastogénesis, denominado ligando del receptor activador del factor nuclear  $\kappa$ B (RANKL) (Okamoto y cols., 2017). Además, los linfocitos Th17 son capaces de inducir directamente la osteoclastogénesis, al producir la forma secretada de RANKL, con efecto paracrino en los tejidos periodontales (Kikuta y cols., 2013; Vernal y cols., 2006). Por otro lado, los linfocitos T reguladores (Tregs) participan en el control homeostático de la respuesta inmune

mediante la producción de citoquinas antiinflamatorias, tales como IL-10 e IL-35, las que inhiben la actividad de los linfocitos Th17 y, en consecuencia, la diferenciación de los osteoclastos y su actividad osteolítica periodontal (Alvarez y cols., 2018; Bozec y cols., 2018).

## **2.2 Periodontitis, respuesta inmune y resorción ósea alveolar**

Existe una regulación bidireccional entre el sistema inmune y el sistema óseo. Por ejemplo, la médula ósea alberga a los precursores y promueve la diferenciación de las células inmunes (Okamoto y cols., 2017) y las moléculas expresadas por las células inmunes afectan directamente el balance fisiológico entre la aposición y resorción ósea (Ponzetti y Rucci, 2019). Entre estas moléculas, RANKL es esencial para la diferenciación, activación y supervivencia de los osteoclastos periodontales (Ponzetti y Rucci, 2019). En cambio, la molécula osteoprotegerina (OPG), el receptor señuelo soluble de RANKL, impide la unión de RANKL a su receptor RANK y, en consecuencia, la diferenciación y activación de los osteoclastos (Kanzaki y cols., 2016). Así, el equilibrio RANKL/OPG regula directamente la resorción ósea y, en parte, estos mediadores son producidos por las células inmunes (Kanzaki y cols., 2016).

Durante la periodontitis, el balance RANKL/OPG se encuentra alterado, debido a un aumento en los niveles locales de RANKL; así como, también de citoquinas proinflamatorias que promueven su expresión, entre ellas IL-6 e IL-17A (Cochran, 2008). En respuesta a este desbalance, también aumenta la producción de citoquinas antiinflamatorias, con el propósito de controlar el proceso inflamatorio; sin embargo, su actividad no logra compensar la actividad de las citoquinas proinflamatorias, lo que resulta en el incremento de la actividad de los linfocitos Th17 por sobre los Treg y, de esta manera, se establece un desbalance Th17/Treg periodontal osteodestructivo (Collison y cols., 2010; Kuo y cols., 2011).

### **2.3 Rol de IL-6 y linfocitos Th17 en la periodontitis**

IL-6 es una citoquina producida en respuesta a las infecciones y al daño tisular, esencial para la diferenciación y proliferación de los linfocitos Th17 (Kimura y Kishimoto, 2010). Durante la masticación, se genera un daño mecánico fisiológico que induce la producción de IL-6 y que favorece la acumulación de linfocitos Th17 en los tejidos periodontales (Dutzan y cols., 2017). En pacientes afectados de periodontitis, los niveles de IL-6 presentes en el fluido crevicular gingival, la saliva y la sangre aumentan, lo que se asocia a mayores niveles de resorción ósea (Lima y cols., 2019; Machado y cols., 2018). Además, la sobreexpresión de IL-6 impide la diferenciación de los linfocitos T naïve a Treg, y provoca la inestabilidad fenotípica de los linfocitos Treg ya diferenciados, promoviendo su transdiferenciación hacia linfocitos Th17 productores de RANKL, lo que incrementa la resorción ósea patológica durante la periodontitis (Dutzan y cols., 2012; Tsukasaki y cols., 2018).

Durante la presentación antigénica, la diferenciación de los linfocitos Th17 a partir de linfocitos T naïve requiere la señalización de IL-6 vía el receptor IL-6R y gp130 presentes en la membrana celular, formando el complejo IL-6/IL-6R/gp130, el que induce la expresión de ROR $\gamma$ t, un factor de transcripción maestro que regula la diferenciación y actividad de los linfocitos Th17 y, en consecuencia, la producción de IL-17A y RANKL (Kimura y Kishimoto, 2010).

### **2.4 IL-35 y linfocitos iTr35**

IL-35 es una citoquina inmunoreguladora producida principalmente por los linfocitos Treg y reconocida como un potente supresor de los linfocitos T efectores, entre ellos, los linfocitos Th17 (Collison y cols., 2010). IL-35 es un heterodímero formado por las subunidades IL-12p35 y Ebi3 (Choi y cols., 2015), y pertenece a la familia de la IL-6 e IL-12 (Garbers y cols., 2012), cuya acción es crítica para la generación de los linfocitos iTr35 (por su nombre en inglés: IL-35-producing regulatory T cells). Los iTr35 son una subpoblación de linfocitos T reguladores caracterizada por la producción exclusiva de IL-35 como mecanismo inmunoregulador, pero que depende la señalización de IL-35 mediante el receptor heterodimérico, conformado

por IL-12R $\beta$ 2 y gp130, la que induce la expresión de Fopx3 y Ebi3 y, en consecuencia, la producción autóloga de IL-35 (Collison y cols., 2012).

Entre los efectos de IL-35, se ha descrito que es capaz de inhibir la diferenciación de los linfocitos Th17 y la producción de IL-17A mediante la inhibición de la expresión de ROR $\gamma$ t (Niedbala y cols., 2007; Okada y cols., 2017). Por otro lado, reportes recientes han sugerido que IL-35 podría desempeñar un rol regulador sobre el balance RANKL/OPG, pudiendo inhibir la resorción ósea patológica (Collison y cols., 2010; Kuo y cols., 2011; Sakkas y cols., 2018). En este contexto, durante la periodontitis, los niveles de IL-35 se encuentran aumentados y se propone que pudiera tener un potencial rol protector, al actuar como un regulador de la respuesta proinflamatoria (Jin y cols., 2017). Sin embargo, no se ha descrito la presencia o el posible rol que desempeñarían los linfocitos iTr35 en la periodontitis.

## **2.5 Receptores y señalización de IL-35 e IL-6**

IL-35 inicia su señalización mediante la unión a distintos receptores formados por los homodímeros gp130/gp130 e IL-12R $\beta$ 2/IL-12R $\beta$ 2 y los heterodímeros gp130/IL-12R $\beta$ 2, gp130/WSX-1 e IL-12R $\beta$ 2/WSX-1 (Floss y cols., 2017). Entre las subunidades que forman homodímeros, gp130 es una proteína que se expresa de manera ubicua y funciona principalmente como unidad de transducción de señal para las citoquinas de la familia de IL-6 (Cron, 2016), y que al unirse con IL-35 en los linfocitos T, inhibe su proliferación (Huang y cols., 2017; Ma, 2016). Por otro lado, IL-12R $\beta$ 2 es parte del receptor de IL-12 cuando se asocia con IL-12R $\beta$ 1, y se expresa principalmente en linfocitos T y células natural killer activadas (Fauconnier y cols., 2012) y, de igual manera, al unirse a IL-35, inhibe la proliferación de linfocitos T (Ma, 2016; Huang y cols., 2017). Por otro lado, la señalización de IL-35 mediante el receptor heterodimérico, gp130/IL-12R $\beta$ 2 regula de manera exclusiva la diferenciación de los linfocitos iTr35 y la producción de IL-35; mientras que cuando se une a IL-12R $\beta$ 2/WSX-1, induce la expansión y activación de los linfocitos B reguladores (Breg) (Huang y cols., 2017; Ma, 2016).

La citoquina IL-6 señala mediante el receptor IL-6R, el cual presenta dos formas: mL-6R, unido a membrana, y sIL-6R, en forma soluble (Cron y cols., 2016). Cuando IL-6 se une a IL-6R, el complejo IL-6/IL-6R activa la vía gp130 (Garbers y cols., 2012). De este modo, el complejo IL-6/IL-6R/gp130 promueve la activación de los factores de transcripción STAT1 y STAT3 (Ma, 2016) y en conjunto con TGF- $\beta$ 1 inducen la expresión de ROR $\gamma$ t provocando la diferenciación de linfocitos Th17 y la producción de IL-17A y RANKL (Kimura y Kishimoto, 2010).

## **2.6 Planteamiento del problema científico**

Es relevante destacar que, a pesar de sus diferentes funciones, IL-6 e IL-35 pertenecen a la misma familia de citoquinas, junto con IL-27 e IL-39 (Garbers y cols., 2012). Recientemente, se ha reportado que IL-35 es capaz de inhibir la producción de IL-6 e IL-8 en células del ligamento periodontal estimuladas con IL-17A (Shindo y cols., 2019). Además, algunos de los receptores de IL-35 también pueden interactuar con IL-6, por lo que es plausible que compitan por la unión a éstos (Floss y cols., 2017; Garbers y cols., 2012). Así, la subunidad Ebi3 de IL-35 puede señalar, al igual que IL-6, vía gp130, pudiendo suprimir la unión de sIL-6R e inhibir la trans-señalización de IL-6 (Chehboun y cols., 2017), lo que podría impedir la diferenciación de los linfocitos Th17. Por lo tanto, es posible sugerir que IL-35 tiene un rol en la regulación de la acción de IL-6 sobre los linfocitos T; es decir, la concentración local de IL-6 o de IL-35 podría favorecer la unión de éstos a sus receptores respectivos y ejercer efectos contrarios, perpetuando la inflamación y la resorción ósea en el caso de IL-6, o regulando la inflamación e inhibiendo la resorción ósea en el caso de IL-35.

Los niveles tanto de IL-6 como de IL-35 se encuentran incrementados en los tejidos periodontales de pacientes afectados por periodontitis (Carrillo de Albornoz Sainz y cols., 2006; Köseoğlu y cols., 2015; Mitani y cols., 2015); sin embargo, los niveles de IL-6 son significativamente mayores que IL-35 (Lin y cols., 2005). Esto podría favorecer su unión a los receptores que comparten y, así, suprimir de manera importante la función inmunoreguladora de IL-35.

Por otro lado, no existe claridad sobre los niveles de expresión de los receptores a los que se unen IL-35 e IL-6 en los tejidos periodontales, o si la proporción de éstos podría afectar su unión a IL-6 o IL-35 durante la periodontitis. Por lo tanto, el aumento de los niveles locales de IL-35 por sobre los de IL-6 podría favorecer su efecto inmunoregulador y osteoprotector, promoviendo la diferenciación de los linfocitos iTreg y, en consecuencia, inhibiendo la resorción ósea alveolar durante la periodontitis. En consecuencia, en el presente trabajo de investigación se analizó el efecto de la inoculación de IL-35 en la resorción ósea alveolar y en la respuesta inmune mediada por los linfocitos Th17 e iTreg, usando un modelo animal de periodontitis experimental.

### **3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **3.1 Hipótesis**

Durante la periodontitis, IL-35 inhibe la resorción ósea alveolar, disminuye los niveles de IL-6 y la expresión de sus receptores específicos e incrementa el número de los linfocitos iTr35.

#### **3.2 Objetivo general**

En un modelo animal de periodontitis experimental, analizar el efecto de IL-35 sobre la resorción ósea alveolar, los niveles periodontales de RANKL, OPG, IL-6 e IL-35, la expresión de los receptores IL-6R, gp130, WSX-1 e IL-12R $\beta$ 2, y el número de linfocitos iTr35 y Th17.

#### **3.3 Objetivos específicos**

1. Cuantificar la resorción ósea alveolar en animales con periodontitis tratados o no con IL-35, mediante la cuantificación del área de resorción ósea por microtomografía computarizada (micro-CT).
2. Cuantificar los niveles de expresión de RANKL, OPG, IL-6 e IL-35, y de los receptores IL-6R, gp130, WSX-1 e IL-12R $\beta$ 2, en las lesiones periodontales de animales afectados de periodontitis tratados o no con IL-35.
3. Cuantificar el número de linfocitos Th17 e iTr35 en las lesiones periodontales de animales con periodontitis tratados o no con IL-35, mediante citometría de flujo.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Tipo de estudio**

Experimental *in vivo*.

### **4.2 Animales**

Se utilizaron 48 ratones C57BL/6 de 8 semanas de edad disponibles en la Plataforma Experimental Bioterio de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Todos los procedimientos se realizaron siguiendo las pautas del “*Council of the American Psychological Society 1980*” y las recomendaciones de la “*American Veterinary Medical Association*”. El protocolo de experimentación (Protocolo #061601) fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile (Anexo 1). Además, el estudio fue aprobado en su totalidad por el Comité de Bioseguridad de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile (Anexo 2).

### **4.3 Periodontitis experimental**

La inducción de la periodontitis se realizó usando el método de ligadura (Abe y Hajishengallis, 2013). Los animales se anestesiaron con 100 µL de ketamina 10% y de xilacina 2% vía intraperitoneal, luego se colocaron sobre un soporte de fijación y apertura oral específicamente diseñado y, finalmente, se ató una sutura de seda negra 5-0 alrededor de los segundos molares maxilares en posición yuxtagingival, sin afectar a los tejidos periodontales (*Fine Science Tools, CA, EE. UU.*). Al día 15 posterior a la colocación de las ligaduras, los animales se eutanasiaron mediante sobredosis de anestesia y se obtuvieron las muestras biológicas.

#### **4.4 Inoculación con IL-35**

La citoquina IL-35 se administró de manera intragingival o intraperitoneal, 1 vez al día, día por medio, durante 15 días, usando jeringas 26s de 5  $\mu$ L. Así, se establecieron los siguientes grupos experimentales: administración intragingival de 1 ng/ $\mu$ L (IL-35ig1), 10 ng/ $\mu$ L (IL-35ig10) o 100 ng/ $\mu$ L (IL-35ig100) de IL-35, o administración intraperitoneal de 2  $\mu$ g/ $\mu$ L de IL-35 (IL-35ip2). Las dosis de IL-35 se establecieron sobre la base de antecedentes (Niedbala y cols., 2007). Como controles, se analizaron animales con periodontitis sin tratamiento con IL-35 y animales sin periodontitis.

#### **4.5 Cuantificación de la resorción ósea alveolar**

Se obtuvieron los maxilares y se escanearon mediante microtomografía computarizada (micro-CT) para la cuantificación del volumen óseo perdido (Monasterio y cols., 2018). Para esto, en un equipo micro-CT (*SkyScan 1278, Bruker, Kontich, Bélgica*), las muestras se analizaron usando siguientes parámetros: 59 kV, 588  $\mu$ A y rotación de 0,5° y 360° de rango angular. Las muestras se escanearon en los tres planos espaciales y las imágenes digitalizadas 3D se generaron utilizando un algoritmo de haz cónico modificado y un software de reconstrucción (*Dataviewer software, Bruker, Kontich, Bélgica*). Todos los datos fueron recolectados por un único observador, el que estuvo ciego a las condiciones experimentales de las muestras.

#### **4.6 Expresión de RANKL, OPG, de las citoquinas IL-6 e IL-35, y de los receptores IL-6R, gp130, WSX-1 e IL-12R $\beta$ 2 en las lesiones periodontales**

Los niveles de expresión de los mRNAs de RANKL, OPG, IL-6, IL-35 (p35 y Ebi3), IL-6R, gp130, WSX-1 e IL-12R $\beta$ 2 se analizaron mediante qPCR. Para esto, se obtuvieron biopsias de las lesiones periodontales y se homogenizaron inmediatamente en 1 ml de TRIzol Plus (Invitrogen Corp., Barcelona, España), para la obtención del RNA total usando un protocolo previamente estandarizado (Monasterio y cols., 2018). Para la extracción del RNA, las muestras ya

homogeneizadas fueron incubadas en 1 ml de TRIzol Plus por 10 minutos a 4°C, para luego agregar 200 µL de cloroformo y ser nuevamente incubadas a 4°C durante 10 minutos, bajo agitación vigorosa. Luego, las muestras fueron centrifugadas a 12.000 xg durante 20 minutos, y la fase acuosa se transfirió a un vial eppendorf libre de RNAasas, para lavar el RNA citoplasmático total obtenido con 1 mL de etanol al 75%. Finalmente, el RNA purificado se resuspendió en 10 µL de agua milli-Q libre de RNAasas y se cuantificó en un espectrofotómetro (*Synergy HT; BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EE. UU.*). La primera hebra de ADNc se sintetizó utilizando 1 µg de ARN total con un kit de transcripción reversa, siguiendo las instrucciones del fabricante (*SuperScript III; Invitrogen, Grand Island, NY, EE. UU.*). Para la amplificación con partidores específicos (Tabla 1) se utilizaron 10 ng de cDNA. El protocolo de amplificación consistió en los siguientes pasos: un primer ciclo de 95°C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 3 segundos y 60°C por 30 segundos. Para la detección de productos inespecíficos y de amplificación de falsos positivos, se realizó una curva de melting que consistió en ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto y 95°C por 15 segundos. Como control endógeno, se cuantificaron los niveles de expresión de la subunidad rRNA 18S.

**Tabla 1.** Partidores utilizados para la amplificación mediante qPCR.

<b>Blanco</b>	<b>Partidor Forward</b>	<b>Partidor Reverse</b>
IL-6	TGATGGATGCTACCAAAGTGG	TTCATGTACTCCAGGTAGCTATGG
OPG	ATGAACAAGTGGCTGTGCTG	CAGTTTCTGGGTCATAATGCAA
RANKL	TGAAGACACACTACCTGACTCCTG	CCCACAATGTGTTGCAGTTC
IL-35 (p35)	CATCGATGAGCTGATGCAGT	GCAGAGCTTCATTTTCACTCTGT
IL-35 (Ebi3)	GCTCCCCTGGTTACTGAA	ACGGGATACCGAGAAGCAT

IL-6R	AACAACAAACCAAACGTGGAG	TCGCACTTGAAATACATACTTGC
Gp130	GAATCGGACCCACTTGAGAG	GCGAATACGGGAGTTACTGTG
WSX-1	TCAGAAATACCATCCCAATAGAGTC	GGAATGGTCACCCAACTCTG
IL-12R $\beta$ 2	GTGATTCCTCTTGGGTCAGC	ACAGCCTTGCTTGGGATTC
18S rRNA	GCAATTATTCCCATGAACG	GGGACTTAATCAACGCAAGC

#### 4.7 Detección de linfocitos Th17 e iTr35

Para la obtención de las células de los linfonodos cervicales que drenan las lesiones periodontales, se utilizó un filtro de 70  $\mu$ m en buffer fosfato salino (PBS) y se cuantificaron en un contador de células automático (*LUNA II; Logos biosystems, Inc., Annandale, VA*). Luego, las células se lavaron e incubaron con la tinción de viabilidad Zombie UV por 30 minutos para caracterizar sólo células vivas, para luego ser marcadas extracelularmente con los siguientes anticuerpos monoclonales conjugados a fluorocromos: anti-CD3 conjugado a brilliant violet 711 (BV 711), anti-CD4 conjugado a brilliant violet allophycocyanin-Cy7 (APC-Cy7), anti-CD8 conjugado a brilliant ultraviolet 396 (BUV 396), anti-CD25 conjugado a allophycocyanin (APC), anti-CD45 conjugado a brilliant violet 421 (BV 421), y anti-RANKL conjugado a phycoerythrin (PE), a 4°C por 30 minutos. Posteriormente, las células se trataron con 50 ng/ml de Phorbol-12-myristate 13-acetate (PMA) (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.*), 1  $\mu$ g/ml de Ionomicina (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.*), y 3  $\mu$ g/mL de Brefeldina A (*Invitrogen, Grand Island, NY*), y se incubaron a 37°C por 4 horas. Previa permeabilización celular usando una solución de lavado/permeabilización por 45 minutos a 4°C, las células fueron marcadas intracelularmente con los siguientes anticuerpos monoclonales para identificar los factores de transcripción: anti-Foxp3 conjugado a fluoresceína-5-isotiocianato (FITC) y anti-ROR $\gamma$ t conjugado a phycoerythrin CF594 (PE CF594); y para las citoquinas con los anticuerpos anti-IL-35 (anti-Ebi3) conjugado a allophycocyanin

700 (APC 700) y anti-IL-17A conjugado a phycoerythrin-Cy7 (PE-Cy7). Para los análisis de citometría se utilizó un citómetro de flujo (*LSR Fortessa X-20; Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.*), usando ventanas de análisis secuenciales de acuerdo a la dispersión frontal y lateral (FS/SS), viabilidad celular y los marcadores extracelulares, donde las células CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>RORγt<sup>+</sup>IL17A<sup>+</sup> se consideraron como linfocitos Th17 y las células CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>IL35<sup>+</sup> se consideraron como linfocitos iTr35.

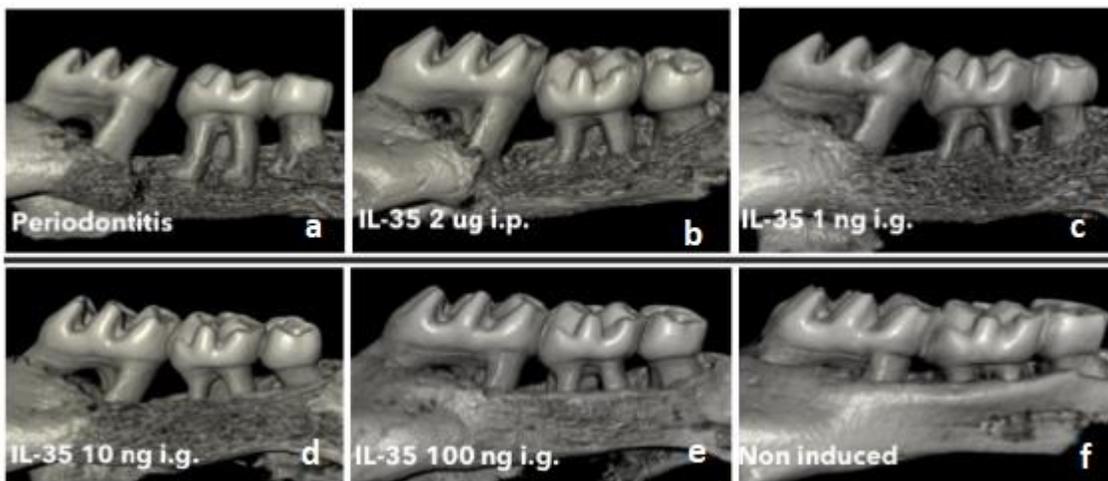
#### **4.8 Análisis estadísticos**

Los datos se analizaron estadísticamente utilizando el software SPSS 22.0 (*IBM Corp., Armonk, NY, EE. UU.*). Se determinó la normalidad de la distribución de datos utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias entre las distintas condiciones experimentales se analizaron con la prueba ANOVA y post-hoc de Bonferroni. Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo.

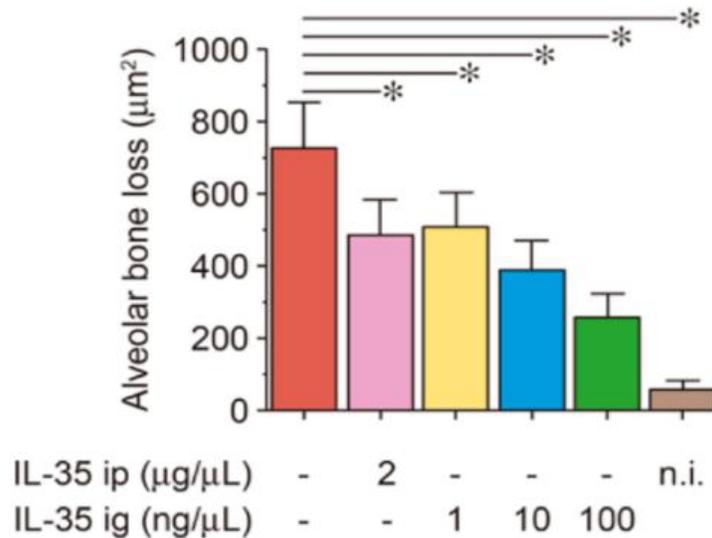
## 5. RESULTADOS

### 5.1 Resorción ósea alveolar

En la Figura 1 se muestran las imágenes obtenidas mediante micro-CT de maxilares de los animales afectados por periodontitis inducida por ligadura (1a, 1b, 1c, 1d, 1e) que fueron inoculados o no con IL-35 (1b, 1c, 1d, 1e), y animales no inducidos (1f). Los animales que fueron inoculados con IL-35 presentaron un área menor de resorción ósea, de manera dependiente de la dosis. El grupo que recibió la dosis más concentrada de 100 ng/ $\mu$ L presentó una reabsorción ósea significativamente menor en comparación con el grupo no inoculado (Figura 2). Además, el área de resorción ósea fue similar entre los animales que recibieron IL-35 intraperitoneal (1b) y la menor dosis de IL-35 intragingival (1c), de la misma manera, el área de resorción fue significativamente menor en comparación con el grupo de animales afectados por periodontitis no inoculados con IL-35 (Figura 2).



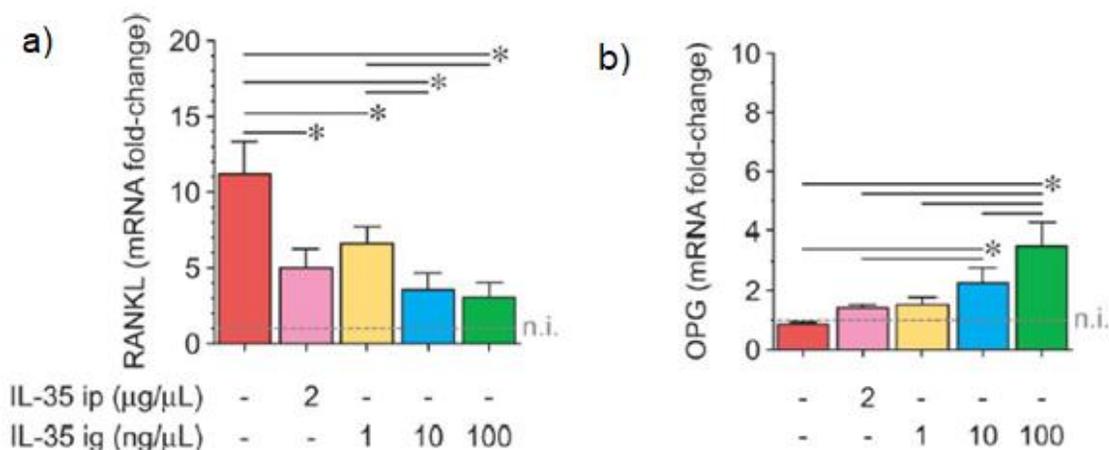
**Figura 1. Resorción ósea alveolar.** Imágenes representativas de micro-CT de ratones afectados de periodontitis, donde se presentan los siguientes grupos: a) Periodontitis (no inoculados), b) animales inoculados vía i.p. con IL-35 2 ug /100  $\mu$ L, animales inoculados vía i.g. con IL-35, c) 1 ng/ $\mu$ L, d) 10 ng/ $\mu$ L, e) 100 ng/ $\mu$ L) y f) animales no inducidos.



**Figura 2. Cuantificación del área ósea perdida.** Área de pérdida de hueso alveolar de ratones afectados de periodontitis en los siguientes grupos: Periodontitis (no inoculados), animales inoculados vía i.p. con IL-35 2 ug /100 µL, animales inoculados vía i.g. con IL-35 (1 ng/µL, 10 ng/µL, 100 ng/µL) y animales no inducidos (n.i), cuantificados mediante micro-CT. Los datos son presentados como  $\mu\text{m}^2$  y se muestran como media  $\pm$  desviación estándar (DE) de 8 experimentos independientes. \* $p < 0,05$ .

## 5.2 Niveles de expresión de mRNA de RANKL, OPG, las citoquinas IL-6 e IL-35, y de los receptores IL-6R, gp130, WSX-1 e IL-12R $\beta$ 2 en las lesiones periodontales.

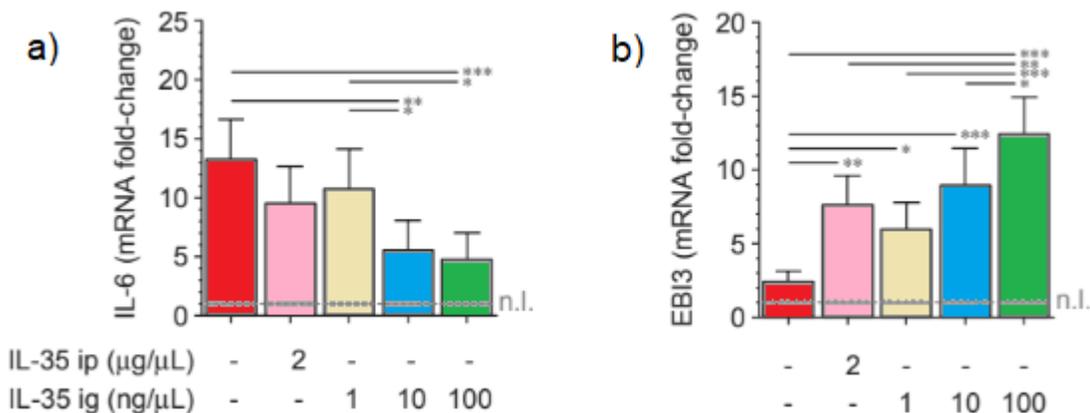
Se detectó una disminución significativa de los niveles de expresión de RANKL, de manera dependiente de la dosis, en las lesiones periodontales de los animales afectados por periodontitis que fueron inoculados con IL-35, en comparación con los que no fueron inoculados (Figura 3a). Por el contrario, los niveles de OPG aumentaron significativamente, de manera dependiente de la dosis, en los animales inoculados con IL-35, en comparación con los no inoculados (Figura 3b).



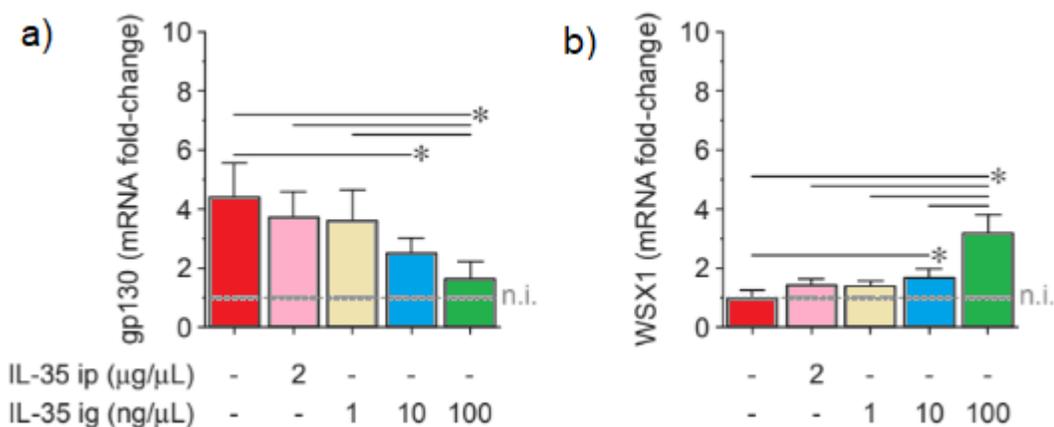
**Figura 3. Niveles de expresión de RANKL y OPG.** Expresión de mRNA de RANKL y OPG en lesiones periodontales de animales afectados de periodontitis no inoculados, con inoculación i.p. de IL-35 2 μg /100 μL, inoculación i.g. de IL-35 (1 ng/μL, 10 ng/μL, 100 ng/μL) y animales no inducidos (n.i.). Para la expresión relativa, la expresión de RANKL y OPG en los animales no inducidos (n.i.) fue considerada como “1”, siendo referencia de fold-change de la expresión. Los datos son presentados como mRNA fold change y se muestran como media ± DE de 8 experimentos independientes. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < .01$  y \*\*\* $p < .001$ .

En relación con la expresión de IL-6 e IL-35, ambas citoquinas se vieron afectadas por la inoculación de IL-35. IL-6 disminuyó significativamente su expresión (Figura 4a) en los animales inoculados, y la expresión de IL-35 aumentó significativamente, de manera dependiente de la dosis inoculada (Figura 4b). Estos resultados demuestran que IL-6 presenta una disminución clara de su expresión a medida que aumentan los niveles locales de IL-35.

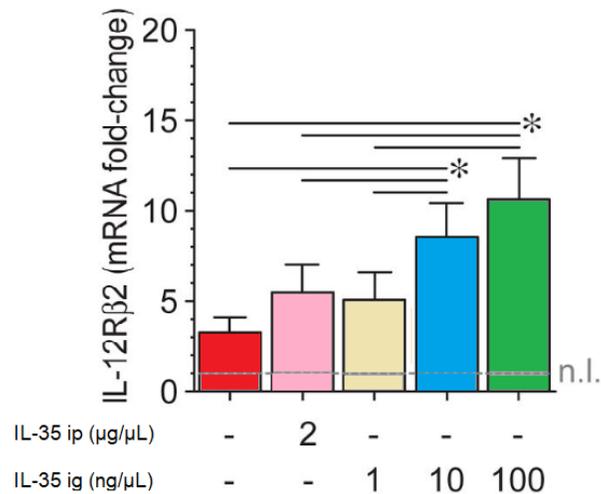
Con respecto a la expresión de los receptores de IL-6 e IL-35, la expresión de gp130 disminuye (Figura 5a) de manera dependiente de la dosis de IL-35 inoculada; mientras que, la expresión de WSX1 y IL-12Rβ2 aumenta (Figura 5b y 6), siendo estos cambios estadísticamente significativos para ambos receptores en los grupos tratados con 10 ng/μL y 100 ng/μL de IL-35, en comparación al grupo no inoculado. Debido a las restricciones para acceder a los laboratorios en el contexto de pandemia, no fue posible completar los análisis para el receptor IL-6R.



**Figura 4. Niveles de expresión de IL-6 e IL-35.** Expresión de mRNA de IL-6 e IL-35 (subunidad EB13) en lesiones periodontales de animales afectados de periodontitis no inoculados, con inoculación i.p. de IL-35 2 μg /100 μL, inoculación i.g. de IL-35 (1 ng/μL, 10 ng/μL, 100 ng/μL) y animales no inducidos (n.i.). Para la expresión relativa, la expresión de IL-6 e IL-35 en los animales no inducidos (n.i.) fue considerada como “1”, siendo referencia de fold-change de la expresión. Los datos son presentados como mRNA fold change y se muestran como media ± DE de 8 experimentos independientes. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < .01$  y \*\*\* $p < .001$ .



**Figura 5. Niveles de expresión de los receptores gp130 y WSX1.** Expresión de mRNA de los receptores gp130 y WSX1 en lesiones periodontales de ratones afectados de periodontitis sin tratamiento, con inoculación i.p. de IL-35 2 ug /100 μL, inoculación i.g. de IL-35 (1 ng/μL, 10 ng/μL, 100 ng/μL) y ratones no inducidos (n.i.). Para la expresión relativa, la expresión de gp130 y WSX1 en los animales no inducidos (n.i.) fue considerada como “1”, siendo referencia de fold-change de la expresión. Los datos son presentados como mRNA fold change y se muestran como media ± DE de 8 experimentos independientes. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < .01$  y \*\*\* $p < .001$ .

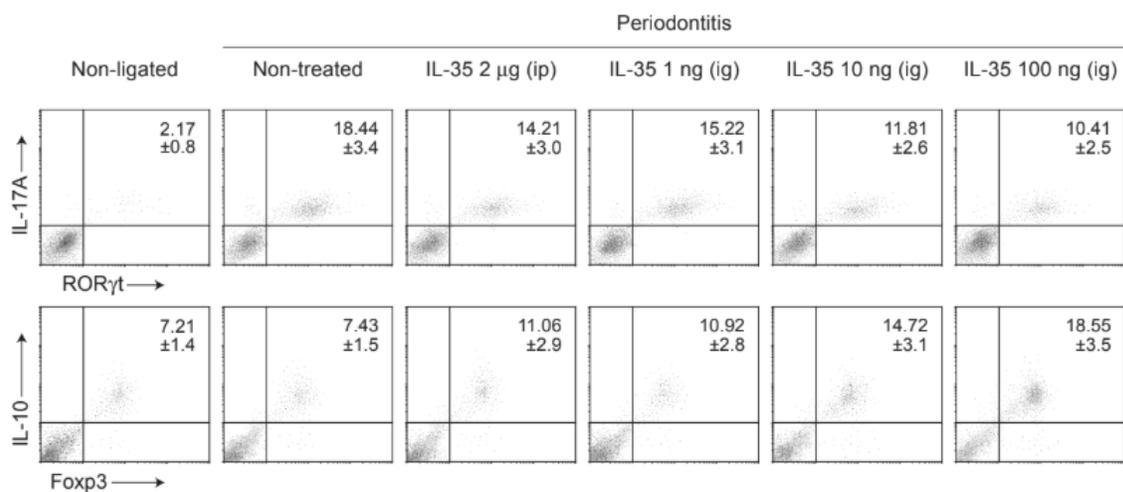


**Figura 6. Niveles de expresión del receptor IL-12Rβ2.** Expresión de mRNA del receptor IL-12Rβ2 en lesiones periodontales de ratones afectados de periodontitis sin tratamiento, con inoculación i.p. de IL-35 2 ug /100 μL, inoculación i.g. de IL-35 (1 ng/μL, 10 ng/μL, 100 ng/μL) y ratones no inducidos (n.i.). Para la expresión relativa, la expresión de IL-12Rβ2 en los animales no inducidos (n.i.) fue considerada como “1”, siendo referencia de fold-change de la expresión. Los datos son presentados como mRNA fold change y se muestran como media ± DE de 8 experimentos independientes. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < .01$  y \*\*\* $p < .001$ .

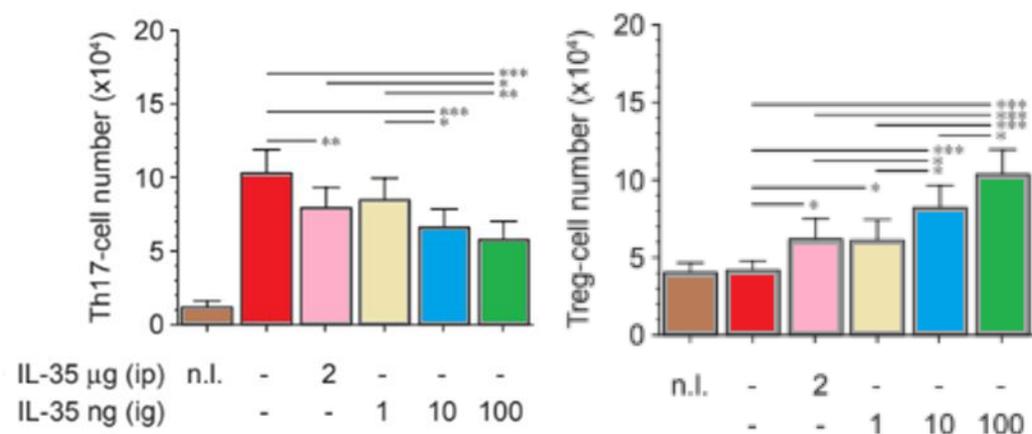
### 5.3. Detección de linfocitos Th17 e iTr35.

En relación con la detección de linfocitos en los linfonodos cervicales que drenan las lesiones periodontales, la inoculación de IL-35 disminuyó la detección de linfocitos Th17 CD45<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>RORγt<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> de manera dependiente de la dosis en los ratones inoculados, en comparación con los animales no inoculados, a excepción del grupo inoculado con 1 ng/μL (Figura 7). La detección de los linfocitos iTr35 no pudo ser completada; por lo cual, se muestra la detección los linfocitos Treg CD45<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>Foxp3<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>, la cual aumenta significativamente, y de manera dependiente de la dosis, en los animales inoculados con IL-35 comparados con los que no fueron inoculados (Figura 7).

(a)



(b)



**Figura 7. Detección de linfocitos Th17 y Treg.** (a) Análisis de citometría de flujo que demuestra la presencia de linfocitos CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>IL17A<sup>+</sup> Th17 y CD45<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>Foxp3<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> Treg en los linfonodos cervicales de animales afectados por periodontitis e inoculados o no con IL-35. (b) Número de linfocitos CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>IL17A<sup>+</sup> Th17 y CD45<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>Foxp3<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> Treg en los linfonodos cervicales de ratones afectados por periodontitis e inoculados o no con IL-35. Los datos están representados como número absoluto de linfocitos Th17 y Treg, además, se muestran como media  $\pm$  DE de 8 experimentos independientes. \* $p$  < .05, \*\* $p$  < .01 y \*\*\*

## 6. DISCUSIÓN

La sinergia polimicrobiana y la disbiosis de la microbiota subgingival durante la periodontitis son capaces de provocar una respuesta inflamatoria crónica, caracterizada por altos niveles de citoquinas proinflamatorias (Hajishengallis, 2015). Los altos niveles de IL-6 favorecen la diferenciación, proliferación y la actividad patogénica de los linfocitos Th17, lo que induce un aumento de la expresión de RANKL (Dutzan y cols., 2018) y el incremento de la actividad osteoresortiva de los osteoclastos en los tejidos periodontales (Okamoto y cols., 2017). En contraparte, la actividad de los linfocitos Treg mitiga la inflamación osteoresortiva, produciendo citoquinas antiinflamatorias e inmunosupresoras, tal como IL-35 (Choi y cols., 2015), e induciendo la producción de OPG, teniendo un rol protector durante la periodontitis. Entre las citoquinas antiinflamatorias involucradas en este proceso, la citoquina IL-35 promueve la expansión y diferenciación de los linfocitos iT<sub>Tr</sub>35, capaces de secretar altos niveles de IL-35, pudiendo inhibir aún más la actividad Th17 (Ma, 2016). En este trabajo de investigación, la inoculación de IL-35 disminuyó la expresión de la citoquina proinflamatoria IL-6, su receptor gp130, RANKL, y la detección de linfocitos Th17 en linfonodos cervicales. Además, IL-35 aumentó la expresión periodontal local de IL-35, de sus receptores no comunes con IL-6, de la molécula osteoprotectora OPG, y la detección de linfocitos Treg.

Los cambios a nivel celular y molecular ocasionados por la inoculación de IL-35 provocaron una disminución de la pérdida ósea en los maxilares en el modelo animal de periodontitis experimental. IL-35 restauró el balance RANKL/OPG y generó una disminución en la detección linfocitos Th17, y disminuyó los niveles de expresión de IL-6 y su receptor gp130, necesarios para su diferenciación durante la periodontitis. Estos resultados concuerdan con los de otros estudios, como el de Li y cols. (2016), donde IL-35 tuvo estos mismos efectos usando un modelo animal de artritis inducida por colágeno (Li y cols., 2016). Otros estudios han descrito el rol de IL-35 en otros tipos de enfermedades inflamatorias: en las enfermedades autoinmunes su expresión disminuye, en cambio en las enfermedades infecciosas, su expresión aumenta, participando en la disminución del daño tisular inflamatorio

(Huang y cols., 2017). En efecto, pacientes afectados por periodontitis presentan niveles de IL-35 periodontales significativamente mayores a los detectados en individuos sanos (Kalburgi y cols., 2013; Köseoğlu y cols., 2015).

Diversos estudios han planteado que IL-35 podría jugar un papel protector durante la periodontitis, mediado por su rol en la disminución de los niveles de IL-6 y de IL-17A. Cai y cols. (2017) asociaron el aumento en la expresión de IL-35 en pacientes con periodontitis, con la disminución de la expresión de IL-6 en el ligamento periodontal (Cai y cols., 2017). De manera similar, Mitani y cols. (2015), encontraron una tendencia similar con los niveles de IL-17A en el fluido crevicular gingival (Mitani y cols., 2015). Además, a nivel de parámetros clínicos periodontales, existe una correlación negativa entre el aumento de los niveles de IL-35 y la disminución de la profundidad de sacos periodontales y el nivel de inserción clínica (Jin y cols., 2017).

Por otro lado, existe evidencia con respecto a la relación *in vitro* entre IL-35 y cada uno de sus receptores: gp130, IL-12R $\beta$ 2 y WSX-1 (Collison y cols., 2012; Huang y cols., 2017; Ma, 2018); sin embargo, la expresión diferencial de estos receptores en presencia de IL-35 no ha sido asociada a alguna patología en específico. En el presente estudio, la inoculación de IL-35 indujo un aumento en la expresión de IL-12R $\beta$ 2 y WSX-1, y la disminución de la expresión de gp130 periodontales. No obstante, debido a las dificultades presentadas por la pandemia, no fue posible determinar los niveles del receptor IL-6R. Actualmente, se desconoce el efecto de IL-35 en los niveles de este receptor, pero existe evidencia del efecto de otras citoquinas como la IL-2, donde la estimulación de linfocitos T naïve con esta citoquina generó la disminución de la expresión de gp130 e IL-6R y un aumento en la expresión de IL-12R $\beta$ 2, promoviendo la proliferación de linfocitos Treg e inhibiendo su polarización hacia un perfil Th17 (Liao y cols., 2011). Aparte, Wolf y cols. (2014), describieron una relación directamente proporcional entre la expresión de IL-6 e IL-6R, en células epiteliales bronquiales y hepatocitos (Wolf y cols., 2014); sin embargo, aún no hay evidencia de esta proporción en células del sistema

inmune. Por lo tanto, es posible sugerir que la inoculación de IL-35 podría provocar también una disminución en la expresión del receptor IL-6R, de manera similar a su efecto en la expresión de gp130 e IL-6 durante la periodontitis.

Con respecto al receptor WSX-1, Cox y cols. (2010) investigaron el efecto de sus niveles de expresión a través de un modelo de inflamación intestinal en ratones carentes de WSX-1, concluyendo que su ausencia provocaba mayores signos de inflamación, como aumento en la longitud del colón y mayor severidad de colitis (Cox y cols., 2011). Otros estudios han evaluado la actividad inmunoreguladora de IL-27 (perteneciente a la familia de IL-35) vía WSX-1, determinando que su inoculación disminuye la detección de linfocitos Th17 en ratones (Stumhofer y cols., 2006; Aparicio-Siegmund y Garbers, 2015) y los niveles de IL-6 en pacientes afectados por artritis reumatoide (Tanida y cols., 2011). Estos resultados concuerdan con los encontrados en este trabajo de investigación; ya que, la inoculación de IL-35 también indujo un incremento en los niveles de expresión de WSX-1 y la disminución de la expresión de IL-6 y la cantidad de linfocitos Th17.

En relación con la diferenciación y expansión de linfocitos iTr35, se hipotetizó que la inoculación de IL-35 provoca un aumento en el número de linfocitos iTr35 periodontales. Collison y cols. (2012), en una revisión de las funciones de IL-35 y sus receptores, describió que el aumento de los niveles IL-35 favorece su señalización vía IL-12R $\beta$ 2/gp130 y; por lo tanto, la diferenciación de linfocitos iTr35 (Collison y cols., 2012). Nuestros resultados demostraron un aumento en la detección de linfocitos Treg luego de la inoculación de IL-35, los que, al menos en parte, podrían ser iTr35. En este contexto, la disminución de la expresión de gp130, podría deberse a una posible mayor afinidad por IL-6, la que también disminuyó su expresión ante la inoculación de IL-35. Por consiguiente, un aumento en la diferenciación de células iTr35, provocado por la inoculación de IL-35, podría mitigar la actividad osteodestructora y proinflamatoria de los linfocitos Th17, contribuyendo a la restauración del balance inmunológico durante la periodontitis.

De acuerdo con los resultados de este estudio, es posible sugerir que la inoculación de IL-35 o la regulación de sus niveles en pacientes afectados por periodontitis, presenta un potencial futuro como tratamiento coadyuvante a la remoción y control de la placa bacteriana; particularmente, en pacientes refractarios al tratamiento convencional o que presenten alguna condición sistémica que exacerbe las manifestaciones clínicas de la periodontitis. Dentro de las limitantes de este estudio, es importante destacar que no fue posible determinar los niveles de IL-6R ni la detección de los linfocitos iTr35. En efecto, éstas podrían contribuir a elucidar el mecanismo detrás del potencial terapéutico de IL-35, siendo una alternativa prometedora para controlar tanto la inflamación como la resorción ósea durante la periodontitis.

## 7. CONCLUSIONES

1. La inoculación con IL-35 inhibe la resorción ósea producida durante la periodontitis experimental en ratones.
2. La inoculación con IL-35 disminuye la expresión de mRNA de RANKL, IL-6 y gp130, y aumenta la de OPG, IL-35, WSX-1 e IL-12R $\beta$ 2 durante la periodontitis experimental en ratones.
3. La inoculación con IL-35 disminuye la detección de linfocitos Th17 y aumenta la de linfocitos Treg durante la periodontitis experimental en ratones.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Alvarez C, Rojas C, Rojas L, Cafferata EA, Monasterio G y cols. (2018). Regulatory T Lymphocytes in Periodontitis: A Translational View. *Mediators Inflamm*, 2018, 7806912.

Alvarez C, Monasterio G, Cavalla F, Córdova LA, Hernández M y cols. (2019). Osteoimmunology of Oral and Maxillofacial Diseases: Translational Applications Based on Biological Mechanisms. *Front Immunol*, 10. 1664.

Aparicio-Siegmund S y Garbers C (2015). The biology of interleukin-27 reveals unique pro- and anti-inflammatory functions in immunity. *Cytokine Growth Factor Rev*, 26(5), 579-586.

Bozec A, Luo Y, Engdahl C, Figueiredo C, Bang H y cols. (2018). Abatacept blocks anti-citrullinated protein antibody and rheumatoid factor mediated cytokine production in human macrophages in IDO-dependent manner. *Arthritis Res Ther*, 20(1), 24.

Cai S, Liu X, Li H, Feng L, Cao L y cols. (2017). Elevated interleukin (IL)-35-related sCD14 but not IL-23 is associated with the severity of chronic periodontitis. 10, 4119-4128.

Carrillo de Albornoz Sainz A, García Kass A y Bascones Martínez A (2006). Papel de la IL-6 y TNF- $\alpha$  en la enfermedad periodontal. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*, 18, 83-89.

Chehboun S, Labrecque-Carbonneau J, Pasquin S, Meliani Y, Meddah B y cols. (2017). Epstein-Barr virus-induced gene 3 (EBI3) can mediate IL-6. *J Biol Chem*, 292(16). 6644-6656.

Chen XT, Chen LL, Tan JY, Shi DH, Ke T y cols. (2016). Th17 and Th1 Lymphocytes Are Correlated with Chronic Periodontitis. *Immunol Invest*, 45(3), 243-254.

Choi J, Leung PS, Bowlus C y Gershwin ME (2015). IL-35 and Autoimmunity: a Comprehensive Perspective. *Clin Rev Allergy Immunol*, 49(3), 327-332.

Cochran DL (2008). Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol*, 79(8 Suppl). 1569-1576.

Collison LW, Chaturvedi V, Henderson AL, Giacomini PR, Guy C y cols. (2010). IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat Immunol*, 11(12). 1093-1101.

Collison LW, Delgoffe GM, Guy CS, Vignali KM, Chaturvedi V y cols. (2012). The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional. *Nat Immunol*, 13(3), 290-299.

Cox JH, Kljavin NM, Ramamoorthi N, Diehl L, Batten M y cols. (2011). IL-27 promotes T cell-dependent colitis through multiple mechanisms. *J Exp Med*, 208(1), 115-123.

Cron L, Allen T y Febbraio MA (2016). The role of gp130 receptor cytokines in the regulation of metabolic homeostasis. *J Exp Biol*, 219(Pt 2), 259-265.

Dutzan N, Vernal R, Vaque JP, García-Sesnich J, Hernandez M y cols. (2012). Interleukin-21 expression and its association with proinflammatory cytokines in untreated chronic periodontitis patients. *J Periodontol*, 83(7). 948-954.

Dutzan N, Abusleme L, Bridgeman H, Greenwell-Wild T, Zangerle-Murray T y cols. (2017). On-going Mechanical Damage from Mastication Drives Homeostatic Th17 Cell Responses at the Oral Barrier. *Immunity*, 46(1), 133-147.

Dutzan N, Kajikawa T, Abusleme L, Greenwell-Wild T, Zuazo CE y cols. (2018). A dysbiotic microbiome triggers T. *Sci Transl Med*, 10(463):eaat0797.

Fauconnier M, Palomo J, Bourigault ML, Meme S, Szeremeta F y cols. (2012). IL-12R $\beta$ 2 is essential for the development of experimental cerebral malaria. *J Immunol*, 188(4), 1905-1914.

Floss DM, Schönberg M, Franke M, Horstmeier FC, Engelowski E y cols. (2017). IL-6/IL-12 Cytokine Receptor Shuffling of Extra- and Intracellular Domains Reveals Canonical STAT Activation via Synthetic IL-35 and IL-39 Signaling. *Sci Rep*, 7(1), 15172.

Garbers C, Hermanns HM, Schaper F, Müller-Newen G, Grötzinger J y cols. (2012). Plasticity and cross-talk of interleukin 6-type cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev*, 23(3), 85-97.

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

Huang A, Cheng L, He M, Nie J, Wang J y cols. (2017). Interleukin-35 on B cell and T cell induction and regulation. *J Inflamm (Lond)*, 14, 16.

Stumhofer JS, Laurence A, Wilson EH, Huang E, Tato CM y cols. (2006). Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol*, 7(9), 937-945.

Jin Y, Liu D y Lin X (2017). IL-35 may maintain homeostasis of the immune microenvironment in periodontitis. *Exp Ther Med*, 14(6). 5605-5610.

Kalburgi NB, Muley A, Shivaprasad BM y Koregol AC (2013). Expression profile of IL-35 mRNA in gingiva of chronic periodontitis and aggressive periodontitis patients: a semiquantitative RT-PCR study. *Dis Markers*, 35(6), 819-823.

Kanzaki H, Makihira S, Suzuki M, Ishii T, Movila A y cols. (2016). Soluble RANKL Cleaved from Activated Lymphocytes by TNF- $\alpha$ -Converting Enzyme Contributes to Osteoclastogenesis in Periodontitis. *J Immunol*, 197(10). 3871-3883.

Kikuta J, Wada Y, Kowada T, Wang Z, Sun-Wada GH y cols. (2013). Dynamic visualization of RANKL and Th17-mediated osteoclast function. *J Clin Invest*, 123(2), 866-873.

Kimura A y Kishimoto T (2010). IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol*, 40(7). 1830-1835.

Kirst ME, Li EC, Alfant B, Chi YY, Walker C y cols. (2015). Dysbiosis and alterations in predicted functions of the subgingival microbiome in chronic periodontitis. *Appl Environ Microbiol*, 81(2), 783-793.

Kuo J, Nardelli DT, Warner TF, Callister SM y Schell RF (2011). Interleukin-35 enhances Lyme arthritis in *Borrelia*-vaccinated and -infected mice. *Clin Vaccine Immunol*, 18(7). 1125-1132.

Köseoğlu S, Sağlam M, Pekbağrıyanık T, Savran L y Sütçü R (2015). Level of Interleukin-35 in Gingival Crevicular Fluid, Saliva, and Plasma in Periodontal Disease and Health. *J Periodontol*, 86(8). 964-971.

Li Y, Li D, Wu S, Jiang S, Lin T y cols. (2016). Interleukin-35 upregulates OPG and inhibits RANKL in mice with collagen-induced arthritis and fibroblast-like synoviocytes. *Osteoporos Int*, 27(4). 1537-1546.

Liao W, Lin JX, Wang L, Li P y Leonard WJ (2011). Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages. *Nat Immunol*, 12(6), 551-559.

Lima RP, Belém FV, Abreu LG, Cunha FA, Cota LO y cols. (2019). Effect of Periodontal Therapy on Serum Levels of IL-6 in Type 2 Diabetics: A Systematic Review. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 39(1), e1-e10.

Lin SJ, Chen YL, Kuo MY, Li CL y Lu HK (2005). Measurement of gp130 cytokines oncostatin M and IL-6 in gingival crevicular fluid of patients with chronic periodontitis. *Cytokine*, 30(4), 160-167.

Ma X (2016). Regulation of Cytokine Gene Expression in Immunity and Diseases. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 213-215.

Machado V, Mesquita MF, Bernardo MA, Casal E, Proença L y cols. (2018). IL-6 and TNF- $\alpha$  salivary levels according to the periodontal status in Portuguese pregnant women. *PeerJ*, 6, e4710.

Mitani A, Niedbala W, Fujimura T, Mogi M, Miyamae S y cols. (2015). Increased expression of interleukin (IL)-35 and IL-17, but not IL-27, in gingival tissues with chronic periodontitis. *J Periodontol*, 86(2), 301-309.

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

Niedbala W, Wei XQ, Cai B, Hueber AJ, Leung BP y cols. (2007). IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *Eur J Immunol*, 37(11), 3021-3029.

Okada K, Fujimura T, Kikuchi T, Aino M, Kamiya Y y cols. (2017). Effect of interleukin (IL)-35 on IL-17 expression and production by human CD4. *PeerJ*, 5. e2999.

Okamoto K, Nakashima T, Shinohara M, Negishi-Koga T, Komatsu N y cols. (2017). Osteoimmunology: The Conceptual Framework Unifying the Immune and Skeletal Systems. *Physiol Rev*, 97(4). 1295-1349.

Ponzetti M y Rucci N (2019). Updates on Osteoimmunology: What's New on the Cross-Talk Between Bone and Immune System. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 10, 236.

Sakkas LI, Mavropoulos A, Perricone C y Bogdanos DP (2018). IL-35: a new immunomodulator in autoimmune rheumatic diseases. *Immunol Res*, 66(3), 305-312.

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

Tanida S, Yoshitomi H, Ishikawa M, Kasahara T, Murata K y cols. (2011). IL-27-producing CD14(+) cells infiltrate inflamed joints of rheumatoid arthritis and regulate inflammation and chemotactic migration. *Cytokine*, 55(2), 237-244.

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

Vernal R, Dutzan N, Hernández M, Chandía S, Puente J y cols. (2006). High expression levels of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand associated with human chronic periodontitis are mainly secreted by CD4+ T lymphocytes. *J Periodontol*, 77(10). 1772-1780.

Wolf J, Rose-John S y Garbers C (2014). Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system. *Cytokine*, 70(1), 11-20.

## 9. ANEXOS

### Anexo 1: Carta de aprobación del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.



Santiago, a 23 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<sup>tm1.1Mom1</sup>, 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<sup>tm1.1Mom1</sup>, 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 relacionado 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 ocioso 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

**Anexo 2:** Carta de aprobación del Comité de Bioseguridad de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile.



Comité Institucional de Bioseguridad  
Administración Conjunta Campus Norte  
FDO N° 119

Santiago, 06 de junio de 2018.

**C E R T I F I C A D O**

El Comité Institucional de Bioseguridad (CIB) ha analizado el Proyecto Fondecyt regular N°1181780 titulado "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". El Investigador Responsable de este proyecto es el Dr. Rolando Vernal Astudillo, Académico del Departamento de Odontología Conservadora, Facultad Odontología, Universidad de Chile.

Los ensayos propuestos involucran la inyección de las bacterias *Porphyromonas gingivalis* o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ambas de Grupo de Riesgo 2) en los tejidos gingivales palatinos de ratones machos Rag1<sup>-/-</sup>, y la realización de ensayos de detección de la infección y producción de citoquinas a través de qPCR, análisis histológico, test de Elisa y citometría de flujo. Además, se utilizarán agentes químicos de riesgo de tipo irritantes, inflamables y tóxicos.

Los ensayos se realizarán en la Plataforma Experimental, Laboratorio de Microbiología y en el Laboratorio de Biología Periodontal, todos ellos pertenecientes a la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

El CIB certifica que la Facultad de Odontología cuenta con las facilidades para el manejo y desecho del material biológico y químico a utilizar en el proyecto de acuerdo al Manual de Bioseguridad, Conicyt 2008. Además, el investigador se compromete a velar por el cumplimiento de las normas de bioseguridad junto al Manual de Procedimientos para el Manejo y Desechos de Residuos biológicos y RESPEL de la Facultad, durante el desarrollo del proyecto.

Se extiende el presente certificado a solicitud del Dr. Vernal para ser presentado al Concurso Fondecyt Regular 2018.

Carla Lozano M.

Dra. Carla Lozano M.  
Presidenta