



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

**“ROL DE LA CITOQUINA INTERLEUQUINA-35 EN LA RESORCIÓN ÓSEA
ALVEOLAR DURANTE LA PERIODONTITIS”**

Romina Daniela Barrera Recabal

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANA DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Rolando Vernal Astudillo

TUTOR EXPERTO

Dr. Emilio A. Cafferata Chea

**Adscrito a Proyecto FONDECYT 1181780
Santiago - Chile
2020**



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

**“ROL DE LA CITOQUINA INTERLEUQUINA-35 EN LA RESORCIÓN ÓSEA
ALVEOLAR DURANTE LA PERIODONTITIS”**

Romina Daniela Barrera Recabal

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANA DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Rolando Vernal Astudillo

TUTOR EXPERTO

Dr. Emilio A. Cafferata Chea

**Adscrito a Proyecto FONDECYT 1181780
Santiago - Chile
2020**

ÍNDICE

1. RESUMEN	6
2. MARCO TEÓRICO	7
2.1 Introducción	7
2.2 Etiología microbiana	7
2.3 Respuesta inmune durante la periodontitis	8
2.4 Interleuquina-35	9
2.5 Estrategias inmuno-terapéuticas de control de la periodontitis	10
2.6 Rol de IL-35 durante las enfermedades osteo-destructivas	11
Planteamiento del problema	11
3. HIPÓTESIS	12
4. OBJETIVO GENERAL	12
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
6. MATERIALES Y MÉTODOS	13
6.1 Diseño de estudio	13
6.2 Animales	13
6.3 Periodontitis experimental	14
6.4 Inoculación con IL-35	14
6.5 Resorción del hueso alveolar	14
6.6 Detección de osteoclastos	15
6.7 Análisis de niveles de RANKL y OPG	15
6.8 Detección de linfocitos Th17, Tregs e iTr35 en los linfonodos cervicales que drenan las lesiones periodontales	16
6.9 Análisis estadístico	16
7. RESULTADOS	18
7.1 La inoculación con IL-35 inhibe la resorción del hueso alveolar	18
7.2 La inoculación con IL-35 disminuye la detección de osteoclastos TRAP+ en lesiones periodontales	18
7.3 La inoculación con IL-35 disminuye los niveles de RANKL y aumenta los niveles de OPG en fluido crevicular gingival	19
7.4 La inoculación con IL-35 disminuye los niveles de linfocitos Th17 en lesiones periodontales y aumenta los niveles de linfocitos Tregs en lesiones periodontales	20
8. DISCUSIÓN	21
9. CONCLUSIONES	25
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
11. ANEXOS	32

1. RESUMEN

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta a los tejidos periodontales, en donde se desarrolla una respuesta inmune desregulada inducida por la disbiosis microbiana subgingival. La patogenia de la periodontitis involucra un desbalance entre la respuesta osteo-destructiva de los linfocitos T helper tipo 17 (Th17) y la respuesta inmuno-reguladora de los linfocitos T reguladores (Tregs). Este desbalance inmune Th17/Treg provoca un desbalance óseo, en particular un desbalance entre el factor inductor de la pérdida ósea denominado ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B (RANKL) y el factor protector óseo conocido como osteoprotegerina (OPG). Finalmente, este desbalance RANKL/OPG desencadena la activación de los osteoclastos periodontales, la resorción ósea alveolar y, eventualmente, la pérdida de los dientes.

La citoquina interleuquina-35 (IL-35) es un mediador antiinflamatorio producido por linfocitos Tregs. En enfermedades como la artritis reumatoide y el asma, IL-35 provoca la disminución del número de linfocitos Th17 productores de RANKL, lo que lleva a menores niveles de RANKL y la consecuente inhibición de la osteoclastogénesis. En este contexto, IL-35 favorece la diferenciación de un tipo particular de linfocito Treg con propiedades inmuno-supresoras, denominado linfocitos iTr35. Los linfocitos iTr35 se caracterizan por secretar en abundancia IL-35, lo que se traduce en la inducción de más linfocitos iTr35 y, por lo tanto, la generación de un circuito de retroalimentación positiva que potencia la respuesta inmuno-reguladora.

En este estudio se analizó el efecto de la administración de IL-35 en la resorción ósea alveolar durante la periodontitis. Se utilizó un modelo animal de periodontitis experimental inducido mediante ligadura. Se administró IL-35 de manera local intragingival o sistémica intraperitoneal. Se demostró que IL-35 inhibió la resorción ósea alveolar de una manera dependiente de la dosis, y ésta inhibición se asoció con la menor detección de osteoclastos periodontales y la modulación del desbalance periodontal Th17/Treg y RANKL/OPG.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Introducción

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica cuya causa se atribuye a la disbiosis de la microbiota subgingival. Durante esta disbiosis, los cambios entre las interacciones y proporciones bacterianas dentro de la microbiota subgingival provocan un desbalance en la respuesta inmune del hospedero, caracterizada por la formación de un denso infiltrado leucocitario enriquecido en factores pro-inflamatorios y osteo-destructivos. Estos mediadores inducen la destrucción progresiva de los tejidos de soporte de los dientes, lo que se manifiesta como pérdida de inserción clínica, resorción ósea alveolar y, en los casos más severos, pérdida dentaria (Caton y cols., 2018; Steffens y Marcantonio, 2018). La periodontitis puede clasificarse en etapas, dependiendo de su severidad, complejidad de tratamiento y extensión, y en grados de progresión, de acuerdo a la actual clasificación de enfermedades periodontales (Caton y cols., 2018; Steffens y Marcantonio, 2018).

2.2 Etiología microbiana

Para explicar la etiología de la periodontitis, en la actualidad se acepta el modelo de “sinergia polimicrobiana y disbiosis” (Hajishengallis y Lamont, 2012). Según este modelo, la enfermedad se inicia por una alteración entre las interacciones de los microorganismos comensales y las bacterias patógenas clave que colonizan el surco gingivodentario, lo que altera la homeostasis ecológica asociada a la salud periodontal (Hajishengallis y Lamont, 2012; Potempa y cols., 2017). En este contexto, las bacterias expresan distintos factores de virulencia, tales como lipopolisacáridos, leucotoxinas y péptidoglicanos, entre otros, los cuales entran en contacto con las células residentes en los tejidos periodontales y generan la producción de citoquinas en el sitio periodontal afectado (Botero y Bedoya, 2010; Sarduy y González, 2016). Así, la inmunidad del hospedero reacciona frente a estas bacterias y sus productos, generando una respuesta caracterizada por la acumulación de células pro-inflamatorias y mediadores moleculares en el periodonto. En términos generales, si bien estos microorganismos pueden causar un daño directo sobre los tejidos periodontales, es el desbalance y cronicidad de la

respuesta inmune del hospedero el que provoca mayoritariamente la destrucción del periodonto durante la periodontitis, afectando al hueso alveolar de inserción de los dientes (Cekici y cols., 2015; Hajishengallis y Korostoff, 2017; Hernández y cols., 2011).

2.3 Respuesta inmune durante la periodontitis

Los linfocitos T CD4⁺ cumplen un rol central en la respuesta inmune desplegada por el hospedero durante la periodontitis. Desde un punto de vista funcional, se describen distintos tipos de linfocitos T CD4⁺, los cuales se pueden diferenciar dependiendo principalmente del patrón de citoquinas predominante en los tejidos periodontales afectados (Wilensky y cols., 2014). Entre las distintas subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ se describen principalmente los linfocitos T colaboradores tipo 1 (Th1), tipo 2 (Th2) y tipo 17 (Th17), y los linfocitos T reguladores (Tregs) (Díaz-Zúñiga y cols., 2017; Hajishengallis y Korostoff, 2017; Rojas-Zuleta y Vásquez, 2016). En términos generales, el balance Th1/Th2 define el carácter inflamatorio de la periodontitis y el balance Th17/Treg define tanto el carácter inflamatorio como osteodestructivo de la enfermedad (Dutzan y cols., 2009; Hajishengallis y Korostoff, 2017; Herane y cols., 2013; Kimura y Kishimoto, 2010; Okui y cols., 2014). Por lo tanto, este estudio se centra en el análisis del desbalance Th17/Treg que determina la resorción del hueso alveolar, característica principal de la periodontitis.

Los linfocitos Th17 se caracterizan por expresar el factor de transcripción específico ROR γ t (RORC2 en humanos) y secretar interleuquina (IL)-17A, IL-21 e IL-23 (Dutzan y cols., 2016; Herane y cols., 2013), citoquinas que favorecen la inflamación e inducen la producción de metaloproteinasas de matriz que degradan la matriz orgánica de la inserción periodontal. Además, los linfocitos Th17 secretan el factor osteo-destructivo denominado ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B (RANKL), el que induce la diferenciación y activación de los osteoclastos, células responsables finales de la resorción ósea alveolar (Wang y cols., 2015). Por el contrario, los linfocitos Tregs expresan el factor de transcripción Foxp3 y secretan citoquinas inmunosupresoras, tales como el factor de crecimiento transformante (TGF)- β 1,

IL-10 e IL-35 (Wang y cols., 2015), las que inhiben la diferenciación y actividad de los linfocitos Th17 y, consecuentemente, la resorción del hueso alveolar durante la periodontitis (Wang y cols., 2015).

2.4 Interleuquina-35

La citoquina inmunosupresora IL-35 es un heterodímero compuesto por 2 cadenas: la proteína inducida por el virus Epstein-Barr-3 (Ebi-3) y la cadena p35 de IL-12 (IL-12p35) (Tao y cols., 2016). En humanos, IL-35 puede actuar sobre los linfocitos B reguladores (Bregs), linfocitos Tregs, células dendríticas inmaduras, endotelioscitocitos, queratinocitos y células musculares lisas (Sakkas y cols., 2018), siendo predominantemente secretada por linfocitos Tregs (Tao y cols., 2016). Se reportan múltiples funciones asociadas a IL-35, entre las cuales está suprimir la producción de IL-17A y factor de necrosis tumoral (TNF)- α , al inhibir la diferenciación, activación y proliferación de los linfocitos Th17 y Th1, respectivamente, e inhibir la osteoclastogénesis y la resorción ósea alveolar mediada por RANKL (Okada y cols., 2017; Sakkas y cols., 2018; Yago y cols., 2018). Así, IL-35 disminuye el ratio entre RANKL y su inhibidor conocido como osteoprotegerina (OPG), supresor fisiológico de la actividad de RANKL dado que al unirse a éste bloquea su unión a su receptor específico expresado en los osteoclastos (Kohli y Kohli, 2011; Yago y cols., 2018).

Los linfocitos Tregs requieren de IL-35 para alcanzar su actividad reguladora máxima; es decir, para suprimir a los linfocitos Th1 y Th17 (Jin y cols., 2015). Por otro lado, IL-35 puede inducir el desarrollo de una subpoblación particular de linfocitos Tregs llamada iTr35, que ejerce su actividad inmuno-reguladora mediante la secreción abundante de IL-35, la que a su vez incrementa la actividad Treg general (Vignali y Kuchroo, 2012). Al contrario, en determinadas condiciones patológicas, los linfocitos Tregs pueden perder su fenotipo supresor en un ambiente abundante en citoquinas pro-inflamatorias, tal como IL-1 β y TNF- α (Hajishengallis y Korostoff, 2017; Herane y cols., 2013); así, dejan de expresar el factor de transcripción Foxp3 y pueden, incluso, expresar IL-17A y RANKL como linfocitos exTregs, pudiendo cumplir funciones inflamatorias y osteo-destructivas (Hajishengallis y Korostoff, 2017; Herane y cols., 2013; Tsukasaki y cols., 2018).

Por lo tanto, existe una regulación recíproca entre los linfocitos Th17 y los Tregs, de tal manera que, durante el desbalance Th17/Treg, se altera el proceso de remodelación ósea y se desencadena la resorción ósea patológica característica de la periodontitis (Okui y cols., 2014). Sin embargo, el rol de IL-35 en este balance Th17/Treg no ha sido descrito durante la periodontitis.

2.5 Rol de IL-35 durante las enfermedades osteo-destructivas

El papel del desbalance Th17/Treg en la resorción ósea se ha descrito en otras enfermedades, como la artritis reumatoide (Naufel y cols., 2017). Esta enfermedad crónica autoinmune se presenta como una inflamación de la membrana sinovial y se caracteriza por la erosión y destrucción del cartílago articular y el hueso subcondral, responsable final de la degeneración articular y pérdida progresiva de la función (Kohli y Kohli, 2011). La artritis reumatoide se caracteriza por el incremento de la actividad de los linfocitos Th1 y Th17 articulares, los que sobreexpresan citoquinas pro-inflamatorias y RANKL, responsables de la inflamación y osteo-destrucción articular (Kohli y Kohli, 2011; Maddaloni y cols., 2018; Naufel y cols., 2017). IL-35 tiene una acción inmuno-supresora durante la artritis reumatoide; así, la inoculación de IL-35 en un modelo murino de artritis reumatoide redujo la inflamación sinovial y la erosión ósea subcondral (Guan y cols., 2016; Niedbala y cols., 2007). En efecto, IL-35 promueve la proliferación de linfocitos T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ articulares, junto con un incremento en los niveles de IL-10, disminuyendo el ambiente pro-inflamatorio y suprimiendo la diferenciación y función de los linfocitos Th17; de esta manera, regula el balance Th17/Treg y suprime la destrucción articular (Guan y cols., 2016; Niedbala y cols., 2007).

2.6 Estrategias inmuno-terapéuticas de control de la periodontitis

Entre las terapéuticas alternativas al tratamiento convencional de la periodontitis se describen las estrategias inmuno-moduladoras. Por ejemplo, en modelos murinos periodontitis experimental, se ha probado la inoculación sistémica de ácido retinoico, en particular del metabolito activo *all-trans* derivado de la vitamina A (ATRA) (Wang y cols., 2014). En este estudio se demostró la disminución del infiltrado inflamatorio en los tejidos periodontales y

la inhibición de la resorción del hueso alveolar (Wang y cols., 2014). De manera similar, la inoculación del agonista sintético de receptor α del ácido retinoico llamado Tamibarotene (Am80) inhibió la actividad de los linfocitos Th17 e indujo la actividad de los linfocitos Tregs, y de esta forma redujo la inflamación periodontal y la pérdida de hueso alveolar (Cafferata y cols., 2018; Jin y cols., 2014).

Estas estrategias, aunque promisorias, dependen de los cambios celulares producidos en presencia de los factores que los inducen; en otras palabras, una vez que el ácido retinoico o sus derivados dejen de ser administrados, la osteo-destrucción se puede reactivar en presencia del agente causal del desbalance Th17/Treg. En este sentido, el potencial efecto beneficioso de IL-35 puede ser más atractivo, dado que la inoculación de IL-35 podría mantener la regulación del balance Th17/Treg incluso luego de finalizada su administración, dado que induce la diferenciación y activación de los linfocitos iTr35, los que al producir IL-35 se pueden autoperpetuar y, de esta manera, se podría mantener la inhibición de la resorción ósea alveolar.

En este trabajo de investigación se analizó el efecto de la inoculación de IL-35 en la recuperación del balance Th17/Treg y RANKL/OPG durante la periodontitis, y la consecuente inhibición de la resorción ósea alveolar.

3. HIPÓTESIS

La citoquina IL-35 inhibe la resorción ósea alveolar producida durante la periodontitis mediante la regulación del balance RANKL/OPG y Th17/Treg periodontal.

4. OBJETIVO GENERAL

Analizar el rol de la citoquina IL-35 en la pérdida ósea alveolar durante la periodontitis experimental y la regulación del balance RANKL/OPG y Th17/Treg periodontal.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cuantificar la resorción ósea alveolar en las lesiones periodontales de ratones afectados de periodontitis experimental tratados o no con IL-35, mediante tomografía computarizada (micro-CT).
2. Cuantificar el número de osteoclastos activos en las lesiones periodontales de ratones afectados de periodontitis experimental tratados o no con IL-35, mediante histoquímica.
3. Cuantificar los niveles de RANKL y OPG en el fluido crevicular gingival obtenido de ratones afectados de periodontitis experimental tratados o no con IL-35, mediante ELISA.
4. Cuantificar el número de linfocitos Th17 y Tregs detectados en los linfonodos cervicales que drenan las lesiones periodontales de ratones afectados de periodontitis experimental tratados o no con IL-35, mediante citometría de flujo.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Diseño de estudio:

Experimental *in vivo*.

6.2 Animales

Se utilizaron 18 ratones C57BL/6 de 8 semanas de edad adquiridos y mantenidos en la Plataforma Experimental Bioterio de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile. El número de animales que se utilizó en este estudio se calculó de acuerdo con la ecuación $n = 2 (Z\alpha + Z\beta) 2xS^2 / \delta^2$, donde "n" es el número de animales para cada condición, "δ" la media esperada de la resorción de hueso alveolar considerada como estadísticamente significativa (micro-CT: 1,72%), "S" la desviación estándar (0,29%) (Monasterio y cols., 2019), "Zα" el tipo de error I (5%) y "Zβ" el tipo de error II (20%). Los 18 animales se asignaron aleatoriamente a las siguientes condiciones experimentales: 1) 3 animales para el grupo con periodontitis y administración intragingival de 1 ng/μL de IL-35, 2) 3 animales para el grupo con periodontitis y administración intragingival de 10 ng/μL de IL-35, 3) 3 animales para el grupo con periodontitis y administración intragingival de 100 ng/μL de IL-35, 4) 3 animales para el grupo con periodontitis y administración intraperitoneal de 2 μg/100 μL de IL-35, 5) 3 animales para el grupo con periodontitis sin tratamiento y 6) 3 animales para el grupo control sin periodontitis. El estudio se realizó siguiendo las pautas aprobadas por el Council of the American Psychological Society de 1980 y las recomendaciones de la American Veterinary Medical Association. El protocolo de experimentación animal (Protocolo #061601) fue aprobado en sus aspectos éticos por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile (Anexo 1). El estudio en su totalidad fue aprobado además por el Comité de Bioseguridad de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile (Anexo 2).

6.3 Periodontitis experimental

La inducción de periodontitis se realizó usando el método de ligadura (Abe y Hajishengallis, 2013). Los animales se anestesiaron con 100 μ L de ketamina 10% y xilacina 2% vía intraperitoneal, luego se colocaron sobre un soporte de fijación y apertura oral especialmente diseñado y, finalmente, se colocó una sutura de seda negra 5-0, usando pinzas castroviejo (Fine Science Tools, CA, EEUU) y una lupa estereoscópica, alrededor de los segundos molares maxilares, evitando el trauma mecánico de los tejidos adyacentes. Los animales fueron eutanasiados por sobredosis de anestesia al día 15 de colocada la ligadura, para la obtención de las muestras biológicas.

6.4 Inoculación con IL-35

La IL-35 (Prospec[®], Ness Ziona, Israel) se administró de manera local intragingival o sistémica intraperitoneal, usando jeringas Hamilton de 5 μ L con agujas 26s. La administración de IL-35 se realizó 1 vez al día, día por medio, durante 15 días. Se establecieron los siguientes grupos experimentales: 1) grupo con periodontitis y administración intragingival de 1 ng/ μ L de IL-35, 2) grupo con periodontitis y administración intragingival de 10 ng/ μ L de IL-35, 3) grupo con periodontitis y administración intragingival de 100 ng/ μ L de IL-35 y 4) grupo con periodontitis y administración intraperitoneal de 2 μ g/100 μ L de IL-35. La posología de la administración de IL-35 se basó en un estudio previo (Niedbala, y cols., 2007). Como controles, se usaron los siguientes grupos: 1) grupo con periodontitis sin tratamiento y 2) grupo sano, sin periodontitis.

6.5 Resorción del hueso alveolar

Se diseccionaron los maxilares y se limpiaron mecánicamente dejándolos libres de tejidos blandos. Inmediatamente, se analizaron por medio de micro-CT, determinando porcentaje de pérdida ósea alveolar en una región de interés (ROI) con los siguientes límites anatómicos: el techo de furca y el ápice de la raíz mesial del primer molar y distal del segundo molar, la superficie mesial de la raíz mesial del primer molar y la superficie distal de la raíz distal del segundo molar. Para ello, se escanearon los maxilares en los tres planos espaciales usando un equipo de micro-CT (SkyScan 1278[®], Bruker, Kontich, Bélgica) y se

obtuvieron imágenes digitalizadas en 3D usando un software de reconstrucción (Nrecon[®], Bruker, Kontich, Bélgica). Los cambios óseos en la ROI se analizaron utilizando un software específico (Dataviewer[®], Bruker, Kontich, Bélgica). El porcentaje de pérdida ósea se calculó utilizando la siguiente fórmula: pérdida ósea(%)=1-(volumen óseo remanente/ROI)×100, y se ajustó el grupo control sano.

6.6 Detección de osteoclastos

El número de osteoclastos activos observados en las lesiones periodontales se cuantificó utilizando el marcador fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP), el que es específico de osteoclastos. Para ello, se obtuvieron biopsias maxilares totales, las que se fijaron inmediatamente en formalina al 10% pH 7,4 durante 24 horas a 4°C y luego se desmineralizaron en EDTA al 14% por 4 semanas. Luego de procesarlas para ser embebidas en parafina usando protocolos histológicos estándar, secciones de 5 µm de grosor se tiñeron usando un kit TRAP (Sigma Aldrich, St.Louis, MO, EEUU) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las microfotografías fueron capturadas utilizando un microscopio de luz (AxioStarPlus[®]; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) de manera ciega a cada condición experimental.

6.7 Análisis de los niveles de RANKL y OPG

De cada animal, se obtuvo una muestra de fluido crevicular gingival (FCG) siguiendo un protocolo previamente descrito (Matsuda y cols., 2016). Para esto, previo a la eutanasia, los animales se anestesiaron y se retiraron las ligaduras utilizadas para inducir la periodontitis. Inmediatamente después, se colocaron en su lugar nuevas ligaduras, sin cortar los cabos. Luego de 10 minutos, las nuevas ligaduras embebidas en FCG fueron retiradas e inmediatamente sumergidas en 120 µL de buffer de elusión a 4°C. Luego, se procedió al protocolo de la elusión centrífuga estándar (Matsuda y cols., 2016). Los niveles de RANKL y OPG se cuantificaron mediante ELISA utilizando kits específicos (Quantikine[®]; R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, EEUU). Los cálculos se realizaron utilizando una ecuación logística de 4 parámetros.

6.8 Detección de linfocitos Th17, Tregs e iTr35 en los linfonodos cervicales que drenan las lesiones periodontales

Los linfonodos cervicales que drenan las lesiones periodontales se obtuvieron quirúrgicamente y a partir de ellos se aislaron las células totales usando filtros de 70 µm en amortiguador fosfato salino (PBS). Las células obtenidas se contaron en un contador de células automático (LUNA II[®]; Logos Biosystems, Inc., Annandale, VA, EEUU) y luego se incubaron con un kit de viabilidad celular (Zombie Aqua Fixable Viability Kit[®]; BioLegend, San Diego, CA, EEUU) por 30 minutos, para caracterizar sólo células vivas. Luego, las células se marcaron extracelularmente con los siguientes anticuerpos monoclonales (BioLegend, San Diego, CA, EEUU): anti-CD4 (fluorocromo BV605), anti-CD8 (fluorocromo BV711) y anti-CD45 (fluorocromo APC-Cy7) a 4°C por 30 minutos. Posteriormente, las células se trataron con 50 ng/ml de PMA, 1 µg/ml de ionomicina y 3 µg/mL de brefeldina A (Invitrogen, Grand Island, NY, EEUU), se fijaron por 45 minutos a 4° C y permeabilizaron para ser marcadas intracelularmente para los factores de transcripción con los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-Foxp3 (fluorocromo Alexa Fluor 488) y anti-RORyt (fluorocromo PE CF594), y para las citoquinas con los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-IL-10 (fluorocromo BV 421) y anti-IL-17A (fluorocromo APC-Cy5.5). El análisis se realizó en un citómetro de flujo (LSR Fortessa X-20[®]; Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Franklin Lakes, NJ, EEUU), usando el siguiente “gating strategy”: FSC/SSC, SSC/SSC, live/dead, CD45, CD4/CD8, donde las células vivas CD45⁺CD4⁺RORyt⁺IL-17A⁺ fueron consideradas linfocitos Th17 y las células CD45⁺CD4⁺Foxp3⁺IL-10⁺ fueron consideradas linfocitos Tregs. Las gráficas fueron obtenidas utilizando el software WinMDi v.2.9 (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EEUU).

6.9 Análisis estadístico

Los datos se analizaron estadísticamente utilizando el software SPSS 22.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EEUU). Se determinó la normalidad de la distribución de datos utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Previo análisis de la igualdad de varianzas con la prueba de Levene, 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.

7. RESULTADOS

7.1 La inoculación con IL-35 inhibe la resorción del hueso alveolar

En los animales afectados de periodontitis experimental, la inoculación de IL-35 intragingival o intraperitoneal inhibió la resorción ósea alveolar (Figura 1A). De manera dependiente de la dosis, la administración intragingival de IL-35 causó significativamente menores niveles de pérdida ósea alveolar, en comparación a los animales que no recibieron tratamiento con IL-35 (Figura 1B).

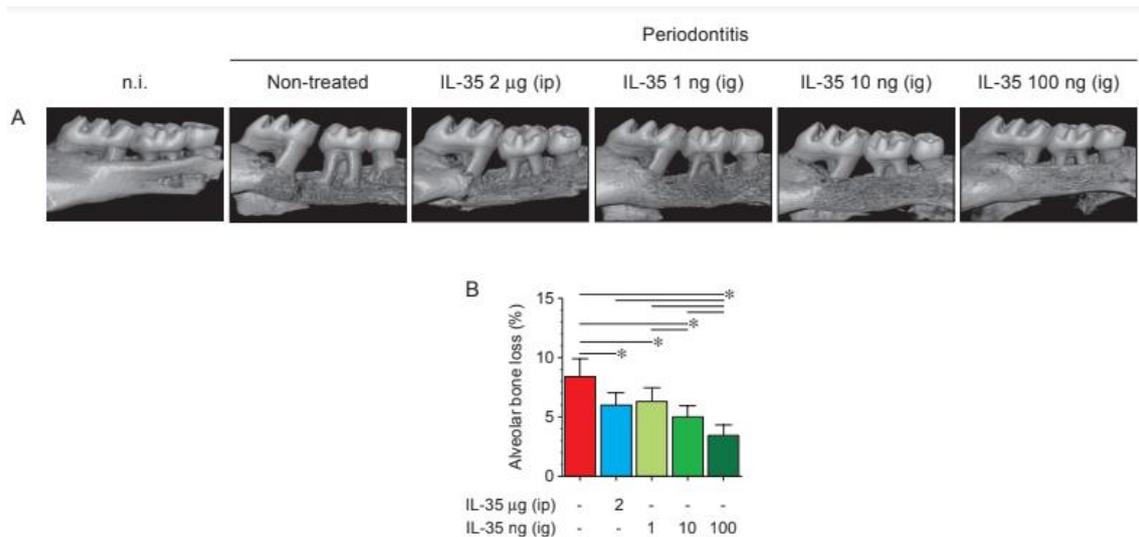


Figura 1. IL-35 inhibe la resorción ósea alveolar. (A) Imágenes micro-CT representativas de las hemimaxilas de los animales afectados de periodontitis experimental, tratados con distintas concentraciones de IL-35 vía i.g. (1, 10, 100 ng/μL) o vía i.p (2 μg/100 μL). Animales no inducidos (n.i.) fueron usados como control. (B) Cuantificación del volumen de resorción ósea alveolar expresado como % en cada condición experimental. *P < 0,05.

7.2 La inoculación con IL-35 disminuye la detección de osteoclastos en las lesiones periodontales

Los osteoclastos TRAP⁺ fueron identificados en todas las condiciones experimentales (Figura 2A). La administración de IL-35 causó significativamente menor detección de osteoclastos TRAP⁺ en comparación a los animales sin tratamiento (Figura 2B).

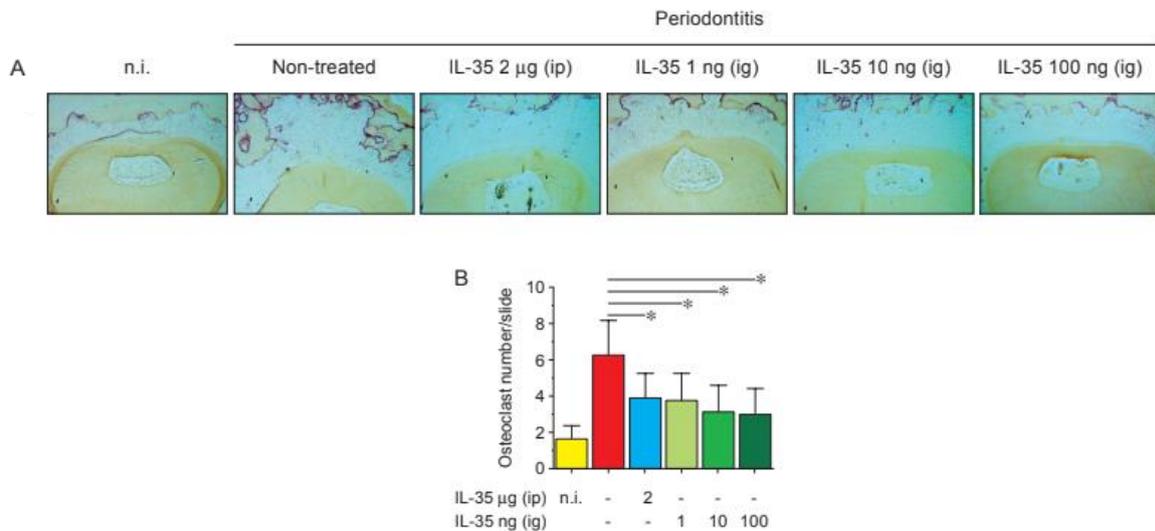


Figura 2. IL-35 causa menor detección de osteoclastos. (A) Imágenes representativas de la tinción con TRAP, para identificar osteoclastos en los animales afectados de periodontitis experimental tratados con distintas concentraciones de IL-35 vía i.g. (1, 10, 100 ng/µL) o vía i.p (2 µg/100 µL). Animales no inducidos (n.i.) fueron usados como control. (B) Cuantificación del número de osteoclastos en cada condición experimental. *P < 0,05.

7.3 La inoculación con IL-35 disminuye los niveles de RANKL y aumenta los niveles de OPG en las lesiones periodontales

La administración de IL-35 llevó a una disminución significativa de los niveles de RANKL y un aumento significativo de los niveles de OPG en las lesiones periodontales de los animales afectados de periodontitis (Figura 3). Esto llevó a una disminución significativa del ratio RANKL/OPG.

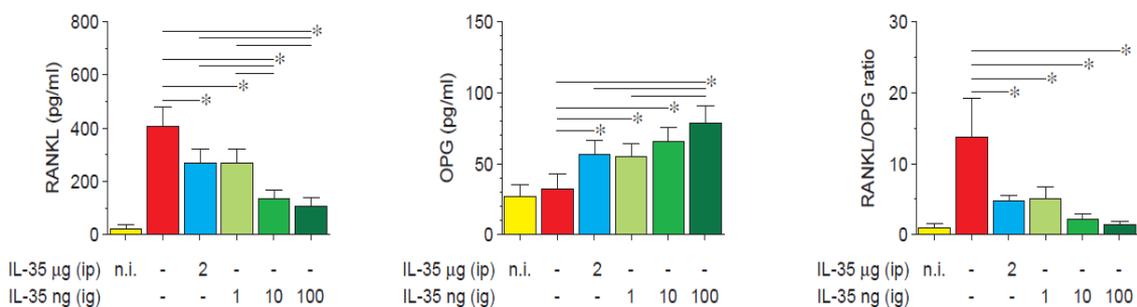


Figura 3. IL-35 disminuye el ratio RANKL/OPG en las lesiones periodontales. Cuantificación de niveles de RANKL y OPG en los animales afectados de periodontitis experimental tratados con distintas concentraciones de IL-35 vía i.g. (1, 10, 100 ng/µL) o vía i.p (2 µg/100 µL). Animales no inducidos (n.i.) fueron usados como control. *P < 0,05.

7.4 La inoculación con IL-35 disminuye el número de linfocitos Th17 y aumenta el número de linfocitos Tregs en lesiones periodontales

Se observó una menor cantidad de linfocitos Th17 en las lesiones periodontales de animales afectados de periodontitis experimental que recibieron IL-35 en comparación con las lesiones periodontales de animales que no recibieron IL-35. En contraparte, se detectó una mayor cantidad de linfocitos Tregs en las lesiones periodontales de animales afectados de periodontitis experimental que recibieron IL-35 en comparación con las lesiones periodontales de animales que no recibieron IL-35.

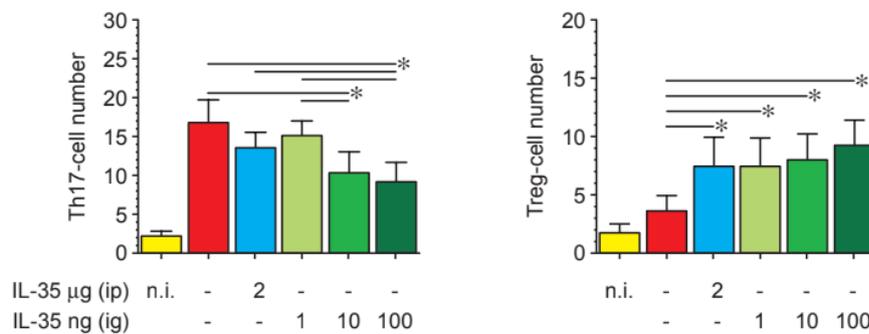


Figura 4. IL-35 causa una disminución en el número de linfocitos Th17 y un aumento del número de linfocitos Tregs. Número absoluto de linfocitos Th17 y Tregs detectado en los linfonodos regionales que drenan las lesiones periodontales de los animales afectados de periodontitis experimental tratados con distintas concentraciones de IL-35 vía i.g. (1, 10, 100 ng/µL) o vía i.p. (2 µg/100 µL). Animales no inducidos (n.i.) fueron usados como control. *P < 0,05.

8. DISCUSIÓN

En el presente estudio, la inoculación de IL-35 inhibió la resorción ósea alveolar durante la periodontitis experimental y esta inhibición se asoció con la menor detección de osteoclastos, la disminución de los niveles de RANKL y el aumento de los niveles de OPG. Además, IL-35 indujo la disminución del número de linfocitos Th17 y el aumento del número de linfocitos Tregs en los linfonodos cervicales que drenan las lesiones periodontales, lo cual demuestra el rol osteoprotector e inmuno-regulador de IL-35 durante la periodontitis experimental.

La IL-35 es una citoquina inmuno-reguladora, que se ha detectado en FCG, saliva, suero y tejidos periodontales en pacientes afectados por periodontitis (Jin y cols., 2017; Jing y cols., 2019; Mitani y cols., 2015). Estudios recientes, en los que se analizó la concentración de IL-35 en el FCG, revelaron que la IL-35 y los parámetros clínicos periodontales, como profundidad de surco y pérdida de inserción clínica, se correlacionan negativamente (Jin y cols., 2017; Mitani y cols., 2015). Por lo cual, los datos obtenidos en nuestra investigación que demuestran que IL-35 inhibe la periodontitis están en línea con estos resultados y, por lo tanto, son un blanco terapéutico viable. Si bien en periodontitis no existen estudios previos que analicen el potencial terapéutico de IL-35, nuestros resultados están en concordancia con estudios previos que usan IL-35 para inhibir la artritis reumatoide, la que al igual que la periodontitis es una enfermedad caracterizada por el desbalance Th17/Treg asociado a la resorción ósea patológica. En el estudio de Niedbala, *et al.*, usando un modelo de artritis inducida por colágeno, la inoculación intraperitoneal de IL-35 promovió la proliferación de linfocitos Tregs y la supresión de la diferenciación de linfocitos Th17, atenuando de manera significativa la inflamación sinovial y la erosión ósea (Guan y cols., 2016; Jing y cols., 2019; Li y cols., 2016). Estos resultados reafirman el rol inmuno-regulador de IL-35 durante la artritis reumatoide descritos previamente (Niedbala y cols., 2007). De la misma manera, en un modelo animal de asma, la IL-35 suprimió la actividad de los linfocitos Th17 y la producción de IL-17A, y en consecuencia, redujo los niveles de inflamación de las vías respiratorias y alivió los signos clínicos de la

enfermedad (Gao y cols., 2017; Li y cols., 2014; Whitehead y cols., 2012; Zhang y cols., 2015). Estos resultados destacan la capacidad inmunoreguladora de IL-35, pudiendo inhibir eficientemente la progresión de las enfermedades inflamatorias (Guan y cols., 2016; Niedbala y cols., 2007), sugiriendo así su potencial uso para tratar otras enfermedades caracterizadas por un desbalance Th17/Treg, tal como la periodontitis.

El diseño experimental de nuestro estudio se basó en parte en los resultados reportados por Li *et al.*, donde la inyección intraperitoneal de 2 µg de IL-35 en un modelo murino de artritis reumatoide inhibió la progresión de la enfermedad (Li y cols., 2016), por lo cual la administración sistémica de IL-35 se utilizó como control positivo para nuestros experimentos con periodontitis. En este contexto, se obtuvieron resultados similares, con menores niveles de linfocitos Th17 y a su vez mayores niveles de linfocitos Tregs en los animales afectados de periodontitis experimental. Cabe destacar que en nuestro estudio se usaron menores concentraciones de IL-35 durante la administración intragingival (1, 10, 100 ng/µL) en comparación a los 2 µg intraperitoneales. No obstante, la inoculación local en comparación a la sistémica permitió incluso más altos niveles de inhibición de la pérdida ósea periodontal, de manera que esta menor concentración local es efectiva y permite evitar mayores concentraciones de IL-35 que eventualmente podrían tener efectos indeseables locales.

Otra posible explicación para el incremento de las poblaciones de linfocitos Tregs y la disminución de los linfocitos Th17 inducida por la inoculación de IL-35 es que la participación de otras células inmunoreguladoras que responden a IL-35, como el caso de los linfocitos B reguladores (Bregs). IL-35 indujo la formación de Bregs productores de IL-10 *in vivo* (Egwuagu y cols., 2015; Wang y cols., 2014), mientras que *ex vivo* IL-35 suprimió la proliferación de linfocitos Th17 y Th1, e indujo la diferenciación de linfocitos Breg productores de IL-35. Por lo tanto, se podría inducir un “loop” positivo donde los niveles de IL-35 aumentan y potencian sus funciones inmunoreguladoras (Egwuagu y cols., 2015; Huang y cols., 2017; Wang y cols., 2018; Wang y cols., 2014). Así, los linfocitos Bregs productores de IL-35

pueden promover la actividad de linfocitos Tregs e inhibir a los linfocitos Th17 (Huang y cols., 2017) pudiendo favorecer la restauración del desbalance Th17/Treg.

Por otro lado, Li *et al.* recientemente demostró que IL-35 indujo la diferenciación de los osteoblastos por medio de la activación de la vía de señalización canónica Wnt/ β -catenina, promoviendo su actividad osteoregeneradora. Además, indujo el aumento de los niveles de OPG y la disminución de los niveles de RANKL de manera significativa, regulando así la osteoclastogénesis (Li y cols., 2019) lo cual es consistente con los resultados obtenidos en nuestra investigación, donde la inoculación con IL-35 disminuyó los niveles de RANKL y aumentó los de OPG en las lesiones periodontales, recuperando el balance RANKL/OPG.

La IL-35 es una proteína heterodimérica formada por las subunidades EBI3 y la cadena p35 de IL-12. Ésta última se expresa en la mayoría de los tejidos, mientras que EBI3 se expresa principalmente en células hematopoyéticas de los tejidos linfoides humanos, tal como la amígdala, bazo y placenta en embarazos a término (Li y cols., 2014; Niedbala y cols., 2007). Liu, *et al.* demostraron una mayor producción de IL-17A en órganos linfoides periféricos de ratones deficientes de EBI3 (Liu y cols., 2012); de la misma manera, células de bazo de ratones deficientes en la subunidad EBI3 expresaron más IL-17A y ROR γ t comparadas con células extraídas de ratones silvestres (Gao y cols., 2017; Yago y cols., 2018). Por estos motivos, se decidió analizar la subunidad EBI3 en vez de la subunidad IL-12p35 en nuestro estudio para cuantificar los niveles de expresión asociados a IL-35 (Gao y cols., 2017; Yago y cols., 2018).

Así como IL-35 es producido por distintos tejidos, también es producido por diversas células, tal como monocitos, linfocitos T y B, y células tumorales (Gao y cols., 2017; Li y cols., 2016; Niedbala y cols., 2007; Posadas-Sanchez y cols., 2017). A su vez, las subunidades de IL-35 pueden ser producidas por macrófagos y células dendríticas (Gao y cols., 2017; Guttek y Reinhold, 2013). Si bien varias células que pueden producir IL-35, su secreción es mínima, y son

los linfocitos Tregs, en particular los iTr35, los principales productores de IL-35 en condiciones patológicas (Collison y cols., 2010; Collison y cols., 2007). En este sentido, los linfocitos Tregs requieren de IL-35 para alcanzar su actividad reguladora máxima y así suprimir la actividad de linfocitos Th1 y Th17 (Jin y cols., 2017; Sawant y cols., 2015). Además, IL-35 induce la expansión de linfocitos Tregs y la diferenciación de linfocitos iTr35, los que tienen una potente actividad reguladora *in vivo*, independiente de IL-10 o TGF- β 1 y la expresión de Foxp3 (Collison y cols., 2010; Egwuagu y cols., 2015; Gao y cols., 2017). La IL-35 secretada por los linfocitos iTr35 induce la generación de nuevos linfocitos iTr35 de manera independiente de la administración de IL-35, por lo tanto, la IL-35 y los iTr35 generan un circuito de retroalimentación positivo potenciando su función inmuno-reguladora en un ambiente inflamatorio, autoperpetuándose (Gao y cols., 2017). Se ha demostrado que los linfocitos iTr35 son tan eficaces como otras subpoblaciones de linfocitos Tregs para restaurar la homeostasis inmune e inhibir el desarrollo de artritis reumatoide (Huang y cols., 2017). Estos estudios que están en concordancia a lo que obtuvimos en nuestro modelo experimental de periodontitis, en el cual IL-35 es capaz de regular la periodontitis y sus secuelas.

Actualmente, la terapéutica periodontal convencional se basa en la remoción mecánica de la biopelícula bacteriana supra y subgingival, que si bien es efectiva para tratar la mayoría de los casos de periodontitis, hay algunos en que esta terapéutica no lo es (Bazzano y cols., 2012; Benza-Bedoya y Pareja-Vásquez, 2017; Yang y cols., 2018). Dado que IL-35 inhibe la resorción ósea y regula el balance RANKL/OPG y Th17/Treg, su administración podría proyectarse en un escenario clínico como terapia coadyuvante al tratamiento periodontal convencional en estos casos. En este escenario, IL-35 podría ser inoculada de manera conjugada a nanopartículas que permitan su liberación lenta y controlada a dosis efectivas. Pese a lo prometedor de esta propuesta, aún falta definir el mecanismo molecular a través del cual IL-35 regula la respuesta inmune periodontal; por lo que, se requieren más estudios que aseguren una concentración efectiva e inocua en los tejidos periodontales previos a su uso en humanos (Hajishengallis y Korostoff, 2017; Herane y cols., 2013).

10. CONCLUSIONES

1. La inoculación con IL-35 inhibe la resorción ósea alveolar producida durante la periodontitis experimental.
2. La inoculación con IL-35 causa una disminución en el número de osteoclastos TRAP⁺ detectados en las lesiones periodontales durante la periodontitis experimental.
3. La inoculación con IL-35 causa menores niveles de RANKL y un aumento en los niveles de OPG, lo que lleva a una disminución de la razón RANKL/OPG en las lesiones periodontales de los animales afectados de periodontitis experimental.
4. La inoculación con IL-35 causa menor detección de linfocitos Th17 productores de IL-17A y un aumento de la detección de linfocitos Treg productores de IL-10 en las lesiones periodontales de los animales afectados de periodontitis experimental.
5. Durante la periodontitis experimental, el tratamiento con IL-35 inhibe la resorción ósea alveolar mediante la regulación del balance RANKL/OPG y Th17/Treg.

11. 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.
- Bazzano, G., Parodi, R., Tabares, S., y Sembaj, A. (2012). Evaluación de la terapia mecánica periodontal en bolsas profundas: Respuesta clínica y bacteriológica. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*, 5(3), 122-126.
- Benza-Bedoya, R., y Pareja-Vásquez, M. (2017). Diagnóstico y tratamiento de la periodontitis agresiva. *Odontoestomatología*, 19(30), 29-39.
- Botero, J. E., y Bedoya, E. (2010). Determinantes del diagnóstico periodontal. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*, 3, 94-99.
- Cafferata, E. A., Jerez, A., Vernal, R., Monasterio, G., Pandis, N., y Faggion, C. M., Jr. (2018). The therapeutic potential of regulatory T lymphocytes in periodontitis: A systematic review. *J Periodontol Res*, 54(3), 207-217.
- Caton, J. G., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I. L. C., Jepsen, S., Kornman, K. S., y cols. (2018). A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Periodontol*, 89 Suppl 1, S1-S8.
- Cekici, A., Kantarci, A., Hasturk, H., y Van Dyke, T. E. (2015). Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000*, 64(1), 57-80.
- Collison, L. W., Chaturvedi, V., Henderson, A. L., Giacomini, P. R., Guy, C., Bankoti, J., y cols. (2010). IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat Immunol*, 11(12), 1093-1101.
- Collison, L. W., Workman, C. J., Kuo, T. T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K. M., y cols. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, 450(7169), 566-569.
- Díaz-Zúñiga, J., Melgar-Rodríguez, S., Rojas, L., Alvarez, C., Monasterio, G., Carvajal, P., y cols. (2017). Increased levels of the T-helper 22-associated cytokine (interleukin-22) and transcription factor (aryl hydrocarbon receptor) in patients with periodontitis are associated with

- osteoclast resorptive activity and severity of the disease. *J Periodontal Res*, 52(5), 893-902.
- Dutzan, N., Konkel, J. E., Greenwell-Wild, T., y Moutsopoulos, N. M. (2016). Characterization of the human immune cell network at the gingival barrier. *Mucosal Immunol*, 9(5), 1163-1172.
- Dutzan, N., Vernal, R., Hernandez, M., Dezerega, A., Rivera, O., Silva, N., y cols. (2009). Levels of interferon-gamma and transcription factor T-bet in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*, 80(2), 290-296.
- Egwuagu, C. E., Yu, C. R., Sun, L., y Wang, R. (2015). Interleukin 35: Critical regulator of immunity and lymphocyte-mediated diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*, 26(5), 587-593.
- Gao, P., Su, Z., Lv, X., y Zhang, J. (2017). Interleukin-35 in asthma and its potential as an effective therapeutic agent. *Mediators Inflamm*, 2017, 5931865.
- Guan, S. Y., Leng, R. X., Khan, M. I., Qureshi, H., Li, X. P., Ye, D. Q., y cols. (2016). Interleukin-35: A potential therapeutic agent for autoimmune diseases. *Inflammation*, 40(1), 303-310.
- Guttek, K., y Reinhold, D. (2013). Stimulated human peripheral T cells produce high amounts of IL-35 protein in a proliferation-dependent manner. *Cytokine*, 64(1), 46-50.
- Hajishengallis, G., y Korostoff, J. M. (2017). Revisiting the Page & Schroeder model: the good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later. *Periodontol 2000*, 75(1), 116-151.
- Hajishengallis, G., y Lamont, R. J. (2012). Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol*, 27(6), 409-419.
- Herane, A., Chaparro, A., Quintero, A., Sanz, A., Hernández, M., Gaedechens, D., y cols. (2013). Expresión de citoquinas Th17 y su correlación con periodontopatógenos y el área periodontal inflamada en pacientes con periodontitis crónica. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*, 6(3), 109-113.

- Hernández, M., Dutzan, N., García-Sesnich, J., Abusleme, L., Dezerega, A., Silva, N., y cols. (2011). Host-pathogen interactions in progressive chronic periodontitis. *J Dent Res*, 90(10), 1164-1170.
- Huang, A., Cheng, L., He, M., Nie, J., Wang, J., y Jiang, K. (2017). Interleukin-35 on B cell and T cell induction and regulation. *J Inflamm (Lond)*, 14, 16.
- 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.
- Jin, Y., Wang, L., Liu, D., y Lin, X. (2014). Tamibarotene modulates the local immune response in experimental periodontitis. *Int Immunopharmacol*, 23(2), 537-545.
- Jing, L., Kim, S., Sun, L., Wang, L., Mildner, E. y Divaris, K. (2019). IL-37- and IL-35/IL-37-Producing Plasma Cells in Chronic Periodontitis. *J Dent Res*, 98(7), 813-821.
- Kimura, A., y Kishimoto, T. (2010). IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol*, 40(7), 1830-1835.
- Kohli, S. S., y Kohli, V. S. (2011). Role of RANKL-RANK/osteoprotegerin molecular complex in bone remodeling and its immunopathologic implications. *Indian J Endocrinol Metab*, 15(3), 175-181.
- Li, Y., Li, D., Wu, S., Jiang, S., Lin, T. y Xia, L. (2016). Interleukin-35 upregulates OPG and inhibits RANKL in mice with collagen-induced arthritis and fibroblast-like synoviocytes. *Osteoporos Int*, 27(4), 1537-1546.
- Li, Y., Wang, Y., Liu, Y., Zuo, X., y Lu, X. (2014). The possible role of the novel cytokines il-35 and il-37 in inflammatory bowel disease. *Mediators Inflamm*, 2014, 136329.
- Li, Y., Yuan, L., Jiang, S., Liu, S., Xia, L. y Shen, H. (2019). Interleukin-35 stimulates tumor necrosis factor-alpha activated osteoblasts differentiation through Wnt/beta-catenin signaling pathway in rheumatoid arthritis. *Int Immunopharmacol*, 75, 105810.
- Liu, J. Q., Liu, Z., Zhang, X., Shi, Y., Talebian, F. y Carl, J. W., Jr. (2012). Increased Th17 and regulatory T cell responses in EBV-induced gene 3-deficient mice lead to marginally enhanced development of autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 188(7), 3099-3106.

- Maddaloni, M., Kochetkova, I., Hoffman, C., y Pascual, D. W. (2018). Delivery of IL-35 by *Lactococcus lactis* ameliorates collagen-induced arthritis in mice. *Front Immunol*, 9, 2691.
- Matsuda, S., Movila, A., Suzuki, M., Kajiya, M, Wisitrasameewong, W., Kayal, R., y cols. (2016). A novel method of sampling gingival crevicular fluid from a mouse model of periodontitis. *J Immunol Methods*, 438, 21-25.
- Mitani, A., Niedbala, W., Fujimura, T., Mogi, M., Miyamae, S., Higuchi, N., 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., Fernández, B., Castillo, F., Rojas, C., Cafferata, E. A., Rojas, L., y cols. (2019). 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*, 90 (5): 522-534.
- Naufel, A. O., Aguiar, M. C. F., Madeira, F. M., y Abreu, L. G. (2017). Treg and Th17 cells in inflammatory periapical disease: A systematic review. *Brazilian Oral Research*, 31, e103, 1807-3107.
- Niedbala, W., Wei, X. Q., Cai, B., Hueber, A. J., Leung, B. P., McInnes, I. B., 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., Izawa, A., y cols. (2017). Effect of interleukin (IL)-35 on IL-17 expression and production by human CD4(+) T cells. *PeerJ*, 5, e2999.
- Okui, T., Aoki-Nonaka, Y., Nakajima, T., y Yamazaki, K. (2014). The role of distinct T cell subsets in periodontitis—studies from humans and rodent models. *Current Oral Health Reports*, 1(2), 114–123.
- Posadas-Sanchez, R., Perez-Hernandez, N., Angeles-Martinez, J., Lopez-Bautista, F., Villarreal-Molina, T., Rodriguez-Perez, J. M., y cols. (2017). Interleukin 35 polymorphisms are associated with decreased risk of premature coronary artery disease, metabolic parameters, and IL-35 levels: The genetics of atherosclerotic disease (GEA) study. *Mediators Inflamm*, 2017, 6012795.

- Potempa, J., Mydel, P., y Koziel, J. (2017). The case for periodontitis in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*, 13(10), 606-620.
- Rojas-Zuleta, W. G., y Vásquez, G. (2016). Th9 lymphocytes: A recent history from IL-9 to its potential role in rheumatic diseases. *Autoimmun Rev*, 15(7), 649-655.
- Sakkas, L. I., Mavropoulos, A., Perricone, C., y Bogdanos, D. P. (2018). IL-35: A new immunomodulator in autoimmune rheumatic diseases. *Immunol Res*, 66(3), 305-312.
- Sarduy, L., y González, M. E. (2016). La biopelícula: Una nueva concepción de la placa dentobacteriana. *Medicentro Electrónica*, 20, 167-175.
- Sawant, D. V., Hamilton, K., y Vignali, D. A. (2015). Interleukin-35: Expanding its job profile. *J Interferon Cytokine Res*, 35(7), 499-512.
- Steffens, J. P., y Marcantonio, R. A. C. (2018). Classificação das doenças e condições periodontais e peri-implantares 2018: Guia prático e pontos-Chave. *Revista de Odontologia da UNESP*, 47, 189-197.
- Tao, L., Zhu, J., Chen, Y., Wang, Q., Pan, Y., Yu, Q., y cols. (2016). IL-35 improves Treg-mediated immune suppression in atherosclerotic mice. *Exp Ther Med*, 12(4), 2469-2476.
- Tsukasaki, M., Komatsu, N., Nagashima, K., Nitta, T., Pluemsakunthai, W., Shukunami, C., y cols. (2018). Host defense against oral microbiota by bone-damaging T cells. *Nat Commun*, 9(1), 701.
- Vignali, D. A., y Kuchroo, V. K. (2012). IL-12 family cytokines: Immunological playmakers. *Nat Immunol*, 13(8), 722-728.
- Wang, K., Liu, J., y Li, J. (2018). IL-35-producing B cells in gastric cancer patients. *Medicine (Baltimore)*, 97(19), e0710.
- Wang, L., Guan, N., Jin, Y., Lin, X., y Gao, H. (2015). Subcutaneous vaccination with *Porphyromonas gingivalis* ameliorates periodontitis by modulating Th17/Treg imbalance in a murine model. *Int Immunopharmacol*, 25(1), 65-73.
- Wang, L., Wang, J., Jin, Y., Gao, H., y Lin, X. (2014). Oral administration of all-trans retinoic acid suppresses experimental periodontitis by modulating the Th17/Treg imbalance. *J Periodontol*, 85(5), 740-750.

- Wang, R. X., Yu, C. R., Dambuza, I. M., Mahdi, R. M., Dolinska, M. B., Sergeev, Y. V., y cols. (2014). Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. *Nat Med*, 20(6), 633-641.
- Whitehead, G. S., Wilson, R. H., Nakano, K., Burch, L. H., Nakano, H., y Cook, D. N. (2012). IL-35 production by inducible costimulator (ICOS)-positive regulatory T cells reverses established IL-17-dependent allergic airways disease. *J Allergy Clin Immunol*, 129(1), 207-215 e201-205.
- Wilensky, A., Segev, H., Mizraji, G., Shaul, Y., Capucha, T., Shacham, M., y cols. (2014). Dendritic cells and their role in periodontal disease. *Oral Dis*, 20(2), 119-126.
- Yago, T., Nanke, Y., Kawamoto, M., Kobashigawa, T., Yamanaka, H., y Kotake, S. (2018). IL-35 inhibits human osteoclastogenesis from monocytes induced by receptor-activator of NF-kappaB ligand. *Cent Eur J Immunol*, 43(2), 148-154.
- Yang, N. Y., Wang, C. Y., Chyuan, I. T., Wu, K. J., Tu, Y. K., Chang, C. W., y cols. (2018). Significant association of rheumatoid arthritis-related inflammatory markers with non-surgical periodontal therapy. *J Formos Med Assoc*, 117(11), 1003-1010.
- Yucel-Lindberg, T., y Bage, T. (2013). Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert Rev Mol Med*, 15, e7.
- Zhang, Y. L., Zhou, X. Y., Guo, X. Y., y Tu, J. W. (2015). Association between serum interleukin-35 levels and severity of acute pancreatitis. *Int J Clin Exp Med*, 8(5), 7430-7434.

12. 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 objeciones 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^{tm1.1MomyJ}, 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^{tm1.1MomyJ}, 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

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⁺, 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
A circular official stamp of the Universidad de Chile, Comité Institucional de Bioseguridad, Administración Conjunta Campus Norte. The stamp contains the text "UNIVERSIDAD DE CHILE", "COMITE INSTITUCIONAL BIOSEGURIDAD", and "ADMINISTRACION CONJUNTA CAMPUS NORTE".

Dra. Carla Lozano M.
Presidenta