

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



**UNIVERSIDAD
DE CHILE**

**EFFECTO DE INTERLEUQUINA-35 EN EL BALANCE
TH17/TREG Y EL HUESO ALVEOLAR PERIRRADICULAR
EN LESIONES PERIAPICALES EXPERIMENTALES DE
ORIGEN ENDODÓNTICO.**

**ALFREDO JOSÉ SIERRA CRISTANCHO.
TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS.**

**Director de Tesis: Prof. Asociado Dr. Jaime Díaz Zúñiga.
Director de Tesis: Prof. Titular. Dr. Rolando Vernal Astudillo.**

**Santiago - Chile
2024**

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESCUELA DE GRADUADOS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS

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

ALFREDO JOSÉ SIERRA CRISTANCHO

ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias Odontológicas, en examen rendido el día 24 de julio de 2024.

COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS



Prof. Dra. Gabriela Sánchez Sanhueza.



Prof. Dr. Luis Córdova Jara.



Prof. Dr. Juan Carlos Aguilón Gutiérrez.



Prof. Dr. Mauricio Budini.
(Presidente Comisión Revisora)

DEDICATORIA.

A mi madre, Lucila Cristancho de Sierra.

Aunque hace un año que partiste, tu amor y enseñanzas siguen impactando profundamente mi vida. Esta tesis doctoral es un tributo a tu legado y a la fuerza que me diste para llegar hasta aquí. Gracias por impulsarme a ir en busca de mis sueños. Te extraño cada día y te llevo siempre en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de este viaje, he tenido la fortuna de contar con el apoyo y amor incondicional de muchas personas a las que hoy quiero expresar mi más profundo agradecimiento.

A todo el equipo científico y humano que lideró esta tesis, en especial a mi tutor y mentor Rolando Vernal: Tu guía, paciencia y gran conocimiento han sido fundamentales en este proceso. Agradezco profundamente que hayas creído en mí y que te hayas dedicado a ayudarme a crecer tanto como investigador y profesional. Tu pasión por la ciencia no solo es inspiradora, sino que ha dejado una huella imborrable en mi vida. Admiro enormemente tu inteligencia y brillantez, pero, sobre todo, admiro la gran persona que eres. Tu integridad y bondad me han enseñado tanto como tu sabiduría científica. Gracias por ser un mentor excepcional y por marcar la diferencia en mi camino.

A mi tutor Jaime Diaz: Quiero expresar mi más profundo agradecimiento por todo el apoyo técnico y científico que me brindaste durante este viaje. Tu enfoque meticuloso y tu dominio experimental fueron cruciales para el desarrollo de mi doctorado. Gracias a tu orientación y conocimientos, pude superar muchos

desafíos y avanzar con confianza en mi trabajo. Tu pasión por la ciencia y tu compromiso con la excelencia han sido una inspiración constante.

A mi amiga y guía Carolina Rojas: Quiero agradecerte profundamente por tu invaluable apoyo y guía. A pesar de ser tan joven, tu conocimiento y rigor científico son impresionantes y han dejado una marca significativa en mi formación. Admiré tu capacidad para cuestionar cada detalle y la forma meticulosa y ordenada en que aboras el trabajo. Tu habilidad para planificar y ejecutar de manera precisa me enseñó la importancia de la metodología y la organización en la investigación científica. Aprendí mucho de ti, no solo en términos técnicos, sino también en cómo ser un científico más crítico y reflexivo. Gracias por ser una inspiración constante y por compartir conmigo tu pasión por la investigación.

A mi esposo, Víctor: Tu amor, paciencia y apoyo constante han sido mi refugio durante los momentos más desafiantes de este viaje. Gracias por creer en mí, por tus palabras de aliento y por estar siempre a mi lado, brindándome la fuerza necesaria para seguir adelante. Tu apoyo incondicional durante todo el doctorado, soportando mi poco tiempo, mis enojos, alegrías, tristezas, derrotas diarias y celebraciones, ha sido fundamental. Me ayudaste en todo momento,

brindándome el amor y la comprensión que necesitaba para superar cada obstáculo. Tu presencia me ha dado la fortaleza para no rendirme y seguir persiguiendo mis sueños. Este logro es tanto tuyo como mío. Estoy emocionado por esta nueva etapa que viviremos juntos, y saber que estarás a mi lado me llena de confianza y esperanza para enfrentar los nuevos retos que nos esperan. Te amo.

A mi padre Alfredo: Quien es profesor y me enseñó el verdadero significado del amor por la enseñanza. Gracias a tus interminables noches de esfuerzo y sacrificio, y a tu incansable dedicación, he podido seguir mis sueños y convertirme en quien soy hoy. Tus lecciones no solo me formaron académicamente, sino que también me inculcaron valores de perseverancia, integridad y pasión por el conocimiento. Eres mi mayor inspiración, y cada logro mío es un reflejo de tu amor y compromiso. Gracias, papá, por ser mi guía y mi modelo para seguir. Te llevo siempre en mi corazón.

A mis hermanos: Por su apoyo y comprensión han sido fundamentales para superar los momentos difíciles y celebrar los logros. Gracias por estar siempre a mi lado, brindándome palabras de aliento y un abrazo cálido cuando más lo necesitaba.

A mi familia chilena, Rosita, Manuel, Víctor, Carolina, Roberto, Diego y Geraldine: Gracias por abrirme las puertas de su hogar y su corazón. Su cariño y hospitalidad me han hecho sentir en casa, a pesar de estar lejos de mi tierra natal. Su apoyo ha sido invaluable y siempre los llevaré en mi corazón.

A mis amigos “Los Nutria” Michelle, Luis Daniel, Carolina: Gracias por ser el refugio en momentos de estrés y por celebrar cada pequeño avance conmigo. Su amistad y apoyo incondicional han sido una fuente constante de motivación y alegría. No habría podido llegar hasta aquí sin sus risas, consejos y cariño. Los “Nutria” no solo han sido mi apoyo en los momentos difíciles, sino también mis compañeros de celebración en los triunfos. Hemos vivido juntos interminables fiestas, profundas conversaciones, comidas compartidas, paseos memorables y confesiones sinceras. Gracias por cada risa, cada lágrima, y cada momento que hemos compartido.

A mis amigas Nina y Carlita: No tengo palabras suficientes para expresar lo agradecido que estoy por tenerlas en mi vida. Ustedes son más que amigas, son mi red de apoyo emocional y científica, mis compañeras del alma que siempre están allí, a pesar de la distancia. Gracias por cada café compartido, por los consejos llenos de sabiduría, y por el incondicional apoyo que me brindan día

a día. Su presencia, aunque a veces solo sea virtual, ha sido fundamental para mantenerme fuerte y motivado. Agradezco cada risa, cada lágrima, y cada momento que hemos compartido. Su amistad es un tesoro invaluable que llevo en mi corazón, y no podría haber llegado hasta aquí sin ustedes a mi lado.

A mis compañeros de laboratorio de Biología Periodontal, Berny, Ely, Cote, David, Marcelo, Sebastián y Joaquín: Su colaboración y camaradería han hecho de este viaje una experiencia enriquecedora y memorable. Gracias por los debates intelectuales, el trabajo en equipo y los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio. Juntos, hemos superado retos y alcanzado metas que parecían imposibles.

Para mis alumnos y profesores del posgrado de Endodoncia de la UNAB, Pili, Vero, Maca, Rita, Caro, Marcos y Pancho: Quiero expresar mi más sincero agradecimiento. Su dedicación, entusiasmo y amor por la endodoncia han sido una fuente constante de inspiración para mí. He aprendido tanto de ustedes como espero que ustedes hayan aprendido de mí. A los profesores, gracias por su invaluable guía y por compartir su vasto conocimiento con generosidad y pasión. A mis alumnos, su curiosidad y ganas de superarse me motivan a ser mejor cada día. Este logro es también de ustedes, por el apoyo, la colaboración y el espíritu

de comunidad que hemos construido juntos. ¡Gracias por ser parte fundamental de este camino!

A la Universidad de Chile: Gracias por brindarme la oportunidad de ser parte de esta prestigiosa institución y por el apoyo incondicional durante todo el proceso.

A todos los profesores y personal administrativo del programa de doctorado en Ciencias Odontológicas: Su dedicación y compromiso con la excelencia académica han sido fundamentales para mi formación. Gracias por crear un entorno de aprendizaje estimulante y por estar siempre dispuestos a ayudar.

Al gobierno de Chile y a la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo de Chile (ANID): Gracias a la beca de doctorado Nacional que me otorgaron, he podido realizar este programa de doctorado. Su contribución ha sido esencial para llevar a cabo este proyecto y avanzar en el conocimiento científico.

Finalmente, quiero agradecer a todas las personas que, de una u otra manera, han sido parte de este viaje: Cada palabra de aliento, cada gesto de

apoyo y cada sonrisa han sido un pilar en este camino. Esta tesis es el resultado de un esfuerzo colectivo y no habría sido posible sin la ayuda de todos ustedes.

INDICE.

2. INDICE DE FIGURAS.	9
3. RESUMEN.	16
4. ABSTRACT.	18
5. INTRODUCCION.	21
5.1. Lesiones periapicales y resorción/formación ósea.	21
5.2. Desbalance Th17/Treg durante las lesiones periapicales.	23
5.3. IL-35.	23
5.4. Rol de IL-35 en patologías inmuno-inflamatorias.	29
5.5. Tratamiento de las lesiones periapicales.	32
6. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.	34
6.1. Hipótesis.	34
6.2. Objetivo general.	34
6.3. Objetivos específicos.	34
7. METODOLOGIA.	36
7.1. Consideraciones éticas.	36
7.2. Metodología del objetivo específico 1.	36
7.2.1. Grupos experimentales.	36
7.2.2. Lesión periapical experimental.	37
7.2.3. Caracterización morfológica de la lesión periapical.	38

7.2.4. Caracterización inmunológica.	39
7.3. Metodología objetivo específico 2.	41
7.3.1 Grupos experimentales.	41
7.3.2. Inducción de la lesión periapical experimental.	42
7.3.3. Tratamiento con IL-35.	42
7.3.4. Cuantificación del volumen de la resorción ósea periapical.	44
7.3.5. Expresión de RANKL y OPG.	46
7.4. Metodología objetivo específico 3.	47
7.4.1. Análisis de la frecuencia y fenotipo de linfocitos T (Th17/Treg).	47
7.4.2. Expresión de factores de transcripción y citoquinas relacionados con Th17/Treg.	47
7.5. Análisis estadístico.	47
8. RESULTADOS.	49
8.1. Objetivo específico 1.	49
8.1.1. Resorción ósea perirradicular analizada mediante micro CT.	49
8.1.2. Caracterización histomorfológica de la lesión periapical	51
8.1.3. Cuantificación de los niveles de secreción de citoquinas.	55
8.1.4. Identificación de linfocitos Treg y Th17.	56

8.1.5. Niveles de expresión de RANKL, OPG, factores de transcripción y citoquinas.	58
8.2. Objetivo específico 2.	60
8.2.1. Cuantificación de la resorción ósea periapical por micro-CT.	62
8.2.2. Expresión de los niveles de RANKL y OPG	65
8.3. Objetivo específico 3.	66
8.3.1. Análisis de la frecuencia y fenotipo de linfocitos T (Th17/Treg) en lesiones periapicales tratadas o no con IL-35.	66
8.3.2. Expresión de factores de transcripción y citoquinas relacionados con los perfiles Th17 y Treg en lesiones periapicales tratadas o no con IL-35.	68
9. DISCUSIÓN.	71
10. CONCLUSIONES.	84
11. REFERENCIAS.	84
12. ANEXOS.	100
Anexo 1.	100
Anexo 2.	101
Anexo 3.	102
Anexo 4.	103

2. INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Caracterización de la resorción ósea periapical en las lesiones periapicales experimentales.	50
FIGURA 2. Cuantificación de la resorción ósea periapical en las lesiones apicales experimentales.	51
FIGURA 3. Cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina (HE) de las lesiones periapicales experimentales en los días 0, 7, 14, 21, 28	52
FIGURA 4. Cortes histológicos teñidos con Brown and Breen (BB) de las lesiones periapicales experimentales en los días 0, 7, 14, 21, 28.	54
FIGURA 5. Cuantificación de los niveles de secreción de citoquinas en las lesiones periapicales experimentales y en suero.	56
Figura 6. Presencia de infiltrado de linfocitos Treg y Th17 en lesiones periapicales experimentales en los días 0, 14 y 21.	58
FIGURA 7. Niveles de expresión de factores de transcripción y citoquinas en las lesiones periapicales experimentales y en suero.	60
Figura 8. Efecto de Il-35 en la resorción ósea periapical.	64
Figura 9. Figura 9. Identificación de osteoclastos en lesiones periapicales tratadas con IL-35.	66
Figura 10. Niveles de Expresión de RANKL y OPG en lesiones periapicales tratadas con IL-35.	67

Figura 11. Presencia de linfocitos Treg y Th17 en lesiones periapicales tratadas con IL-35	69
Figura 12. Expresión de factores de transcripción y citoquinas relacionados con los perfiles Th17 y Treg en lesiones periapicales tratadas con IL-35.	72

3. RESUMEN.

Introducción: Las lesiones periapicales son enfermedades inflamatorias que se desarrollan alrededor del ápice radicular de los dientes, provocadas por la infección de microorganismos que colonizan e invaden el sistema de canales radiculares. La patogenia de estas lesiones está determinada por el desequilibrio inmunitario entre los linfocitos T reguladores (Treg) y los linfocitos T colaboradores tipo 17 (Th17), lo que lleva a la resorción del hueso alveolar perirradicular. En enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide y la periodontitis, la interleuquina-35 (IL-35) ha demostrado regular el balance Th17/Treg, inhibiendo la resorción y favoreciendo la formación de tejido óseo.

Hipótesis: En las lesiones periapicales de origen endodóntico, el tratamiento con IL-35 restaura el balance Th17/Treg, aumentando la actividad de los linfocitos Treg y disminuyendo la actividad de los linfocitos Th17, inhibiendo así la resorción y promoviendo la formación del hueso alveolar perirradicular.

Objetivo: Determinar el efecto del tratamiento con IL-35 en la modulación del balance Th17/Treg y en la resorción y formación del hueso alveolar perirradicular en un modelo experimental de lesiones periapicales de origen endodóntico.

Metodología: Se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho de 10 semanas de edad para inducir lesiones periapicales experimentales mediante exposición pulpar. Los animales fueron divididos en grupos para caracterizar en diferentes tiempos de progresión (0, 7, 14, 21 y 28 días) y además, se evaluó el efecto de distintas dosis de IL-35 (1, 10 y 100 ng/ μ l) en la reducción de la pérdida ósea periapical y el balance Th17/Treg en las lesiones inducidas. La resorción ósea perirradicular se cuantificó mediante microtomografía computarizada (micro-CT). Además, se cuantificaron niveles de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A y TNF- α) mediante ELISA en homogenizados de lesiones apicales y suero sanguíneo. Se realizó el análisis fenotípico de linfocitos Treg y Th17 mediante citometría de flujo, y se cuantificaron los niveles de expresión de factores de transcripción y citoquinas características de los perfiles linfocitarios Th17 y Treg mediante RT-qPCR.

Resultados: Al caracterizar la lesión periapical en diferentes tiempos de progresión, encontramos que la resorción ósea incrementó gradualmente con el tiempo, alcanzando su máximo el día 28. Se observó una disminución de las citoquinas IL-4 e IL-10 y un incremento de IL-17A y TNF- α . La expresión de RANKL aumentó significativamente, mientras que los niveles de OPG permanecieron bajos. Los factores de transcripción asociados a Th17 (ROR γ t)

aumentaron, mientras que los asociados a Treg (Foxp3) disminuyeron, indicando un desequilibrio inmunológico.

El tratamiento de la lesión periapical experimental con IL-35 redujo la resorción ósea perirradicular, disminuyó la expresión de RANKL y aumentó la expresión de OPG de manera dosis-dependiente. La dosis de 100 ng/μl de IL-35 mostró una capacidad significativamente mayor para disminuir los linfocitos CD4⁺IL-17⁺ y aumentar la cantidad de linfocitos CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺. La expresión de factores de transcripción y citoquinas mostró una reducción en los niveles de RORγt e IL-17A, y un aumento en los niveles de Foxp3, IL-10 y TGF-β1 en los grupos tratados con IL-35.

Conclusiones: IL-35 reduce la resorción ósea alveolar periapical de manera dosis-dependiente, asociada con la modulación del desequilibrio entre linfocitos Th17/Treg, sugiriendo un potencial terapéutico significativo en el manejo de patologías osteodestructivas crónicas.

4. ABSTRACT

Introduction: Periapical lesions are inflammatory diseases that develop around the root apex of teeth, caused by infections from microorganisms that colonize and invade the root canal system. The pathogenesis of these lesions is determined by the immune imbalance between regulatory T cells (Treg) and T-helper 17 cells (Th17), leading to resorption of periradicular alveolar bone. In inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis and periodontitis, interleukin-35 (IL-35) has been shown to regulate the local Th17/Treg balance, thereby inhibiting resorption and promoting the formation of bone tissue.

Hypothesis: In endodontic periapical lesions, IL-35 treatment restores the Th17/Treg balance by increasing Treg activity and decreasing Th17 activity, thus inhibiting resorption and promoting the formation of periradicular alveolar bone.

Objective: To determine the effect of IL-35 treatment on the modulation of the Th17/Treg balance and on the resorption and formation of periradicular alveolar bone in an experimental model of endodontic periapical lesions.

Methodology: Male Sprague-Dawley rats, aged 10 weeks, were used to induce experimental periapical lesions through pulp exposure. The animals were divided

into groups to characterize different progression times (0, 7, 14, 21, and 28 days), and additionally, the effect of different doses of IL-35 (1, 10, and 100 ng/μl) on the reduction of periapical bone loss and the Th17/Treg balance in induced lesions was evaluated. Periradicular bone resorption was quantified using micro-computed tomography (micro-CT). Additionally, levels of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines (IL-1β, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, and TNF-α) were quantified by ELISA in homogenates of apical lesions and blood serum. Phenotypic analysis of Treg and Th17 lymphocytes was performed by flow cytometry, and the expression levels of transcription factors and cytokines characteristic of Th17 and Treg lymphocyte profiles were quantified by RT-qPCR.

Results: Characterizing the periapical lesion at different progression times, we found that bone resorption gradually increased over time, reaching its maximum at day 28. There was a decrease in IL-4 and IL-10 cytokines and an increase in IL-17A and TNF-α. The expression of RANKL significantly increased, while OPG levels remained low. Transcription factors associated with Th17 (RORγt) increased, whereas those associated with Treg (Foxp3) decreased, indicating an immune imbalance.

The treatment of experimental periapical lesions with IL-35 reduced periradicular bone resorption, decreased RANKL expression, and increased OPG expression in a dose-dependent manner. The 100 ng/μl dose of IL-35 showed a significantly greater ability to decrease CD4+IL-17+ lymphocytes and increase CD4+Foxp3+CD25+ lymphocytes. The expression of transcription factors and cytokines showed a reduction in RORγt and IL-17A levels, and an increase in Foxp3, IL-10, and TGF-β1 levels in the IL-35 treated groups.

Conclusions: IL-35 reduces periapical alveolar bone resorption in a dose-dependent manner, associated with the modulation of the imbalance between Th17/Treg lymphocytes, suggesting significant therapeutic potential in the management of chronic osteodestructive pathologies.

5. INTRODUCCIÓN.

5.1. Lesiones periapicales y resorción/formación ósea.

Las lesiones periapicales de origen endodóntico son un grupo de enfermedades inflamatorias osteolíticas que se manifiestan alrededor del ápice radicular de los dientes, cuya causa son los microorganismos que colonizan e invaden el sistema de canales radiculares (Kakehashi et al., 1965; Nair, 2004). La lesión periapical se inicia luego de la necrosis pulpar como resultado de la lesión de caries dental, traumatismos o procedimientos iatrogénicos. Como consecuencia de la necrosis pulpar, el sistema de canales radiculares se convierte en un hábitat favorable para el establecimiento de una microbiota, principalmente conformada por bacterias anaeróbicas. Cuando las bacterias o sus factores de virulencia pasan al ligamento periodontal a través del forámen apical, las células inmunes despliegan una respuesta inflamatoria con el objetivo de controlar la colonización e invasión microbiana (Siqueira, 2002 ; Siqueira & Rôças, 2007). Al contrario, la consolidación de un reservorio de microorganismos protegido dentro del sistema de canales radiculares impide su eliminación por las células inmunes, generando un ciclo vicioso de activación de la inmunidad periapical.

La respuesta inmune periapical se caracteriza por presentar un desbalance entre la función supresora de los linfocitos T reguladores (Treg) y la capacidad pro-inflamatoria y osteolítica de los linfocitos T colaboradores (del inglés *T helper*, Th), particularmente los del tipo Th17 (Yang et al., 2014). Sin señales reguladoras o supresoras activas, el ciclo vicioso de activación inmune periapical lleva a una respuesta pro-inflamatoria y osteolítica constante y exacerbada, que genera la inflamación y destrucción progresiva del ligamento periodontal, el cemento radicular y el hueso alveolar (Galler et al., 2021). En este contexto, las personas con lesiones periapicales crónicas presentan una carga inflamatoria sistémica elevada, con un aumento de mediadores pro-inflamatorios a nivel sérico, tal como la proteína C-reactiva. Así, la presencia de lesiones periapicales crónicas favorecería un fenotipo inflamatorio crónico de bajo grado (del inglés *chronic low-grade inflammatory phenotype*, CLIP), con mayor resistencia a la insulina, incremento de los triglicéridos plasmáticos, y así, mayor riesgo de obesidad y enfermedades cardiovasculares (Garrido et al., 2019).

5.2. Desbalance Th17/Treg durante las lesiones periapicales.

La resorción del hueso alveolar periapical involucra la desmineralización de los componentes inorgánicos y la degradación de la matriz orgánica ósea por parte de los osteoclastos, células gigantes multinucleadas con una gran capacidad

fagocítica. Los osteoclastos producen ácido clorhídrico y enzimas proteolíticas, tales como la fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP), que es un marcador específico de su activación (Ishii et al., 2018). La actividad resorptiva es dependiente de la señalización mediada por la unión del ligando del receptor activador del factor nuclear κ B (RANKL) a su receptor específico RANK, lo cual activa la vía del factor nuclear κ B (NF- κ B) y permite la fusión de las membranas celulares de los monocitos precursores de osteoclastos mediante la expresión en superficie de la proteína transmembrana estimuladora de osteoclastos (del inglés *osteoclast stimulatory transmembrane protein*, OC-STAMP). Por otro lado, la actividad RANKL/RANK está regulada por osteoprotegerina (OPG), la cual se une a RANKL con una mayor afinidad y bloquea la señalización vía RANK, inhibiendo la formación de los osteoclastos. En este contexto, el balance RANKL/OPG en condiciones fisiológicas es regulado por las células productoras de estas citoquinas, tales como los fibroblastos, los osteoblastos y los osteocitos (Alvarez et al., 2019; Francisconi et al., 2018). Sin embargo, en condiciones patológicas, RANKL también es producida por las células del sistema inmune, en particular los linfocitos Th17, los que activan directamente la osteoclastogénesis (Hikosaka et al., 2008).

La neoformación del hueso alveolar periapical perdido sucede de manera gradual una vez se produce la desinfección terapéutica del sistema de canales radiculares (Siqueira, 2002). Esta osteogénesis ocurre por la disminución en la

producción de citoquinas pro-inflamatorias y un incremento de la respuesta inmune reguladores, eventos que generan un ambiente anti-inflamatorio favorable para la reparación de los tejidos, en particular la formación de nuevo hueso alveolar (Galler et al., 2021; Siqueira, 2002). En este contexto, el hueso alveolar circundante a la lesión periapical es una fuente rica de células madre mesenquimales osteoprogenitoras, las que en presencia del factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento insulínico (IGF), el factor de crecimiento transformante (TGF)- β , el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) se diferencian en osteoblastos (Calori et al., 2009; Lieberman et al., 2002). Estos nuevos osteoblastos tienen como característica principal expresar proteínas constitutivas como fosfatasa alcalina (ALP), osteocalcina, osteopontina y osteonectina, y OPG, lo que favorece la formación ósea y recupera el equilibrio remodelador osteoblasto-osteoclasto (Lieberman et al., 2002).

Además de la función que pueden cumplir los osteoblastos y osteoclastos durante la formación y resorción ósea en condiciones inflamatorias, también cumplen un rol clave ciertas células del sistema inmune. En efecto, durante el desarrollo de las lesiones periapicales se ha descrito un rol fundamental de los distintos fenotipos de linfocitos T y, en particular, de sus citoquinas fenotipo

específicas. (Alvarez et al., 2019; Araujo-Pires et al., 2014; Okamoto & Takayanagi, 2019). En este contexto, distintos fenotipos de células T CD4⁺ se describen en la literatura, con distintas funciones y fenotipos: los linfocitos Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 y Tregs. De ellos,

La respuesta del perfil linfocitario Th1 se asocia con la producción de citoquinas pro-inflamatorias, tales como interleuquina (IL)-1 β , interferón (IFN)- γ y factor de necrosis tumoral (TNF)- α , las cuales inducen la activación de fagocitos y median la inflamación periodontal; mientras que la respuesta Th2, caracterizada por la producción de IL-4, se asocia con la inhibición de la respuesta Th1 (Alvarez et al., 2019). Por otro lado, los linfocitos Th17 y Treg se diferencian a partir de un linfocito precursor común, aunque presentan funciones antagónicas (Araujo-Pires et al., 2014). Los linfocitos Th17 se caracterizan por la expresión del factor de transcripción *master-switch* denominado receptor y huérfano relacionado con el receptor del ácido retinoico (del inglés *retinoic-acid-receptor related orphan receptor gamma-t*, ROR γ t) y la producción de interleuquina (IL)-17A y RANKL. Se diferencian a partir de linfocitos T CD4⁺ *naïve* en presencia del factor de crecimiento transformante (TGF)- β 1 e IL-6 y cumplen un rol fundamental en la patogénesis de las lesiones periapicales al inducir la expresión de IL-6 y RANKL en los osteoblastos y células estromales y producir directamente RANKL,

estimulado así de manera indirecta e directa la diferenciación y activación de los osteoclastos (Wei et al., 2013; Yang et al., 2014).

Por otra parte, los linfocitos Treg se caracterizan por la expresión del factor de transcripción *master-switch* denominado caja de horquilla P3 (del inglés *forkhead box p3*, Foxp3) que determina su fenotipo (Alvarez et al., 2018). A diferencia de los linfocitos Th17, se diferencian a partir de linfocitos T CD4⁺ *naïve* en presencia de elevadas concentraciones de TGF-β1, aunque bajas de IL-6 (Alvarez et al., 2018). Además, los Treg expresan constitutivamente la cadena α del receptor de IL-2, conocido como CD25, al cual se une IL-2, citoquina necesaria para la diferenciación, activación y expansión de los linfocitos Treg (Pol et al., 2020). Los Treg son capaces de modular la acción de los linfocitos Th efectoras mediante mecanismos dependientes del antígeno citotóxico asociado a linfocitos T (CTLA)-4 y la producción de citoquinas, tales como TGF-β1, IL-10 e IL-35 (Parachuru et al., 2018). Además, los Treg son capaces de inhibir la resorción ósea tanto mediante la inducción de la muerte por apoptosis de los osteoclastos por medio de CTLA-4 (Zaiss et al., 2007), como por la inhibición de la diferenciación de los linfocitos Th17 mediante la acción de TGF-β1, IL-10 e IL-35 (Alvarez et al., 2018; Luo et al., 2011; Sakaguchi et al., 2009; Waldmann & Cobbold, 2009).

En términos generales, el balance Th17/Treg explica el proceso de resorción/formación ósea en diversas enfermedades, tales como la osteoartritis y la periodontitis, las cuales se caracterizan por presentar un desequilibrio entre la capacidad pro-inflamatoria y pro-resortiva del hueso, siendo el responsable de la destrucción progresiva de los tejidos (Naufel et al., 2017). En las lesiones periapicales, los estudios clínicos y experimentales sugieren que el balance Th17/Treg es fundamental para la progresión o remisión de enfermedad (Andrade et al., 2013; Araujo-Pires et al., 2014; Naufel et al., 2017; Peixoto et al., 2012). Así, las estrategias que permitan restablecer el balance Th17/Treg podrían modular la señalización RANKL/OPG, inhibir la osteoclastogénesis, reducir la resorción ósea alveolar y promover la regeneración del hueso alveolar perirradicular perdido. En este contexto, proponemos el uso terapéutico de la citoquina reguladora interleukina-35 (IL-35).

5.3. IL-35.

IL-35 es una citoquina perteneciente a la superfamilia de IL-12 estructurada como un heterodímero conformado por la subunidades IL-12p35 y gen 3 inducido por el virus de Epstein-Barr (Ebi3) (Olson et al., 2013). Funcionalmente, IL-35 es una citoquina inmuno-reguladora producida por los

linfocitos Treg de manera dependiente de la expresión de Foxp3 (Collison et al., 2012). Los efectos inmuno-reguladores más relevantes de IL-35 son la supresión de la diferenciación y proliferación de los linfocitos Th17 ROR γ t⁺ productores de IL-6 e IL-17A (Niedbala et al., 2007; Okada et al., 2017) y la inducción de la diferenciación y función de los linfocitos Treg Foxp3⁺ productores de IL-10 y TGF- β 1 (Collison et al., 2010). Recientemente, se estableció que IL-35 favorece la diferenciación de una población particular de linfocitos Treg, denominados linfocitos Treg inducidos productores de IL-35 (iTr35), que son importantes productores de IL-35, lo que favorece su actividad de manera autóloga (Schmidlin et al., 2021).

IL-35 es reconocido por el receptor IL-35R, heterodímero conformado por las subunidades IL-12R β 2 y gp130, el cual señala vía Jak1, Jak2, stat1 y stat4 para activar el factor de transcripción NF- κ B (Hasegawa et al., 2016). Además, IL-35 puede ser reconocida por receptores homodímeros de IL-12R β 2/IL-12R β 2 y gp130/gp130, con funcionalidad diferente (Egwuagu et al., 2015). De hecho, sólo la señalización vía IL-12R β 2/gp130 induce la diferenciación de los linfocitos iTr35 (Collison et al., 2010; Collison et al., 2012; Hasegawa et al., 2016; Sawant et al., 2015).

5.4. Rol de IL-35 en patologías inmuno-inflamatorias.

IL-35 es considerada una citoquina inmuno-protectora en distintas enfermedades cuya patogenia está estrechamente relacionada con el desequilibrio Th17/Treg, tal como la colitis experimental (Wirtz et al., 2011), asma (Gao et al., 2017), la enfermedad inflamatoria intestinal (Li et al., 2014), la artritis reumatoide (Niedbala et al., 2007) y la periodontitis (Cafferata et al., 2020). En modelos experimentales de estas enfermedades, la inoculación de IL-35 lleva a la disminución en el número de linfocitos Th17 *RORγt*⁺ y el incremento en el número de linfocitos Treg *Foxp3*⁺. Así, IL-35 favorece la restauración del balance Th17/Treg, aumentando la actividad de los Treg y disminuyendo la actividad de los linfocitos Th17 (Dambuza et al., 2017; Maddaloni et al., 2018; Zhang et al., 2018). En un modelo experimental de periodontitis se demostró recientemente que la inoculación de IL-35 es capaz de revertir la resorción ósea alveolar (Cafferata et al., 2020). En efecto, los animales afectados de periodontitis experimental y tratados con IL-35 tuvieron una menor detección de linfocitos Th17 y producción de sus citoquinas, junto con una mayor detección de linfocitos Treg y producción de sus citoquinas fenotipo-específicas. De esta manera, se logró demostrar que IL-35 permite restaurar el balance Th17/Treg e inhibir la resorción ósea (Cafferata et al., 2020).

Al igual que la periodontitis, la periodontitis apical es una enfermedad osteolítica; sin embargo, difieren en etiología y manifestación clínica. Por un lado, la periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica no transmisible originada por la disbiosis microbiana subgingival que causa el desbalance Th17/Treg periodontal y la consecuente destrucción progresiva de los tejidos de soporte de los dientes. Por otro lado, la periodontitis apical se asocia con infección bacteriana en el tejido periapical debido a una pulpa dental necrótica o inflamada consecutiva a caries dental, trauma o iatrogenias (Siqueira & Rôças, 2007). Estas diferencias destacan la importancia de un diagnóstico diferencial para un tratamiento efectivo y personalizado.

La característica patológica central en la patogenia de las lesiones periapicales es la resorción del hueso alveolar periapical, la que se produce como una consecuencia del incremento en la actividad de los linfocitos Th17 *RORγt*⁺ y una disminución en la actividad de los linfocitos Treg *Foxp3*⁺. Este desbalance Th17/Treg se produce por los cambios en el microambiente pro-inflamatorio en el territorio periapical, inducido por la presencia de bacterias y sus factores de virulencia en el sistema de canales radiculares. En este contexto, IL-35 podría ser una alternativa terapéutica atractiva para restaurar el balance Th17/Treg.

5.5. Tratamiento de las lesiones periapicales.

En la actualidad, el tratamiento de las lesiones periapicales se basa en la desinfección del sistema de canales radiculares y su sellado con biomateriales con escasa bioactividad. En efecto, estos biomateriales carecen de propiedades inmunomoduladoras y osteogénicas, lo que restringe considerablemente las opciones de tratamiento para revertir la patología periapical y promover la reparación de los tejidos perdidos. En este contexto, IL-35 surge como una alternativa terapéutica atractiva que contribuiría a restaurar el balance Th17/Treg periapical, tal como se ha descrito en otras enfermedades como la periodontitis. En particular, un tratamiento endodóntico suplementado con IL-35 favorecería la inducción de linfocitos iT_h17 en el entorno perirradicular, la restauración del balance Th17/Treg y, consecuentemente, el control de los procesos patológicos osteolíticos perirradiculares que caracterizan a las lesiones periapicales. Además, al aprovechar las propiedades inmunomoduladoras y regenerativas de IL-35, se podría estimular la regeneración de los tejidos perdidos y promover la curación de las lesiones periapicales de manera más efectiva. La incorporación de esta terapia podría abrir nuevas perspectivas para el tratamiento de las lesiones periapicales, al proporcionar una opción viable que tenga el potencial de impulsar las terapias regenerativas en endodoncia. Así, este anteproyecto de

investigación tiene como objetivo evaluar los efectos del tratamiento endodóntico suplementado con IL-35, utilizando un modelo experimental animal de lesión periapical. En particular, analizará su potencial modulador del balance Th17/Treg y de control de la pérdida ósea perirradicular.

6. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

6.1. Hipótesis.

En lesiones periapicales de origen endodóntico, el tratamiento endodóntico suplementado con IL-35 restaura el balance Th17/Treg, mediante el incremento de la actividad de los linfocitos Treg y la disminución de la actividad de los linfocitos Th17 y, consecuentemente, inhibe la resorción y promueve la formación del hueso alveolar periradicular.

6.2. Objetivo general.

Determinar el efecto del tratamiento endodóntico suplementado con IL-35 en la modulación del balance Th17/Treg y la resorción y formación del hueso alveolar perirradicular en un modelo experimental animal de lesiones periapicales de origen endodóntico.

6.3. Objetivos específicos.

1. Caracterizar los aspectos morfológicos e inmunológicos del modelo de lesión periapical experimental en ratas.

2. Analizar el efecto del tratamiento endodóntico suplementado con IL-35 en la pérdida ósea perirradicular, la detección de osteoclastos TRAP⁺ y los niveles de RANKL y OPG en lesiones periapicales de origen endodóntico.
3. Cuantificar el número de linfocitos Th17 y Treg, los niveles de expresión de los factores de transcripción Foxp3 y ROR γ t y las citoquinas IL-6, IL-10, IL-17A, IL-23, IL-35 y TGF- β 1 en lesiones periapicales experimentales de origen endodóntico en animales tratados o no con IL-35.

7. METODOLOGIA.

7.1. Consideraciones éticas.

En relación con el modelo animal de lesión periapical, todos los procedimientos experimentales se realizaron siguiendo las pautas del Council of the American Psychological Society y las recomendaciones de la American Veterinary Medical Association (AVMA). Los animales se alojaron en jaulas separadas, con filtros de aire y en condiciones estándar bajo un ciclo de 12:12 horas de luz/oscuridad, a $22\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, 40-70% de humedad relativa y con agua y alimentación ad libitum. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (Certificado N°22621-MED-UCH) de la Universidad de Chile (**Anexo 1**).

7.2. Metodología del objetivo específico 1.

7.2.1. Grupos experimentales. Para este objetivo se emplearon 38 ratas macho de la cepa Sprague-Dawley de 10 semanas de edad. La lesión periapical experimental fue inducida durante 7, 14, 21 o 28 días. Se establecieron los siguientes grupos experimentales: Grupo 1 (día 7) 4 animales, grupo 2 (día 14) 4 animales, grupo 3 (día 21) 4 animales y grupo 4 (día 28) 4 animales. Como control, 2 animales fueron mantenidos sanos, sin inducción de lesión periapical.

El número de animales se calculó considerando una diferencia media esperada de resorción de hueso peri-radicular evaluada mediante micro-CT de 1,02 mm³, con una desviación estándar de 0,25 mm³, un error tipo I de 5% y un error tipo II de 20%.

7.2.2. Lesión periapical experimental. La lesión periapical se indujo utilizando el método de la exposición pulpar, siguiendo un protocolo previamente estandarizado (Jara et al., 2021; Siddiqui et al., 2019; Yoneda et al., 2017). Bajo anestesia general con isoflurano 3% en un flujo de 1 L de oxígeno, los animales se posicionaron en un estereotáxico asegurando la apertura bucal atraumática para la intervención dentaria. Para generar las lesiones periapicales experimentales, se realizó la exposición pulpar en la fosa mesial de ambos primeros molares maxilares, utilizando una fresa redonda de diamante #1/2 (ISO 006) y una pieza de mano eléctrica a 25.000 rpm bajo refrigeración constante. A los días 7, 14, 21 o 28, los animales fueron eutanasiados para obtener los maxilares, las lesiones periapicales y una muestra de sangre periférica. Animales eutanasiados inmediatamente después de realizado el procedimiento de inducción de la lesión periapical (día 0) fueron usados como control.

7.2.3. Caracterización morfológica de la lesión periapical.

Resorción ósea perirradicular. En los maxilares derechos obtenidos a los días 0, 7, 14, 21 y 28 se cuantificó la resorción ósea periapical utilizando microtomografía computarizada (micro-CT), siguiendo protocolos previamente descritos (Cafferata et al., 2021; Cafferata et al., 2020; Monasterio et al., 2019). Brevemente, las muestras se escanearon con un dispositivo micro-CT SkyScan 1272 (Bruker, Kontich, Bélgica). Los parámetros de adquisición de imágenes fueron: matriz de 1120 × 1120, 70 kV, 114 mA, filtro de aluminio de 1 mm de espesor, tiempo de exposición de 320 milisegundos, paso de rotación de 0,3° y una rotación de 360° alrededor del eje vertical con una resolución isotrópica de 15 µm. Las imágenes se reconstruyeron utilizando el software NRecon (v1.6.1.0; Bruker) con los siguientes ajustes: corrección de artefactos de anillo en nivel 4, corrección de endurecimiento del haz al 40% y suavizado en nivel 2 para todas las imágenes.

El procesamiento y análisis de las imágenes se realizaron con el programa CTAn (v1.6.6.0, Bruker). Se etiquetaron las imágenes según los valores de gris de las estructuras para diferenciar entre hueso y lesión perirradicular/ligamento periodontal. La escala de grises se determinó mediante un histograma de densidad para obtener una imagen compuesta únicamente por píxeles blancos y

negros. Para la segmentación de la lesión periapical, se utilizó un rango de densidad entre 60 y 255 para seleccionar el hueso, y luego se cuantificó el volumen de resorción ósea perirradicular.

Histomofología de la lesión periapical. La cual consistió en la realización de cortes histológicos de los maxilares, que fueron teñidos con hematoxilina-eosina y de Brown & Breen. Las imágenes resultantes fueron digitalizadas utilizando microscopía de luz visible y fueron sometidas a análisis mediante el software Image J, (National Institutes of Health, MD, EE. UU.). Para este análisis, se seleccionó un subconjunto de 18 animales del cual se utilizó los maxilares derechos, 4 para cada grupo experimental y 2 para el grupo control. Los maxilares izquierdos fueron reservados para la cuantificación de los niveles de citoquinas en la caracterización de aspectos inmunológicos.

7.2.4. Caracterización inmunológica.

Cuantificación de los niveles de secreción de citoquinas. Para ello, se realizó la extracción de los primeros molares izquierdos en los días 0, 14 y 21, obteniendo un homogenizado de las lesiones periapicales en los grupos experimentales mediante raspado radicular, mientras que en el grupo control se obtuvo el ligamento periodontal. Además, se obtuvo sangre periférica total de cada animal para la extracción del suero sanguíneo. La purificación de las

proteínas totales se efectuó conforme al protocolo previamente establecido (Díaz-Zúñiga et al., 2020). La secreción de citoquinas IL-1 β IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A y TNF- α se cuantificó a partir de 50 μ L de las muestras de suero u homogenizados de lesión periapical mediante ELISA, siguiendo las instrucciones del fabricante (R&D, Minneapolis, USA), y evaluando la absorbancia a 460 nm y 560 nm utilizando un espectrofotómetro de placas (SynergyTM).

Identificación de linfocitos Treg y Th17. Para este análisis, se seleccionó un subconjunto de 10 animales, 4 para cada grupo experimental y 2 para el grupo control. Se extrajeron los primeros molares derechos y, mediante raspado radicular, se obtuvieron las lesiones periapicales en los grupos experimentales, mientras que en el grupo control se obtuvo el ligamento periodontal. Se procedió entonces a la purificación de las células totales para el análisis fenotípico mediante citometría de flujo. En resumen, los tejidos obtenidos fueron sometidos a digestión enzimática en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con colagenasa IV (Roche). Posteriormente, las células fueron incubadas para el marcado de superficie con anticuerpos anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD45. Luego, las células fueron tratadas con PMA/ionomicina/brefeldina A y marcadas intracelularmente con los anticuerpos anti-Foxp3, anti-ROR γ t, anti-IL-10, anti-IL-17A y anti-TGF- β 1. El análisis se realizó mediante citometría de flujo

(LSR Fortessa X-20, BD), siguiendo un análisis secuencial de acuerdo con las siguientes características: FS/SS, vivas/muertas, CD45, CD3 y CD4. Los maxilares izquierdos fueron reservados para ser utilizados en experimentos de los objetivos 2 y 3.

Cuantificación los niveles de expresión de RANKL, OPG, factores de transcripción y citoquinas. Se extrajo el RNA citoplasmático total de biopsias de las lesiones periapicales y de tejidos periapicales sanos. Posteriormente, se cuantificaron los niveles de expresión de RANKL, OPG, Foxp3, ROR γ t, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-35, TNF- α y TGF- β 1 mediante RT-qPCR, utilizando partidores específicos (ver Anexo 2) y siguiendo los protocolos de amplificación previamente descritos (Cafferata et al., 2020; Melgar-Rodríguez et al., 2016).

7.3. Metodología objetivo específico 2.

7.3.1 Grupos experimentales. Para los objetivos 2 y 3, se emplearon 24 ratas macho de la cepa Sprague-Dawley, con una edad de 10 semanas. Los animales fueron asignados aleatoriamente a cuatro grupos, cada uno compuesto por 6 ratas, siguiendo la siguiente distribución: grupo 1, con lesión periapical y tratado con 1 ng/ μ l de IL-35 intracanal; grupo 2, con lesión periapical y tratado con 10 ng/ μ l de IL-35 intracanal; grupo 3, con lesión periapical y tratado con 100 ng/ μ l

de IL-35 intracanal; grupo 4, grupo control con lesión periapical, pero sin tratamiento con IL-35. El número de animales se calculó considerando una diferencia media esperada de resorción de hueso peri-radicular evaluada mediante micro-CT de 1,02 mm³, con una desviación estándar de 0,25 mm³, un error tipo I de 5% y un error tipo II de 20%, basado en datos previos de estudios similares (Pinto et al., 2024).

7.3.2. Inducción de la lesión periapical experimental. La lesión periapical experimental se indujo mediante el método de exposición pulpar, conforme se detalló previamente (Jara et al., 2021; Yoneda et al., 2017). En los primeros molares mandibulares derechos e izquierdos, se realizó la exposición pulpar, exponiendo la pulpa dental al ambiente oral durante un período de 21 días con el propósito de inducir la infección del sistema de conductos radiculares y la formación de la lesión periapical correspondiente.

7.3.3. Tratamiento con IL-35. En el día 22, en los molares se realizó aislamiento absoluto para realizar la preparación biomecánica del sistema de canales radiculares, siguiendo un protocolo previamente descrito modificado (Siddiqui et al., 2019). Brevemente, se empleó un procedimiento meticuloso que comenzó con el aislamiento del diente utilizando dique de goma de látex y grapa

endodóntica para rata, fabricada a medida (YDM, Tokio, Japón). El espacio entre el diente y la goma se selló con resina compuesta fluida para asegurar un ambiente aséptico. Previamente, el diente fue sometido a un proceso de limpieza con etanol al 70% para establecer un estado de asepsia. Se utilizó una fresa redonda #1/2 para acceder a la cámara pulpar y eliminar la pulpa coronal necrótica, seguido por el uso de una microcureta para extirpar el tejido pulpar de la cámara pulpar y la entrada de los canales radiculares. La exploración de los canales radiculares se llevó a cabo con limas K de bajo calibre #8 y #10 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suiza), y la longitud de trabajo se determinó mediante un localizador apical (Root ZX, J Morita, Tokio, Japón), estableciendo una distancia de 0.5 mm del foramen apical. La preparación de los canales mesiales se realizó utilizando limas rotatorias de níquel-titanio (Ni-Ti) Trunatomy (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suiza) con la secuencia Orifice modifier, Trunatomy glider, small y prime, utilizando un motor Endo-mate (NSK, Tokio, Japón) a una velocidad de 400 rpm y un torque de 1.5 N cm. Posteriormente, entre cada lima los canales radiculares fueron irrigados con 0,5 ml de solución de NaOCl al 2,5%, utilizando agujas de calibre 30 a un caudal de 1 ml/min. Se utilizó como lima de pasaje la #0.6 con el fin de mantener la permeabilidad apical. Tras el proceso de irrigación, los conductos fueron secados utilizando puntas de papel esterilizadas, y se procedió a aplicar la medicación indicada para cada caso. Finalmente, se realizó

el grabado ácido total de la corona, seguido del condicionamiento del esmalte y la dentina con un sistema adhesivo. La cámara pulpar se rellenó con composite fluido y se ajustó la oclusión para dejar el diente sin ningún contacto.

Los canales preparados fueron medicados con IL-35 a distintas dosis (1, 10 o 100 ng), sobre la base de lo establecido como efectivo para el control de la pérdida ósea en otra patología de patogenia similar a la estudiada (39, 45). La medicación se aplicó con una jeringa con aguja calibre 30 y, para facilitar la entrega de la medicación al interior del sistema de canales radiculares, se utilizará una lima K #15. Finalmente, la cámara pulpar se recubrirá con una restauración de resina compuesta fluida fotopolimerizable. Al día 50, los animales fueron eutanasiados y obtuvo la mandíbula derecha para los análisis del objetivo 2 y la mandibular izquierda fue reservada para el desarrollo del objetivo 3.

7.3.4. Cuantificación del volumen de la resorción ósea periapical.

Para determinar los cambios óseos periapicales, se realizó un análisis mediante microtomografía computarizada (micro-CT, Bruker) utilizando de biopsias de las mandíbulas derechas obtenidas de los grupos experimentales. El volumen óseo alveolar peri-radicular se cuantificó mediante análisis imagenológico 3D como fue descrito previamente (Cafferata et al., 2021; Cafferata et al., 2020; Chen et al.,

2019; Pinto et al., 2024). Además, se realizó un análisis morfométrico de la calidad del hueso alveolar periapical. La obtención, procesamiento y análisis de las imágenes se realizó de forma similar a lo detallado el objetivo 1 (Resorción ósea periapical)

Para la segmentación, se utilizó un rango de densidad entre 60 y 255 para seleccionar el hueso. En todos los conjuntos de imágenes, se realizó una selección manual de la región de interés (ROI) a evaluar en vista axial, comenzando en la primera imagen donde aparecían todas la raíz mesial del primer molar mandibular izquierdo rodeadas por una cresta ósea y extendiéndose hasta el ápice (Chen et al., 2019), finalizando 20 cortes después de que la lesión desapareció.

El ROI incluyó el hueso alveolar que rodea todas las raíces del primer molar, el hueso interradicular, la destrucción alrededor de las raíces y el ligamento periodontal. Se midieron el porcentaje de volumen óseo (BV/TV), la densidad mineral ósea, el espesor trabecular (Tb.Th), la separación trabecular (Tb.Sp) y el número trabecular (Tb.N) utilizando el complemento de análisis 3D de CTAn. El BV/TV representa el volumen de hueso mineralizado en el volumen total analizado, y su reducción indica una mayor pérdida ósea (Bouxsein et al.,

2010). La densidad mineral ósea se calcula identificando tejido mineralizado en diferentes densidades, y valores reducidos indican una menor resistencia ósea (Irie et al., 2018). El Tb.Th se obtiene calculando el espesor promedio de todos los vóxeles óseos, mientras que el Tb.Sp se mide de manera similar evaluando los vóxeles que representan las partes no óseas, reflejando así el espesor de las cavidades de la médula (Jiang et al., 2005) . Finalmente, el Tb.N representa el número promedio de trabéculas óseas en la región seleccionada (Irie et al., 2018). Por lo tanto, una mayor separación trabecular, un menor espesor trabecular y un menor número trabecular indican cambios que conducen a una reducción de la densidad ósea. Las imágenes sagitales y coronales se obtuvieron utilizando el software Data Viewer (Tesa Technology, Renens, Suiza)

7.3.5. Identificación de osteoclastos: Luego del análisis de micro-CT, las mandíbulas se fijaron, descalcificaron en EDTA durante 60 días y procesaron para análisis histológico estándar. Los osteoclastos TRAP+ se identificaron y cuantificaron mediante histoquímica (SigmaAldrich)..

7.3.6. Expresión de RANKL y OPG. A partir de las mandíbulas izquierdas Se extrajo el ARN citoplasmático total de biopsias de las lesiones o los tejidos periapicales sanos y se cuantificaron los niveles de expresión de RANKL, OPG, Foxp3, ROR γ t, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-23, IL-35 y TGF- β 1 mediante RT-qPCR, utilizando partidores específicos (ver Anexo 2) y siguiendo los protocolos de amplificación previamente descritos en las referencias (Cafferata et al., 2020; Melgar-Rodríguez et al., 2016).

7.4. Metodología objetivo 3.

7.4.1. Análisis de la frecuencia y fenotipo de linfocitos T (Th17/Treg). Se extrajeron los primeros molares izquierdos y, mediante raspado radicular, se obtuvieron las lesiones periapicales en los grupos experimentales. Posteriormente, se procedió a la purificación de las células totales para el análisis fenotípico mediante citometría de flujo. Se empleó el mismo protocolo metodológico utilizado en el objetivo 1.

7.4.2. Expresión de factores de transcripción y citoquinas relacionados con Th17/Treg. Se extrajo el RNA citoplasmático total de biopsias de las lesiones

periapicales y de tejidos periapicales sanos. Posteriormente, se cuantificaron los niveles de expresión de RANKL, OPG, Foxp3, ROR γ t, 6, IL-10, IL-17A, IL-23, IL-35, y TGF- β 1 mediante RT-qPCR, utilizando partidores específicos (ver Anexo 2) y siguiendo los protocolos de amplificación previamente descritos en las el objetivo 1 (Cafferata et al., 2020; Melgar-Rodríguez et al., 2016).

7.5. Análisis estadístico.

Los datos de resorción ósea se representan en mm² y mm³ y las gráficas representan el valor promedio +/- desviación estándar. Los valores de los mediadores pro-inflamatorios cuantificados se representan como el valor promedio (pg/mL) +/- desviación estándar. Los datos se analizaron estadísticamente utilizando el software SPSS v.22.0. La normalidad de la distribución de los datos se estableció mediante la prueba Kolgomorov-Smirnov. Las diferencias se determinaron mediante las pruebas ANOVA y post-hoc de Tukey, en caso de estadística paramétrica, o Kruskal-Wallis y post-hoc de Dunn, en caso de estadística no-paramétrica. El nivel de significancia se estableció con un valor de $p < 0,05$.

8. RESULTADOS.

8.1. Objetivo específico 1.

8.1.1. Resorción ósea perirradicular analizada mediante micro-CT.

La **Figura 1** muestra la evolución en el tiempo de la resorción ósea periapical asociada a la lesión periapical experimental inducida en las ratas. Al día 0, se observa la región periapical con ausencia de resorción ósea, de aspecto similar a los dientes vecinos no intervenidos. Entre los días 7 y 28, se observa una zona con clara resorción ósea, la que incrementa de tamaño de manera progresiva, alcanzando la mayor extensión el día 28 con compromiso del espacio interradicular. La **Figura 2** muestra la cuantificación de la pérdida ósea producida a consecuencia de la lesión periapical experimental, presentada como área (mm^2) y volumen (mm^3) de resorción ósea. Se observa un incremento progresivo de la resorción ósea a los distintos tiempos de evaluación de la lesión periapical experimental, con diferencias significativas a los días 21 y 28 en comparación con el día 0 usado como control.

Las imágenes obtenidas por micro-CT confirman la formación y evolución en el tiempo de la lesión periapical en el modelo implementado. Con estos resultados se puede establecer que la exposición pulpar genera cambios en la

cantidad del hueso alveolar perirradicular, característica distintiva de las lesiones periapicales experimentales.

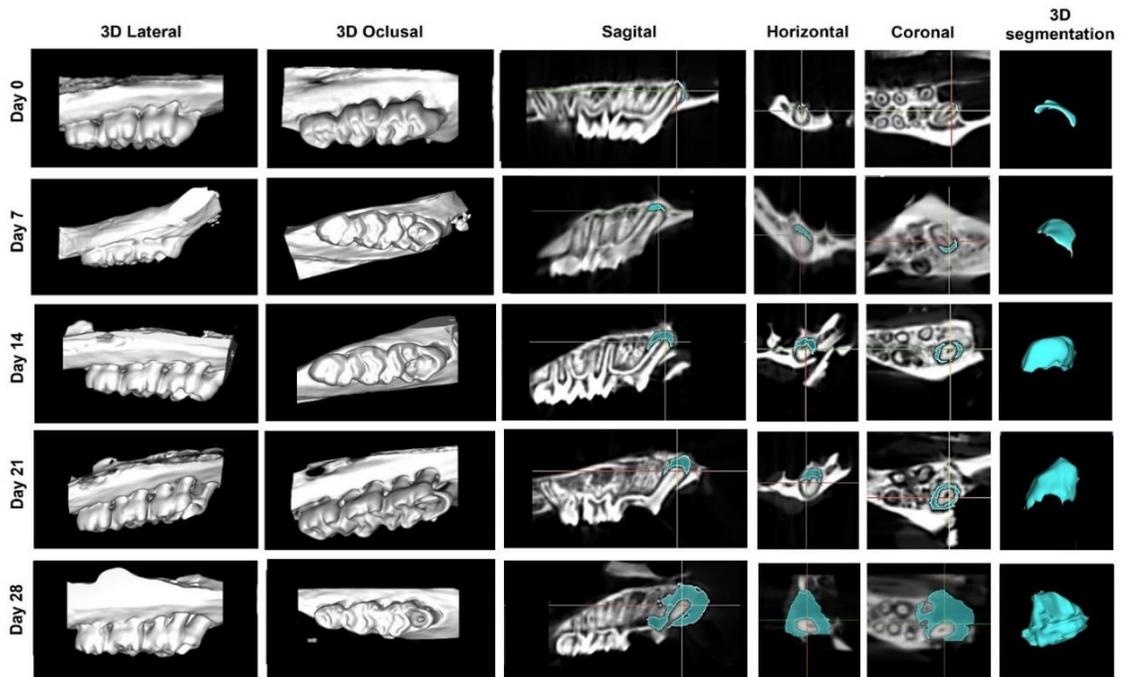


Figura 1. Caracterización de la resorción ósea periapical en las lesiones periapicales experimentales. Análisis mediante micro-CT de la resorción ósea observada en la raíz mesio-vestibular del primer molar maxilar de las ratas. Se muestran imágenes representativas de reconstrucciones volumétricas 3D visualizadas desde lateral y oclusal. Además, se muestran imágenes bidimensionales en los planos sagital, horizontal y coronal para visualizar la evolución de la lesión periapical en el tiempo. Finalmente, se muestra una reconstrucción 3D de la lesión periapical. En color azul, se muestran las regiones de interés (ROI) que fueron evaluadas y que corresponden a las zonas de resorción ósea periapical.

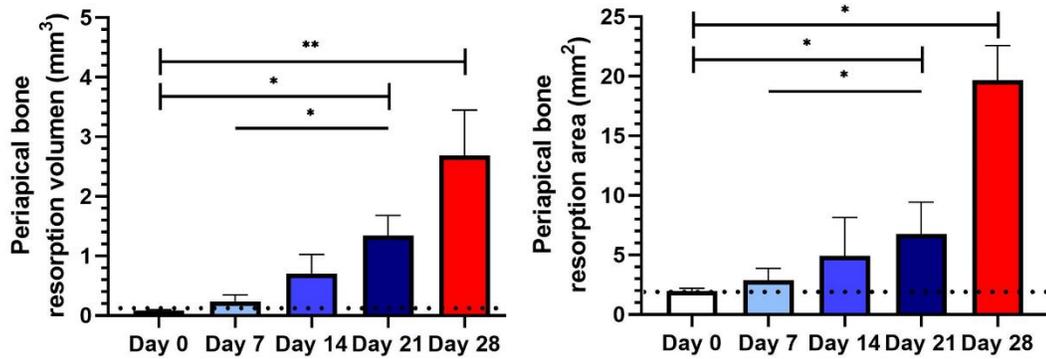


Figura 2. Cuantificación de la resorción ósea periapical en las lesiones apicales experimentales. Análisis cuantitativo del volumen (mm^3) y el área (mm^2) de la resorción ósea periapical analizada mediante micro-CT. Los datos se expresan como promedio \pm desviación estándar de 4 experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

8.1.2. Caracterización histomorfológica de la lesión periapical.

El análisis histomorfológico de la lesión periapical experimental revela la progresión en el tiempo de la necrosis pulpar, el infiltrado inflamatorio, la pérdida ósea y la colonización bacteriana (**Figura 3**). En la **figura 3** se observan los aspectos histológicos de la pulpa y los tejidos periapicales en los días 0, 7, 14, 21 y 28.

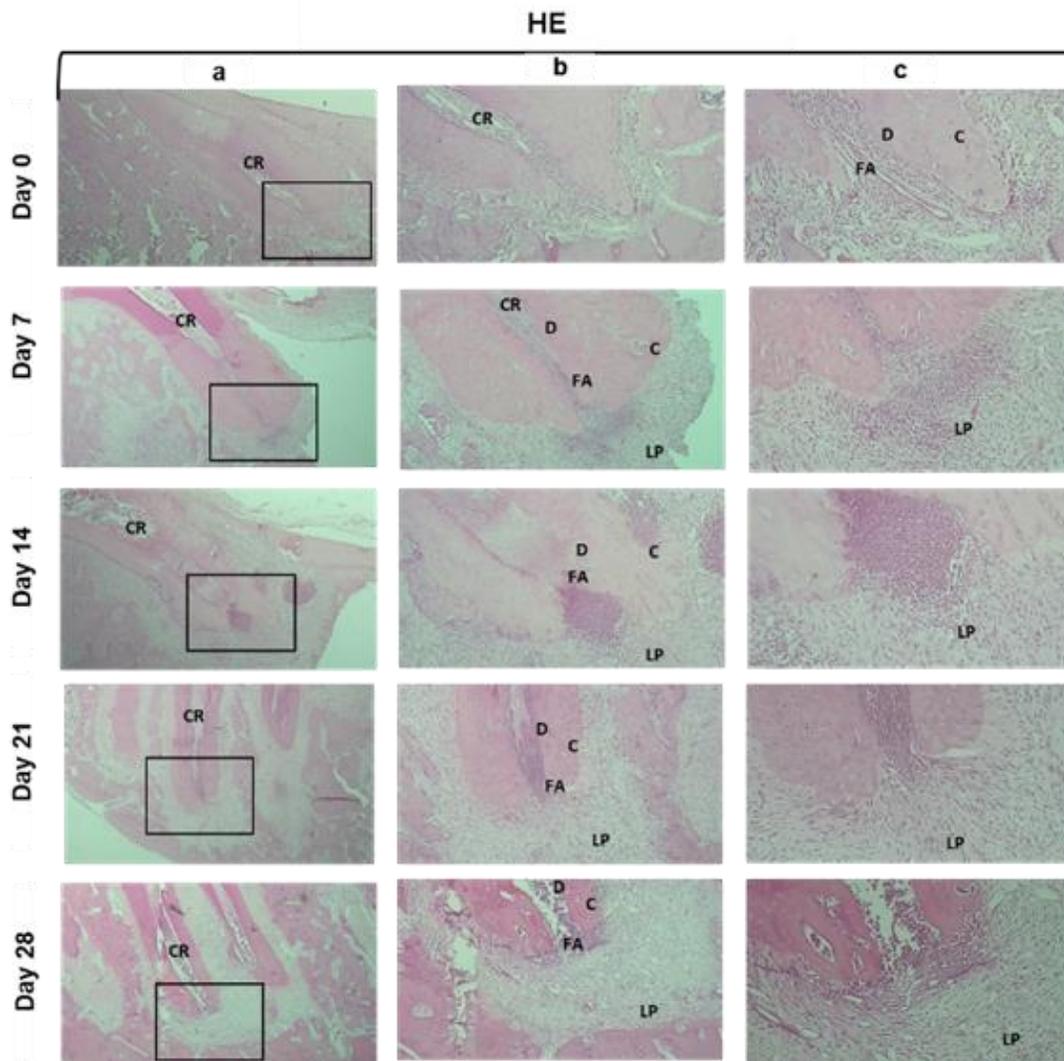


Figura 3. Cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina (HE) de las lesiones periapicales experimentales en los días 0, 7, 14, 21, 28. Se presentan imágenes representativas de cortes histológicos teñidos con HE, con el objetivo de evaluar los cambios en la morfología de la pulpa, el hueso alveolar periapical y determinar la presencia del infiltrado inflamatorio. Las imágenes se presentan a diferentes magnificaciones: (a) 4X, (b) 10X, (c) 20X. CR, canal radicular; D, dentina; C, cemento; FA, foramen apical; LP, lesión periapical; E, esmalte; P, pulpa.

Los cortes histológicos teñidos con Hematoxilina-Eosina (HE) revelan una pulpa normal y tejido periapical libre de células inflamatorias, sin evidencia de pérdida ósea en el día 0. En los grupos experimentales, se observa una necrosis pulpar progresiva, evidenciándose desde una necrosis parcial en las etapas iniciales hasta una necrosis total en los días 21 y 28. Además, se observa un infiltrado inflamatorio intenso en los tejidos periapicales, que se incrementa con el tiempo. La resorción ósea periapical progresa gradualmente, alcanzando su máximo grado al día 28, donde se pueden evidenciar extensas lesiones interradiculares.

Además, mediante la técnica de Brown and Brenn (**Figura 4**) visualizamos la presencia de bacterias en los grupos experimentales y control. En etapas tempranas se detecta una mayor colonización bacteriana en la porción coronal y el tercio cervical del canal radicular y, en los días 21 y 28, una intensificación de la infección intracanal, evidenciado por la invasión bacteriana dentro de los túbulos dentinarios.

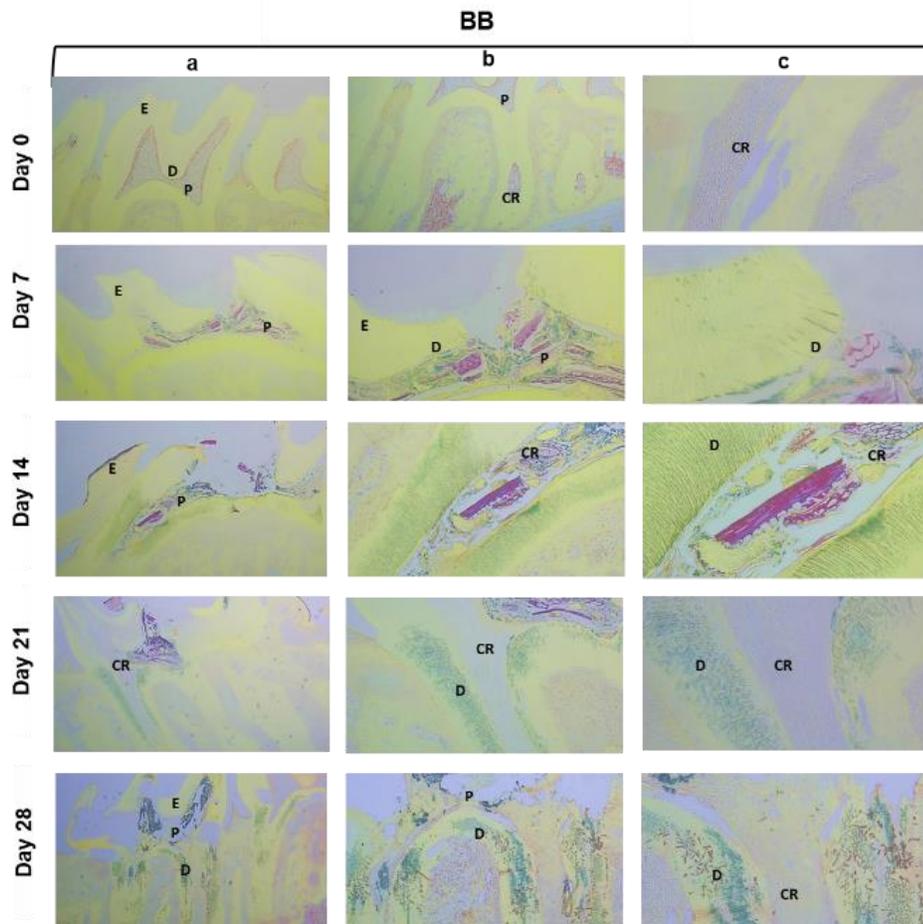


Figura 4. Cortes histológicos teñidos con Brown and Breen (BB) de las lesiones periapicales experimentales en los días 0, 7, 14, 21, 28. Se presentan imágenes representativas de cortes histológicos teñidos con BB, con el objetivo de evaluar la invasión y colonización bacteriana en los túbulos dentinarios, pulpa y sistema de canales radiculares.. Las imágenes se presentan a diferentes magnificaciones: (a) 4X, (b) 10X, (c) 20X. CR, canal radicular; D, dentina; C, cemento; FA, foramen apical; LP, lesión periapical; E, esmalte; P, pulpa.

El diseño experimental de este objetivo contemplaba la caracterización morfológica, inmunológica y microbiológica en los días 0, 7, 14, 21 y 28. Sin embargo, durante la caracterización morfológica se observó un aumento

significativo en el tamaño de la lesión periapical en el día 28, lo que resultó en la formación de lesiones interradiculares que comprometían tanto la estabilidad como el pronóstico a largo plazo del diente en estudio, y podría incluso afectar la salud del individuo. Además, al realizar la caracterización inmunológica en el día 7, debido al pequeño tamaño de la lesión, se obtuvo una pobre suspensión celular con un bajo número de células, lo cual no permitió realizar una adecuada técnica de detección por ELISA o citometría de flujo. Por lo tanto, se tomó la decisión de excluir los días 7 y 28 de los análisis subsiguientes.

8.1.3. Cuantificación de los niveles de secreción de citoquinas.

A partir de las muestras de lesiones periapicales como de suero se cuantificaron los niveles de IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A y TNF- α mediante ELISA, con el objetivo de evaluar los cambios al día 0, 14 y 21 (**Figura 5**). Para las citoquinas moduladoras IL-4 e IL-10 se puede observar una disminución significativa a medida que avanza el tiempo, siendo significativa para IL-4 al día 21 en comparación al día 0 y para IL-10 a los días 14 y 21 en comparación al control (**Figura 5A**). Para las citoquinas pro-inflamatorias, se observa un incremento a medida que avanza el tiempo, siendo significativo para IL-1 β y TNF- α a los días 14 y 21 en comparación al control y para IL-17A al día 21 en relación al control. No se detectaron diferencias para IL-6. Al evaluar los niveles de los

marcadores en el suero, se detecta una disminución para IL-4 e IL-10 según avanza el tiempo, siendo significativo para IL-10 en los días 14 y 21, comparado con el día 0. Para IL-6 e IL-17A se logran detectar mayores niveles al día 21, en comparación al día 0 y, para IL-1 β y TNF- α , se observan mayores niveles al día 14 y 21 en comparación al día 0 (**Figura 5B**). Finalmente, no se detectaron diferencias en los niveles de mediadores evaluados ni en las lesiones periapicales ni el en suero entre los días 14 y 21, observándose leves incrementos al día 21 en comparación al día 14.

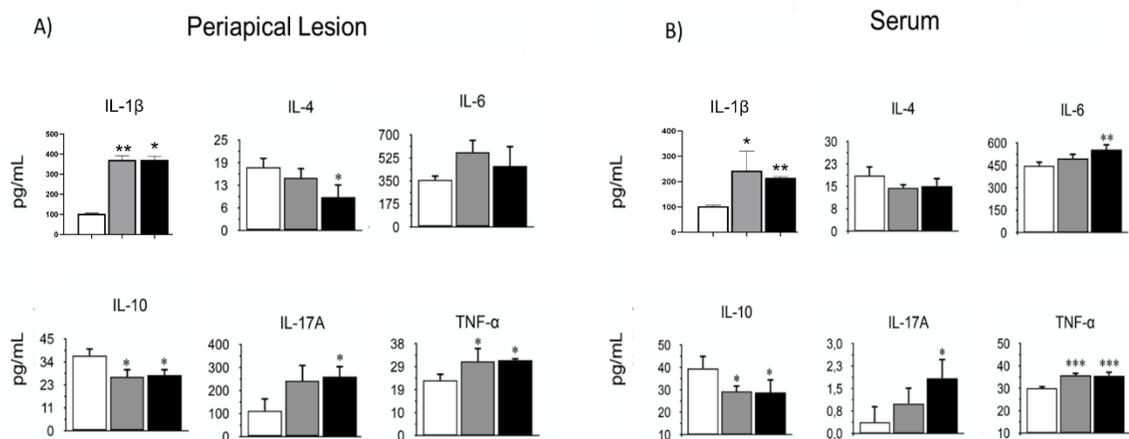


Figura 5. Cuantificación de los niveles de secreción de citoquinas en las lesiones periapicales experimentales y en suero en los días 0 (control), 14 y 21. Los niveles de secreción de IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17 y TNF- α se determinaron mediante ELISA. A) Lesión periapical B) Suero. Los datos se presentan como concentración de citoquinas (pg/ml); media \pm desviación estándar (SD) de 4 experimentos independientes. IL: Interleuquina, TNF: factor de necrosis tumoral. LP: lesión periapical. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

8.1.4. Identificación de linfocitos Treg y Th17.

Al evaluar la presencia de linfocitos Tregs y Th17 en las lesiones periapicales pudimos observar un aumento discreto en el porcentaje de linfocitos CD3⁺CD4⁺ desde el día 0 hasta el día 21, siendo significativo al día 21 en comparación al control inicial (48.90% ± 10.93 vs. 2.07 ± 1.38; **Figura 6A**). El porcentaje de células CD4⁺IL-17⁺ fue significativamente mayor a los 14 días en comparación con el control (19.50% ± 2.38 vs. 0.49% ± 0.7), y luego disminuyó a los 21 días (**Figura 6B**). Un patrón similar se observó en las células CD4⁺Foxp3⁺IL-10⁺ (**Figura 6D**), pero sin diferencias estadísticamente significativas. Además, el porcentaje de células CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺ aumentó gradualmente en cada período de tiempo evaluado (**Figura 6C**). Por último, el porcentaje de células CD4⁺Foxp3⁺TGF-β⁺ aumentó en el grupo de control y disminuyó en los grupos de 14 y 21 días (**Figura 6E**). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos en las poblaciones de células CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺ y CD4⁺Foxp3⁺TGF-β⁺. Estos hallazgos indican la presencia de cambios en la infiltración de linfocitos Treg y Th17 en las lesiones periapicales experimentales a lo largo del tiempo, evidenciando una posible modulación de la respuesta inmunológica en estas lesiones.

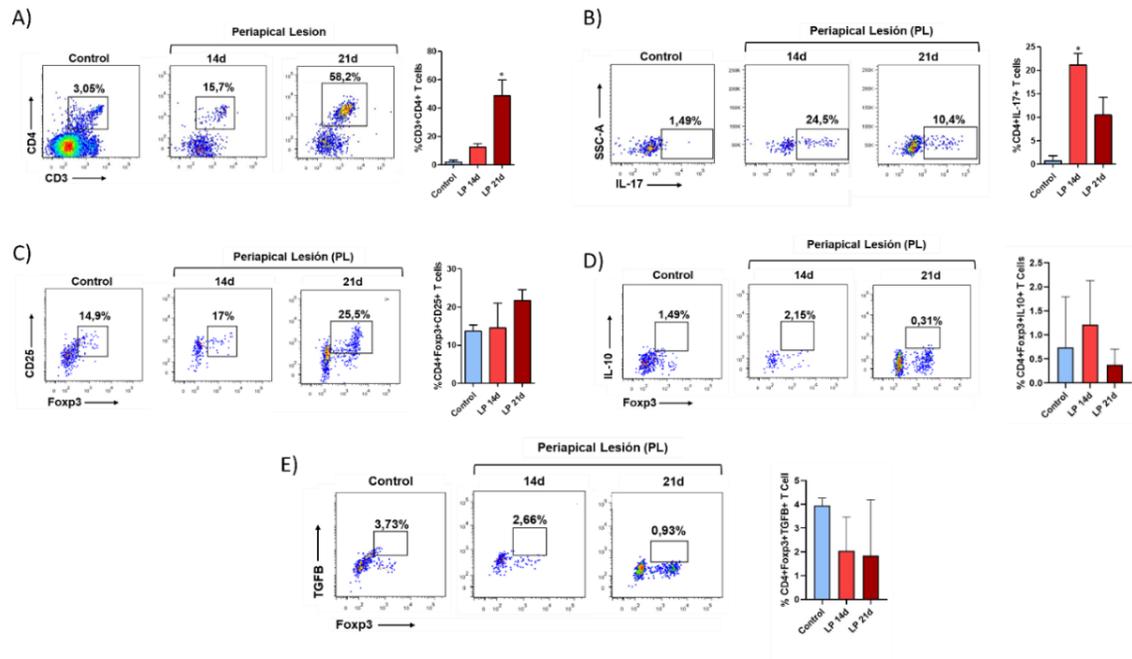


Figura 6. Presencia de infiltrado de linfocitos Treg y Th17 en lesiones periapicales experimentales en los días 0, 14 y 21. Se presentan gráficos de puntos representativos y frecuencia de linfocitos en las siguientes poblaciones: A) CD3⁺CD4⁺, B) CD4⁺IL17⁺. C) CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺ D) CD4⁺Foxp3⁺IL-10⁺, E) CD4⁺Foxp3⁺TGF-β⁺, El grupo de control tuvo un tamaño de muestra de n=2, mientras que los grupos correspondientes a cada período de tiempo tuvieron un tamaño de muestra de n=4. Los gráficos muestran los datos expresados como promedio ± desviación estándar (SD) de 4 experimentos independientes. *p<0,05.

8.1.5. Niveles de expresión de RANKL, OPG, factores de transcripción y citoquinas.

A partir de las muestras de lesiones periapicales, se evaluaron los niveles de expresión de ARNm de RANKL, OPG, los factores de transcripción RORγt

(Th17) y Foxp3 (Treg) y las citoquinas IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A y TNF- α , con el objetivo de evaluar los cambios al día 0, 14 y 21 (**Figura 7**).

Se detectó un aumento significativo en los niveles de expresión de RANKL a medida que avanzaba el tiempo, siendo significativo en los días 14 y 21 en comparación con el día 0 (**Figura 7A**). Por el contrario, los niveles de OPG se mantuvieron bajos en los días 14 y 21, similar al nivel del control, sin detectar diferencias entre ellos (**Figura 7B**). Al evaluar el factor de transcripción ROR γ t de los linfocitos Th17, se observó un aumento significativo en los días 14 y 21 comparado con el control (**Figura 7C**). De manera opuesta, los días 14 y 21 se observaron bajos niveles de expresión del factor de transcripción Foxp3, similares al grupo control, sin detectar diferencias entre ellos (**Figura 7D**).

Para las citoquinas pro-inflamatorias, se observó un incremento a medida que avanzaba el tiempo, siendo significativo para IL-1 β , IL-6, IL-17A e IL-23 en los días 14 y 21 en comparación con el día 0 (**Figura 7E**). En el caso de las citoquinas moduladoras IL-4, IL-35 y TGF- β 1, se observó una baja expresión de ARNm en los días 14 y 21 en comparación con el día 0, siendo significativo para IL-10 en el día 21 en comparación con el control (**Figura 7F**).

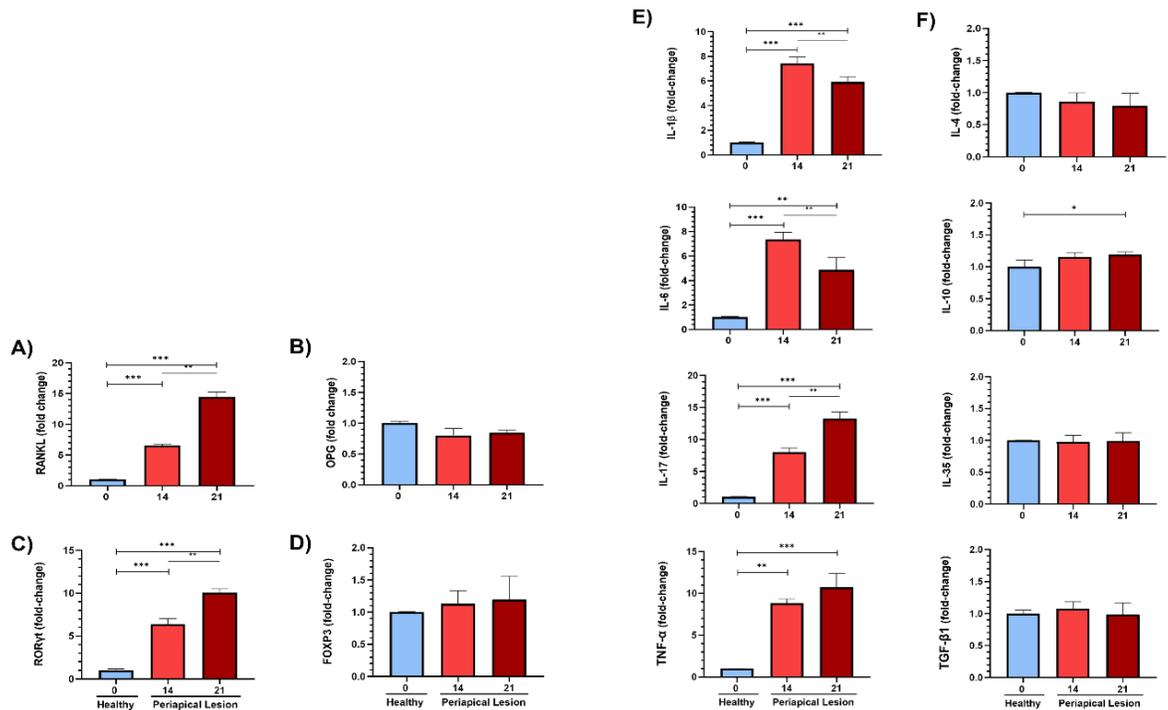


FIGURA 7. Niveles de expresión de factores de transcripción y citoquinas en las lesiones periapicales experimentales y en suero. En los días 0 (control), 14 y 21, se muestran los niveles de expresión de ARNm A) RANKL B) OPG, los factores de transcripción C) RORγt (Th17), D) Foxp3 (Treg) y citoquinas E) IL-1β, IL-6, IL-17A y TNF-α (Th17) y F) IL-4 IL-10, IL-35 y TGF-β1 (Treg) en lesiones periapicales tratadas con IL-35. La expresión relativa se calculó tomando como referencia los niveles en animales sanos (Healthy), sin lesión periapical inducida, cuya expresión se consideró como "1" para determinar el cambio relativo ("fold-change") en la expresión. Los datos se presentan como "fold-change" del ARNm y se muestran como media ± desviación estándar (DS) de 4 experimentos independientes. *p < 0,05, **p < 0,01 y ***p < 0,001.

8.2. Objetivo específico 2.

La ejecución de este objetivo representó un desafío significativo desde el punto de vista técnico. Para su implementación, realizamos un estudio piloto del tratamiento endodóntico en animales de descarte proporcionados por el bioterio de Química y Farmacia. Durante esta fase inicial, realizamos un preclínico para estandarizar el procedimiento endodóntico en el maxilar. Sin embargo, al colocar los animales en un estereotáxico y simular la administración de la anestesia, nos enfrentamos a dificultades para acceder al sistema de canales radiculares con los instrumentos endodónticos, debido a la angulación de los canales. Además, encontramos desafíos para colocar y mantener la máscara de oxígeno en su lugar.

Ante estas limitaciones, consideramos la posibilidad de llevar a cabo procedimientos en la mandíbula, aunque esto planteaba un desafío adicional. Mantener al animal en una posición de decúbito lateral y semisentado en lugar de la posición torácica habitual resultaba complicado. Para abordar esta situación, desarrollamos un dispositivo diseñado específicamente para mantener al animal en la posición óptima para acceder a los molares inferiores, realizar el

aislamiento absoluto y administrar el tratamiento endodóntico, al mismo tiempo que asegurábamos la adecuada colocación de la máscara de anestesia.

Además, enfrentamos el desafío de determinar qué tipo de instrumentos endodónticos utilizar y cuál sería el diámetro adecuado para la preparación biomecánica de los canales radiculares. La literatura describe una variedad de técnicas, desde procedimientos mecanizados hasta métodos manuales con diámetros apicales que van desde #25 hasta #45 (Siddiqui et al., 2019; Yoneda et al., 2017). Para abordar este problema, llevamos a cabo un estudio preclínico utilizando dientes de rata extraídos, con el objetivo de determinar el instrumento más adecuado. Consideramos no solo la capacidad del instrumento para lograr una conformación adecuada de los canales, sino también su capacidad para acceder a la boca del animal sin interferir con el equipo estereotáxico, la máscara de anestesia y el aislamiento absoluto. Este proceso nos permitió seleccionar los instrumentos óptimos para llevar a cabo los procedimientos endodónticos de manera efectiva y segura.

8.2.1. Cuantificación de la resorción ósea periapical por micro-CT.

La progresión de las lesiones periapicales se caracteriza por la resorción ósea alveolar, la cual está estrechamente asociada con la inflamación inmune

persistente en la región perirradicular. En este estudio, se investigó el efecto del tratamiento endodóntico suplementado con IL-35 en la pérdida ósea periapical, evaluando su efecto terapéutico mediante la cuantificación del volumen de resorción ósea. Se compararon los cambios en el volumen de resorción entre los grupos de animales con lesiones periapicales tratados con diferentes dosis de IL-35 (1, 10 y 100 ng/μl) y el grupo control de lesión periapical sin tratamiento con IL-35.

El tratamiento con IL-35 redujo la resorción ósea perirradicular de manera dosis-dependiente, resultando en niveles significativamente menores de pérdida ósea alveolar en comparación con los animales no tratados con IL-35 (**Figura 8A**). Además, se observó un aumento en los parámetros relacionados con las características del hueso alveolar, particularmente un incremento significativo del volumen óseo con la dosis de 100 ng/μl (**Figura 8B**) y un mayor porcentaje de densidad mineral al utilizar las dosis de 10 y 100 ng/μl (**Figura 8C**), en comparación con los animales no tratados con IL-35.

Adicionalmente, en los animales tratados con IL-35, se observó una mejora en los parámetros de calidad del hueso alveolar, con un aumento significativo en el número y la separación de trabéculas óseas al utilizar las dosis

de 1, 10 y 100 ng/μl (**Figura 8E y 8F**). Además, se evidenció un incremento en el grosor de las trabéculas óseas (**Figura 8G**). Estos hallazgos sugieren que IL-35 no solo inhibe la resorción ósea, sino que también mejora la calidad estructural del hueso alveolar en un contexto de lesiones periapicales experimentales.

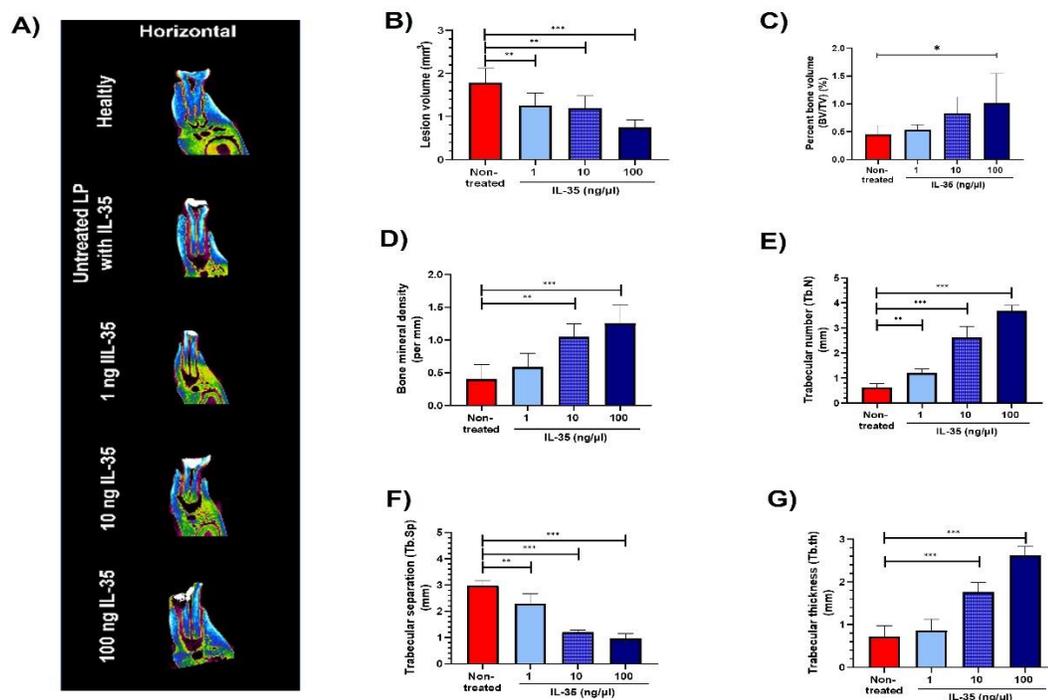


Figura 8. Efecto de IL-35 en la resorción ósea periapical. Análisis cuantitativo por micro-CT del: A) reconstrucciones volumétricas representativas generadas mediante micro-CT B) volumen de la lesión B) Porcentaje de volumen óseo, C) Densidad mineral ósea. D) Número de trabéculas Separación de trabéculas y F) Grosos de trabéculas, de muestras de ratas con lesiones periapicales experimentales tratados con IL-35. Los datos se expresan como promedio \pm desviación estándar (DS) de 6 experimentos independientes. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

8.2.2. Identificación de osteoclastos

Il-35 también redujo la detección de osteoclastos TRAP+. Se observaron El tratamiento con IL-35 también resultó en una reducción significativa en la detección de osteoclastos TRAP+ en las lesiones periapicales. En todas las condiciones experimentales, se observaron osteoclastos TRAP+ (**Figura 9A**).

Sin embargo, los animales con lesiones periapicales tratados con distintas dosis de IL-35 mostraron una disminución notable en el número de osteoclastos TRAP+ en comparación con los animales con lesiones periapicales no tratados, en los cuales se observaron numerosos osteoclastos (**Figura 9B**). Por otro lado, la detección de osteoclastos TRAP+ en las ratas sanas (sin lesión periapical inducida) fue mínima. Se detectaron diferencias estadísticamente significativas al comparar los animales tratados con 10 y 100 ng/μl de IL-35 con el grupo no tratado.

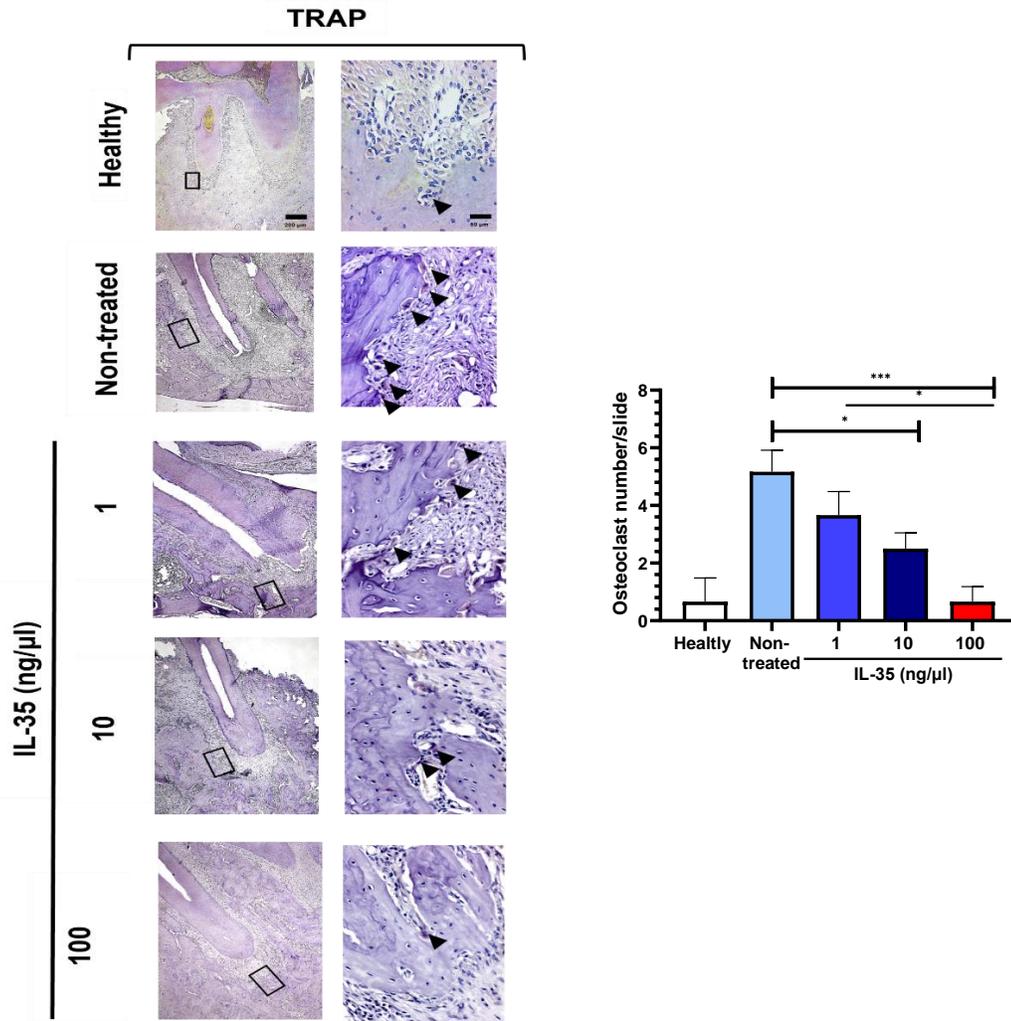


Figura 9. Identificación de osteoclastos en lesiones periapicales tratadas con IL-35. A) Tinción representativa de fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) de muestras de ratas con lesiones periapicales experimentales tratadas con IL-35. B) Cuantificación de osteoclastos TRAP+ en muestras de ratas con lesiones periapicales experimentales tratadas con IL-35. Se utilizaron ratas sanas como controles. Los grupos tratados con IL-35 (1, 10 y 100 ng/μl) se compararon con el grupo no tratado. Los datos se representan como número de osteoclastos/portaobjetos y se muestran como media ± DE (n = 6). *P<0,05 **p<0,01; ***p<0.001

Expresión de los niveles de RANKL y OPG.

La expresión de RANKL en las lesiones periapicales de los animales tratados con IL-35 disminuyó significativamente de manera dosis-dependiente al utilizar las dosis de IL-35 de 1, 10 y 100 ng/μl. Por el contrario, los niveles de expresión de OPG fueron significativamente mayores en los animales tratados con IL-35 en comparación con los animales no tratados (**Figura 10**)

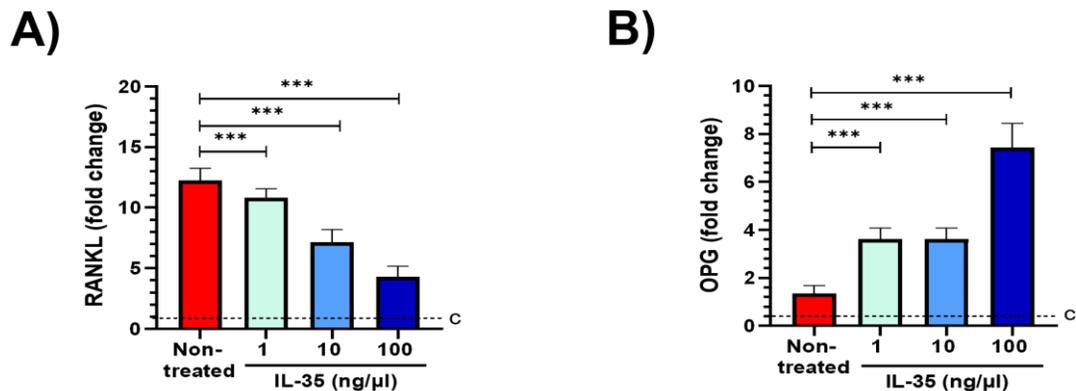


Figura 10. Niveles de Expresión de RANKL y OPG en lesiones periapicales tratadas con IL-35. Se muestran los niveles de expresión de ARNm de A) RANKL y B) OPG en lesiones periapicales tratadas con IL-35. La expresión relativa se calculó tomando como referencia los niveles en animales sanos (C), sin lesión periapical inducida, cuya expresión se consideró como "1" para determinar el cambio relativo ("fold-change") en la expresión. Los datos se presentan como "fold-change" del ARNm y se muestran como media \pm desviación estándar (DS) de 6 experimentos independientes. *** $p < 0,001$.

8.3. Objetivo específico 3.

8.3.1. Análisis de la frecuencia y fenotipo de linfocitos T (Th17/Treg) en lesiones periapicales tratadas o no con IL-35.

Las lesiones periapicales están estrechamente asociadas a una respuesta inmune constante y exacerbada, producto del desbalance inmunológico funcional entre los linfocitos T reguladores (Treg) y los linfocitos T colaboradores tipo 17 (Th17), lo que conlleva a la inflamación y destrucción progresiva del ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar. Con el fin de explorar la capacidad inmunomoduladora de IL-35 en la respuesta inmune local de las lesiones periapicales, se empleó el modelo de lesión periapical experimental. Se compararon los cambios en la frecuencia y fenotipo de los linfocitos Th17 y Treg entre los grupos de animales con lesiones periapicales tratados con diferentes dosis de IL-35 y el grupo control de lesión periapical sin tratamiento con IL-35.

Los resultados muestran la reducción en la población de células CD3⁺ CD4⁺ en los grupos experimentales en comparación con el grupo control, lo que sugiere que la administración de IL-35 podría inhibir la proliferación de células T CD4⁺ (**Figura 11A**). Además, en las lesiones periapicales experimentales se observó una disminución en la cantidad de linfocitos CD4⁺IL-17⁺ en comparación con aquellas de los animales no tratados con IL-35 (**Figura 11B**). En contraste, en las

lesiones periapicales experimentales de los animales que recibieron IL-35 se detectó un aumento en la cantidad de linfocitos $CD4^{+}Foxp3^{+}CD25^{+}$ en comparación con las lesiones periapicales de los animales no tratados con IL-35 (**Figura 11C**). La dosis de 100 ng/ μ l de IL-35 mostró una capacidad significativamente mayor para disminuir los linfocitos Th17 y aumentar la cantidad de linfocitos Treg. Estos hallazgos sugieren un efecto inmunomodulador negativo de IL-35 en la respuesta inflamatoria asociada a las lesiones periapicales.

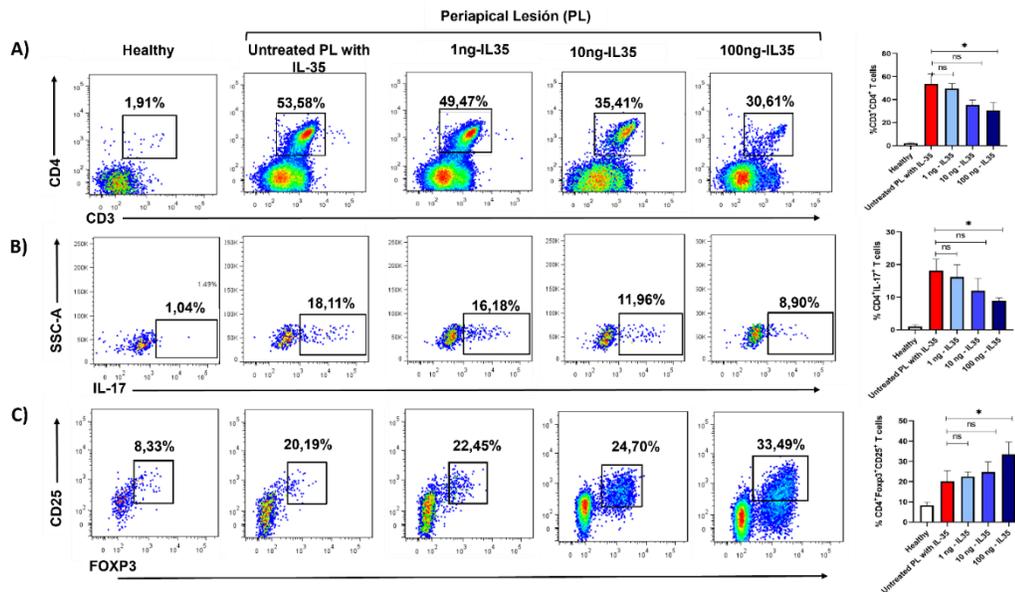


Figura 11. Presencia de linfocitos Treg y Th17 en lesiones periapicales tratadas con IL-35. Se presentan gráficos de puntos representativos y frecuencia de linfocitos en las siguientes poblaciones: A) $CD3^{+}CD4^{+}$, B) $CD4^{+}IL17^{+}$ C) $CD4^{+}Foxp3^{+}CD25^{+}$. Los gráficos muestran los datos expresados como promedio \pm desviación estándar (DS) de 6 experimentos independientes. * $p < 0,05$.

8.3.2. Expresión de factores de transcripción y citoquinas relacionados con los perfiles Th17 y Treg en lesiones periapicales tratadas o no con IL-35.

Para un análisis más detallado del efecto de IL-35 en la modulación del desequilibrio Th17/Treg durante la lesión periapical experimental, cuantificamos los niveles de expresión de los factores de transcripción ROR γ t (Th17) y Foxp3 (Treg) y las citoquinas IL-6, IL-17A e IL-23 (Th17) y IL-10, IL-35 y TGF- β 1 (Treg) en lesiones periapicales de animales tratados o no con IL-35 (**Figura 12**). De manera dosis-dependiente, la expresión de ARNm del factor de transcripción ROR γ t, asociado con la diferenciación y función de los linfocitos Th17, fue significativamente menor en animales con lesiones periapicales tratados con IL-35 en comparación con los no tratados (**Figura 12A**). Además, se detectó una reducción en la expresión de las citoquinas IL-6, IL-17A e IL-23 en los grupos tratados con dosis de 10 y 100 ng/ μ l de IL-35, lo que refuerza el efecto inhibitor de IL-35 sobre la respuesta inflamatoria mediada por Th17 en este modelo experimental (**Figura 12C**). Por el contrario, se detectó un aumento dependiente de la dosis en la expresión del ARNm del factor de transcripción Foxp3, asociado con la diferenciación y función de los linfocitos Treg, en animales con lesiones periapicales tratados con IL-35 en comparación con los animales no tratados (**Figura 12B**). De manera similar, los niveles de ARNm de las citoquinas relacionadas con Treg (IL-10, IL-35 y TGF- β 1) fueron significativamente mayores

en los animales afectados con lesiones periapicales tratados con IL-35 que en aquellos no tratados (**Figura 11D**). En las dosis de 10 y 100 ng/μl, IL-35 indujo una expresión significativamente mayor de la cadena EBI3 de IL-35 en animales con lesiones periapicales en comparación con los animales no tratados. Además, estas mismas dosis de IL-35 incrementaron significativamente la expresión del factor de transcripción Foxp3 y las citoquinas IL-10 y TGF-β1 en animales con periodontitis en comparación con los animales sin tratamiento.

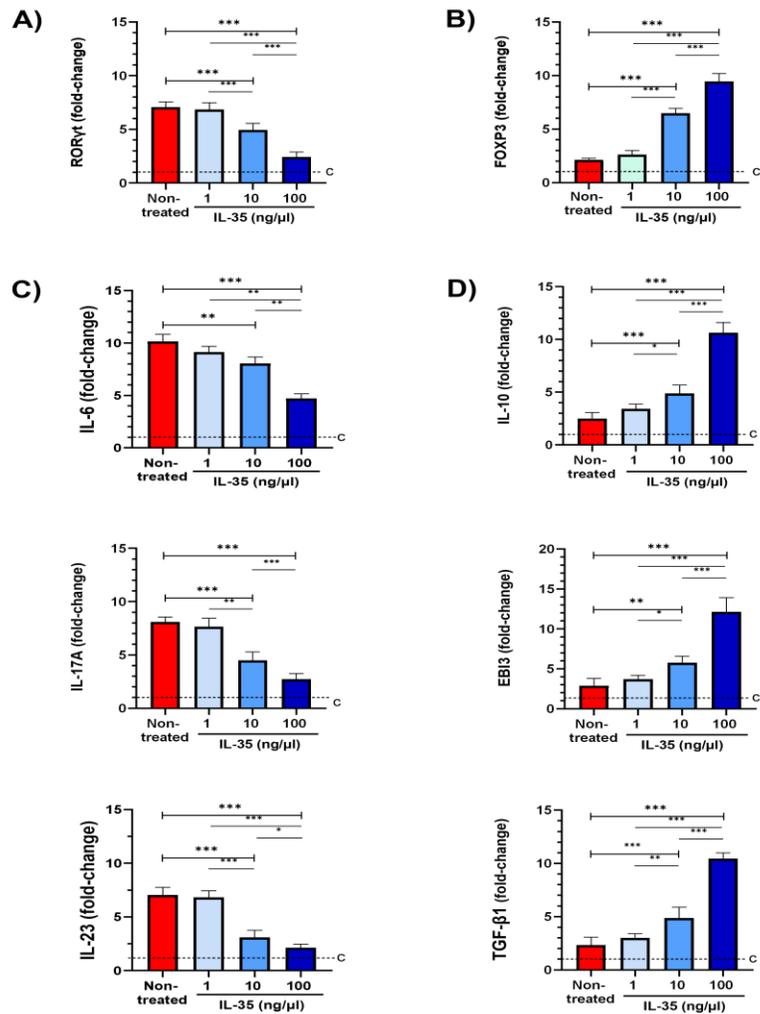


Figura 12. Expresión de factores de transcripción y citoquinas relacionados con los perfiles Th17 y Treg en lesiones periapicales tratadas con IL-35. Se muestran los niveles de expresión de ARNm de factores de transcripción A) RORγt (Th17) y B) Foxp3 (Treg) y citoquinas C) IL-6, IL-17A e IL-23 (Th17) y D) IL-10, EBI3 (IL-35) y TGF-β1 (Treg) en lesiones periapicales tratadas con IL-35. La expresión relativa se calculó tomando como referencia los niveles en animales sanos (C), sin lesión periapical inducida, cuya expresión se consideró como "1" para determinar el cambio relativo ("fold-change") en la expresión. Los datos se presentan como "fold-change" del ARNm y se muestran como media ± desviación estándar (DS) de 6 experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

9. DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos en este estudio proporcionan por primera vez una perspectiva comprensiva sobre el efecto de la interleuquina-35 (IL-35) en el equilibrio Th17/Treg y en la resorción del hueso alveolar periapical en un modelo experimental de lesiones periapicales de origen endodóntico. Se demostró que el tratamiento endodóntico suplementado con distintas concentraciones de IL-35 en ratas Sprague-Dawley macho, redujo la resorción ósea periapical de manera dosis-dependiente, siendo la dosis de 100 ng/ μ l de IL-35 la más eficaz. Esta reducción se asoció con una menor presencia de osteoclastos y una disminución en la expresión de RANKL en las lesiones periapicales. Además, IL-35 moduló efectivamente el desequilibrio Th17/Treg, al aumentar el número y la actividad de los linfocitos Treg y disminuir la de los linfocitos Th17, evidenciándose un aumento en la expresión del factor de transcripción Foxp3 y las citoquinas IL-10, IL-35 y TGF- β 1 asociadas a Treg, y una disminución en la expresión del factor de transcripción ROR γ t y de las citoquinas IL-6, IL-17A e IL-23 asociadas a Th17. Estos hallazgos son de gran relevancia, ya que no solo validan la hipótesis propuesta al demostrar que el tratamiento endodóntico suplementado con IL-35 inhibe con éxito la resorción ósea al modular el desequilibrio Th17/Treg, sino que también sugieren un potencial terapéutico significativo de IL-35 en el manejo de patologías osteodestructivas crónicas que afectan los tejidos periapicales.

Aunque no existen estudios previos que analicen el potencial terapéutico de IL-35 en las lesiones periapicales de origen endodóntico, nuestros hallazgos son consistentes con investigaciones anteriores que utilizan IL-35 para inhibir la resorción ósea en enfermedades como la periodontitis marginal y la artritis reumatoide. Al igual que las lesiones periapicales, estas enfermedades están caracterizadas por un desequilibrio entre Th17 y Treg, lo que conduce a la resorción ósea patológica. Los hallazgos de nuestro estudio se alinean con los resultados reportados por Yuan et al. (2024), quienes exploraron el efecto de IL-35 en un modelo de artritis inducida por colágeno (CIA) en ratones. Yuan et al. encontraron que IL-35 inhibe la osteoclastogénesis y atenúa la inflamación y destrucción ósea. De manera similar a nuestro estudio, la administración de IL-35 en su modelo redujo significativamente la resorción ósea y los niveles de RANKL, mientras aumentaba los niveles de OPG. También se observó una disminución en los marcadores de osteoclastogénesis, como TRAP y cathepsina K. Además, Yuan et al. midieron las citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-17 y encontraron que IL-35 redujo sus niveles, al tiempo que aumentaba la expresión de citoquinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- β (Yuan et al., 2024). En nuestro estudio, tras el tratamiento con IL-35, observamos una disminución en el número de linfocitos Th17 y una reducción en la expresión de RANKL y citoquinas

relacionadas con este perfil linfocitario, lo cual es consistente con la reducción de la relación RANKL/OPG en lesiones periodontales reportada en la literatura (Cafferata et al., 2020; Li et al., 2016). Estos resultados refuerzan la estrecha relación entre las enfermedades inmunológicas y óseas, y destacan el potencial terapéutico de IL-35 en el manejo de patologías osteodestructivas crónicas.

Por otra parte, el estudio de Goto et al. (2023), que investigó el rol de las citoquinas relacionadas con la subunidad EBI3 de IL-35 en la periodontitis experimental utilizando ratones knockout (KO) para EBI3. Se observó una resorción ósea alveolar significativamente mayor en los ratones EBI3 KO en comparación con los ratones de tipo salvaje (WT). La inyección de IL-35 recombinante redujo significativamente la resorción ósea alveolar inducida por la ligadura en los ratones EBI3 KO. Además, detectaron mayores niveles de RANKL y menores de OPG en los ratones EBI3 KO, lo cual se normalizó con la administración de IL-35 recombinante. También observaron que la deficiencia de EBI3 aumentaba la polarización de las células Th17 y la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-17A y TNF- α , mientras que IL-35 promovía una mayor proporción de células Treg y citoquinas antiinflamatorias como IL-10 (Goto et al., 2023). Estos hallazgos son concordantes con los resultados de nuestro estudio, donde los niveles de ARNm de las citoquinas relacionadas con Treg (IL-10, IL-35

y TGF- β 1) fueron significativamente mayores en los animales afectados con lesiones periapicales tratados con IL-35 en comparación con aquellos no tratados. Esta similitud refuerza la evidencia de que IL-35 desempeña un rol central en la regulación de la resorción ósea y la respuesta inmune, promoviendo un equilibrio Th17/Treg favorable que podría ser clave para el manejo de patologías osteodestructivas crónicas.

En estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación, donde se evaluó el efecto de IL-35 en un modelo de periodontitis marginal inducida por ligadura en ratones, se reportaron resultados similares a los obtenidos en este estudio (Cafferata et al., 2020). En ambos casos, IL-35 demostró ser eficaz en la inhibición de la resorción ósea y en la modulación del equilibrio Th17/Treg. En nuestro estudio, IL-35 redujo la resorción ósea periapical, disminuyó la presencia de osteoclastos y la expresión de RANKL, y aumentó la actividad de los linfocitos Treg mientras disminuía la de los linfocitos Th17. De manera similar, en el estudio de Cafferata et al., IL-35 inhibió la resorción ósea alveolar, redujo la activación de osteoclastos, y moduló la relación RANKL/OPG, con una disminución de citoquinas proinflamatorias y un aumento de citoquinas antiinflamatorias. Estas similitudes en los resultados refuerzan la evidencia del potencial terapéutico de IL-35 en el manejo de patologías inflamatorias crónicas que afectan los tejidos

de soporte dental, sugiriendo que IL-35 podría ser una herramienta efectiva para prevenir la destrucción ósea y promover la regeneración tisular en diversas condiciones osteoimmunológicas.

El estudio de Cafferata et al. (2023) y el presente estudio difieren principalmente en el modelo experimental y las dosis de IL-35 utilizadas. Cafferata et al. emplearon un modelo de periodontitis marginal en ratones, administrando IL-35 por vía intragingival (1 ng, 10 ng y 100 ng) e intraperitoneal (2 µg). En contraste, nuestro estudio utilizó un modelo de lesiones periapicales en ratas Sprague-Dawley, con dosis de IL-35 de 1 ng/µl, 10 ng/µl y 100 ng/µl aplicadas directamente en los canales radiculares molares. Además, la administración de IL-35 en el estudio de Cafferata fue tanto local como sistémica, mientras que en nuestro estudio se aplicó directamente en la lesión periapical. Estas diferencias metodológicas pueden explicar las variaciones en la respuesta observada, subrayando la importancia de la vía de administración y la dosificación en la eficacia del tratamiento con IL-35. Optimizar estas estrategias es fundamental para maximizar el potencial terapéutico de IL-35 en diversas condiciones inflamatorias que afectan los tejidos de soporte dental.

En este estudio se detectó una disminución en la expresión de RANKL y un aumento en la expresión de OPG en los animales tratados con IL-35, sugiriendo una inhibición de la actividad osteoclástica y una promoción de la formación ósea. Los mecanismos biológicos detrás de los efectos de IL-35 en la inhibición de la resorción ósea están relacionados con la modulación de las vías de señalización RANKL/OPG. IL-35 ejerce su efecto anti-resortivo mediante varios mecanismos: primero, suprime la diferenciación de los precursores de osteoclastos al reducir la expresión de factores pro-osteoclastogénicos como RANKL y M-CSF (Xu et al., 2023; Zhang et al., 2021; Zhu et al., 2020). Además, IL-35 antagoniza la señalización intracelular mediada por RANKL en los osteoclastos maduros, resultando en una disminución de su actividad resortiva (Xu et al., 2023). Segundo, inhibe la función de los osteoclastos al reducir la expresión de enzimas clave como la fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) y catepsina K, esenciales para la degradación de la matriz ósea (Kamiya et al., 2020). Algunos estudios sugieren que IL-35 puede promover la muerte por apoptosis de los osteoclastos maduros, lo que eventualmente conduce a una disminución de la resorción ósea. Peng et al. (2018) demostraron que IL-35 puede promover la apoptosis de los osteoclastos maduros mediante la modulación de la señalización asociada al receptor TNF. IL-35 induce la expresión de FasL (ligando Fas) en células no adherentes y aumenta la expresión

de FADD (proteína del dominio de muerte asociada a FAS) y caspasa-3 clivada en células tratadas con TNF- α e IL-35, lo que resulta en un aumento significativo de la muerte por apoptosis. Este mecanismo es crucial para reducir la resorción ósea al eliminar los osteoclastos maduros (Peng et al., 2018)

IL-35 no solo inhibe la resorción ósea mediada por los osteoclastos, sino que también estimula la formación de nuevo hueso a través de la promoción de la diferenciación de osteoblastos. IL-35 induce la diferenciación de osteoblastos y mejora la formación ósea mediante la vía canónica Wnt/ β -catenina (Li et al., 2023). En cultivos de células madre mesenquimales, IL-35 aumentó la expresión de marcadores osteoblásticos como ALP, Runx2 y Osterix. Estos hallazgos indican que IL-35 tiene un doble efecto: inhibe la resorción ósea y promueve la formación ósea (Li et al., 2023; Zhang et al., 2021) .

IL-35 también desempeña un rol en la regulación de la inmunidad y la resorción ósea a través de sus efectos sobre los linfocitos Treg y los linfocitos T Th17. Como citoquina de la familia IL-12, es predominantemente producida por células Treg y células B reguladoras (Breg), ejerciendo una potente acción inmunosupresora. El mecanismo de acción de IL-35 involucra la activación de la vía de señalización JAK-STAT, particularmente STAT1 y STAT3. La activación

de estas moléculas de señalización conduce a la transcripción de genes que promueven un fenotipo regulador en las células T y B, resultando en una disminución de la inflamación y la resorción ósea. La vía JAK-STAT facilita la expresión de citoquinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- β , que contrarrestan los efectos destructivos de las citoquinas proinflamatorias. Además, IL-35 inhibe la producción de citoquinas proresortivas como IL-17 y TNF- α , producidas por los linfocitos Th17, que cumplen un rol central en la activación de los osteoclastos. Varios estudios demuestran que IL-35 induce la expansión de células Treg y la conversión de linfocitos convencionales en células reguladoras, contribuyendo a la supresión de la respuesta inmune proinflamatoria. IL-35 induce la expresión de factores de transcripción como Foxp3 en las células T, favoreciendo la diferenciación hacia células Tregs (Choi & Egwuagu, 2021; Collison et al., 2010; Collison et al., 2012; Wang et al., 2014). En este estudio, la inoculación de IL-35 aumentó la expresión de Foxp3 y EBI3 en tejidos periapicales. El tratamiento endodóntico suplementado con IL-35 puede generar retroalimentación positiva en la respuesta Treg al inducir la diferenciación y activación de Treg productoras de IL-35, conocidas como células iTr35 (Collison et al., 2010; Collison et al., 2012). Estas células secretan más IL-35, creando un bucle de retroalimentación positiva. Los Treg productores de IL-35 (iTr35) desempeñan un rol esencial en la regulación del metabolismo óseo y las respuestas inmunitarias, manteniendo la

homeodinamia ósea (Choi & Egwuagu, 2021; Collison et al., 2012; Liu et al., 2021). La modulación farmacológica de la vía de señalización de IL-35 emerge como una estrategia terapéutica prometedora no solo para reducir la pérdida ósea patológica, sino también para mejorar la regeneración ósea en diversas condiciones clínicas, como la periodontitis (Cafferata et al., 2020; Niedbala et al., 2007; Shindo et al., 2019) y artritis reumatoide (Li et al., 2023)

El modelo de lesión periapical experimental en ratas, utilizado en nuestro estudio, demostró ser una herramienta valiosa y validada para investigar la patogénesis y el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas que afectan los tejidos periapicales. Este modelo ha sido utilizado ampliamente en la literatura científica debido a su capacidad para reproducir con precisión las características clínicas y biológicas de las lesiones periapicales humanas, consolidando su validez externa (Pinto et al., 2024; Siddiqui et al., 2019; Yoneda et al., 2017). Nuestro laboratorio ha estandarizado y consolidado este modelo, realizando una caracterización detallada en aspectos morfológicos e inmunológicos en diferentes periodos de tiempo, específicamente en los días 0, 7, 14, 21 y 28. Este enfoque permitió identificar las ventajas y limitaciones del modelo, así como tomar decisiones experimentales informadas a lo largo de la investigación. Los análisis histológicos y de micro-CT revelaron la presencia de lesiones

periapicales en todos los animales sometidos a la infección endodóntica experimental, confirmando así la validez interna del modelo. El objetivo de esta caracterización fue evaluar la progresión de la patología, observando un incremento gradual de la resorción ósea y cambios en la respuesta inmunitaria. Además de un incremento progresivo de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β , TNF- α e IL-17A, mientras que las citoquinas antiinflamatorias IL-4 e IL-10 mostraron una disminución significativa con el tiempo. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en los niveles de IL-6 entre las lesiones y el suero. Esta discrepancia puede deberse a varios factores. En el contexto de las lesiones periapicales, IL-6 puede tener una función más localizada y específica en el microambiente periapical, contribuyendo a la inflamación y resorción ósea en el sitio de la lesión. En contraste, en el suero, los niveles de IL-6 pueden estar modulados por una respuesta inflamatoria sistémica que no refleja directamente la dinámica local de las lesiones periapicales.

Los individuos con lesiones periapicales crónicas presentan una carga inflamatoria sistémica elevada, con un aumento de mediadores pro-inflamatorios a nivel sérico, como la proteína C-reactiva. La presencia de lesiones periapicales crónicas favorece un fenotipo inflamatorio crónico de bajo grado (chronic low-grade inflammatory phenotype, CLIP), lo que está asociado con mayor

resistencia a la insulina, incremento de los triglicéridos plasmáticos, y mayor riesgo de obesidad y enfermedades cardiovasculares (Garrido et al., 2019). Estas observaciones sugieren que, mientras IL-6 puede estar desempeñando un papel específico y localizado en la patogénesis de las lesiones periapicales, su comportamiento sistémico puede ser más complejo y estar influenciado por múltiples factores sistémicos y metabólicos. Estudios previos han demostrado que IL-6 tiene roles pleiotrópicos tanto proinflamatorios como reguladores, dependiendo del contexto tisular y del estado patológico (Mihara et al., 2012; Scheller et al., 2011).

En estudios en humanos se ha reportado que el aumento de linfocitos Th17 está asociado con la progresión de las lesiones periapicales. Un incremento en las células Th17 y sus citoquinas asociadas, como IL-17A, está directamente relacionado con la severidad de las lesiones periapicales y la resorción ósea (Yang et al., 2014). La disminución de los linfocitos Treg y sus citoquinas antiinflamatorias, como IL-10 y TGF- β , contribuye a la persistencia de la inflamación en las lesiones periapicales. En lesiones periapicales crónicas, la reducción de los Treg y sus citoquinas reguladoras está vinculada con una menor capacidad de controlar la respuesta inflamatoria, perpetuando así el daño tisular y la resorción ósea (Alvarez et al., 2019). Otros estudios han determinado la

expresión de ARNm de subconjuntos linfocitarios, incluidos Foxp3 e IL-17, en lesiones periapicales activas e inactivas. Las lesiones mostraron una expresión generalizada de citoquinas; sin embargo, TNF α , IL-17, IL-21 e IFN- γ se asociaron con lesiones activas, mientras que Foxp3, IL-9, IL-4 e IL-22 se relacionaron con lesiones inactivas (Araujo-Pires et al., 2014).

Nuestros resultados demostraron una modulación dinámica de las poblaciones de células Treg y Th17 en las lesiones periapicales a lo largo del tiempo, alineándose con el entendimiento de que las lesiones periapicales exhiben fases de activación e inactivación. Específicamente, observamos un aumento significativo en las células CD4+IL-17+ el día 14, que posteriormente disminuyó el día 21. Este patrón refleja el ciclo conocido de actividad de la lesión, donde las células Th17 impulsan la respuesta inflamatoria inicial, promoviendo la osteoclastogénesis y la resorción ósea a través de la producción de IL-17A. A medida que avanza la inflamación, la respuesta inmune cambia hacia una fase reguladora, caracterizada por un aumento de CD4+Foxp3+CD25+ Tregs, que ayudan a mitigar la pérdida ósea excesiva y restaurar la homeostasis del tejido mediante la producción de citoquinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- β . Esta respuesta bifásica resalta el equilibrio crítico entre la actividad proinflamatoria mediada por Th17 y las fases de resolución mediadas por Treg en la patogénesis

de las lesiones periapicales, subrayando la importancia de la regulación inmune en las condiciones inflamatorias crónicas.

En los últimos años, con el avance de la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa, la investigación en terapia endodóntica regenerativa (RET) ha logrado resultados prometedores mediante el uso de andamios, biomateriales, factores de crecimiento y células madre para inducir a la regeneración del tejido pulpar dañado o perdido. Basado en los hallazgos de nuestra investigación, planteamos la hipótesis de que la administración de IL-35 en dosis óptimas puede no solo inhibir la resorción ósea asociada a las lesiones periapicales, sino también promover la regeneración pulpar.

Teniendo en cuenta nuestros resultados, la capacidad de IL-35 para restaurar el equilibrio inmunológico y promover la regeneración ósea emerge como una alternativa para mejorar los resultados a largo plazo en pacientes con lesiones periapicales crónicas. En el futuro, nos gustaría explorar el efecto de IL-35 en el modelo experimental de lesiones periapicales en diferentes momentos del tratamiento, específicamente a los 7, 14, 21 y 28 días. Este enfoque longitudinal permitirá identificar no solo los efectos inmediatos de IL-35, sino también su influencia a largo plazo en la regeneración del tejido óseo y la

resolución de la inflamación. Profundizar en estos aspectos podría consolidar a IL-35 como una herramienta terapéutica eficaz en el campo de la endodoncia ofreciendo nuevas estrategias para el tratamiento de patologías osteodestructivas crónicas.

La administración de hidróxido de calcio (Ca(OH)_2) es ampliamente reconocida como el estándar de oro en la terapia endodóntica debido a sus propiedades antimicrobianas y su capacidad para inducir la reparación del tejido periapical. Sin embargo, en este estudio no se utilizó Ca(OH)_2 como control comparativo debido a limitaciones en el número de animales disponibles, lo que habría afectado la validez estadística de nuestros hallazgos. Esta decisión fue tomada para enfocar nuestros recursos en evaluar de manera exhaustiva el efecto específico de la interleuquina-35 (IL-35). Es importante reconocer que la ausencia de Ca(OH)_2 en nuestro protocolo experimental representa una limitación, ya que impide una comparación directa con el tratamiento estándar. Estudios previos han demostrado que Ca(OH)_2 efectivamente modula la respuesta inflamatoria en lesiones periapicales al aumentar las citoquinas Th2 y Treg, mientras reduce las citoquinas Th1 y Th17, promoviendo así un entorno antiinflamatorio y de curación. Esta comparación es crucial para establecer la eficacia relativa de IL-35 frente a tratamientos convencionales. En futuros

estudios, sería beneficioso incluir Ca(OH)_2 para evaluar de manera más completa la potencial superioridad o complementariedad de IL-35 en la terapia endodóntica.

Otra limitación de nuestro estudio fue la imposibilidad de realizar la evaluación longitudinal de la resorción ósea en los mismos animales a lo largo del tiempo, debido a restricciones éticas. Esto nos obligó a utilizar diferentes grupos de animales para cada punto temporal de evaluación. Evaluar los mismos animales tratados con IL-35 en distintos periodos habría permitido observar la evolución de la lesión apical de manera continua, proporcionando una visión más precisa y comprensiva de la dinámica de tratamiento y curación de las lesiones periapicales. Esta restricción limita nuestra capacidad para obtener datos detallados sobre la progresión y regresión de las lesiones dentro del mismo sujeto.

En los últimos años, los avances en la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa han impulsado la investigación en terapia endodóntica regenerativa (RET), logrando resultados prometedores mediante el uso de andamios, biomateriales, factores de crecimiento y células madre para regenerar el tejido pulpar dañado o perdido (Kahler et al., 2024). Basándonos en nuestros hallazgos,

planteamos que la administración de IL-35 en dosis óptimas podría no solo inhibir la resorción ósea asociada a las lesiones periapicales, sino también promover la regeneración pulpar.

Nuestros resultados sugieren que IL-35 puede restaurar el equilibrio inmunológico y favorecer la regeneración ósea, presentándose como una alternativa viable para mejorar los resultados a largo plazo en pacientes con lesiones periapicales crónicas. En el futuro, nos proponemos explorar el efecto de IL-35 en un modelo experimental de lesiones periapicales en distintos momentos del tratamiento (7, 14, 21 y 28 días), lo que permitirá identificar tanto los efectos inmediatos como los de largo plazo de IL-35 en la regeneración del tejido óseo y la resolución de la inflamación. Este enfoque longitudinal podría consolidar a IL-35 como una herramienta terapéutica eficaz en endodoncia, ofreciendo nuevas estrategias para tratar patologías osteodestructivas crónicas.

Futuros estudios deben centrarse en determinar las dosis más efectivas y los protocolos de administración ideales para maximizar los beneficios terapéuticos de IL-35, incluyendo la frecuencia y duración del tratamiento para lograr una regeneración óptima. Es crucial profundizar en los mecanismos moleculares y celulares mediante los cuales IL-35 ejerce sus efectos, así como

en su interacción con otros factores de crecimiento y citoquinas en el microambiente periapical. La transición de estudios preclínicos a ensayos clínicos en humanos es esencial para validar los resultados obtenidos en modelos animales, evaluando la seguridad, eficacia y posibles efectos secundarios de IL-35 en pacientes con lesiones periapicales. Además, explorar el uso combinado de IL-35 con otros agentes regenerativos, como andamios, biomateriales, biomoléculas y células madre, podría potenciar los efectos regenerativos y ofrecer soluciones más integrales para la reparación del tejido dañado o perdido.

Para abordar las bondades de IL-35 de manera más económica, una alternativa viable podría ser el uso de péptidos que se unan al receptor de IL-35, replicando sus efectos inmunomoduladores sin incurrir en los costos asociados con la producción y purificación de IL-35 recombinante. Estos péptidos miméticos pueden ser diseñados para interactuar específicamente con los receptores de IL-35 (gp130 e IL-12R β 2), promoviendo la misma señalización intracelular y regulación inmunológica.

Péptidos sintéticos que imitan la acción de citoquinas han sido investigados en otros contextos terapéuticos con resultados prometedores. Por ejemplo, el uso de péptidos miméticos del antagonista del receptor de IL-1 (IL-

1Ra) ha mostrado eficacia en la reducción de la inflamación en modelos de artritis reumatoide (Lackington et al., 2022). De manera similar, un péptido mimético de IL-10 ha sido desarrollado y probado en ensayos clínicos, demostrando su potencial para modular la respuesta inmune en el tratamiento de cánceres avanzados (Naing et al., 2016).

Estos péptidos pueden sintetizarse químicamente a un costo significativamente menor que las proteínas completas y, sin embargo, inducir la expansión de células Treg y la inhibición de células Th17, replicando el efecto antiinflamatorio y anti-resortivo de IL-35. La investigación de péptidos miméticos ha mostrado promesa en otros contextos terapéuticos, lo que sugiere que esta estrategia podría ser aplicable en el manejo de enfermedades inflamatorias crónicas y la regeneración ósea. Estudios futuros deben enfocarse en la identificación y optimización de estos péptidos, evaluando su eficacia y seguridad en modelos experimentales de lesiones periapicales.

Estos resultados son de gran relevancia, ya que no solo validan la hipótesis propuesta en nuestro estudio, sino que también amplían la comprensión del rol de IL-35 en la modulación de la respuesta inmune y la protección contra la destrucción ósea en enfermedades inflamatorias. La evidencia conjunta de

estos estudios sugiere que IL-35 podría tener un amplio espectro de aplicaciones terapéuticas en patologías inflamatorias crónicas más allá de las lesiones periapicales, como la periodontitis y la osteoartritis, donde la regulación del balance Th17/Treg y la inhibición de la osteoclastogénesis son fundamentales para prevenir la progresión de la enfermedad y preservar la integridad ósea.

10. CONCLUSIONES.

En lesiones periapicales de origen endodóntico, el tratamiento endodóntico suplementado con IL-35 redujo la resorción ósea alveolar de manera dependiente de la dosis. Este efecto se evidenció por una reducción significativa en el volumen de resorción ósea y una disminución en el número de osteoclastos TRAP+. Además, el tratamiento con IL-35 indujo un incremento en la expresión de ARNm de Foxp3, IL-10, IL-35 y TGF- β , OPG, y una disminución en la expresión de ROR γ t, IL-6, IL-17A y RANKL en las lesiones periapicales.

Asimismo, se observó un aumento en el número de linfocitos Treg y una reducción en el número de linfocitos Th17, modulando efectivamente el desequilibrio Th17/Treg.

11. REFERENCIAS

- Alvarez, C., Monasterio, G., Cavalla, F., Córdova, L. A., Hernández, M., Heymann, D., Garlet, G. P., Sorsa, T., Pärnänen, P., Lee, H. M., Golub, L. M., Vernal, R., & Kantarci, A. (2019). Osteoimmunology of Oral and Maxillofacial Diseases: Translational Applications Based on Biological Mechanisms. *Front Immunol*, *10*, 1664. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01664>
- Alvarez, C., Rojas, C., Rojas, L., Cafferata, E. A., Monasterio, G., & Vernal, R. (2018). Regulatory T Lymphocytes in Periodontitis: A Translational View. *Mediators Inflamm*, *2018*, 7806912. <https://doi.org/10.1155/2018/7806912>
- Andrade, A. L., Nonaka, C. F., Gordón-Núñez, M. A., Freitas Rde, A., & Galvão, H. C. (2013). Immunoexpression of interleukin 17, transforming growth factor β 1, and forkhead box P3 in periapical granulomas, radicular cysts, and residual radicular cysts. *J Endod*, *39*(8), 990-994. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.04.028>
- Araujo-Pires, A. C., Francisconi, C. F., Biguetti, C. C., Cavalla, F., Aranha, A. M., Letra, A., Trombone, A. P., Faveri, M., Silva, R. M., & Garlet, G. P. (2014). Simultaneous analysis of T helper subsets (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh, Tr1 and Tregs) markers expression in periapical lesions reveals multiple cytokine clusters accountable for lesions activity and inactivity status. *J Appl Oral Sci*, *22*(4), 336-346. <https://doi.org/10.1590/1678-775720140140>
- Bouxsein, M. L., Boyd, S. K., Christiansen, B. A., Guldberg, R. E., Jepsen, K. J., & Müller, R. (2010). Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*, *25*(7), 1468-1486. <https://doi.org/10.1002/jbmr.141>
- Cafferata, E. A., Castro-Saavedra, S., Fuentes-Barros, G., Melgar-Rodriguez, S., Rivera, F., Carvajal, P., Hernandez, M., Cortes, B. I., Cortez, C., Cassels, B. K., & Vernal, R. (2021). Boldine inhibits the alveolar bone resorption during ligature-induced periodontitis by modulating the Th17/Treg imbalance. *J Periodontol*, *92*(1), 123-136. <https://doi.org/10.1002/JPER.20-0055>
- Cafferata, E. A., Terraza-Aguirre, C., Barrera, R., Faundez, N., Gonzalez, N., Rojas, C., Melgar-Rodriguez, S., Hernandez, M., Carvajal, P., Cortez, C., Gonzalez, F. E., Covarrubias, C., & Vernal, R. (2020). Interleukin-35 inhibits alveolar bone resorption by modulating the Th17/Treg imbalance during periodontitis. *J Clin Periodontol*, *47*(6), 676-688. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13282>
- Calori, G. M., Donati, D., Di Bella, C., & Tagliabue, L. (2009). Bone morphogenetic proteins and tissue engineering: future directions. *Injury*, *40 Suppl 3*, S67-76. [https://doi.org/10.1016/s0020-1383\(09\)70015-4](https://doi.org/10.1016/s0020-1383(09)70015-4)

- Chen, S., Lei, H., Luo, Y., Jiang, S., Zhang, M., Lv, H., Cai, Z., & Huang, X. (2019). Micro-CT analysis of chronic apical periodontitis induced by several specific pathogens. *Int Endod J*, 52(7), 1028-1039. <https://doi.org/10.1111/iej.13095>
- Choi, J. K., & Egwuagu, C. E. (2021). Interleukin 35 Regulatory B Cells. *J Mol Biol*, 433(1), 166607. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.07.019>
- Collison, L. W., Chaturvedi, V., Henderson, A. L., Giacomini, P. R., Guy, C., Bankoti, J., Finkelstein, D., Forbes, K., Workman, C. J., Brown, S. A., Rehg, J. E., Jones, M. L., Ni, H. T., Artis, D., Turk, M. J., & Vignali, D. A. (2010). IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat Immunol*, 11(12), 1093-1101. <https://doi.org/10.1038/ni.1952>
- Collison, L. W., Delgoffe, G. M., Guy, C. S., Vignali, K. M., Chaturvedi, V., Fairweather, D., Satoskar, A. R., Garcia, K. C., Hunter, C. A., Drake, C. G., Murray, P. J., & Vignali, D. A. (2012). The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional. *Nat Immunol*, 13(3), 290-299. <https://doi.org/10.1038/ni.2227>
- Dambuza, I. M., He, C., Choi, J. K., Yu, C. R., Wang, R., Mattapallil, M. J., Wingfield, P. T., Caspi, R. R., & Egwuagu, C. E. (2017). IL-12p35 induces expansion of IL-10 and IL-35-expressing regulatory B cells and ameliorates autoimmune disease. *Nat Commun*, 8(1), 719. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00838-4>
- Díaz-Zúñiga, J., More, J., Melgar-Rodríguez, S., Jiménez-Unión, M., Villalobos-Orchard, F., Muñoz-Manríquez, C., Monasterio, G., Valdés, J. L., Vernal, R., & Paula-Lima, A. (2020). Alzheimer's Disease-Like Pathology Triggered by Porphyromonas gingivalis in Wild Type Rats Is Serotype Dependent. *Front Immunol*, 11, 588036. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.588036>
- Egwuagu, C. E., Yu, C. R., Sun, L., & Wang, R. (2015). Interleukin 35: Critical regulator of immunity and lymphocyte-mediated diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*, 26(5), 587-593. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.07.013>
- Francisconi, C. F., Vieira, A. E., Azevedo, M. C. S., Tabanez, A. P., Fonseca, A. C., Trombone, A. P. F., Letra, A., Silva, R. M., Sfeir, C. S., Little, S. R., & Garlet, G. P. (2018). RANKL Triggers Treg-Mediated Immunoregulation in Inflammatory Osteolysis. *J Dent Res*, 97(8), 917-927. <https://doi.org/10.1177/0022034518759302>
- Galler, K. M., Weber, M., Korkmaz, Y., Widbiller, M., & Feuerer, M. (2021). Inflammatory Response Mechanisms of the Dentine-Pulp Complex and the Periapical Tissues. *Int J Mol Sci*, 22(3). <https://doi.org/10.3390/ijms22031480>
- Gao, P., Su, Z., Lv, X., & Zhang, J. (2017). Interleukin-35 in Asthma and Its Potential as an Effective Therapeutic Agent. *Mediators Inflamm*, 2017, 5931865. <https://doi.org/10.1155/2017/5931865>
- Garrido, M., Cárdenas, A. M., Astorga, J., Quinlan, F., Valdés, M., Chaparro, A., Carvajal, P., Pussinen, P., Huamán-Chipana, P., Jalil, J. E., & Hernández, M. (2019). Elevated Systemic Inflammatory Burden and Cardiovascular Risk in Young

- Adults with Endodontic Apical Lesions. *J Endod*, 45(2), 111-115.
<https://doi.org/10.1016/j.joen.2018.11.014>
- Goto, H., Kikuchi, T., Takayanagi, Y., Kamiya, Y., Suzuki, Y., Kawamura, S., Sawada, N., Hayashi, J. I., & Mitani, A. (2023). Ebi3 knockout aggravates experimental periodontitis via Th17 polarization. *J Clin Periodontol*, 50(10), 1406-1418.
<https://doi.org/10.1111/jcpe.13859>
- Hasegawa, H., Mizoguchi, I., Chiba, Y., Ohashi, M., Xu, M., & Yoshimoto, T. (2016). Expanding Diversity in Molecular Structures and Functions of the IL-6/IL-12 Heterodimeric Cytokine Family. *Front Immunol*, 7, 479.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00479>
- Hikosaka, Y., Nitta, T., Ohigashi, I., Yano, K., Ishimaru, N., Hayashi, Y., Matsumoto, M., Matsuo, K., Penninger, J. M., Takayanagi, H., Yokota, Y., Yamada, H., Yoshikai, Y., Inoue, J., Akiyama, T., & Takahama, Y. (2008). The cytokine RANKL produced by positively selected thymocytes fosters medullary thymic epithelial cells that express autoimmune regulator. *Immunity*, 29(3), 438-450.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.06.018>
- Irie, M. S., Rabelo, G. D., Spin-Neto, R., Dechichi, P., Borges, J. S., & Soares, P. B. F. (2018). Use of Micro-Computed Tomography for Bone Evaluation in Dentistry. *Braz Dent J*, 29(3), 227-238. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201801979>
- Ishii, T., Ruiz-Torruella, M., Ikeda, A., Shindo, S., Movila, A., Mawardi, H., Albassam, A., Kayal, R. A., Al-Dharrab, A. A., Egashira, K., Wisitrasameewong, W., Yamamoto, K., Mira, A. I., Sueishi, K., Han, X., Taubman, M. A., Miyamoto, T., & Kawai, T. (2018). OC-STAMP promotes osteoclast fusion for pathogenic bone resorption in periodontitis via up-regulation of permissive fusogen CD9. *Faseb j*, 32(7), 4016-4030. <https://doi.org/10.1096/fj.201701424R>
- Jara, C. M., Pereira, K. K. Y., Maito, F. L. D. M., Adorno, C. G., & Gomes, M. S. (2021). Impact of endodontic and periodontal diseases and treatments on the aorta and liver of obese and non-obese rats. *International Endodontic Journal*.
<https://doi.org/10.1111/iej.13601>
- Jiang, Y., Zhao, J., Liao, E. Y., Dai, R. C., Wu, X. P., & Genant, H. K. (2005). Application of micro-CT assessment of 3-D bone microstructure in preclinical and clinical studies. *J Bone Miner Metab*, 23 Suppl, 122-131.
<https://doi.org/10.1007/bf03026336>
- Kahler, B., Lu, J., & Taha, N. A. (2024). Regenerative endodontic treatment and traumatic dental injuries. *Dent Traumatol*. <https://doi.org/10.1111/edt.12979>
- Takehashi, S., Stanley, H., & Fitzgerald, R. (1965). The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology*, 20(3), 340-349.
- Kamiya, Y., Kikuchi, T., Goto, H., Okabe, I., Takayanagi, Y., Suzuki, Y., Sawada, N., Okabe, T., Suzuki, Y., Kondo, S., Hayashi, J. I., & Mitani, A. (2020). IL-35 and

- RANKL Synergistically Induce Osteoclastogenesis in RAW264 Mouse Monocytic Cells. *Int J Mol Sci*, 21(6). <https://doi.org/10.3390/ijms21062069>
- Lackington, W. A., Gehweiler, D., Zhao, E., Zderic, I., Nehrbass, D., Zeiter, S., González-Vázquez, A., O'Brien, F. J., Stoddart, M. J., & Thompson, K. (2022). Interleukin-1 receptor antagonist enhances the therapeutic efficacy of a low dose of rhBMP-2 in a weight-bearing rat femoral defect model. *Acta Biomater*, 149, 189-197. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.07.012>
- Li, Y., Li, D., Li, Y., Wu, S., Jiang, S., Lin, T., Xia, L., Shen, H., & Lu, J. (2016). Interleukin-35 upregulates OPG and inhibits RANKL in mice with collagen-induced arthritis and fibroblast-like synoviocytes. *Osteoporos Int*, 27(4), 1537-1546. <https://doi.org/10.1007/s00198-015-3410-9>
- Li, Y., Wang, X., & Lu, J. (2023). Interleukin-35 Promote Osteogenesis and Inhibit Adipogenesis: Role of Wnt/ β -Catenin and PPAR γ Signaling Pathways. *Inflammation*, 46(2), 522-533. <https://doi.org/10.1007/s10753-022-01749-3>
- Li, Y., Wang, Y., Liu, Y., Wang, Y., Zuo, X., Li, Y., & Lu, X. (2014). The possible role of the novel cytokines il-35 and il-37 in inflammatory bowel disease. *Mediators Inflamm*, 2014, 136329. <https://doi.org/10.1155/2014/136329>
- Lieberman, J. R., Daluiski, A., & Einhorn, T. A. (2002). The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am*, 84(6), 1032-1044. <https://doi.org/10.2106/00004623-200206000-00022>
- Liu, K., Huang, A., Nie, J., Tan, J., Xing, S., Qu, Y., & Jiang, K. (2021). IL-35 Regulates the Function of Immune Cells in Tumor Microenvironment. *Front Immunol*, 12, 683332. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.683332>
- Luo, C. Y., Wang, L., Sun, C., & Li, D. J. (2011). Estrogen enhances the functions of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells that suppress osteoclast differentiation and bone resorption in vitro. *Cell Mol Immunol*, 8(1), 50-58. <https://doi.org/10.1038/cmi.2010.54>
- Maddaloni, M., Kochetkova, I., Hoffman, C., & Pascual, D. W. (2018). Delivery of IL-35 by Lactococcus lactis Ameliorates Collagen-Induced Arthritis in Mice. *Front Immunol*, 9, 2691. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02691>
- Melgar-Rodríguez, S., Díaz-Zúñiga, J., Alvarez, C., Rojas, L., Monasterio, G., Carvajal, P., Escobar, A., Sanz, M., & Vernal, R. (2016). Serotype b of Aggregatibacter actinomycetemcomitans increases osteoclast and memory T-lymphocyte activation. *Mol Oral Microbiol*, 31(2), 162-174. <https://doi.org/10.1111/omi.12112>
- Mihara, M., Hashizume, M., Yoshida, H., Suzuki, M., & Shiina, M. (2012). IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)*, 122(4), 143-159. <https://doi.org/10.1042/cs20110340>
- Monasterio, G., Budini, V., Fernández, B., Castillo, F., Rojas, C., Alvarez, C., Cafferata, E. A., Vicencio, E., Cortés, B. I., Cortez, C., & Vernal, R. (2019). IL-22-

- expressing CD4(+) AhR(+) T lymphocytes are associated with RANKL-mediated alveolar bone resorption during experimental periodontitis. *J Periodontal Res*, 54(5), 513-524. <https://doi.org/10.1111/jre.12654>
- Naing, A., Papadopoulos, K. P., Autio, K. A., Ott, P. A., Patel, M. R., Wong, D. J., Falchook, G. S., Pant, S., Whiteside, M., Rasco, D. R., Mumm, J. B., Chan, I. H., Bendell, J. C., Bauer, T. M., Colen, R. R., Hong, D. S., Van Vlasselaer, P., Tannir, N. M., Oft, M., & Infante, J. R. (2016). Safety, Antitumor Activity, and Immune Activation of Pegylated Recombinant Human Interleukin-10 (AM0010) in Patients With Advanced Solid Tumors. *J Clin Oncol*, 34(29), 3562-3569. <https://doi.org/10.1200/jco.2016.68.1106>
- Nair, P. N. (2004). Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med*, 15(6), 348-381. <https://doi.org/10.1177/154411130401500604>
- Naufel, A. O., Aguiar, M. C. F., Madeira, F. M., & Abreu, L. G. (2017). Treg and Th17 cells in inflammatory periapical disease: a systematic review. *Braz Oral Res*, 31, e103. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2017.vol31.0103>
- Niedbala, W., Wei, X. Q., Cai, B., Hueber, A. J., Leung, B. P., McInnes, I. B., & Liew, F. Y. (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. <https://doi.org/10.1002/eji.200737810>
- Okada, K., Fujimura, T., Kikuchi, T., Aino, M., Kamiya, Y., Izawa, A., Iwamura, Y., Goto, H., Okabe, I., Miyake, E., Hasegawa, Y., Mogi, M., & Mitani, A. (2017). Effect of interleukin (IL)-35 on IL-17 expression and production by human CD4(+) T cells. *PeerJ*, 5, e2999. <https://doi.org/10.7717/peerj.2999>
- Okamoto, K., & Takayanagi, H. (2019). Osteoimmunology. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 9(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031245>
- Olson, B. M., Sullivan, J. A., & Burlingham, W. J. (2013). Interleukin 35: a key mediator of suppression and the propagation of infectious tolerance. *Front Immunol*, 4, 315. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00315>
- Parachuru, V. P. B., Coates, D. E., Milne, T. J., Rich, A. M., & Seymour, G. J. (2018). FoxP3(+) regulatory T cells, interleukin 17 and mast cells in chronic inflammatory periodontal disease. *J Periodontal Res*, 53(4), 622-635. <https://doi.org/10.1111/jre.12552>
- Peixoto, R. F., Pereira Jdos, S., Nonaka, C. F., Silveira, E. J., & Miguel, M. C. (2012). Immunohistochemical analysis of FoxP3+ cells in periapical granulomas and radicular cysts. *Arch Oral Biol*, 57(9), 1159-1164. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.02.005>
- Peng, M., Wang, Y., Qiang, L., Xu, Y., Li, C., Li, T., Zhou, X., Xiao, M., & Wang, J. (2018). Interleukin-35 Inhibits TNF- α -Induced Osteoclastogenesis and Promotes

- Apoptosis via Shifting the Activation From TNF Receptor-Associated Death Domain (TRADD)-TRAF2 to TRADD-Fas-Associated Death Domain by JAK1/STAT1. *Front Immunol*, 9, 1417. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01417>
- Pinto, K. P., Fidalgo, T., de Lima, C. O., Lopes, R. T., Freitas-Fernandes, L. B., Valente, A. P., Sassone, L. M., & Silva, E. (2024). Chronic alcohol and nicotine consumption as catalyst for systemic inflammatory storm and bone destruction in apical periodontitis. *Int Endod J*, 57(2), 178-194. <https://doi.org/10.1111/iej.13994>
- Pol, J. G., Caudana, P., Paillet, J., Piaggio, E., & Kroemer, G. (2020). Effects of interleukin-2 in immunostimulation and immunosuppression. *J Exp Med*, 217(1). <https://doi.org/10.1084/jem.20191247>
- Sakaguchi, S., Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., & Yamaguchi, T. (2009). Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol*, 21(10), 1105-1111. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxp095>
- Sawant, D. V., Hamilton, K., & Vignali, D. A. (2015). Interleukin-35: Expanding Its Job Profile. *J Interferon Cytokine Res*, 35(7), 499-512. <https://doi.org/10.1089/jir.2015.0015>
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., & Rose-John, S. (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*, 1813(5), 878-888. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.01.034>
- Schmidlin, P. R., Dehghannejad, M., & Fakheran, O. (2021). Interleukin-35 pathobiology in periodontal disease: a systematic scoping review. *BMC Oral Health*, 21(1), 139. <https://doi.org/10.1186/s12903-021-01515-1>
- Shindo, S., Hosokawa, Y., Hosokawa, I., & Shiba, H. (2019). Interleukin (IL)-35 Suppresses IL-6 and IL-8 Production in IL-17A-Stimulated Human Periodontal Ligament Cells. *Inflammation*, 42(3), 835-840. <https://doi.org/10.1007/s10753-018-0938-9>
- Siddiqui, Y. D., Omori, K., Ito, T., Yamashiro, K., Nakamura, S., Okamoto, K., Ono, M., Yamamoto, T., Van Dyke, T. E., & Takashiba, S. (2019). Resolvin D2 Induces Resolution of Periapical Inflammation and Promotes Healing of Periapical Lesions in Rat Periapical Periodontitis. *Front Immunol*, 10, 307. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00307>
- Siqueira, J. F., Jr. (2002). Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 94(3), 281-293. <https://doi.org/10.1067/moe.2002.126163>
- Siqueira, J. F., Jr., & Rôças, I. N. (2007). Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. *Braz Dent J*, 18(4), 267-280. <https://doi.org/10.1590/s0103-64402007000400001>
- Waldmann, H., & Cobbold, S. (2009). Regulatory T cells: context matters. *Immunity*, 30(5), 613-615. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.04.007>

- Wang, R. X., Yu, C. R., Dambuza, I. M., Mahdi, R. M., Dolinska, M. B., Sergeev, Y. V., Wingfield, P. T., Kim, S. H., & Egwuagu, C. E. (2014). Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. *Nat Med*, *20*(6), 633-641. <https://doi.org/10.1038/nm.3554>
- Wei, S., Kawashima, N., Suzuki, N., Xu, J., Takahashi, S., Zhou, M., Koizumi, Y., & Suda, H. (2013). Kinetics of Th17-related cytokine expression in experimentally induced rat periapical lesions. *Aust Endod J*, *39*(3), 164-170. <https://doi.org/10.1111/j.1747-4477.2012.00371.x>
- Wirtz, S., Billmeier, U., McHedlidze, T., Blumberg, R. S., & Neurath, M. F. (2011). Interleukin-35 mediates mucosal immune responses that protect against T-cell-dependent colitis. *Gastroenterology*, *141*(5), 1875-1886. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.07.040>
- Xu, J., Yu, L., Liu, F., Wan, L., & Deng, Z. (2023). The effect of cytokines on osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling in osteoporosis: a review. *Front Immunol*, *14*, 1222129. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1222129>
- Yang, S., Zhu, L., Xiao, L., Shen, Y., Wang, L., Peng, B., & Haapasalo, M. (2014). Imbalance of interleukin-17+ T-cell and Foxp3+ regulatory T-cell dynamics in rat periapical lesions. *J Endod*, *40*(1), 56-62. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.09.033>
- Yoneda, N., Noiri, Y., Matsui, S., Kuremoto, K., Maezono, H., Ishimoto, T., Nakano, T., Ebisu, S., & Hayashi, M. (2017). Development of a root canal treatment model in the rat. *Sci Rep*, *7*(1), 3315. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03628-6>
- Yuan, L., Li, Y., Liu, D., Zhang, H., Yang, J., Shen, H., Xia, L., Yao, L., & Lu, J. (2024). Interleukin-35 protein inhibits osteoclastogenesis and attenuates collagen-induced arthritis in mice. *J Cell Physiol*. <https://doi.org/10.1002/jcp.31231>
- Zaiss, M. M., Axmann, R., Zwerina, J., Polzer, K., Gückel, E., Skapenko, A., Schulze-Koops, H., Horwood, N., Cope, A., & Schett, G. (2007). Treg cells suppress osteoclast formation: a new link between the immune system and bone. *Arthritis Rheum*, *56*(12), 4104-4112. <https://doi.org/10.1002/art.23138>
- Zhang, H., Li, Y., Yuan, L., Yao, L., Yang, J., Xia, L., Shen, H., & Lu, J. (2021). Interleukin-35 Is Involved in Angiogenesis/Bone Remodeling Coupling Through T Helper 17/Interleukin-17 Axis. *Front Endocrinol (Lausanne)*, *12*, 642676. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.642676>
- Zhang, X., Zhang, Z., He, Z., Ju, M., Li, J., Yuan, J., Jing, Y., Li, K., Liu, Y., & Li, G. (2018). Interleukin 35 induced Th2 and Tregs bias under normal conditions in mice. *PeerJ*, *6*, e5638. <https://doi.org/10.7717/peerj.5638>
- Zhu, L., Hua, F., Ding, W., Ding, K., Zhang, Y., & Xu, C. (2020). The correlation between the Th17/Treg cell balance and bone health. *Immun Ageing*, *17*, 30. <https://doi.org/10.1186/s12979-020-00202-z>

12. ANEXOS

Anexo 1: Certificado CICUA



Santiago, 11 de octubre de 2022
Certificado N°: 22621 – MED – UCH

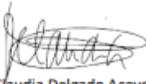
CERTIFICADO

El Comité Institucional de **Cuidado** y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica que en el Protocolo **CBA 1228 FMUCH** del Proyecto de Investigación titulado **"Efecto de interleuquina-35 en el balance Th17/Treg y el hueso alveolar perirradicular en lesiones periapicales experimentales de origen endodóntico"**, del investigador **Sr. Alfredo Sierra**, Tesista del Programa de Doctorado en Ciencias Odontológicas, Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y del académico patrocinante **Dr. José Luis Valdés**, Profesor Titular, Departamento de Neurociencias, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, no se plantean acciones en sus procedimientos que contravengan las normas bioéticas 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.

Se otorga la presente certificación para el uso de **60 ratas**, especie *Rattus norvegicus*, cepa Sprague Dawley, provenientes del **Bioterio Central, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile**, desde el **11 de octubre del 2022 hasta el 31 de agosto del 2023**, tiempo estimado de ejecución del estudio, el cual será financiado por los proyectos **Fondecyt Regular N° 1220999, Regional Development Program IADR y Beca ANID Doctorado Nacional N° 21331750**.

Los investigadores se han 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. Además, el CICUA realizará un seguimiento de este protocolo durante su ejecución para resguardar el cumplimiento de las normativas institucionales y nacionales.

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.


Claudia Delgado Acevedo
Directora Ejecutiva
CICUA – VID
Universidad de Chile




Dr. Emilio Herrera Videla
Presidente
CICUA - VID
Universidad de Chile

Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA)
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo (VID) – Universidad de Chile
<http://www.uchile.cl/portal/investigacion/152120/comite-institucional-de-cuidado-y-uso-de-animales-cicua>

Anexo 2: Partidores utilizados para realizar las ampliaciones mediante RT-qPCR.

Objetivo	Forward primer	Reverse primer
ROR γ t	<i>ACGACCCTGGACTCCAATAA</i>	<i>AGTAGGTGATGGTGGGAAGTAG</i>
IL-17A	<i>CAGGGAGAGCTTCATCTGTGT</i>	<i>GCTGAGCTTTGAGGGATGAT</i>
IL-6	<i>TGATGGATGCTACCAAAGTGG</i>	<i>TTCATGTACTCCAGGTAGCTATGG</i>
RANKL	<i>TGAAGACACACTACCTGACTCCT G</i>	<i>CCCACAATGTGTTGCAGTTC</i>
OPG	<i>GTTTCCCGAGGACCACAAT</i>	<i>CCATTCAATGATGTCCAGGAG</i>
Foxp3	<i>CGAAAGTGGCAGAGAGGTATTG</i>	<i>AAGGCAGAGTCAGGAGAAGTAG</i>
TGF- β 1	<i>TGGAGCAACATGTGGAAGTC</i>	<i>GTCAGCAGCCGGTTACCA</i>
IL-10	<i>GCTTCATCCCTGAAAAGTGTG</i>	<i>TGCTACAAAGGCAGACAAACA</i>
Ebi3	<i>GCTCCCCTGGTTACTGAA</i>	<i>ACGGGATACCGAGAAGCAT</i>
18S rRNA	<i>GCAATTATTCCCATGAACG</i>	<i>GGGACTTAATCAACGCAAGC</i>

Anexo 3: Panel de Anticuerpos para caracterización fenotípica de linfocitos T en el modelo de lesión periapical experimental.

Anticuerpo	Fluoróforo
CD4	BV421
CD3	BV605
CD45	APC-Cy7
CD25	BV 711
FoxP3	FITC
RORyt	Ror pe-cf594
IL-17A	PE-Cy7
IL-10	Alexa fluor 647 (APC)
TGF- β 1	Perp cy 5.5
Viabilidad	BUV 496 (zombiee UV)

Anexo 4. Productos.

1. Publicaciones.

- Sierra-Cristancho A, González-Osuna L, Balanta-Melo J, Cafferata EA, Rojas C, Melgar-Rodríguez S, Carvajal P, Vernal R. A micro-CT analysis of radicular dentine thickness in mandibular first premolars presenting C-shaped root canals: Identification of potential danger zones. *International Endodontic Journal* 2022; 55(6): 672-684. doi: 10.1111/iej.13740.

- González-Osuna L, Sierra-Cristancho A, Cafferata EA, Melgar-Rodríguez S, Rojas C, Carvajal P, Cortez C, Vernal R. Senescent CD4+CD28- T lymphocytes as a potential driver of Th17/Treg imbalance and alveolar bone resorption during periodontitis. *International Journal of Molecular Sciences* 2022; 23(5): 2543.

2. Participación en Proyectos de investigación con registro formal

Título proyecto: Periodontitis and dementias, and the role of the gut dysbiosis: looking for the intestinal inflammation, intestinal barrier permeability and microbiota changes, for the new therapeutic strategies development.

Código: RDP-IADR 2023-2025.

Fuente de financiamiento: International Association for Dental Research.

Años de inicio y término: junio de 2023 a mayo de 2025.

Nombre del investigador responsable: Jaime Díaz Zúñiga.

Calidad de participación: Alumno tesista de doctorado.

Título proyecto: Efecto de la periodontitis experimental en la disbiosis intestinal y la enfermedad de Alzheimer.

Código: DIUDA Regular 22433.

Fuente de financiamiento: Universidad de Atacama.

Años de inicio y término: enero de 2023 a enero de 2025.

Nombre del investigador responsable: Jaime Díaz Zúñiga.

Calidad de participación: Alumno tesista de doctorado.

3. Presentaciones a Congresos

- Avances en micro morfometría 3d: Del laboratorio a la práctica clínica”. V Congreso de actualización e investigación en endodoncia. Universidad de la Frontera. 2 de diciembre 2022.

- Redefiniendo zonas de peligro anatómicas en endodoncia”. XXXIV Reunión anual IADR división Chile. 03,04 y 05 de noviembre 2022.