



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

“Presencia y rol de las células NKT en la etiopatogenia de la periodontitis: Una revisión sistemática exploratoria”

Miguel Ángel Peña Jorquera

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REVISIÓN SISTEMÁTICA CUALITATIVA
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Samanta Melgar Rodríguez

TUTOR ASOCIADO

Prof. Dr. Jaime Díaz Zúñiga

TUTOR ASESOR

Dr. Richard García Betancourt

Adscrito a proyecto RDP-IADR 2022-2023 y PRI-ODO 15-2021

Santiago, Chile

2023



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

“Presencia y rol de las células NKT en la etiopatogenia de la periodontitis: Una revisión sistemática exploratoria”

Miguel Ángel Peña Jorquera

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REVISIÓN SISTEMÁTICA CUALITATIVA
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Samanta Melgar Rodríguez

TUTOR ASOCIADO

Prof. Dr. Jaime Díaz Zúñiga

TUTOR ASESOR

Dr. Richard García Betancourt

Adscrito a proyecto RDP-IADR 2022-2023 y PRI-ODO 15-2021

Santiago, Chile

2023

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, María y Miguel, por su esfuerzo, dedicación y entrega incondicional. A mis abuelos, Elena y Aliro, que han llenado mi vida de cariño y bondad. A mi hermana, María Teresa, que ha sido un apoyo invaluable siempre. A Máximo, mi sobrino, que es motivación diaria desde que llegó a alegrar y llenar de ternura nuestras vidas. Los amo.

A Juan, mi padrino, de quien aprendí lo hermoso que es ayudar a quienes lo necesitan. A mi mejor amigo, mi hermano, Andrés, por su inagotable sostén y por nunca permitirme agachar la cabeza. A Lara, que ilumina mis días.

A mis tutores, Prof. Samanta Melgar y Prof. Dr. Jaime Díaz, por su compromiso, apoyo y amabilidad durante este proceso.

A aquellos docentes y funcionarios de la facultad que diariamente entregan un servicio de calidad humana y profesional a estudiantes y pacientes.

A mis amigos, Nicolás F, Jennifer, Fernando, Nicolas G, Matías, Sebastián S, Nicolás D, Joshua, Sebastián C, Mónica, Josefa, Oscar, Daniel, Isidora y Antonia que estuvieron conmigo en los buenos, malos y peores momentos.

A todos ellos y a todos aquellos que no fueron mencionados, pero que formaron parte del camino, fueron apoyo y me acompañaron durante mi estadía en la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Eternamente agradecido.

ÍNDICE

1. RESUMEN	6
2. MARCO TEÓRICO	7
2.1. <i>Características fenotípicas de las células NKT</i>	7
2.2. <i>Clasificación y desarrollo de las células NKT</i>	10
2.3. <i>Funciones efectoras de las células NKT</i>	12
2.4. <i>Rol de las células NKT en las patologías inflamatorias y osteolíticas</i>	14
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	16
4. OBJETIVO GENERAL	16
5. METODOLOGÍA	17
5.1. <i>Criterios de elegibilidad: Inclusión y exclusión</i>	17
5.2. <i>Estrategia de búsqueda</i>	18
5.3. <i>Extracción de los datos y selección de los estudios</i>	19
5.4. <i>Análisis de los datos</i>	19
6. RESULTADOS	21
6.1. <i>Presencia y rol de las células NKT en la enfermedad periodontal</i>	22
6.2. <i>Presencia de células NKT en tejido periodontal de pacientes con periodontitis</i>	25
6.3. <i>Rol de las células NKT en tejidos periodontales de pacientes con periodontitis</i>	30
6.4. <i>Rol de células NKT en periodontitis experimental</i>	31
6.5. <i>Concordancia entre revisores</i>	38
6.6. <i>Análisis de riesgo de sesgo de los estudios</i>	38
7. DISCUSIÓN	43
7.1. <i>Presencia de las células NKT en tejido oral de pacientes con periodontitis</i>	43
7.2. <i>Etiopatogenia de la periodontitis y activación de las células NKT</i>	44
7.3. <i>Células NKT y su relación con la resorción ósea alveolar durante la periodontitis</i>	46
7.4. <i>Expresión de citoquinas por parte de células NKT</i>	48
7.5. <i>Heterogeneidad de los estudios</i>	50
7.6. <i>Análisis de riesgo de sesgo de los estudios</i>	51
8. CONCLUSIONES	53
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
10. ANEXOS	64

1. RESUMEN.

Introducción: Las células T asesinas naturales (NKT) corresponden a una subpoblación linfocitaria. Difieren de las células T $\alpha\beta$ convencionales, ya que presentan una cadena TCR invariante V α 24J α Q (murinos: V α 14J α 281). A su vez, estas células comparten características de las células *Natural Killer* (NK), debido a que expresan el marcador CD161 (murinos: NK1.1). Además, se caracterizan por presentar funciones efectoras que intervienen en la respuesta inmune, viéndose involucradas en diversas enfermedades autoinmunes como hígado graso no alcohólico, encefalomiелitis autoinmune, alopecia areata, artritis reumatoidea, osteoporosis, entre otras, sin embargo, la evidencia en periodontitis es escasa. En esta revisión se analizarán los estudios disponibles que permitan establecer la presencia e instaurar el rol de las células NKT en la etiopatogenia de la periodontitis.

Metodología: La investigación se realizó siguiendo el protocolo PRISMA-P y su extensión para *scoping reviews*. Se seleccionaron estudios observacionales y experimentales *in vivo* e *in vitro* que presentaban como objetivo establecer la proporción y/o rol de las células NKT en tejido periodontal. Se incluyeron artículos de los últimos 25 años, en idioma inglés o castellano. La búsqueda se realizó en las bases de datos Medline vía PubMed, Embase, Web of Science y Scopus. Los estudios fueron analizados por dos revisores independientes y un tercer revisor tomó la decisión final en situaciones de duda. Finalmente, por medio de las herramientas Newcastle-Ottawa y Syrcle se evaluó el riesgo de sesgo.

Resultados: Se encontraron 130 artículos de los que se seleccionaron 5 para su análisis, presentando un riesgo de sesgo moderado. Se estableció la presencia de células NKT en tejidos periodontales en salud y un incremento en su número en periodontitis. La activación de estas células *in vitro* e *in vivo* evidenció un incremento en los niveles de interleuquinas, marcadores inflamatorios y resorción alveolar.

Conclusiones: En el tejido periodontal las células NKT están presentes en salud y aumentadas en periodontitis. El incremento de estas células durante la periodontitis podría establecer una relación con el desarrollo, progresión y/o regulación de la periodontitis, sin embargo, se requiere mayor cantidad de estudios para establecer el rol de estas células.

2. MARCO TEÓRICO.

Las células T asesinas naturales (NKT) se han establecido como un nuevo linaje de células T (Wingender y cols, 2015). Estas células se han identificado tanto en murinos como en humanos, pudiendo tener un rol fundamental en la regulación de los linfocitos T (Wingender y cols, 2015). Las células NKT difieren de las células T $\alpha\beta$ convencionales debido a que cuentan con un receptor antigénico de células T (TCR) restringido que utiliza segmentos génicos para murinos (V α 14J α 28/V β 8, V β 7, V β 2) y humanos (V α 24J α Q/V β 11) (Porcelli y cols, 1993; Lantz y Bendelac, 1994, Benlagha y cols, 2000; Godfrey y cols, 2000; Bendelac y cols, 2007). Tanto las células NKT humanas, como murinas, interactúan de manera específica con las células que presentan glicolípidos asociados al receptor CD1d, molécula monomórfica de la clase Ib (Benlagha y cols, 2000), que tiene un rol inmunoregulador importante al permitir la producción de interleuquina (IL)-4 e interferón (IFN)- γ pudiendo influir en la respuesta inmune (Benlagha y cols, 2000; Bendelac y cols, 2007). Además, las células NKT murinas expresan NK1.1 y las humanas su homólogo CD161, marcadores específicos de células *Natural Killer* (NK) (Godfrey y cols, 2000; Bendelac y cols, 2007). Aunque la función de las células NKT y su posible rol en la patogénesis de las enfermedades aún no se define por completo, varios modelos experimentales asocian la respuesta de las células NKT contra microorganismos o células tumorales. La alteración del rol inmunoregulador de las células NKT, dependiendo número o función, se ha visto involucrado en diversas enfermedades autoinmunes (Godfrey y cols, 2000). Así, en esta revisión sistemática cualitativa se analizará la presencia y el rol de las células NKT en la periodontitis.

2.1 Características fenotípicas de las células NKT

En el año 1987, diversos grupos de investigación publicaron la existencia de una subpoblación particular de linfocitos T $\alpha\beta$ en murinos que expresaban una cadena V β 8 del TCR con una mayor frecuencia que en los linfocitos T convencionales (Fowlkes y cols, 1987), carecían de la expresión de CD4 y CD8 (Bendelac y cols, 1995; Benlagha y cols, 2000) y compartían características con las células asesinas naturales (NK), específicamente la expresión del marcador NK1.1 (Wingender y cols, 2015; Bennstein, 2017). El interés de estas células aumentó cuando se

describió que producen citoquinas inmuno-reguladoras, tales como IL-4, IFN- γ y factor de necrosis tumoral (TNF)- α (Bendelac y cols, 1995; Benlagha y cols, 2000).

En particular, las células NKT poseen una cadena invariante del TCR (Dellabona y cols, 1994; Bendelac y cols, 1995; Bendelac y cols, 2007) que en humanos se expresa como: una cadena V α 24/J α 18 (murinos: V α 14/J α 18) junto con una cadena V β 11 (murinos: V β 2, V β 8, V β 7). Además, presenta un marcador de fenotipo de células T de memoria efectora, CD45RO (Bendelac y cols, 2007; Montoya y cols, 2007), marcador que tiene una gran capacidad para producir citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, además de moléculas co-estimuladoras que promueven la activación celular (Bendelac y cols, 2007; Montoya y cols, 2007). Los linfocitos NKT son independientes de la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), carecen de la expresión de CD4 y CD8 (Ohteki y MacDonald, 1994) y poseen un ligando específico que regula su función: la molécula CD1d (Bendelac, 1995; Exley y cols, 1997; Kawano y cols, 1997; Roark y cols, 1998; Wingender y cols, 2015; Carreño y cols, 2016). En efecto, la molécula CD1d es una molécula homóloga al MHC expresada principalmente por células del linaje hematopoyético (monocitos, células dendríticas, linfocitos T y B), por células no hematopoyéticas (Brigl y Brenner, 2004) y tiene 3 dominios extracelulares (α 1, α 2 y α 3) que forman un heterodímero con la β 2-microglobulina y presenta antígenos lipídicos hidrofóbicos a las células T (Bendelac y cols, 1995; Carreno y cols, 2016). Así, la evidencia sugiere que este linaje de linfocitos T reconocen antígenos glicolipídicos como el α -galactosilceramida (α -GalCer) presentados por la molécula CD1d, asociado al TCR invariante y en conjunto con moléculas co-estimuladoras promueven la activación de estas células (Wang y cols, 2018) (Figura 1).

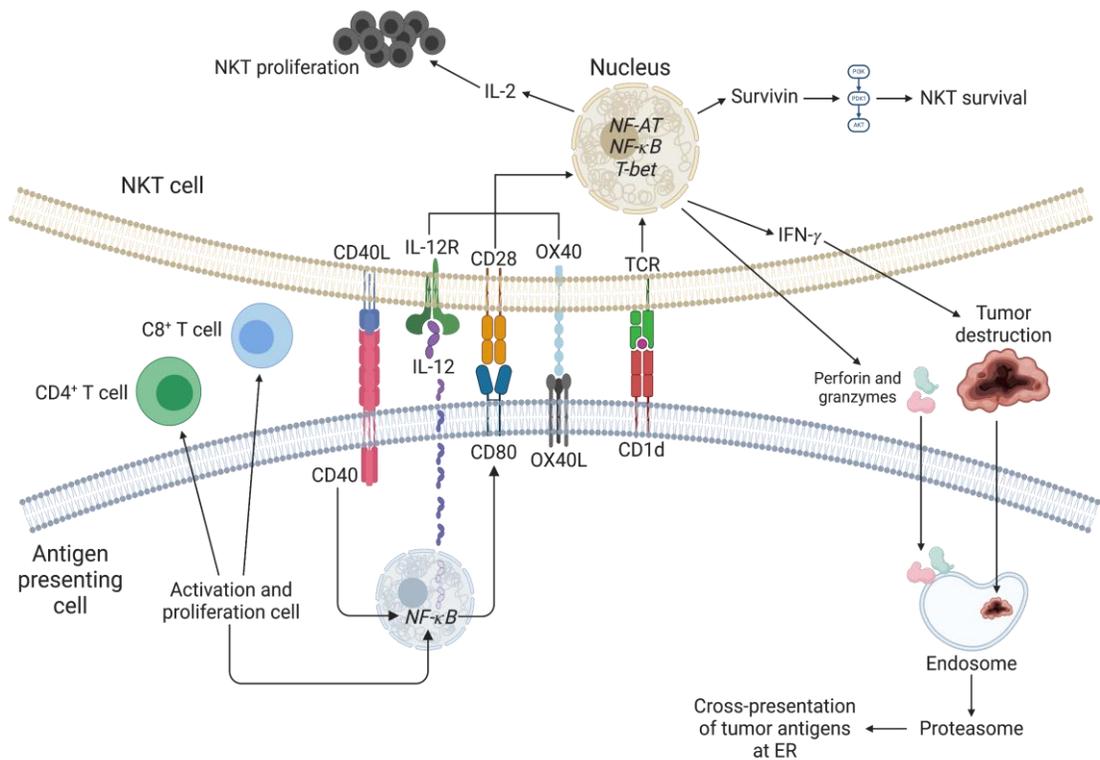


Figura 1. Presentación antigénica y activación de las células NKT. El receptor CD1d de la célula presentadora de antígeno presenta el antígeno glicolípido al receptor TCR de la célula NKT y que junto con moléculas co-estimuladoras promueve la función de proliferación, supervivencia celular y eliminación de tumores, además de promover en la célula presentadora de antígenos la activación y proliferación en las células T CD4⁺ y CD8⁺ (Tomado del paper "Natural Killer T (NKT) Cells and Periodontitis: Potential Regulatory Role of NKT10 Cells. Mediators of Inflammation. Melgar-Rodríguez y cols, 2021").

El recientemente mencionado α -GalCer es un glicolípido sintético derivado de una esponja marina llamada *Agelas mauritanicus*, este contiene enlaces glicosídicos anoméricos con residuos de galactosa unidos a una base de esfingosina (Biburger y Tiegs, 2005; Carreño y cols, 2016), siendo este el ligando característico presentado por las moléculas tipo CD1d para la activación de las células NKT en humanos y murinos, permitiendo la producción de altos niveles de citoquinas, en particular IL-4 e IFN- γ (Kawano y cols, 1997). Para fines experimentales se desarrolló un análogo sintético que emula su función, llamado KRN7000 (Carreño y cols, 2016). Recientemente, estudios *in vitro* han demostrado que en células precursoras de NKT, la estimulación con α -GalCer induce la activación y secreción de estas moléculas, lo que sugiere que tiene una potente actividad inmunostimuladora (Biburger y Tiegs, 2005; Wu y cols, 2009). No obstante, α -GalCer no es un componente normal en las células humanas se desconocen los glicolípidos fisiológicos que se asocian con CD1d *in vivo* y por ello se ha sugerido que α -GalCer imita al ligando o natural debido a la integración de alta afinidad con CD1d (Gumperz

y cols, 2000). Adicionalmente, las células NKT tienen la capacidad de responder a extractos lipídicos de tumores cancerígenos, lo que sugiere un reconocimiento específico a un ligando natural que podría alterar la estructura y función de los tumores (Figura 2) (Gumperz y cols, 2000; Zhou, 2007).

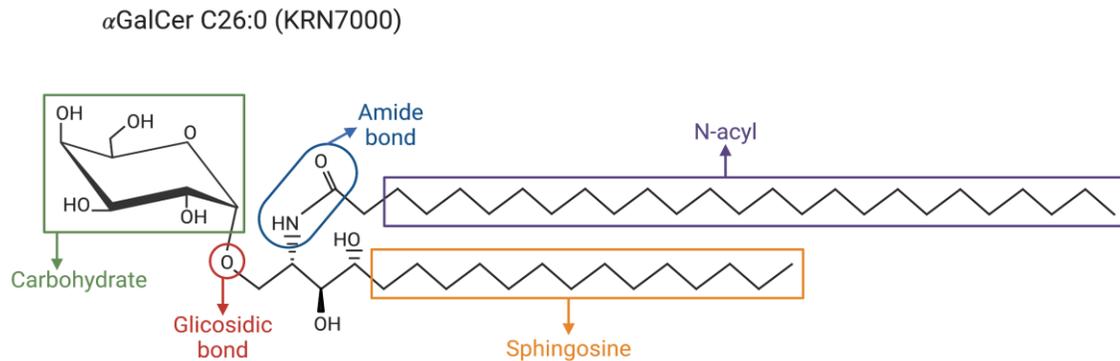


Figura 2. Antígeno glicolipídico artificial α -GalCer (KRN7000). α -GalCer está compuesto por un carbohidrato, una esfingosina y una cadena de N-acil unidos a un compuesto glicosídico y una amida (Tomado del paper "Natural Killer T (NKT) Cells and Periodontitis: Potential Regulatory Role of NKT10 Cells. Mediators of Inflammation. Melgar-Rodríguez y cols, 2021").

2.2 Clasificación y desarrollo de las células NKT

Las células NKT se clasifican en 2 tipos, denominadas células NKT tipo I y tipo II (Liao y cols, 2012; Carreño y cols, 2016). Las células NKT tipo I expresan una cadena TCR α invariante junto a una cadena de TCR β , por ello también son denominadas células NKT invariantes (iNKT) (Carreño y cols, 2016). Estas células reconocen a lípidos y antígenos glicolipídicos unidos a CD1d y su activación tiene tanto efectos pro-inflamatorios como anti-inflamatorios (Wu y Van Kaer, 2009; Brennan y cols, 2013). Las células NKT tipo II expresan un repertorio diverso de TCR, similar a las células T convencionales, por ello se denominan células NKT diversas (dNKT) (Behar y cols, 1999; Wu y Van Kaer, 2009; Carreño y cols, 2016) al igual que las iNKT, reconocen a lípidos y antígenos glicolipídicos presentados por CD1d y se ha demostrado que tienen una función inmuno-moduladora (Behar y cols, 1999; Liao y cols, 2012).

Estudios previos proponen que el desarrollo funcional de las células NKT se produce en 3 subgrupos diferenciados basado en el patrón de expresión de citoquinas y factores de transcripción característicos, denominado modelo de diferenciación lineal (Hogquist y Georgiev 2020; Kwon y Lee 2017). En este modelo, después de la presentación del antígeno glicolípido, las células NKT surgen de un progenitor común, clasificado como célula NKT0 ($egr2^{high}CD24^{+}CD44^{-}NK1.1^{-}$), luego al activarse el factor de transcripción *plzf*, NKT0 se diferencia a una célula NKT precursora (NKTp) ($CD4^{+}$ e $IL17RB^{-}$, donde el factor $IL17RB^{-}$ es el receptor de IL-25 que define la capacidad de producción de IL-4 en las células NKT), para finalmente diferenciarse a tres subgrupos denominadas NKT1, NKT2 y NKT17 (Bendelac y cols, 2007; Hogquist y Georgiev 2020; Kwon y Lee 2017).

Las células NKT1 ($plzf^{low}tbet^{+}CD122^{+}IL17RB^{-}$) posterior a su estimulación producen IFN- γ y bajos niveles de IL-4 y es el único subgrupo que expresa proteínas características de las células NK como NK1.1, NKG2D y Nkp46 (Lee y cols, 2016). Las células NKT2 ($plzf^{high}gata3^{+}CD4^{+}CD27^{+}IL17RB^{+}$) expresan elevados niveles de *plzf* e *il-4* (Hogquist y Georgiev, 2020). Finalmente, las células NKT17 ($plzf^{med}ror\gamma T^{+}CD4^{-}Cd27^{-}IL17RB^{+/-}$) producen elevados niveles de IL-17 (Hogquist y Georgiev, 2020; Lee y cols, 2016). Interesantemente, se ha demostrado que las células NKT2 producen activamente IL-4 en condiciones de estado estacionario, un proceso esencial para la generación de células T $CD8^{+}$ en el timo y en la periferia (Hogquist y Georgiev 2020; Lee y cols, 2011). Finalmente, las células NKT1, NKT2 y las células NKT17 se consideran células diferenciadas terminales que generalmente no se diferencian a otros subgrupos (Lee y cols, 2011; Lee y cols, 2016).

Recientemente, se ha descrito un nuevo subgrupo de células NKT con una función reguladora dependiente de la producción de IL-10, denominadas NKT10 (Sag y cols, 2014; Wingender y cols, 2015). Las células NKT10 expresan varios marcadores comunes asociados a las células T reguladoras, incluidos CD152 (CTLA4), CD279 (PD1) y CD304 (Neuropilina-1) (Sag y cols, 2014; Wingender y cols, 2015). Con respecto a su desarrollo, posterior a la estimulación antigénica glicolípida, las células NKT10 presentan producción de citoquinas pro-inflamatorias, sin embargo esta producción es reducida en comparación con otros subgrupos de NKT (Lynch y

cols, 2015; Wingender y cols, 2015). De igual forma, las células NKT10 al ser productoras de IL-10 podrían provocar una respuesta anti-tumoral, fomentar la expansión clonal de células T reguladoras y macrófagos M2 anti-inflamatorios (Lynch y cols, 2015). Además, se ha observado la promoción de una respuesta supresora por parte de NKT10 en modelos *in vivo* de encefalomiелitis autoinmune experimental (Sag y cols, 2014; Lynch y cols, 2015). En modelos murinos, las células NKT10 se encontraron en el timo, bazo y principalmente en tejido adiposo, donde el 13,5% de las células NKT totales producen IL-10 después de la activación antigénica glicolípídica (Sag y cols, 2014; Wingender y cols, 2015) y en sangre periférica humana presentan una frecuencia del 0,5% (Sag y cols, 2014; Wingender y cols, 2015; Nair y Dhodapkar, 2017). Estos datos nos permiten especular que las células NKT10 son importantes para mantener un ambiente anti-inflamatorio mediante la producción de IL-10, principalmente en el tejido adiposo (Sag y cols, 2014). Así, la proliferación de las células NKT10 concedida a través de la activación mediante el antígeno glicolípídico α -GalCer promueve una respuesta anti-inflamatoria que ayudaría a comprender la actividad funcional de los antígenos glicolípídicos en una terapia inmuno-reguladora (Sag y cols, 2014; Wingender y cols, 2015).

2.3 Funciones efectoras de las células NKT

Tanto las células NKT murinas, como las humanas, han demostrado una elevada actividad citotóxica, además de una rápida secreción de citoquinas efectoras, como IL-4 e IFN- γ (Godfrey y Kronenberg, 2004; Carreño y cols, 2016). Esta rápida secreción de citoquinas después de la activación de las células NKT induce la posterior activación de múltiples tipos celulares como células dendríticas, células NK, células B, células T CD4⁺ y CD8⁺, además del incremento en la producción de sus moléculas, proceso denominado transactivación (Figura 3) (Godfrey y Kronenberg, 2004; Carreño y cols, 2016).

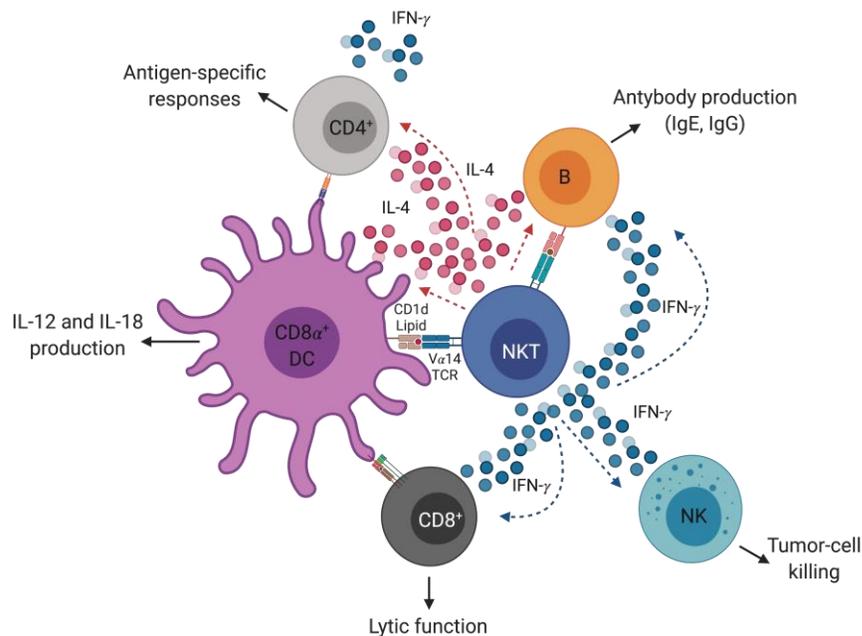


Figura 3. Transactivación de las células NKT. Las células NKT se activan mediante la unión de su TCR con antígenos glicolipídicos presentados por una molécula CD1d expresado por las células presentadoras de antígenos, por ejemplo, células dendríticas (células dendríticas CD8 α^+ en ratones). Luego de la activación del TCR, las células NKT secretan rápidamente múltiples citoquinas tipo Th1 y Th2 como IFN- γ e IL-4 que influyen en la actividad de otras células inmunes, por ejemplo, células NK, células dendríticas, células B, células T convencionales (Tomado del paper "Natural Killer T (NKT) Cells and Periodontitis: Potential Regulatory Role of NKT10 Cells. Mediators of Inflammation. Melgar-Rodríguez y cols, 2021").

La activación de las células NKT mediada por la solubilidad de los glicolípidos permite la polarización hacia un fenotipo linfocitario T helper Th1 o Th2 (Godfrey y Kronenberg, 2004; Carreño y cols, 2016). En general, los cambios estructurales aumentan la hidrofobicidad de los glicolípidos, lo que conlleva a una respuesta proinflamatoria tipo Th1, mientras que al mejorar su solubilidad en ambientes acuosos permiten una respuesta anti-inflamatoria tipo Th2 (Carreño y cols, 2016). Por lo tanto, los análogos de α -GalCer que inducen una respuesta tipo Th1 requieren que las células dendríticas internalicen al antígeno para la presentación antigénica, su asociación con CD1d dependiente de un pH ácido en los compartimentos endosomales y de la transferencia de lípidos intracelulares (Kang y Cresswell, 2004; Carreño y cols, 2016). Como resultado, estos ligandos experimentan una presentación antigénica dependiente del endosoma que en conjunto con CD1d forman complejos que se encuentran en microdominios de membrana, denominados *lipid rafts* (Carreño y cols, 2016). Por el contrario, debido a la menor

hidrofobicidad, los glicolípidos hidrofílicos promueven una respuesta anti-inflamatoria tipo Th2 directamente asociado a CD1d evitando la presentación endosómica y la formación de complejos asociados a *lipid rafts* (Carreño y cols, 2016). Así, la solubilidad de los glicolípidos está relacionada con la activación celular y las vías de señalización intracelular mediadas por CD1d (Kronenberg y Gapin, 2002; Carreño y cols, 2016).

Los distintos subgrupos de células NKT pueden producir diversos perfiles de citoquinas luego de la activación, por ello se especula que la elevada producción de IL-4 de las células NKT podría promover la diferenciación de una respuesta tipo Th2 (Godfrey y cols, 2000), además, de poseer una elevada actividad lítica que favorece la interacción de Fas-L/Fas y la eliminación de células tumorales mediada por perforina (Kronenberg y Gapin, 2002). Por lo tanto, el rol de las células NKT en la regulación de la respuesta inmune asociado a diferentes patologías podría ser debido a la producción de un perfil de citoquinas tipo Th1/Th2, la citotoxicidad celular o la secreción de citoquinas reguladoras (Kronenberg y Gapin, 2002).

2.4 Rol de las células NKT en las patologías inflamatorias y osteolíticas

En diversas enfermedades el rol de las células NKT en la patogénesis se ha establecido claramente (Drennan y cols, 2010; Rizzo y cols, 2019). En la patogenia de la enfermedad del hígado graso no alcohólico, se ha demostrado que las células NKT hepáticas tienen un rol dual, durante la fase más temprana de la enfermedad cumplen una función protectora y en etapas posteriores promueven la fibrogénesis (Tajiri y Shimizu, 2012). La transferencia adoptiva de células NKT a murinos deficientes en leptina produce una reducción del hígado graso y la glucemia (Elinav y cols, 2006).

Durante la encefalomiелitis autoinmune, las células NKT1 que producen IFN- γ favorecen la respuesta patogénica de los linfocitos colaboradores (Th) tipo Th1 y Th17 en el sistema nervioso central (Oh y Chung, 2011). Por el contrario, las células NKT2 productoras de IL-4 inhiben la respuesta Th1, pero no la respuesta Th17 (Singh y cols, 2001). En un modelo murino de alopecia areata inducida por xenoinjerto de cuero cabelludo e inoculación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) estimuladas *in vitro* con IL-2 se observó un incremento en el

número de células NKT1 (Gilhar y cols, 2016). A su vez, este aumento en el número de células NKT1 produjo una expansión clonal de linfocitos Th y citotóxicos y el incremento en la producción de IFN- γ lo que promueve la distrofia del folículo piloso y pérdida focal de cabello (Gilhar y cols, 2016).

Durante la artritis reumatoide, las células NKT desempeñan un rol patológico al promover la destrucción progresiva del hueso articular (Chiba y cols, 2004; Rizzo y cols, 2019). En pacientes afectados por artritis reumatoide, se ha observado un aumento en la infiltración de células NKT1 en las articulaciones afectadas (Gutowska-Owsiak y cols, 2014). En un modelo animal de artritis reumatoide inducida por colágeno, la administración a largo plazo de α -GalCer indujo la activación de las células NKT, que a su vez promovió la diferenciación de los linfocitos Th con actividades pro-inflamatorias (Rizzo y cols, 2019). Por el contrario, en pacientes afectados por osteoporosis, el deterioro óseo se asoció con la actividad de las células NKT1 y NKT17 (Tilkeridis y cols, 2019). Así, las células NKT favorecen la sobreexpresión del ligando o del receptor activador del factor nuclear κ B (RANKL), factor clave responsable de la osteoclastogénesis y la resorción ósea mediada por osteoclastos, un fenómeno que aumenta con la severidad de la enfermedad y es dependiente de la pérdida de estrógenos (Tilkeridis y cols, 2019).

De esta forma, las células NKT se encuentran implicadas en diversas patologías inflamatorias y osteolíticas, sin embargo, en el contexto de la enfermedad periodontal los estudios existentes son escasos. Por lo tanto, en esta revisión sistemática exploratoria se analizarán los estudios disponibles acerca de la presencia y el rol de las células NKT en el proceso pro-inflamatorio y osteo-destructivo asociado a la periodontitis.

3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.

¿Existirá la presencia de las células NKT y cuál es el rol de estas células en la etiopatogenia de la periodontitis?

4. OBJETIVO GENERAL.

Identificar y describir la evidencia disponible relacionada con la presencia y el rol de las células NKT en la etiopatogenia de la periodontitis, mediante el análisis de estudios observacionales y experimentales *in vivo* e *in vitro* en tejidos periodontales de pacientes afectados por periodontitis, animales con periodontitis experimental o modelos *in vitro* de infección periodontal.

5. METODOLOGÍA.

La siguiente revisión sistemática exploratoria (Scoping systematic review) se realizó siguiendo las indicaciones del protocolo PRISMA-P y su extensión para scoping reviews (Arksey y O'Malley 2005; Tricco y cols, 2018; Urrutia y Bonfill, 2010).

El estudio se basó en la pregunta acorde al acrónimo PICR: P = Población (Tejidos periodontales humanos afectados de periodontitis, tejido periodontal de animales con periodontitis experimental o cultivos celulares tratados mediante modelos de infección periodontal), I = Intervención (Análisis de muestras de: Tejido periodontal de pacientes afectados por periodontitis, tejido periodontal de animales con periodontitis experimental, cultivos celulares inoculados mediante modelos de infección periodontal) C = Comparación (Muestras de tejido periodontal de pacientes sanos o afectados de gingivitis, animales sanos, cultivos celulares no infectados) y R = Resultados (Presencia y rol de las células NKT).

5.1 Criterios de elegibilidad: Inclusión y exclusión

Los trabajos seleccionados fueron estudios observacionales y experimentales *in vitro* o *in vivo* que describen la presencia y/o el rol entre las células NKT y la etiopatogenia de la periodontitis. Se eligieron artículos publicados en los últimos 25 años debido a que el descubrimiento y estudio de las células NKT es reciente y existe escasa evidencia al respecto. Se seleccionaron aquellos estudios en idioma castellano por ser lengua nativa e inglés por ser el idioma universal de la ciencia.

Los criterios de inclusión y exclusión aplicados en el análisis de texto completo fueron:

- Se incluyeron artículos que describían la presencia y/o el rol de las células NKT en tejido periodontal de pacientes con periodontitis, animales afectados por periodontitis experimental o cultivos celulares derivados de tejido periodontal animal previamente infectado con patógenos periodontales.
- Se incluyeron estudios que describían la asociación entre las células NKT y patogenia periodontal.
- Se excluyeron estudios que estén en un idioma distinto al castellano o inglés.

5.2 Estrategia de búsqueda

Se realizó una búsqueda electrónica en las bases de datos de Medline vía PubMed, Embase, Web of Science y Scopus, hasta el día 12 de marzo de 2022. La estrategia de búsqueda fue realizada utilizando términos MeSH en la base de datos Medline y en las demás bases de datos se adaptó dicha estrategia de búsqueda. La estrategia utilizando términos MeSH fue la siguiente:

1. "invariant natural killer t cells" [MeSH terms]
2. "Natural Killer T-Cells" [MeSH terms]
3. "Natural killer t-cell" [MeSH terms]
4. "Natural killer t-cells"
5. "Inkt cells"
6. "Inkt cel"
7. "Natural killer T lymphocyte"
8. "Natural killer t lymphocytes"
9. "natural killer t-lymphocyte"
10. "natural killer t-lymphocytes"
11. #1 OR #2 OR #3 OR #4 OR #5 OR #6 OR #7 OR #8 OR #9 OR #10
12. "Chronic periodontitis" [MeSH terms]
13. "Periodontitis" [MeSH terms]
14. "Aggressive periodontitis" [MeSH terms]
15. "Apical periodontitis" [MeSH terms]
16. "Adult periodontitis" [MeSH terms]
17. "Periodontal disease" [MeSH terms]
18. "periodontitis"
19. "periodontal disease"
20. "periodont"
21. #12 OR #13 OR #14 OR #15 OR #16 OR #17 OR #18 OR #19 OR #20
22. #11 AND #21

5.3 Extracción de los datos y selección de los estudios

La extracción de datos fue realizada por dos revisores de manera independiente y en duplicado, siendo un tercer revisor quien verificó y confirmó la precisión de la información. La extracción de datos siguió un enfoque estructurado y se creó una plantilla para extraer características claves de cada documento incluido. Luego, los diversos artículos seleccionados fueron sujetos a eliminación por superposición. La lista de elementos de datos que se incluyeron en la plantilla fueron el nombre del primer autor, el año de publicación, el diseño del estudio, población estudiada, intervención o exposición, comparación y resultados sobre la presencia y/o rol de células NKT en pacientes con enfermedad periodontal, en animales con periodontitis experimental o modelos *in vitro* de infección periodontal.

El total de los estudios obtenidos fue sometido a un primer filtro para eliminar los registros no relacionados con los temas de la revisión, dicho filtro incluyó el análisis del título y resumen de cada estudio obtenido. Este proceso fue realizado por ambos revisores independientes, en duplicado, siendo el tercer revisor quien tomó la decisión final frente a la inclusión de algún registro sobre el que los revisores independientes estuvieron en desacuerdo. En un segundo filtro, se descargó cada artículo seleccionado y se realizó la lectura de texto completo por cada revisor independiente, siendo el tercer revisor quien actuó como tomador de decisiones en situaciones de duda de inclusión de algún estudio. Para la evaluación de concordancia entre los dos revisores independientes se aplicó el coeficiente Kappa de Cohen (acuerdo K) basándose en las fórmulas del Manual Cochrane para revisiones sistemáticas (Higgins y Green, 2011).

5.4 Análisis de los datos

Los artículos seleccionados fueron evaluados cualitativamente para investigar la presencia y rol de las células NKT en la enfermedad periodontal. Para calificar el riesgo de sesgo de los experimentos en animales se utilizó la herramienta SYRCLE (Systematic review center for laboratory animal experimentation). SYRCLE (Hoojimans y cols, 2014) se deriva de la herramienta de riesgo de sesgo de Cochrane para estudios clínicos (Higgins y cols, 2011) y se adaptó para su aplicación en estudios con animales. La herramienta resultante consta de 10

preguntas o dominios principales relacionadas con el sesgo de selección, sesgo de realización, sesgo de detección, sesgo de deserción, sesgo de notificación y otros sesgos. Se utilizaron preguntas de señalización para apoyar las preguntas principales con el fin de determinar el riesgo de sesgo. Las respuestas a las preguntas de la herramienta se respondieron como Sí (Pregunta adecuadamente respondida), No (Pregunta no respondida) o Poco claro (No hay suficiente información para responder sí o no). Según las respuestas a las preguntas de señalización, los dominios de riesgo de sesgo se clasificaron como bajo, alto o poco claro. No se evaluó el riesgo de sesgo general debido a la dificultad de asignar valoración para los distintos dominios. Para evaluar el riesgo de sesgo de estudios no aleatorizados como los observacionales se utilizó la herramienta Newcastle-Ottawa. Con esta herramienta, cada estudio se evaluó en base a nueve ítems, categorizados en tres grupos: La selección de los grupos de estudio, la comparabilidad de los grupos y la determinación de la exposición o el resultado de interés. Las estrellas otorgadas por cada artículo de calidad sirven como una evaluación visual rápida, según el número de estrellas se clasifican en calidad alta, moderada o baja. “Alta” corresponde a una puntuación superior a 7 estrellas; “Moderada” corresponde a una puntuación de 5 a 7 estrellas; y “baja” corresponde a una puntuación inferior a 5 estrellas.

6. RESULTADOS.

Se identificaron un total de 130 registros en las bases de datos Medline vía Pubmed, Embase, Web of Science y Scopus. Tras la eliminación de duplicados, se obtuvieron un total de 90 resúmenes potencialmente elegibles. Luego del análisis de títulos y resúmenes, se seleccionaron 7 artículos. Posterior a esto, se realizó la lectura completa de cada artículo junto a la aplicación de los criterios de inclusión y exclusión, obteniéndose finalmente 5 artículos para el análisis cualitativo. Los procedimientos de selección de los estudios se describen en el diagrama de flujo PRISMA (Figura 4).

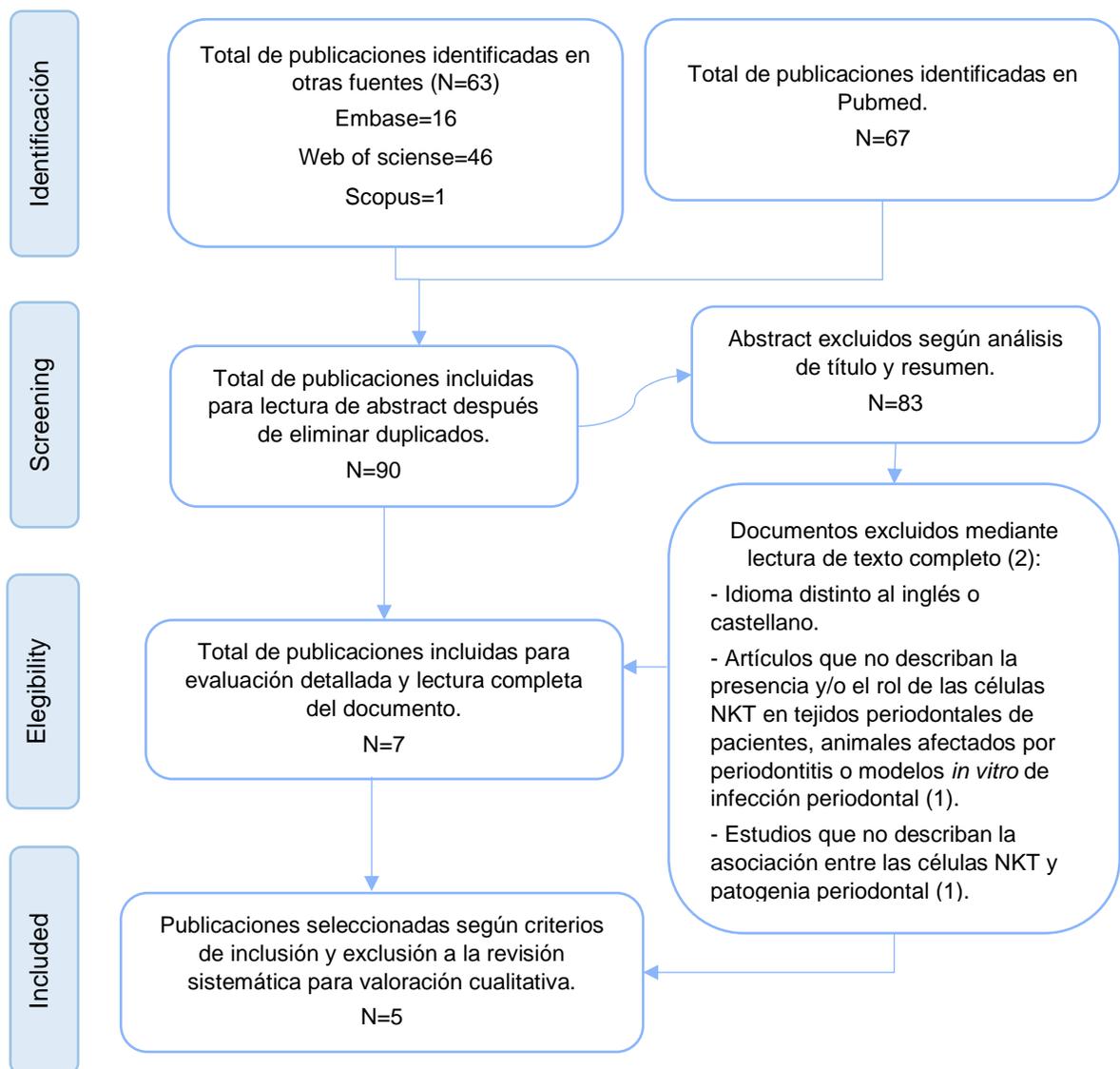


Figura 4. Diagrama de flujo PRISMA. Proceso de selección de estudios para su análisis cualitativo.

6.1 Presencia y rol de las células NKT en la enfermedad periodontal

Los 5 estudios seleccionados para la revisión corresponden a 2 estudios experimentales *in vivo* e *in vitro* (Nowak y cols, 2013; Aoki-Nonaka y cols, 2014) y 3 estudios observacionales en pacientes con enfermedad periodontal (Yamazaki y cols, 2001; Amanuma y cols, 2006, Muthukuru, 2012). El estudio de Nowak y cols. Se determinó como experimental y observacional, debido a que contempla un modelo de infección periodontal *in vitro* junto con un estudio observacional en pacientes con periodontitis.

Los datos de los estudios incluidos correspondientes al nombre del primer autor, el año de publicación, el diseño del estudio, población estudiada, intervención o exposición, comparación y resultados sobre la presencia y el rol de las células NKT en modelos de animales infectados con periodontitis y pacientes con periodontitis se presentan en la tabla N°1.

Tabla N°1 Tabla de extracción P.I.C.R. de los estudios experimentales *in vivo*, *in vitro* y observacionales. A partir del análisis de la literatura seleccionada en esta sección se resumen los principales hallazgos que se relacionan con la pregunta de investigación.

Autor, Año	Objetivo	Diseño	Población	Intervención	Comparación	Resultados
Yamazaki y cols, 2001	Establecer cambios en la proporción de células NKT en periodontitis crónica.	Estudio observacional.	Muestras de tejido gingival y muestras de sangre periférica de pacientes afectados de periodontitis crónica.	Análisis por RT-PCR-SSCP de RNA de tejido gingival y muestras de células mononucleares de sangre periférica mediante. Análisis inmunohistoquímico usando anticuerpos monoclonales para Va24 ⁺ , CD1d, CD3. Análisis microscópico del número total de Va24 ⁺ y CD3 ⁺ .	Biopsias de tejido gingival y muestras de sangre periférica de sujetos con gingivitis.	La expresión génica relativa de Va24JaQ fue significativamente mayor en muestras de tejido con periodontitis que con gingivitis. No se observaron diferencias significativas para la expresión relativa de Va24JaQ en sangre periférica entre pacientes y controles o entre tejido gingival (afectado de periodontitis o gingivitis) y sangre periférica.
Amanuma y cols, 2006	Establecer cambios en la proporción de CD1d ⁺ y células NKT en periodontitis crónica.	Estudio observacional.	Muestras de tejido gingival de pacientes afectados de periodontitis crónica.	Análisis inmunohistoquímico usando anticuerpos para CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD4, CD19 y CD83. Análisis microscópico del número total de células NKT invariantes, CD1a ⁺ , CD1b ⁺ , CD1c ⁺ , CD1d ⁺ y CD83 ⁺ .	Biopsias de tejido gingival de sujetos sanos.	Los subconjuntos analizados de la molécula CD1 se expresaron en los tejidos con periodontitis, siendo la molécula CD1d, la que se expresó en mayor proporción. Además, la proporción de la molécula CD1d fue mayor en comparación con muestras de tejido afectadas de gingivitis.
Mutukhuru, 2012	Establecer cambios en la proporción de células Th (Helper) y <i>Natural Killer</i> en periodontitis crónica.	Estudio observacional.	Muestras de tejido gingival de pacientes afectados de periodontitis crónica.	Análisis inmunohistoquímico para detectar fibroblastos y células CD45 ⁺ . Análisis de citometría de flujo para analizar linfocitos con marcadores de superficie CD3, CD4 y CD8.	Biopsias de tejido gingival de sujetos sanos.	La proporción de células NKT aumentó en los tejidos gingivales de pacientes afectados de periodontitis en comparación a los tejidos gingivales de sujetos sanos.

<p>Nowak y cols, 2013</p>	<p>Establecer proporción y mecanismo de activación de células NKT en periodontitis crónica y agresiva.</p>	<p>Estudio experimental en animales/ Estudio experimental <i>in vitro</i>/ Estudio observacional.</p>	<p>Muestras de tejido gingival de pacientes afectados de periodontitis crónica y agresiva células dendríticas (DCs) derivadas de ratones C57BL/6J (<i>wild-type</i>)</p>	<p>Análisis mediante qPCR de infiltrado celular de NKT en muestras de tejido gingival afectado de periodontitis y sano. Cultivo de DCs generadas a partir de ratones (<i>wild-type</i> (WT) que posteriormente fueron inoculadas con <i>A. actinomycetemcomitans</i> o <i>P. gingivalis</i>. Finalmente se añadió al cultivo células NKT extraídas del hígado de ratones WT para realizar el análisis de la expresión de citoquinas mediante RT-qPCR</p>	<p>Biopsias de tejido gingival de sujetos sanos. Ratones WT Ratones MyD88^{+/+} Ratones MyD88^{-/-}.</p>	<p>Aumento en el infiltrado celular de NKT en tejido de pacientes afectados de periodontitis crónica o agresiva. Los mayores niveles de infiltrado de células NKT se encontraron en los tejidos de pacientes con periodontitis agresiva en comparación a periodontitis crónica. DCs infectadas con <i>A. actinomycetemcomitans</i> estimula el incremento en la producción de IFN-γ e IL-4 por parte de células cocultivadas. DCs infectadas con <i>A. actinomycetemcomitans</i> requieren de señalización TLR para la activación de NKT. <i>P. gingivalis</i> produce una disminución en la activación de las células NKT, lo que produce una disminución en la activación de las células NKT, lo que promueve una menor producción de citoquinas.</p>
<p>Aoki-Nonaka y cols, 2014</p>	<p>Determinar el rol de las células NKT en la resorción ósea alveolar y en la respuesta inflamatoria sistémica ante la infección oral con <i>P. gingivalis</i> en periodontitis experimental.</p>	<p>Estudio experimental en animales/ Estudio experimental <i>in vitro</i>.</p>	<p>Ratones C57BL/6 (<i>WT</i>) infectados con <i>P. gingivalis</i>. Ratones C57BL/6 (<i>WT</i>) infectados con <i>P. gingivalis</i> y estimulados con α-GalCer.</p>	<p>Inoculación con <i>oral gavage</i> de <i>P. gingivalis</i> strain W83. Inyección intraperitoneal de α-GalCer. Cuantificación de pérdida ósea alveolar utilizando imágenes de estereomicroscopio junto a un software de medición de imagen. Análisis de niveles séricos de amiloide sérico a (SAA), RANKL y anti <i>P. gingivalis</i> W83 mediante ELISA. Análisis de expresión génica de IFN-γ, IL-4 y RANKL mediante RT-PCR. Análisis de niveles séricos de IFN-γ, IL-4 e IL-10 producidos por esplenocitos mediante ELISA.</p>	<p>Ratones WT con infección placebo. Ratones WT con infección placebo y con estimulación placebo. Ratones CD1d^{-/-} infectados con <i>P. gingivalis</i>. Ratones CD1d^{-/-} con infección placebo.</p>	<p>Aumento de los niveles de resorción ósea alveolar en ratones infectados con <i>P. gingivalis</i>. Incremento en los niveles séricos de SAA, RANKL e IgG en ratones infectados con <i>P. gingivalis</i>. Resultando el mayor incremento en los niveles séricos de SAA, RANKL e IgG en ratones infectados con <i>P. gingivalis</i> y estimulados con α-GalCer. Aumento en los niveles de expresión génica de IFN-γ y RANKL en ratones infectados con <i>P. gingivalis</i>. Estos niveles aumentan aún más en ratones estimulados con α-GalCer. La infección oral con <i>P. gingivalis</i> estimula la expresión de IL-4 en los ratones estimulados con α-GalCer.</p>

6.2 Presencia de células NKT en tejido periodontal de pacientes con periodontitis

La evidencia disponible sobre la presencia de las células NKT en tejido gingival de pacientes con periodontitis es escasa. Efectivamente, existen pocos estudios que permitan explorar este ámbito, incluyendo los posibles cambios en la proporción del número celular en condiciones de enfermedad. Así, 4 estudios, incluidos en esta revisión, extrajeron muestras de tejido gingival de pacientes con diagnóstico de periodontitis crónica o agresiva sin asociación con alguna enfermedad sistémica, junto con biopsias de tejido gingival de pacientes con gingivitis o sin destrucción periodontal evidenciable bajo examen clínico (Yamazaki y cols, 2001; Amanuma y cols, 2006; Mutukhuru, 2012; Nowak y cols, 2013).

Dentro de los estudios mencionados, Yamazaki y cols. compararon la proporción de las células T de muestras de sangre periférica y de biopsias de tejido gingival de pacientes afectados de periodontitis y sujetos sanos. Mediante RT-PCR-SSCP se comparó la expresión de la cadena $V\alpha 24J\alpha Q$ invariante del TCR, la que es una cadena exclusiva para las células iNKT. De esta forma, se detectó que expresión relativa de la cadena $V\alpha 24J\alpha Q$ invariante del TCR está significativamente aumentada en las muestras de tejido gingival con periodontitis en comparación a las biopsias con gingivitis (Figura 5). Además, la expresión relativa de la cadena $V\alpha 24J\alpha Q$ invariante del TCR en tejido periodontal en comparación con las muestras de sangre periférica no presentó diferencias significativas, tanto en pacientes como en controles. Así, existió una proporción aumentada de células NKT $V\alpha 24J\alpha Q$ en muestras de lesiones de tejidos con periodontitis en comparación a biopsias de lesiones con gingivitis y muestras de sangre periférica de los mismos pacientes con periodontitis en comparación a sangre periférica de los mismos pacientes controles (Yamazaki y cols, 2001).

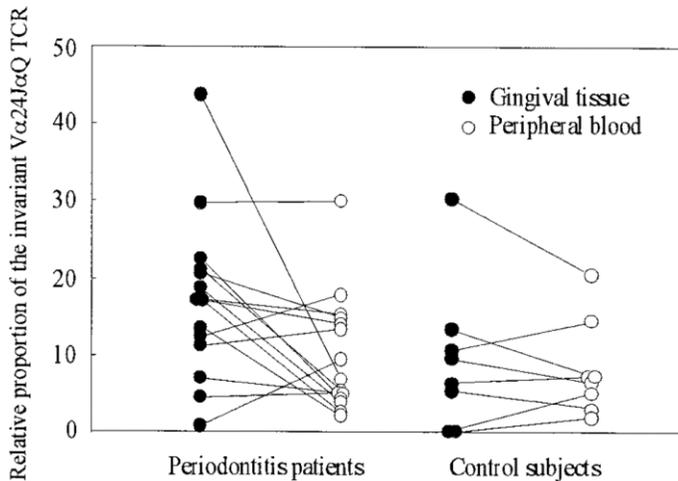


Figura 5. Proporción relativa de la cadena Va24JaQ invariante del TCR del total de la población Va24.

La proporción relativa de la cadena Va24JaQ del TCR en la población total de las células Va24 fue significativamente mayor en las biopsias de los tejidos afectados de periodontitis en comparación a los controles y fue significativamente mayor en sangre periférica de pacientes con periodontitis en comparación a las muestras de sangre periférica de los pacientes controles (Tomado del paper "Elevated proportion of Natural Killer T Cells in Periodontitis Lesions", Yamazaki y cols, 2001).

Por otro lado, en el estudio de Amanuma y cols. se realizaron técnicas de inmunohistoquímica para la detección de los marcadores Va24JaQ, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d y CD83 en muestras de tejido periodontal de pacientes con periodontitis y de pacientes con gingivitis. El análisis estableció una mayor proporción de células positivas para la isoforma CD1d en relación con el total de células mononucleares en las muestras de lesiones de periodontitis, siendo significativamente mayor su expresión en comparación a las muestras de tejido afectado por gingivitis. Además, existió una proporción significativamente mayor de células NKT, células positivas para el marcador de Va24JaQ, en lesiones de periodontitis que muestras de tejido afectado por gingivitis (Figura 6) (Amanuma y cols, 2006).

Además, la proporción de células CD1d se correlacionó de manera positiva con respecto a la proporción del infiltrado de células iNKT (Figura 7) (Amanuma y cols, 2006), demostrando que al incrementar el porcentaje de células positivas para CD1d, incrementa el porcentaje de células NKT con respecto del total de células mononucleares.

Figura 6

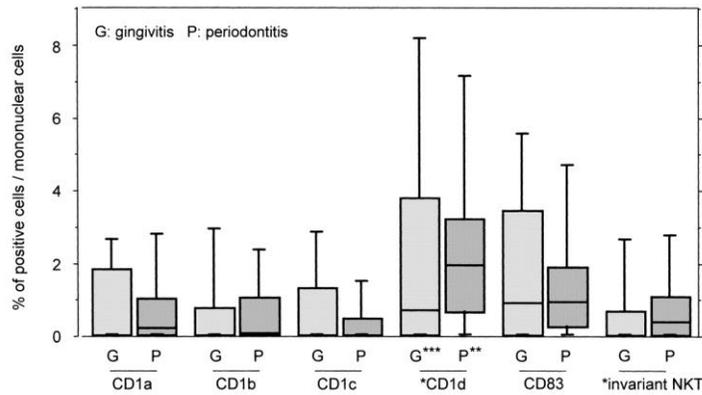


Figura 7

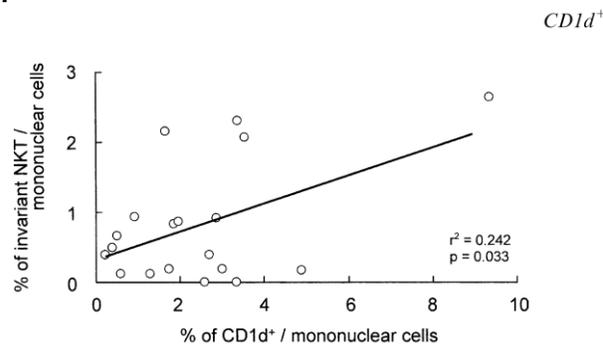
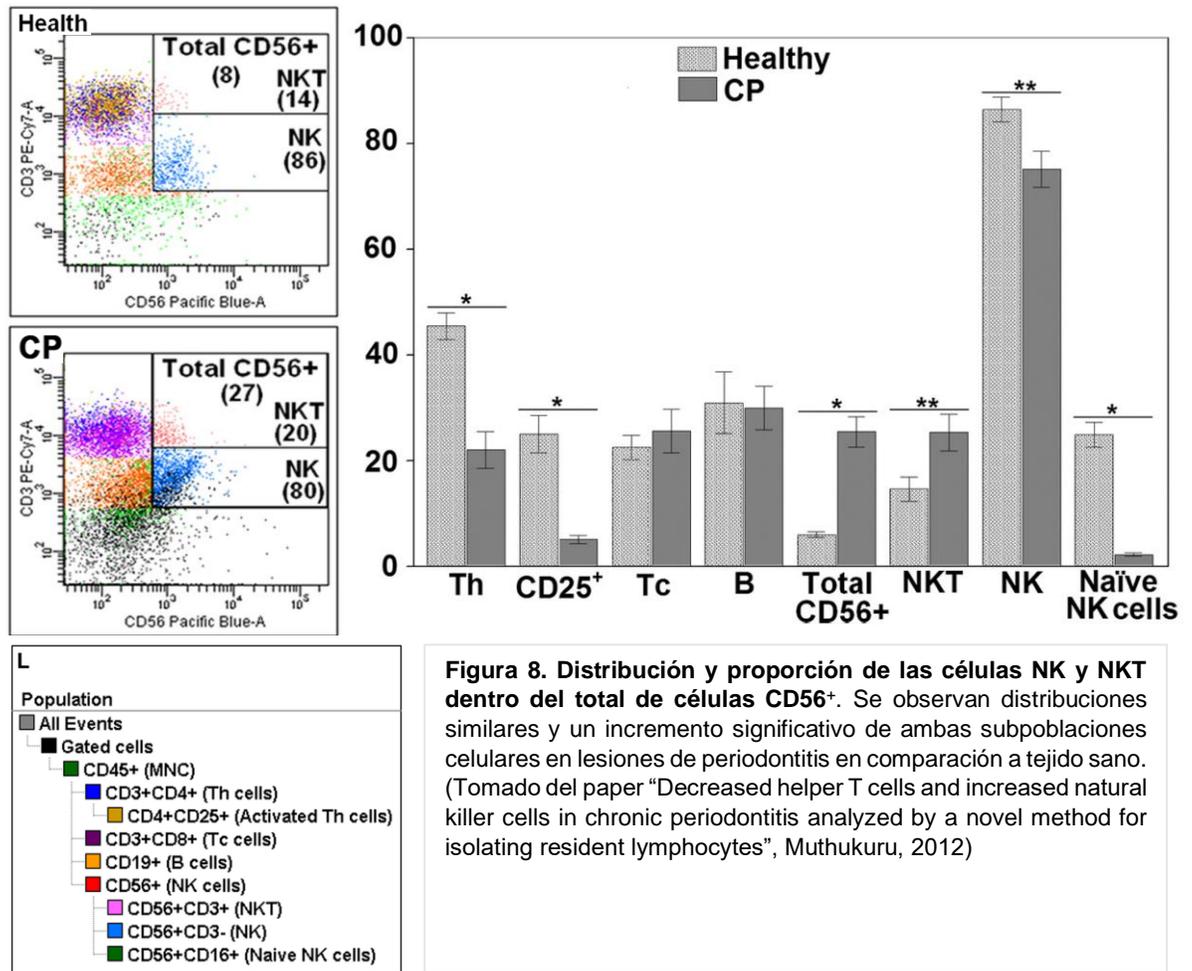


Figura 6. Presencia isoformas de CD1, CD83 y células iNKT en lesiones de periodontitis y gingivitis.

Se observa en el gráfico el porcentaje de las células analizadas. La expresión de CD1d e iNKT fue significativamente mayor en periodontitis comparado con gingivitis. Se muestra que la expresión de CD1d fue significativamente mayor que CD1a, b, c y 83 en periodontitis. (Tomado del paper "Increased infiltration of CD1d⁺ and natural killer T cells in periodontal disease tissues", Amanuma y cols, 2001).

Figura 7. Correlación entre células CD1d⁺ con las células iNKT. Se muestra una correlación positiva entre células CD1d⁺ y iNKT (Tomado del paper "Increased infiltration of CD1d⁺ and natural killer T cells in periodontal disease tissues", Amanuma y cols, 2001).

Muthukuru analizó la presencia de células mononucleares gingivales mediante citometría de flujo, en el que realizaron un esquema general (Figura 8) que describe que todas las células CD56⁺ son NKT o NK, lo que diferencia a estas células es la presencia del marcador CD3 que está ausente en las células NK. Por lo tanto, aquellas células CD56⁺CD3⁺ corresponden a células NKT. De esta misma forma, detectaron que la distribución de células NKT presentan similitudes entre las muestras de tejido gingival de pacientes con periodontitis y los sujetos con salud periodontal (Figura 8). Además, se detectó un incremento significativo en la proporción de las subpoblaciones de células NKT de pacientes afectados de periodontitis en comparación con los pacientes sanos (Figura 8) (Mutukhuru, 2012). A pesar de que el número de células NKT dentro del total de células evaluadas es menor, esto no indica una menor función por parte de NKT, debido a que son células que no sólo se caracterizan por presentar gran potencia citotóxica, sino que también por presentar alta actividad reguladora mediante la producción de citoquinas (Mutukhuru, 2012).



Nowak y cols. a través del análisis mediante qPCR de muestras de tejido gingival de pacientes con periodontitis crónica y agresiva, realizaron la detección de la expresión relativa de la cadena V α 24J α Q, exclusiva de iNKT. Se determinó que en pacientes afectados de periodontitis agresiva existió un incremento en los niveles de expresión relativa de las células iNKT, ya que en 8 de los 10 pacientes biopsiados el infiltrado celular de iNKT se vio aumentado, en comparación a las muestras de tejido sano de los mismos pacientes (Figura 9A). Por otra parte, se evidencia que en el grupo de pacientes con periodontitis crónica los niveles de expresión aumentados de la cadena V α 24J α Q no fueron significativos en comparación a niveles de expresión en biopsias de tejido sano, ya que sólo existió un incremento en el infiltrado celular de iNKT en 5 de los 15 pacientes que presentaban periodontitis crónica (Figura 9B) (Nowak y cols, 2013).

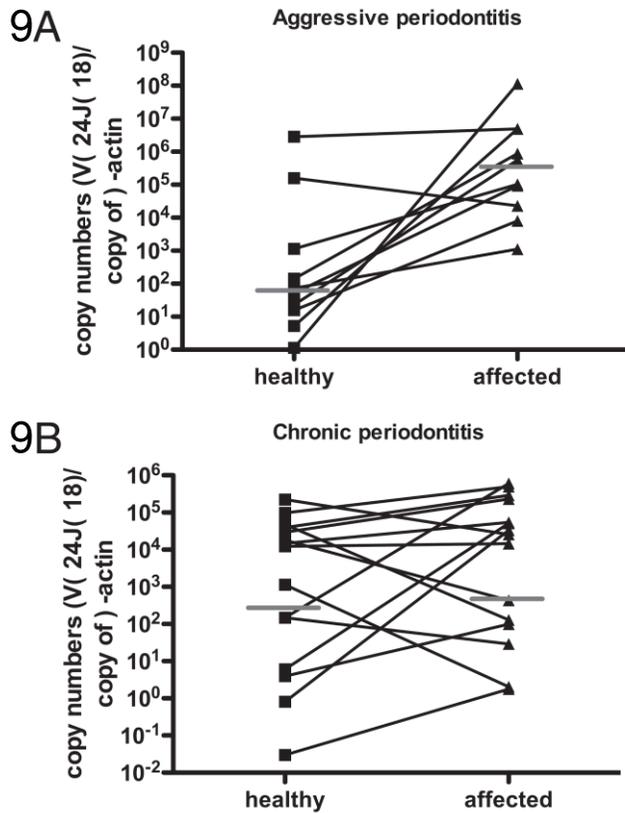


Figura 9. Infiltración diferencial de células iNKT en lesiones de periodontitis crónica y agresiva. Se muestra el número de células iNKT obtenido mediante qPCR en lesiones de periodontitis agresiva y crónica en comparación a las biopsias de tejido sano. **9A.** Se puede observar que en pacientes con periodontitis agresiva el tejido periodontal resató un mayor infiltrado de células NKT en comparación a tejido sano de los mismos pacientes. **9B.** En los pacientes con periodontitis crónica se detectó un aumento leve en el infiltrado celular de iNKT en comparación con muestras de tejido sano (Tomado del paper "Activation of invariant Natural Killer T cells in periodontitis lesions", Nowak y cols, 2013).

Por lo tanto, existe evidencia de la presencia de las células NKT en tejidos periodontales y además de un incremento en la proporción de estas células en condiciones de periodontitis, sobretudo en la condición agresiva de la enfermedad (Yamazaki y cols, 2001; Amanuma y cols, 2006; Nowak y cols, 2013; Mutukhuru, 2012). Por otro lado, este aumento se correlaciona de forma positiva con el aumento de CD1d y células NK (Amanuma y cols, 2006, Mutukhuru, 2012).

6.3 Rol de las células NKT en tejidos periodontales de pacientes con periodontitis

El rol de las células NKT en tejidos periodontales de pacientes con periodontitis no ha sido esclarecido, sin embargo ha sido posible establecer ciertas relaciones entre las células NKT y células inmunitarias presentes en el tejido periodontal. Amanuma y cols. Mediante el estudio de los isotipos del marcador CD1 evidenciaron una correlación positiva entre el incremento de células CD1d⁺ y NKT (Amanuma y cols, 2006). Además, en dicho estudio se demostró la presencia y co-expresión de CD1d y CD19 en tejido gingival, lo que nos indica la presencia del marcador CD1d y CD19 en conjunto, posiblemente en linfocitos B, ya que el marcador CD19 se asocia a estas células (Figura 10A). A su vez, se demostró la presencia de células CD1⁺ y NKT en tejidos afectados de periodontitis en las que se puede observar una interacción célula a célula (Figura 10B) (Amanuma y cols, 2006). El marcador CD1d se expresa principalmente en células presentadoras de antígeno y linfocitos B. Las primeras están implicadas en la respuesta celular a través de la activación de macrófagos y linfocitos T efectores, mientras que los linfocitos B son células leucocitarias implicadas en la respuesta humoral mediante la generación de anticuerpos que participan en la presentación antigénica y regulación de la respuesta inflamatoria/autoinmune. Esta interacción célula a célula entre células que expresan el marcador CD1d⁺ y NKT podría estar relacionado a las funciones efectoras de las células NKT en el contexto periodontal.

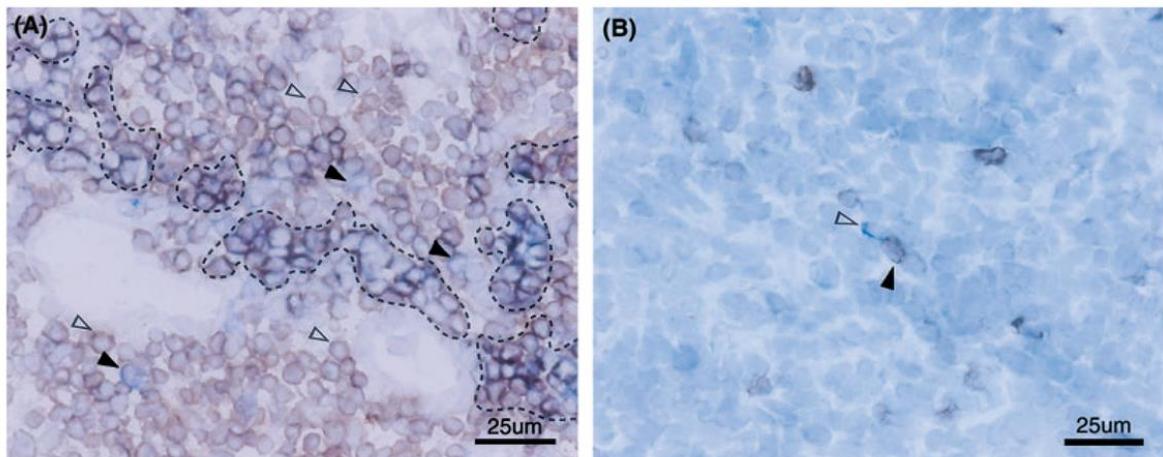


Figura 10. Doble inmunohistoquímica de CD1d/CD19 y NKT/CD1d. 10A. Células CD19 y CD1d están indicadas con flechas vacías y rellenas respectivamente. Existe formación de paquetes de algunas células CD19 expresando CD1d. **10B.** Se observa una relación de interacción entre células NKT (indicada con flechas vacías) y células CD1d⁺. (Tomado del paper "Increased infiltration of CD1d⁺ and natural killer T cells in periodontal disease tissues", Amanuma y cols, 2001).

6.4 Rol de células NKT en periodontitis experimental

Para analizar el rol de las células NKT en la periodontitis se realizaron diversos estudios. Entre ellos Aoki-Nonaka y cols. Utilizaron ratones C57BL/6 (*wild-type*) que fueron infectados directamente con patógenos periodontales, tales como *A. actinomycetemcomitans* y/o *P. gingivalis* para analizar el rol de las células NKT en periodontitis experimental. Por otro lado, también se diseñaron modelos *in vitro* de infección periodontal en los que utilizaron células derivadas de ratones (Aoki-Nonaka y cols, 2014, Nowak y cols, 2013). A través de la inducción de la enfermedad se analizó la activación de las células NKT y el grado de activación que alcanzaban según la utilización de periodontopatógenos y/o α -GalCer. Además de su acción efectora mediante la expresión de diferentes citoquinas, nivel de destrucción ósea periodontal y la relación con otras células en el tejido periodontal.

Aoki-Nonaka y cols. analizaron la inducción de la resorción ósea alveolar mediante *oral gavage* con *P. gingivalis* en ratones. El nivel de resorción ósea alveolar se evaluó mediante la medición de la superficie radicular expuesta. De esta forma se pudo determinar que existe un incremento significativo en la inducción de la resorción ósea alveolar en ratones *wild-type* (WT) inoculados con *oral gavage* con *P. gingivalis* en comparación con los grupos control (Figura 11). A su vez, los niveles de resorción alveolar alcanzan los mayores valores en ratones WT que además se encontraban estimulados con α -GalCer, en comparación a todos los demás grupos (Figura 11) (Aoki – Nonaka y cols, 2014).

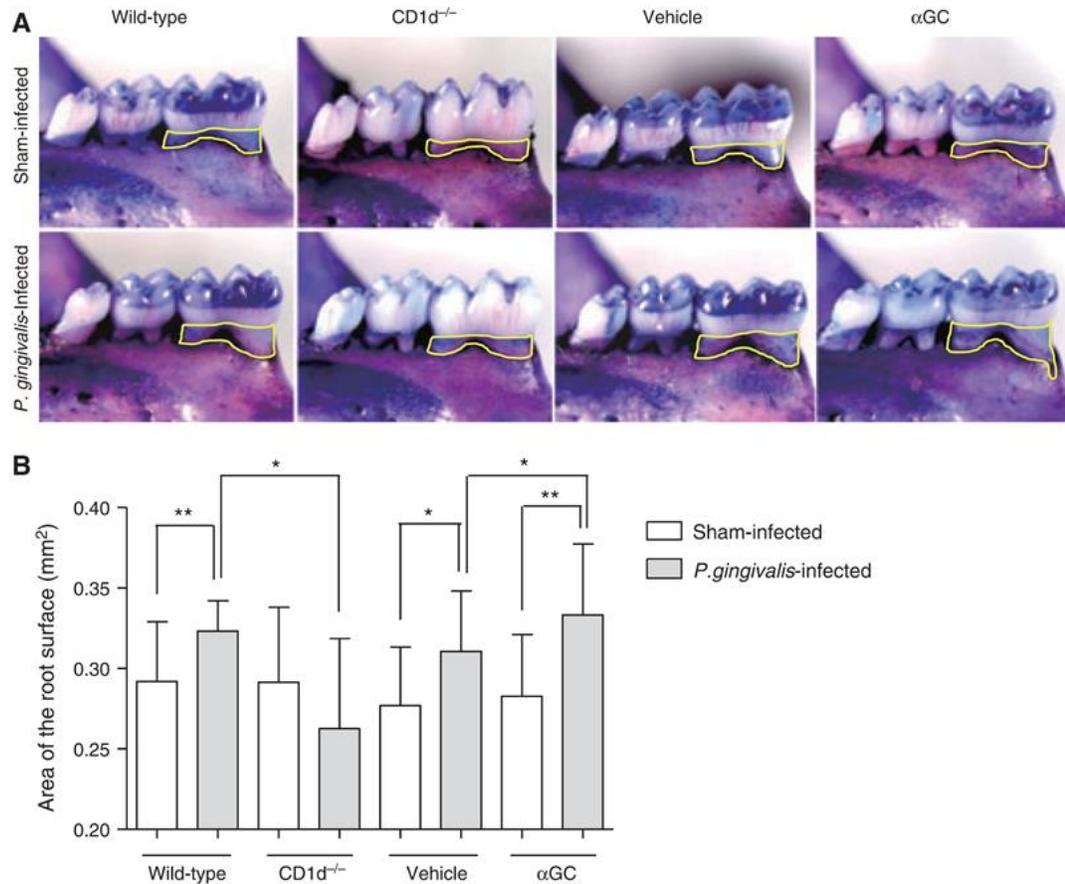


Figura 11. Infección oral con *P. gingivalis* induce resorción ósea alveolar en ratones. **A:** se muestran imágenes obtenidas mediante estereomicroscopio. Se observa el área de superficie radicular expuesta graficada a través de líneas amarillas que establecen los límites dentro de los diferentes grupos de estudio. **B:** Se muestra un gráfico que indica el área de superficie radicular expuesta en milímetros cuadrados en los diferentes grupos. Se observa que existió mayor resorción ósea alveolar en ratones WT con infección oral de *P. gingivalis* en comparación a ratones WT con infección placebo. Además, se observa que los ratones CD1d^{-/-} no presentaron diferencias de resorción ósea alveolar entre ambos grupos, infectados con *P. gingivalis* y ratones con infección placebo, sin embargo, la resorción fue mayor en el grupo de infección placebo. Ratones estimulados con α-GalCer presentaron niveles mayores de resorción ósea alveolar que ratones con estimulación placebo. (Tomado del paper "Natural killer T cells mediate alveolar bone resorption and a systemic inflammatory response in response to oral infection of mice with *P. gingivalis*" Aoki-Nonaka y cols, 2014).

Además, se establecieron los efectos de la infección con *P. gingivalis* en ratones. Así se obtuvo que la infección mediante *oral gavage* en ratones WT induce un aumento de los niveles de amiloide A sérico (SAA) (Figura 12), marcador importante en condiciones inflamatorias sistémicas. Este aumento se acrecienta en ratones que además fueron estimulados con α-GalCer (Figura 12). Por otro lado, la infección con *P. gingivalis* produce un aumento en los niveles séricos de RANKL soluble de ratones WT, observando los niveles más elevados de RANKL soluble en ratones que fueron estimulados con α-GalCer (Figura 12) (Aoki-Nonaka y cols, 2014).

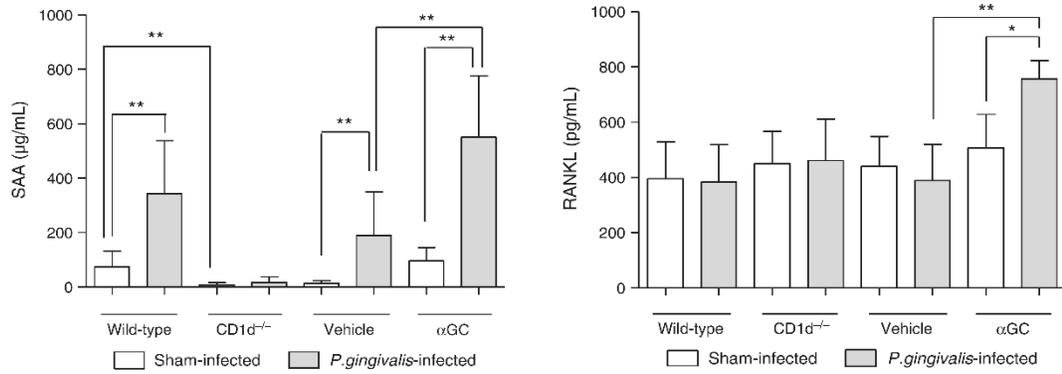


Figura 12. Efectos de la infección con *P. gingivalis* en los niveles séricos de SAA y RANKL. Se observan mayores niveles de SAA en los ratones WT infectados con *P. gingivalis* en comparación a los ratones WT con infección placebo. Además, se observa que el mayor aumento en los niveles de SAA se produce en ratones WT inoculados con *P. gingivalis* y estimulados con α-GalCer. Por otra parte, los ratones CD1d^{-/-} no presentaron un incremento en los niveles séricos de SAA. En relación con los niveles de RANKL, estos se observan con un leve aumento en ratones WT CD1d^{-/-} con estimulación placebo, ya sea infectados con *P. gingivalis* o con infección placebo. No obstante, los niveles de RANKL en ratones WT inoculados con *P. gingivalis* y estimulados con α-GalCer se muestran con un incremento significativo. (Tomado del paper “Natural killer T cells mediate alveolar bone resorption and a systemic inflammatory response in response to oral infection of mice with *P. gingivalis*” Aoki-Nonaka y cols, 2014).

Los niveles séricos de IgG, anticuerpo cuya concentración aumenta en conjunto a la inflamación periodontal, aumentaron significativamente en respuesta a la infección con *P. gingivalis* de ratones WT, en comparación a los ratones WT con infección placebo (Figura 13). Los niveles séricos de IgG fueron mayores en ratones WT estimulados por α-GalCer que habían sido inoculados con *P. gingivalis*. (Aoki-Nonaka y cols, 2014).

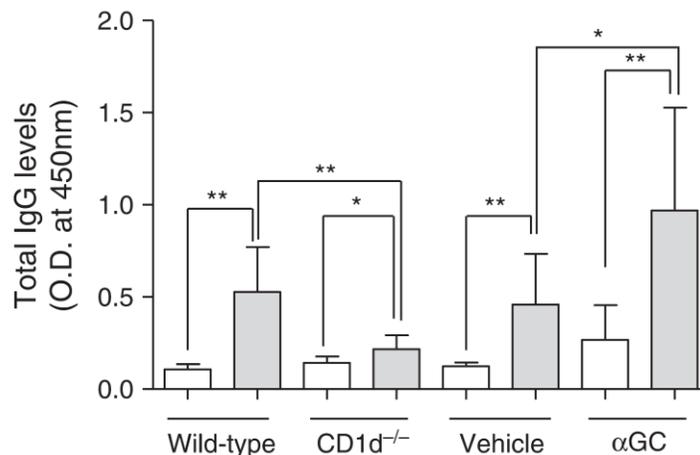


Figura 13. Efectos de la infección oral con *P. gingivalis* en los niveles séricos de IgG. Se observan niveles aumentados de IgG en ratones WT infectados con *P. gingivalis* en comparación a ratones WT con infección placebo. Se muestra, además, un aumento en los niveles de IgG en ratones WT infectados con *P. gingivalis* que además fueron estimulados con α-GalCer. (Tomado del paper “Natural killer T cells mediate alveolar bone resorption and a systemic inflammatory response in response to oral infection of mice with *P. gingivalis*” Aoki-Nonaka y cols, 2014).

Además, Aoki-Nonaka y cols. analizaron *in vitro* la producción de citoquinas por parte de los esplenocitos de los ratones WT de cada grupo en presencia de antígenos de *P. gingivalis*. De esta forma, los esplenocitos co-cultivados con *P. gingivalis* derivados de ratones infectados con *oral gavage* con *P. gingivalis* produjeron elevados niveles de IFN- γ en comparación a los esplenocitos cocultivados con *P. gingivalis* derivados de ratones control. Sin embargo, no existió aumento en la producción de IFN- γ en esplenocitos re infectados con *P. gingivalis* y a su vez estimulados con α -GalCer (Figura 14). En relación con la producción *in vitro* de IL-4 es importante destacar que aquellos esplenocitos derivados de ratones que fueron estimulados por α -GalCer presentaron un aumento significativo en los niveles de IL-4 (Aoki-Nonaka y cols, 2014). Por otra parte, la infección con *P. gingivalis* produjo un incremento en la producción de IL-10 por parte de los ratones WT, estos niveles aumentaron de manera significativa en esplenocitos re infectados con *P. gingivalis* que además derivan de ratones WT que fueron estimulados con α -GalCer, en efecto, la estimulación previa con α -GalCer incrementó los niveles de IL-10 incluso en esplenocitos derivados de ratones WT con infección placebo (Figura 14) (Aoki-Nonaka y cols, 2014).

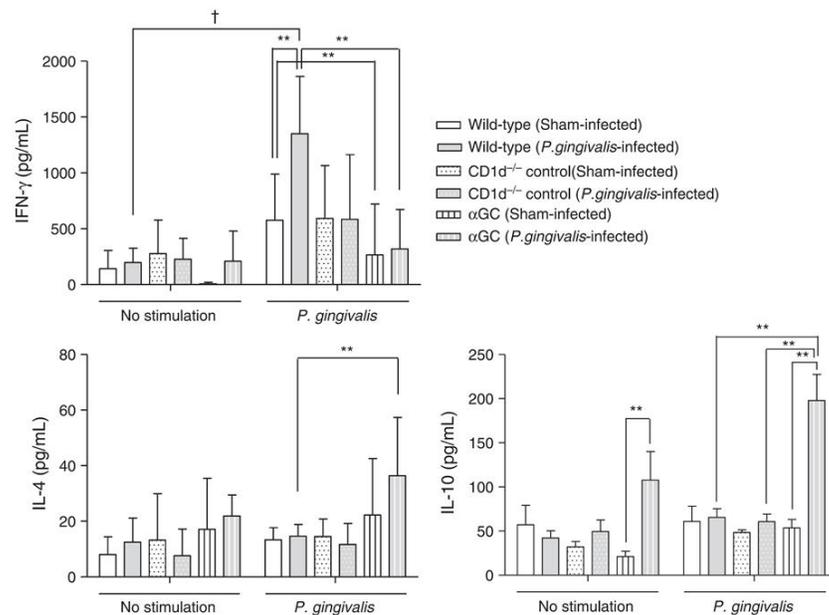


Figura 14. Producción de citoquinas por parte de esplenocitos estimulados con el antígeno de *P.gingivalis* *in vitro*. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de esplenocitos cocultivados con *P. gingivalis* derivados de ratones infectados con *P. gingivalis* y esplenocitos cocultivados con *P.gingivalis* derivados de ratones WT con infección placebo. (Tomado del paper "Natural killer T cells mediate alveolar bone resorption and a systemic inflammatory response in response to oral infection of mice with *P. gingivalis*" Aoki-Nonaka y cols, 2014).

Por otro lado, Nowak y cols. mediante su modelo experimental *in vitro* a través del que obtuvieron células dendríticas (DCs) derivadas de la médula ósea de ratones WT en presencia de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). Las DCs fueron estimuladas con α -GalCer o estimulación placebo y posteriormente se cultivaron en conjunto con *A. actinomycetemcomitans* o *P. gingivalis*. Finalmente, luego de realizar el lavado de las DCs, estas fueron añadidas al cultivo las células iNKT provenientes del hígado de los mismos ratones (Nowak y cols, 2013). De esta manera, demostraron que las DCs cultivadas con la bacteria *A. actinomycetemcomitans* promueven la secreción de IFN- γ por parte de las células iNKT, pero esta activación de las células iNKT va a depender de la concentración de la bacteria en el cultivo (Nowak y cols, 2013). Además, la infección de DCs con *A. actinomycetemcomitans*, estimula significativamente la elevación de los niveles basales de IL-17A en las células iNKT. En el caso de IL-4 no incrementaron los niveles basales con la presencia de *A. actinomycetemcomitans*. Por otra parte, aquellas DCs cultivadas con *P. gingivalis* no produjeron una activación suficiente en las células iNKT para producir un cambio en los niveles de IFN- γ , ni IL-4 (Figura 15) (Nowak y cols, 2013). Además, se realizó la incubación de DCs junto a anticuerpos bloqueantes de CD1d para evaluar si la activación de las células iNKT por parte de las DCs requiere de CD1d. Estas DCs con el bloqueo de la molécula CD1d mediante anticuerpo produjeron una reducción significativa de la producción de IFN- γ por parte de las células iNKT. Esto indica que la activación de las células iNKT por parte de DCs infectadas requiere la expresión de moléculas CD1d (Figura 15) (Nowak y cols, 2013).

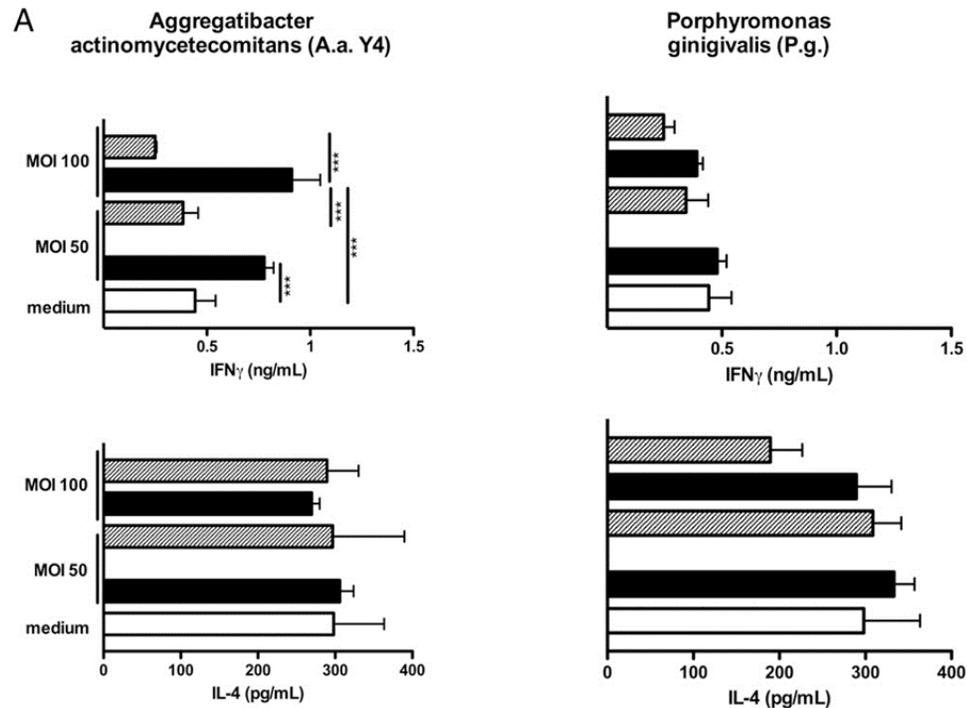


Figura 15. Efectos sobre IFN- γ e IL-4 de DCs posterior a la inoculación con *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* cultivadas en presencia de anticuerpos bloqueantes de CD1d (Barras sombreadas), con o sin α -GalCer y en diferente concentración de bacterias por 24 horas. Se muestra un aumento de los niveles de IFN- γ concentración-dependiente por parte de las iNKT en cultivos de DCs inoculadas con *A. actinomycetemcomitans*. Por otro lado, no existieron diferencias en la producción de IL-4 en los mismos cultivos de DCs. En el caso de los cultivos de DCs inoculadas con *P. gingivalis* no hubo diferencias en la producción de IFN- γ ni IL-4 (Tomado del paper "Activation of invariant Natural Killer T cells in periodontitis lesions", Nowak y cols, 2013).

Nowak y cols. analizaron el tipo de activación de las células iNKT frente a los patógenos periodontales, de esta forma evaluaron si la activación de las células iNKT requería la señalización TLR. De manera que utilizaron DCs derivadas de ratones WT y ratones MyD88^{+/-} y MyD88^{-/-}, siendo MyD88 una molécula que está involucrada en la vía de señalización de TLR. DCs derivadas de ratones WT e inoculadas con *A. actinomycetemcomitans* produjeron un incremento de IFN- γ por parte de las células iNKT. En contraste, DCs derivadas de ratones MyD88^{+/-} e infectadas con *A. actinomycetemcomitans* presentaron una producción reducida de IFN- γ en comparación con los ratones WT. Así es como se hacen necesarios ambos alelos de Myd88 para la activación de las células iNKT en respuesta a la infección con *A. actinomycetemcomitans* (Figura 16) (Nowak y cols, 2013). Además, se realizó el análisis de la expresión de la proteína CD25, proteína que presenta una regulación positiva (aumento en la expresión relativa) tras la activación de las células iNKT. De modo que aquellas iNKT cultivadas con DCs derivadas de ratones

WT estimuladas con *A. actinomycetemcomitans* presentaron una regulación positiva de la proteína CD25 dependiente de la concentración bacteriana. Por otra parte, no existió regulación positiva de CD25 en iNKT cultivadas con DCs derivadas de ratones MyD88^{+/-} y MyD88^{-/-} (Figura 16). Esto indica que es necesaria la señalización mediante TLR por parte de las DCs infectadas por *A. actinomycetemcomitans* para la activación de las células iNKT (Nowak y cols, 2013).

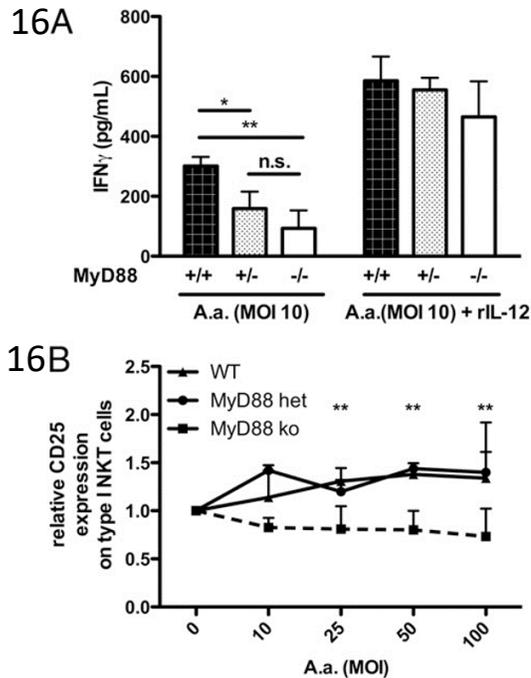


Figura 16. Activación de las células iNKT por parte de DCs infectadas con *A. actinomycetemcomitans* depende de la señalización TLR. 16A. se muestra la producción IFN- γ por parte de las células iNKT (activación de iNKT) cultivadas con DCs infectadas con *A. actinomycetemcomitans* derivadas de ratones WT MyD88^{+/-} y MyD88^{-/-}. Se muestra un aumento en la producción de IFN- γ en ratones WT, que disminuye en ratones MyD88^{+/-} y disminuye aún más en ratones MyD88^{-/-}. Esto sucede en presencia o ausencia de IL-12. 16B. Se presenta la expresión relativa de la proteína CD25 en células iNKT estimuladas por DCs provenientes de ratones wild type, MyD88^{+/-} y MyD88^{-/-}. A partir de ello se observa en la gráfica que existió un aumento en la expresión relativa de CD25 dependiente de la concentración bacteriana en ratones WT MyD88^{+/-}, en el caso de los ratones MyD88^{-/-} no existió regulación positiva de la proteína CD25. (Tomado del paper "Activation of invariant Natural Killer T cells in periodontitis lesions", Nowak y cols, 2013).

De acuerdo con lo antes mencionado, la activación de las células iNKT por medio de DCs infectadas con *A. actinomycetemcomitans in vitro*, está mediada por la molécula CD1d y necesita de señalización mediante TLR (Nowak y cols, 2013).

Además, posterior a la estimulación de las células NKT mediante la adición de α -GalCer en conjunto a la inducción de periodontitis experimental con *P. gingivalis* existió un aumento en la resorción ósea alveolar, reflejado en la superficie radicular expuesta de los ratones analizados (Aoki-Nonaka y cols, 2014). Además, la estimulación de las células NKT en conjunto a la inducción de periodontitis experimental ocasiona una respuesta sistémica que fue evidenciada mediante el aumento de RANKL, SAA e IgG (Aoki-Nonaka y cols, 2014). Así, se estableció el aumento de citoquinas como IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-17A debido a la activación de células NKT (Aoki-Nonaka y cols, 2014).

6.4 Concordancia entre revisores

Para definir que, si existió concordancia en el proceso de selección de los artículos, se calculó el coeficiente Kappa de Cohen, el cual fue de $k = 0,6$ (Tabla N°2).

		Revisor 2		Total
		SI	NO	
Revisor 1	SI	5	1	6
	NO	0	1	1
Total		5	2	

Tabla N°2. Cálculo de k de Cohen.

Proporción de acuerdo (Pra) = 0,86
 Acuerdo esperado (Pe) = 0,65
 Acuerdo K = 0,6

El acuerdo K se calculó a partir de los 7 artículos analizados a texto completo, para incluir 5 artículos con la aplicación de los criterios de inclusión y exclusión. Se obtuvo un coeficiente Kappa de cohen de 0,6 que establece un **acuerdo equitativo**.

6.5 Análisis del riesgo de sesgo de los estudios

En la evaluación del riesgo de sesgo que se realizó a través de la herramienta SYRCLE (Tabla N°3). Con respecto al dominio 1, este se calificó como “Poco claro”, debido a que no se informó método de asignación al azar durante la secuencia de asignación. En el dominio 2, este fue calificado en su totalidad como “Sí”, lo que se debe a que los grupos compartían características similares al inicio del estudio. El dominio 3 se calificó como “Poco claro” producto de que no existió información acerca de aleatorización durante la asignación de los grupos. El dominio 4 se calificó como “Sí”, lo que se debe a que es poco probable que los resultados se vean influenciados por no albergar los animales al azar. Los dominios 5, 6 y 7 estaban referidos al uso de ciego durante la intervención o al evaluar los resultados del estudio, sin embargo, en las investigaciones incluidas no se indica de forma clara que los investigadores estaban bajo ciego sobre las intervenciones, tampoco la elección aleatorizada de los animales, ni el ciego de los investigadores sobre los resultados, por estas razones el dominio fue calificado como “Poco claro”. En cuanto al dominio 8, es poco probable que los datos resultados faltantes posean influencia en los resultados finales, así todos se marcaron como “Poco claro”. Por último, los dominios 9 y 10 se marcaron como “Sí”. En general los estudios fueron marcados como “Poco claro”.

Tabla N°3. Herramienta SYRCLE para evaluación de riesgo de sesgo de estudios experimentales en animales.

SYRCLE's Tool	Estudios	
	Nowak, 2013	Aoki-Nonaka, 2014
1 ¿Se generó y aplicó adecuadamente la secuencia de asignación? <ul style="list-style-type: none"> - Los investigadores describieron un componente aleatorio en el proceso de generación de secuencias como: <ul style="list-style-type: none"> • Una tabla de números aleatorios; • Un generador de números aleatorios por computadora 	Poco claro	Poco claro
2 ¿Fueron los grupos similares al inicio del estudio o se ajustaron por factores de confusión en el análisis? <ul style="list-style-type: none"> - ¿Fue la distribución de las características basales relevantes equilibrado para los grupos de intervención y control? - De ser relevante, ¿Los investigadores se ajustaron adecuadamente a la distribución desigual de algunas características de referencia relevantes en el análisis? - ¿Fue adecuado el momento de la inducción de la enfermedad? 	si	si
3 ¿Se ocultó adecuadamente la asignación a los diferentes grupos durante? <ul style="list-style-type: none"> - ¿El investigador que asigna los animales al grupo de intervención o control no puede prever la asignación debido a uno de los métodos siguientes o equivalente? <ul style="list-style-type: none"> • Codificación de terceros de la asignación al azar central de la asignación de grupos experimentales y de control por un tercero • Sobres cerrados, opacos y numerados secuencialmente 	Poco claro	Poco claro
4 ¿Fueron los animales alojados al azar durante el experimento? <ul style="list-style-type: none"> - ¿Los autores colocaron al azar las jaulas o los animales dentro de la sala / instalación de animales? <ul style="list-style-type: none"> • Los animales se seleccionaron al azar durante la evaluación de resultados - ¿Es poco probable que los resultados o la medición del resultado se vieran influidos por no alojar a los animales al azar? 	Poco claro	Poco claro
5 ¿Los cuidadores y/o investigadores estaban cegados al conocimiento de qué intervención recibió cada animal durante el experimento? <ul style="list-style-type: none"> - ¿Se aseguró el cegamiento de los cuidadores e investigadores, y era poco probable que se hubiera roto? 	Poco claro	Poco claro

6	¿Se seleccionaron los animales al azar para el resultado?	Poco claro	Poco claro
	- ¿Los investigadores eligieron un animal al azar durante evaluación de resultados, o utilizaron un componente aleatorio en la generación de la secuencia para la evaluación de resultados?	Poco claro	Poco claro
7	¿Estaba cegado el evaluador de resultados?	Poco claro	Poco claro
	- ¿Se aseguró el cegamiento del evaluador de resultados y era poco probable que se hubiera roto?	Poco claro	Poco claro
	- ¿El evaluador de resultados no estaba cegado, pero los revisores juzgan que es probable que la falta de cegamiento no influya en el resultado?	Poco claro	Poco claro
8	¿Se abordaron adecuadamente los datos de resultado incompletos?	Poco claro	Poco claro
	- ¿Es poco probable que las razones de la falta de datos de resultado están relacionadas con el resultado real? (por ejemplo, falla técnica)	Poco claro	Poco claro
	- ¿Faltan datos de resultados equilibrados en números en grupos de intervención, con razones similares para faltar?	Poco claro	Poco claro
	• ¿Se imputan los datos de resultado faltantes utilizando métodos?	Poco claro	Poco claro
9	¿Los informes del estudio están libres de informes de resultados selectivos?	si	si
	- ¿El protocolo del estudio estaba disponible y todos los resultados primarios y secundarios preespecificados del estudio se informaron en el manuscrito actual?	si	si
	- ¿No estaba disponible el protocolo de estudio, pero estaba claro que el informe publicado incluía todos los resultados esperados (es decir, la sección de comparación de métodos y resultados)?	-	-
10	¿El estudio aparentemente no tuvo otros problemas que pudieran resultar en un riesgo de sesgo alto?	si	si
	- ¿El estudio estuvo libre de contaminación (combinación de medicamentos)?	si	si
	- ¿El estudio estuvo libre de influencias inapropiadas de los patrocinadores?	si	si
	- ¿El estudio estuvo libre de errores de unidad de análisis?	si	si
	- ¿Estuvieron ausentes los riesgos de sesgo específicos del diseño?	si	si
	- ¿Se agregaron nuevos animales a los grupos de control y experimentales para reemplazar a los que abandonaron la población original?	Poco claro	Poco claro

Luego, para el análisis de los estudios observacionales se utilizó la herramienta de Newcastle-Ottawa, que evalúa 9 parámetros definiendo cada estudio con un alta, moderada o baja calidad con relación al cumplimiento de cada sección (Tabla N°4). En la sección de selección todos los estudios obtuvieron la puntuación máxima. En la sección comparabilidad, un único estudio obtuvo la puntuación máxima (Nowak y cols, 2013), mientras que los demás estudios no consideraron factores de riesgo adicionales (Yamazaki y cols, 2001; Amanuma y cols, 2006; Mutukhuru, 2012). En la sección exposición, ningún estudio obtuvo el puntaje máximo, debido a que ningún estudio informó la calidad de ciego del investigador que registró los resultados de la investigación (Yamazaki y cols, 2001; Amanuma y cols, 2006; Mutukhuru, 2012; Nowak y cols, 2013). Al sumar la puntuación de cada estudio, la mayoría posee calidad moderada (Yamazaki y cols, 2001; Amanuma y cols, 2006; Mutukhuru, 2012), a excepción de un único estudio que presentó calidad alta (Nowak y cols, 2013).

Tabla N°4. Herramienta Newcastle-Ottawa para evaluación de riesgo de sesgo de estudios observacionales.

Criterios de evaluación de la calidad	Aceptable	Yamazaki y cols, 2001	Amanuma y cols, 2006	Muthukuru, 2012	Nowak y cols, 2013
Selección					
¿Es adecuada la definición de caso o exposición?	Si, con validación independiente	★	★	★	★
¿Representatividad de los casos?	Series de casos consecutivos u obviamente representativos	★	★	★	★
¿Selección de controles?	Controles comunitarios	★	★	★	★
¿Definición de controles?	Sin historia de enfermedad. Sección de tejido gingival clínicamente sano (Sin presencia de PS < 4 mm, sin pérdida de soporte o sangrado al sondaje)	★	★	★	★
Comparabilidad					
Controles del estudio por diagnóstico periodontal	Si	★	★	★	★
¿Se estudian controles para al menos 3 factores de riesgo adicionales?	Género/ Edad/ Condiciones sistémicas/ Embarazo/ Tabaquismo	-	-	-	★
Exposición					
¿Evaluación de la exposición?	Examen clínico realizado por un profesional de la salud, ciego al estado de caso/control	-	-	-	-
Mismo método de verificación para casos y controles	Si	★	★	★	★
Tasa de no respuesta	Misma tasa para ambos grupos	★	★	★	★
Alta: >7; Moderada: 5 – 7; Baja <5	Nivel de calidad general (Máximo = 9)	7	7	7	8
	Categoría de calidad	Moderada	Moderada	Moderada	Alta
Nota: Cada estrella significa que el criterio se cumple, la ausencia de estrella significa ausencia de cumplimiento.					

7. DISCUSIÓN.

Mediante la presente revisión sistemática exploratoria se han mostrado resultados que intentan evidenciar mediante estudios observacionales en humanos la presencia de células NKT en tejido periodontal, además de los cambios en la proporción de estas células bajo el contexto de pacientes afectados por periodontitis (Yamazaki y cols, 2001; Amanuma y cols, 2006; Nowak y cols, 2013; Mutukhuru, 2012). Por otro lado, los resultados obtenidos han intentado esclarecer cómo actúan las células NKT bajo el contexto de la periodontitis, ya que como fue mencionado, existen múltiples líneas de evidencia que apuntan al rol patogénico de las células NKT en diversas enfermedades inflamatorias y osteolíticas (Drennan y cols, 2010; Oh y Chung, 2011; Gilhar y cols, 2016; Rizzo y cols, 2019; Chiba y cols, 2004; Tilkeridis y cols, 2019). Por lo tanto, mediante los resultados obtenidos a partir de estudios *in vitro* e *in vivo* se intentó esclarecer la activación y acción de las células NKT en la periodontitis (Nowak y cols, 2013; Aoki-Nonaka y cols, 2014).

7.1 Presencia de las células NKT en tejido oral de pacientes con periodontitis.

Mediante de la recopilación de diferentes estudios observacionales ha sido posible establecer que existe un aumento significativo en la proporción relativa de las células NKT en muestras de tejido extraído de pacientes afectados de periodontitis en comparación a gingivitis y/o tejido sano (Yamazaki y cols, 2001; Nowak y cols, 2013). A su vez, se logró evidenciar un aumento significativo en el número de células positivas para el marcador de V α 24J α Q en lesiones periodontales extraídas de pacientes afectados de periodontitis en comparación a muestras de tejido afectadas por gingivitis y/o tejido sano (Amanuma y cols, 2006; Muthukuru y cols, 2012). De manera que, se demostró un aumento significativo en la proporción de estas células en tejidos humanos bajo condiciones de periodontitis. Es importante recordar que, como se mencionó anteriormente, las células NKT presentan diferentes funciones efectoras, tales como elevada actividad citotóxica/lítica, rápida secreción de citoquinas reguladoras, Th1/Th2 y activación de múltiples tipos celulares inmunes (Godfrey y cols, 2000; Kronenberg y Gapin, 2002; Godfrey y Kronenberg, 2004; Carreño y cols, 2016). Todas estas funciones podrían ser parte del rol de las células NKT en el contexto periodontal, sin embargo, es importante

entender la periodontitis y su etiopatogenia asociado a los mecanismos de activación y el posible rol de las células NKT.

7.2 Etiopatogenia de la periodontitis y activación de las células NKT.

Es importante describir que la periodontitis es el resultado de la sinergia polimicrobiana y la disbiosis de la comunidad bacteriana que coloniza el ambiente subgingival (Hajishengallis y cols, 2012). Sin embargo, la destrucción del tejido periodontal está determinada principalmente por la respuesta inmune del hospedero en donde las subpoblaciones de linfocitos cumplen un rol clave en la resorción del hueso alveolar que conduce a la pérdida de dientes (Hajishengallis y Korostoff 2017; Lamont y cols, 2018; Tilkeridis y cols, 2019). De hecho, la resorción del hueso alveolar implica la relación antagónica entre la actividad de los linfocitos Th17 productores de RANKL y los linfocitos Treg productores de IL-10 (Garlet y Giannobile, 2018; Alvarez y cols, 2019). Por lo tanto, la resorción del hueso alveolar es, en parte, una consecuencia del desequilibrio entre Th17 y Treg dentro de la respuesta inmune desplegada en los tejidos afectados por la periodontitis, lo que provoca la regulación positiva de RANKL y otras citoquinas pro-inflamatorias que promueven la osteoclastogénesis y la pérdida de hueso alveolar (Alvarez y cols, 2018; Cavalla y cols, 2021).

Dentro de las subpoblaciones de linfocitos se encuentran las células NKT, que bajo su rol patogénico en la periodontitis han sido estudiadas mediante estudios animales *in vivo* e *in vitro* (Seidel y cols, 2020). En este contexto, las bacterias Gram negativas contienen glicoesfingolípidos en su membrana externa, de esta forma las bacterias periodontopatógenas como *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *Tanerella forsythia* y *Treponema denticola* pueden expresar glicoesfingolípidos en su estructura los que podrían ser procesados y presentados por APCs CD1d⁺ y consecuentemente activar las células NKT (Kinjo y cols, 2005; Mattner y cols, 2005; Amanuma y cols, 2006; Nowak y cols, 2013). De esta forma, la activación de las células NKT bajo el contexto periodontal va a ser dependiente de los glicoesfingolípidos de membrana pertenecientes a las bacterias Gram negativas (Mattner y cols, 2005).

Con respecto a la forma de activación de las células NKT, existe un consenso general que establece que la presentación antigénica es dependiente de la molécula CD1d, por sobre otras isoformas de la molécula CD1 (Bendelac y cols, 2006). Bajo esta línea y de acuerdo con la evidencia recopilada, se establece que en el contexto de la inoculación *in vitro* con antígenos periodontopatógenos se requiere de la expresión de la molécula CD1d, ya que en el caso de existir bloqueadores de esta molécula dentro del cultivo se imposibilita la activación de las células NKT (Nowak y cols, 2013). Por otro lado, en biopsias de tejido gingival obtenidas de pacientes con periodontitis o gingivitis se analizó la expresión del marcador V α 24 y las diferentes isoformas de CD1, observándose un predominio de las isoformas CD1d sobre CD1a, CD1b y CD1c en pacientes con periodontitis y un mayor número de células CD1d⁺ y células NKT V α 24⁺ en pacientes con periodontitis, en comparación con pacientes con gingivitis (Amanuma y cols, 2006). Aunque las células dendríticas pueden expresar CD1d, el análisis de la doble expresión de CD1d y CD83 reveló un número significativo de células CD1d⁺CD83⁻ infiltrantes en las lesiones periodontales que no corresponden a las células dendríticas (Amanuma y cols, 2006). Esto indica que otras células presentadoras de antígenos (APCs) que comparten la molécula CD1d podrían participar en la presentación de antígeno y en la activación de las células NKT durante la periodontitis (Blumberg y cols, 1991; Amanuma y cols, 2006). De hecho, se observó la expresión conjunta de CD1d⁺ y V α 24⁺ en tejidos afectados por periodontitis, lo que sugiere que los linfocitos B CD1d⁺ podrían activar las células NKT V α 24⁺ (Amanuma y cols, 2006). Es importante recordar, que un gran número de linfocitos B infiltra los tejidos gingivales en pacientes afectados por periodontitis (Gu y Han, 2020). Además, las células NKT tienen la capacidad de reconocer antígenos presentados por CD1d en los linfocitos B y a la vez las células NKT activadas pueden inducir la proliferación de células B y la producción de inmunoglobulinas (Galli y cols, 2003; Amanuma y cols, 2006). Por lo tanto, la función patogénica de las células NKT durante la periodontitis podría estar estrechamente relacionada a la actividad de los linfocitos B, tanto en su función como APCs y como células efectoras productoras de anticuerpos. Por otro lado, en relación con la activación de las células NKT, se estableció que las APCs presentadoras de antígenos periodontopatógenos requerían de la señalización TLR

para promover la activación de las células inmunes, en particular las NKT (Nowak y cols, 2013).

Además, debido a la evaluación en la capacidad de activación de distintos patógenos periodontales sobre las células NKT. Estas células al ser expuestas *in vitro* ante células dendríticas estimuladas con *A. actinomycetemcomitans* secretaron de manera dosis dependiente un incremento en los niveles de IFN- γ e IL-17 en comparación con las células NKT que habían sido expuestas a *P. gingivalis* a través células dendríticas (Garlet, 2010; Nowak y cols, 2013). Estos resultados detectados en células NKT confirman la mayor capacidad inmunogénica de *A. actinomycetemcomitans* sobre *P. gingivalis* descrita previamente en otras células inmunes (Vernal y cols, 2014; Díaz-Zúñiga y cols, 2015; Melgar-Rodríguez y cols, 2016). De esta manera, la activación de las células NKT va a responder de forma distinta ante los distintos patógenos periodontales, a pesar de presentar antígenos glicolipídicos similares. De la misma forma la estimulación mediante α -GalCer establece una respuesta aumentada de las células NKT en comparación a la respuesta ante la activación ofrecida por NKT bajo el estímulo de los antígenos periodontales como *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*, que se evidencia en el aumento de los niveles de resorción alveolar, RANKL, SAA, IgG, IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-17.

7.3 Células NKT y su relación con la resorción ósea alveolar durante la periodontitis

Se han realizado estudios *in vivo* sobre la relación de la activación de las células NKT con el desarrollo y la función osteoclástica (Hu y cols, 2011). En ratones seguido de la administración intraperitoneal de α -GalCer se evidenció que las células NKT activadas generaban una maduración y activación más rápida de los osteoclastos a nivel sistémico (Hu y cols, 2011), al realizar el mismo procedimiento en ratones CD1d^{-/-} se obtuvo una acción osteoclástica reducida en comparación a los ratones WT (Hu y cols, 2011). En el caso de estudios *in vivo* en que se realizó la inducción de periodontitis experimental mediante la inoculación con *oral gavage* de *P. gingivalis* y la administración intraperitoneal de α -GalCer las células NKT de los ratones WT promovieron la inflamación sistémica, la producción de RANKL

periodontal, la osteoclastogénesis y la pérdida de hueso alveolar (Aoki-Nonaka y cols, 2014). Además, cuando se indujo periodontitis en ratones CD1d^{-/-}, la infección con *oral gavage* de *P. gingivalis* desencadenó una menor resorción ósea alveolar en comparación con la periodontitis inducida en ratones WT (Aoki-Nonaka y cols, 2014). Lo que nos indica que también en periodontitis experimental se requiere de la expresión de la molécula CD1d para la presentación antigénica y posterior activación de las células NKT.

Así, RANKL es considerado el factor osteoclastogénico más importante, y a su vez una molécula clave que determina la progresión de las lesiones periodontales/periapicales (Yuan y cols, 2011; Francisconi y cols, 2018; Alvarez y cols, 2019). De manera que, bajo el contexto de la progresión de la periodontitis, los niveles de RANKL van a incrementarse conforme exista aumento en el infiltrado de las células Th1 y Th17. Este aumento de RANKL sumado al aumento de citoquinas proinflamatorias ocasiona los efectos pro-inflamatorios y pro-osteoclastogénicos que al ser originados a causa de los efectos de las células Th1/Th17 resultan en la inflamación sin remisión (Cavalla y cols, 2021). Según los datos recopilados a través de la presente revisión fue posible evidenciar *in vivo* que la infección con *P. gingivalis* produjo un aumento en los niveles séricos de RANKL soluble de ratones WT, observando los niveles más altos de RANKL soluble en ratones estimulados con α -GalCer (Aoki-Nonaka y cols, 2014). De manera que, como fue mencionado las células NKT al ser activadas generan la secreción de citoquinas del perfil Th1, Th2 y Th17 (Tomura y cols, 1999; Kitamura y cols, 1999), al hablar de citoquinas Th1 y sobre todo Th17 nos referimos a citoquinas proinflamatorias que, como fue mencionado, ocasionan un aumento en los niveles de RANKL provocando un aumento de la inflamación y acción osteoclástica que se traduce en niveles de resorción alveolar aumentados (Aoki-Nonaka y cols, 2014). Por lo tanto, la activación de las células NKT bajo el contexto periodontal ocasiona mayor severidad de la periodontitis experimental, ya que incrementa los niveles de resorción alveolar. Sin embargo, esta evidencia se basa en estudios experimentales *in vivo* donde se recoge información a partir de muestras al final de las intervenciones, por lo tanto, no es posible evaluar cambios a través del tiempo en la producción de citoquinas y/o niveles de resorción ósea alveolar. De manera que, no es posible establecer con

certeza si la acción de las células NKT es netamente inflamatoria y osteo-resortiva, sino que podría ejercer incluso una acción reguladora en alguna o varias de las etapas de la progresión de la periodontitis.

7.4 Expresión de citoquinas por parte de células NKT

En relación con las funciones efectoras de las células NKT, se ha descrito su capacidad de expresión de citoquinas mediante la administración de ligandos específicos *in vivo*. De acuerdo con estos estudios las células NKT al ser activadas serían capaces de secretar citoquinas asociadas a los fenotipos Th1/Th2 como IL-4, IL-12 e IFN- γ (Yoshimoto, 1994; Tomura y cols, 1999; Kitamura y cols, 1999). Dentro de la evidencia recogida a partir de estudios *in vivo* e *in vitro* pudimos observar la expresión de citoquinas por parte de las células NKT que fueron expuestas a DCs cultivadas con periodontopatógenos y/o α -GalCer. De manera que las células NKT activadas produjeron aumento en la producción de IFN- γ , IL-4 e IL-10 en comparación a células NKT que no fueron expuestas a periodontopatógenos y/o estimuladas con α -GalCer (Garlet. 2010; Aoki-Nonaka y cols, 2011; Nowak y cols, 2013). De acuerdo con esto, la activación de las células NKT bajo el contexto de la periodontitis tiene como consecuencia un aumento en la secreción de las citoquinas ya nombradas, de esta forma debemos entender las implicancias que presentan éstas citoquinas bajo el contexto periodontal. Dentro del perfil de citoquinas Th1 se encuentra IFN- γ , esta citoquina bajo el contexto periodontal se caracteriza por llevar a un incremento de la resorción ósea alveolar producto de la inducción de la expresión de quimioquinas y posterior atracción de células productoras de RANKL y precursores osteoclasticos hacia el lugar de la lesión periodontal (Garlet y cols, 2008; Somer y cols, 2019). Por otro lado, dentro del perfil de citoquinas Th2 encontramos IL-4 que se caracteriza por ser anti-inflamatoria y dentro del contexto periodontal esta citoquina lleva a la polarización de los macrófagos a un fenotipo M2, lo que quiere decir que estos macrófagos M2 van a producir citoquinas inmuno-reguladoras como IL-10 y TGF β generando un medio modulador y regulador ayudando a limitar la respuesta del hospedero y por lo tanto, colaborando con la estabilidad de la lesión periodontal (Trombone y cols, 2010; Araujo-Pires y cols, 2015; Francisconi y cols, 2018). El paradigma que es aceptado actualmente establece que la patogenia de la periodontitis implica una respuesta

inmuno-inflamatoria mediada por la actividad de los linfocitos Th1, Th2, Th17 y Treg, en la que los linfocitos Th1 y Th17 se han relacionado más con el inicio y progresión de la periodontitis, mientras que linfocitos Th2 y Treg se han relacionado más con la remisión de la periodontitis y la reparación periodontal (Alvarez y cols, 2018; Cavalla y cols, 2021). Bajo esta línea, las células NKT activadas podrían estar implicadas tanto en la respuesta pro-inflamatoria como anti-inflamatoria y a su vez la regulación de la respuesta inmune, como fue anteriormente mencionado estas células se caracterizan por tener como funciones efectoras la producción de citoquinas del perfil Th1/Th2. De acuerdo con los antecedentes recopilados las células NKT *in vivo* en periodontitis experimental e *in vitro* bajo la inoculación de antígenos periodontopatógenos, muestran que posterior a la activación de estas células existe efectivamente el aumento en los niveles de citoquinas del perfil Th1 como IFN- γ , pero a su vez existe aumento en la producción citoquinas del perfil Th2 como IL-4. Por lo tanto, si bien estos antecedentes podrían permitirnos establecer una clara asociación entre la actividad de las células NKT y los eventos patológicos/reguladores que caracterizan a la periodontitis, hasta la fecha no existe una evidencia clara que establezca una relación funcional entre los linfocitos Th1, Th2 o Th17, las células B, las células NK y las células NKT asociados a los estadios de la enfermedad. Como ya fue mencionado, la evidencia en esta materia es escasa y heterogénea, de manera que se hace necesario incrementar la cantidad de estudios experimentales que permitan recopilar la información necesaria para esclarecer la función e importancia de las células NKT en la patogenia de la periodontitis. En relación con la producción de citoquinas de las células NKT es relevante establecer los niveles de producción durante el desarrollo y progreso de la enfermedad, además de clarificar cómo la transactivación podría instaurar interacciones entre la actividad de las células NKT y otras diversas células inmunes bajo el contexto periodontal.

De esta forma, está evidenciada la existencia de las células NKT en el tejido periodontal, células que durante la periodontitis aumentan su proporción y además se activan ocasionando liberación de citoquinas que podrían intervenir en el aumento de la severidad de la enfermedad periodontal. Sin embargo, en la actualidad esclarecer de manera fehaciente el rol de las células NKT no es posible.

Se requiere mayor cantidad de estudios experimentales tanto *in vivo* como *in vitro* que incluyan el análisis de la variación a través del tiempo del nivel de expresión de citoquinas, estimulación de otras células inmunes, respuesta efectora de aquellas células inmunes transactivadas, niveles de producción de citoquinas asociadas a inflamación y resorción ósea alveolar. De esta forma, podrían generarse la evidencia necesaria que nos permita establecer la conveniencia de la extrapolación de la dinámica de las células NKT bajo el contexto periodontal como posibilidad terapéutica de la periodontitis.

7.5 Heterogeneidad de los estudios

Los estudios analizados en esta revisión sistemática de tipo exploratoria se caracterizaron por ser en su mayoría heterogéneos, por lo tanto, no se realizó análisis estadístico de los datos, lo que además se condice con la naturaleza exploratoria de esta revisión.

Sólo se analizó un único estudio *in vivo* (Aoki-Nonaka y cols, 2014) por lo tanto, se establece la escasa evidencia bajo esta metodología. En este estudio se realizó la inducción de periodontitis experimental mediante *oral gavage*, no se informaron las estimaciones del tamaño de los efectos de la infección bacteriana con medidas de variabilidad, mientras que los valores de *p-value* se informaron en cada variable evaluada. Es importante mencionar que, al no informarse estimaciones en algunos estudios, el significado exacto de los valores *p-value* podría malinterpretarse fácilmente con respecto a lo que realmente significa.

Por otro lado, se evaluaron dos estudios experimentales que incluían metodología *in vitro* (Nowak y cols, 2013; Aoki-Nonaka y cols, 2014). La heterogeneidad metodológica de estos estudios se relaciona con las células blanco utilizadas, la realización de re-infección/re-estimulación y el patógeno periodontal utilizado. En relación con las células blanco utilizadas, los autores mencionaron que se utilizaron esplenocitos derivados de ratones WT o CD1d^{-/-} (Aoki-Nonaka y cols, 2014) y DCs derivadas de ratones WT, MyD88^{+/-} y MyD88^{-/-}. En cuanto a la realización de re-infección/re-estimulación, los autores señalaron que los esplenocitos provenían de ratones que ya habían sido infectados o estimulados con α -GalCer (Aoki-Nonaka y cols, 2014) y DCs que provenían de ratones no intervenidos (Nowak y cols, 2013).

Por otro lado, los patógenos periodontales utilizados fueron *P. gingivalis* (Nowak y cols, 2013; Aoki-Nonaka y cols, 2014) y *A. actinomycetemcomitans* (Nowak y cols, 2013). Y el antígeno glicolipídico fue α -GalCer (Nowak y cols, 2013; Aoki-Nonaka y cols, 2014). De estos dos estudios, ninguno informó explícitamente las estimaciones del tamaño de los efectos de la infección con medidas de variabilidad como la desviación estándar o error típico, sin embargo, los valores de *p-value* fueron informados.

En los estudios observacionales, la heterogeneidad metodológica se basó en las características de la población de la investigación y en el diagnóstico periodontal establecido para el estudio. El rango etario utilizado fue diferente en cada estudio, los autores mencionaron que el rango utilizado fue desde los 25 años en adelante (Nowak y cols, 2013) de 26 a 55 años (Yamazaki y cols, 2001), 24 a 64 años (Amanuma y cols, 2006) y otros estudios no especificaron rango etario de los pacientes evaluados (Mutukhuru, 2012). En relación con el estado sistémico de los pacientes evaluados, se excluyeron pacientes con patologías sistémicas (Yamazaki y cols, 2001, Mutukhuru, 2012, Nowak y cols, 2013), embarazadas (Mutukhuru, 2012) usuarios de tabaco o reemplazantes de nicotina (Nowak y cols, 2013) y algunos estudios no especificaron el estado sistémico de los pacientes evaluados (Amanuma y cols, 2001). Por otro lado, el estado periodontal evaluado y su control fue de periodontitis crónica moderada a severa y gingivitis (Yamazaki y cols, 2001; Amanuma y cols, 2006), periodontitis crónica y salud gingival Mutukhuru, 2012) y periodontitis crónica con periodontitis agresiva (Nowak y cols, 2013).

7.6 Análisis del riesgo de sesgo

La evaluación del riesgo de sesgo de los estudios *in vivo* en animales se calificó generalmente como "Poco claro", debido a la falta o ausencia de información. Por ejemplo, en los dominios 1 y 3 de la herramienta SYRCLE, en ningún estudio se mencionó explícitamente algún método de asignación al azar y no se describió a ninguna persona a cargo de la asignación aleatoria de animales a los grupos de intervención. La mayoría de las calificaciones de "Poco claro" estaban relacionadas con los ítems del SYRCLE que evaluaban cegamiento, aleatorización antes de la intervención o durante la evaluación de resultados (dominios 5, 6 y 7). Estos

hallazgos reconocen un importante "sesgo de información". Además, no se consignó en ninguno de los estudios evaluados datos de resultados incompletos, por lo que el dominio 8 también fue considerado "Poco claro", sin embargo, es poco probable que los datos resultados faltantes posean influencia en los resultados finales. Cabe mencionar que varias pautas para estudios con animales, como SYRCLE, consignan qué factores podrían influir en los resultados. Tanto el estrés producido por la exposición a la luz dentro de las jaulas como un aumento de la temperatura serían capaces de generar cambios en el metabolismo o farmacodinamia en los animales (Hooijmans y cols, 2014). Por lo tanto, se debe prestar atención especial a las instalaciones de alojamiento de animales, la manipulación del personal y los protocolos de aleatorización, que podrían ayudar a evitar sesgos en los estudios. Esta información no estaba disponible en los estudios analizados (Nowak y cols, 2013; Aoki-Nonaka y cols, 2014).

La evaluación del riesgo de sesgo de los estudios observacionales en humanos, por medio de la herramienta Newcastle-Ottawa se calificaron generalmente con calidad moderada. En la sección de selección la mayoría de los estudios cumplieron los 4 ítem, lo que indica que la elección de los grupos fue generalmente adecuada. En relación con la sección de comparación solo un estudio no considero la edad de los pacientes con periodontitis (Mutukhuru, 2012), mientras que también solo 1 no considero el estado sistémico de los pacientes evaluados (Amanuma y cols, 2001), sin embargo, 3 de los 5 estudios no evaluaron otros factores de riesgo adicionales como el embarazo, mientras que solo 1 estudio consideró el tabaquismo, debido a ello podría existir "sesgo de confusión". En cuanto a la sección de exposición o de resultados, ninguno de los estudios mencionó en su metodología el cegamiento de los profesionales a cargo del registro de los resultados lo cual significa que podrían presentar riesgo de "sesgo de información". Por otra parte, cabe mencionar que en la mayoría de los estudios no se perdieron pacientes durante el seguimiento o los sujetos perdidos fueron menor o igual al 20% (Mutukhuru, 2012; Amanuma y cols, 2006; Nowak y cols, 2013) por lo que es poco probable que induzca sesgo. Si bien la calidad de los estudios tuvo una tendencia a ser moderada es importante tener en consideración que algunas de estas investigaciones no están libres de presentar algún tipo de sesgo.

8. CONCLUSIONES.

- Los estudios han demostrado la presencia de las células NKT en tejido gingival de animales y humanos, bajo el contexto de periodontitis y de salud.
- Existe un aumento en la expresión relativa y/o número de células NKT en periodontitis en comparación a la salud gingival.
- La activación de las células NKT bajo el contexto periodontal, ya sea con periodontopatógenos y/o α -Galcer modula la respuesta inmune a través de diferentes vías, por lo tanto, es importante esclarecer la relación funcional de las células NKT y sus subconjuntos en el desarrollo y progresión de la periodontitis.
- Para establecer de manera concreta el rol de estas células durante el desarrollo de la periodontitis se hacen necesarios estudios *in vivo* e *in vitro* que establezcan a través del tiempo posibles variaciones en la expresión de citoquinas por parte de las células NKT y sus subconjuntos.
- Es necesaria una mayor investigación de las células NKT en periodontitis para entender el rol de estas células y sus subconjuntos, de tal forma que sea posible establecer si es conveniente realizar futuros estudios en pacientes para considerar a estas células como posibilidad dentro de la terapéutica periodontal.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Alvarez C, Monasterio G, Cavalla F, Córdova L, Hernández M y cols. (2019). Osteoimmunology of oral and maxillofacial diseases: Translational applications based on biological mechanisms. *Frontiers in immunology*, 10, 1664. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01664.

Alvarez C, Rojas C, Rojas L, Caferatta E, Monasterio G y cols. (2018). Regulatory T lymphocytes in periodontitis: a translational view. *Mediators of inflammation*, 2018, 7806912. DOI: 10.1155/2018/7806912.

Amanuma R, Nakajima T, Yoshie H y Yamazaki K. (2006). Increased infiltration of CD1d and natural killer T cells in periodontal disease tissues *Journal of periodontal research*, 41(1), 73–79. DOI: 10.1111/j.1600-0765.2005.00837.x.

Aoki-Nonaka Y, Nakajima T, Miyauchi S, Miyazawa H, Yamada H y cols. (2014). Natural killer T cells mediate alveolar bone resorption and a systemic inflammatory response in response to oral infection of mice with *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of periodontal research*, 49(1), 69–76. DOI: 10.1111/jre.12080.

Araujo-Pires A, Vieira A, Francisconi C, Bigueti C, Glowacki A y cols. (2015). IL-4/CCL22/CCR4 axis controls regulatory T-cell migration that suppresses inflammatory bone loss in murine experimental periodontitis. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 30(3), 412–422. DOI: 10.1002/jbmr.2376.

Arksey H y O'Malley L. (2005). Scoping studies: towards a methodological framework. *International Journal of Social Research Methodology*, 8(1), 19-32. DOI: 10.1080/1364557032000119616.

Behar S, Podrebarac T, Roy C, Wang C. y Brenner M. (1999). Diverse TCRs recognize murine CD1. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 162(1), 161–167. ISSN: 0022 – 1767. PMID: 9886382.

Bendelac A, Lantz O, Quimby O, Yewdell J, Bennik J y cols. (1995). CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. *American Association for the Advancement of Science*, 268(5212), 863–865. DOI: 10.1126/science.7538697.

Bendelac A, Savage P y Teyton L. (2007). The biology of NKT cells. *Annual review of immunology*, 25, 297–336. DOI: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141711.

Bendelac A. (1995). CD1: Presenting unusual antigens to unusual T lymphocytes. *American Association for the Advancement of Science*, 269(5221), 185–186. DOI:10.1126/science.7542402.

Benlagha K, Weiss A, Beavis A, Teyton L y Bendelac A. (2000). *In vivo* identification of glycolipid antigen-specific T cells using fluorescent CD1d tetramers. *The Journal of experimental medicine*, 191(11), 1895–1903. DOI: 10.1084/jem.191.11.1895.

Bennstein S (2017). Unraveling Natural Killer T-Cells Development. *Frontiers in immunology*, 8, 1950. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01950.

Biburger M y Tiegs G. (2005). Alpha-galactosylceramide-induced liver injury in mice is mediated by TNF-alpha but independent of Kupffer cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 175(3), 1540–1550. DOI: 10.4049/jimmunol.175.3.1540.

Blumberg R, Terhorst C, Bleicher P, McDermott F, Allan C y cols. (1991). Expression of a nonpolymorphic MHC class I-like molecule, CD1D, by human intestinal epithelial cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 147(8), 2518–2524. PMID: 1717564.

Brennan P, Brigl M, y Brenner M. (2013). Invariant natural killer T cells: An innate activation scheme linked to diverse effector function. *Nature Reviews Immunology*, 13(2), 101–117. DOI: 10.1038/nri3369.

Brigl M. y Brenner M. (2004). CD1: antigen presentation and T cell function. *Annual review of immunology*, 22, 817–890. DOI: 10.1038/nri3369.

Carreno L, Saavedra-Avila N y Porcelli S. (2016). Synthetic glycolipid activators of natural killer T cells as immunotherapeutic agents. *Clinical & translational immunology*, 5(4), e69. DOI: 10.1038/cti.2016.14.

Cavalla F, Letra A, Silva R y Garlet G. (2021). Determinants of Periodontal/Periapical Lesion Stability and Progression. *Journal of Dental Research*, 100(1), 29–36. DOI: 10.1177/0022034520952341.

Chiba A, Oki S, Miyamoto K, Hashimoto H, Yamamura T y cols. (2004). Suppression of Collagen-Induced Arthritis by Natural Killer T Cell Activation with OCH, a Sphingosine-Truncated Analog of α -Galactosylceramide. *Arthritis and Rheumatism*, 50(1), 305–313. DOI: 10.1002/art.11489.

Dellabona P, Padovan E, Casorati G, Brockhaus M y Lanzavecchia A. (1994). An invariant V alpha 24-J alpha Q/V beta 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4-8- T cells. *The Journal of experimental medicine*, 180(3), 1171–1176. DOI: 10.1084/jem.180.3.1171.

Díaz-Zúñiga J, Monasterio G, Alvarez C, Melgar-Rodríguez S, Benítez A y cols. (2015). Variability of the Dendritic Cell Response Triggered by Different Serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* or *Porphyromonas gingivalis* Is Toll-Like Receptor 2 (TLR2) or TLR4 Dependent. *Journal of Periodontology*, 86(1), 108–119. DOI: 10.1902/jop.2014.140326.

Drennan M, Aspeslagh S y Elewaut D. (2010). Invariant natural killer T cells in rheumatic disease: a joint dilemma. *Nature reviews. Rheumatology*, 6(2), 90–98. DOI: 10.1038/nrrheum.2009.261.

Elinav E, Pappo O, Sklair-Levy, Margalit M, Shibolet O y cols. (2006). Adoptive transfer of regulatory NKT lymphocytes ameliorates non-alcoholic steatohepatitis and glucose intolerance in ob/ob mice and is associated with intrahepatic CD8 trapping. *The Journal of pathology*, 209(1), 121–128. DOI: 10.1002/path.1950.

Exley M, García J, Balk S y Porcelli S. (1997). Requirements for CD1d recognition by human invariant V α 24+ CD4- CD8- T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 186(1), 109–120. DOI: 10.1084/jem.186.1.109.

Fowlkes B, Kruisbeek A, Ton-That H, Weston M, Coligan J y cols. (1987). A novel population of T-cell receptor $\alpha\beta$ -bearing thymocytes which predominantly expresses a single V β gene family. *Nature*, 329(6136), 251–254. DOI: 10.1038/329251a0.

Francisconi C, Vieira A, Azevedo M, Tabanez A, Fonseca A y cols. (2018). RANKL triggers Treg-mediated immunoregulation in inflammatory osteolysis. *Journal of Dental Research*. 97(8):917–927. DOI: 10.1177/0022034518759302.

- Galli G, Nuti S, Tavarini S, Galli-Stampino L, De Lalla C y cols. (2003). CD1d-restricted help to B cells by human invariant natural killer T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 197(8), 1051–1057. DOI: 10.1084/jem.20021616.
- Garlet G y Giannobile W. (2018). Macrophages: The Bridge between Inflammation Resolution and Tissue Repair. *Journal of Dental Research*, 97(10), 1079–1081. DOI: 10.1177/0022034518785857.
- Garlet G, Cardoso C, Campanelli A, Garlet T, Avila-Campos M y cols. (2008). The essential role of IFN-gamma in the control of lethal *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection in mice. *Microbes and infection*, 10(5), 489–496. DOI: 10.1016/j.micinf.2008.01.010.
- Garlet G. (2010). Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *Journal of dental research*, 89(12), 1349–1363. DOI: 10.1177/0022034510376402.
- Gilhar A, Schrum A, Etzioni A, Waldmann H y Paus R. (2016). Alopecia areata: Animal models illuminate autoimmune pathogenesis and novel immunotherapeutic strategies. *Autoimmunity reviews*, 15(7), 726–735. DOI: 10.1016/j.autrev.2016.03.008.
- Godfrey D y Kronenberg M. (2004). Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *The Journal of clinical investigation*, 114(10), 1379–1388. DOI: 10.1172/JCI23594.
- Godfrey D, Hammond K, Poulton L, Smyth y Baxter A. (2000). NKT cells: facts, functions, and fallacies. *Immunology today*, 21(11), 573–583. DOI: 10.1016/s0167-5699(00)01735-7.
- Godfrey D, Macdonald H, Kronenberg M, Smyth M y Van Kaer L. (2004). NKT cells: What's in a name?. *Nature Reviews Immunology*, 4(3), 231–237. DOI: 10.1038/nri1309.
- Gu Y y Han X. (2020). Toll-Like Receptor Signaling and Immune Regulatory Lymphocytes in Periodontal Disease. *International journal of molecular sciences*, 21(9), 3329. DOI: 10.3390/ijms21093329.

Gumperz J, Roy C, Makowska A, Lum D, Sugita M y cols. (2000). Murine CD1d-restricted T cell recognition of cellular lipids. *Immunity*, 12(2), 211–221. DOI: 10.1016/s1074-7613(00)80174-0.

Gutowska-Owsiak D, Birchall M, Moots R, Christmas S y Pazmany L. (2014). Proliferatory defect of invariant population and accumulation of non-invariant CD1d-restricted natural killer T cells in the joints of RA patients. *Modern Rheumatology*, 24(3), 434–442. DOI: 10.3109/14397595.2013.844309.

Hajishengallis G y Korostoff J. (2017). Revisiting the Page & Schroeder model: the good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later. *Periodontology 2000*, 75(1), 116–151. DOI: 10.1111/prd.12181.

Hajishengallis G, Darveau R, Curtis M. (2012). The keystone-pathogen hypothesis. *Nature reviews. Microbiology*, 10(10), 717–725. DOI: 10.1038/nrmicro2873.

Hogquist K y Georgiev H. (2020). Recent advances in iNKT cell development. *F1000Research*, 9, F1000 Faculty Rev-127. DOI: 10.12688/f1000research.21378.1.

Hu M, Basset J, Danks L, Howell P, Xu K y cols. (2011). Activated invariant NKT cells regulate osteoclast development and function. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 186(5), 2910–2917. DOI: 10.4049/jimmunol.1002353.

Kang S y Cresswell P. (2004). Saposins facilitate CD1d-restricted presentation of an exogenous lipid antigen to T cells. *Nature immunology*, 5(2), 175–181. DOI: 10.1038/ni1034.

Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Taura I, Kaneko Y y cols. (1997). CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *American Association for the Advancement of Science*, 278(5343), 1626–1629. DOI: 10.1126/science.278.5343.1626.

Kinjo Y, Wu D, Kim G, Xing G, Poles M y cols. (2005). Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. *Nature*, 434(7032), 520–525. DOI: 10.1038/nature03407.

Kitamura H, Iwakabe K, Yahata T, Nishimura S, Ohta A y cols. (1999). The natural killer T (NKT) cell ligand α -galactosylceramide demonstrates its immunopotentiating effect by inducing interleukin (IL)-12 production by dendritic cells and IL-12 receptorexpression on NKT cells. *The Journal of experimental medicine*, 189(7), 1121–1128. DOI: 10.1084/jem.189.7.1121.

Kronenberg M y Gapin L. (2002). The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nature reviews. Immunology*, 2(8), 557–568. DOI: 10.1038/nri854.

Kwon D y Lee Y. (2017). Lineage Differentiation Program of Invariant Natural Killer T Cells. *Immune network*, 17(6), 365–377. DOI: 10.4110/in.2017.17.6.365.

Lamont R, Koo H y Hajishengallis G. (2018). The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nature reviews. Microbiology*, 16(12), 745–759. DOI: 10.1038/s41579-018-0089-x.

Lantz O y Bendelac A. (1994). An invariant T cell receptor α Chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans. *Journal of Experimental Medicine*, 180(3), 1097–1106. DOI: 10.1084/jem.180.3.1097.

Lee Y, Jameson S y Hogquist K. (2011). Alternative memory in the CD8 T cell lineage. *Trends in immunology*, 32(2), 50–56. DOI: 10.1016/j.it.2010.12.004.

Lee Y, Starret G, Lee S, Yang R, Henzler C y cols. (2016). Lineage-Specific Effector Signatures of Invariant NKT Cells Are Shared amongst $\gamma\delta$ T, Innate Lymphoid, and Th Cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 197(4), 1460–1470. DOI: 10.4049/jimmunol.1600643.

Liao C, Zimmer M, Shanmuganad S, Yu H, Cardell S y cols. (2012). Dysregulation of CD1d-restricted type ii natural killer T cells leads to spontaneous development of colitis in mice. *Gastroenterology*, 142(2), 326–34.e342. DOI: 10.1053/j.gastro.2011.10.030.

Lynch L, Michelet, Zhang S, Brennan P, Moseman A y cols. (2015) Regulatory iNKT cells lack expression of the transcription factor *PLZF* and control the homeostasis of T(reg) cells and macrophages in adipose tissue. *Nature immunology*, 16(1), 85–95. DOI: 10.1038/ni.3047.

Mattner J, Debord K, Ismail N, Goff R, Cantu C y cols. (2005). Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. *Nature*, 434(7032), 525–529. DOI: 10.1038/nature03408.

Melgar-Rodríguez S, Cafferata E, Diaz N, Peña M, González-Osuna L y cols. (2021). Natural Killer T (NKT) Cells and Periodontitis: Potential Regulatory Role of NKT10 Cells. *Mediators of Inflammation*. 2021. 1-13. DOI: 10.1155/2021/5573937.

Melgar-Rodríguez S, Díaz-Zuñiga J, Alvarez C, Rojas L, Monasterio G y cols. (2016). Serotype b of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* increases osteoclast and memory T-lymphocyte activation. *Molecular Oral Microbiology*, 31(2), 162–174. DOI: 10.1111/omi.12112.

Montoya C, Pollard D, Martinson J, Kumari K, Wasserfall C y cols. (2007) . Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody, 6B11. *Immunology*, 122(1), 1–14. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2007.02647.x

Muthukuru M. (2012). Decreased helper T cells and increased natural killer cells in chronic periodontitis analyzed by a novel method for isolating resident lymphocytes. *Journal of leukocyte biology*, 92(3), 683–692. DOI: 10.1189/jlb.0212103.

Nair S y Dhodapkar M. (2017). Natural killer T cells in cancer immunotherapy . *Frontiers in Immunology*, 8, 1178. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01178.

Nowak M, Kramer B, Haupt M, Papapanou P, Kepschull J y cols. (2013). Activation of Invariant NK T Cells in Periodontitis Lesions. *The Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 190(5), 2282–2291. DOI: 10.4049/jimmunol.1201215.

Oh S y Chung D. (2011). Invariant NKT cells producing IL-4 or IL-10, but not IFN-gamma, inhibit the Th1 response in experimental autoimmune encephalomyelitis, whereas none of these cells inhibits the Th17 response. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 186(12), 6815–6821. DOI: 10.4049/jimmunol.1003916.

Ohteki T y MacDonald H. (1994). Major histocompatibility complex class I related molecules control the development of CD4+8- and CD4-8- subsets of natural killer 1.1+ T cell receptor-alpha/beta+ cells in the liver of mice. *The Journal of experimental medicine*, 180(2), 699–704. DOI: 10.1084/jem.180.2.699.

Porcelli S, Yockey C, Brenner M y Balk S. (1993). Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8- alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain. *The Journal of experimental medicine*, 178(1), 1–16. DOI: 10.1084/jem.178.1.1.

Rizzo C, La Barbera L, Pizzo M, Ciccia F, Sireci G y cols. (2019). Invariant and Rheumatic Disease: Focus on Primary Sjogren Syndrome. *International journal of molecular sciences*, 20(21), 5435. DOI: 10.3390/ijms20215435.

Roark J, Park S, Jayawardena J, Kavita U, Shannon M y cols. (1998). CD1.1 expression by mouse antigen-presenting cells and marginal zone B cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 160(7), PMID: 9531266.

Sag D, Krause P, Hedrick C, Kronenberg M y Windenger G. (2014). IL-10-producing NKT10 cells are a distinct regulatory invariant NKT cell subset. *The Journal of clinical investigation*, 124(9), 3725–3740. DOI: 10.1172/JCI72308.

Seidel A, Seidel C, Weider M, Junker R, Gölz, L y Schmetzer H. (2020). Influence of Natural Killer Cells and Natural Killer T Cells on Periodontal Disease: A Systematic Review of the Current Literature. *International journal of molecular sciences*, 21(24), 9766. DOI: 10.3390/ijms21249766.

Singh A, Wilson M, Hong S, Olivares-Villagómez D, Du C y cols. (2001). Natural killer T cell activation protects mice against experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of experimental medicine*, 194(12), 1801–1811. DOI: 10.1084/jem.194.12.180.

Sommer M, Dalia R, Nogueira A, Cirelli J, Vinolo M y cols. (2019). Immune response mediated by Th1/IL-17/caspase-9 promotes evolution of periodontal disease. *Archives of oral biology*, 97, 77–84. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2018.09.009.

Tajiri K y Shimizu Y. (2012). Role of NKT Cells in the Pathogenesis of NAFLD. *International journal of hepatology*, 2012, 850836. DOI: 10.1155/2012/850836.

Tilkeridis K, Kizridis G, Ververidis A, Papoutselis M, Kotsianidis I y cols. (2019). 'Immunoporosis: A New Role for Invariant Natural Killer T (NKT) Cells Through Overexpression of Nuclear Factor- κ B Ligand (RANKL). *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 25, 2151–2158. DOI: 10.12659/MSM.912119.

Tomura M, Yu W, Ahn H, Yamashita M, Yang Y y cols. (1999). A novel function of V α 14+CD4+NKT cells: stimulation of IL-12 production by antigen-presenting cells in the innate immune system. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 163(1), 93–101. PMID: 10384104.

Tricco, A, Lillie E, Zarin W, O'Brien K, Colquhoun H y cols. (2018). PRISMA Extension for Scoping Reviews (PRISMA-ScR): Checklist and Explanation. *Annals of internal medicine*, 169(7), 467–473. DOI: 10.7326/M18-0850.

Trombone A, Ferreira S, Raimundo F, de Moura K, Avila-Campos M y cols. (2009). Experimental periodontitis in mice selected for maximal or minimal inflammatory reactions: increased inflammatory immune responsiveness drives increased alveolar bone loss without enhancing the control of periodontal infection. *Journal of periodontal research*, 44(4), 443–451. DOI: 10.1111/j.1600-0765.2008.01133.x.

Urrútia G y Bonfill X. (2010). PRISMA declaration: a proposal to improve the publication of systematic reviews and meta-analyses. *Medicina clinica*, 135(11), 507–511. DOI: 10.1016/j.medcli.2010.01.015.

- Vernal R, Díaz-Zuñiga J, Melgar-Rodríguez S, Pujol M, Díaz-Guerra E y cols. (2014). Activation of RANKL-induced osteoclasts and memory T lymphocytes by *Porphyromonas gingivalis* is serotype dependant. *Journal of clinical periodontology*, 41(5), 451–459. DOI: 10.1111/jcpe.12236.
- Wang Y, Sedimbi S, Löfbom L, Singh A, Porcelli S y cols. (2018). Unique invariant natural killer T cells promote intestinal polyps by suppressing TH1 immunity and promoting regulatory T cells. *Mucosal immunology*, 11(1), 131–143. DOI: 10.1038/mi.2017.34.
- Wingender G, Sag D y Kronenberg M. (2015). NKT10 cells: a novel iNKT cell subset. *Oncotarget*, 6(29), 26552–26553. DOI: 10.18632/oncotarget.5270.
- Wu L y Van Kaer L. (2009). Natural killer T cells and autoimmune disease. *Current molecular medicine*, 9(1), 4–14. DOI: 10.2174/156652409787314534.
- Wu L, Gabriel C, Parekh V y Kaer L. (2009). Van Invariant natural killer T cells: innate-like T cells with potent immunomodulatory activities. *Tissue Antigens*, 73(6), 535–545. DOI: 10.1111/j.1399-0039.2009.01256.x.
- Yamazaki K, Ohsawa Y y Yoshie H. (2001). Elevated proportion of natural killer T cells in periodontitis lesions: a common feature of chronic inflammatory diseases. *The American journal of pathology*, 158(4), 1391–1398. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64090-4.
- Yoshimoto T y Paul WE. (1994). CD4pos NK1.1pos T cells promptly produced IL-4 in response to *in vivo* challenge with anti-CD3. *The Journal of experimental medicine*, 179(4), 1285–1295. DOI: 10.1084/jem.179.4.1285.
- Yuan H, Gupte R, Zelkha S y Amar S. (2011). Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand antagonists inhibit tissue inflammation and bone loss in experimental periodontitis. *Journal of clinical periodontology*. 38(11), 1029–1036. DOI: 10.1111/j.1600-051X.2011.01780.x.
- Zhou D. (2007). OX40 signaling directly triggers the antitumor effects of NKT cells. *The Journal of clinical investigation*, 117(11), 3169–3172. DOI: 10.1172/JCI33976.

10. ANEXOS

ANEXO 1: Tabla resumen algoritmos de búsqueda en bases de datos electrónicas

Base de datos	Estrategia/Algoritmo de Búsqueda	Nº de Artículos
PubMed (MEDLINE)	<p>((((((((((((((invariant natural killer t cells[MeSH Terms]) OR (Natural Killer T-Cells[MeSH Terms])) OR (natural killer t-cell)) OR (natural killer t-cells)) OR (natural killer T cell)) OR (natural killer t cells)) OR (nkt cell)) OR (nkt cells)) OR (inkt cells)) OR (inkt cell)) OR (natural killer T lymphocyte)) OR (natural killer t lymphocytes)) OR (natural killer t-lymphocyte)) OR (natural killer t-lymphocytes)) AND (((((((((((chronic periodontitis[MeSH Terms]) OR (Periodontitis[MeSH Terms])) OR (aggressive periodontitis[MeSH Terms])) OR (apical periodontitis[MeSH Terms])) OR (adult periodontitis[MeSH Terms])) OR (periodontal disease[MeSH Terms])) OR (periodontitis)) OR (periodontal disease)) OR (periodont*)))</p>	67
Embase (Elsevier)	<p>('natural killer t cell'/exp OR 'natural killer t cell' OR 'natural killer t-cell'/exp OR 'natural killer t-cell' OR 'natural killer t lymphocyte'/exp OR 'natural killer t lymphocyte' OR 'natural killer t-lymphocyte'/exp OR 'natural killer t-lymphocyte' OR 'natural killer t cells'/exp OR 'natural killer t cells' OR 'natural killer t-cells'/exp OR 'natural killer t-cells' OR 'invariant natural killer cell'/exp OR 'invariant natural killer cell' OR 'invariant natural killer t cell'/exp OR 'invariant natural killer t cell' OR 'invariant natural killer t-cell'/exp OR 'invariant natural killer t-cell' OR 'nkt cell'/exp OR 'nkt cell' OR 'nkt lymphocyte'/exp OR 'nkt lymphocyte' OR 'inkt cell' OR 'inkt lymphocyte') AND ('periodontitis' OR 'chronic periodontitis' OR 'aggressive periodontitis' OR 'periodontal disease' OR 'apical periodontitis')</p>	16

<p>ISI Web of science (Clarivate Analytics)</p>	<p>(((((TS=(Natural killer t cell)) OR TS=(Natural killer t-cell)) OR TS=(natural killer t lymphocyte)) OR TS=(natural killer t-lymphocyte)) OR TS=(natural killer t cells)) OR TS=(natural killer t-cells)) OR TS=(invariant natural killer cell)) OR TS=(invariant natural killer cell)) OR TS=(invariant natural killer t cell)) OR TS=(invariant natural killer t-cell)) OR TS=(nkt cell)) OR TS=(nkt lymphocyte)) OR TS=(inkt cell)) OR TS=(inkt lymphocyte) AND ((((((TS=(chronic periodontitis)) OR TS=(aggressive periodontitis)) OR TS=(periodontal disease)) OR TS=(adult periodontitis)) OR TS=(periodont)) OR TS=(apical periodontitis)</p>	<p>46</p>
<p>Scopus</p>	<p>(TITLE-ABS-KEY ("natural killer t cell" OR "natural killer t cell" OR " natural AND killer AND t-cell " OR " natural AND killer AND t-cell " OR " natural AND killer AND t AND lymphocyte " OR " natural AND killer AND t AND lymphocyte " OR " natural AND killer AND t-lymphocyte " OR " natural AND killer AND t-lymphocyte " OR " natural AND killer AND t AND cells " OR " natural AND killer AND t AND cells " OR " natural AND killer AND t-cells " OR " natural AND killer AND t-cells " OR " invariant AND natural AND killer AND cell " OR " invariant AND natural AND killer AND cell " OR " invariant AND natural AND killer AND t AND cell " OR 'invariant natural killer t cell" OR "invariant natural killer t-cell" OR "invariant natural killer t-cell" OR "nkt cell" OR "nkt cell" OR "nkt lymphocyte" OR "nkt lymphocyte" OR "inkt cell" OR "inkt lymphocyte")) AND (TITLE-ABS-KEY ("periodontitis" OR "chronic periodontitis" OR "aggressive periodontitis" OR "periodontal disease" OR "apical periodontitis" OR "periodont*"))</p>	<p>1</p>

Anexo 2: Tabla de artículos incluidos en la revisión sistemática exploratoria ScR

Número	Referencia
1	Yamazaki K, Ohsawa Y y Yoshie H. (2001). Elevated proportion of natural killer T cells in periodontitis lesions: a common feature of chronic inflammatory diseases. <i>The American journal of pathology</i> , 158(4), 1391–1398. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64090-4
2	Amanuma R, Nakajima T, Yoshie H, y Yamazaki K. (2006). Increased infiltration of CD1d and natural killer T cells in periodontal disease tissues. <i>Journal of periodontal research</i> , 41(1), 73–79. DOI: 10.1111/j.1600-0765.2005.00837.x
3	Muthukuru M. (2012). Technical advance: decreased helper T cells and increased natural killer cells in chronic periodontitis analyzed by a novel method for isolating resident lymphocytes. <i>Journal of leukocyte biology</i> , 92(3), 683–692. DOI: 10.1189/jlb.0212103
4	Nowak M, Krämer B, Haupt M, Papapanou P, Kepschull J y cols. (2013). Activation of invariant NK T cells in periodontitis lesions. <i>Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)</i> , 190(5), 2282–2291. DOI: 10.4049/jimmunol.1201215
5	Aoki-Nonaka Y, Nakajima T, Miyauchi S, Miyazawa H, Yamada H y cols. (2014). Natural killer T cells mediate alveolar bone resorption and a systemic inflammatory response in response to oral infection of mice with <i>Porphyromonas gingivalis</i> . <i>Journal of periodontal research</i> , 49(1), 69–76. DOI: 10.1111/jre.12080

Anexo 3: Tabla de artículos identificados vía bases de datos recuperados a texto completo y sus motivos de exclusión:

Número	Autores/ Año	Motivo de exclusión
1	Sokołowska-Wojdyło M, Florek A, Barańska-Rybak W, Sikorska M, Starzyńska A y cols. 2013	Diagnóstico periodontal fuera de los criterios de inclusión.
2	Baker P, Dixon M, Evans R, Dufour L, Johnson E y cols. 1999.	Caracterización de células NKT imprecisa.