



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**DPTO FORMACIÓN INTEGRAL DEL HOMBRE**

**INFORME DE INVESTIGACIÓN**

**CUANTIFICACIÓN DE LINFOCITOS T Y SUBPOBLACIONES EN  
SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CON PERIODONTITIS  
CRÓNICA.**

**Área de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad de  
Carabobo 2005.**

Autoras: Millano Laura

Palma María G.

Tutor de Contenido:

Prof. Liliana Jiménez.

Tutor Metodológico:

Prof. Carlos Sierra.

Asesor: Lic. Rubén Toro

VALENCIA, MARZO 2005

Este trabajo fue subvencionado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo (CDCH-UC), Según oficio Nro. 2274-2004 del 11/11/2004.



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO**  
**Facultad de Odontología**  
**Dpto. Formación Integral del Hombre**

## **CARTA DE APROBACIÓN**

*Es de carácter del tutor ( es ) del trabajo final de Investigación*  
*Titulado CUANTIFICACION DE LINFOCITOS T Y*  
*SUBPOBLACIONES EN SANGRE PERIFERICA EN*  
*PACIENTES CON PERIODONTITIS CRONICA. Area de*  
*Periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad de*  
*Carabobo 2005. Presentado por los (as) bachiller (es): Millano*  
*Laura y Palma Ma Gabriela, considero que dicho trabajo de*  
*Investigación reúne los requisitos y méritos suficiente para ser*  
*aprobado y sometido a presentación pública y evaluación.*

*En la ciudad de Valencia, a los 07 días del mes de Marzo de*  
*2005.*

\_\_\_\_\_  
**TUTOR DE CONTENIDO**

\_\_\_\_\_  
**TUTOR METODOLÓGICO**

## **DEDICATORIA:**

A nuestros padres Margoth, Arizdelys y Ramón Jesús por regalarnos el privilegio de la vida. Arehanny, Luís José y David, porque con su inocencia, belleza y espontaneidad alegraban nuestro días.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios Todopoderoso, por ser nuestro maestro darnos la fuerza para seguir adelante manteniendo en nosotras encendida la luz de la esperanza.

A nuestros Padres, porque gracias a ustedes somos quienes somos y estamos donde estamos, guiándonos en el camino de la vida por el rumbo correcto. Esta meta cumplida es también de ustedes. Porque su apoyo fue, es y seguirá siendo el motor que impulse nuestras vidas.

A Arehanny, por tu comprensión y apoyo en los momentos difíciles, regalándonos en todo momento la inocencia de tu sonrisa.

A nuestros abuelos, que con su vida nos han regalado la mayor de las enseñanzas, es por ustedes y para ustedes este escalón que hoy logramos subir, sabemos que donde estén siempre nos envían sus bendiciones.

A Liliana Jiménez, nuestra tutora, madrina y amiga; pilar en nuestro crecimiento como personas y profesionales, no existen palabras en el mundo para expresar la inmensa gratitud que tenemos con usted, nuestro mayor apoyo con su palabra de aliento, una y mil veces gracias por TODO!!!!!!!

Al Laboratorio UNIMPA, y en especial a el Lic. Rubén Toro y a la Lic. Mariela Pacheco por su invaluable colaboración prestada, sin ustedes no hubiese sido posible la culminación de este trabajo.

Al CDCH por la ayuda económica prestada en fomento y pro de la investigación.

A nuestros tíos y primos, porque no siempre se puede decir que se cuenta con el apoyo y comprensión de una familia, y ustedes nos han demostrado que somos eso una gran familia.

A Hendrick novio y cuñis, porque en todo momento nos has demostrado tu apoyo, paciencia y comprensión.

A nuestros amigos, compañeros de logros, rumbas, alegrías, y tristezas, porque en el camino de la vida uno se los encuentra, y que bueno que ese día no teníamos prisa y nos pudimos detener a conocernos!!! y así poder ser mas que amigos, hermanos

A nosotras porque en este largo trecho aprendimos a querernos y a valorar el significado de la palabra hermandad.

Una y mil veces gracias  
Laura y M<sup>a</sup> Gabriela

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ACREDITACION AL CDCH-UC.....	ii
CARTA DE APROBACIÓN DEL TUTOR.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
ÍNDICE GENERAL.....	vi
ÍNDICE DE CUADROS Y GRÁFICOS.....	vii
RESUMEN.....	x
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULOS	
I    EL PROBLEMA	
Planteamiento del Problema.....	4
Objetivos de la Investigación.....	6
Justificación de la Investigación.....	7
II. MARCO TEÓRICO	
Antecedentes de la Investigación.....	9
Bases Teóricas de la Investigación.....	15
Definición de Términos.....	28
Sistema de Variables.....	31
Operacionalización de Variables.....	32
III MARCO METODOLÓGICO	
Tipo y Diseño de la Investigación.....	33
Población y Muestra.....	34
Técnica e Instrumento de Recolección de Datos.....	35
Validez.....	36
Técnica de Análisis de los Resultados.....	36
Materiales y Métodos para la Recolección de Datos.....	37
IV ANÁLISIS DE LOS DATOS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.....	
Presentación de Resultados.....	39
Conclusiones .....	57
Recomendaciones.....	60
	61
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
ANEXOS	

## ÍNDICE DE CUADROS Y GRÁFICOS

	Pág.
<b>CUADRO 1</b> Valores Promedio de Linfocitos TCD3+ en Pacientes Periodontalmente comprometidos y Controles Sanos .....	40
<b>GRÁFICO 1</b> Valores Promedio de Linfocitos TCD3+ en Pacientes Periodontalmente comprometidos y Controles Sanos.....	40
<b>CUADRO 2</b> Valores Promedio de Linfocitos TCD3+ en Pacientes Periodontalmente comprometidos y Valores Normales.....	41
<b>GRÁFICO 2</b> Valores Promedio de Linfocitos TCD3+ en Pacientes Periodontalmente comprometidos y Valores Normales.....	42
<b>CUADRO 3</b> Valores Promedio de Linfocitos TCD4+ en Pacientes Periodontalmente comprometidos y Controles Sanos.....	43
<b>GRÁFICO 3</b> Valores Promedio de Linfocitos TCD4+ en Pacientes Periodontalmente comprometidos y Controles Sanos.....	43
<b>CUADRO 4</b> Valores Promedio de Linfocitos TCD4+ en Pacientes Periodontalmente comprometidos y Valores Normales.....	45
<b>GRÁFICO 4</b> Valores Promedio de Linfocitos TCD3+ en Pacientes Periodontalmente comprometidos y Valores Normales.....	45
<b>CUADRO 5</b> Valores Promedio de Linfocitos TCD8+ en Pacientes Periodontalmente comprometidos y Controles Sanos.....	46
<b>GRÁFICO 5</b> Valores Promedio de Linfocitos TCD8+ en Pacientes Periodontalmente comprometidos y Controles Sanos.....	47

<b>CUADRO 6</b>	Valores Promedio de Linfocitos TCD8+ en Pacientes Periodontalmente comprometidos y Valores Normales.....	48
<b>GRÁFICO 6</b>	Valores Promedio de Linfocitos TCD8+ en Pacientes Periodontalmente comprometidos y Valores Normales.....	48
<b>CUADRO 7</b>	Comparación de Valores promedio de la Proporción de Linfocitos TCD4+ y TCD8+ en Pacientes Periodontalmente comprometidos y Controles Sanos.....	49
<b>GRÁFICO 7</b>	Comparación de Valores promedio de la Proporción de Linfocitos TCD4+ y TCD8+ en Pacientes Periodontalmente comprometidos y Controles Sanos.....	50
<b>CUADRO 8</b>	Comparación de Valores promedio de la Proporción de Linfocitos TCD4+ y TCD8+ en Pacientes Periodontalmente comprometidos y Valores Normales.....	51
<b>GRÁFICO 8</b>	Comparación de Valores promedio de la Proporción de Linfocitos TCD4+ y TCD8+ en Pacientes Periodontalmente comprometidos y Valores Normales.....	51
<b>CUADRO 9</b>	Valores Promedio del Índice TCD4+/TCD8+ en Pacientes Periodontalmente comprometidos y Controles Sanos.....	52
<b>GRÁFICO 9</b>	Valores Promedio del Índice TCD4+/TCD8+ en Pacientes Periodontalmente comprometidos y Controles Sanos.....	53
<b>CUADRO 10</b>	Valores Promedio del Índice TCD4+/TCD8+ en Pacientes Periodontalmente comprometidos y Valores Normales.....	54
<b>GRÁFICO 10</b>	Valores Promedio del Índice TCD4+/TCD8+ en Pacientes Periodontalmente comprometidos y Valores Normales.....	54

<b>CUADRO 11</b>	Valores Promedio de Linfocitos TCD3+, TCD4+, TCD8+ y TCD4+/TCD8+ en Pacientes Periodontalmente comprometidos y Controles Sanos.....	55
<b>GRÁFICO 11</b>	Valores Promedio de Linfocitos TCD3+, TCD4+, TCD8+ y TCD4+/TCD8+ en Pacientes Periodontalmente comprometidos y Controles Sanos.....	56

Universidad De Carabobo  
Facultad De Odontología  
Departamento De Formación Integral Del Hombre  
Informe De Investigación

**CUANTIFICACIÓN DE LINFOCITOS T Y SUBPOBLACIONES EN  
SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CON PERIODONTITIS  
CRÓNICA.**

**Área de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad de  
Carabobo 2005.**

Autoras: Millano Laura  
Palma María G.

**RESUMEN**

La presente investigación reporta un estudio el cual tuvo como propósito evaluar las proporciones de linfocitos T y subpoblaciones en sangre periférica, en los pacientes con Periodontitis Crónica que acuden al área clínica de Periodoncia de la FOUC durante el período Enero-Febrero 2005. La muestra fue seleccionada de una forma no probabilista intencionada, quedando conformada por 18 pacientes periodontalmente comprometidos y 5 pacientes controles sanos, a los cuales se les tomó una muestra de sangre periférica con el fin de determinar proporciones de linfocitos T CD3+ y subpoblaciones TCD4+ y TCD8+, comparar las proporciones TCD4+ y TCD8+ en sangre periférica y por último se analizó el índice TCD4+/TCD8+. La recolección de la información se realizó a través de una técnica de observación directa. Las muestras de sangre fueron procesadas a través de la técnica de citometría de flujo utilizando anticuerpos monoclonales específicos para cada subpoblación, obteniéndose los siguientes resultados: TCD3+: 87.83% en pacientes periodontalmente comprometidos y 85.96% en controles sanos. TCD4+: 54.23 % en pacientes periodontalmente comprometidos y 49.03% en controles sanos. TCD8+ 33.88 % en pacientes periodontalmente comprometidos y 36.92 % en controles sanos, el índice TCD4+/TCD8+ fue de 1.65 en pacientes periodontalmente comprometidos y 1.46 en controles sanos. Los resultados obtenidos demostraron que existe una proporción elevada de linfocitos TCD3+, TCD4+ e índice TCD4+/TCD8+ en los pacientes enfermos con respecto a los sanos, y una proporción con poca diferencia significativa de linfocitos TCD8+ en los pacientes periodontalmente comprometidos con respecto a los sanos, lo que reveló el papel importante que desempeñan los linfocitos T ante la presencia de agentes periodontopatógenos en el organismo.

**Palabras claves:** Linfocitos/ Periodontitis Crónica / Citometría de flujos / TCD3+ / TCD4+ / TCD8+ / Índice TCD4+/TCD8+.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad periodontal es un conjunto de enfermedades inflamatorias que afectan los tejidos de soporte del diente y se considera como resultado del desequilibrio entre la interacción inmunológica del huésped y la flora de la placa dentobacteriana marginal que coloniza el surco gingival (AAP 2000).

Dentro de las enfermedades periodontales la periodontitis crónica es una de las patologías más frecuentes. Es una enfermedad destructiva crónica que envuelve la unidad dento-gingival y que se extiende a los tejidos de soporte. Se caracteriza porque usualmente comienza luego de los 35 años, progresa lentamente, presenta reabsorción ósea de tipo horizontal, además de estar presentes irritantes locales y de no existir anormalidades en la defensa del huésped. (Barrios, G 1989)

La patogénesis de la enfermedad periodontal se inicia con la biopelícula de la placa bacteriana que alberga nutre y protege a la cavidad bucal por medio de las defensas orgánicas de una gran población microbiana, que se encarga de producir enzimas líticas y toxinas (endotoxinas generalmente), que van a causar efectos deletéreos sobre las células gingivales y periodontales, esto lo hace con el fin de invadir tejidos profundos en búsqueda de espacio y nutrimento.

Estas sustancias o subproductos bacterianos afectan a veces irreversiblemente a los tejidos y ellos desencadenan una reacción orgánica defensiva (inflamación), enviando a los tejidos afectados una serie de células (linfocitos, monocitos, macrófagos, plasmocitos) que producen a su vez sustancias conocidas como interleuquinas (IL1, IL2, IL3, etc.), que atraen a más células defensivas lo que lleva a sustituir tejido sano fisiológicamente activo por tejido defensivo.

La presencia de linfocitos B y T y de anticuerpos contra diferentes componentes de bacterias involucradas en la periodontitis, sugiere que en la etiopatogenia de la enfermedad periodontal., las reacciones inmunitarias juegan un papel importante, que no sólo intentaría proteger al huésped, sino que también sería responsable parcial de la destrucción del soporte periodontal, de la destrucción

provocada directamente por las bacterias o sus productos y finalmente de la rapidez con que esta destrucción tiene lugar en diferentes individuos.

Los linfocitos B son importantes ya que son las células que secretan anticuerpos, es decir, son responsables de la inmunidad humoral, pero también son células presentadoras de antígeno a los linfocitos T, por medio de sus inmunoglobulinas de superficie pueden endocitar selectivamente antígenos o partículas reconocidos por estas inmunoglobulinas, y disponen de toda la maquinaria de presentación y coestimulación necesaria para esta función de presentación de antígenos a las células T. Asimismo, son importantes porque son las células responsables de la memoria inmunológica humoral.

Los linfocitos T son los encargados del reconocimiento y muerte de las células que han sido infectadas por algún patógeno además de regular la respuesta inmune celular por medio de las citoquinas, y la iniciación de la producción de anticuerpos por las células B. Los linfocitos T se subdividen en dos poblaciones funcionalmente distintas, entre las cuales encontramos a las células T colaboradoras (CD4+) y las células T citolíticas o citotóxicas (CD8+).

El daño celular es inducido por acción bacteriana y una vez afectado irreversiblemente los tejidos, estos deben ser removidos para dar cabida a las células reparativas, y en todo esto los linfocitos T4 (CD4+, ayudadores o colaboradores) juegan un papel fundamental al excretar IL1 $\alpha$  (antes conocida como factor activador de osteoclastos) que hace que las células indiferenciadas se transformen en osteoclastos, con el fin de remover ese tejido afectado.

Los linfocitos T4 ó LTCD4+ son las células que dirigen la respuesta defensiva orgánica, en tanto que los LT8 ó LTCD8+ (supresores o citotóxicos) son los encargados de suprimir o regular esta respuesta en virtud de que no desborde si existe una reacción positiva a favor de los LTCD4+, la respuesta será exagerada, determinando excesiva inflamación y destrucción tisular, al igual que si los LTCD8+ están disminuidos.

El presente trabajo de investigación tendrá como objetivo general evaluar la proporción de linfocitos T totales y sus subpoblaciones en sangre periférica, a través

de la técnica de Citometría de flujos, en los pacientes con Periodontitis que acuden al área clínica de Periodoncia de la FOUC durante el período Enero 2004- Febrero 2005, para comprender mejor la respuesta inmunológica de los tejidos periodontales ante la agresión de la placa bacteriana.

La presente investigación está estructurada de la siguiente manera:

En el Capítulo I se muestra el planteamiento del problema, los objetivos de la investigación y la justificación.

El Capítulo II presenta el marco teórico, en el cual se encuentran desarrollados los antecedentes de la investigación, las bases teóricas, la operacionalización de variables y un glosario para definir términos.

El Capítulo III detalla qué tipo de investigación se utilizó para realizar el estudio, población y muestra, técnica e instrumentos de recolección de datos, materiales y procedimientos y por último validez.

El capítulo IV representa los resultados obtenidos, su análisis, las conclusiones y recomendaciones a las cuales se llegó al finalizar la investigación.

Finalmente, se presentan las referencias bibliográficas.

## **CAPITULO I**

### **EL PROBLEMA**

#### **Planteamiento del Problema**

La Periodontitis Crónica es considerada una enfermedad universal, ya que el 75% de la población la padece (Genco y col. 1990). Así mismo se han realizado estudios en donde se manifiesta que la prevalencia de la enfermedad periodontal se encuentra en mayor proporción en la población venezolana que la de Estados Unidos, demostrando así que 85% de la población adulta padece de afecciones a nivel periodontal. Este elevado porcentaje de individuos afectados por la enfermedad periodontal no sólo en Venezuela sino también a nivel mundial refleja que dicha enfermedad es un problema de salud pública (Fundacredesa 1989).

A nivel regional, Jiménez L. (2003), refleja una elevada incidencia de Periodontitis Crónica con 79,76% en la población que asiste al área clínica de Periodoncia en la Facultad de Odontología de la Universidad de Carabobo (FOUC).

La enfermedad periodontal se considera como un conjunto de enfermedades inflamatorias que afectan principalmente a los tejidos de soporte del diente, creando ésta un desequilibrio entre la interacción inmunológica del huésped y la flora de la placa dento-bacteriana marginal que se encuentra colonizando el surco gingival (AAP 2000). El principal factor desencadenante de la Enfermedad Periodontal es la placa dento-bacteriana la cual se define como depósitos blandos que forman una bio-película adherida a la superficie dentaria u otras superficies duras en la boca (Carranza 2003). La placa dento-bacteriana desencadena un proceso inflamatorio agudo, constituido principalmente por células redondeadas de linfocitos T y B, células plasmáticas y macrófagos. La respuesta inmunológica va a estar mediada a través de los linfocitos B responsables de la respuesta inmunológica humoral y los

linfocitos T responsables de la respuesta inmunológica celular, donde se encuentran subpoblaciones que juegan un papel importante en la destrucción de los tejidos periodontales como son los linfocitos TCD4+ colaboradores o inductores, los cuales estimulan la diferenciación de las células B y los TCD8+ supresores o citotóxicos que estimulan la producción de células T. (Stites D 1995).

La Periodontitis es una enfermedad que se caracteriza por presentar un proceso inflamatorio que conlleva a una destrucción progresiva de los tejidos de sostén del diente.

La cuantificación de los linfocitos TCD4+ y TCD8+ en los tejidos afectados con Periodontitis crónica surgió a mediados de los años 70, como consecuencia de que varias investigaciones anteriores habían arrojado que la Periodontitis es una enfermedad infecciosa multifactorial, ya que la placa dentobacteriana no sólo juega un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad sino que también involucra la condición general y sistémica del paciente, es decir; que las bacterias que producen esta enfermedad desarrollan una destrucción tisular indirectamente, ya que activan los sistemas de defensa del huésped, quedando así establecida una destrucción de los tejidos de sostén y facilitando de esta manera la instalación de la enfermedad como tal.

Es enigmático como los mismos sistemas de defensa del huésped que proveen protección sean también los responsables de su destrucción. Algunos hallazgos sugieren que la enfermedad puede ser más destructiva si ciertos aspectos de los mecanismos de defensa del huésped, dentro del tejido local, predominan más que otros. Lo anterior parece deberse a la hiperactividad del huésped o a un reto bacteriano aumentado en el área del surco gingival.

Los estudios sobre los linfocitos T y sus subpoblaciones tanto en Periodontitis crónica como en Periodontitis agresiva han dado resultados controversiales al evaluar las proporciones de linfocitos TCD4+, TCD8+, tanto a nivel local (tejido gingival) como a nivel sistémico. La presente investigación tiene como finalidad evaluar por medio de la técnica de Citometría de flujo las proporciones de linfocitos T (TCD3+) y subpoblaciones de linfocitos TCD4+ y TCD8+, en pacientes con Periodontitis crónica

moderada a severa que acuden al área de Periodoncia de la FOUC, lo cual permitirá corroborar si existe un desbalance entre dichas poblaciones linfocitarias. Por esta razón y dado que enfermedad es de etiología multifactorial se hace necesario la realización de este estudio, debido al importante papel que juegan los antes mencionados en la patogénia de la periodontal.

Sobre la base de los argumentos planteados anteriormente, y considerando la relevancia de los mismos, surgió la inquietud de dar respuesta a las siguientes interrogantes:

¿Cuál de las subpoblaciones linfocitarias se encuentra en mayor proporción en los pacientes con Periodontitis Crónica que acuden al área de Periodoncia de la FOUC?

## **Objetivos de la Investigación**

### **Objetivo General**

Evaluar las proporciones de linfocitos T y subpoblaciones en sangre periférica, en los pacientes con Periodontitis Crónica que acuden al área clínica de Periodoncia de la FOUC durante el periodo Enero-Febrero 2005.

### **Objetivos Específicos**

- Determinar las proporciones de linfocitos T (CD3+) totales en sangre periférica, en los pacientes con Periodontitis Crónica que acuden al área clínica de Periodoncia de la FOUC durante el periodo Enero-Febrero 2005.

- Cuantificar las proporciones de las subpoblaciones linfocitarias TCD4+ y TCD8+ en sangre periférica en los pacientes con Periodontitis Crónica, que acuden al área clínica de Periodoncia de la FOUC durante el periodo Enero-Febrero 2005.

- Comparar las proporciones TCD4+ y TCD8+ en sangre periférica, en los pacientes con Periodontitis Crónica, que acuden al área clínica de Periodoncia de la FOUC, durante el periodo Enero-Febrero 2005.

- Analizar el índice TCD4+/TCD8+ a nivel sistémico en los pacientes con Periodontitis Crónica, que acuden al área clínica de Periodoncia de la FOUC, durante el periodo Enero-Febrero 2005. Con el fin de obtener información sobre el grado de inmunidad de los pacientes en estudio

### **Justificación**

El estudio de las reacciones inmunitarias ante una enfermedad infecciosa y multifactorial tal como lo es la Periodontitis, es de vital importancia y mucho más aún la cuantificación de las subpoblaciones de linfocitos T ante esta enfermedad específicamente la Periodontitis crónica.

Los estudios más recientes se han realizado a través de técnicas inmunohistoquímicas, los cuales han arrojado resultados importantes sobre las proporciones de los linfocitos B y de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T, pero éstos han estado orientados hacia la Periodontitis severas y la gingivitis inducida por placa; por esta razón se hace pertinente la realización de un estudio por medio de otras técnicas como la citometría de flujo en pacientes que padezcan de Periodontitis Crónica, ya que esta técnica también permite obtener resultados concretos sobre las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias las cuales permitirán analizar otra de las formas de enfermedad periodontal como lo es la Periodontitis Crónica y así conocer el comportamiento de las células T y subpoblaciones en las diferentes patologías periodontales. Dado que son pocos los estudios realizados en el país, se le otorga de esta manera un carácter novedoso a esta investigación.

Esta técnica permite realizar procedimientos menos invasivos y poco traumáticos al momento de la recolección de la muestra requerida. Al analizar las proporciones

de la población y subpoblaciones linfocitarias, permitirá por medio de un índice evaluar la condición inmunológica de los pacientes; a mayor índice mejor estará el estado inmunológico del paciente.

Por otra parte, también se debe mencionar que esta investigación, posee un valor importante debido a que son pocos los estudios que se han realizado sobre las proporciones de linfocitos TCD3, TCD4+, TCD8+ e índice TCD4+/TCD8+ en los pacientes con Periodontitis Crónica de moderada a severa con respecto a su estado inmunológico, por esta razón este estudio se enfoca desde este punto de vista para ampliar las líneas de investigación.

Con respecto a los resultados que se obtengan se podrá de una u otra manera analizar la patogenia de la enfermedad periodontal y en un futuro moderar o intervenir la respuesta inmunológica.

## **CAPÍTULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **Antecedentes**

En el año 1987 Reinhard A. y colaboradores, fueron los pioneros en este tipo de investigación, donde realizaron un trabajo con 31 pacientes adultos con Periodontitis recurrentes para cuantificar las subpoblaciones de linfocitos in situ entre zonas periodontalmente estables, dichos pacientes se encontraban en la fase de mantenimiento de la terapia periodontal. Sólo 20 de estos pacientes fueron seleccionados para reunir todo el criterio clínico y para completar toda una evaluación histológica y de sangre periférica. A los mismos se le determinó el nivel de inserción profundidad de sondaje y recesión gingival.

En las zonas en donde se encontraba activa la enfermedad se observaron en mayor cantidad las células B en relación con las zonas sanas. Aún cuando las características clínicas son similares; la reducción de la relación T/B es evidente y se le atribuye al predominio de células B. Estos resultados son consistentes con la teoría de activación policlonal de células B, la cual asume que mitógenos encontrados en bacterias periodontopatogenas no estimulan específicamente a linfocitos B para proliferar y producir inmunoglobulinas y/o linfoquinas dominando el incremento de inflamación y destrucción de tejido.

Las células B fueron frecuentemente encontradas en bandas de agregados y asociados con las áreas de degeneración avanzada de colágeno.

Años más tarde se realizó un estudio que tiene relación con la presente investigación, la cual fue realizada en 1993, y pretendía determinar la proporción anormal de las células T en sangre periférica en los pacientes con enfermedad periodontal. Para la ejecución de este proyecto se tomaron muestras de sangre periférica de 8 pacientes con periodontitis del temprano-inicio (EOP), de 8 pacientes

con periodontitis de tarde-inicio (LOP), y de 17 sujetos sanos (HS) fueron determinadas por análisis de la inmunofluorescencia usando  $\gamma\delta$  T de la sangre periférica en contra de células  $\gamma\delta$  T de un anticuerpo monoclonal (TCR- $\delta$ 1) esto estudia las cualidades de la población de células en pacientes con enfermedad Periodontal. La distribución de las proporciones de células  $\gamma\delta$  T en pacientes con EOP y LOP fue establecida como una media para una y otra, más amplias que la de los HS; sin embargo, no había diferencia significativa en la proporción de células  $\gamma\delta$  T entre cada grupo. Una parte anormalmente elevada de células  $\gamma\delta$  T de la sangre periférica resulto en las células T las cuales se encontraban elevadas ( $> 9.90\%$ ) y fue observada en 37.5% de los pacientes de EOP y de los pacientes del LOP. Una proporción anormalmente baja ( $< 5.57\%$ ) fue observada en el 50% de los pacientes de EOP y en el 25% de los pacientes del LOP. El acontecimiento más grande es la diferencia alta o baja de las proporciones de las células  $\gamma\delta$  T, las cuales eran significativas entre EOP y HS, y entre EOP + LOP y HS. También se observó que no había correlación entre la proporción de células  $\gamma\delta$  T, edad y los otros parámetros clínicos del estado Periodontal. Al final de este estudio se llegó a la conclusión de que existe una proporción anormal de células  $\gamma\delta$  T, la cual es detectada con frecuencia en pacientes con enfermedad Periodontal. Estos resultados concuerdan con el papel propuesto de las células  $\gamma\delta$  T para desempeñar un rol único ya que es la primera línea de defensa contra infecciones en el cuerpo.(Nagai A. y Col 1993).

Posteriormente en 1995, fue emprendido un estudio para determinar si existía la posibilidad de que una anomalía fenotípica de la subpoblación de linfocitos sistémico o de su función de los linfocitos en sangre periférica está implicada en la etiología de los pacientes con EOP. Para la realización de este estudio se tomaron catorce (14) pacientes con periodontitis juvenil (JP), 18 con Periodontitis de progreso rápido (RPP), 22 con periodontitis del adulto (AP), y 33 con un periodonto saludable (HP) para que participaran en el mismo. Los subconjuntos de linfocitos fueron determinados usando los paneles de los anticuerpos monoclonal (MABS) y del flujo fluorescente por citometría. La blastogénesis de las células T fue evaluada por [3H]

la captación del timidina. La introducción de agentes mitogénicos en el saco indujo inmunoglobulinas G (IgG) en el mismo, además de la síntesis de IgM, las cuales fueron detectadas unidas a las enzimas y en el ensayo inmunoabsorbente había distribuciones amplias de valores en todas las exámenes entre sujetos. Ninguna diferencia significativa se podría encontrar entre los pacientes con periodontitis y los del grupo HP con la excepción de un alto cociente CD4+/CD8+ en todos los grupos del paciente ( $p < 0.000$ ) y los porcentajes deprimidos de las células positivas CD3 conocidas en el grupo paciente con AP ( $p < 0.0001$ ). Estos resultados sugieren que la mayoría de los pacientes con EOP no muestran una diferencia significativa en los perfiles de los linfocitos para con los pacientes con AP y los sujetos con HP, y que en esos linfocitos no siempre se ven los trastornos celulares, incluso en los pacientes de EOP. (Takahashi K y Col. 1995).

Más tarde en 1998 se ejecutó una investigación en la que se determinó la producción anormal de citoquinas por la activación de los linfocitos T en pacientes con Periodontitis juvenil o de inicio temprano. Aquí se tomó en cuenta la importancia del sistema inmune en la patogenia de la Periodontitis, para así poder caracterizar más lejos la disfunción inmunoreguladora posible que podían existir en las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) en pacientes con periodontitis, por esta razón se investigaron aspectos funcionales de PBMC de los pacientes con periodontitis de ataque temprano (EOP) y los pacientes con periodontitis del adulto (AP). Comparados los controles, se observó una respuesta proliferativa disminuida de PBMC de pacientes con EOP después de la estimulación con un estímulo mutagénico (phytohemagglutinin). Para investigar si esta anomalía refleja una modulación en la producción de Citoquinas, se midió la producción *in vitro* de interleuquina IL-3, IL-5, macrófago (GM-CSF), e interferones  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) por PBMC activados. PBMC en los pacientes con EOP expresó niveles significativamente disminuidos de IFN- $\gamma$  en respuesta al estímulo mutagénico. La secreción de IFN- $\gamma$  reducida era asociada con IFN- $\gamma$  disminuido e IL-2 la expresión del RNAm en estas células, así como la expresión superficial disminuida de HLA-DR en los monocitos. Por otra parte también se observaron niveles perceptiblemente más altos de IL-5 y de

GM-CSF en el mismo sistema usando PBMC en pacientes con AP. Estos eran comparables a los niveles observados en los pacientes con asma alérgica. Estos datos implicaron que esto se encuentra asociado con la disminución de TH1- $\gamma$  como la expresión de citoquinas y que la respuesta de PBMC en los pacientes con AP es predominantemente Th2/ThO en la naturaleza. (Sigusch de T. y Col. 1998).

En el mismo año 1998 Morgado y Muñoz realizaron una investigación denominada “Estudio inmunohistoquímico de la enfermedad periodontal (Periodontitis)” dicho trabajo consistió en un estudio inmunohistoquímico con anticuerpos monoclonales CD8+ en 20 pacientes de los cuales 13 eran del sexo femenino y 7 del sexo masculino con un promedio del grupo etario entre el rango de 41 a 50 años de edad; los pacientes fueron clasificados de acuerdo al índice periodontal de Russell, dando como resultado que 17 presentaron una enfermedad periodontal destructiva tanto inicial como establecida y 3 presentaron una gingivitis simple. En este estudio se usaron dos técnicas de coloración, una técnica de Hematoxilina-Eosina y la de Streptavidina-Biotina en los cortes de encía obtenidos de los pacientes seleccionados. En los análisis histopatológicos se observó la existencia de un 100% de infiltrado inflamatorio de tipo mononuclear y epiteliotropismo positivo (+). En el 75% de los cortes la distribución del infiltrado inflamatorio se ubico en 1/3 (+1), seguido de un 25% en 3/3 (+3) y un 10% en 2/3(+2); independientemente del tipo de lesión periodontal.

Los resultados de esta investigación arrojaron como conclusión que en los cortes teñidos con Streptavidina-Biotina se observó escasa presencia de células T CD8+ dentro del infiltrado.

Dos años más tarde Seguíer S y Col. realizaron un estudio comparativo y cuantitativo por inmunohistoquímica y análisis automatizado de la imagen de las fibras de colágeno y las células inflamatorias en los tejidos gingivales humanos saludables y enfermos. En donde los mismos tenían como base para la ejecución de dicha investigación que la enfermedad Periodontal histológicamente es caracterizada por la degradación de los componentes extracelulares de la matriz asociados a una infiltración gingival de las poblaciones de células inflamatorias. El propósito de esto

en el estudio in situ era cuantificar subconjuntos celulares inflamatorios y la fracción de área (AA%) que se ocupó por fibras de colágeno en el tejido gingival saludable y enfermo a nivel del tejido conjuntivo para investigar la asociación, si que pudiera existir, entre la pérdida de colágeno y el infiltrado celular inflamatorio.

El método que se utilizó fue parafina en las secciones gingivales del tejido fino, a partir de 10 pacientes sanos del grupo control (C), 9 pacientes con gingivitis (G), y 10 pacientes con Periodontitis crónica severa (P) y los anticuerpos contra CD45, CD3, CD8, CD20, CD68, TIA-1, y las moléculas de GrB donde por medio de la técnica de la inmunohistoquímica, las fibras del colágeno fueron manchadas usando el sirius F3Ba rojo. Las evaluaciones cuantitativas de los números de las células inflamatorias y el AA% ocupado por las fibras del colágeno fueron realizadas por el morphometric y el análisis automatizado de imagen.

Esta investigación arrojó como resultado que en el grupo P, los anticuerpos CD45+, CD20+, CD68+, TIA-1+, y GrB+ aumentaron los números celulares significativamente ( $P < 0.05$ ) cuando se comparó con los del grupos C y los del grupo G. El estudio presente reveló las diferencias significativas ( $P < 0.01$ ) entre los medios de AA% observadas en el grupo C (63%), grupo G (46%), y grupo P (26%), y se observó que las AA% entre los grupos G y P se presento una correlación inversa con los números de TIA-1 + las células ( $P < 0.01$ ) y células de GrB+ ( $P < 0.01$  y  $P < 0.05$ , respectivamente).

Al finalizar este estudio se mostró que existían grandes diferencias en el número de los subconjuntos de las células inflamatorias distintas según la severidad de la enfermedad periodontal e hizo pensar que la activación de las células citotóxicas podría tocar al papel giratorio en la pérdida de fibras de colágeno observada durante estos estados patológicos. Durante la periodontitis, la pérdida de colágeno se puso en correlación significativamente con los números de subconjuntos celulares inflamatorios. Finalmente, la evaluación cuantitativa del fragmento del área ocupada por fibras de colágeno del tejido gingival puede reflejar la severidad clínica de la enfermedad periodontal.

En el mismo año, China E y cols., elaboraron un estudio descriptivo para evaluar la inmunidad celular, la muestra estuvo conformada por 57 pacientes sin distinción de sexo, en donde se cuantificaron subpoblaciones de linfocitos CD3+, CD4+, CD8+ e índice CD4+/CD8+ en sangre periférica mediante la técnica opti-cim, en el mismo se pudo observar un deterioro de la inmunidad celular periférica (células CD3+ y CD4+), manteniéndose los CD8+ dentro de los valores normales al igual que el índice CD4+/CD8+. No se pudo evidenciar cambios significativos en las subpoblaciones del grupo afectado.

Un año más tarde en Agosto del 2001 Petit M D y cols., realizaron un análisis del fenotipo y la función de las células T en sangre periférica, para estudiar la inmunidad celular en respuesta de la patogenia de la enfermedad periodontal. En el estudio escogieron 2 grupos de pacientes: uno constituido por 16 pacientes altamente susceptibles con periodontitis severa y un grupo control. Los resultados arrojaron que el número de células CD3+ CD4+ y CD8+ así como también el radio CD4/CD8 y la capacidad proliferativa de las células T, no fueron diferentes entre los 2 grupos de sujetos.

Durante el mismo año (2001), meses más tarde Emingil G y cols., elaboran otro estudio donde determinaron el fenotipo y la actividad funcional en sangre periférica de células mononucleares (PBMC) en pacientes con periodontitis agresiva y Periodontitis Crónica. Se realizó el conteo de células T CD3+, CD4+, CD8+ y de células B (CD19+) las cuales fueron analizadas por medio de la citometría de flujo usando anticuerpos monoclonales. Los resultados demostraron que no hubo diferencias significativas en el conteo de células mononucleares (PBMC) en ambos grupos con la excepción de una disminución relativa de células CD3+. En este estudio se concluyó que los pacientes de ambos grupos tienen cantidades similares de células inmunes comparadas con los sujetos saludables, además existe una reducida actividad funcional de esas células lo cual puede deberse a la existencia de defectos en los mecanismos inmune celular por la susceptibilidad a la enfermedad periodontal.

Más tarde Ocampo y Rodríguez en el año 2003 realizaron un estudio llamado “Caracterización de linfocitos T gingivales en pacientes con Periodontitis agresiva”

el cual tenía como finalidad determinar la localización y distribución de los linfocitos T en el tejido gingival afectado de pacientes con Periodontitis agresiva y gingivitis Inducida por Placa Bacteriana. Las biopsias se obtuvieron de 20 pacientes entre 18 y 41 años de edad y fueron procesadas para estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos. Los linfocitos T gingivales (CD3+), las células T ayudadoras (CD4+) y las T supresoras-citotóxicas (CD8+) fueron identificadas usando anticuerpos monoclonales y la técnica de inmunoperoxidasa. El infiltrado inflamatorio en gingivitis inducida por placa fue escaso y se localizo principalmente en la lamina propia debajo del epitelio surcular y de unión, y estuvo dominado por linfocitos T, mientras que en las biopsias de Periodontitis agresiva se localizo primordialmente en el tejido conectivo profundo, debajo del epitelio de la bolsa y estaba compuesto de linfocitos y células plasmáticas. El porcentaje de células CD3+ disminuyo en la Periodontitis agresiva, al compararlo con la gingivitis producida por placa, como consecuencia de una reducción de las células CD4+ especialmente. Estos hallazgos sugieren un papel inmunoregulador de las células T en la patogénia de la enfermedad periodontal.

## **Bases Teóricas**

### *Periodontitis*

La Periodontitis es una enfermedad inflamatoria del periodonto que se caracteriza por destrucción progresiva de los tejidos que sostienen el diente. Su etiología principal esta constituida por una serie de infecciones microbianas mal definidas, que pueden estar compuesta por alguna de las 300 especies bacterianas que se han reconocido en la cavidad oral.

La gravedad de la enfermedad periodontal aumenta progresivamente con la edad de manera directa, siendo entre lo 35 y 40 años la edad promedio del adulto en la que se entra en la fase inicial de la enfermedad periodontal destructiva, (National Institute of Dental Research –NIDR).

La enfermedad se considera que se desarrolla en episodios periódicos, relativamente cortos, ocasionando destrucción tisular rápida, seguida por reparo y

períodos prolongados de remisión. El resultado de la destrucción tisular exhibe un patrón simétrico de pérdida de hueso alveolar y formación de sacos, a pesar de la distribución aparentemente desordenada de los episodios de la actividad de la enfermedad, el cual es común en varias de las formas de Periodontitis, aunque la distribución de los dientes más afectados pueda variar entre las enfermedades y la condición de los pacientes.

La invasión de las bacterias hacia el interior de los tejidos desde el fondo del saco es muy común, evidenciada por recurrencia de bacteriemias en pacientes con Periodontitis seguido a la masticación o a procedimientos de higiene oral, sin embargo es importante diferenciar la invasión pasiva de bacterias en los tejidos periodontales de la invasión activa, como puede ocurrir en una infección aguda, ya que las implicaciones patológicas son completamente diferentes. (Lisgarten 1996)

Es importante resaltar que ninguna persona se encuentra exenta de padecer cualquiera de los tipos de enfermedad periodontal existentes, siendo menos frecuente la aparición de la misma en los pacientes que presentan edades por debajo de los 19 años, evidenciando mayor recurrencia y severamente después de los 35 años de edad. La información que se tenía antes de realizarse un estudio integral de la odontología, era que en Venezuela la población por encima de los 7 años, tenía una prevalencia de la enfermedad de 2 de cada 3 individuos venezolanos, padeciendo la enfermedad en diferentes grados.

#### *Factores etiológicos de la Periodontitis:*

Los factores etiológicos de la enfermedad periodontal por lo general se clasifican en locales y generales, aunque se correlacionan sus efectos. Los factores locales son los relacionados estrechamente con el periodonto, los cuales pueden causar inflamación, que es proceso patológico iniciador de la enfermedad periodontal, en cuanto a los factores generales están relacionados con el estado de salud general del paciente, el cual contribuirá junto con los factores locales a la reacción de los tejidos, por lo que el efecto de los irritantes locales pueden ser agravados en gran medida por situaciones generales desfavorables. (Carranza-2003)

Siguiendo el mismo orden de ideas, Ramfjord (1989) divide estos factores de la siguiente manera: factores iniciadores que son los responsables del desarrollo de la enfermedad (placa bacteriana, cálculo y bacterias) y los factores modificadores que son los que alteran la respuesta inflamatoria del terreno. Estos últimos los clasifica en extrínsecos que actúan localmente y los intrínsecos que son los de origen sistémico y general. (Bascones- 1992).

Por otra parte, también es necesario destacar que a través de los años se crearon diferentes tipos de clasificación para organizar y dar nombre a los diversos trastornos y entidades patológicas periodontales, pero la clasificación de Periodontitis más aceptada es la de la Academia Americana de Periodontología (A.A.P.) 1999:

- Periodontitis Crónica:  
Localizadas < 30 % de sitios involucrados.  
Generales > 30 % de sitios involucrados.  
Incipiente- Moderada- Severa.
- Periodontitis Agresiva:  
Localizadas < 30 % de sitios involucrados.  
Generales > 30 % de sitios involucrados.  
Incipiente- Moderada- Severa.
- Periodontitis asociada a Manifestaciones Sistémicas:  
Desordenes hematológicos y genéticos.
- Enfermedad Periodontal Necrotizante.  
-Gingivitis Ulcerativa Necrotizante.  
-Periodontitis Ulcerativa Necrotizante.
- Abscesos del Periodonto  
-Absceso Gingival, Periodontal o Pericoronal.
- Lesiones Endoperio.
- Deformidades del Desarrollo o Adquirida  
-Relacionada a dientes.  
-Deformidades Mucogingivales.  
-Trauma Oclusal Primario y Secundario.

Es de conocimiento actual que la enfermedad gingival y periodontal son producidas por la acumulación de placa y las bacterias de ésta las causantes por si mismo o por sus productos de características patológicas de los cuadros, pero el huésped desarrolla un mecanismo de defensa que hace que se active un sistema inmunitario e inflamatorio completo.

Estas enfermedades comienzan con una inflamación en la encía y que se extiende a las estructuras periodontales del diente.

Esta alteración se puede dividir en gingivitis y Periodontitis sobre la base de la pérdida de inserción en su progresión hacia apical de la línea amelocementaria. Por ello, las gingivitis se localizan a nivel de la encía y la Periodontitis afecta al resto de los tejidos de sostén del diente, como lo son: cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar. A pesar de que la gingivitis y la Periodontitis se agrupan juntas, a su vez se diferencian en que se desarrollan en distintos estadios de la misma enfermedad y además se consideran como las afecciones más frecuentes dentro de las enfermedades que se desarrollan en el organismo del ser humano.

La acumulación y progresión de la placa dentobacteriana dentro de la cavidad bucal hace que gradualmente la enfermedad evolucione de una gingivitis a una Periodontitis en la mayoría de los casos, aunque también es posible encontrar una gingivitis que persista por mucho tiempo y no progrese a Periodontitis, ya que la cantidad de placa acumulada no es directamente proporcional al efecto que esta ejerce sobre los tejidos.

Los estudios sobre el desarrollo de la enfermedad periodontal han tenido como base principal las características ultraestructurales y de histopatología de la encía en cada una de las etapas del desarrollo de dicha patología.

En la actualidad se conoce con certeza que los diferentes tipos de enfermedad periodontal se encuentran íntimamente relacionados con los mecanismos de defensa del huésped, debido a que en el desarrollo de la enfermedad periodontal en cualquiera de sus tipos existe una interacción entre los microorganismos y los mecanismos de respuesta del huésped, representados por los mecanismos inmunopatológicos. Los

microorganismos son los encargados de producir antígenos, los cuales a su vez van a desencadenar una respuesta por parte del huésped. (Bascones, 1992)

*Patogenia de la Enfermedad Periodontal:*

Los leucocitos PMNs son las primeras células que reaccionan ante la presencia de antígenos para desencadenar la respuesta del huésped. La población de PMNs es reemplazada progresivamente por células redondas de tipo linfocitos, células plasmáticas y macrófagos respectivamente. Los mastocitos, eosinófilos y basófilos también participan en la respuesta inmunológica del huésped, aparecen en escena diferentes mediadores químicos de la inflamación, entre las cuales se deben mencionar los leucotrienos (sustancias lentas de anafilaxis), prostaglandinas, anafilotoxinas y monoquinas. Todo el comportamiento de la red inmunológica está dirigido principalmente por los macrófagos, los cuales estimulan a los linfocitos T para que secreten dos citoquinas proinflamatorias, IL-1 y el factor de necrosis tumoral (TNF), los cuales cumplen un papel protagonista en la destrucción de los tejidos periodontales. La IL-1 se encuentra en dos formas activas, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , las cuales son codificadas a su vez por genes separados. Las dos son moléculas de tipo proinflamatorias potentes y son los principales constituyentes de lo que alguna vez se llamó “factor activador de osteoclastos”. En la familia de la IL-1 también se encuentra el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra) que se une al receptor de IL-1 sin estimular la célula huésped. El TNF al igual que la IL también se encuentra en dos formas las cuales son TNF  $\alpha$  y TNF  $\beta$ . El TNF  $\alpha$  comparte muchas de las actividades biológicas de la IL-1, sin dejar atrás la estimulación de la reabsorción ósea.

Por otra parte cabe destacar que además de todas las reacciones anteriormente mencionadas la Periodontitis Crónica se caracteriza por afectar directamente la activación de la vía alternativa, con degradación de C3 y B a nivel de los líquidos gingivales. Esto a su vez hace pensar que, aunque se forman anticuerpos específicos contra el patógeno en la Periodontitis Crónica, no predomina la activación de la vía

clásica del complemento por procesos en los que hay unión antígeno-anticuerpo. (Carranza 2003).

Cuando el 60% del volumen del epitelio de unión esta constituido por PMNs, se puede observar como el mismo se desprende de la superficie radicular. Clínicamente es importante que el profesional entienda que este fenómeno que se está presentando de destrucción del aparato de sostén y profundización del surco normal para convertirse en patológico, es totalmente independiente del grado de inflamación. Al examen clínico se puede observar un aspecto exterior totalmente normal, pero este proceso patológico se puede estar produciendo en el interior.

El exudado inflamatorio estará formado por la acumulación de los componentes séricos, la fibrina, los hematíes y los granulocitos. La respuesta se presenta ya a los 2-4 días de la acumulación de la placa (lesión inicial) y constituye la gingivitis aguda. Esta respuesta puede ser protectora o destructiva. La naturaleza del huésped hará que esta lesión involucone o evolucione hacia una lesión inflamatoria crónica.

La liberación de histamina, 5 hidroxitriptamina, quininas, componentes del complemento y prostaglandinas aumentaran la permeabilidad vascular. La histamina puede derivar de las células endoteliales plaquetas o los mastocitos. Los mastocitos al desgranularse producen por los efectos bacterianos directos endotoxicos, complejos inmunes pépticos y enzimas proteolíticas, así como por la hipersensibilidad inmediata mediada por IgE.

Después de conocer lo anteriormente se expuesto se procederá a explicar de una forma más específica como es la respuesta inmunológica del huésped ante un proceso infeccioso.

La respuesta inmunológica del huésped se encuentra mediada por dos fenómenos biológicos que conducen a la de dos variedades inmunológicas: la humoral y la celular. La primera célula en actuar es el macrófago, el cual procesa al antígeno, lo condensa y posteriormente lo presenta al linfocito.

Dentro de la medula ósea roja se diferencia la célula madre o pluripotencial, en sus dos vías: una hematopoyetica que va a conduce a la formación de células

sanguíneas no linfoides como plaquetas, eritrocitos, macrófagos y las llamadas “Natural Killer Cells”; y la otra vía que lleva a la formación de las células del sistema linforeticular que a su vez dan origen a las células del tejido linfoide, especializándose luego en linfocitos T ayudadores y favoreciendo a la diferenciación de otro tipo de células. En la vía linfoide se pueden diferenciar los linfocitos B, que terminaran dando lugar a células plasmáticas, encargadas de sintetizar las inmunoglobulinas o anticuerpos. (Muñoz-1991).

En los mamíferos los linfocitos B son generados primeramente en el hígado fetal y luego en la medula ósea, cuando esta se convierte en el tejido hematopoyético primario. Los precursores de los linfocitos B son las células especializadas que se forman a partir de las células madres y que permanecen en la medula ósea, cuya maduración ocurre en la medula ósea en dos fases: una independiente y otra dependiente del contacto con un antígeno.

Las células pre-B inician la primera fase; las mismas son células grandes, carentes de inmunoglobulinas citoplasmáticas y de superficie, las cuales se dividen y dan lugar a las inmunoglobulinas M (M+), en el citoplasma se reordenan los genes que codifican las cadenas pesadas y después los responsables de codificar las cadenas livianas de la inmunoglobulina. Al completarse el reordenamiento, en su superficie las células expresan cadenas de inmunoglobulinas. Convirtiéndolas en células B maduras con capacidad de interactuar con antígenos y de captar señales reguladoras de linfocitos T para así poder proliferarse y diferenciarse, además de presentar numerosas moléculas en su superficie relacionadas con las capacidades funcionales.

Luego los linfocitos B abandonan la medula ósea y se ubican en el tejido linfoide periférico.

No está claramente definido el proceso de maduración de los linfocitos T, no obstante cuando dejan el timo ya han sido dispuestos para actuar como reguladores en la función inmunológica por medio de el aparato transductor (TCD3+) que va a ser el facultado de la transmisión de la información hacia las células, lo cual conlleva a la estimulación de la respuesta inmunológica por los linfocitos TCD4+ (ayudadores) o a la eliminación de la misma por medio de los linfocitos TCD8+ (supresores). Estás

células están además totalmente dotadas para el reconocimiento de los antígenos, interacción con receptores y todas las demás funciones propias de los linfocitos T. (Carranza- 2003).

Además de el receptor de linfocitos T durante su desarrollo intratímico adquieren una estructura conformada por dos grupos de proteínas: la primera llamada T<sub>i</sub> constituidas por dos moléculas ( $\beta$ ) parecidas a las cadenas de inmunoglobulinas; la segunda denominada T<sub>3</sub> que tiene tres moléculas ( $\delta, \epsilon, \gamma$ ) de menor peso molecular. Dicho receptor constituye el sitio de unión de los antígenos y las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Los anticuerpos monoclonales son un derivado homogéneo de una única clona celular B, con los han definido subpoblaciones funcionales de linfocitos T y marcadores de superficie de ciertos grupos de estas células.

Para iniciar la respuesta inmunitaria deben existir 4 tipos de células inmunológicas competentes: las células presentadoras de antígenos APC, los linfocitos B maduros, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> ayudadores o inductores y los linfocitos T CD8<sup>+</sup> supresores o citotóxicos.

Las células especializadas captan el antígeno, tanto por el sistema monoclonal fagocitario como por otras células con función de APC. Se cumple así el procedimiento antigénico y las células presentadoras de antígeno profesional (APPC) las cuales transfieren la información sobre sus características a los linfocitos CD4<sup>+</sup>, en algunos casos la información pasa directamente a los linfocitos B, esto sucede con los llamados antígenos timo independiente.

Los linfocitos CD4<sup>+</sup> inducen a la activación de los linfocitos CD8, de los linfocitos B y de otras subpoblaciones de linfocitos T, dando como consecuencia de esto, que los linfocitos CD8<sup>+</sup> se involucren en la respuesta produciendo señales supresoras dirigidas hacia los linfocitos CD4<sup>+</sup>, linfocitos B y APC, diferenciándose en células citotóxicas específicas para el Ag. Dichas señales reguladoras emitidas los CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> ayudan a la activación de los linfocitos B y a la producción de anticuerpos específicos. La respuesta de hipersensibilidad retardada es producida por la otras subpoblaciones de linfocitos T (CD4<sup>+</sup> TH1 y 2) que se activan y producen

diversas linfoquinas cuyo función es la de reclutar el mayor número de elementos celulares para intentar la eliminación del antígeno.

Existen valores normales en sangre periférica para los linfocitos T, los mismos son medidos en forma porcentual, según Abbas (2002) y Roitt (2000) son:

Linfocitos T (TCD3+): 65-80%.

Linfocito TCD4+: 50-60%.

Linfocito TCD8+: 20-25%.

Índice TCD4+/TCD8+: 1-2.1 ( estado inmunológico del paciente)

El primer método puesto en práctica que actualmente es de uso generalizado para la producción de anticuerpos homogéneos o monoclonales de especificidad conocida fue descrito por George, Kohler y Cesar Milstein en 1975. Esta técnica se basa en el hecho de que cada linfocito B produce anticuerpo para una única especificidad. Esto se lleva a cabo mediante fusión celular o hibridación de células somáticas entre una célula B productora de anticuerpo normal y una célula de mieloma seguido de la selección de la células fusionadas que secretan el anticuerpo de la especificidad deseada derivado de la célula B normal. Estas líneas celulares derivadas de la fusión, inmortalizadas y productoras de anticuerpos se denominan hibridomas, y los anticuerpos que producen reciben el nombre de anticuerpos monoclonales. (Abbas-2002)

En inmunología su aplicación ha permitido localizar glucoproteínas de membrana con las que se ha logrado identificar, enumerar y purificar subpoblaciones de células involucradas en la respuesta inmunológica, usando el microscopio de fluorescencia o el citómetro de flujo, instrumento con capacidad para controlar y/o separar subpoblaciones de linfocitos. (Báscones-1992).

### *Citometría de Flujo*

La Citometría de Flujo (CMF) es una técnica de análisis celular multiparamétrico cuyo fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de partículas (generalmente células) alineadas y de una en una por delante de un haz de láser focalizado. El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que

corresponden a diferentes parámetros de la célula y que son recogidos por distintos detectores. Estos convierten dichas señales en señales electrónicas que posteriormente serán digitalizadas para permitir la medida simultánea de varios parámetros en una misma célula. Estos parámetros son:

- Parámetros relacionados con características intrínsecas de la célula, como su tamaño y la complejidad de su núcleo y citoplasma.
- Parámetros relacionados con características antigénicas de cada célula (inmunofenotipo).

Por lo tanto la CMF es capaz de identificar una célula por medio de sus características antigénicas y/o por sus características morfológicas de tamaño y complejidad.

Por otra parte, cabe destacar que es una técnica sencilla que se aplica en la rutina diaria de muchos laboratorios clínicos y de investigación, capaz de proporcionar resultados de forma rápida que pueden ser aplicables al diagnóstico. Gracias a su gran especificidad es capaz de distinguir entre varias poblaciones celulares diferentes, y detectar una población celular en una muestra en la que predominan otras poblaciones celulares mayoritarias. Pero la principal característica de la CMF es que puede ofrecer información simultánea de varios parámetros de cada una de las células analizadas y la relación entre los parámetros de una célula y los de otra célula también analizada. Permite el análisis de dos parámetros de dispersión, SSC/FSC y tres de fluorescencia (en equipos con un solo láser), F11, F12 y F13, y de una cuarta fluorescencia en equipos con dos láseres. (<http://www.citometriadeflujo.com>)

Las señales producidas por la interacción de las células con el haz de luz son de dos tipos:

- Señales de dispersión.
- Señales de fluorescencia.

a) Señales de dispersión: La dispersión resulta de la interacción de la luz con una partícula que produce un cambio de dirección (no de la longitud de onda) en todas las direcciones del espacio. Las características morfológicas que determinan la

dispersión de la luz son fundamentalmente el tamaño celular, la membrana, el núcleo y el material granular del interior de la célula, llamado complejidad. En los Citómetros de Flujo se miden dos fracciones de dispersión:

- La luz dispersada en ángulo cónico pequeño (0-10°) que casi coincide con la dirección de la luz incidente, llamada FSC (Forward Scatter). Es una medida proporcional al tamaño de la partícula que produce la dispersión.
- La luz dispersada en ángulo recto llamada SSC (Side Scatter). Es proporcional a la complejidad de la estructura interna de la partícula. (<http://www.citometriadeflujo.com>)

b) Señales de Fluorescencia: Un fluorocromo es una molécula química que absorbe luz a una determinada longitud de onda (energía) y emite a una longitud superior (menor energía). El espectro de absorción o excitación es el rango sobre el que un fluorocromo absorbe luz, y el espectro de emisión es el rango sobre el que un fluorocromo emite luz. Cuando un fluorocromo interacciona con la luz de excitación procedente del láser emite energía radiante. Debido a que parte de la energía se utiliza para la absorción, la luz emitida es de menor energía que la luz de excitación, es decir la longitud de onda emitida es mayor. La diferencia entre la longitud de onda de absorción y emisión se denomina Stokes Shift. Los citómetros de flujo permiten detectar señales de fluorescencia procedentes de complejos Antígeno/Anticuerpo marcados con un fluorocromo y situados en una célula, siendo la cantidad de señal de fluorescencia emitida igual a la proporción de la cantidad de componentes fluorescentes de la partícula.

#### *Características De La Citometría De Flujo*

La CMF es una técnica sencilla que se aplica en la rutina diaria de muchos laboratorios clínicos y de investigación, capaz de proporcionar resultados de forma rápida que pueden ser aplicables al diagnóstico. Gracias a su gran especificidad es capaz de distinguir entre varias poblaciones celulares diferentes, y detectar una población celular en una muestra en la que predominan otras poblaciones celulares

mayoritarias. Pero la principal característica de la CMF es que puede ofrecer información simultánea de varios parámetros de cada una de las células analizadas y la relación entre los parámetros de una célula y los de otra célula también analizada. Permite el análisis de dos parámetros de dispersión, SSC/FSC y tres de fluorescencia (en equipos con un solo láser), F11, F12 y F13, y de una cuarta fluorescencia en equipos con dos láseres.

### *Ventajas e Inconvenientes De La Citometría De Flujo*

Debido a la necesidad de utilizar una suspensión de partículas (células, núcleos, cromosomas, etc.), para ser leídos de una en una hace que se pierda información sobre la arquitectura de los tejidos que componen las células o de las propias células, así como la interacción entre estas y el medio que las rodea (patrones nodulares o difusos de los linfomas). Frente a este inconveniente la CMF presenta múltiples ventajas frente al microscopio de fluorescencia y las técnicas citoquímicas, como:

- Posibilidad de empleo de múltiples marcajes frente a un solo marcaje de la citoquímica y la microscopia de fluorescencia.
  - Posibilidad de analizar un elevado número de partículas en un corto período de tiempo (5000 partículas/segundo).
  - Posibilidad de cuantificar la intensidad antigénica por medio de los canales medios de fluorescencia.
  - Mayor sensibilidad y objetividad que le permiten detectar enfermedad mínima residual y caracterizar poblaciones celulares poco abundantes en condiciones normales como los basofilos.
  - Posibilidad de analizar poblaciones celulares y epitopos celulares. - Permite almacenar informáticamente la información del análisis para poderla utilizar en cualquier momento y reanalizar análisis hechos con anterioridad.
  - Posibilidad de cuantificar las moléculas antigénicas presentes en un grupo celular.
- (<http://www.citometriadeflujo.com>)

### *El Citómetro*

El citómetro es un aparato capaz de medir varios parámetros celulares a partir de una suspensión celular por medio la interacción de las células con un haz de luz láser guiadas mediante un flujo continuo. (<http://www.citometriadeflujo.com>)

Esquema Facscan de BD

Esquema Facscan de BD

### *Componentes De Un Citómetro*

Básicamente un citómetro está compuesto por:

a) Sistemas de fluidos:

- Inyección de la muestra.
- Cámara de flujo.

b) Sistemas ópticos:

- Fuentes de luz.
- Detectores.

c) Sistemas electrónicos y computadora:

- Amplificador-convertidor.
- Sistema informático.

### *Representación Grafica De Poblaciones Celulares*

Los citogramas usados habitualmente tanto en la adquisición celular como en su análisis se presentan sobre un eje de coordenadas X/Y. Las poblaciones celulares, representadas por agrupaciones homogéneas de puntos, se situarán en los citogramas dependiendo de sus características físicas de dispersión (SSC/FSC) y antigénicas

## Definición de Términos Básicos

**Anafilotoxina:** Sustancia por activación del complemento, que causa un incremento en la permeabilidad vascular por liberación de mediadores con actividad farmacológica.

**Anticuerpo (Ab):** Proteína producida como resultado de la inducción de un antígeno y que tiene la capacidad de combinarse con el antígeno que combino su producción.

**Antígeno (Ag):** Sustancia que puede inducir una respuesta inmunitaria detectable cuando se introduce en un animal.

**Células Polimorfonucleares (PMN):** Conocido también como neutrofilo o grannulocito, un PMN se deriva de una célula hematopoyetica de la medula ósea y se caracteriza por un núcleo multilobulado. Los PMN emigran de la circulación a un sitio de inflamación por quimiotaxis y actúan como fagotitos de bacterias y otras partículas.

**Célula Pre-B:** Células B en desarrollo presentes solo en tejido hematopoyético que se encuentran en un estadio de maduración caracterizado por la expresión de cadenas pesadas citoplasmáticas  $\mu$  y por cadenas ligeras sustitutivas de Ig, pero no cadenas ligeras.

**Célula Presentadora de Antígenos (APC):** Célula que expone en su superficie fragmentos peptídicos de antígenos proteicos, asociados a moléculas de MHC, y activa a las células T específicas de los antígenos.

**Citómetro:** Es un aparato capaz de medir varios parámetros celulares a partir de una suspensión celular por medio de la interacción de las células con un haz de luz de láser guiado mediante un flujo continuo.

**Citometría de Flujo:** Técnica de análisis celular multiparamétrico cuyo fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de partículas (generalmente células) alineadas y de una en una por delante de un haz de láser focalizado.

**Complejo Mayor de Histocompatibilidad:** Locus genético de gran tamaño que consta de genes muy polimorficos que codifican las moléculas de unión al

péptido que son reconocidas por los linfocitos T. El locus MHC contiene genes que codifican citoquinas moléculas que participan en el procesamiento antigénico y proteínas del complemento.

**Inmunidad Celular:** Forma de inmunidad adaptativa que esta mediada por los linfocitos T y que actúa como mecanismo de defensa contra los microorganismos que sobreviven en el interior de los fagocitos o que infectan células no fagocíticas. Las respuestas de estas consisten en la activación mediada por las células TCD4+ de los macrófagos que han fagocitados los microorganismos, además de la destrucción de las células infectadas por los linfocitos TCD8+.

**Inmunidad Humoral:** Tipo de respuesta inmunitaria adaptativa mediada por anticuerpos producidos por los linfocitos B. la inmunidad humoral es el principal mecanismo de defensa contra los microorganismos extracelulares y sus toxinas.

**Linfocitos:** Células mononucleares de 7 a 12µm de diámetro cuyo núcleo contiene cromatina empacada en forma densa y el citoplasma es un anillo pequeño. Los linfocitos comprenden a las células B y T que desempeñan funciones primarias en la inmunidad.

**Linfocitos TCD3+ (aparato transductor):** Encargados de la activación de los receptores de antígeno de las células T (TCR) y la transmisión o transducción final de la señal de las células.

**Linfocitos TCD4+ (inductores):** Ayudan en la reacción de las células B para que se diferencien en células plasmáticas y produzcan anticuerpos.

**Linfocitos TCD8+ (citotóxicos):** Estimulan la actividad citotóxica y microbicida de las células inmunitarias.

**Macrófagos:** Célula mononuclear fagocítica derivada de los monolitos de la medula ósea y que se encuentra en los tejidos y en el sitio de inflamación. Los macrófagos tienen funciones accesorias en la inmunidad celular.

**Monocitos:** Célula sanguínea fagocítica circundante que originan a los macrófagos titulares.

**Periodontitis Crónica:** Es una enfermedad que se caracteriza por presentar un proceso inflamatorio que conlleva a una destrucción progresiva de los tejidos de sostén del diente.

**Respuesta Inmunitaria:** Desarrollo de resistencia (inmunidad) a una sustancia extraña (por ejemplo, un agente infeccioso). Puede ser mediada por anticuerpos (humoral) y mediada por células (celular) o ambas.

## Sistema de Variables.

### Variable X:

La Periodontitis Crónica

### Definición Conceptual

La Periodontitis es una enfermedad que se caracteriza por presentar un proceso inflamatorio que conlleva a una destrucción progresiva de los tejidos de sostén del diente. (Carranza, 2003)

### Variable Y:

Cantidad de linfocitos TCD3+, TCD4+ y TCD8+ en los pacientes con Periodontitis crónica atendidos en la Facultad de Odontología de la Universidad de Carabobo.

### Definición conceptual

Linfocitos TCD3+: (**aparato transductor**) son los linfocitos encargados de la activación de los receptores de antígeno de las células T (TCR) y la transmisión o transducción final de la señal de las células.(Roitt 2000)

Linfocitos TCD4+: (**inductores**). Son las precursoras de las células T colaboradoras cuyas principales funciones efectoras están mediadas por la producción de citoquinas, además de ayudar en la reacción de las células B para que se diferencien en células plasmáticas y produzcan anticuerpos.(Abbas 2003)

Linfocitos TCD8+: (**citotóxicos**) Son las precursoras de los linfocitos T citolíticos, cuya principal función efectora consiste en lisar células dianas infectadas, y ayudan a estimular la actividad citotóxica y microbicida de las células inmunitarias. (Abbas 2003)

### Definición Operacional

Por medio de la citometría de flujo se cuantificaran las subpoblaciones linfocitarias TCD3+/ TCD4+/TCD8+, para luego comparar el grupo experimental con el control.

### OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.

OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN	VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIÓN	INDICADORES
<p>Evaluar las proporciones de linfocitos T y subpoblaciones en sangre periférica, en los pacientes con Periodontitis Crónica, que acuden al área clínica de periodoncia de la FOUC durante el periodo Enero Febrero 2005.</p>	<p>Subpoblaciones de linfocitos TCD3+, TCD4+ y TCD8+</p> <p>Periodontitis Crónica</p>	<p>Linfocitos CD3+: (<b>aparato transductor</b>) encargados de la activación de los receptores de antígeno de las células T (TCR) y la transmisión o transducción final de la señal de las células.</p> <p>Linfocitos TCD4+: (<b>inductores</b>) Son las precursoras de las células T colaboradoras cuyas principales funciones efectoras están mediadas por la producción de citoquinas, además de ayudar en la reacción de las células B para que se diferencien en células plasmáticas y produzcan anticuerpos.</p> <p>Linfocitos TCD8+: (<b>supresores o citotóxicos</b>) Son las precursoras de los linfocitos T citolíticos, cuya principal función efectora consiste en lisis de células dianas infectadas, y ayudan a estimular la actividad citotóxica y microbicida de las células inmunitarias.</p> <p>Enfermedad inflamatoria del periodonto que se caracteriza por destrucción progresiva de los tejidos que sostienen el diente.</p>	<p>Por medio de la citometría de flujo se cuantificarán las subpoblaciones linfocitarias TCD3+, TCD4+ y TCD8+, para luego comparar el grupo experimental con el control.</p>	<p>Linfocitos TCD3+</p> <p>Linfocitos TCD4+</p> <p>Linfocitos TCD8+</p>	<p>Citometría de flujo.</p> <p>Cantidad de linfocitos TCD3+, TCD4+ y TCD8+ por cc<sup>3</sup></p>

## **CAPITULO III**

### **MARCO METODOLÓGICO**

#### **Tipo y Diseño de la Investigación**

La investigación que se realizó fue de tipo descriptiva (Hernández, S. R., Fernández C., & Bastidas L., P 1998.), ya que se detectaron y describieron ciertas variables con las cuales se pudo fundamentar este estudio.

En otro contexto, cabe acotar que la presente investigación tiene un diseño no experimental transeccional descriptivo en donde Hernández y Col. (1998) lo definen como:

Los diseños no experimentales son aquellos en donde la investigación “se realiza sin manipular deliberadamente las variables. Es decir, se trata de una investigación donde no hacemos variar intencionalmente las variables independientes. Lo que hacemos en la investigación no experimental es observar fenómenos tal y como se dan en su contexto natural, para después analizarlos. (p. 184).”

Por otra parte también se debe tomar en cuenta que las variables independientes ya han ocurrido y no pueden ser manipuladas, por esto el investigador no tiene un control directo sobre dichas variables y no puede influir sobre ellas, ni sobre sus efectos porque ya ocurrieron.

Los diseños transeccionales descriptivos tienen como objetivo indagar la incidencia y los valores en que se manifiesta en una o más variables. El procedimiento consiste en medir en un grupo de personas u objetos una o, generalmente, más variables y proporcionar su descripción (p.187). Esta investigación posee un diseño transeccional descriptivo, ya que en la misma se cuantificaron las proporciones de linfocitos T (TCD3+), subpoblaciones TCD4+ y TCD8+.

## **Población y Muestra**

### *Población:*

Para Hurtado y Toro (1997), la población es el conjunto de todos los elementos o sujetos, objeto de estudio, que poseen una serie de características comunes que la definen y para la cual serán válidas las conclusiones que se obtengan de la investigación.

La investigación que se llevó a cabo tuvo como población o universo a todos los pacientes con diagnóstico definitivo de Periodontitis crónica de moderada a severa que acudieron al área de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad de Carabobo durante el lapso Enero-Febrero 2005, sin distinción de sexo, edad, ni procedencia, quedando conformada la población por 60 pacientes.+

### *Muestra:*

Morles (1977) define muestra como una porción representativa de un universo o población, la cual permite generalizar los resultados de la investigación a esa población. De la población anteriormente mencionada se tomó una muestra no probabilista intencionada que cumplió con los criterios de inclusión establecidos. El porcentaje que se utilizó en este estudio fué del 30% de los pacientes que acudieron en el período comprendido, el total de la muestra quedó conformada por 23 los cuales están distribuidos de la siguiente manera: 18 pacientes periodontalmente comprometidos y para mayor rigurosidad científica se tomó una muestra de 5 pacientes, periodontalmente sanos los cuales serán denominados “controles sanos”, que actuarán como patrón de referencia con respecto a los valores ya establecidos.

## **Criterios de Selección**

### *Criterios de Inclusión:*

Se incluirán en esta investigación:

- Pacientes con diagnóstico de periodontitis crónica moderada a severa que presente clínicamente:
  - Pérdida de inserción de 3 a 7 mm.

- Sangrado al sondaje.
- Presencia de secreciones purulentas.
- Profundidad de bolsa de 6 a 8 mm.
- Pérdida ósea entre un 40 y 60%.
- Moderada invasión de furca.
- Pacientes que acepten por voluntad propia ser objeto de estudio. .  
(Carranza 2003).

#### *Criterio de Exclusión*

- Pacientes que estén ingiriendo antibióticos, corticoesteroides y AINES en los últimos 6 meses.
- Pacientes fumadores, embarazadas, alcohólicos.
- Pacientes que hallan recibido terapia periodontal en los últimos 6 meses.
- Paciente con deficiencias nutricionales.

#### **Técnicas e instrumentos de recolección de datos**

Pérez (2002) afirma que “La técnica es el método y los instrumentos son aquellos que permiten al investigador obtener y recabar datos acerca de las variables de estudio” (p.67)

Por otra parte Sabino (1992) define que “Un instrumento de datos es, en un principio, cualquier recurso del que se vale el investigador para acercarse a los fenómenos y extraer de ellos información” (p.143).

La presente investigación se considera que se realizó por medio de una observación estructurada (Pérez 2002) ya que se emplearon los sentidos para observar fenómenos en una forma general y además se utilizaron técnicas e instrumentos para calcular y organizar toda la información obtenida como lo son las balanzas, los termómetros, los microscopios, etc. (Pérez 2002), en este caso se empleo el citómetro de flujos, el cual fué necesario para la realización de esta investigación.

La recolección de la información se llevó a cabo en el área clínica de Periodoncia, ubicada en el pabellón 9 de la FOUC, sector Bárbula, Valencia-Edo. Carabobo, a través de una técnica de observación directa durante el periodo Enero-Febrero 2005, utilizándose un instrumento que fue diseñado por las autoras de la investigación, denominado guía de observación, el cual consta de dos partes:

Una primera parte (I) la cual incluye datos del paciente tales como: Nombre, Apellido, Edad, Sexo, Dirección, Teléfono, Firma del Paciente.

Una segunda parte (II) donde se registraran todos los datos obtenidos por medio de la citometría de flujo: Cantidad de Linfocitos CD3+; CD4+, CD8+ y CD4+/CD8+.

### **Validez**

Al finalizar la elaboración del instrumento, nace la imperiosa necesidad de realizar una serie de procesos por medio de los cuales se permitió conocer si los datos obtenidos son certeros y si se puede seguir confiando en el proceso que se utilizó para la recolección de datos.

La validación se llevó a cabo a través de un juicio de expertos que se hizo. Esto se refiere a la revisión exhaustiva que se le realiza al instrumento de investigación antes de ser aplicado, con el fin de evitar o disminuir los errores. Es ejecutado por una serie de especialistas expertos en el tema y con experiencia en el área de metodología de la investigación (Pérez 2002).

La guía de observación por dos (2) expertos en contenido de Periodoncia y un experto en metodología, que evaluaron los objetivos y los ítems de la guía de observación, los cuales reflejaron observaciones que permitieron ajustar de una mejor manera la investigación.

### **Técnica de Análisis de los Resultados**

La interpretación de los datos fue elaborada mediante el analisis descriptivo, cuyos resultados fueron registrados, analizados y presentados a través de cuadros estadísticos, gráficos de barra y graficos lineales. Para ello se procedió al uso

del estadístico de distribución T de Student, utilizando el criterio de un nivel de significación del 5% ( $p < 0.05$ ), a fin de comparar estas proporciones en cada grupo.

### **Materiales y Métodos para la Recolección de Datos**

Para la realización de esta investigación se requirió de una serie de materiales, que fueron necesarios para la obtención de los resultados por medio de la citometría de flujo. Entre los materiales que se utilizaron se encuentran:

- Inyectadoras.
- Tubos de Ensayo.
- Anticuerpos monoclonal CD4 casa DAKO F0766
- Anticuerpos monoclonal CD8 casa DAKO F0765
- Anticuerpos monoclonal CD3 casa DAKO F0818
- Isotón
- Solución Lizada de glóbulos rojos.
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Colorantes
- Pipeta automática 10 – 100 ml
- Pipeta automática 100 – 1000 ml
- Pipeta automática 1000 – 5000 ml.
- Gradillas metálicas para laminas
- Laminas porta objetos Standard.
- Colorante wright
- Tubos falcón para citometría de flujo.

Equipos:

- Citómetro de flujo,
- Microscopio óptico
- Centrifuga
- Voltex.
- Hematocitómetro o cámara de Neubauer.

Previo diagnóstico de los pacientes afectados periodontalmente se procedió a tomar la muestra de sangre periférica que luego se analizaría a través de la citometría de flujo por medio de los siguientes pasos:

A cada paciente se le extrajo 5 ml. de sangre periférica y se colocó en un tubo de ensayo que contenía 50  $\mu$ l. De anticoagulante E.D.T.A.

Con la muestra de sangre se hizo un frotis y se coloreo con colorante Wright para realizar el recuento diferencial de glóbulos blancos, además de ello se obtuvo la población total de leucocitos a través del uso de un hematocitómetro, realizado de forma tradicional. Una vez obtenido lo anterior se procedió al marcaje de linfocitos T (CD3+) y subpoblaciones, CD4+ y CD8+ procesándolos de la siguiente manera:

1. Se añadieron 10  $\mu$ l. del anticuerpo monoclonal CD3+, CD4+ y CD8+ en un tubo de ensayo falcon, donde previamente, se había colocado de la muestra de 50  $\mu$ l sangre.
2. Se taparon los tubos, se agitaron.
3. Se incubaron en la oscuridad durante 20 minutos a temperatura ambiente.
4. Se añadieron 2ml de solución de lizado de glóbulos rojos.
5. Mezclar en el voltex.
6. Dejar los tubos a temperatura ambiente por 10 min. Sin exceder el tiempo.
7. Se centrifugaron durante 5 minutos.
8. Se extrajo con una pipeta calibrada aspiró el líquido sobrenadante, dejando las células en suspensión (pellet).
9. Luego se añadió 0.5ml de isotón.
10. Y por último se leyó en el citómetro y se cuantificaron las células marcadas.

## **CAPÍTULO IV**

### **ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS**

En el presente capítulo, se presentan los resultados obtenidos de la guía de observación estructurada aplicada a fin evaluar las proporciones linfocitarias de TCD3+, TCD4+ y TCD8+ en los pacientes periodontalmente comprometidos y pacientes sanos, atendidos en la Facultad de Odontología de la Universidad de Carabobo y UNIMPA durante los meses Enero-Febrero 2005. El análisis e interpretación de los resultados se realizó en función de los objetivos formulados comparando los resultados a su vez con el basamento teórico.

#### **Presentación de Resultados**

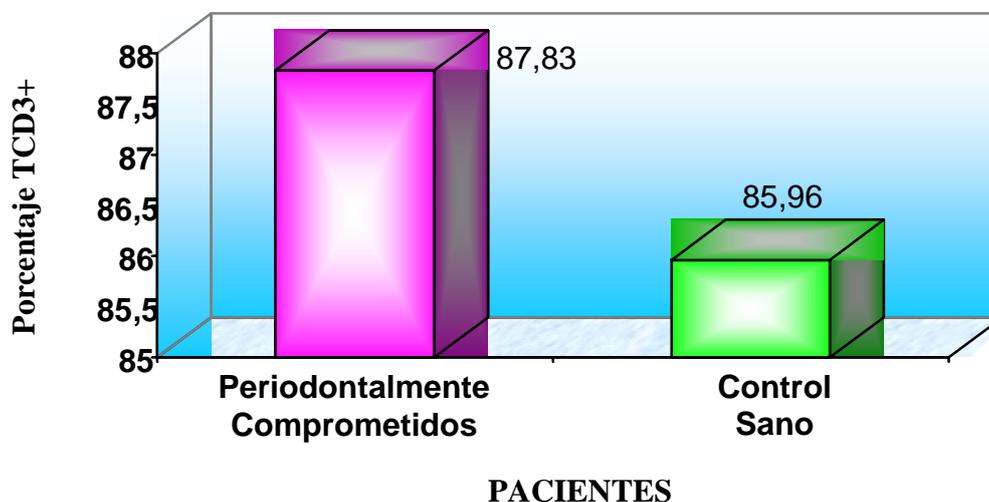
El análisis descriptivo de los datos recopilados con la guía de observación se realizó de forma porcentual, se procedió a la elaboración de los cuadros y gráficos de acuerdo a los objetivos de la investigación. En estos cuadros se muestran las proporciones linfocitarias de TCD3+, TCD4+, TCD8+ y TCD4+/TCD8+ en los pacientes periodontalmente comprometidos para luego compararlos con el grupo control sanos y con los valores normales previamente establecidos; para ello se procedió al uso del estadístico de distribución T de Student, utilizando el criterio de un nivel de significación del 5% ( $p < 0.05$ ), a fin de comparar estas proporciones en cada grupo.

El primer objetivo de esta investigación tuvo como propósito determinar las proporciones de linfocitos T (CD3+) totales en sangre periférica, en los pacientes con Periodontitis Crónica que acuden al área clínica de Periodoncia de la FOUC durante el periodo Enero-Febrero 2005 y los resultados se describen a continuación:

**Cuadro N° 1.** Valores promedio (Media  $\pm$  Desviación estándar) de Linfocitos TCD3+ en pacientes periodontalmente comprometidos y controles sanos. UNIMPA Facultad de Odontología Universidad de Carabobo 2005.

PACIENTES	$\overline{X} \pm S$	SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA
Periodontalmente Comprometidos	87.83 $\pm$ 3.2	DIFERENCIA = 1.87 T (Student) = 0.258 G.L. = 44 P < 0.05 (significativa)
Control Sano	85.96 $\pm$ 1.3	

**Fuente:** Guía de Observación Millano-Palma 2005.



**Gráfico N° 1.** Valores promedio (Media  $\pm$  Desviación estándar) de Linfocitos TCD3+ en pacientes periodontalmente comprometidos y controles sanos. UNIMPA Facultad de Odontología Universidad de Carabobo 2005.

**Fuente:** Cuadro N° 1

## **Análisis e Interpretación del Cuadro y Gráfico N° 1**

En el cuadro No. 1, se determina que hubo una diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) en el grupo de pacientes periodontalmente comprometidos en la dimensión TCD3+. Como puede apreciarse este grupo obtuvo un porcentaje promedio de 87.83 puntos con desviación estándar de 3.2 punto con respecto al grupo de pacientes sanos. La existencia de diferencia (con exactitud de 1.87) corresponde a un valor de la t (Student) igual a 0.258, para 44 grados de libertad y con significación correspondiente al 5% ( $p < 0.05$ ).

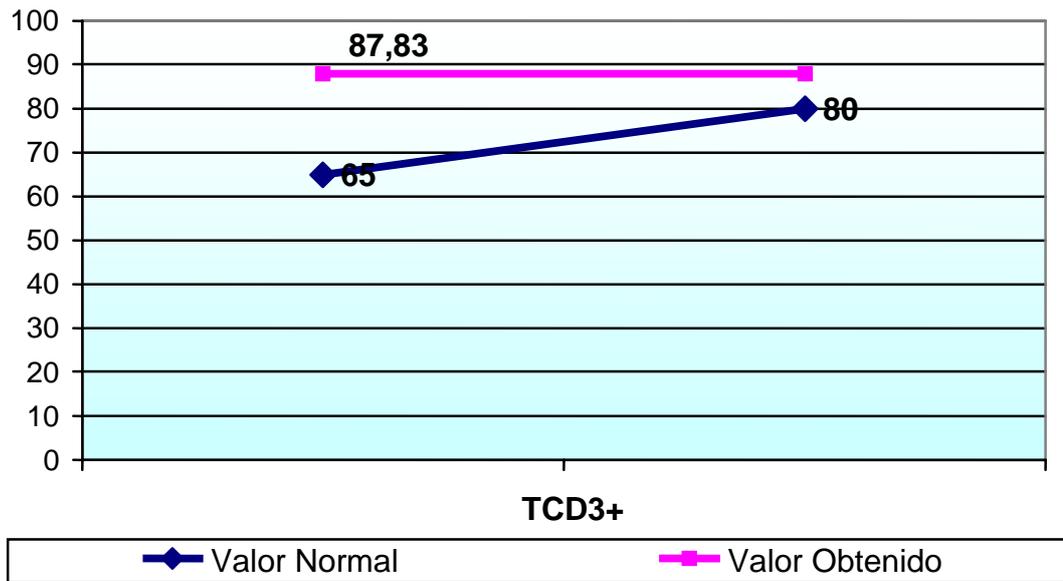
Este resultado confirma que hubo cambios significativos en el grupo de pacientes periodontalmente comprometidos comparado con el grupo de pacientes sanos; en este grupo se aprecia un promedio más bajo en lo que respecta a los resultados de Linfocitos TCD3+.

Chinea E y cols en el año 2000 realizan un estudio en sangre periférica a 57 pacientes con gingivitis crónica y periodontitis de aparición temprana y tardía mediante la técnica opti-cim, donde refieren la existencia de un deterioro de la inmunidad celular periférica (TCD3+) difiriendo con los resultados obtenidos en esta investigación, ya que en la misma la población de linfocitos TCD3+ se encuentra aumentado en los pacientes periodontalmente comprometidos con respecto a los pacientes controles sanos.

**Cuadro N° 2.** Valores promedio (Media  $\pm$  Desviación estándar) de Linfocitos TCD3+ en pacientes periodontalmente comprometidos y valores normales. UNIMPA Facultad de Odontología Universidad de Carabobo 2005.

<b>Pacientes</b>	<b>Porcentaje Promedio</b>
<b>Periodontalmente comprometidos</b>	87.83
<b>Valores Normales</b>	65 a 80

**Fuente:** Guía de Observación Millano-Palma 2005 y Valores normales de Roitt 2000.



**Gráfico N° 2.** Valor promedio (porcentaje) obtenidos en la comparación de las proporciones TCD3+ en sangre periférica, entre los pacientes Periodontalmente comprometidos y los valores normales. UNIMPA Facultad de Odontología Universidad de Carabobo 2005.

**Fuente:** Cuadro N° 2.

### **Análisis e Interpretación del Cuadro y Gráfico N° 2**

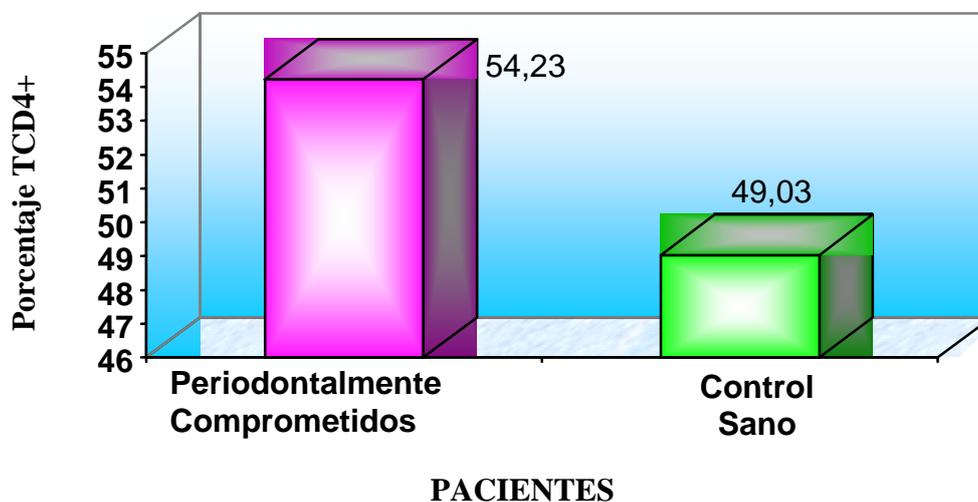
El cuadro N° 2 muestra los resultados obtenidos en linfocitos TCD3+, determinándose que el promedio obtenido en el grupo periodontalmente comprometido, compuesto por 18 elementos muestrales; obtuvieron un porcentaje promedio de 87,83% lo que determina que sobrepasa el rango en sangre periférica para los linfocitos TCD3+; ya que según Roitt (2000) éstos oscilan entre 65 – 80%; revelando el estado inmunitario de los pacientes en estudio.

El segundo objetivo tiene como fundamento cuantificar las proporciones de las subpoblaciones linfocitarias TCD4+ y TCD8+ en sangre periférica en los pacientes con Periodontitis Crónica, que acuden al área clínica de Periodoncia de la FOUC durante el periodo Enero-Febrero 2005.

**Cuadro N° 3.** Valores promedio (Media  $\pm$  Desviación estándar) de Linfocitos TCD4+ en pacientes periodontalmente comprometidos y controles sanos. UNIMPA Facultad de Odontología Universidad de Carabobo 2005.

PACIENTES	$\overline{X} \pm S$	SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA
Periodontalmente comprometidos	54.23 $\pm$ 2.2	DIFERENCIA = 5.02 T (Student) = 0.558 G.L. = 44 P < 0.05 (significativa)
Control Sano	49.03 $\pm$ 1.3	

**Fuente:** Guía de Observación Millano-Palma 2005.



**Gráfico N° 3.** Valores promedio (Media  $\pm$  Desviación estándar) de Linfocitos TCD4+ en pacientes periodontalmente comprometidos y controles sanos. UNIMPA Facultad de Odontología Universidad de Carabobo 2005.

**Fuente:** Cuadro N° 3

### **Análisis e Interpretación del Cuadro y Grafico N° 3**

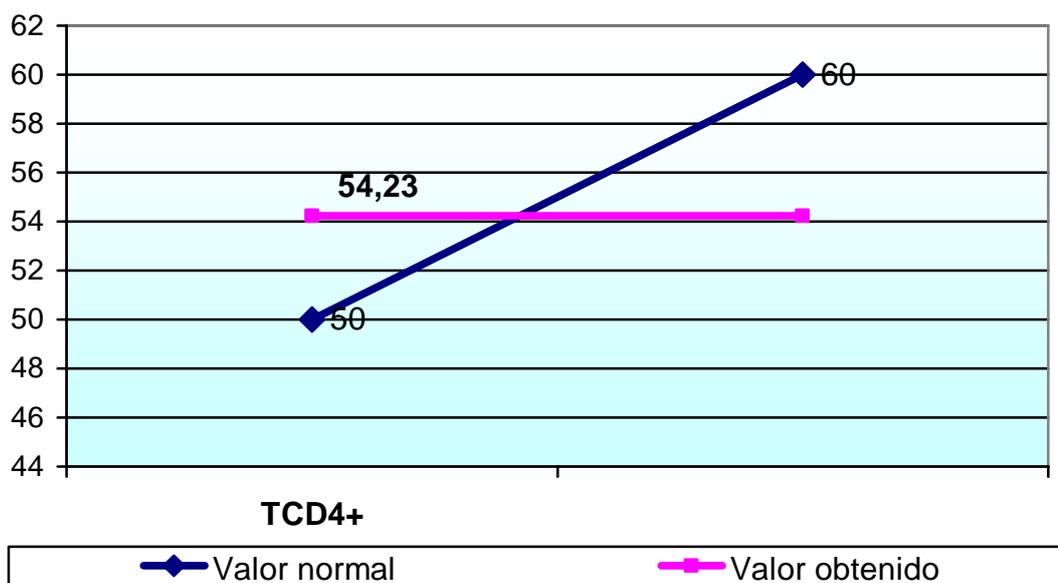
En el cuadro No. 3, se determinó que hubo una diferencia significativa ( $p > 0.05$ ). Como puede apreciarse el grupo de pacientes periodontalmente comprometidos obtuvo un porcentaje promedio de 54.23 puntos con desviación estándar de 2.2 puntos; mientras que el grupo de pacientes sanos obtuvo un porcentaje promedio de 49.03 puntos. La existencia de diferencia (con exactitud de 5.02) corresponde a un valor de la t (Student) igual a 0.558, para 44 grados de libertad y con significación correspondiente al 5% ( $p < 0.05$ ). Este resultado confirma que hubo cambios significativos en los pacientes periodontalmente comprometidos comparado con el de pacientes sanos; en este grupo se aprecia un promedio más bajo en lo que respecta a los resultados de Linfocitos TCD4+.

Para el año 2000 Emingil G y cols. realizaron estudios en sangre periférica, donde determinaron el conteo de diversas células, entre las cuales cuantificaron TCD4+, por medio de la citometría de flujo, los resultados de esta investigación demostraron que los pacientes de ambos grupos tenían proporciones similares de células inmunes (TCD4+) comparadas con los sujetos saludables, lo que difiere con los resultados obtenidos en este estudio ya que la proporción de linfocitos TCD4+ obtenida tuvo una diferencia de 2% entre los pacientes periodontalmente comprometidos y el grupo control sano, lo que quiere decir que la subpoblación TCD4+ se encuentran en proporciones elevadas en los pacientes enfermos con respecto a los pacientes sanos.

**Cuadro N° 4.** Valores promedio (Media  $\pm$  Desviación estándar) de Linfocitos TCD4+ en pacientes periodontalmente comprometidos y valores normales. UNIMPA Facultad de Odontología Universidad de Carabobo 2005.

Pacientes	Porcentaje Promedio
Periodontalmente Comprometidos	54.23
Valores Normales	50 a 60

**Fuente:** Guía de Observación Millano-Palma 2005 y Valores normales de Abbas (2002).



**Gráfico N° 4.** Valor promedio (porcentaje) obtenidos en la comparación de las proporciones TCD4+ en sangre periférica, entre los pacientes Periodontalmente comprometidos y los valores normales. UNIMPA Facultad de Odontología Universidad de Carabobo 2005.

**Fuente:** Cuadro N° 4

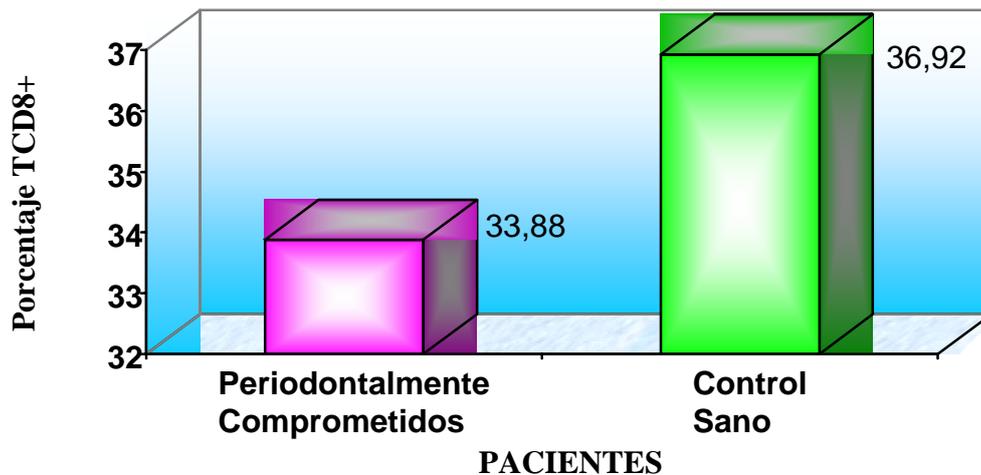
#### **Análisis e Interpretación del Cuadro y Grafico N° 4**

El cuadro N° 4 muestra los resultados obtenidos en linfocitos TCD4+, determinándose que el promedio obtenido en el grupo enfermo, compuesto por 18 elementos muestrales; fue de 54.23% lo que determina que están en el rango de los valores normales de TCD4 + en sangre periférica establecidos por Abbas (2002) los cuales oscilan entre 50-60%; revelando el estado inmunitario de los pacientes en estudio.

**Cuadro N° 5.** Valores promedio (Media  $\pm$  Desviación estándar) de Linfocitos TCD8+ en pacientes periodontalmente comprometidos y controles sanos. UNIMPA Facultad de Odontología Universidad de Carabobo 2005.

<b>PACIENTES</b>	$\overline{X} \pm S$	<b>SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA</b>
<b>Periodontalmente Comprometidos</b>	33.88 $\pm$ 1.2	DIFERENCIA = -3.04 T (Student) = 0.058 G.L. = 43 P > 0.05 (No significativa)
<b>Controles Sanos</b>	36.92 $\pm$ 2.3	

**Fuente:** Guía de Observación Millano-Palma 2005.



**Gráfico N° 5.** Valores representativos (Meda  $\pm$  Desviación estándar) de los resultados obtenidos en la Dimensión Linfocitos TCD8+ + en pacientes periodontalmente comprometidos y control sano.

**Fuentes: Cuadro N° 5**

#### **Análisis e Interpretación del Cuadro y Grafico N° 5**

En el cuadro No. 5, se determina que no hubo una diferencia significativa ( $p > 0.05$ ). Como puede apreciarse el grupo periodontalmente comprometido obtuvo un porcentaje promedio de 33.88 puntos con desviación estándar de 1.2 puntos; mientras que el grupo sano obtuvo un porcentaje promedio de 36.97 puntos. La existencia de diferencia negativa (con exactitud de -3.04) corresponde a un valor de la t (Student) igual a 0.058, para 43 grados de libertad y con significación correspondiente al 5% ( $p > 0.05$ ). Este resultado confirma que no hubo cambios significativos en el grupo de pacientes comprometidos comparado con el grupo sano; en este grupo se aprecia un promedio mayor en lo que respecta a los resultados de Linfocitos TCD8+.

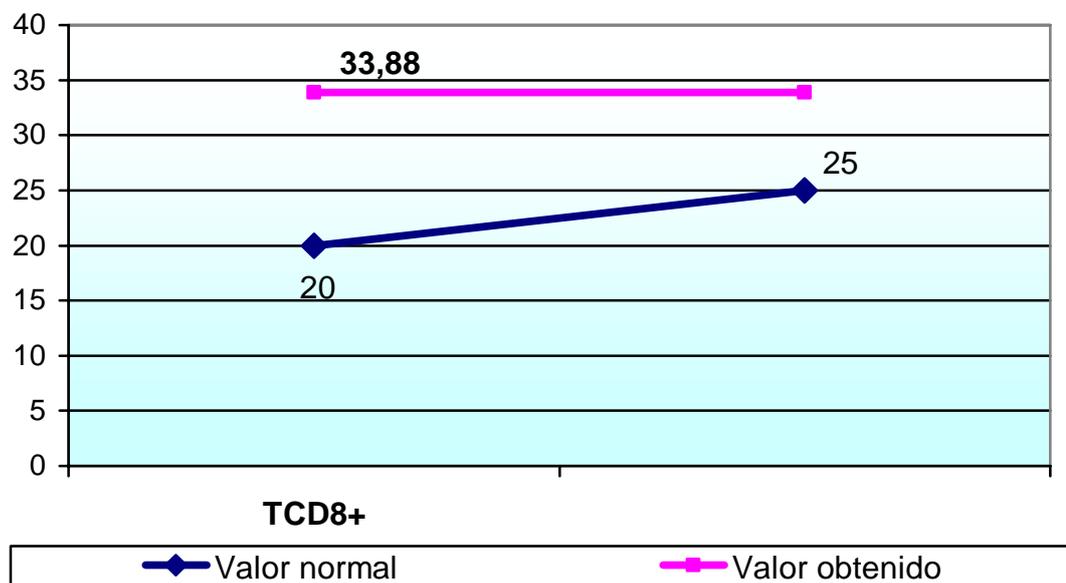
Estos resultados no concuerdan con los obtenidos por China E y cols en el año 2000 donde se mantienen los TCD8+ dentro de los valores normales y a

diferencia de la presente investigación donde los encontramos por encima de los valores normales, lo que sugiere un mayor control de la variable.

**Cuadro N° 6.** Valores promedio (Media  $\pm$  Desviación estándar) de Linfocitos TCD8+ en pacientes periodontalmente comprometidos y valores normales. UNIMPA Facultad de Odontología Universidad de Carabobo 2005.

Pacientes	Porcentaje Promedio
Periodontalmente Comprometidos	33.88
Valores Normales	20 – 25

**Fuente:** Guía de Observación Millano-Palma 2005 y Valores normales de Abbas(2002).



**Gráfico N° 6.** Valor promedio (porcentaje) obtenidos en la comparación de las proporciones TCD8+ en sangre periférica, entre los pacientes Periodontalmente comprometidos y los valores normales. UNIMPA Facultad de Odontología Universidad de Carabobo 2005.

**Fuente:** Cuadro N° 6.

### **Análisis e Interpretación del Cuadro y Grafico N° 6**

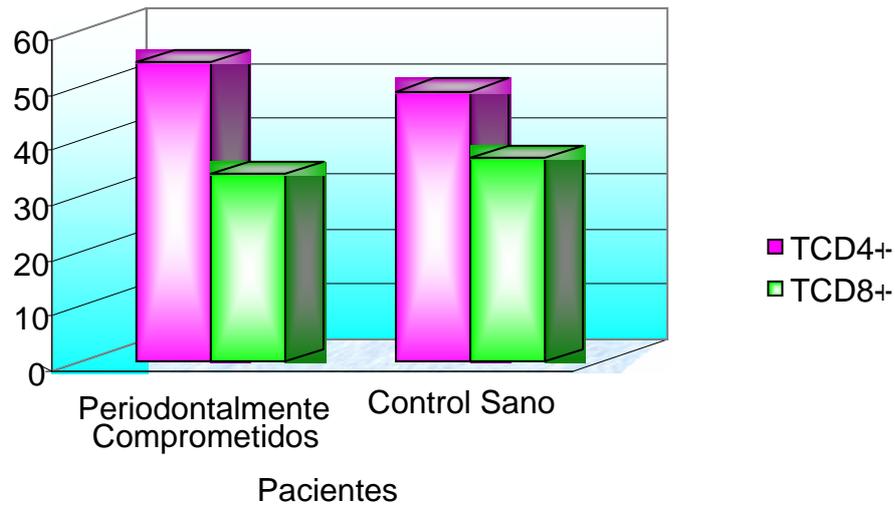
El cuadro N° 6 muestra los resultados obtenidos en linfocitos TCD8+, determinándose que el promedio obtenido en el grupo periodontalmente comprometidos, compuesto por 18 elementos muestrales; fue de 33.88% lo que determina que sobrepasan el rango de valores normales en sangre periférica para los linfocitos TCD8+; ya que según Abbas (2002) éstos oscilan entre 20-25%; revelando una alteración en el estado inmunitario de los pacientes en estudio.

En el tercer objetivo se compararon las proporciones TCD4+ y TCD8+ en sangre periférica, en los pacientes con Periodontitis Crónica, que acuden al área clínica de Periodoncia de la FOUC, durante el periodo Enero-Febrero 2005.

**Cuadro N° 7.** Comparación de Valores promedio (Media  $\pm$  Desviación estándar) de la proporción de Linfocitos TCD4+ y TCD8+ en pacientes periodontalmente comprometidos y control sano. UNIMPA Facultad de Odontología Universidad de Carabobo 2005.

<b>Anticuerpos Monoclonales</b>	<b>Pacientes</b>	
	<b>Periodontalmente Comprometidos</b>	<b>Control Sano</b>
<b>TCD4+</b>	54,23	49,03
<b>TCD8+</b>	33,88	36,92

**Fuente:** Guía de Observación Millano-Palma 2005.



**Gráfico N° 7.** Valores representativos (Meda  $\pm$  Desviación estándar) de los resultados obtenidos en la Dimensión Linfocitos TCD4+ y TCD8+ en pacientes periodontalmente comprometidos y control sano

**Fuente:** Cuadro N° 7

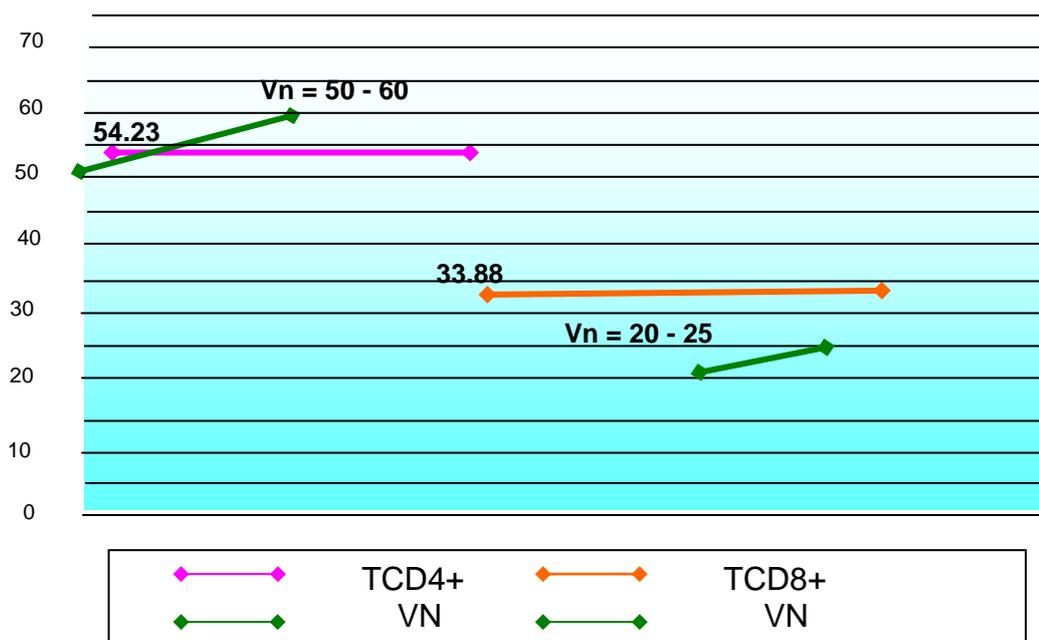
**Análisis e Interpretación del Cuadro y Grafico N° 7.**

El cuadro N° 7 muestra los resultados obtenidos en linfocitos TCD4+ y TCD8+, en donde se evidencia que existe mayor proporción de los linfocitos TCD4+ en los pacientes periodontalmente comprometidos con respecto a los controles sanos, sin embargo en el grupo control sano existe una diferencia inversamente proporcional de las cantidades, es decir en estos pacientes existe mayor cantidad de linfocitos TCD8+ que de TCD4+.

**Cuadro N° 8.** Valores promedio (Media  $\pm$  Desviación estándar) de Linfocitos TCD4+ y TCD8+ en pacientes periodontalmente comprometidos y valores normales. UNIMPA Facultad de Odontología Universidad de Carabobo 2005.

Anticuerpos Monoclonales	Pacientes Periodontalmente Comprometidos	Valores Normales
TCD4+	54,23	50-60
TCD 8+	33,88	20-25

**Fuente:** Guía de Observación Millano-Palma 2005 y Valores normales de Abbas(2002).



**Gráfico N° 8.** Valor promedio (porcentaje) obtenidos en la comparación de las proporciones TCD4+ y TCD8+ en sangre periférica, entre los pacientes Periodontalmente comprometidos y los valores normales. UNIMPA Facultad de Odontología Universidad de Carabobo 2005.

**Fuente:** Cuadro N° 8

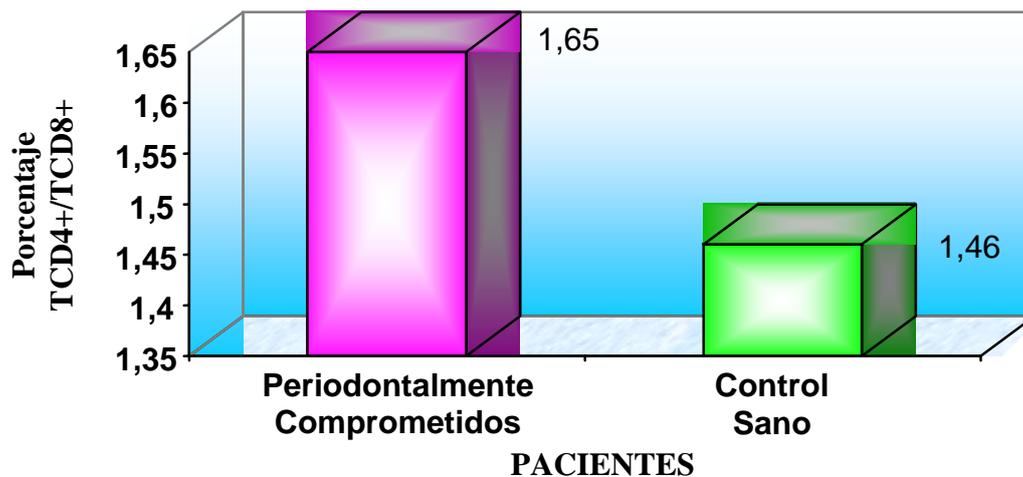
### **Análisis e Interpretación del Cuadro y Grafico N° 8**

El cuadro N° 8 muestra los resultados obtenidos al comparar las proporciones linfocitarias TCD4+ y TCD8+ con los valores normales descritos por Abbas (2002), donde se evidencio que la subpoblación TCD4+ se encuentra dentro de los limites previamente establecidos, a diferencia de los TCD8+ que sobrepasan dichos valores, por lo que se puede sugerir que estos resultados se encuentran así ya los linfocitos TCD8+ fueron activados para producir una respuesta inmunitaria.

**Cuadro N° 9.** Valores promedio (Media  $\pm$  Desviación estándar) de el Indice TCD4/TCD8+ de pacientes periodontalmente comprometidos y controles sanos. UNIMPA Facultad de Odontología Universidad de Carabobo 2005.

<b>PACIENTES</b>	$\overline{X} \pm \overline{S}$	<b>SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA</b>
<b>Periodontalmente Comprometidos</b>	1.65 $\pm$ 1.2	DIFERENCIA = 0.19 T (Student) = 0.358 G.L. = 44 P > 0.05 (significativa)
<b>Control Sano</b>	1.46 $\pm$ 0.1	

**Fuente:** Guía de Observación Millano-Palma 2005.



**Gráfico N° 9.** Valores promedio (Media  $\pm$  Desviación estándar) de Linfocitos TCD4+/TCD8+ en pacientes periodontalmente comprometidos y controles sanos. UNIMPA Facultad de Odontología Universidad de Carabobo 2005.

**Fuente:** Cuadro N° 9.

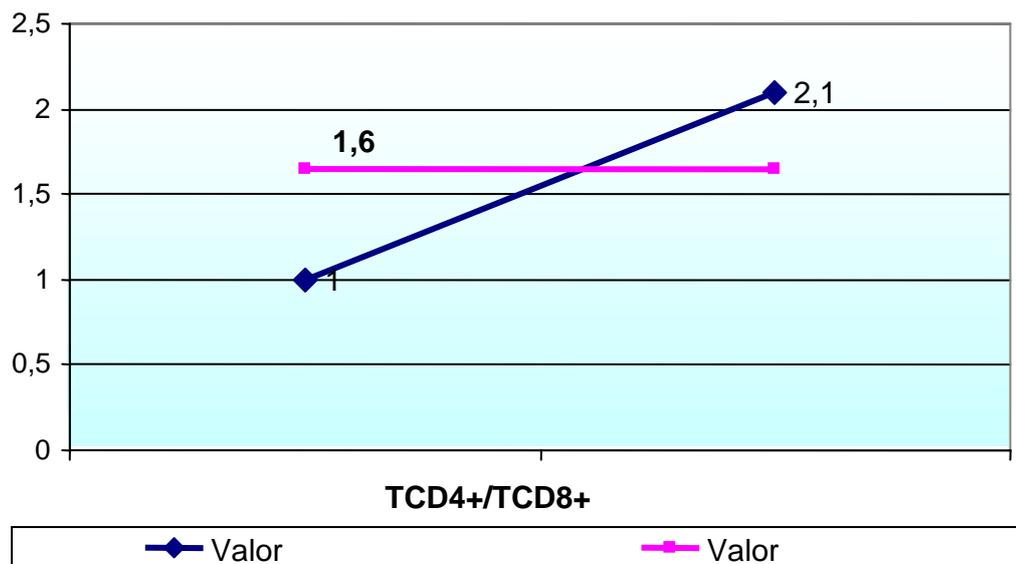
#### **Análisis e Interpretación del Cuadro y Grafico N° 9**

En el cuadro No. 9, se determina que hubo diferencia significativa ( $p > 0.05$ ). Como puede apreciarse los pacientes periodontalmente comprometidos obtuvieron un índice promedio de 1.65 puntos con desviación estándar de 1.2 puntos; mientras que el grupo de pacientes sanos obtuvo un índice promedio de 1.46 puntos. La existencia de diferencia (con exactitud de 0.19) corresponde a un valor de la t (Student) igual a 0.358, para 44 grados de libertad y con significación correspondiente al 5% ( $p > 0.05$ ). Este resultado confirma que hubo cambios significativos en los pacientes periodontalmente comprometidos comparado con los controles sanos; en el cual se aprecia un promedio menor en el índice de TCD4/TCD8+.

**Cuadro N° 10.** Valores promedio (Media  $\pm$  Desviación estándar) de Linfocitos TCD4+/TCD8+ en pacientes periodontalmente comprometidos y valores normales. UNIMPA Facultad de Odontología Universidad de Carabobo 2005.

Grupo	Porcentaje Promedio
Periodontalmente Comprometidos	1.65
Valores Normales	1 – 2.1

**Fuente:** Guía de Observación Millano-Palma y Valores normales de Roitt (2000).



**Gráfico N° 10.** Valor promedio (porcentaje) obtenidos en la comparación de las proporciones TCD4+/TCD8+ en sangre periférica, entre los pacientes Periodontalmente comprometidos y los valores normales. UNIMPA Facultad de Odontología Universidad de Carabobo 2005.

**Fuente:** Cuadro N° 10.

### **Análisis e Interpretación del Cuadro y Grafico N° 10**

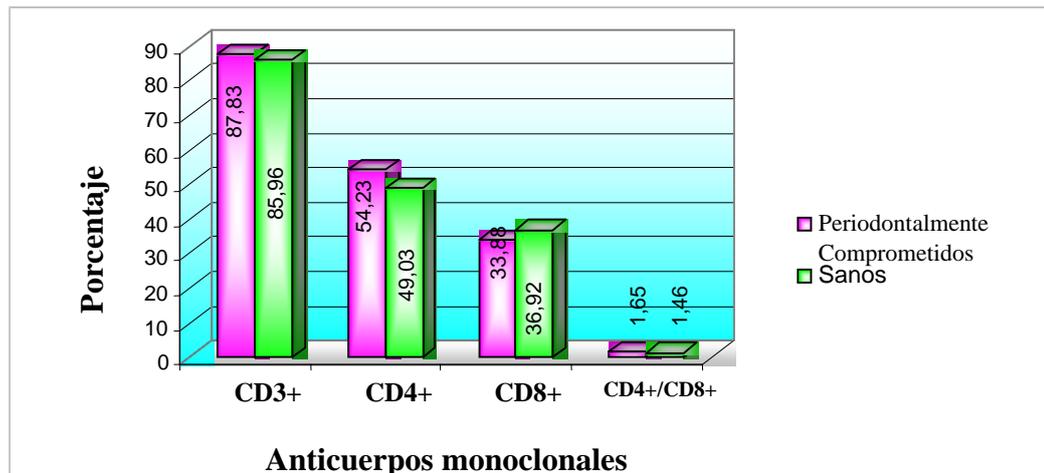
El cuadro N° 10 muestra los resultados obtenidos en linfocitos TCD4+/TCD8+, determinándose que el promedio obtenido en el grupo de pacientes enfermos, compuesto por 18 elementos muestrales; fue de 1.65% lo que determina que están dentro del rango en sangre periférica para los linfocitos TCD4+/TCD8+; ya que según Roitt (2000) éstos oscilan entre 1 – 2.1%; revelando el estado inmunitario de los pacientes en estudio.

Según el estudio realizado por China E y cols se puede observar que el índice CD4+/CD8+ se encuentra dentro de los valores normales, lo que concuerda con los resultados obtenidos en la investigación

**Cuadro N° 11** Valores promedio (Media ± Desviación estándar) de Linfocitos TCD3+, TCD4+, TCD8+ y TCD4+/TCD8+ en pacientes periodontalmente comprometidos y controles sanos. UNIMPA Facultad de Odontología Universidad de Carabobo 2005.

<b>Anticuerpos Monoclonales</b>	<b>Pacientes</b>	
	<b>Periodontalmente Comprometidos</b>	<b>Control Sano</b>
<b>CD3+</b>	87,83	85,96
<b>CD4+</b>	54,23	49,03
<b>CD8+</b>	33,88	36,92
<b>CD4+/CD8+</b>	1,65	1,46

**Fuente: Guía de Observación Millano-Palma 2005.**



**Gráfico N° 11** Valores promedio (Media  $\pm$  Desviación estándar) de Linfocitos TCD3+, TCD4+, TCD8+ y TCD4+/TCD8+ en pacientes periodontalmente comprometidos y controles sanos. UNIMPA Facultad de Odontología Universidad de Carabobo 2005.

**Fuente: Cuadro N° 10**

### **Análisis e Interpretación del Cuadro y Grafico N° 11**

El cuadro N° 11 muestra que las proporciones TCD3+ y TCD4+ se obtuvieron valores de 87.83% y 54.23% respectivamente en pacientes periodontalmente comprometidos los cuales se encuentran por encima de los resultados obtenidos en los pacientes sanos (TCD3+ 85.96% y TCD4+ 49.03%), a diferencia del TCD8+ donde el valor superior estuvo ubicado con 36.92% en el grupo sano con respecto a los periodontalmente comprometidos (33.88%). Mostrando una diferencia significativa en los índices TCD4+/TCD8+.

## CONCLUSIONES

A continuación se presentan las conclusiones que se obtuvieron de acuerdo a los objetivos planteados en la investigación:

En relación a las proporciones de linfocitos T (CD3+) totales en sangre periférica se concluye que:

- Hubo una diferencia significativa entre el grupo de pacientes periodontalmente comprometidos los cuales obtuvieron un promedio de linfocitos TCD3+ de 87.83% a diferencia de los pacientes tomados como controles sanos los cuales mostraron un promedio de un 85.96%, lo que ratifica el papel de los linfocitos T en la respuesta inmune celular.

- Al comparar los resultados obtenidos de linfocitos TCD3+ en pacientes periodontalmente comprometidos (87.83%) con los valores normales reportados por Roitt (2000) (VN 65-80%) se puede evidenciar que el valor promedio de linfocitos TCD3+ sobrepasa en sangre periférica el rango de los valores normales de los mismos, lo que revela que existe un estado inmunitario alterado en los pacientes con periodontitis crónica.

En relación a las subpoblaciones linfocitarias TCD4+ y TCD8+ en sangre periférica en los pacientes objetos de estudio se concluye:

- Existió una diferencia significativa entre los pacientes periodontalmente comprometidos en los cuales se evidencio un valor promedio de linfocitos TCD4+ de 54.23% en discrepancia con los resultados obtenidos en los pacientes seleccionados como control sano los cuales obtuvieron un resultado de 49.03%, puesto que los linfocitos TCD4+ son los encargados de estimular la respuesta inmunológica induciendo la estimulación de los linfocitos CD8+, lo que explica el nivel aumentado

de los valores, ya que en presencia de los agentes periodontopatógenos los mismos se ven estimulados y conducen a una respuesta inmunitaria celular.

- Al confrontar los resultados obtenidos de linfocitos TCD4+ en pacientes periodontalmente comprometidos (54.23%) con los valores normales reportados por Abbas (2002) (VN 50-60%), lo que evidencia que se encuentra dentro de los parámetros establecidos. lo que se puede traducir como el inicio de la respuesta inmunitaria celular.

- En relación a los linfocitos TCD8+ la diferencia existente no fue significativa puesto que el valor promedio fue de 33.88% en el grupo periodontalmente comprometido y de 36.97% en los pacientes sanos. Este resultado se puede explicar debido a que la población de linfocitos CD4+ se encontró dentro de los valores normales, y los mismos no estaban en la capacidad para producir las señales necesarias para la activación de los CD8+. Este resultado no concuerda con las expectativas propuestas en la investigación, por lo que también se presume que al momento de la selección de los pacientes sanos no se fue lo suficientemente estricto, por lo que se supone que los valores de TCD8+ en los pacientes sanos se encuentran aumentados porque los mismos presentaron con anterioridad o en el momento de la toma de la muestra un proceso infeccioso.

- Al comparar los valores obtenidos por los pacientes periodontalmente comprometidos (33.88%) con los valores normales establecidos por Abbas (2002) (VN 20-25%), se puede justificar que el valor promedio de linfocitos TCD8+ sobrepasa en sangre periférica el rango de los valores normales previamente establecidos, lo que revela que existe un proceso infeccioso en inicio que desencadenara una respuesta inmunitaria.

Al comparar las proporciones de linfocitos TCD4+ con respecto a los linfocitos TCD8+ en los pacientes periodontalmente comprometidos se concluye:

- La existencia de un aumento significativo en la población de linfocitos TCD4+ con respecto a los linfocitos TCD8+ de los pacientes periodontalmente comprometidos. Lo que se puede atribuir a la presencia de agentes periodontopatógenos que activan el proceso de respuesta inmunitaria mediada por las células CD4+, desencadenando una serie de mecanismos para la producción de anticuerpos.

- Al ser comparados los valores obtenidos en las subpoblaciones linfocitarias TCD4+ (54.23%) y TCD8+ (33.88%) con los valores normales previamente establecidos por Abbas (2002) (VN TCD4+ 50-60% y VN TCD8+ 20-25%), se pudo describir que los linfocitos TCD4+ se encuentran dentro de los valores normales y los TCD8+ se encuentran por encima de los valores establecido en un 8.88 % del limite superior normal.

Al analizar el índice TCD4+/TCD8+ en los pacientes objeto de estudios se pudo concluir:

- Existe una diferencia significativa entre los valores obtenidos en los pacientes periodontalmente comprometidos (1.65) con respecto a los pacientes del grupo control sano (1.47), lo que evidencia que el organismo al entrar en contacto con lo agentes patógenos, desencadena una reacción inmunitaria donde se observa un aumento en el índice que revela el estado inmunitario de los pacientes en estudio.

- Al comparar el índice TCD4+/TCD8+ de los pacientes periodontalmente comprometidos (1.65) y los valores normales establecidos por Roitt (2000) (VN 1-2.1), se puede decir que tanto el grupo periodontalmente comprometido como el control sano se encuentra dentro de los parámetros establecidos. Este resultado permite deducir que la enfermedad periodontal por si sola no es capaz de desencadenar una respuesta inmune celular apta para alterar el estado inmune de los pacientes, mas si puede evidenciar cambios en las poblaciones linfocitarias dado que el organismo responde a la presencia de los agentes periodontopatógenos activando una serie de mecanismos de defensa celular.

## RECOMENDACIONES

- Proseguir la línea de investigación en las diferentes patologías periodontales.
- Cuantificar los linfocitos B en pacientes con periodontitis crónica a nivel sistémico.
- Cuantificar los linfocitos T y B a nivel local y sistémico en pacientes con periodontitis crónica y agresiva para comparar los valores promedios de las poblaciones linfocitarias.
- Divulgar la investigación a través de ponencias nacionales e internacionales y publicaciones en revistas arbitradas.
- Promover las funciones del CDCH como institución que fomenta la investigación en los estudiantes de las diferentes carreras universitarias.
- Se recomienda estudiar las patologías periodontales utilizando otros anticuerpos monoclonales que nos puedan ayudar a entender mejor la patogénesis de la enfermedad periodontal.
- Se recomienda comparar las poblaciones linfocitarias en pacientes periodontalmente afectados sin compromisos sistémicos con pacientes periodontalmente afectados con compromiso sistémico.
- Replicar el experimento donde exista un mayor control en los criterios de selección de los pacientes sanos, para verificar el resultado no esperado.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.A.P. (1999). Annals of Periodontology. Internationl Workshop for a Classification of Periodontal. Diseases and Condition. Vol 4 N° 1

A.A.P (2000). Periodonto Sano. Documento en línea: <http://www.periodoncia.com.ar/links.html>., consulta 2003 julio

Abbas A; Lichtman A; Pober J; (1999) *Inmunología Celular y Molecular*. (3ª Edición) Editorial Interamericana McGraw-Hill. Madrid-España.

Abbas A; Lichtman A; Pober J; (2003) *Inmunología Celular y Molecular*. (4ta Edición) Editorial Interamericana McGraw-Hill. Madrid-España

Bascones M, Antonio (1992). *Diagnostico y Tratamiento de la enfermedad periodontal*. (3º Edición) Madrid – España.

Carranza, Newman y Takei (2003). *Periodontología Clínica*. (9º Edición). México: McGraw-Hill Interamericana.

China E, y cols. *Inmunidad celular periférica en pacientes con gingivitis crónica y periodontitis de aparición temprana y tardía*. *Medicentro* 2000 4(1) pp. 1-9.

Emingil G y cols. *Phenotypic and functional analysis of peripheral blood mononuclear cells in generalised aggressive and chronic periodontitis patients*. *J. Int. Acad. Periodontol*; 2001 oct, 3(4), pp. 87-94.

Enciclopedia Encarta 2001 [CD-ROM]. USA: Microsoft Corporation.

- Genco R; H. Goldman; W. Cohen. (1990). *Periodoncia*. 1ª Edición. México: Editorial Interamericana.
- Hernández, S. R., Fernández C., & Bastidas L., P. (1998). *Metodología de la investigación*. México: McGraw-Hill Interamericana.
- Hurlburt, R. T. (1998). *Comprehending behavioral statistics* (2a. Edición). Pacific Grove, CA: Brooks/Cole.
- Hurtado, I. L., & Toro G., J. (1997). *Paradigmas y métodos de investigación en tiempos de cambios*. Valencia, Venezuela: Editorial Episteme Consultores.
- Listgarten MA. (1996). *Pathogenesis of Periodontitis*. *Journal Periodontology*. Vol. 13 (pp.418).
- Jiménez, L;(2003). “condición Periodontal de los Pacientes de la Facultad de Odontología de la Universidad de Carabobo. 2002-2003”.
- Miller, A.J; H. Løe Etal. (1987). *Oral Health of United States Adults: The National Survey of Oral Health in U.S. Employed Adults and Seniors: 1985-86, Regional Findings* Bethesda: National Institutes of Health.
- Morles, V. (1977). *Planeamiento y análisis de investigaciones*. Caracas: Ediciones de la Facultad de Humanidades y Educación, Universidad Central de Venezuela.
- Morgado L. y Muñoz B. (1998). *Estudio Inmunohistoquímico de la Enfermedad Periodontal (Periodontitis)*. Proyecto de investigación de Pregrado no publicado. Universidad de Carabobo. Valencia.

- Muñoz José F, Rangel Antonio, Espinoza Gustavo, Cristancho Manuel y Hernández Manuel. (1991). *Inmunología Básica* (2° Edición). Mérida-Venezuela.
- Nagai A., Takahashi K., Sato N., Matsuo Y., Minowada, Kurihara H, y Murayama Y. (1993) *Abnormal Proportion of  $\gamma\delta$  T Cells in Peripheral Blood Is Frequently Detected in Patients in Periodontal Disease*. Journal Periodontology. Vol. 64 (pp.963-967).
- Ocampo A., y Rodríguez A. (2003) *Caracterización de los Linfocitos T gingivales y perfil de Citocinas en Pacientes con Periodontitis Agresiva*. Centro de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología, Pontificia Universidad Javeriana.
- Pérez, A.G. (2002). *Guía Metodológica para Anteproyectos de Investigación*. Caracas: FEDUPEL.
- Petit M.D, y cols. *Phenotypical and Functional analysis of T cells in periodontitis*. J Periodontal Res; 2001 Aug, 36 (4): p 214-20
- Ramfjord, S. and Ash M. (1989). *Periodontology and Periodontics Modern Theory and Practice*. St. Louis Tokyo Ishiyaku Euroamérica INC.
- Reinhardt, Richard A. D.D.S., M.S., Ronald W. Bolton, Ph.D., Thomas L. McDonald, Ph.D. *In Situ Lymphocyte subpopulations from active versus stable periodontal sites*. Journal Periodontology. 59:656 October, 1988.
- Roitt, I (2000). *Inmunología Fundamentos* (9 edición). Madrid España, Editorial Médica Panamericana.

Sabino, C. (1994). *Cómo hacer una tesis* (2a. Edición). Caracas: Editorial Pañazo.

Seguier S., Godeau G. y Brousse N. (2000) *Collagen Fibers and Inflammatory Cells in Healthy and Diseased Human Gingival Tissues: A Comparative and Quantitative Study by Immunohistochemistry and Automated Image Analysis*. Journal Periodontology. Vol 71 (pp.1079-1085).

Sigusch de T, G. Klinger, E. Glockmann, y Simont H. (1998) *Early-Onset and Adult Periodontitis Associated With Abnormal Cytokine Production by Activated T Lymphocytes*. Journal periodontology. Vol 69 (pp.1098-1104).

Takahashi K., Nagai A., Nobuhiko, y Murayama Y. (1995). *Studies on the Phenotypic and Functional Characterization of Peripheral Blood Lymphocytes From Patients UIT Early-Onset Periodontitis*. Journal Periodontology. Vol 66. (pp.391-396).

Documentos en línea disponibles en:

<http://www.citometriadeflujo.com> Fecha de consulta octubre2003

## **ANEXOS**



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO  
FACULTAD DE ODONTOLOGIA**

**Instrumento de recolección de datos:**

Nombre y apellido: \_\_\_\_\_ sexo: \_\_\_\_ edad: \_\_\_\_\_

Procedencia: \_\_\_\_\_ Tlf: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Paciente N°: \_\_\_\_\_ Sano: \_\_\_\_\_ Periodontitis crónica: \_\_\_\_\_

Linfocitos TCD3+:

Linfocitos TCD4+:

Linfocitos TCD8+

Proporción TCD4+/TCD8+

**FIRMA:**



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGIA**

**REGISTRO DE PACIENTES SANOS**

<b>N°</b>	<b>NOMBRE S Y APELLIDOS</b>	<b>LINFOCITOS ABSOLUTOS</b>	<b>% LINFOCITOS TCD3+</b>	<b>% LINFOCITOS TCD4+</b>	<b>% LINFOCITOS TCD8+</b>	<b>% INDICE TCD4+/TCD8+</b>
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						



UNIVERSIDAD DE CARABOBO  
FACULTAD DE ODONTOLOGIA

**REGISTRO DE PACIENTES CON PERIODONTITIS CRÓNICA.**

Nº	NOMBRE S Y APELLIDOS	LINFOCITOS ABSOLUTOS	% LINFOCITOS TCD3+	% LINFOCITOS TCD4+	% LINFOCITOS TCD8+	% INDICE TCD4+/TCD8+
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						



## *Consentimiento Informado*

Yo \_\_\_\_\_ portador (a) de la C.I. nº \_\_\_\_\_, he sido informado (a) acerca de la investigación titulada “Cuantificación de linfocitos T y sus subpoblaciones TCD4+ y TCD8+ en sangre periférica, en pacientes con periodontitis crónica moderada”, en donde el objetivo principal de dicha investigación es cuantificar las células de defensa del huésped en sangre periférica, y que para realizar dicho estudio solo se me someterá a la toma de una muestra de sangre, en donde no es necesario asistir al laboratorio en ayunas. Por esta razón acepto voluntariamente participar en dicha investigación.

Como constancia firmo el presente consentimiento informado, en la ciudad de Valencia a los \_\_\_\_\_ del mes de \_\_\_\_\_ de 2005.

Paciente : \_\_\_\_\_

Testigo: \_\_\_\_\_

C.I: \_\_\_\_\_

C.I: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Telefono: \_\_\_\_\_

Telefono: \_\_\_\_\_