

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, TIJUANA

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA SALUD



**DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN CELULAR EN MUESTRAS
DE SALIVA TOTAL HUMANA. POTENCIALES APLICACIONES
DIAGNÓSTICAS**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO EN MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

PRESENTA

EDGAR RAMIRO MÉNDEZ SÁNCHEZ

PRESIDENTE

DR. MIGUEL ANGEL CADENA ALCANTAR

SINODALES

DR. LUIS ALBERTO GAITAN CEPEDA

DRA. ANA GABRIELA CARRILLO VARGUEZ

TIJUANA BAJA CALIFORNIA, ENERO 201

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	2
1.1.	ANTECEDENTES	2
1.2.	MARCO TEÓRICO	4
1.3.	PROBLEMA	8
2.	JUSTIFICACIÓN	9
3.	OBJETIVO	9
3.1	GENERAL	9
3.2	ESPECÍFICOS	10
4.	HIPÓTESIS	10
4.1.	DE LA INVESTIGACIÓN	10
4.2.	NULA	10
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	11
5.1.	TIPO DE ESTUDIO	11
5.2.	UNIVERSO DE ESTUDIO	11
5.3.	CRITERIOS	11
5.4.	INCLUSIÓN	11
5.5.	EXCLUSIÓN	11
5.6.	OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES	12
5.6.1.	DEPENDIENTES	12
5.6.2.	INDEPENDIENTES	13
5.7.	MATERIALES	13
5.8.	MÉTODOS	14
5.8.1	INSTRUMENTO	17
5.8.1	PASOS PARA LA MEDICIÓN DE VARIABLES	21
6.	RESULTADOS	23
	RESULTADOS DE LAS ETAPAS PRELIMINARES	23
	__METODOLOGÍA (RESUMEN)	30
	RESULTADOS FINALES	31
	__EDAD Y SEXO	31
	__SALIVA	31
	__POBLACIONES CELULARES	33
6.1	TABLAS DE RESULTADOS	36
6.2	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	42
6.3	PRUEBAS ESTADÍSTICAS	42
6.4	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	42
7.	CONCLUSIONES	44
8.	BIBLIOGRAFÍA	46

RESUMEN

Invariablemente las enfermedades se diagnostican a través de los signos y síntomas, que el médico observa en el paciente o que este relata y, como complemento o como base del diagnóstico, los análisis de distintas muestras biológicas se tendrán que realizar para establecer el diagnóstico y la terapéutica más adecuada. La sangre ha sido históricamente el sustrato biológico más empleado en la medicina; no obstante, supone una serie de desafíos que enfrenta quien toma la muestra, quien la interpreta y el propio paciente que será analizado. En primer lugar, el método de extracción de sangre periférica es sin duda una de las mayores complicaciones, particularmente si el paciente es un niño, un paciente aprensivo o con trayectos venosos colapsados. La saliva ha venido tomando importancia como un elemento apto para análisis cualitativo de sus elementos; esto resulta fácil de entender si observamos el mecanismo de formación de la saliva. Sin embargo, poco se ha profundizado en los alcances que el contenido celular de la saliva total humana tiene, particularmente aquellas de origen hematopoyético.

Problema: los métodos de recolección de derivados hematopoyéticos y/o tejido hematopoyético resultan dolorosos, generan temor y se requiere de distintos grados de entrenamiento para su realización. **Objetivo general:** establecer un protocolo para recolección, manejo y análisis de muestras de saliva total humana que facilite su estudio a nivel celular y que permita estimar los alcances diagnósticos de estos elementos. Para ello, se seleccionaron individuos sanos, entre 18 y 30 años, sin toxicomanías o ingesta de medicamentos. **Resultados:** el contenido celular de la saliva fue determinado mediante citometría de flujo. Los resultados fueron en su mayor parte los esperados, de acuerdo a trabajos previos. Lo que permite colocar a la saliva total como un sustrato de relevancia para análisis de múltiples enfermedades, por ejemplo las hematológicas. Sin embargo, el hallazgo de otras células, como las plaquetas, en una proporción no descrita, abre la puerta a nuevas investigaciones sobre las mismas plaquetas y otros grupos celulares. La aplicación en hematología (detección de alteraciones citogenéticas) parece ser la conclusión más relevante del estudio.

DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN CELULAR EN MUESTRAS DE SALIVA TOTAL HUMANA. POTENCIALES APLICACIONES DIAGNÓSTICAS

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

Las enfermedades se han venido diagnosticado desde hace mucho tiempo a través de los signos y síntomas que se recaban del paciente, tanto en la historia clínica como durante el examen físico; además, por el análisis de distintas muestras biológicas como sangre, orina y, en un alto porcentaje de los casos, de muestras de tejidos en una biopsia. En general, las muestras obtenidas, se envían a un laboratorio para la determinación de múltiples y distintos parámetros como: iones, anticuerpos, hormonas, junto con una serie de biomarcadores específicos dependiendo de la enfermedad y, después de algún tiempo, el informe de laboratorio se devuelve al médico.^{1,2,3}

La saliva total humana (STH) se ha investigado cada vez más en los últimos años debido a que es un fluido corporal muy accesible, pero que sobre todo refleja varias condiciones fisiológicas y patológicas en el cuerpo humano.^{4,5} La mayoría de los elementos analizables que se encuentran en la sangre también se pueden medir en la saliva. Este hecho ha llevado a la utilización de elementos salivales (moléculas, iones) para el diagnóstico y/o seguimiento de las enfermedades locales y sistémicas.⁶ Mientras que los componentes solubles salivales (orgánicos e inorgánicos) han sido bien caracterizados, se ha prestado mucha menos atención a los componentes celulares de la saliva humana, llegando al punto de ser prácticamente ignorados.^{7,8} Hubo un interés particular por los leucocitos de la saliva en los estudios realizados durante los años de 1960 y la década de 1970.^{9,10,11,12,13,14} La mayoría de los leucocitos salivales resultaron ser células polimorfonucleares (PMN), neutrófilos que entran en la cavidad oral a través del surco gingival.^{15,16,17} Un interés mayor se centró en estudiar el número de las células salivales, polimorfonucleares particularmente; sin embargo, la investigación únicamente se desarrolló en el contexto de las enfermedades locales y no incorporó datos del papel de la

población de PMN en patologías sistémicas, sobre todo a finales de la década de 1980.^{18,19,20}

Si bien, la investigación sobre las poblaciones celulares en saliva han motivado un número relativamente considerable de artículos, el hecho de que se hayan realizado cuando las técnicas de conteo celular no habían alcanzado la refinación de los sistemas en la actualidad, hace suponer que los alcances de dicho análisis no se han agotado; más aún, las posibilidades de aplicar la información de estas poblaciones celulares en el entorno de enfermedades sistémicas son todavía un campo sin explorar ampliamente.²¹

La STH no sólo contiene elementos provenientes de glándulas salivales, sino también de otros fluidos, tal es el caso del líquido crevicular procedente de la microcirculación cercana a la encía libre/marginal; y además, células de la mucosa orofaríngea y mucosa oral propiamente (células epiteliales) que junto con células como eritrocitos y leucocitos forman un cuerpo celular con información valiosa para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de diversas patologías.^{22,23}

Varios fluidos corporales, entre los que se pueden contar líquido cefalorraquídeo, orina y semen, han sido sometidos a análisis por citometría de flujo, que es capaz de una detección rápida y sensible, tanto de células como de otras moléculas asociadas a estas; así como la discriminación precisa de las células sobre la base de sus propiedades físicas o químicas.^{24,25} Mientras que en estudios anteriores se habían enfocado en el uso de la microscopía para contar y diferenciar células salivales, algunos de los estudios más recientes han preferido una técnica más rápida, y probablemente más exacta, como es la de la citometría de flujo para caracterizar células, particularmente PMN, en muestras de STH provenientes de enjuagues bucales o fluido del surco gingival.^{26,27}

Aps *et al.* evaluaron el uso de un analizador de orina automatizado basado en citometría de flujo para la cuantificación de los elementos celulares de saliva total recolectada mediante la estimulación con parafina. Se observó que el número de leucocitos salivales se incrementaba en individuos con algún proceso inflamatorio local como el caso de la gingivitis.²⁸ Sin embargo, el método que usaron no permitía una determinación más específica de subconjuntos de las poblaciones celulares, es decir, no permitía discriminar entre leucocitos. En otros estudios, por ejemplo, se han estudiado leucocitos totales y subconjuntos de linfocitos por citometría de flujo en STH en condiciones asociadas a estrés. En la mayoría de estos casos se recurrió a muestras de saliva no estimulada, por lo que no se considera estrictamente saliva total, y se estudiaron las variantes en respuesta a estímulos de estrés psicológico principalmente.^{29,30,31}

Los linfocitos salivales también han sido analizados en el contexto de las enfermedades autoinmunes, usando citometría de flujo, tal es el caso de pacientes con síndrome de Sjögren, en donde la distinción de las subpoblaciones de linfocitos podría ser de utilidad en el seguimiento de la enfermedad; a pesar de ello, aún no se tienen datos sobre las características de las poblaciones celulares en saliva total para estados autoinmunes.^{32,33} Estos dos últimos estudios mencionados se han centrado en la composición y cambios de la saliva más que en las variables que los leucocitos de la STH pudieran tener. Aunado a esto, los estudios citados tampoco presentaron parámetros de validación de los métodos que se utilizaron en las investigaciones.³²

Probablemente, y debido al hecho de que la saliva es una muestra que está llena de *debris* de varias fuentes, la discriminación de subpoblaciones de leucocitos sea difícil en muestras de saliva total humana recolectada a través de la estimulación con parafina. Cada paso, desde la toma de muestra hasta el análisis final, debe ser descrito cuidadosamente para ser capaz de reproducir el método y confiable en la determinación de subconjuntos de leucocitos en la STH por citometría de flujo.

1.2. Marco Teórico

Las muestras de la región oral y faríngea se toman con poca frecuencia y, como sucede en la mayoría de los casos, parece estar restringida al diagnóstico y tratamiento de procesos infecciosos locales; por ejemplo, establecer la presencia de estreptococo pyogenes en una infección faríngea. Si bien, la toma de biopsias de la mucosa oral se realiza con mayor frecuencia hoy en día, esta tendencia se inclina únicamente a descartar o confirmar cáncer oral. Sin embargo, ha habido un interés creciente en el uso de saliva y otras muestras orales para diagnóstico de enfermedades tanto bucales como sistémicas. La razón es obvia, si es posible obtener información similar o idéntica a la de una muestra de sangre; si además es fácil de obtener y no requiere procedimientos invasivos, las ventajas sobre la toma de sangre son enormes. Esto es particularmente importante en una serie de poblaciones y situaciones, que incluyen el manejo de pacientes pediátricos y geriátricos, o cuando el acceso a la atención médica es limitada. Un estudio reciente informó que los dentistas creen que la detección de las condiciones médicas es importante y que están dispuestos a participar cuando la muestra a estudiar es la saliva, en comparación con una punción en el dedo u otro tipo de abordaje al paciente.^{34,35,36,37}

La saliva es un líquido hipotónico compuesto principalmente de agua, electrolitos, moléculas inorgánicas e orgánicas (por ejemplo, aminoácidos, proteínas y lípidos),

además de células, entre ellas, leucocitos. El agua contenida en la saliva se obtiene en gran parte del lecho capilar a través de difusión intracelular, canales de acuaporinas y rutas extracelulares. Las pequeñas moléculas neutras del suero entran por difusión pasiva, provenientes de los numerosos capilares que rodean a las glándulas salivales. También se han encontrado poblaciones celulares, principalmente leucocitos, destacando neutrófilos y linfocitos. Debido a que los componentes del suero de la saliva derivan principalmente de la vasculatura local que se origina de la carótida; la saliva es una importante fuente de moléculas, encontrándose la mayoría en la circulación sistémica de forma equiparable. En este sentido, la presencia de material celular y, por ende de material genético, podría ser empleada para la detección de alteraciones citogenéticas. Por otro lado, la facilidad de algunos sistemas de cuantificación celular (citómetro de flujo) para determinar otras moléculas presentes en los fluidos analizados, permitiría ampliar el uso diagnóstico de la saliva.^{38,39,40}

Existen diversos caminos por los que algunos elementos que no son constituyentes habituales de la saliva (saliva primaria preferentemente) pueden llegar a ella, a través de rutas intra y extracelulares. Las vías intracelulares más habituales son la difusión pasiva y el transporte activo, mientras que la ultrafiltración a través de las estrechas uniones celulares, es el mecanismo extracelular más conocido. Algunas moléculas pueden llegar a la saliva desde el suero atravesando las barreras de los capilares, los espacios intersticiales, y las membranas de las células acinares y ductales hasta llegar a la luz de los túbulos excretores, así mismo los componentes del suero también pueden llegar a la saliva a través del fluido crevicular, gracias a esta posibilidad, se abre una perspectiva para su aplicación en el diagnóstico de determinadas patologías, tanto locales como sistémicas.⁴¹

La muestra de saliva ha probado ser de utilidad en el campo del diagnóstico; su aplicación en el pronóstico del riesgo de padecer caries es bien conocida, y especialmente en la monitorización de los tratamientos de control químico de la enfermedad. Gracias a la posibilidad de detectar la presencia de *S. mutans* y *Lactobacillus spp*, y a la posibilidad de determinar la presencia de ácido láctico, causante de la desmineralización subsuperficial que da origen al inicio de la lesión de caries, es posible establecer esquemas terapéuticos y correctivos en los individuos que son analizados a través de la saliva.⁴² Otras enfermedades infecciosas que afectan a la cavidad oral como las candidiasis pueden diagnosticarse por la presencia de *Candida spp* en la saliva. También la presencia de bacterias periodontopatógenas puede diagnosticarse por este medio, esto es importante,

no solo por la posibilidad de identificar la microflora más específicamente periodontopatógena, sino también por el papel potencial que juegan algunas de estas bacterias en el incremento del riesgo de enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, nacimientos pretérmino y niños de bajo peso al nacer.⁴³

Incluso, enfermedades hereditarias como la fibrosis quística, considerada como una exocrinopatía, caracterizada por una alteración en el transporte de electrolitos en las células epiteliales y la secreción de un moco viscoso por parte de las glándulas y los epitelios, asocia un aumento en el contenido de sodio, cloro, calcio, fosfato, lípidos y proteínas en la saliva de las glándulas submaxilares; igualmente, se encuentra en la saliva de estos pacientes un factor de crecimiento epidérmico con actividad biológica pobre, con respecto al de las personas sanas y una elevación de la prostaglandina E2.⁴⁴

Para el diagnóstico de la enfermedad celiaca, por ejemplo, la detección en saliva de IgA y anticuerpos antigliadina muestra una alta especificidad y baja sensibilidad, al contrario de lo que sucede con las determinaciones en suero que son altamente sensibles y menos específicas. En la deficiencia de 21-hidroxilasa se ha encontrado una alta correlación en los niveles salivales de 17-hidroxiprogesterona con los del suero. En el síndrome de Sjögren, se acepta como procedimiento diagnóstico la biopsia de las glándulas salivales menores, en la que se encuentra un infiltrado inflamatorio predominante de linfocitos CD4, junto a una reducción del flujo en reposo y estimulado, cuantitativamente se encuentra un aumento de la concentración de sodio, cloro, Ig A, Ig G, lactoferrina, albúmina, β 2 microglobulina, cistatina C y S, lípidos y mediadores de la inflamación como la prostaglandina E2, el tromboxano B2 y la interleucina-6; también pueden detectarse en la saliva autoanticuerpos frente a IgA, Ig G e IgM.^{31,45}

En algunas neoplasias malignas, existen marcadores que pueden ser detectados en la saliva como la presencia de anticuerpos frente a la proteína p53 en pacientes con carcinoma de células planas, o niveles elevados de defensina-1 positivamente correlacionados con los niveles en el suero. La presencia del marcador tumoral c-erbB-2 en la saliva y el suero de mujeres con cáncer de mama, frente a su ausencia en mujeres sanas es un elemento prometedor para el diagnóstico precoz de esta enfermedad. En el cáncer de ovario también puede detectarse en la saliva el marcador CA125 con una mayor especificidad y menor sensibilidad que sus valores en el suero.^{33,46}

La presencia de *Helicobacter pylori* en la saliva evidenciada mediante PCR, presenta una alta sensibilidad, los estudios demuestran que la vía de transmisión oral-oral de esta bacteria puede ser muy importante en los países desarrollados. La presencia de

anticuerpos frente a otros agentes infecciosos como la *Borrelia burgdorferi*, *Shigella* o *Tenia Solium* pueden ser detectados a través de la saliva.^{47,48,49}

Con respecto a algunas enfermedades víricas, hay que señalar que la detección en la saliva del antígeno de la hepatitis A y del antígeno de superficie de la hepatitis B, se ha utilizado en estudios epidemiológicos, así como la presencia de anticuerpos del tipo IgM e IgG frente a ambos tipos de hepatitis. Existen medios comercializados para la determinación de anticuerpos frente al virus de la hepatitis B y C con una sensibilidad y especificidad de prácticamente el 100%. La saliva también ha sido utilizada para la detección de anticuerpos frente al virus de la rubéola, parotiditis y sarampión. En los recién nacidos la presencia de IgA es un excelente marcador frente a la infección por rotavirus. Algunas investigaciones sugieren que la reactivación de las infecciones por virus del herpes tipo-1, está relacionada con la patogenia de la parálisis de Bell y que la detección mediante PCR del virus en saliva sería un método adecuado para la detección precoz de las reactivaciones de esta enfermedad. La presencia de anticuerpos frente al VIH, es casi tan precisa en la saliva como en el suero y aplicable tanto en estudios clínicos como epidemiológicos, la presencia de anticuerpos frente al virus, y de componentes virales en la saliva pueden ayudar en el diagnóstico de la infección aguda, de la infección congénita y de las reactivaciones de la infección.^{50,51}

La determinación de algunas drogas en saliva va a depender de su concentración en sangre, de su capacidad de difusión, liposolubilidad y tamaño de molécula. Se ha utilizado la saliva para monitorizar los niveles de litio, carbamacepina, barbitúricos, benzodiazepinas, fenitoína, teofilina y ciclosporina. Así mismo, la concentración de etanol en la saliva guarda una alta correlación con los niveles en suero. La presencia de tiocianato en la saliva es un excelente indicador de la condición de fumador activo o pasivo. Otras drogas como la cocaína o los opiáceos también pueden detectarse en la saliva.⁵²

La presencia de algunas hormonas como el cortisol, la aldosterona, la testosterona, el estradiol o la insulina, pueden detectarse en la saliva con una alta correlación con sus concentraciones en suero, en general las hormonas de menor peso molecular y liposolubles son las que se van a poder detectar en la saliva con mayor fiabilidad, las cuales van a llegar por ultrafiltración o por difusión pasiva, mientras que las unidas a proteínas no van a poder encontrarse ya que el transporte activo hacia la saliva no existe.^{53,54}

Así pues, el uso de la saliva como alternativa para el diagnóstico o como elemento para monitorizar la evolución de determinadas enfermedades, incluso la dosificación de determinados medicamentos, representa un prometedor horizonte; incrementándose su atractivo para el diagnóstico mediante la comercialización de test de uso sencillo. Por otro lado la accesibilidad y la ausencia de métodos cruentos para obtener la muestra son otras de las ventajas que ofrece la saliva como instrumento diagnóstico.^{55,56}

Si aunado a estas ventajas se toma en cuenta que la facilidad de obtener material genético, características morfológicas y detalles celulares equiparables a los de la sangre, el atractivo es aún mayor.

1.3. Problema

El diagnóstico de cualquier enfermedad, sea local o sistémica, ocupa del profesional a cargo una extensa investigación de los detalles clínicos y particulares del paciente. Además de una batería de pruebas de laboratorio, en ocasiones extensa y costosa, el clínico debe obtener la mayor parte de la información a través de la anamnesis, por lo que dicha información puede estar sesgada o ser parcial en algún modo. Son pues los estudios de laboratorio un recurso indispensable en la práctica clínica diaria. El tiempo que se invierte en cada uno de estos puede ser crucial en la evolución de la situación del paciente, por lo que el empleo de estudios más prácticos y económicos reditúa inevitablemente en una mejor atención del paciente, particularizando las necesidades de este. La saliva como alternativa de muestra biológica, tanto para el diagnóstico de enfermedades sistémicas, monitorizar la evolución de determinadas patologías y/o la dosificación de medicamentos y drogas, proporciona un horizonte prometedor en el que sin duda se requieren estudios amplios sobre fisiología, bioquímica, inmunología y patología de las glándulas salivales y su secreción. La accesibilidad en la obtención de la muestra y, sobre todo, la correlación entre múltiples parámetros en el suero y en la saliva son algunas de las ventajas que ofrece como instrumento diagnóstico. Sin embargo, las poblaciones y subpoblaciones celulares en la saliva no deben ser olvidadas pues representan un acervo de información valiosísima, que va desde la biológica hasta genética, y que potencialmente tiene múltiples aplicaciones para el diagnóstico. Si bien, el análisis de la saliva a través de su población celular ha sido un aspecto abordado ya en el

pasado, es poco valorado hoy en día. Pues se tiene la idea de que únicamente se pueden evaluar las características celulares cuantitativamente.

2. JUSTIFICACIÓN

La saliva es un líquido hipotónico compuesto principalmente de agua, electrolitos, moléculas inorgánicas e orgánicas (por ejemplo, aminoácidos, proteínas y lípidos), además de células, entre ellas, leucocitos. El agua contenida en la saliva se obtiene en gran parte del lecho capilar, derivado directamente de la circulación carotídea, a través de difusión intracelular, canales de acuaporinas y rutas extracelulares. Las pequeñas moléculas neutras del suero entran por difusión pasiva, provenientes de los numerosos capilares que rodean a las glándulas salivales. También se han encontrado poblaciones celulares, principalmente leucocitos, destacando neutrófilos y linfocitos. Debido a que los componentes del suero de la saliva, y muy probablemente la población celular también, derivan principalmente de la vasculatura local que se origina de la carótida; la saliva es una importante fuente de moléculas y células, encontrándose la mayoría en la circulación sistémica de forma equiparable. Las poblaciones celulares parecen llegar a la cavidad bucal por las mismas rutas extracelulares de algunas moléculas y el líquido crevicular.

La saliva total humana, entonces, es un material biológico potencialmente útil para diagnóstico; en la que se encuentran diferentes elementos tanto orgánicos, inorgánicos y celulares que son resultado de regulaciones sistémicas, pudiendo emplearse para establecer valores séricos en condiciones de normalidad y, por analogía, en condiciones mórbidas. Además es una secreción exocrina de fácil recolección, sobre todo para pacientes poco tolerantes al dolor, en niños y en individuos en quienes procedimientos invasivos de toma de muestra, particularmente sangre, resultan complicados.

3. OBJETIVO

3.1 General

Establecer un protocolo para recolección, manejo y análisis de muestras de saliva total humana que facilite su estudio a nivel celular (cuantificación y determinación de poblaciones y subpoblaciones celulares) por medio de un analizador hematológico

multiparamétrico automatizado; y que permita estimar los alcances diagnósticos de estos elementos en las muestras de saliva total humana.

3.2 Específicos

- Validar un protocolo para el manejo de muestras de saliva total humana estimulada con parafina.
- Estimar la analogía cualitativa y cuantitativa entre poblaciones celulares de sangre periférica y saliva total humana.
- Establecer las características de la saliva total humana estimulada para evaluación por citometría de flujo en un analizador hematológico multiparamétrico automatizado.
- Estimar el volumen de fluido salival y su porcentaje celular en una población sana.
- Cuantificar la población celular en una muestra de saliva estimulada en una población sana.
- Estimar la viabilidad de la saliva como material biológico para diagnóstico de alteraciones sistémicas y/o locales basadas en las subpoblaciones celulares.

4. HIPÓTESIS

4.1. De la investigación

La saliva es un fluido útil como muestra biológica en la determinación de parámetros fisiológicos normales que incluyan la valoración cuantitativa y cualitativa de las poblaciones celulares presentes en ella; y por ende, de las alteraciones sistémicas y/o locales que incluyan modificaciones cuantitativas y cualitativas en estas poblaciones celulares.

4.2. Nula

La saliva no es un fluido útil como muestra biológica en la determinación de parámetros fisiológicos normales que incluyan la valoración cuantitativa y cualitativa de las poblaciones celulares presentes en ella; y por ende, de las alteraciones sistémicas y/o locales que incluyan modificaciones cuantitativas y cualitativas en estas poblaciones celulares.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Tipo de Estudio

Estudio descriptivo comparativo transversal

5.2. Universo de Estudio

Individuos sanos entre 18 y 30 años que asistan, como estudiantes de la carrera de Cirujano Dentista, al Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Baja California y que acepten participar en el estudio.

5.3. Criterios

Se especifican a continuación los parámetros de inclusión y exclusión para la muestra del estudio.

5.4. Inclusión

- Hombres y mujeres que sean mayores de edad (>18 años) al día de la toma de muestra
- Hombres y mujeres sanos, sin diagnóstico confirmado de enfermedad sistémica
- Hombres y mujeres que no estén bajo tratamiento farmacológico

5.5. Exclusión

- Hombres y mujeres, menores de edad (<18 años) al día de la toma de muestra y/o que no sean sujetos con plena voluntad para tomar decisiones
- Hombres y mujeres, con sospecha o diagnóstico confirmado de enfermedad sistémica
- Hombres y mujeres que estén bajo tratamiento farmacológico
- Mujeres embarazadas y/o con tratamientos hormonales

5.6. Operacionalización de las variables

5.6.1. Dependientes

Nombre	Definición conceptual	Definición operacional	Escala de medición	Fuente de información
Nutrófilos	Célula hematopoyética de estirpe mieloide, bifásica para tinciones ácido básicas	Granulocito neutrófilo	Cuantitativa discreta (0.00 10 ⁹ /L)	Citometría de flujo
Eosinófilos	Célula hematopoyética de estirpe mieloide, afin a colorantes ácidos	Granulocito eosinófilo	Cuantitativa discreta (0.00 10 ⁹ /L)	Citometría de flujo
Basófilos	Célula hematopoyética de estirpe mieloide, afin a colorantes básicos	Granulocito basófilo	Cuantitativa discreta (0.00 10 ⁹ /L)	Citometría de flujo
Monocitos	Fase inmadura de macrófagos e histiocitos tisulares	Agranulocito monocítico	Cuantitativa discreta (0.00 10 ⁹ /L)	Citometría de flujo
Linfocitos	Células responsables de la inmunidad humoral y celular	Agranulocito linfocítico	Cuantitativa discreta (0.00 10 ⁹ /L)	Citometría de flujo
Plaquetas	Célula con funciones críticas en la hemostasia	Trombocito	Cuantitativa discreta (0.00 10 ⁹ /L)	Citometría de flujo
Células epiteliales	Célula de la mucosa oral (epitelio plano estratificado)	Queratinocito	Cuantitativa discreta (0.00 10 ⁹ /L)	Citometría de flujo

5.6.2. Independientes

Nombre	Definición conceptual	Definición operacional	Escala de medición	Fuente de información
Edad	Tiempo transcurrido desde el nacimiento hasta el día actual	Años de vida cumplidos	Cuantitativa discreta (#)	Registro
Género	Genotipo que determina el fenotipo masculino o femenino	Caracteres sexuales secundarios	Nominal 1= femenino 2= masculino	Registro

5.7. Materiales

- Cédula de registro
- Formato de consentimiento informado
- Lápices, bolígrafos
- Tubos de plástico BD Vacutainer® K2E/K2 EDTA 7.2 mg por aspersion
- Tubos BD Microtainer (sin aditivo)
- Equipo para toma de muestra sanguínea (°/ Vacutainer®)
- Aguja para Vacutainer® 22G/0.7 mm (1"/25 mm de longitud)
- Embudos de plástico de 4 cm de diámetro
- Gradillas para tubos de ensayo
- Parafilm®
- Guantes
- Cubrebocas
- Gasas y algodón
- Campos desechables
- Analizador hematológico multiparamétrico automatizado CELL-DYN RUBY®
- Impresora
- Engrapadora
- Microscopio triocluar Zeiss (modelo Primo Star)
- Microscopio con cámara digital Fisher Scientific
- Cámara digital
- Portaobjetos esmerilados 25x75x1 mm
- Cubreobjetos No.1

- Xilol grado histológico
- Alcohol etílico absoluto
- Alcohol etílico 96°
- Tinción de hematoxilina y eosina
- Tinción de Papanicolau
- Buffer de fosfatos
- Gasas y algodón
- Laptop modelo MacbookAir
- Programa de análisis estadísticos SPSS

5.8. Métodos

Fases preliminares del estudio

Primera fase (prueba piloto)

Para facilitar la lectura por parte del sistema automatizado y favorecer la utilidad de sus lecturas multiparamétricas; se realizarán previamente, en un grupo de 10 individuos con las mismas características descritas en los criterios de inclusión, las pruebas necesarias que permitan establecer las mejores condiciones de dilución y concentración, según se valorará, para el análisis por citometría de flujo de muestras de saliva total humana.

Se evaluarán las siguientes cantidades de saliva total humana, tomando en cuenta la proporción de células contenidas en cada una, así como la factibilidad del sistema para su detección:

- 1 ml vs %
- 3 ml vs %
- 5 ml vs %

Una vez establecidas las condiciones previas, y como parte de la misma primera fase, se procederá a evaluar los siguientes parámetros en saliva total humana con el fin de protocolizar la técnica de recolección, manejo y análisis cuantitativo y cualitativo.

Con la proporción de volumen necesario para la detección de poblaciones celulares a través del citómetro de flujo, se redactará el protocolo más conveniente, con el fin de llevarlo a cabo en los individuos de la muestra para este estudio.

1. Método de recolección.

- a) Se recolectarán las muestras de saliva empleando la metodología de estimulación salival a través de la masticación de parafina u otro elemento.
- b) El espacio de tiempo necesario para obtener la cantidad de volumen necesario de saliva total, previamente establecido, se espera sea variable.
- c) La saliva se recolectará en tubos de plástico BD Vacutainer® K₂E/K₂ EDTA 7.2 mg por aspersion y BD Microtainer®

2. Análisis cuantitativo y cualitativo

- a) Demostración morfológica de la presencia de células en saliva recolectada.
 1. Las muestras obtenidas se centrifugarán a 300 RPM
 2. Se recolectará la interfase (capa) donde se deposite la mayor parte de los leucocitos
 3. Se realizarán extendidos celulares, mismos que serán teñidos tanto con técnicas ácido básicas (tinción de hematoxilina y eosina) y técnica de Papanicolau
- b) Análisis cuantitativo.
 1. Se realizará conteo diferencial manual en la cámara de Neubauer
 2. Se realizará conteo automatizado con el analizador hematológico multiparamétrico automatizado CELL-DYN RUBY®

Segunda fase

Se recolectarán las muestras de saliva en la población de estudio según protocolo que se determinó anteriormente.

Se analizarán, comparativamente, con muestras de sangre periférica de los mismos individuos con la finalidad de establecer, si la hubiera, la proporcionalidad entre estos dos fluidos biológicos.

1. Procedimiento para toma de muestra de saliva total

- Se explica a los voluntarios que no consuman alimentos y/o bebidas (carbonatadas, saborizadas, etc., incluso agua si es posible); que no cepillen su boca usando cualquier tipo de dentífrico
- Se pide a cada voluntario que comience a masticar un pedazo de Parafilm® el cual permanecerá en la boca mientras se alcanza el volumen de saliva determinado.

- Se indica que en lapsos de 1 min, en promedio (esto en caso de que voluntario decida hacer así, aunque esto puede variar de individuo a individuo), se vierta la saliva acumulada en los tubos de plástico BD Vacutainer® K2E/K2 EDTA 7.2 mg por aspersion.
- Cuando se ha obtenido el volumen deseado, se indica al voluntario desechar el Parafilm® y limpiar su boca de residuos, del propio material y/o escurrimientos de saliva.

Para la toma de muestra sanguínea se seguirán los lineamientos basados en las normas del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), en la literatura sobre el tema, así como en la experiencia de los autores.

2. Procedimiento para toma de muestra sanguínea

- Colocar el brazo del paciente, inclinándolo hacia abajo, desde la altura del hombro.
- Colocar el torniquete con el lazo hacia arriba para evitar la contaminación de la zona de punción.
- Se usa el torniquete para la selección preliminar de la vena, aplicándolo durante un breve momento, pidiendo al voluntario que cierre la mano. Localizar la vena y aflojar el torniquete enseguida.
- Aplicar el torniquete de 7.5 a 10 cm por encima de la zona de la punción para evitar la contaminación de la zona.
- Al aplicar el torniquete, se pide al voluntario que cierre la mano para hacer visible la vena. El torniquete no se usará de forma continua por más de 1 minuto.
- Se realiza limpieza de la zona seleccionada con alcohol isopropílico 70% o alcohol etílico, povidona yodada 1 a 10% o gluconato de clorhexidina.
- Se introduce la aguja 22G/.0.7 mm de diámetro (1"/25 mm de longitud) en un ángulo aproximado de 15°, con el bisel de la cánula hacia arriba.
- Una vez que se accede a la vena se acopla el tubo plástico BD Vacutainer® K2E/K2 EDTA 7.2 mg por aspersion y se llena hasta el volumen de y capacidad indicada en el mismo tubo (4 ml).

Nota. Para cuestiones de homogeneidad se verificará que el volumen sea el indicado antes de extraer la aguja.

- Se limpia la zona de la punción y se le pide al voluntario que presione un algodón impregnado con alcohol por un minuto.

3. Procedimiento para el transporte de las muestras

- Se acomodarán las muestras de los tubos (identificados y etiquetados), tanto para saliva total como para sangre venosa, en gradillas que se movilizarán en una hielera.

NOTA. No se adicionará hielo o algún otro elemento que enfríe el interior de la hielera. Esta se empleará como medio de transporte y con la única finalidad de mantener una temperatura constante.

- Se prevé que el tiempo de transporte y el inicio del análisis por citometría de flujo no exceda los 45 min.

4. Procedimiento para el análisis de las muestras de saliva y sangre

- Se colocan los tubos BD Microtainer (sin aditivo) de 500 µL que contienen la saliva en el aparato CELL-DYN RUBY® a través su sistema de recolección. Cada tubo BD Microtainer es identificado en el software del sistema para posteriormente imprimir las lecturas de cada tubo.
- Los tubos de plástico BD Vacutainer® K2E/K2 EDTA 7.2 mg por aspersion que contienen las muestras de sangre son colocados en las rejillas especiales y acondicionadas del aparato CELL-DYN RUBY® para iniciar la recolección de la muestra que leerá el sistema. Esta se realiza de forma automática, pudiendo analizar 10 tubos por rejilla. Al finalizar cada grupo de 10 tubos por rejilla, se registran los datos en el software del sistema para identificar cada muestra.
- Al finalizar la lectura de las muestras por parte del sistema CELL-DYN RUBY® se agrupan (seleccionan) las lecturas y se envían para impresión.

5.8.1 Instrumento

El CELL-DYN RUBY® es un analizador hematológico multiparamétrico automatizado, diseñado para el diagnóstico *in vitro* en los laboratorios clínicos. Cuenta con las características que se enlistan a continuación.

1. Parámetros leucocitarios

- **WBC:** Recuento de leucocitos

- **NEU**: Recuento absoluto de neutrófilos
- **%N**: Porcentaje de neutrófilos del recuento WBC
- **LYM**: Recuento absoluto de linfocitos
- **%L**: Porcentaje de linfocitos del recuento WBC
- **MONO**: Recuento absoluto de monocitos
- **%M**: Porcentaje de monocitos del recuento WBC
- **EOS**: Recuento absoluto de eosinófilos
- **%E**: Porcentaje de eosinófilos del recuento WBC
- **BASO**: Recuento absoluto de basófilos
- **%B**: Porcentaje de basófilos del recuento WBC

2. Parámetros plaquetarios

- **PLT** — Recuento de plaquetas
- **MPV** — Volumen plaquetario medio

3. Parámetros eritrocitarios

- **RBC** — Recuento de eritrocitos
- **HCT** — Hematocrito
- **MCV** — Volumen corpuscular medio
- **RDW** — Amplitud de la distribución del tamaño de los eritrocitos
- **%R** — Porcentaje de reticulocitos
- **RETC** — Recuento absoluto de reticulocitos

4. Parámetros de hemoglobina

- **HGB** — Dosaje de hemoglobina
- **MCH** — Hemoglobina corpuscular media
- **MCHC** — Concentración de hemoglobina corpuscular media

La metodología del sistema CELL DYN RUBY™ utiliza dos canales de medición independientes:

- El canal de hemoglobina para la determinación de HGB: con un diodo emisor de luz como fuente luminosa, con una longitud de onda de 555 nm. Un detector fotométrico mide la luz transmitida.

- El canal óptico para el recuento glóbulos blancos, glóbulos rojos y plaquetas.

El conjunto óptico contiene los componentes que conforman el citómetro de flujo. El objetivo fundamental del conjunto óptico es detectar el esparcimiento de luz a causa de las células a su paso por la celda de flujo. La fuente de luz es un rayo láser de helio-neón polarizado verticalmente a 10 mW con una longitud de onda de 632,8 nm. El rayo atraviesa una lente cilíndrica que cambia la forma de circular a elíptica. Luego, el rayo es dirigido a través de una ranura de 125 μm , que obtura los bordes externos más débiles. Este proceso genera un rayo intenso uniforme, con un ancho de aproximadamente 80 μm , el cual permite que el flujo celular quede expuesto a la misma intensidad luminosa aunque la posición oscile en la celda de flujo. Una lente centra el haz de láser enfocado sobre la celda de flujo de cuarzo. En el citómetro de flujo, la suspensión celular es bombeada desde la cámara de mezcla, a través de un conducto de muestra, hasta una cámara de flujo especial con una pequeña abertura en su extremo. Seguidamente, se inyecta la suspensión sobre una corriente de líquido en movimiento rápido y exento de células (reactivo envolvente). Como los dos líquidos viajan a una velocidad diferente, no se mezclan entre sí. Esta geometría especial de la celda de flujo y la velocidad de flujo del reactivo envolvente, obliga a que las células se dispongan en una sola hilera. Este proceso se denomina enfoque hidrodinámico.

El aparato mide entonces, ambos tipos de dispersión de luz en el ángulo de avance (de 1° a 3° , conocida como 0° , y 7° a 11° , conocida como 10° o ángulo estrecho). Además, ambos tipos de dispersión ortogonal (lateral) (70° a 110° , conocida como 90° , y 70° a 110° despolarizada, conocida como 90°D). Esta tecnología se denomina MAPSSTM (del inglés, Multiangle Polarized Scattergram Separation y que significa separación mediante dispersión lumínica polarizada en múltiples ángulos).

Para clasificar las subpoblaciones leucocitarias y obtener las alertas morfológicas se pueden combinar estas cuatro mediciones de forma diversa. Los diferentes detectores podrán analizar características especiales de cada elemento

- 0° - Tamaño
- 10° - Complejidad
- 90° - Lobularidad
- 90°D (Despolarizado) – Granularidad

Una vez obtenidos los datos de las diferentes diluciones procesadas, el software realiza el análisis de los mismos en una serie de pasos, a saber:

I. Análisis de la serie blanca

- Separación de las células mononucleares – polimorfonucleares
- Separación de neutrófilos-eosinófilos
- Separación de las células mononucleares en linfocitos, monocitos y basófilos

Por último, el analizador examina el área bajo la nube linfocitaria y por encima del umbral. Toda partícula comprendida en esta zona es separada de los linfocitos mediante un umbral dinámico. En esta región pueden aparecer los siguientes tipos de células:

- Eritrocitos nucleados
- Eritrocitos no hemolizados
- Plaquetas gigantes
- Agregados de plaquetas

Todas las partículas de esta región quedan excluidas del recuento leucocitario y de la fórmula leucocitaria. Y además se genera una alarma que advierte sobre la presencia de estos elementos en la muestra.

Para el caso de los eritrocitos no hemolizados o resistentes a la hemólisis, la muestra debe ser reanalizada con la selección CBC (hemograma completo) + RRBC (Glóbulos rojos resistentes). En este modo, la dilución para glóbulos blancos se mantiene en la cámara de mezcla 15 segundos más que en el modo de paciente normal. Este tiempo de lisis adicional se usa para hemolizar los eritrocitos resistentes e impedir que interfieran en el recuento WBC y en la fórmula leucocitaria.

II. Análisis de la serie roja / plaquetas

Los parámetros eritrocitarios se calculan utilizando los datos del sensor 0°, 10° y 90°, mientras que los parámetros de las plaquetas se calculan utilizando los datos del sensor 0° y 10°.

El uso de una metodología óptica para el recuento de plaquetas tiene como principal ventaja la mejor capacidad para resolver recuentos bajos, aún en aquellas situaciones dónde los contadores tradicionales no pueden hacerlo, por ejemplo en el caso de un paciente con glóbulos rojos microcíticos.

El CELL DYN RUBY™ tiene la ventaja de la esferización de los glóbulos rojos evitando de esa manera variaciones en la medición de acuerdo a la posición en que la célula ingresa al sistema. Eso permite obtener un volumen corpuscular medio más preciso y además una mejor correlación del hematocrito con el método de referencia.

El software del CELL DYN RUBY™ está basado en Windows lo que le confiere una buena capacidad de búsqueda de resultados en el registro de datos, de manera rápida y flexible pudiendo aplicar múltiples filtros simultáneamente durante la búsqueda.

Tiene capacidad de gráficos que son accesibles con sólo tocar la pantalla sensible del monitor de 17 pulgadas; junto con indicadores de stock de reactivos, videos de ayuda y manual del operador en línea con sólo tocar una tecla. Capacidad de *back up* de resultados en DVD, capacidad de múltiples tipos de impresoras (Windows compatibles) y rápido acceso a la página de uso exclusivo del laboratorio con resultados del diferencial de glóbulos blancos extendido que agrega a los cinco parámetros clásicos un recuento de células en bandas (cayados), variantes de linfocitos, granulocitos inmaduros y blastos, a fin de ayudar al momento de examinar los extendidos al microscopio.

El instrumento tiene la capacidad de diferenciar los eosinófilos por su detector de 90°D (despolarizado). Los eosinófilos normales vistos en la polarización de 90° versus despolarización 90° forman una nube nítida de eventos cuyo código de colores es el verde. La despolarización de estas células se debe a los gránulos de los eosinófilos.

Los glóbulos blancos fagocíticos en circulación (monocitos y neutrófilos) ingieren la hemozoina pura liberada. En consecuencia, normalmente los monocitos y neutrófilos no despolarizadores, harán el proceso de despolarizar la luz cuando contengan agregados de hemozoina. El sistema del CELL DYN RUBY™ incorpora la posibilidad de activar la alarma de ATYPDEP para que el operador se alertado sobre la presencia de este efecto.

5.8.2 Pasos para la medición de variables

CRONOGRAMA

La programación estará basada en la identificación, hecha durante la planeación del proyecto, de las necesidades primarias para la obtención de material adecuado para el

análisis por medio del citómetro de flujo, en primer lugar, y posteriormente se evaluarán las características restantes.

Para dichas necesidades se establecen metas (tabla 1) a cumplirse durante el tiempo de desarrollo del proyecto, mismas que se relacionan estrechamente con las actividades (tabla 2) a realizarse para cumplir las metas señaladas.

Tabla 1	
METAS	
1	diseñar método de recolección para saliva total
2	demostración morfológica de las poblaciones celulares en muestras de saliva total
3	determinar características cuantitativas y cualitativas de las poblaciones celulares
4	determinación de las poblaciones y subpoblaciones celulares en las muestras de saliva total mediante citometría de flujo
5	toma de muestras sanguíneas y análisis en citómetro de flujo
6	determinar las relaciones de proporcionalidad entre las poblaciones celulares encontradas en saliva total y en sangre periférica

Tabla 1. Metas proyectadas durante el desarrollo del proyecto.

Tabla 2													
ACTIVIDADES POR MES													
	1/2	3/4	5/6	7/8	9/10	11/12	13/14	15/16	17/18	19/20	21/22	23/24	
Selección de voluntarios	x												
Diseño del método de recolección		x											
Pruebas para determinar las proporciones de volumen/concentración celular		x	x										
Comprobación morfológica (citológica)				x	x								
Toma de muestra para saliva total						x	x						
Toma de muestra para sangre periférica						x	x						
Análisis cuantitativo de ambas muestras								x	x				
Captura y análisis de resultados										x	x	x	

Tabla 2. Actividades a realizar secuencialmente para alcanzar las metas especificadas para el proyecto.

6. RESULTADOS

RESULTADOS DE LAS ETAPAS PRELIMINARES

Con la finalidad de establecer un protocolo que fuera práctico, adaptable y con reproducibilidad, se realizaron numerosas pruebas, en diferentes circunstancias y con variación de escenarios. Sin embargo, y a pesar de toda la información disponible ya en la literatura referente a la recolección de muestras de saliva total, toda esta serie de ensayos estuvieron basados en el método heurístico, probablemente más empleado que existe, de *prueba –error*.

Para el análisis de las muestras de la población de estudio se debieron cumplir con los 3 primeros puntos establecidos en las metas del cronograma.

Estos puntos se detallan por separado, al final de la exposición de los resultados de cada meta se pormenoriza el protocolo para la toma de muestra junto con las especificaciones necesarias para obtener muestras susceptibles de evaluación por citometría de flujo.

Meta 1.

Diseño del método de recolección

- El método para la recolección de saliva que se empleó estuvo basado: 1) en lo informado en la literatura científica respecto al tema, 2) consideraciones fisiológicas sobre las características de la saliva primaria ^v saliva secundaria, y 3) estimaciones a partir de la experiencia de los autores.
- Se eligió estimular la salivación de 20 voluntarios sanos (con las características de los parámetros de inclusión) mediante el uso de diversos medios, entre ellos, Parafilm®, trozos de parafina, trozos de plástico y caucho. Todos estos medios de estimulación probaron ser adecuados en la estimulación de la secreción salival, obteniéndose los volúmenes deseados en cada caso y para cada uno de los tubos de recolección; sin embargo, se decidió emplear los trozos de plástico ya que resulta más fácil en su manipulación, el material se consigue prácticamente en cualquier lugar y fue el mejor tolerado por parte de los voluntarios.

Se les instruyó a los voluntarios que masticaran los distintos aditamentos para estimular la salivación. El producto de esta estimulación (saliva total) debía ser depositado en el tubo correspondiente. En los casos en que el diámetro de la

boca del tubo lo permitía se emplearon embudos de plástico o se vertían directamente en el tubo.

- Las muestras de saliva total que se obtuvieron se recolectaron en tubos de plástico BD Vacutainer® K2E/K2 EDTA 7.2 mg por aspersion para las cantidades de 1, 3 y 5 ml. Además, se recolectaron las mismas cantidades de 1, 3 y 5 ml en tubos sin adición de algún medio anticoagulante.

Además de los tubos mencionados en el párrafo previo, se recolectaron muestras de saliva total estimulada en tubos BD Microtainer (sin aditivo) de 500 µL.

- Aunque no se cronometró de forma rigurosa el tiempo que le tomó a cada uno de los voluntarios obtener el volumen requerido para cada caso; el tiempo varió entre 3 y 7 min para los tubos de mayor volumen (3 ml y 5 ml) y entre 2 y 5 min para los de menor capacidad (1ml y tubos BD Microtainer (sin aditivo) de 500 µL).

Nota. Para el caso de los volúmenes más pequeños, la recolección de la muestra de saliva fue hecha con pipetas de transferencia, ya que verter directamente la saliva en el tubo Microtainer resultaba complicado, a diferencia de los otros volúmenes de recolección donde con la ayuda de un embudo era suficiente.

Para la recolección de volúmenes inferiores o iguales a 1 ml será indispensable la actuación del encargado de la recolección.

Meta 2.

Demostración morfológica de las poblaciones celulares en muestras de saliva total

- Se realizaron extendidos celulares de las muestras de saliva total, previa centrifugación a 300 RPM por ciclo de 3 min.
- La demostración morfológica consistió básicamente en identificar en los extendidos celulares la presencia de células hematopoyéticas, principalmente neutrófilos y linfocitos; además de otras poblaciones celulares susceptibles de estudio cuantitativo y cualitativo.
- Para la demostración citológica se evaluaron muestras teñidas con técnica de Papanicolaou y de hematoxilina y eosina (imagen 1).
- Los resultados obtenidos para los distintos grupos celulares se detallan a continuación.

Nota. Las distintas poblaciones celulares están identificadas en la numeración arábica, tomándose en cuenta para las valoraciones subjetivas de proporción cada grupo de forma individual.

1. Leucocitos
 - a. Polimorfonucleares (100%)
 - i. Neutrófilos (70%)
 - ii. Eosinófilos (menor al 1%)
 - iii. Basófilos (0%)
 - b. Mononucleares
 - i. Linfocitos (20-30 %)
 - ii. Monocitos (5-10 %)
2. Plaquetas (100%)
 - a. Proplaquetas (0%)
 - b. Plaquetas (100%)
3. Células epiteliales (100%)
 - a. Basales (menos del 10%)
 - b. Intermedias (20-30 %)
 - c. Superficiales (60-70 %)

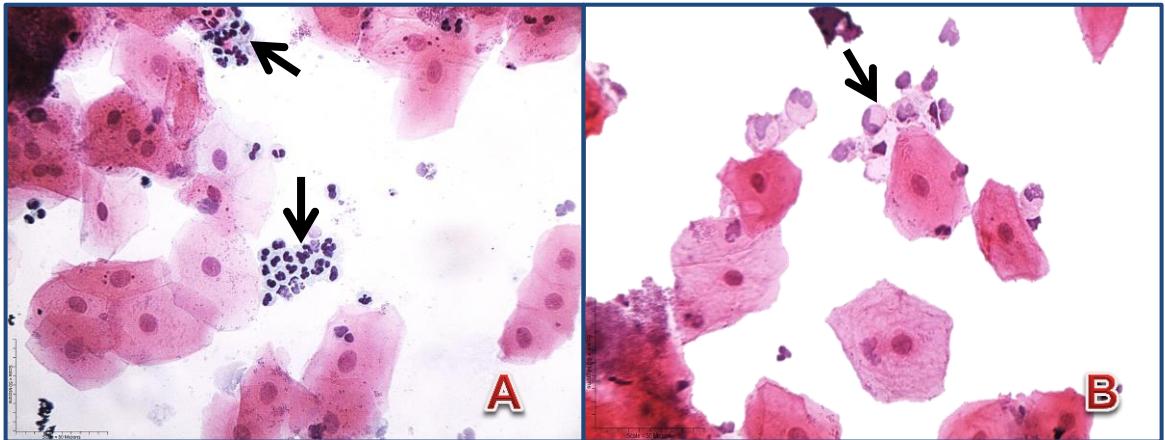


Imagen 1 (400x). En las imágenes se muestran grupos celulares aglutinados que corresponden a neutrófilos (flechas), tanto en muestras teñidas con técnica de Papanicolaou (A) como con hematoxilina y eosina (B).

- En la tabla 3 se agrupan las distintas poblaciones celulares identificadas por citología convencional en las muestras de saliva total y se especifican los porcentajes en general de las células demostradas.

Nota. Los porcentajes son en base a la apreciación y comparación de los campos en el microscopio de luz, empleando siempre un objetivo de 40x, oculares con aumento de 10x, lo que resuelve un aumento total de 400x.

Tabla 3			
Poblaciones celulares por citología			
Tipo			Valor porcentual
células epiteliales			80-85%
leucocitos			10-15%
neutrófilos	linfocitos	monocitos	
plaquetas			

Tabla 3. Porcentajes de las poblaciones celulares demostradas por citología, usando técnicas citoquímicas de rutina.

- Con los datos recopilados, se concluye que la población celular más abundante en muestras de saliva total humana son las células epiteliales, particularmente las provenientes de estratos más superficiales del epitelio plano estratificado; seguida de los leucocitos, donde las subpoblaciones más frecuentes son los neutrófilos y linfocitos.

Meta 3.

Determinar características cuantitativas y cualitativas de las poblaciones celulares

- La valoración de las características cualitativas de las poblaciones celulares se basó en la estimación de las reacciones tintoriales frente a diferentes técnicas de citoquímica, junto con las observaciones morfológicas nucleares y citoplasmáticas viables bajo el microscopio de luz. Obteniéndose los siguientes resultados:

Nota. Se usó el criterio morfológico, en el entendido que la destrucción mecánica de las células sería un factor determinante, tanto en la cuantificación como en la obtención de elementos analizables (por ejemplo, el contenido de elementos propios de las poblaciones celulares), por lo que además se añadió la afinidad química de los

elementos estructurales celulares a distintos colorantes, lo que supone una permanencia de las estructuras y sus características.

En las siguientes tablas (tabla 4 y 5) se expone el resumen de las características cualitativas de las poblaciones celulares en muestras de saliva total humana.

Tabla 4			
Apreciaciones cualitativas por citoquímica			
Tipo celular			Valor
células epiteliales			conservadas
leucocitos			conservadas
neutrófilos	linfocitos	monocitos	
plaquetas			conservadas

Tabla 4. Resumen de las valoraciones de las propiedades citoquímicas de las poblaciones celulares. Se incluyen técnicas con Papanicolaou y hematoxilina-eosina.

NOTA. Sólo se incluyen a aquellas células que se identificaron tanto en sangre como en saliva.

Tabla 5			
Apreciaciones cualitativas por morfología			
Tipo celular			Valor
células epiteliales			conservada
leucocitos			conservada
neutrófilos	linfocitos	monocitos	
plaquetas			conservada

Tabla 5. Valoraciones morfológicas individualizadas de las poblaciones celulares en los extendidos celulares.

NOTA. Sólo se incluyen a aquellas células que se identificaron tanto en sangre como en saliva.

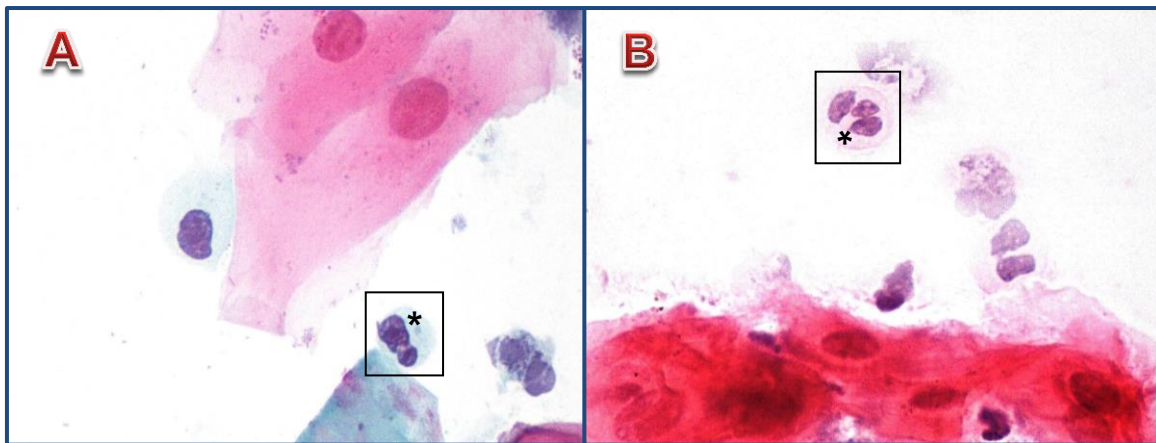


Imagen 2 (1000x). Comparación de las características citoquímicas de las poblaciones celulares en extendidos celulares de saliva con técnica de Papanicolaou (A) así como con hematoxilina y eosina (B). Obsérvese la correlación morfológica y citoquímica entre neutrófilos (*).

- Tanto para los extendidos de saliva total como para los de sangre periférica, los grupos más numerosos que se pudieron observar en el microscopio de luz, teñidos con técnica de Papanicolaou, HyE y técnica de Wright, fueron siempre los neutrófilos (imágenes 2,3 y 4).

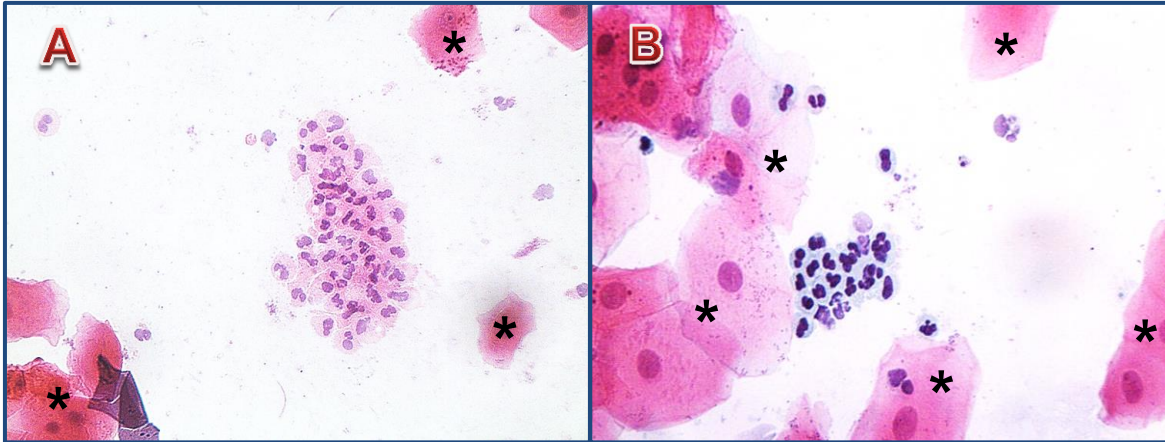


Imagen 3. Extendidos celulares de saliva con técnica de hematoxilina y eosina (A) y Papanicolaou (B), mostrando grupos de polimorfonucleares (nutrófilos) entre células epiteliales (*).



Imagen 4. Detalle de extendidos de sangre periférica con técnica de Wright (A), Papanicolaou (B) y Hematoxilina y Eosina (C). Todos muestran neutrófilos en etapa de segmentados.

- La determinación cuantitativa de las poblaciones celulares se realizó, para esta parte del estudio, con un analizador hematológico basado en citometría de flujo. En la imagen 5 se muestra la lectura de calibración del citómetro de flujo donde se puede establecer que en las lecturas posteriores se reconocerán las poblaciones celulares que se intentan identificar.

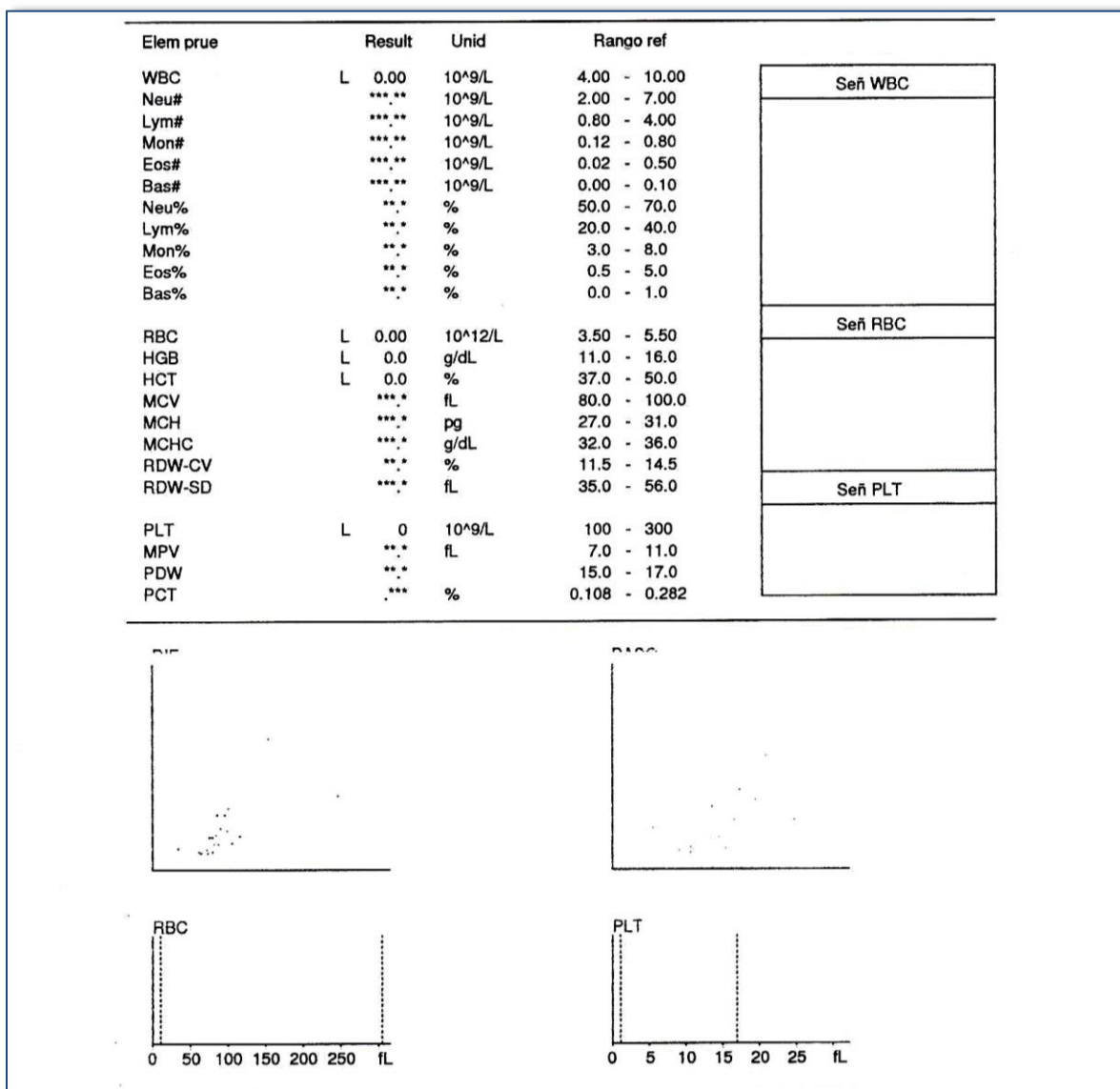


Imagen 5. Resultado obtenido con el citómetro de flujo durante las pruebas de calibración del sistema. Nótese que el aparato no define ninguna población celular, todos los valores están en 0. En los histogramas de concentración tan sólo se alcanza a observar algunas partículas denominadas "ruido", que no tienen relevancia ni alteran la lectura del sistema.

Con la información mostrada en los párrafos anteriores, se establece la metodología que va desde la toma de muestra, volumen indicado y método de cuantificación a través del analizador hematológico multiparamétrico automatizado CELL-DYN RUBY®.

Metodología (resumen)

1. Se estableció de forma general el uso de saliva estimulada con parafina. Sin embargo, no es indispensable este instrumento para estimular la salivación.
2. La cantidad mínima de muestra son 5 microlitros.
3. El análisis debe ser en promedio 2 horas posteriores a la toma de muestra y con un sistema automatizado basado en citometría de flujo.

RESULTADOS FINALES

Con los datos conseguidos en los resultados preliminares (primera fase del estudio, meta 1, 2 y 3), que incluyeron 20 voluntarios y 40 muestras de sangre y saliva, permitieron establecer la viabilidad de la detección, tipificación y cuantificación celular en muestras de saliva total humana. Para la siguiente etapa del estudio, que representa el cuerpo general de los resultados, se obtuvieron 130 muestras de sangre y saliva de 65 voluntarios (1 toma de sangre y otra de saliva del mismo sujeto en el mismo momento). Cabe mencionar que las muestras que se recabaron en la fase preliminar (40 muestras, entre sangre y saliva) no se repiten en la fase final (130 muestras, entre sangre y saliva).

EDAD Y SEXO

En relación a las variables de edad y sexo se obtuvieron los siguientes resultados. Para la muestra de 65 voluntarios sanos, mujeres y hombres, la proporción mostró una decantación hacia el género femenino con 38 participantes, lo que es igual a 58.5%; mientras que el resto de la muestra, 27 participantes; es decir, el 41.5% correspondieron al sexo masculino. En el caso de las valoraciones de las pruebas preliminares, se seleccionaron específicamente 10 casos que correspondieran a mujeres y el mismo número para varones. Por lo que la relación hombre:mujer se estableció 1:1 por conveniencia del estudio en dicha etapa. (Tabla 8)

La edad de los participantes en el estudio se distribuyó principalmente hacia los 21 años cumplidos al momento de la toma de las muestras, datos establecidos en la moda y mediana. Teniendo un rango de edad para los participantes entre 19 y 29 años cumplidos. En los datos de la fase preliminar la edad promedio osciló en los 22 años. (Tablas 6 y 7)

SALIVA

En consecuencia del objetivo general de este estudio y con fundamento en los datos que arrojó la fase preliminar, se establecieron los siguientes puntos en la metodología de la toma y el análisis de las muestras de saliva total humana.

El tipo de saliva que se identificó como más apropiada para el análisis cuantitativo y cualitativo es la saliva total estimulada. A continuación se exponen los resultados de la

metodología para la toma de la muestra, conservación y transporte de las muestras; así como su análisis cuantitativo.

Parámetros identificados:

- Saliva total
 - Se entiende como saliva total a la suma de la saliva primaria y secundaria proveniente de cualquier glándula salival más el contenido de los elementos celulares, biológicos e inertes provenientes de otras estructuras relacionadas a la cavidad bucal. Esto es, además de la misma saliva, la suma de elementos celulares de la descamación del epitelio plano estratificado que recubre la totalidad de la superficie bucal (con excepción de los órganos dentales), el fluido crevicular que drena a través del epitelio de unión, moléculas, microorganismos y cualquier otro elemento capaz de ser arrastrado por el mecanismo físico al fluir la saliva en su momento de expulsión hacia los tubos recolectores.
 - Estimulada. A pesar que entre las dos opciones de recolección de saliva (no estimulada y estimulada) no se identificó una diferencia relevante; la cantidad y la probabilidad de “arrastrar” elementos útiles en el análisis cuantitativo hizo de la saliva estimulada una elección que ofrece potencialmente menos margen de error. Igualmente, se identificó que indistintamente se puede usar parafina, fragmentos plásticos a base de polietileno (popotes/pajillas), goma de mascar (chicle) sin azúcar; aunque para este último elemento se añaden algunas condiciones específicas como carecer de cubierta confitada y contar entre sus componentes con xilitol como edulcorante. Por último, no es aconsejable, aunque no restrictivo en definitiva, el uso de algodón para estimular.
El tiempo que debe emplearse para la estimulación es indistinto y estará más en función del volumen que se consiga en un determinado lapso de tiempo y que varía de acuerdo a las condiciones generales del individuo.
 - El volumen mínimo para una muestra de saliva total es de 5 microlitros, lo recomendable son 1 a 2 ml de saliva total. Si bien se puede recolectar más volumen, esto no mejora el conteo final.
- Manejo de la muestra

- Si bien no se identificó alguna diferencia significativa entre el uso de tubos contenedores adicionados con elementos quelantes (como EDTA) o algún otro acondicionador/preservador de la muestra de saliva total, se recomienda altamente que la muestra se analice inmediatamente o en un promedio máximo de 2 horas posteriores a la recolección.
- Durante el transporte de la muestra debe mantenerse a temperatura ambiente; no refrigerar o congelar y es conveniente mantener las muestras en un contenedor que aisle las muestras de cambios de temperatura bruscos, evite su derrame y facilite su transportación, desde el sitio de recolección hasta el laboratorio
- Análisis cuantitativo
 - Se debe preferir para el análisis cuantitativo de la saliva total, sistemas automatizados para conteo celular basados en citometría de flujo con el ángulo de avance de 1° a 3° (conocida como 0°) y de 7° a 11°, (10° o ángulo estrecho). Además, contar con ambos tipos de dispersión ortogonal, lateral, 70° a 110° (conocida como 90°) y 70° a 110° despolarizada (conocida como 90°D). Esto para mejor definición de los subtipos celulares.
 - Se recomienda agitar, no de manera vigorosa, la muestra antes de hacerla pasar por el sistema automatizado.
 - Tampoco se encontró diferencia significativa en cuanto a la calibración específica de los líquidos del sistema; es decir, no se modifica el conteo final si no se hacen las calibraciones sobre el volumen de la muestra. Sin embargo, esto podría representar un aumento en el costo final para los reactivos del sistema. Aunque no impacta de manera importante al costo total del análisis; esto es, no se encarece con respecto al costo de una citometría hemática de rutina.

POBLACIONES CELULARES

Aunque el sistema empleado para la detección, clasificación y conteo celular de las poblaciones celulares en sangre y saliva, el CELL-DYN RUBY®, es capaz de identificar múltiples parámetros celulares y arrojar una serie de datos sobre estas mismas células, se consideraron para esta parte de resultados, únicamente aquellos rubros considerados como normales en un individuo aparentemente sano. Con ello, datos como el conteo de blastos fueron excluidos de las comparaciones finales entre sangre y saliva.

Con excepción de los eritrocitos, cuya presencia en cualquier localización extravascular es anormal; se incluyeron otras células que aunque su localización es preferentemente intravascular, también ejercen sus funciones por fuera de los vasos sanguíneos como cualquier otro leucocito, caso particular de las plaquetas.

Leucocitos

Para la población general de leucocitos; que además, demostró ser el grupo más numeroso de los representantes hematológicos en saliva, se evidenciaron varias características que hacen valorar a la saliva total como un buen sustrato biológico para el análisis sistémico.

Las relaciones porcentuales son muy evidentes para este grupo de células; las células granulares, principalmente neutrófilos y eosinófilos, muestran una correlación entre el porcentaje de células en sangre y las existentes en saliva. Sin embargo, las proporciones porcentuales, aunque tienen una relación evidente, no necesariamente son directamente proporcionales las variaciones en el número de células en sangre y el número total de células en la muestra de saliva.

En el caso de los neutrófilos, mientras que el porcentaje de células en sangre es de 53.63% en saliva el promedio se ubica en 14.23%, modificándose directamente la proporción en saliva cuando aumenta o disminuye la población de células en sangre. Ahora que al analizar los valores absolutos, la relación se observa con menor claridad pero sigue existiendo una relación entre la cantidad de células en saliva con el aumento o disminución de los neutrófilos en sangre. Por ejemplo, la media de células en sangre se ubicó en el orden de $4.74 \times 10^3/\text{mL}$ (4,740 células), mientras que para la saliva, la media es de $0.192 \times 10^3/\text{mL}$, menos de 200 células por mL. Aunque cuando se observa las valoraciones mínimas registradas ($1.95 \times 10^3/\text{mL}$) no se correlacionan directamente con las observadas en saliva ($.020 \times 10^3/\text{mL}$). Es decir, a pesar que una disminución del número absoluto de células por debajo del promedio impacta el número de células en saliva, existen casos donde una disminución de los valores absolutos en sangre cerca del mínimo muestran valores absolutos en saliva cercanos al promedio. Lo que hace suponer que la cantidad de neutrófilos en saliva depende, además de la proporción circulante en sangre, de variaciones locales de la cavidad bucal. (Gráfica 3)

En conjunto, eosinófilos y basófilos, muestran un comportamiento muy similar a lo observado tradicionalmente en sangre. Sin embargo, los eosinófilos expresan valores relativamente mayores, proporcionalmente, en saliva de manera constante; incluso los valores absolutos de los eosinófilos son en promedio más altos que los de los neutrófilos. Por ejemplo, si comparamos los valores absolutos de neutrófilos y eosinófilos podemos observar un dato particularmente interesante en saliva, la cantidad promedio oscila entre $0.192 \times 10^3/\text{mL}$ para neutrófilos y $0.386 \times 10^3/\text{mL}$ para eosinófilos, casi 100 eosinófilos más por mL. Esto podría suponer una actividad específica de los eosinófilos en cavidad bucal o un tránsito facilitado de estas células.

Las células agranulares de este grupo, monocitos y linfocitos, también muestran una presencia importante en saliva total, siendo del orden de 0.029 y $0.857 \times 10^3/\text{mL}$ respectivamente. Los monocitos en saliva evidencian rangos mínimos no cuantificables por mL sin una relación aparente con las cantidades en sangre. Esto se relaciona claramente con el hecho de que los monocitos requieren de cierta estimulación para abandonar los capilares sanguíneos y ejercer sus funciones fagocíticas en espacios tisulares.

Plaquetas

Dentro de las observaciones más notorias en el análisis cuantitativo de las muestras de saliva total se encuentra la evidencia sobre la presencia de plaquetas en la cavidad bucal. Si bien estas células ejercen su actividad en la periferia cercana de vasos sanguíneos, su hallazgo extratisular podría sugerir una función no descrita de las plaquetas en la superficie de la mucosa bucal. Aunque de igual forma se podría inferir que el tamaño de la célula favorecería su transición, desde los capilares cercanos al epitelio de unión, a la cavidad bucal a través del filtrado del líquido crevicular. (Tablas 9 y 10)

Guiados por los resultados del sistema de citometría de flujo, donde se expresan valores absolutos promedios de $10.90 \times 10^3/\text{mL}$; podríamos enunciar que dentro de las células hemáticas más numerosas en saliva total están las plaquetas, hecho que no había sido comentado previamente en trabajos similares.

Eritrocitos

El sistema de citometría de flujo no demostró una importante presencia de glóbulos rojos en saliva. Mientras que los valores en sangre oscilan entre los 4.976×10^6 por mL, en saliva el promedio es de apenas 0.004×10^6 cada mL, lo que es un valor esperado en saliva tomando en cuenta que la función eritrocitaria es estrictamente intravascular.

6.1 Tablas de resultados

DATOS DE FRECUENCIA PARA EDAD Y SEXO

			Estadísticos	
TIPOmuestra			EDAD	SEXO
SANGRE	N	Válidos	65	65
		Perdidos	0	0
		Media	21.74	1.42
		Mediana	21.00	1.00
		Moda	21	1
		Desv. típ.	2.064	.497
		Varianza	4.259	.247
		Mínimo	19	1
		Máximo	29	2
	SALIVA	N	Válidos	65
Perdidos			0	0
		Media	21.74	1.42
		Mediana	21.00	1.00
		Moda	21	1
		Desv. típ.	2.064	.497
		Varianza	4.259	.247
		Mínimo	19	1
		Máximo	29	2

Tabla 6. Medidas de tendencia central para edad y sexo en los grupos de sangre y saliva.

EDAD

TIPOmuestra		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
SANGRE	Válidos	19	2	3.1	3.1
		20	17	26.2	29.2
		21	23	35.4	64.6
		22	5	7.7	72.3
		23	7	10.8	83.1
		24	3	4.6	87.7
		25	3	4.6	92.3
		26	3	4.6	96.9
		27	1	1.5	98.5
		29	1	1.5	100.0
		Total	65	100.0	100.0
SALIVA	Válidos	19	2	3.1	3.1
		20	17	26.2	29.2
		21	23	35.4	64.6
		22	5	7.7	72.3
		23	7	10.8	83.1
		24	3	4.6	87.7
		25	3	4.6	92.3
		26	3	4.6	96.9
		27	1	1.5	98.5
		29	1	1.5	100.0
		Total	65	100.0	100.0

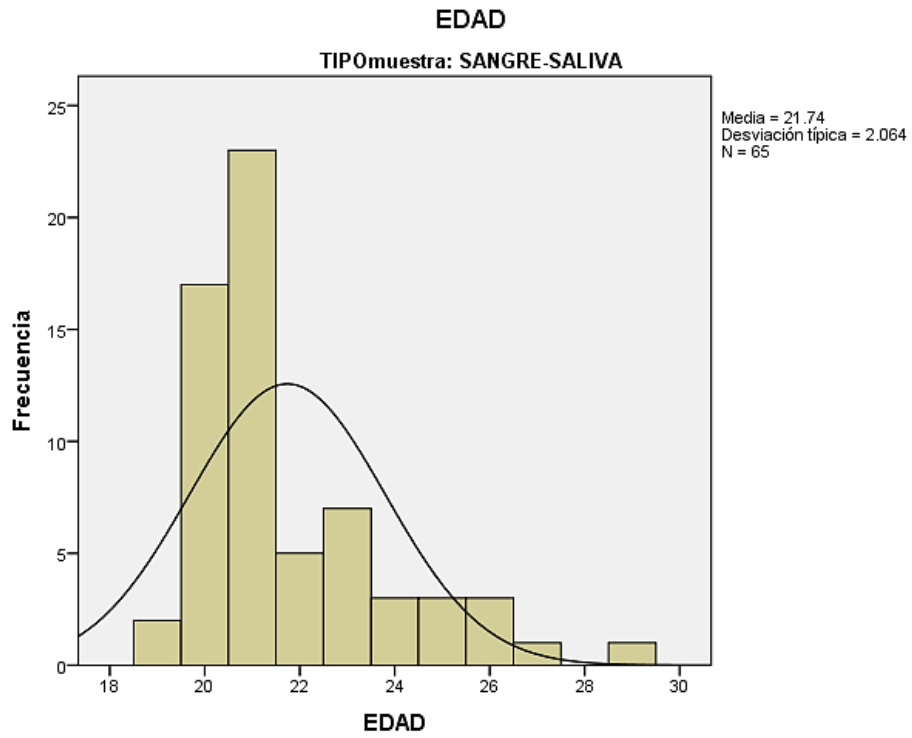
Tabla 7. Tabla de Frecuencia por edades de los participantes.

SEXO

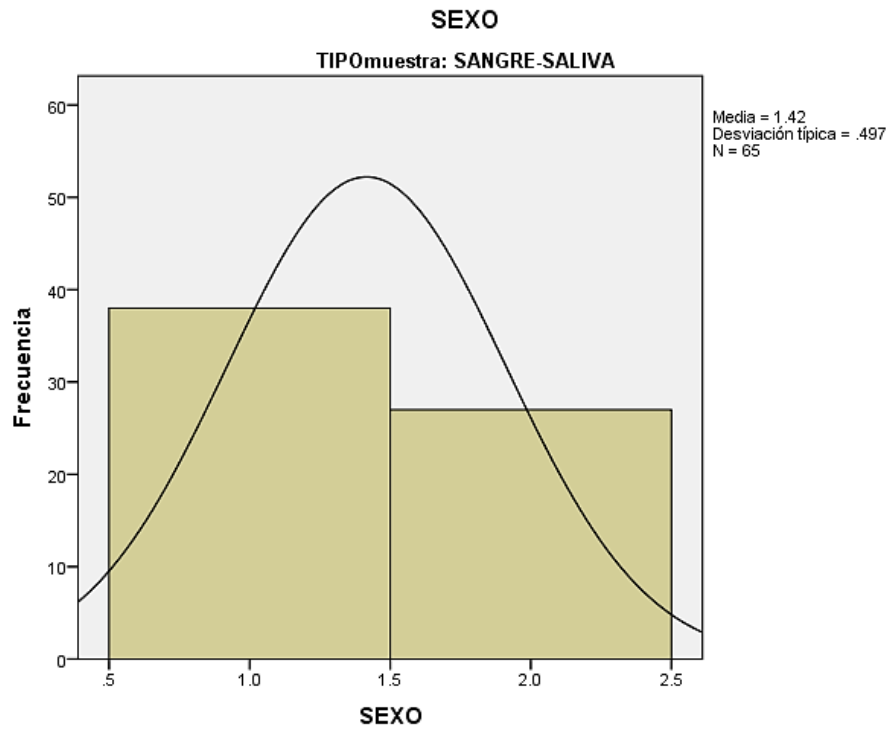
TIPOmuestra		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
SANGRE	Válidos	MUJER	38	58.5	58.5
		HOMBRE	27	41.5	100.0
		Total	65	100.0	100.0
SALIVA	Válidos	MUJER	38	58.5	58.5
		HOMBRE	27	41.5	100.0
		Total	65	100.0	100.0

Tabla 8. Porcentaje de los hombres y mujeres que participaron en el estudio.

HISTOGRAMAS



Gráfica 1. Gráfica que muestra la distribución de las edades de los participantes.



Gráfica 2. Proporción por sexo.

DATOS DE FRECUENCIA PARA POBLACIONES CELULARES

Estadísticos^a

		WBC	MONe	EOS	BASO	LYMe	PLT
N	Válidos	65	65	65	65	65	65
	Perdidos	0	0	0	0	0	0
Media		8.3826	.6352	.3120	.1062	2.6854	235.3377
Mediana		8.7400	.6170	.1320	.0840	2.5800	236.0000
Moda		7.08 ^b	.49 ^b	.12 ^b	.12	1.91	243.00
Desv. típ.		1.39323	.14877	.42507	.13463	.65745	79.13167
Varianza		1.941	.022	.181	.018	.432	6261.822
Mínimo		4.70	.28	.00	.04	1.20	2.55
Máximo		10.10	1.13	2.89	.87	4.15	414.00

a. TIPOmuestra = SANGRE

b. Existen varias modas. Se mostrará el menor de los valores.

Tabla 9. Medidas de tendencia centra para los distintos grupos celulares en sangre.

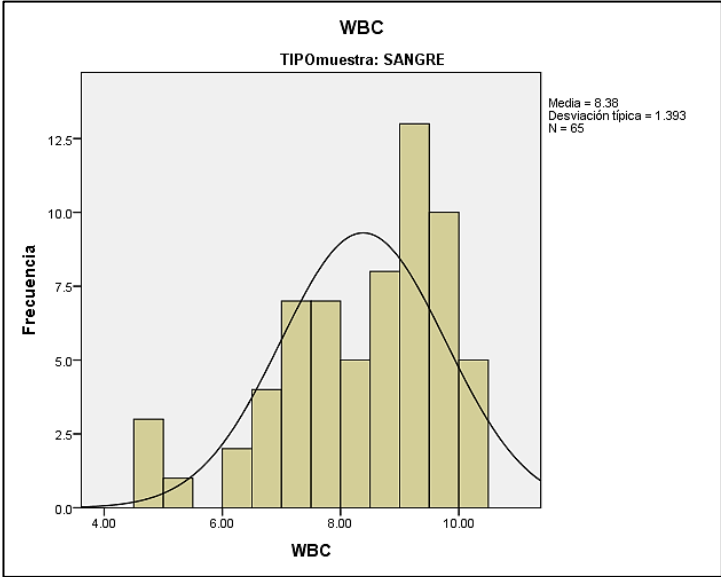
Estadísticos^a

		WBC	MONe	EOS	BASO	LYMe	PLT
N	Válidos	65	65	65	65	65	65
	Perdidos	0	0	0	0	0	0
Media		1.4741	.0296	.3867	.0044	.8574	10.9459
Mediana		1.2000	.0170	.3600	.0000	.4840	8.2300
Moda		.78	.00	.43	.00	.15	8.23
Desv. típ.		.97906	.06277	.26618	.00930	1.07828	11.78912
Varianza		.959	.004	.071	.000	1.163	138.983
Mínimo		.09	.00	.02	.00	.00	.00
Máximo		3.82	.42	1.50	.03	4.24	58.90

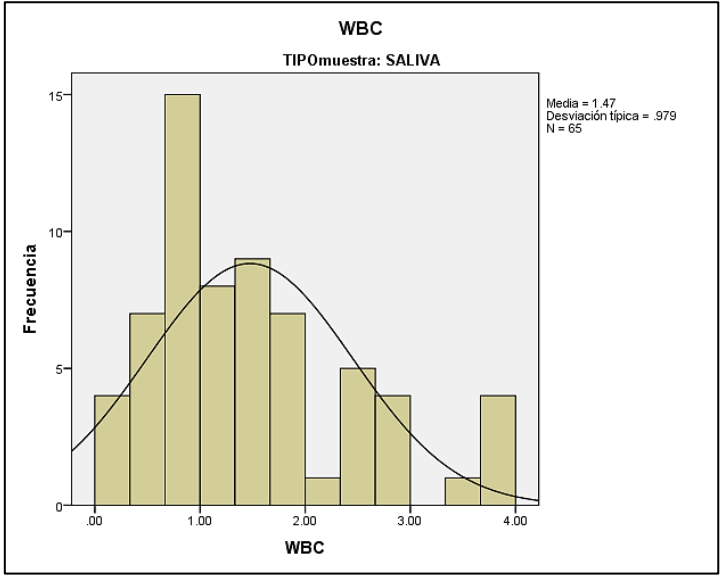
a. TIPOmuestra = SALIVA

Tabla 10. Medidas de tendencia centra para los distintos grupos celulares en saliva.

HISTOGRAMAS PARA POBLACIONES CELULARES



A



B

Gráfica 3. (A) Gráfica que muestra la distribución normal de los leucocitos en sangre y (B) saliva

Estadísticos

RBC			
SANGRE	N	Válidos	65
		Perdidos	0
	Media		4.9763
	Mediana		4.8800
	Moda		4.48 ^a
	Desv. típ.		1.50642
	Varianza		2.269
	Mínimo		.37
	Máximo		15.18
	SALIVA	N	Válidos
Perdidos			0
Media			.0048
Mediana			.0020
Moda			.00
Desv. típ.			.00556
Varianza			.000
Mínimo			.00
Máximo			.03

a. Existen varias modas. Se mostrará el menor de los valores.

Tabla 11. Medidas de tendencia centra para eritrocitos en sangre.

Estadísticos

TIPOmuestra		SEG	SEG_P
SANGRE	N	Válidos	65
		Perdidos	0
	Media	4.7458	53.6385
	Mediana	4.9000	53.6000
	Moda	1.95 ^a	41.40 ^a
	Desv. típ.	1.42052	7.88744
	Varianza	2.018	62.212
	Mínimo	1.95	31.70
	Máximo	7.46	67.50
	SALIVA	N	Válidos
Perdidos			0
Media		.1920	14.2363
Mediana		.1400	13.4000
Moda		.11	13.60
Desv. típ.		.16171	7.86773
Varianza		.026	61.901
Mínimo		.02	1.86
Máximo		.77	35.00

a. Existen varias modas. Se mostrará el menor de los valores.

Tabla 12. Medidas de tendencia centra para eritrocitos en saliva.

6.2 Análisis estadístico

Se emplearon para el análisis estadístico, medidas tendencia central o de centralización, apegándose al diseño del estudio, utilizando el programa estadístico SPSSver.21 para Mac.

6.3 Pruebas estadísticas

Debido a las características en el diseño del estudio; es decir, al ser un estudio básicamente descriptivo, el análisis estadístico se centró en el uso de parámetros o medidas de tendencia central. Destacando el empleo de la media aritmética, moda y la mediana. Todas estas medidas de centralización se realizaron a través del análisis de los datos con el programa estadístico SPSSver.21 para Mac.

6.4 Discusión de resultados

Si bien es cierto que el uso de la saliva en el área de diagnóstico no es del todo nuevo, y que en algún momento se realizaron conteos de células para relacionarlos con alguna alteración fisiopatológica. El análisis de la saliva se ha dirigido más hacia la determinación de iones y moléculas solubles, centrande en ello su valor diagnóstico. Mientras que las poblaciones celulares en saliva fueron prácticamente desechadas del panorama del diagnóstico a finales de 1970, después de casi dos décadas de trabajos en los que cuantificación de las células fue el centro de los esfuerzos de los investigadores, estableciendo como conclusión más importante que el aumento de los leucocitos en saliva estaba más relacionado a factores locales y enfermedades propias de la boca que a variaciones relacionadas con cambios sistémicos. Sin embargo, los métodos de cuantificación y tipificación celular eran poco refinados y de alcances muy limitados, pudiendo decir que eran casi artesanales; donde el microscopio, el extendido celular, los ojos y la perspectiva del examinador eran los filtros para establecer los resultados de estos análisis. Además, la noción de los análisis citogenéticos no había demostrado su crucial importancia.

El presente estudio tuvo como objetivo específico, establecer los probables alcances del análisis celular de la saliva. Más allá de entender, lo que resulta obvio a simple vista, que

la presencia de las diferentes estirpes celulares obedece más a las variaciones del ambiente local, y que este modifica en absoluto las cantidades y subtipos celulares que se encuentran en determinado momento, vale la pena resaltar el hecho de que la saliva posee un valor diagnóstico más allá de la simple cuantificación celular. El verdadero valor radica en las posibilidades de análisis de cada uno de los diferentes subtipos celulares en la saliva. Es decir, la cantidad pasa a segundo plano a partir del momento en que la presencia de una sola célula en la saliva, teóricamente, posee la misma información que 20, 200 ó 2000 células del mismo linaje celular. Partiendo de este hecho, podemos asumir que la saliva posee un potencial enorme para el diagnóstico, pues en ella se encuentra un bagaje muy variado de poblaciones celulares; por ejemplo, células de descamación del epitelio de la mucosa bucal que nos ofrecerían información de alteraciones locales y al mismo tiempo contiene células de origen hemático de las cuales se puede obtener información de condiciones sistémicas relacionadas con patologías en estas células.

La cuantificación y tipificación celular de las muestras de saliva total tuvieron un comportamiento hasta cierto punto esperado; esto es, la probabilidad de encontrar más representantes de los leucocitos que de otras células era mayor, teniendo en cuenta que es este grupo el que circula en mayor cantidad por sangre periférica.

Los linfocitos resultaron ser de las células más abundantes, lo que convierte a la saliva como un potencial líquido corporal capaz de sustituir la toma de sangre para el estudio de las alteraciones citogenéticas de leucemias de estirpe linfoide.

La ausencia de eritrocitos en saliva, reafirma lo que es de todos bien sabido, la actividad de los glóbulos rojos es exclusiva del ambiente intravascular, por lo que cualquier otro hallazgo hubiera excluido la muestra como "normal". Ahora bien, se encontraron algunos registros donde la hemoglobina fue detectada por el sistema de citometría de flujo, esto pone de manifiesto que si el líquido crevicular es un ultrafiltrado sanguíneo las barreras en el periodonto no resultan del todo efectivas tal y como se establecen en los capilares fenestrados del sistema glomerular del riñón. Pero habría que resaltar que este efecto puede ser útil en la identificación de alteraciones hemolíticas, ya sean adquiridas o hereditarias.

La inesperada presencia de un número importante de plaquetas en la saliva total abre una serie de cuestionamientos sobre esta misma presencia en la cavidad bucal. La explicación más simplista, no por ello se descarta su valor, es que el tamaño y capacidades de motilidad de la célula facilitan su transporte desde el lecho vascular hasta la superficie de la mucosa bucal a través del líquido crevicular. Convirtiéndose en un efecto no deseado

de la difusión de elementos en el líquido crevicular. Al mismo tiempo, el hecho podría interpretarse también como un efecto biológico con una finalidad no identificada, para lo cual se requerirían análisis más específicos sobre la fisiología de las plaquetas y su relación con la saliva y/o la mucosa bucal y/o la cavidad bucal en general.

Un dato más que apoya el uso de saliva como sustrato analítico está en el hecho de que tanto en hombres como mujeres los valores promedios se mantienen constantes, por lo que al parecer no hay evidencia que privilegie o limite el uso de saliva por cuestiones de género.

7. CONCLUSIONES

De acuerdo a los datos obtenidos en este trabajo, se hace posible llegar a las siguientes conjeturas:

- La saliva es una opción viable como elemento de análisis en la práctica médica, particularmente para ser usada en el estudio de la mayoría de los leucocitos y, potencialmente, de las alteraciones que pudieran existir en estas células o en aquellas enfermedades en que estas células se vean afectadas.
- El diseño de la prueba para la toma y el análisis cuantitativo de las poblaciones celulares de saliva resulta ser práctico, accesible, de bajo costo y no requiere de capacitación técnica por parte del operador (en la toma de muestra); además, el análisis cuantitativo se basa en sistemas automatizados de presencia en cualquier laboratorio de análisis clínicos.
- La población celular con mayor probabilidad para ser usada como sustrato analítico, por el hecho de ser el grupo más numeroso, son los leucocitos. En especial, linfocitos y neutrófilos; sin embargo, las plaquetas se pueden encontrar en el contenido de la saliva total en un número considerable, por lo que no hay que despreciar el uso que se le pueda dar a este hallazgo.
- Junto a la valoración cuantitativa de estas células, está también la posibilidad de utilizarlas como fuente de material genético. El hecho de que muchas enfermedades en la actualidad requieran de análisis citogenéticos para su adecuado diagnóstico y tratamiento, pone en un lugar privilegiado a la saliva,

puesto que en ella encontramos elementos celulares que no sólo aportarían información local sino también datos que se puedan emplear para el diagnóstico de enfermedades sistémicas; por ejemplo, hematológicas, metabólicas, hereditarias. Además de la posibilidad de seguir empleando a la saliva como un medio para el tamizaje genético de las familias y/o individuos.

- La existencia de las plaquetas, en una proporción considerable de la totalidad de células en saliva, plantea también nuevos campos de investigación o aplicación de técnicas enfocadas a la determinación de características de utilidad analítica.

A manera de conclusión final, se puede decir que la saliva presenta una serie de ventajas sobre la extracción de sangre, particularmente cuando se trata de pacientes complicados (niños, adultos mayores, pacientes poco cooperadores ante instrumentos punzocortantes); minimiza el margen de error en la toma de muestra, no es necesario un almacenamiento especial y cuenta con la capacidad de proveer información local y sistémica.

Los alcances son esperanzadores pero no hay que perder de vista también las limitaciones que tiene la saliva al ser un fluido heterogéneo y expuesto a una cavidad tan dinámica como la boca. Este trabajo, sin embargo, abre la puerta de un amplio panorama de investigaciones, en lo particular, referentes a los estudios de citogenética aplicables a estas poblaciones celulares de origen hematológico, que dicho sea de paso, son de las cuestiones probablemente más complejas y prometedoras en el análisis del componente celular de la saliva.

8. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Campioni D, Bardi MA, Cavazzini F, Tammiso E, Pezzolo E. Cytogenetic and molecular cytogenetic profile of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in chronic and acute lymphoproliferative disorders. *Ann Hematol.* 2012 Jun 14
- 2 Craig S Miller, Joseph D Foley, Alison L Bailey et al. Current developments in salivary diagnostics. *Biomark Med.* 2010 February ; 4(1): 171–189.
- 3 Campos-Sanchez, Toboso-Navasa, Romero-Camarero, et al. Acute lymphoblastic leukemia and developmental biology: a crucial interrelationship. *Cell Cycle.* 2011 Oct 15;10(20):3473-86.Epub 2011 Oct 15.
- 4 Malamud and Rodriguez-Chavez. Saliva as a Diagnostic Fluid. *Dent Clin North Am.* 2011 January; 55(1): 159–178. doi:10.1016/j.cden.2010.08.004.
- 5 Liu J, Duan Y. 12. Saliva: A potential media for disease diagnostics and monitoring. *Oral Oncol.* 2012 Feb 18.
- 6 Greenberg BL, Glick M, Frantsve-Hawley J, et al. Dentists' attitudes toward chairside screening for medical conditions. *J Am Dent Assoc* 2010;141(1):52–62.
- 7 Shankar AA, Routray S. Trends in salivary diagnostics - A 5-year review of Oral Oncology (2007-2011). *Oral Oncol.* 2012 Jun;48(6):e22-3. Epub 2012 Apr 5.
- 8 Stobbe H. [The number and kind of leukocytes in the saliva (salivary corpuscles) in healthy subjects and in patients]. *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch.* 1977;104(4):482-96.
- 9 Klein H. Cellular elements in the saliva of infants before and after eruption of teeth. *Dent Res.* 1962 Sep-Oct;41:1017-20.
- 10 Wright D.E. A note on leucocytes in saliva. *J R Microsc Soc.* 1959 Apr;77:139-41.
- 11 Wright D.E. Leucocytes in the saliva of edentulous and caries-free subjects. *Arch Oral Biol.* 1962 Sep-Oct;7:581-5.
- 12 MITSUI T, KUROSAWA S, OHYA M. Histochemical study of peroxidase. XVI. Leucocytes in the colostrum and the parotid saliva as revealed by the peroxidase stain. *Okajimas Folia Anat Jpn.* 1954 Feb;25(5-6):239-47.
- 13 WRIGHT DE, JENKINS GN. Leucocytes in the saliva of caries-free and caries-active subjects. *J Dent Res.* 1953 Aug;32(4):511-23.
- 14 Wright D.E. Leucocytes in the saliva of edentulous and caries-free subjects. *Arch Oral Biol.* 1962 Sep-Oct;7:581-5.
- 15 P.E.B. Calouiusa. The leukocyte count in saliva. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology.* Volume 11, Issue 1, January 1958
- 16 B EICHEL, V.F LISANTI. Leucocyte metabolism in human saliva. *Archives of Oral Biology,* Volume 9, Issue 3, May–June 1964
- 17 Wrigt D.E. A note on leucocytes in saliva. *J R Microsc Soc.* 1959 Apr;77:139-41

-
- 18** Uchida T, Kikuchi T, Higashi M, Yoshiga J, Ninomiya J. A clinical study on mixed salivary leukocytes and occult blood in patients with periodontal disease. *Nihon Shishubyo Gakkai Kaishi*. 1976 Sep;18(3):406-13.
- 19** Scully C. Phagocytic and killing activity of human blood, gingival crevicular, and salivary polymorphonuclear leukocytes for oral streptococci. *J Dent Res*. 1982 May;61(5):636-9.
- 20** Sela MN, McArthur WP, Tsai CC. Phagocytosis and binding via complement receptors by salivary polymorphonuclear leukocytes. Modulation by saliva and gingival exudate. *Inflammation*. 1981 Dec;5(4):335-41.
- 21** Kami K, Igarashi J, Mitsui T. Immunohistological demonstration of lysozyme in human leukocytes, salivary corpuscles and nasal discharge cells after blockade of myeloperoxidase activity. *Okajimas Folia Anat Jpn*. 1981 Aug;58(3):195-204.
- 22** Schröder W, Pape K. Examination of salivary leukocytes. *Z Arztl Fortbild (Jena)*. 1980 Oct 15;74(20):972-7.
- 23** Mittelman M, Fishman P, Djaldetti M. Effect of human saliva on the phagocytotic activity of polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *Biomed Pharmacother*. 1984;38(3):171-5.
- 24** Sonis ST, Miranda DM, Lamster IB, Stelos P, Wilson RE. Evidence suggesting the presence of antigen-antibody complexes on the surface of salivary leukocytes. *J Periodontal Res*. 1979 Sep;14(5):370-5.
- 25** Moody GH. Plasminogen in human saliva. *Int J Oral Surg*. 1982 Apr;11(2):110-4.
- 26** Dos-Santos MC, Matos-Gomes N, Makimoto FH. Cell phenotyping in saliva of individuals under psychological stress. *Cell Immunol*. 2009;260(1):39-43.
- 27** Zarzycka B, Płuciennik M, Krzemiński Z. The correlation between the number of polymorphonuclear leukocytes in human oral cavity and the counts of some bacteria. *Med Dosw Mikrobiol*. 2005;57(2):225-9.
- 28** Renaat Coopmana, Marijn M. Speeckaert b, Johan K. Aps c, Joris R. Delanghe. Flow cytometry-based analysis by Sysmex-UF1000i® is an alternative method in the assessment of periodontal inflammation. *Clinica Chimica Acta* 436 (2014) 176–180
- 29** Dos-Santos MC, Matos-Gomes N, Makimoto FH, Katsurayama M, Santana LL, Becker MA, Paredes-Garcia E, Bertho AL. Cell phenotyping in saliva of individuals under psychological stress. *Cell Immunol*. 2009;260(1):39-43.
- 30** Gutiérrez-Fernández J, Lara A, Bautista MF, de Dios Luna J, Polo P, Miranda C, Navarro JM. Performance of the Sysmex UF1000i system in screening for significant bacteriuria before quantitative culture of aerobic/facultative fast-growth bacteria in a reference hospital. *J Appl Microbiol*. 2012 Sep;113(3):609-14.
- 31** Ricardo JS, Cartner L, Oliver SJ. No effect of a 30-h period of sleep deprivation on leukocyte trafficking, neutrophil degranulation and saliva IgA responses to exercise. *Eur J Appl Physiol*. 2009 Feb;105(3):499-504.

-
- 32** Thanou-Stavraki A, James JA. Primary Sjogren's syndrome: current and prospective therapies. *Semin Arthritis Rheum.* 2008 Apr;37(5):273-92. Epub 2007 Aug 21.
- 33** Janket SJ, Meurman JH, Nuutinen P, Qvarnström M. Salivary lysozyme and prevalent coronary heart disease: possible effects of oral health on endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Feb;26(2):433-4.
- 34** Emekli-Alturfan E, Demir G, Kasikci E, Tunali-Akbay T. Altered biochemical parameters in the saliva of patients with breast cancer. *Tohoku J Exp Med.* 2008 Feb;214(2):89-96.
- 35** Hershkovich O, Oliva J, Nagler RM. Lethal synergistic effect of cigarette smoke and saliva in an in vitro model: does saliva have a role in the development of oral cancer?. *Eur J Cancer.* 2004 Jul;40(11):1760-7.
- 36** Lukac J, Mravak-Stipetić M, Knezević M, Vrcek J, Sistig S, Ledinsky M, Kusić Z. Phagocytic functions of salivary neutrophils in oral mucous membrane diseases. *J Oral Pathol Med.* 2003 May;32(5):271-4.
- 37** Ohlsson M, Rosengren M, Tegner H, Ohlsson K. Quantification of granulocyte elastase inhibitors in human mixed saliva and in pure parotid secretion. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1983 Sep;364(9):1323-8.
- 38** Yeh CK, Christodoulides NJ, Floriano PN, Miller CS, Ebersole JL, Weigum SE, McDevitt J, Redding SW. Current development of saliva/oral fluid-based diagnostics. *Tex Dent J.* 2010 Jul;127(7):651-61.
- 39** Miller CS, Foley JD, Bailey AL, Campell CL, Humphries RL, Christodoulides N, Floriano PN, Simmons G, Bhagwandin B, Jacobson JW, Redding SW, Ebersole JL, McDevitt JT. Current developments in salivary diagnostics. *Biomark Med.* 2010 Feb;4(1):171-89
- 40** Spielmann N, Wong DT. Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. *Oral Dis.* 2011 May;17(4):345-54
- 41** Tiede D. Vital fluorochrome staining of salivary leukocytes. *Zahn Mund Kieferheilkd Zentralbl.* 1985;73(7):687-94.
- 42** Green FA, Claesson HE, Hamberg M. Lipoxygenase products from polymorphonuclear leukocytes and epithelial cells of human saliva. *Arch Biochem Biophys.* 1987 Sep;257(2):321-7.
- 43** Taba M Jr, Kinney J, Kim AS, Giannobile WV. Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases. *Dent Clin North Am.* 2005 Jul;49(3):551-71, vi
- 44** Thomas EL, Fishman M. Oxidation of chloride and thiocyanate by isolated leukocytes. *J Biol Chem.* 1986 Jul 25;261(21):9694-702.
- 45** Halinen S, Sorsa T, Ding Y, Ingman T, Salo T, Konttinen YT, Saari H. Characterization of matrix metalloproteinase (MMP-8 and -9) activities in the saliva and in gingival crevicular fluid of children with Down's syndrome. *J Periodontol.* 1996 Aug;67(8):748-54.

-
- 46** Streckfus C, Bigler L. The use of soluble, salivary c-erbB-2 for the detection and post-operative follow-up of breast cancer in women: the results of a five-year translational research study. *Adv Dent Res.* 2005 Jun;18(1):17-24.
- 47** Kato C, Suzuki M, Saito K. Chemiluminescence response and phagocytic activity of murine polymorphonuclear leukocytes to various species of oral bacteria. *Shigaku.* 1989 Oct;77(3):876-87.
- 48** Kato C, Suzuki M, Saito K. Chemiluminescence response and phagocytic activity of murine polymorphonuclear leukocytes to various species of oral bacteria. *Shigaku.* 1989 Oct;77(3):876-87.
- 49** Saito K, Kato C, Teshigawara H. Saliva inhibits the chemiluminescence response, phagocytosis, and killing of *Staphylococcus epidermidis* by polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun.* 1988 Aug;56(8):2125-32.
- 50** Glaser V. Saliva shown to inhibit HIV-1 infectivity. *N Y State J Med.* 1988 Aug;88(8):452.
- 51** Fultz PN. Components of saliva inactivate human immunodeficiency virus. *Lancet.* 1986 Nov 22;2(8517):1215.
- 52** Schafer CA, Schafer JJ, Yakob M, Lima P, Camargo P, Wong DT. Saliva diagnostics: utilizing oral fluids to determine health status. *Monogr Oral Sci.* 2014;24:88-98. doi: 10.1159/000358791. Epub 2014 May 23
- 53** Sugawara S, Uehara A, Tamai R, Takada H. Innate immune responses in oral mucosa. *J Endotoxin Res.* 2002;8(6):465-8.
- 54** Kologrivova EN, Ruf EK, Bobkova NV, Lebedev MP. Cellular content of mixed saliva sediment in patients with chronic mucosal Inflammation. *Tsitologija.* 2000;42(5):441-3.
- 55** Llena Puy C. The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis *Med. oral patol. oral cir.bucal (Internet) v.11 n.5 Madrid ago.-sep. 2006*
- 56** B EICHEL, V.F LISANTI. Leucocyte metabolism in human saliva. *Archives of Oral Biology,* Volume 9, Issue 3, May–June 1964