
Estudio de la migración y de la actividad metabólica de los polimorfonucleares neutrófilos en pacientes con periodontitis juvenil localizada*

MARIA N. MORENO, DIANA GARCIA DE OLARTE, LUZ SIERRA, MIGUEL A. CALDERON, PABLO PATIÑO, ABEL DIAZ

La periodontitis juvenil localizada (PJL) se caracteriza por presentar una pérdida rápida de la inserción del tejido conectivo y el hueso alveolar alrededor de los primeros molares e incisivos de la dentición permanente. Esta investigación se realizó para establecer una relación entre el comportamiento *in vitro* de los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) y los diferentes tipos clínicos de la enfermedad.

Se estudiaron 21 pacientes con PJL clasificados en tres grupos: Incipiente, moderada y avanzada. Antes de que los pacientes recibieran algún tipo de tratamiento odontológico, se les aislaron los neutrófilos y se estudió, *in vitro*, la quimiotaxis bajo agarosa y la actividad metabólica mediante la quimioluminiscencia dependiente de luminol (QLDL). Las mismas pruebas fueron practicadas en forma paralela a un grupo de individuos sanos como controles.

Los pacientes con PJL avanzada tuvieron una disminución significativa de la quimiotaxis ($p=0.023$). Su índice quimiotáctico fue de 9.4 ± 1.01 mientras el de los controles fue 11.9 ± 0.33 . De otro lado, la QLDL de los PMN estimulados con forbol miristato acetato (PMA) fue normal en todos los grupos, comparados con los controles; en contraste la estimulación de los PMN con zymosan opsonizado, evidenció una actividad metabólica significativamente

LIC. MARIA N. MORENO, Bióloga; DRA. DIANA GARCIA DE OLARTE, Profesora Titular, Sección de Inmunología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina; DRA. LUZ I. SIERRA, Profesora Titular, Facultad de Odontología; MIGUEL A. CALDERON, Auxiliar de Investigación, Laboratorio de Inmunología, Facultad de Medicina; PABLO PATIÑO, Docente Especial, Sección de Inmunología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina; ABEL DIAZ, Profesor Titular, Departamento de Matemáticas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales; todos de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Trabajo financiado por la Universidad de Antioquia y COLCIENCIAS.



disminuida en los pacientes con PJJ incipiente y avanzada: el promedio de producción de energía lumínica en cpm para el grupo con PJJ avanzada fue 703376 ± 74510 y para el de PJJ incipiente fue 737000 ± 168610 ; en contraste en el grupo control fue 916597 ± 47418 ($p=0.012$).

Estos hallazgos revelan que los pacientes con PJJ conforman un grupo heterogéneo en cuanto a la función de los PMN. Para esclarecer la respuesta de los PMN en cada tipo de PJJ, se hace necesario estudiar la vinculación entre los componentes genéticos, el medio ambiente y los fenotipos clínicos de la enfermedad.

PALABRAS CLAVE
PERIODONTITIS JUVENIL LOCALIZADA
NEUTROFILOS
QUIMIOTAXIS
ACTIVIDAD METABOLICA
QUIMIOLUMINISCENCIA

INTRODUCCION

La periodontitis juvenil localizada (PJJ) es una entidad clínica caracterizada por pérdida rápida de la inserción del tejido conectivo y el hueso alveolar alrededor de los primeros molares e incisivos de la dentición permanente (1). Afecta a individuos jóvenes, especialmente del sexo femenino, hace parte de las periodontitis de aparición temprana y progreso rápido (2).

Por décadas se creyó que era un desorden degenerativo, donde los factores sistémicos jugaban un papel preponderante. Hoy se la considera una infección, en donde el desequilibrio entre la flora del surco gingival y el huésped es grande (3). En algunos estudios se ha encontrado una predisposición familiar a presentar la enfermedad (4).

Hay evidencias que indican que la mayoría de las formas de la enfermedad periodontal son causadas por bacterias como el *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, el *Bacteroides gingivalis*, la *Capnocytophaga spp*, el *Fusobacterium nucleatum*, el *Bacteroides intermedium*, el *Eubacterium spp*. y la *Eikenella corrodens* (5-10). Esta microbiota oral es capaz de causar una respuesta inflamatoria y daño directo al tejido, al secretar toxinas, enzimas o productos tóxicos resultantes

de sus procesos metabólicos. Algunas exotoxinas tienen afinidad específica por diferentes tipos de células; así, las leucotoxinas del *Staphylococcus aureus* y del *A. actinomycetemcomitans* la tienen para los neutrófilos. La leucotoxina del *A. actinomycetemcomitans* parece tener una relación con la enfermedad periodontal (11).

Las endotoxinas poseen la habilidad de activar a neutrófilos y macrófagos, los cuales liberan sus enzimas lisosomales, producen daño en el tejido local y generan péptidos con acción vasoactiva y quimiotáctica para neutrófilos. A través de este mecanismo, las endotoxinas son capaces de amplificar la reacción inflamatoria (11).

Enzimas de origen bacteriano: proteasas, colagenasas, hialuronidasas y condroitinsulfatasa están asociadas al desarrollo de estados avanzados de la enfermedad periodontal (11).

Varias investigaciones sobre el tratamiento han mostrado que la PJJ puede ser tratada exitosamente como una infección bacteriana (12).

Los factores sistémicos que predisponen a la enfermedad periodontal son motivo de investigación. Informes recientes muestran que 80% de los pacientes de PJJ presentan alteraciones en el funcionamiento de los neutrófilos, que incluyen defectos en la quimiotaxis a numerosos factores quimiotácticos (13-15), reducción de la fagocitosis de bacterias como *Staphylococcus aureus* (15) y de hongos como *Candida albicans* (16). El defecto quimiotáctico está asociado a una reducción en el número de receptores para los factores quimiotácticos (15). Se ha descrito además, un incremento en la generación de radicales de oxígeno. Estos metabolitos del oxígeno parecen tener un papel fundamental en la patogénesis de la PJJ (17,18).

Desde el punto de vista etiopatogénico todavía no se sabe claramente si el daño tisular de la enfermedad periodontal se debe a la toxicidad bacteriana, a la acción de las células fagocíticas, a la respuesta inmune ante la flora periodontopatogénica o a asociación de todos estos factores, lo que parece más probable (3).

A pesar de los hallazgos descritos -infección y defectos en los neutrófilos- la periodontitis es la única manifestación en estos pacientes jóvenes, que sistémicamente se consideran sanos (3).

Con el fin de determinar la relación existente entre el comportamiento de los PMN y las manifestaciones

clínicas de la P JL, se realizó la presente investigación en 21 pacientes con diferentes grados de compromiso. Se estudiaron *in vitro* las funciones de quimiotaxis y actividad metabólica de los PMN, encontrando disminución de la primera en los pacientes con P JL avanzada y de la segunda en respuesta a un estímulo particulado en los que tenían las formas incipiente y avanzada de la enfermedad.

MATERIALES Y METODOS

Se estudiaron 14 mujeres y 7 hombres con cuadro clínico odontológico de P JL, sin otra patología asociada y que no hubieran recibido ningún tratamiento previo; sus edades estaban por debajo de los 30 años, pues este es el grupo en que se han descrito las alteraciones en la quimiotaxis de los PMN (10,16,17).

A los pacientes se les realizó una historia clínica y odontológica completa y se les tomaron las respectivas radiografías. Todos los pacientes fueron seleccionados en el servicio de periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad de Antioquia y

rango entre 13 y 25 años (n=21). La edad promedio y los rangos respectivos para los 3 grupos de pacientes fueron: P JL incipiente 19, 13-24 (n=5), P JL moderada 18.5, 16-24 (n=8) y P JL avanzada 20.6, 16-25 (n=8). En forma paralela se estudiaron como controles 15 individuos sanos (11 mujeres y 4 hombres) con edad promedio de 27.5 y rango entre 22 y 31 años (Tabla N° 1). Aunque se observó una diferencia estadísticamente significativa entre las edades de los controles y los pacientes, esto no tiene trascendencia sobre los resultados pues previamente se ha encontrado que la función de los neutrófilos presenta un comportamiento similar después de la pubertad, independientemente del sexo (20).

OBTENCION DE LOS POLIMORFONUCLEARES NEUTROFILOS.

Los PMN de todos los sujetos fueron aislados de sangre venosa periférica heparinizada (10 U/ml). Después de un proceso de sedimentación de los eritrocitos con Dextran 70 al 6% (Pharmacia, Division

TABLA N° 1

POBLACION DE ESTUDIO

GRUPO	MUJERES	HOMBRES	EDAD PROMEDIO	RANGO DE EDAD
Control	11	4	27.5	22 - 31
P JL incipiente	4		19.0	13 -24
P JL moderada	7		18.5	16 -24
P JL avanzada	3	5	20.6	16 -25

remitidos al Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia.

La confirmación clínica de la P JL se basó en:

1. Presencia de bolsas periodontales que indicaban pérdida de la inserción en más de un sitio.

2. Serie radiográfica sugestiva de pérdida ósea, frecuentemente de tipo vertical con patrón molar incisivo que no se asociaba con factores locales.

Los pacientes se asignaron a uno de tres grupos diferentes según que presentaran P JL incipiente, moderada o avanzada, de acuerdo a criterios diagnósticos previamente establecidos (1,2,19). El promedio de edad del grupo total fue 19.3 años, con un

Uppsala, Sweden) y centrifugación en un gradiente de Ficoll-Hypaque (Ficoll 400, Pharmacia. Hypaque sódico 50%, The Sidney Ross Co, Cali, Colombia) 400 x g/25 min/4°C, se procedió a realizar la lisis hipotónica de los glóbulos rojos contaminantes con agua destilada y cloruro de sodio al 3.5% en una relación 2:1. Las células se lavaron con solución de Hank (Gibco Laboratories, Grand Island, Biological Company, NY) más gelatina 0.1% (Difco Laboratories, Detroit MI) centrifugando a 200 xg/10 min/4°C. Luego los PMN se llevaron a una concentración de 50 x 10⁶ células/ml en Hank 1X y se mantuvieron en hielo mientras eran utilizados. La viabilidad, determi-

nada por exclusión del azul de tripano, y la pureza, evaluada por la coloración con violeta de genciana, siempre estuvieron por encima del 95% (20,21).

QUIMIOTAXIS DE LOS PMN *IN VITRO*

Para analizar la migración de los neutrófilos se utilizó una variación de la prueba de quimiotaxis (QT) bajo agarosa (20,22). En una caja de petri plástica de 60 x 15 mm (Nunclon), se depositó una mezcla de agarosa tipo II (Sigma Chem Co, St Louis, MO) al 1% en MEM 2x (Gibco Laboratories), Hepes 0.01 M (Sigma) y una mezcla de sueros humanos normales al 10% previamente inactivada a 56°C/30 min. Después de gelificarse se hicieron 6 filas de 3 pozos cada una. En el pozo externo se depositaron 10 µl de FMLP (N-Formyl-Metionil-Leucil-Fenilalanina) 4.5×10^{-8} M (Peninsula Laboratories INC, San Carlos, CA); en el central 10 µl de la suspensión de PMN (50×10^6 /ml) y en el interno 10 µl de Hank más gelatina al 0.1%. Las cajas se incubaron a 37°C/5% CO₂/2 h. Luego se añadió glutaraldehído al 2.5% (Sigma), se dejó toda la noche y al día siguiente se tiñó con Wright. La lectura se hizo en un microscopio de luz, con un ocular calibrado (10X) y un objetivo de 3.2X. Se determinó la distancia recorrida por las células hacia el factor quimiotáctico y hacia el pozo que contenía la solución tampón; se promedió la diferencia de las 6 hileras de pozos, con lo cual se obtuvo el diferencial quimiotáctico (DQ).

QUIMIOLUMINISCENCIA DEPENDIENTE DE LUMINOL

La actividad metabólica de los neutrófilos se estudió por medio de una prueba de QLDL (23-25). En viales de polipropileno (Wheaton Scientific, Omni-Vials, Milville, NJ) se realizó por triplicado la mezcla de reacción, con un volumen final de 2 ml. Los viales reposo que contenían PBS (solución salina de fosfatos), Luminol 2.2×10^{-6} M (Sigma) y 2.5×10^4 PMN/ml; los viales con estímulo contenían, además de lo anterior, 100 ng/ml PMA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) (Sigma) o 1.66 mg/ml Zymosan opsonizado (Zym ops) (Sigma). Los neutrófilos se añadieron inmediatamente antes de colocar los viales en el contador de centelleo β (Beckman LS 3801). Se registraron 7 ciclos de lectura, con un intervalo de 10 minutos (una hora de observación).

Los datos en reposo y con los estímulos se reportaron en cpm netas, las cuales se obtuvieron al substrair la mediana de la lectura de viales blanco (QL inespecífica) de la respectiva mediana de los triplicados de reposos y estímulos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Para estudiar las diferencias en la respuesta quimiotáctica entre los varios grupos de pacientes con respecto al grupo control, se realizó un análisis de varianza de una vía con los DQ obtenidos de cada individuo (26), para comparar las respuestas en los cuatro grupos estudiados. Cuando las diferencias entre las medias fueron estadísticamente significativas con respecto a un nivel crítico del 5%, se aplicó el método de comparaciones múltiples de Student Newman y Keuls (SNK) (27) para decidir cuáles grupos eran diferentes.

En la QLDL se aplicó un análisis de varianza de dos vías, tomando como factores el tiempo y los grupos de estudio y como variable de respuesta el número de cpm (la media de las medianas de las cpm dadas por el contador en cada uno de los siete ciclos estudiados) para los reposos y para cada estímulo (PMA y Zym ops).

En la aplicación de los análisis de varianza se tuvieron en cuenta las asunciones de homoscedasticidad (prueba de Bartlett) y de normalidad (26).

Para la organización y procesamiento de los datos obtenidos se utilizó como hoja electrónica el programa QUATTRO PROFESIONAL versión 3.0. El programa utilizado para el análisis estadístico fue el STATGRAPHICS versión 4.0.

RESULTADOS

La quimiotaxis de los PMN reveló una diferencia significativa entre los 4 grupos de estudio ($p=0.023$), debida a disminución en el grupo de pacientes con PJA avanzada, con relación a los demás grupos de enfermos y al grupo control (Tabla N° 2).

En cuanto a la actividad metabólica estudiada por QLDL los PMN activados con PMA mostraron un comportamiento similar en los grupos de pacientes y en el de control. En todos los individuos investigados se observó una cinética de la producción de fotones con elevación rápida a los 10 minutos y caída posterior en el transcurso de los siguientes 50 minutos.

Este comportamiento se debe a la rápida acción activadora que tiene este agente promotor de tumores sobre la proteína kinasa C, llevando a una estimulación temprana pero no sostenida de la explosión respiratoria (23,28). En la gráfica 1 se observa la cinética de la QLDL estimulada con PMA de los pacientes con P JL avanzada; no se presenta la de los demás grupos pues no se observan diferencias importantes.

Los neutrófilos activados con Zym ops mostraron diferencias en la actividad metabólica entre los varios grupos estudiados. El análisis de varianza de dos vías evidenció que la diferencia era estadísticamente significativa ($p=0.012$) (Tabla N° 3). Hubo disminu-

ción en la producción de fotones por parte de los neutrófilos de los sujetos con P JL incipiente y avanzada con relación al grupo control. Con este agente particulado los PMN mostraron una cinética característica en la producción de energía lumínica. Se observó elevación sostenida en los niveles de QLDL, entre el tiempo 0 y los 20 minutos y estabilización después de este ciclo, lo que se explica porque la fagocitosis desencadenada por este estímulo lleva a la generación sostenida de los metabolitos responsables de la QLDL (24,28). Se muestra la cinética de la QLDL estimulada con Zym ops en los pacientes con P JL avanzada en la gráfica N° 2.

TABLA N° 2

COMPARACIONES MULTIPLES PARA QUIMIOTAXIS

METODO: MINIMA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA

Grupo	n	X ± E.E.	Grupos homogéneos
Control	15	11.931 ± 0.328	
P JL incipiente	5	13.130 ± 1.165	
P JL moderada	8	11.636 ± 0.880	
P JL avanzada	8	9.414 ± 1.013	

TABLA N° 3

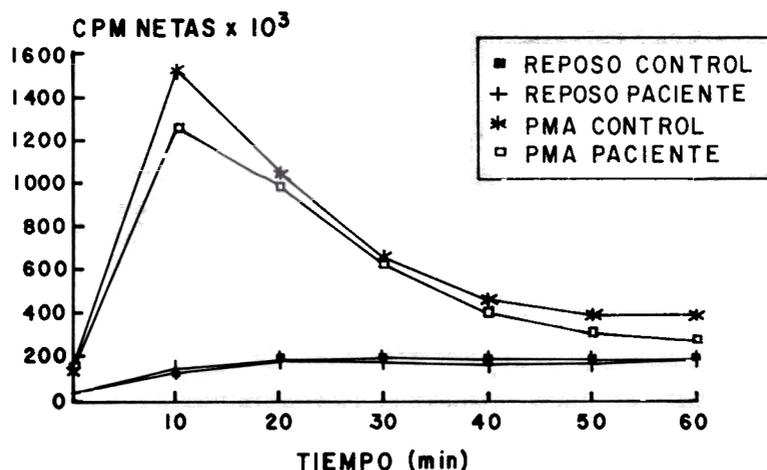
COMPARACIONES MULTIPLES PARA QLDL DE PMN ESTIMULADOS CON ZYMO SAN OPSONIZADO

METODO: MINIMA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA

Grupo	n	X ± E.E.	Grupos homogéneos
Control	103	916596.9 ± 47418.3	
P JL incipiente	33	737009.7 ± 168611.0	
P JL moderada	56	883884.5 ± 93006.3	
P JL avanzada	56	703376.3 ± 74509.4	

El número de datos es mayor debido a que se tomaron en conjunto los controles de cada grupo y en esta tabla se presenta una suma de los siete ciclos analizados en la QLDL.

GRAFICA 1
QLDL DE PMN REPOSO Y ESTIMULO CON PMN
PJL AVANZADA Y CONTROLES



DISCUSION

La incidencia y la prevalencia de la PJA no se han establecido en Colombia pero, en nuestro medio, desde hace varios años se viene diagnosticando esta enfermedad en pacientes atendidos en la Facultad de Odontología de la Universidad de Antioquia. En un estudio reciente realizado en Inglaterra en 7.256 niños de 14 a 19 años, se encontró una prevalencia del 0.1% de todas las formas de periodontitis juvenil (12).

En la presente investigación sobre 21 pacientes con PJA con diferentes grados de compromiso, se estudiaron las funciones de quimiotaxis y de actividad metabólica *in vitro* de los neutrófilos, con el objetivo de observar si había alteraciones en el funcionamiento de estas células y establecer una relación con los diferentes cuadros clínicos de la PJA.

Respecto a la quimiotaxis de PMN se encontró que había una disminución significativa en los pacientes con PJA avanzada. Este hallazgo está de acuerdo con lo reportado por varios grupos de investigadores: Van Dyke y cols. (13), Altman y cols. (29) y Van Dyke y cols. (30), han encontrado alteración de la quimiotaxis de los PMN en cerca del 75% de los pacientes con periodontitis juvenil.

Se sabe que los defectos de la quimiotaxis en la PJA están asociados con una reducción por lo menos del 50% en la expresión de los receptores para los factores quimiotácticos como el FMLP (31,32). De Nardin y cols (33) estudiaron las diferencias en la antigenicidad entre los receptores para el FMLP de los neutrófilos con alteraciones quimiotácticas en individuos con periodontitis y de células normales. Sus hallazgos sugieren varias posibilidades: alteraciones cualitativas, enmascaramiento o expresión reducida del epítopo de 68 KDa de dicho receptor en pacientes con la disminución en la quimiotaxis.

El hecho de que los pacientes con PJA incipiente y moderada en el presente estudio, no presentaran trastornos quimiotácticos no se aparta de los informes de otros autores. En los últimos años se ha esclarecido que los pacientes con PJA no conforman un grupo totalmente homogéneo, con relación a la función de los neutrófilos. Así lo confirman los reportes de pacientes sin anomalías detectables en los PMN (34,35). La explicación más probable para estos hallazgos es que se presenten diferencias en las poblaciones, en las cuales los grupos sin anomalías sean genéticamente homogéneos (34,35). Se han informado patrones de transmisión genética compatibles con una herencia dominante ligada al X (36) y particularmente una herencia autosómica recesiva (37-39).

Las explosión respiratoria determinada por la producción de fotones en los neutrófilos estimulados con PMA, no mostró diferencias significativas entre los pacientes con PjL y los respectivos controles. Pero cuando se empleó el zymosan opsonizado para activar las células se encontró que había diferencias estadísticamente significativas: una disminución en la QLDL en los pacientes con PjL incipiente y avanzada, respecto a la moderada y a los controles. Estos resultados son interesantes porque muestran comportamientos diferentes en la generación de radicales de oxígeno por los neutrófilos.

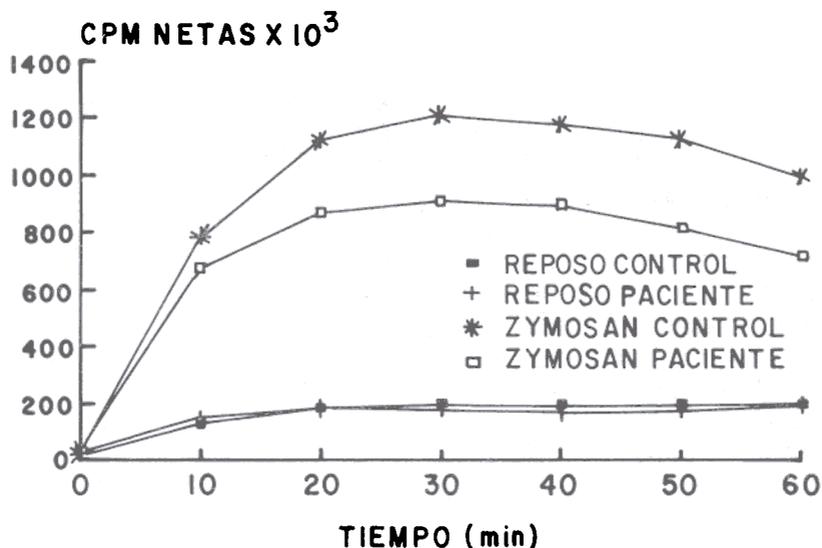
Asman y cols (17,18,40,41) han encontrado aumentada la QLDL en neutrófilos de pacientes con PjL, inducida con *Staphylococcus aureus* opsonizado con suero autólogo. Estos autores consideran que esto se podría atribuir a una mayor capacidad opsónica en estos pacientes. Tal interpretación está de acuerdo con los resultados de Henry y cols. (42), los cuales obtuvieron los mismos hallazgos activando los PMN con zymosan. La disminución en la generación de energía fotónica para los PMN estimulados con Zym ops en nuestros pacientes con PjL incipiente y avanzada también está en concordancia con lo

encontrado por Ellegaard y col. (34). Sin embargo Van Dyke y col. (43), estimulando con zymosan opsonizado los neutrófilos de pacientes con PjL, observaron que la producción de anión superóxido (O_2^-) era idéntica en los pacientes y en sus respectivos controles. De otro lado, Suzuki y col. (44), han reportado una deficiencia en la producción de anión superóxido en los neutrófilos de pacientes con PjL activados con FMLP.

Es evidente que los estímulos como PMA y FMLP no discriminan la actividad metabólica de los pacientes con PjL y los sujetos normales. La discrepancia en la producción de radicales de oxígeno por los PMN de los pacientes con PjL, expresa claramente que cada estímulo utiliza vías de activación metabólica diferentes; el Zym ops estimula la célula a través de la unión a los receptores para las fracciones del complemento C3b y C3bi (CR1, CR3) promoviendo de este modo la fagocitosis y la explosión respiratoria. El PMA activa directamente a la proteína kinasa C, la cual incrementa la actividad metabólica en las células. Se puede sugerir que la disminución de la QLDL en nuestros pacientes con PjL incipiente y avanzada se debe a una alteración en el número,

GRAFICA 2

QLDL DE PMN REPOSO Y ESTIMULADOS CON ZYM OPS. PjL AVANZADA Y CONTROLES



afinidad o función de los receptores CR1 y CR3, o a anomalías en los eventos posteriores a las uniones ligando-receptor, hasta llegar a la etapa final de la activación de la proteína quinasa C.

Los resultados de esta investigación demuestran un hecho ya registrado en la literatura; que la periodontitis es un grupo heterogéneo de enfermedades, cuya característica clínica es la destrucción periodontal, pero con diferentes expresiones en la alteración de la quimiotaxis y de la actividad metabólica de los neutrófilos. Se podría postular un modelo multifactorial en donde existiría una predisposición o susceptibilidad genética, la cual interactuaría con factores del medio ambiente para originar el fenotipo de la enfermedad periodontal.

SUMMARY

MIGRATION AND METABOLIC ACTIVITY OF POLYMPHONUCLEAR NEUTROPHILS IN PATIENTS WITH LOCALIZED JUVENILE PERIODONTITIS

Localized juvenile periodontitis (LJP) is characterized by a rapid loss of connective tissue insertion and of alveolar bone around the first molars and incisors of the permanent teeth. This research was carried out in order to establish a relationship between *in vitro* behavior of PMN and the different clinical types of the disease. Twenty-one patients were studied; they included incipient, moderate and advanced LJP. Before any kind of dental treatment was applied PMN were isolated from each patient to determine their chemotaxis under agarose and their metabolic activity (luminol-dependent-chemiluminescence, LDCL). A group of healthy control individuals was similarly studied.

Patients with advanced LJP had significantly lower chemotaxis ($p=0.023$); on the other hand, LDCL of phorbol-myristate-acetate stimulated PMN was normal in the three groups as compared with controls; PMN stimulation with opsonized zimosan revealed significantly decreased metabolic activity in patients with incipient and advanced disease ($p=0.012$). These findings indicate that patients with LJP behave as a heterogeneous group regarding PMN func-

tion. In order to define PMN response in each type of this disease it is necessary to study the relationship between genetic components, environment and clinical phenotypes of the disease.

BIBLIOGRAFIA

1. BURMEISTER JA, BEST AM, PALCANIS KG, CAINE FA, RANNEY RR. Localized juvenile periodontitis and generalized severe periodontitis clinical findings. *J Clin Periodontol* 1984; 11: 181-192.
2. SAXEN L. Juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol* 1980; 7: 1-9.
3. MILLER DR, LAMSTER IB, CHASENS AI. Role of the polymorphonuclear leukocyte in periodontal health and disease. *J Clin Periodontol* 1984; 11: 1-15.
4. VAN DYKE TE, SCHWEINEBRATEN M, CIANCIO LA LJ, OFFENBACHER S, GENCO RJ. Neutrophil chemotaxis in families with localized juvenile periodontitis. *J Periodontol Res* 1985; 20: 503-514.
5. ASIKAINEN S, JOUSIMIES-SOMER H, KANERVO A, SAXEN L. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and clinical periodontal status in finnish juvenile periodontitis patients. *J Periodontol* 1986; 57: 91-93.
6. VAN DYKE TE, OFFENBACHER S, KALMAR J, ARNOLD RR. Neutrophil defects and host-parasite interactions in the pathogenesis of localized juvenile periodontitis. *Adv Dent Res* 1988; 2: 354-358.
7. TSAI CC, TAICHMANS NS. Dynamics of infection by leucotoxic strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol* 1986; 13: 330-331.
8. SAXEN L, TENOVUO J, VILJA P. Salivary defense mechanisms in juvenile periodontitis. *Acta Odontol Scand* 1990; 48: 399-407.
9. GENCO RJ, SLOTS J. host responses in periodontal diseases. *J Dent Res* 1984; 63: 441-451.
10. GONZALEZ-JARANAY M, LIEBANA J, LOPEZ-BUENOS S. Estudio clínico y microbiológico de la periodontitis juvenil. *Revista de Actualidad Odonto Estomatológica Española* 1990; 390: 33-41.
11. LISTGARTEN MA. Nature of periodontal diseases: pathogenic mechanisms. *J Periodontol Res* 1987; 22: 172-178.
12. GENCO RJ, VAN DYKE TE, LEVINE MJ, NELSON RD, WILSON ME. Molecular factors influencing neutrophil defects in periodontal disease. *J Dent Res* 1986; 65: 1379-1391.
13. VAN DYKE TE, HOROSZEWICZ HU, CIANCOLA LJ, GENCO RJ. Neutrophil chemotaxis dysfunction in human periodontitis. *Infect Immun* 1980; 27: 124-132.
14. LAVINE WS, MADERAZO EG, STOLMAN J, et al. Impaired neutrophil chemotaxis in patients with juvenile and rapidly progressing periodontitis. *J Periodont Res* 1979; 14: 10-19.
15. VAN DYKE TE, ZINNEY W, WINKEL K, et al. Neutrophil function in localized juvenile periodontitis: phagocytosis, superoxide production and specific granule release. *J Periodontol* 1986; 17: 703-707.
16. COGEN RB, ROSEMAN JM, AL-JOBURI W, et al. Host factors in juvenile periodontitis. *J Dent Res* 1986; 65: 394-399.
17. ASMAN B, BERGSTRÖM K, WIJKANDER P, LOCKOWANDT B. Influence of plasma components on luminol-enhanced chemilumines-

- cence from peripheral granulocytes in juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol* 1986; 13: 850-855.
18. ASMAN B, BERGSTRÖM K, WIJKANDER P, LOKCOWANDT B. Peripheral PMN cell activity in relation to treatment of juvenile periodontitis. *Scand J Dent Res* 1988; 96: 418-420.
 19. PAGE RC, SCHROEDER HE. Periodontitis in man and other animals. Philadelphia: Lea and Febiger, 1982; 330.
 20. PATIÑO PJ. Modulación de la función de los neutrófilos en individuos sanos y en pacientes con el síndrome de hiper IgE. Tesis de Grado. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina. Universidad de Antioquia, 1990.
 21. YANAI M, QUIE PG. Chemiluminescence by polymorphonuclear leukocytes adhering to surfaces. *Infect Immun* 1981; 32: 1181-1186.
 22. GARCIA D, ABRAMSON JS. A simplified under agarose method of measuring neutrophil chemotaxis. *J Infect Dis* 1983; 147: 1104.
 23. DECHATELET LR, LONG GW, SHIRLEY PS, et al. Mechanism of the luminol-dependent chemiluminescence of human neutrophils. *J Immunol* 1982; 129: 1589-1593.
 24. WESTRICK MA, SHIRLEY PS, DECHATELET LR. Generation of chemiluminescence by human neutrophils exposed to soluble stimuli of oxidative metabolism. *Infect Immun* 1980; 30: 385-390.
 25. CARDONA R. Generación de quimioluminiscencia por los polimorfonucleares neutrófilos en los pacientes consumidores habituales y exconsumidores de la pasta base de coca (basuca). Tesis de Grado. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, 1989.
 26. STEEL RGD, TORRIE JH. Bioestadística: principios y procedimientos. 2a ed. Bogotá: Mc Graw Hill Latinoamericana, 1985; 622.
 27. ANDERSON VL, McLEAN RA. Design of experiments. A realistic approach. New York: Marcel Dekker, 1974: 6-25.
 28. ALLRED CVD, MARGETTS J, HILL HR. Luminol-induced neutrophil chemiluminescence. *Biochem Biophys Acta* 1980; 631: 380-385.
 29. ALTMAN LC, PAGE RC, VANDESTEEN GE, DIXON LI, BRADFORD C. Abnormalities of leukocyte chemotaxis in patients with various forms of periodontitis. *J Periodontol Res* 1985; 20: 553-563.
 30. VAN DYKE TE, LEVINE MJ, GENCO RJ. Neutrophil function and oral disease. *J Oral Pathol* 1985; 14: 95-120.
 31. VAN DYKE TE, LEVINE MJ, TABAK LA, GENCO RJ. Reduced chemotactic peptide binding in juvenile periodontitis: a model for neutrophil function. *Biochem Biophys Res Comm* 1981; 100: 1278-1284.
 32. CARCHMAN RA, FREER RJ, RANNEY RR. FMLP-receptor binding in chemotactically dysfunctional PMNs (Abstr No 1.399). *J Dent Res* 1984; 63: 326.
 33. DE NARDIN E, DE LUCA GH, LEVINE MJ, GENCO RJ. Antibodies directed to the chemotactic factor receptor detect differences between chemotactically normal and defective neutrophils from LJP patients. *J Periodontol* 1990; 61: 609-617.
 34. ELLEGAARD B, BORREGAARD N, ELLEGAARD J. Neutrophil chemotaxis and phagocytosis in juvenile periodontitis. *J Periodontol Res* 1984; 19: 261.
 35. SAXEN L, NEVANLINNA HR. Autosomal recessive inheritance of juvenile periodontitis: test of a hypothesis. *Clin Genetics* 1984; 25: 332-335.
 36. MELNICK SL, GO RCP, COGEN RB, ROSEMAN JM. Allelic variants for complement factors C3, C4 and B in acute necrotizing ulcerative gingivitis. *J Dental Res* 1988; 67: 851-854.
 37. SAXEN L, KOSKIMIES S. Juvenile periodontitis: no linkage with HLA-antigens. *J Periodontol Res* 1984; 19: 441-444.
 38. BEATY TH, BOUGHMAN JA, YANG P, ASTEMBORSKI JA, SUZUKI JB. Genetic analysis of juvenile periodontitis in families ascertained through an affected proband. *Am J Human Genet* 1987; 40: 443-452.
 39. BOUGHMAN JA, HALLORAN SL, ROULSTON D, et al. An autosomal dominant form of juvenile periodontitis: its localization to chromosome 4 and linkage to dentinogenesis imperfecta and Gc. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1986; 6: 341-350.
 40. ASMAN B, ENGSTRÖM PE, OLSSON T, BERGSTROM K. Increased luminol enhanced chemiluminescence from peripheral granulocytes in juvenile periodontitis. *Scand J Dent Res* 1984; 92: 218-223.
 41. ASMAN B. Peripheral PMN cells in juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol* 1988; 15: 360-364.
 42. HENRY CA, WINFORD TE, LAOHAPUND P, YOTNVEGNIT P. Neutrophil chemiluminescence and opsonic activities of young people with periodontitis in Thailand. *Arch Oral Biol* 1984; 29: 623-627.
 43. VAN DYKE TE, ZINNEY W, WINKEL K, et al. Neutrophil function in localized juvenile periodontitis. *J Periodontol* 1986; 57: 703-708.
 44. SUZUKI JB, COLLISON C, FALKNER WA, NAUMAN RK. Immunologic profile of juvenile periodontitis II. Neutrophil chemotaxis, phagocytosis, and spore germination. *J Periodontol* 1984; 5: 461.