

Alteraciones cuantitativas y funcionales de los neutrófilos

AUTORES/AUTHORS

Pedro Diz Dios (1), Antonio Ocampo Hermida (2),
Javier Fernández Feijoo (3).

- (1) Profesor titular de Odontología en Pacientes Especiales. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Santiago de Compostela. España.
- (2) Médico Adjunto. Sección de Enfermedades Infecciosas. Servicio de Medicina Interna. Complejo Hospitalario Xeral-Ciés (Vigo). España.
- (3) Profesor asociado de Odontología en Pacientes Especiales. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Santiago de Compostela.

Diz P, Ocampo A, Fernández J. Alteraciones cuantitativas y funcionales de los neutrófilos. *Medicina Oral* 2002; 7: 206-21. © Medicina Oral. B-96689336 ISSN 1137-2834.

RESUMEN

El neutrófilo es una célula implicada en el mantenimiento de la homeostasis del organismo, con un especial protagonismo en el control y eliminación de determinados microorganismos patógenos. Los déficits cuantitativos y funcionales de los neutrófilos pueden ser congénitos o secundarios a factores etiológicos extrínsecos, y se traducen en procesos infecciosos recurrentes de severidad variable. Las complicaciones orales más frecuentes en estos pacientes son las aftas, la enfermedad periodontal y la candidiasis. Por su elevada susceptibilidad a las infecciones y el riesgo que conllevan las manipulaciones quirúrgicas, en este colectivo deben intensificarse las acciones de carácter profiláctico (hábitos de higiene oral, fluorizaciones, recomendaciones dietéticas, etc.). El empleo de factores estimuladores de colonias de granulocitos (G-CSF) permite en algunos casos la realización de procedimientos odontológicos hasta hace poco muy controvertidos; su administración exige una adecuada selección de pacientes y una estrecha colaboración entre el médico y el odontólogo. A pesar de la eficacia del G-CSF, el tratamiento odontológico de los pacientes con alteraciones severas de los neutrófilos cuantitativas y/o funcionales debe efectuarse en medio hospitalario. En ocasiones, la progresión de la enfermedad periodontal es inevitable a pesar de un adecuado mantenimiento.

Recibido: 20/07/01. Aceptado: 20/01/02.

Received: 20/07/01. Accepted: 20/01/02.

Palabras clave: neutrófilo, neutropenia, periodontitis, tratamiento odontológico, G-CSF.

INTRODUCCIÓN

Entre 1880 y 1920, el neutrófilo constituyó un objetivo prioritario de la investigación biomédica. Las técnicas de tinción empleadas por Paul Ehrlich le permitieron identificar "las células polinucleares" y posteriormente el zoólogo ruso Elya Metchnikoff describió la fagocitosis y formuló la teoría de la inmunidad celular. Aunque en las décadas siguientes hubo importantes aportaciones de autores como Karnovsky o Becker sobre la actividad inmunológica mediada por los neutrófilos, la información emergente acerca del papel primordial de los linfocitos y los macrófagos en la respuesta inmune desplazó a los neutrófilos a un segundo plano.

Sin embargo, en los últimos 25 años el neutrófilo ha recuperado una especial relevancia, fundamentada en la aplicación de nuevas técnicas de bioquímica y biología molecular, y tras el reconocimiento de una serie de enfermedades caracterizadas por infecciones recurrentes, presumiblemente atribuibles a una disfunción de la fagocitosis celular.

La importancia del neutrófilo quedó claramente justificada por Dmitry Gabilovich, uno de sus grandes investigadores, en el prólogo del libro *The neutrophils: new outlook for old cells* (1): "... pero al mismo tiempo este libro trata sobre todas las células humanas y sobre el organismo en sí, puesto que el neutrófilo como ninguna otra célula está implicado en el mantenimiento de la homeostasis del organismo. No es simplemente por su abundancia (más de 2×10^{10} células circulantes), sino porque estas células son capaces de realizar numerosas funciones. Producen radicales libres, fagocitan microorganismos, secretan citocinas, eliminan células tumorales, neutralizan virus, etc...."

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS NEUTRÓFILOS

Los neutrófilos derivan de células madre pluripotenciales localizadas en la médula ósea. Constituyen junto con los basófilos y los eosinófilos la denominada serie granulocítica, un grupo celular con núcleos multilobulados, numerosos gránulos citoplasmáticos de tinción característica y un lugar de acción tisular específico.

El desarrollo de los granulocitos en la médula ósea atraviesa dos fases bien diferenciadas, una mitótica y otra no mitótica. Cada fase dura aproximadamente una semana. En la mitótica las células maduran de mieloblastos a promielocitos y mielocitos, coincidiendo con la aparición de los gránulos citoplasmáticos característicos. En la fase no mitótica se desarrollan progresivamente los metamielocitos, los neutrófilos en cayado o inmaduros y finalmente los neutrófilos maduros. El desarrollo morfológico se acompaña de cambios en las propiedades físicas de la célula, aparición de antígenos de superficie específicos y maduración funcional. Existen básicamente dos tipos de gránulos en los neutrófilos: Los peroxi-

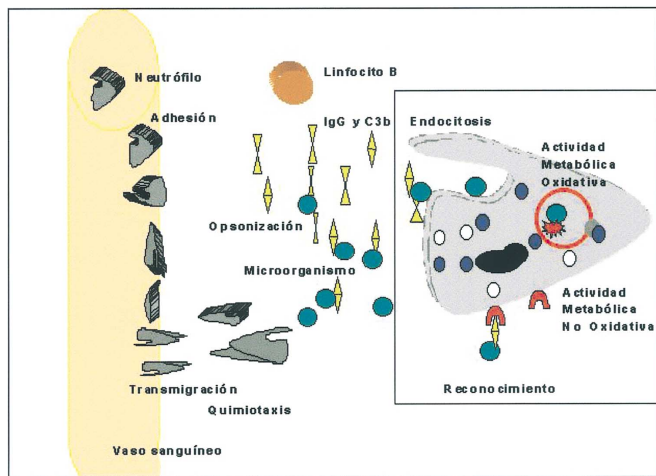


Fig. 1. Fases de la actividad fagocítica de los polimorfonucleares neutrófilos.
Phases of phagocytic activity in polymorphonuclear neutrophils.

dasa-positivos o primarios se tiñen de azul y son verdaderos lisosomas que contienen en su interior hidrolasas, proteasas, mieloperoxidasa, proteínas catiónicas, defensinas, lisozima y mucopolisacáridos. Los gránulos peroxidasa-negativos, secundarios o específicos, son más abundantes que los primarios y contienen lactoferrina, lisozima y proteína transportadora de vitamina B₁₂. En la superficie de la célula en reposo se han identificado receptores específicos para sustancias humerales como IgA, IgG, C3b y varios factores quimiotácticos.

La producción de neutrófilos se estima en 10¹¹ células/día, lo cual representa una reserva 10 veces superior al requerimiento diario habitual. Durante la infección aguda se movilizan los neutrófilos de la médula, cuya depleción activa la oferta celular mediante mecanismos compensadores como el aumento de las mitosis o el acortamiento del tiempo de maduración. La vida media intravascular de los neutrófilos es de 6 a 8 horas, mientras que en localizaciones extravasculares varía entre 7 horas y 14 días. La granulocitosis, expresión de una infección aguda, provoca una redistribución de los neutrófilos más que un incremento de su producción, liberando granulocitos de la reserva medular y del depósito marginal al circulante.

ACTIVIDAD FAGOCÍTICA

La función fagocítica de los polimorfonucleares neutrófilos es un mecanismo complejo, que se inicia con la localización del agente patógeno y concluye con su eliminación (Figura 1). En esta actividad están implicados múltiples factores, como las características de superficie del propio microorganismo, la liberación de opsoninas séricas, la activación de receptores de membrana específicos y los efectos moduladores de las citocinas del hospedador y de los productos secretados por el germen invasor (2).

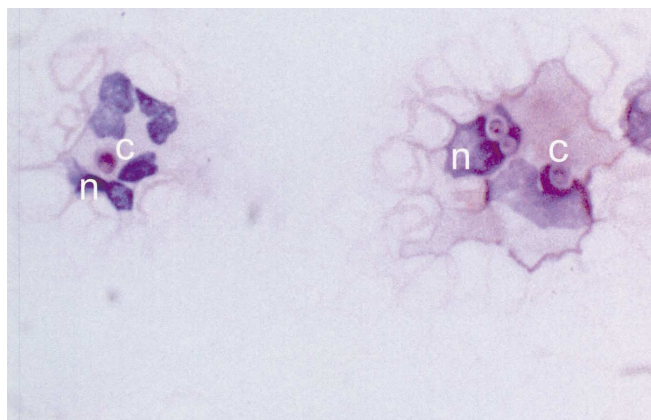


Fig. 2. Fagosomas constituidos por neutrófilos (n) con conidias (c) de *Candida albicans* en su interior.

Phagosomes constituted by neutrophils carrying Candida albicans conidia.

En la fase inicial de este proceso, los neutrófilos se desplazan por vía intravascular hacia el foco infeccioso, favorecidos por la acción quimiotáctica de sustancias liberadas por el microorganismo y por el propio hospedador, como C5a, LTB₄ o IL-8. El neutrófilo inicia entonces un proceso de adhesión mediado por selectinas a la pared del vaso; aunque inicialmente preserva su morfología esférica, después se aplana, aumentando la superficie de contacto con las células endoteliales, evitando de esta forma ser arrastrado por el flujo sanguíneo. Entonces se produce la adhesión firme a la pared vascular, mediada por las β-integrinas y por las moléculas de adhesión endoteliales (ICAM-1, ICAM-2). La trans migración es la fase final del tránsito del neutrófilo hacia los tejidos, y se modula por la presencia de las moléculas PECAM-3 y CD31, selectivamente localizadas en las uniones intercelulares.

Para favorecer el reconocimiento e ingestión del microorganismo por los neutrófilos, aunque no es imprescindible (lectinofagocitosis) (3), éste se recubre de opsoninas termoestables, principalmente IgG, y termolábiles, como la fracción C3b del complemento.

La endocitosis o ingestión es el resultado de la interacción entre los ligandos opsónicos y los receptores de membrana, con la participación de iones de calcio y magnesio, y la de energía proveniente de la glucólisis anaeróbica. La polimerización de los microfilamentos de actina, cercanos al lugar de unión receptor-opsonina, ocasiona un flujo circunferencial de la membrana celular alrededor de la partícula opsonizada. Los pseudópodos rodean al microorganismo hasta que sus extremos se funden, formando el fagosoma (Figura 2); este proceso exige una correcta interacción entre las proteínas contráctiles del neutrófilo: la actina, la proteína fijadora de la actina y la miosina. Las opsoninas además de favorecer la formación del fagosoma, modifican las características antifagocíticas de la superficie de los microorganismos, al proporcionarle un carácter más hidrófobo.

TABLA 1**Causas de neutropenia intrínseca**

• Neutropenia severa congénita o Síndrome de Kostmann
• Neutropenia congénita benigna
• Disgénesis reticular
• Neutropenia cíclica
• Síndrome de Schwachman-Diamond
• Neutropenias crónicas severas:
a) Mielocitosis.
b) Neutropenia asociada con inmunoglobulinopatías.
c) Neutropenia asociada a anomalías fenotípicas.
d) Neutropenia asociada a alteraciones metabólicas.

La activación de las membranas plasmática y fagosómica va a desencadenar en pocos segundos una serie de reacciones enzimáticas complejas, que requieren un consumo de oxígeno 100 veces superior al del neutrófilo en reposo. Los productos de este proceso metabólico son formas reducidas de oxígeno molecular con actividad germicida, como anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH^-) y oxígeno singlete. La producción de estas especies reactivas de oxígeno exige la transferencia de electrones, que se incorporan al oxígeno molecular desde el nicotinamida-adenín-dinucleótido-fosfato reducido (NADPH) procedente del metabolismo de la glucosa, dando lugar a la producción de anión superóxido y $NADP^+$; esta reacción está regulada por la NADPH-oxidasa. Dos moléculas de O_2^- y una de H_2 originan H_2O_2 y OH^- en presencia de superóxidodismutasa. La mieloperoxidasa, procedente de los gránulos primarios, facilita la reacción del H_2O_2 con los radicales CL^- , produciendo iones de hipoclorito (HCL^-). Los radicales libres de oxígeno producto de la actividad metabólica de los neutrófilos ejercen una intensa acción citotóxica; para evitar dañar las propias células del hospedador se precisa de un mecanismo protector regulado por enzimas como la catalasa y el glutatión. La importancia de este complejo mecanismo enzimático se ha corroborado clínicamente en pacientes diagnosticados de enfermedad granulomatosa crónica (4) o con déficit de mieloperoxidasa (5). La actividad metabólica de los neutrófilos se completa con una fase oxígeno-independiente, y finalmente el proceso de fagocitosis concluye con la destrucción de los gérmenes invasores en el interior de los polimorfonucleares.

ALTERACIONES CUANTITATIVAS

La neutropenia se define como un recuento absoluto de neutrófilos periféricos inferior a 2000×10^6 /litro, aunque estos valores presentan variaciones según la raza y el sexo. La aparición de infecciones en pacientes neutropénicos se correlaciona positivamente con el grado, la duración y la velocidad de instauración de la neutropenia (6-8). Algunos autores (9), han demostrado que la frecuencia de infecciones oportunistas graves en pacientes neutropénicos aumenta de forma expo-

TABLA 2**Causas de neutropenia adquirida**

• Inducida por drogas
- Predecible:
Citostáticos e inmunosupresores
- Idiosincrásica:
Fenotiacidas, aminopiridina, sulfamidas, quinidina antiinflamatorios no esteroideos, procainamida, penicilinas semisintéticas, antitiroideos, etc.
• Postinfecciosa
• Transplante de médula ósea
• Irradiación
• Deficiencias nutricionales
Vitamina B_{12}
Folatos
Cobre

nencial (10%, 19% y 28%) a medida que disminuye el recuento periférico de neutrófilos (1.000 , 500 y 100 células $\times 10^6$ /litro respectivamente). En base a su etiopatogenia, la neutropenia se clasifica en congénita o intrínseca y adquirida (Tablas 1 y 2).

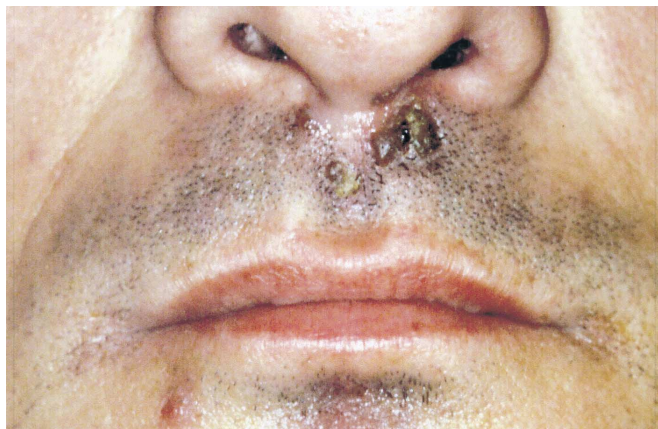
Las neutropenias congénitas constituyen un grupo heterogéneo caracterizado por la disminución de la producción o por defectos en la maduración de los neutrófilos en la médula ósea. Su severidad es variable dependiendo de la entidad que las define, y abarca desde procesos sin repercusión clínica como la neutropenia crónica benigna, hasta formas severas, asociadas a procesos infecciosos graves, que conllevan una elevada mortalidad.

Neutropenia severa congénita o Síndrome de Kostmann

Inicialmente se consideró una enfermedad autosómica recesiva, pero aún no se ha demostrado cuál es la mutación subyacente. Suele diagnosticarse durante el primer año de vida, y se caracteriza por neutropenia intensa (<500 células $\times 10^6$ /litro), infecciones bacterianas recurrentes y fallo en la maduración de los promielocitos a mielocitos (10). Las manifestaciones clínicas más frecuentes incluyen celulitis, abscesos perirectales, peritonitis, estomatitis y meningitis. Los gérmenes implicados con mayor frecuencia son *Staphylococcus aureus* y *Burkholderia aeruginosa* (10). Aunque los pacientes suelen tener niveles elevados de factor estimulador de colonias de granulocitos, habitualmente responden de forma favorable a la administración de factor estimulador recombinante (11).

Neutropenia congénita benigna

Aunque se considera una enfermedad hereditaria de transmisión autosómica dominante (12), en muchos casos no se ha

**Fig. 3.**

Impétigo por *Staphylococcus aureus* en un paciente con neutropenia congénita benigna.

Impetigo caused by Staphylococcus aureus in a patient with benign congenital neutropenia.

demostrado un patrón familiar. Bajo este epígrafe se engloban varios desórdenes habitualmente de curso benigno, con escasas complicaciones infecciosas mucocutáneas en general de carácter leve (13) (Figura 3). La neutropenia suele cronificarse, aunque se han descrito remisiones espontáneas durante la infancia (14), y en cualquier caso no precisa tratamiento.

Disgénesis reticular

Es un desorden autosómico recesivo. Se caracteriza por un defecto en la diferenciación de las células precursoras en células mieloides y linfoides. En consecuencia, aunque el desarrollo de la serie roja y las plaquetas es normal, existe una alteración importante en la producción de leucocitos, que se traduce en un déficit de polimorfonucleares y de linfocitos B y T. Los pacientes tienen un timo hipoplásico, con ausencia de linfocitos en el tejido linfoide, y en consecuencia suelen fallecer en los primeros meses de vida por infecciones diseminadas. Algunos enfermos pueden beneficiarse de un trasplante de médula ósea (15).

Neutropenia cíclica

Es una enfermedad que se transmite siguiendo un patrón autosómico dominante. Recientemente, se han identificado en estos pacientes mutaciones en el gen de la elastasa del neutrófilo (ELA2) (16). Se caracteriza por neutropenia muy severa (<200 células $\times 10^6$ /litro) de 3-6 días de duración, que se repite cada 21 días, aunque en algunos casos los ciclos de hematopoyesis pueden variar entre 2 y 5 semanas. Puede ser asintomática hasta la fase neutropénica, en la que aparecen úlceras aftosas, gingivitis, estomatitis y celulitis (10, 17). Durante los períodos de neutropenia se observa una falta de maduración de los precursores mieloides de los granulocitos a nivel medular, y durante el resto del ciclo es frecuente la

hiperplasia mieloide. Ocasionalmente, la severidad de la neutropenia y la incidencia de complicaciones infecciosas disminuyen con la edad (10, 17). El factor estimulador de colonias de granulocitos modula el número de neutrófilos circulantes y simultáneamente la constante diferenciación de las células madre hematopoyéticas, lo cual explicaría el incremento compensador de linfocitos circulantes, reticulocitos y plaquetas, detectado en ocasiones en los pacientes con neutropenia cíclica (18).

Síndrome de Schwachman-Diamond

Es una alteración autosómica recesiva poco frecuente, que se caracteriza por insuficiencia pancreática, anomalías esqueléticas, disfunción de la médula ósea e infecciones recurrentes (10). La neutropenia puede seguir un patrón cíclico o intermitente, y en el 10-25% de los casos hay pancitopenia (19). Las infecciones debutan en el primer año de vida y habitualmente afectan a los pulmones, huesos, senos, piel y tracto urinario (10). Estos pacientes presentan una especial predisposición a padecer aplasia medular, mielodisplasia y leucemia, por lo que su expectativa de vida es limitada, falleciendo habitualmente antes de los 35 años (20).

Neutropenias adquiridas

Entre las neutropenias adquiridas, las de origen postinfeccioso tienen una especial relevancia. Se ha demostrado que la exposición previa a determinados agentes virales favorece la aparición de infecciones bacterianas secundarias (21). Como ejemplo, basta recordar la elevada morbi-mortalidad asociada a las epidemias por el virus *Influenza A*, generalmente relacionada con infecciones de etiología bacteriana como *Streptococcus pneumoniae* o *Staphylococcus aureus* y en menor proporción por otras bacterias (*Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*) u hongos (*Aspergillus fumigatus*).

ALTERACIONES FUNCIONALES

Las disfunciones de los neutrófilos generalmente se asocian a defectos celulares intrínsecos de carácter hereditario, aunque en otras ocasiones son secundarias a factores etiológicos extrínsecos como fármacos, diabetes o determinadas infecciones.

Desde el punto de vista fisiopatológico las alteraciones funcionales de los neutrófilos pueden clasificarse en: defectos de adherencia y quimiotaxis, anomalías de la ingestión o endocitosis, y deficiencias de la actividad microbicida y la desgranulación (Tabla 3).

Las características clínicas de las infecciones en pacientes con alteraciones en la funcionalidad de los neutrófilos están condicionadas por el tipo de anomalía funcional que las define (22). En experimentos realizados en animales, se observó que existe un tiempo crítico que oscila entre 2 y 4 horas, desde la agresión del agente infeccioso hasta que se inicia la movilización de las células fagocíticas para prevenir la invasión bacte-

TABLA 3

Alteraciones de la funcionalidad de los neutrófilos	
1. Defectos de la adhesión leucocitaria	
<ul style="list-style-type: none"> • Tipo 1: déficit de integrina • Tipo 2: déficit de la molécula de unión E-selectina 	
2. Alteración de la quimiotaxis	
<ul style="list-style-type: none"> • Deficiencia de C5a • Disfunción de C5 (Enf. de Leiner) • Síndrome hiper-IgE o de Job • Factores séricos inactivadores celulares • Síndrome de Chédiak-Higashi • Síndrome del leucocito perezoso • Hipofosfatemia 	
3. Defectos de la opsonización	
<ul style="list-style-type: none"> • Deficiencia del complemento • Deficiencia de anticuerpos 	
4. Alteraciones en los gránulos	
<ul style="list-style-type: none"> • Síndrome de Chédiak-Higashi • Deficiencias de gránulos específicos • Déficit de mieloperoxidasa 	
5. Deficiencia de la actividad oxidativa	
<ul style="list-style-type: none"> • Enfermedad granulomatosa crónica • Deficiencias de NADPH • Deficiencias de G6PD • Deficiencias de glutatión reductasa y/o sintetasa 	

riana. En los pacientes con defectos de adhesión leucocitaria, las lesiones típicamente carecen de pus y están constituidas por tejidos necróticos con escaso componente inflamatorio. Por el contrario, cuando existen defectos moderados o intermitentes de la migración de los neutrófilos, como en el síndrome de Job, los abscesos presentan abundante celularidad (neutrófilos y macrófagos), presumiblemente por la llegada tardía de los neutrófilos al lugar de la infección. Sin embargo, en los pacientes con disminución de la capacidad bactericida de los neutrófilos, como en la enfermedad granulomatosa crónica, los abscesos son difusos, afectando a planos profundos, y contienen granulomas con o sin material purulento. La piel y los tejidos afectados presentan típicamente lesiones pustulosas con escaso componente inflamatorio (23).

Las infecciones en los individuos con alteraciones de la funcionalidad de los neutrófilos generalmente son producidas por microorganismos habituales de las mucosas y la piel (Figura 3), como: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*, *Candida spp.* o *Aspergillus spp.*. Estos pacientes, a diferencia de los enfermos neutropénicos en los que son frecuentes las bacteriemias y la diseminación de la infección a tejidos profundos como la médula ósea, normalmente pueden contener la infección y limitarla a los ganglios linfáticos y/o el hígado, resultando infrecuente la afectación sistémica.

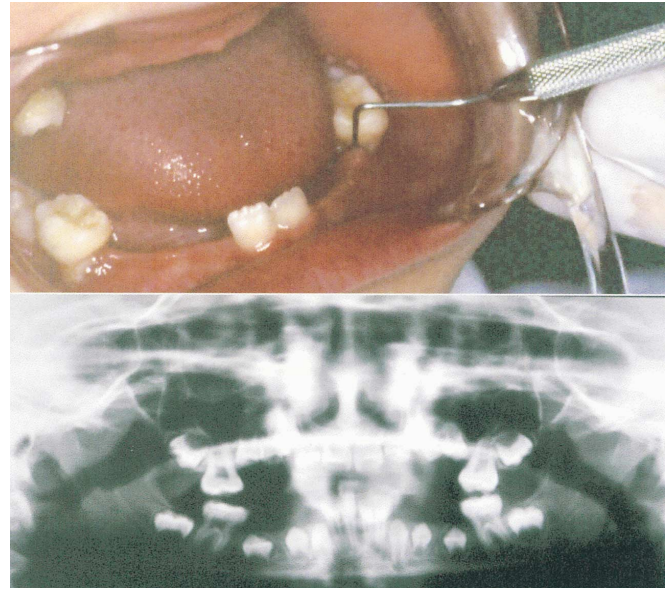


Fig. 4.

Exfoliación prematura de la dentición temporal y severa pérdida de inserción periodontal de los dientes definitivos, en una niña con déficit de adhesión leucocitaria.

Early exfoliation of temporal teeth and severe lost of periodontal insertion of permanent teeth in a child with leukocyte adhesion deficiency.

Déficit de adhesión leucocitaria

Es una enfermedad de transmisión autosómica recesiva. Los neutrófilos son incapaces de adherirse a la superficie del endotelio, por una alteración de las integrinas y/o de las selectinas. A nivel molecular se ha demostrado la ausencia o la expresión reducida de determinadas glicoproteínas en la superficie celular como CD18 (déficit de adhesión tipo 1) (24) o un defecto en la fucosilación de los hidratos de carbono (déficit de adhesión tipo 2) (25). Los polimorfonucleares son incapaces de emigrar hasta el foco infeccioso, y en consecuencia aumentan los niveles de neutrófilos circulantes, mientras la formación de pus y la cicatrización de heridas están limitadas. Se han identificado dos variedades fenotípicas en el déficit de adhesión tipo 1: una forma severa en la que los pacientes fallecen habitualmente en la infancia por diseminación de procesos infecciosos y un fenotipo moderado que se caracteriza clínicamente por infecciones frecuentes mucocutáneas y del tracto digestivo. En el área maxilofacial son frecuentes las celulitis, la sinusitis, la otitis recurrente y la mastoiditis. La gingivitis y la periodontitis son una constante en estos enfermos y conducen inexorablemente a la pérdida prematura de los dientes y del hueso alveolar (26) (Figura 4). En algunos pacientes se ha aplicado con éxito el trasplante de médula ósea, y en el déficit de tipo 2 la administración de fucosa.

Síndrome de Chédiak-Higashi

Esta enfermedad autosómica recesiva se caracteriza por la presencia de grandes inclusiones intracelulares de origen liso-

somial en el interior de granulocitos, monocitos y linfocitos (27). A nivel molecular se ha detectado una mutación en el gen *LYST*, que codifica una proteína citoplasmática involucrada en la formación de vacuolas y en el transporte de proteínas (28). Los neutrófilos tiene alterada la quimiotaxis y la capacidad bactericida. Las manifestaciones clínicas más frecuentes son: infecciones bacterianas por *Streptococcus spp* y *Staphylococcus aureus*, neuropatía periférica, retraso mental moderado, albinismo oculocutáneo, disfunción plaquetaria y enfermedad periodontal severa (27, 29). El pronóstico de estos pacientes es casi invariablemente fatal (23). La fase más avanzada de la enfermedad se caracteriza por infiltración tisular linfocítica e histiocítica, pancitopenia y diatesis hemorrágica. En algunos enfermos se han obtenido respuestas favorables tras someterlos a trasplante de médula y con la administración de ácido ascórbico.

Deficiencia de gránulos específicos

Se trata de una entidad muy poco frecuente descrita en 1972 (30) que sigue un patrón de transmisión recesivo (31). En el interior de los neutrófilos no se detectan gránulos específicos, fundamentales en los procesos inflamatorios, y en cambio se observan gránulos pequeños y elongados, que carecen de constituyentes esenciales como lactoferrina, citocromo b y vitamina B₁₂ (32). En los gránulos basófilos también se han descrito irregularidades, como la reducción de tamaño (33) y la ausencia de defensinas (34). Entre las anomalías funcionales de los neutrófilos de estos pacientes destacan el deterioro de la quimiotaxis y de la capacidad bactericida (31). Las complicaciones más habituales son de carácter infeccioso, producidas por *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis*, *Pseudomona aeruginosa* y *Candida albicans*, y afectan principalmente a los pulmones, piel y mucosas (23). La supervivencia de estos enfermos está supeditada básicamente al tratamiento precoz y agresivo de las infecciones concomitantes (35).

Déficit de mieloperoxidasa

La deficiencia hereditaria de mieloperoxidasa se considera la alteración congénita más frecuente de los neutrófilos, con una prevalencia de 1 caso cada 2.000 nacimientos (36). Esta enzima constituye el principal componente de los gránulos basófilos y cataliza la formación de hipoclorito. En la actualidad su diagnóstico se efectúa mediante citometría de flujo, pero la mieloperoxidasa también puede detectarse por tinción histoquímica de extensiones de sangre periférica. Los neutrófilos presentan una actividad metabólica oxidativa exagerada y conservan ralentizada su capacidad germicida. Aunque se ha demostrado *in vitro* que el hipoclorito tiene acción bactericida, el déficit de mieloperoxidasa generalmente es asintomático, salvo en pacientes con otras enfermedades condicionantes de la respuesta inmunológica como la diabetes, que presentan una especial susceptibilidad a padecer candidiasis diseminada (37).

Enfermedad granulomatosa crónica

Los primeros casos de la posteriormente denominada enfermedad granulomatosa crónica fueron descritos por Janeway *et al.* (38) en 1954, al observar varios niños con hipergammaglobulinemia e infecciones severas recurrentes. La incidencia estimada de este extraño desorden es de 1 caso por cada millón de nacimientos. Se reconocen una forma clásica que se transmite ligada al cromosoma X, y una segunda variante, clínicamente indistinguible de la primera, autosómica recesiva (39). Los neutrófilos de estos enfermos tienen un defecto en el sistema de la NADPH-oxidasa, una enzima imprescindible para producir especies reactivas del oxígeno y en consecuencia para la destrucción intracelular de microorganismos. Los pacientes presentan infecciones por gérmenes catalasa-positivos como *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens* o *Aspergillus spp*, que suelen debutar en los primeros años de vida y afectan a piel, pulmones, ganglios linfáticos y vísceras (39). Las manifestaciones clínicas más frecuentes son acné severo, inflamación persistente y dolorosa de las narinas, úlceras orales y formación de granulomas que pueden originar obstrucciones del tracto genitourinario y digestivo. El tratamiento más utilizado para prevenir la aparición de infecciones oportunistas es el interferón gamma (40), aunque en la actualidad se está ensayando el trasplante alogénico de células precursoras en combinación con terapia génica (41).

Alteraciones funcionales de origen extrínseco

Entre las alteraciones de la funcionalidad de los neutrófilos de origen extrínseco, destacan las secundarias a la exposición a determinados virus, como: *citomegalovirus*, *rubeola*, *influenza*, *herpes virus*, *hepatitis B*, *parvovirus*, etc. (21, 42-46), que explicarían la elevada prevalencia de procesos bacterianos consecutivos a ciertas infecciones virales. El mecanismo etiopatogénico por el que el virus actúa sobre el neutrófilo todavía no está bien establecido. En particular, en estudios efectuados sobre el virus *Influenza A*, se ha demostrado que la disfunción leucocitaria puede ocurrir en el tejido pulmonar, incluso sin viremia (47). Estas alteraciones ocurren a los pocos minutos del contacto de los neutrófilos con el virus, e incluso se han observado con la sola presencia de determinados componentes virales como la hemaglutinina (48). Otros autores por el contrario, atribuyen esta acción a las neuraminidasas del virus (49) o a la disregulación de la proteína G (50).

MANIFESTACIONES ORALES Y TRATAMIENTO ODONTOLÓGICO

Las complicaciones orales más frecuentes relacionadas con la neutropenia son las aftas (Figura 5), la gingivitis severa y la periodontitis (51-59). Aunque gran parte de estas observaciones se fundamentan en casos clínicos aislados (55, 57), la mayoría de los autores consideran que la pérdida de inserción periodontal y el edentulismo prematuro son hallazgos habituales en pacientes con déficits cuantitativos de los



Fig. 5.

Úlcera aftosa en un paciente con neutropenia crónica.

Aphthous ulcer in a patient with chronic neutropenia.

neutrófilos (60). Se ha insinuado que estos enfermos también pueden tener una especial susceptibilidad a presentar caries y patología pulpar (61).

En los pacientes pediátricos con alteraciones funcionales de los neutrófilos como la enfermedad granulomatosa crónica (62, 63) o el síndrome de Chédiak-Higashi (64-68), las manifestaciones más comunes a nivel orofacial son las ulceraciones de la mucosa, la sinusitis recurrente, la linfadenopatía cervical y la candidiasis. La periodontitis prepuberal generalizada se ha definido como la expresión oral de determinadas enfermedades sistémicas, incluyendo la deficiencia de adhesión leucocitaria, y la periodontitis prepuberal localizada se ha relacionado con defectos en la quimiotaxis de los neutrófilos (69). En este contexto, Tinanoff *et al.* (70) después de efectuar un seguimiento durante 15 años a una paciente con síndrome de Papillon-Lefèvre, observaron que las bacterias periodontopáticas desaparecieron coincidiendo con la regularización de la funcionalidad de los neutrófilos. Sin embargo, en los niños con disfunciones primarias de los polimorfonucleares, la afectación periodontal no parece especialmente destacable, detectándose con cierta frecuencia otras anomalías dentarias como hipoplasia de esmalte (18% de los casos) o retraso de la erupción (12% de los casos) (71).

En estos pacientes la prevención y el control de procesos infecciosos intraorales, con el fin de minimizar la necesidad de tratamiento quirúrgico, constituye un pilar fundamental del abordaje odontológico (72). Las medidas preventivas convencionales como la aplicación de flúor tópico, los sellados de fisuras, las recomendaciones dietéticas y la promoción de la salud oral, cobran una especial importancia. En pacientes con neutropenia cíclica (61) y síndrome de Kostmann (73), se ha demostrado que la remoción periódica (mensual) de placa y cálculo, el empleo de antisépticos (clorhexidina al 0,2%) y el tratamiento periodontal ayudan a mantener la inserción periodontal. Sin embargo, en otros pacientes con disfunción de los neutrófilos, la periodontitis y la movilidad dentaria progresan

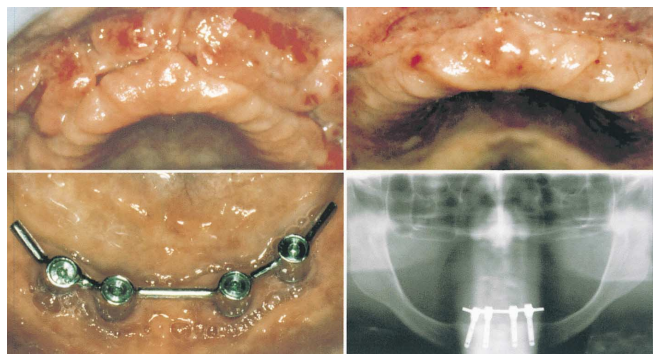


Fig. 6.

Paciente con pérdida prematura de dentición definitiva por periodontitis severa y subsiguiente reabsorción de la cresta alveolar, por neutropenia asociada a glucogenolisis tipo II. Inicialmente se planificó cirugía ortognática bimaxilar con injerto autólogo de cresta ilíaca y rehabilitación protésica implantosoportada. Para minimizar el trauma quirúrgico se optó por una vestibuloplastia y prótesis mucosoportada superior, y la inserción de implantes osteointegrados en la mandíbula. El proceso se efectuó bajo cobertura antibiótica prolongada, administrando G-CSF durante los 5 días previos a cada sesión quirúrgica.

Patient suffering from early lost of permanent teeth due to severe periodontitis and atrophic alveolar crest due to type II glucogenolisis neutropenia. Bimaxilar orthognathic surgery with allograft of iliac crest and implant-supported prosthesis was initially planned. In order to minimize surgical trauma, vestibulum oris rebuilding and superior mucosal-supported prosthesis were performed along with the insertion of osseointegrated implants in jaw. The process was carried out under prolonged antibiotic treatment, administering G-CSF the previous five days to each surgical session.

inevitablemente a pesar de un adecuado mantenimiento (74). En consecuencia, hasta hace algunos años, la cirugía periodontal se consideraba una práctica contraindicada (72). Otras medidas profilácticas relevantes para minimizar el riesgo de bacteriemia son: los enjuagues con antisépticos (clorhexidina) previos a cualquier manipulación odontológica, la administración de antibióticos en los días previos y posteriores a la intervención, y el cierre primario del lecho quirúrgico (72).

En 1966 Bradley y Metcaf (75) descubrieron los “factores estimuladores de colonias”, unas glicoproteínas que regulan la producción y diferenciación de las células progenitoras mieloides y la funcionalidad de las células sanguíneas maduras. Algunos de estos factores se han caracterizado molecularmente y se producen, con finalidades terapéuticas, aplicando tecnología de ADN recombinante. En particular, los factores estimuladores de colonias de granulocitos (G-CSF), de macrófagos (M-CSF), de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y la interleucina 3 (IL-3), se han desarrollado como agentes terapéuticos potenciales (76, 77). El G-CSF y el GM-CSF se han aplicado en el contexto de neutropenias asociadas al Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, neutropenia inducida por quimioterapia, trasplante de médula ósea, mielodisplasia y anemia aplásica. Además, el G-CSF se ha utilizado con éxito en pacientes con neutropenia congénita, cíclica e idiopática (78).

El G-CSF ha permitido en los últimos años la realización de maniobras médico-quirúrgicas diagnósticas y terapéuticas, incluyendo manipulaciones odontológicas (78, 79), en pacientes neutropénicos seleccionados. Los neutrófilos producidos en respuesta al G-CSF muestran una capacidad quimiotáctica y fagocítica normal o superior a las habituales, reduciendo la prevalencia y la severidad de las complicaciones infecciosas en estos pacientes. La dosis y la duración del tratamiento estarán condicionadas por la etiología y severidad de la neutropenia, y por la naturaleza de la manipulación odontológica; en consecuencia, el manejo de estos pacientes exige una estrecha colaboración entre el odontólogo y el médico. La dosis habitual es de 0,5 millones de unidades (5µg)/Kg de peso/día, por vía subcutánea o intravenosa. En pacientes con neutropenia crónica leve o moderada susceptibles de tratamiento odontológico cruento, la administración del fármaco durante 3-5 días suele ser suficiente. El tratamiento odontológico de pacientes con neutropenia severa (< 500 célulasx10⁶/litro) debe efectuarse en medio hospitalario. El empleo de G-CSF está contraindicado en pacientes con síndrome de Kostmann con citogenética anormal, en los sín-

dromes mielodisplásicos y en la leucemia mieloide crónica. Tampoco se recomienda su administración en neutropenias transitorias, como las relacionadas con determinadas infecciones víricas. Entre sus efectos secundarios destacan trombopenia, esplenomegalia y con menor frecuencia anemia, aumento transitorio de los progenitores mieloides y hematuria/proteinuria. Al planificar el tratamiento odontológico hay que tener presente que al interrumpir la administración del fármaco se produce habitualmente al cabo de 1-2 días una disminución importante (hasta el 50%) del número de neutrófilos circulantes, normalizándose los niveles 1-7 días más tarde. La administración de G-CSF se ha relacionado con la resolución de úlceras orales en pacientes neutropénicos (78). Su aplicación permite además la realización de procedimientos odontológicos hasta hace poco muy controvertidos, como raspajes y alisados (79), cirugía preprotésica o inserción de implantes dentales (Figura 6).

Agradecimientos: Al Dr. J. Fdez. Sanromán (Servicio de Cirugía Maxilofacial de POVISA, Vigo), que realizó la fase quirúrgica del paciente de la Figura 5.

Quantitative and functional neutrophil deficiencies

SUMMARY

Neutrophil is a cell involved in the maintenance of homeostasis of the organism. It plays an important role in the elimination and control of certain pathogenic microorganisms. Deficiency in function and quantity of neutrophils, either due to congenital or secondary etiological extrinsic factors, lead to recurrent infectious processes of variable severity. The most frequent oral complications in these patients are ulcers, periodontal disease and candidiasis. Due to their high susceptibility to infections and the risk implied in undergoing surgical procedures, actions leading to a higher degree of prophylaxis must be carried out on these patients (oral hygiene habits, fluoridation, dietary advise, etc.). The use of granulocyte colony-stimulating factors (G-CSF) allows, in some cases, the fulfilment of some, until recently considered controversial dental procedures. Its administration demands an adequate selection of patients and a close collaboration between physician and dental practitioner. Despite G-CSF effectiveness, dental treatment in severe neutropenic patients must be carried out in a hospital and, in some cases, regardless of adequate care, the progress of periodontal disease cannot be avoided.

Key words: neutrophil, neutropenia, periodontitis, dental treatment, G-CSF.

INTRODUCTION

Between 1880 and 1920, the neutrophil became a priority in the field of the biomedical research. Paul Ehrlich's stain techniques allowed him to identify "the polinuclear cells". Afterwards, the Russian zoologist Elya Metchnikoff described phagocytosis and formulated the theory of cellular immunity. Although in the following decades some important studies about the immunological activity performed by neutrophils were published by Karnovsky, Becker and other authors, the new information about the primary role of lymphocytes and macrophages in the immune response pushed the neutrophil out of the spotlight.

Nevertheless, in the last 25 years the neutrophil has recovered special importance due to the implementation of new methods in biochemistry and molecular biology as well as the identification of a number of diseases, characterized by recurrent infections, probably due to cellular phagocytosis dysfunction.

The importance of the neutrophil became clearly established by Dmitry Gabrilovich, one of the most important researchers on this field. In the prologue of his book *The neutrophils: new outlook for old cells* he claims that (1): "...But

at the same time this book is also about all human cells and the organism itself, since the neutrophil as no other cell is involved in maintaining homeostasis of the organism. It is not simply because of their abundance (more than 2×10^{10} intravascular cells), but mainly because these cells are able to perform numerous functions. They produce free radicals, phagocytize microorganisms, secrete a number of cytokines, kill tumor cells, neutralize viruses, etc...."

GENERAL CHARACTERISTICS OF NEUTROPHILS

Neutrophils are derived from pluripotential stem cells placed in the bone marrow. Along with basophiles and eosinophiles, they constitute the granulocytic series, a cellular group with multilobulated nuclei, and numerous cytoplasmic granules of peculiar staining and a specific place of tissular action.

The development of granulocytes in the bone marrow undergoes two different stages: a mitotic stage and a non-mitotic stage. Each phase lasts for about a week. In the mitotic stage, cells undergo a transformation from mieloblastes to promielocytes and mielocytes, coinciding with the appearance of the characteristic cytoplasmic granules. During the non-mitotic stage, cells develop into metamielocytes, crook or immature neutrophils, and, lastly, into mature neutrophils. The morphological development goes along with changes in the physical characteristics of the cell as well as with the development of specific surface antigens and functional maturity. Neutrophils have two main types of granules: Positive peroxidase or primary granules dye blue and are authentic lysosomes holding hidrolases, proteases, mieloperoxidase, cationic proteins, defensins, lysozyme and mucopolisacarides inside. The negative peroxidase granules, either secondary or specific, are more abundant than the others, and contain lactoferrine, lysozyme and protein conveyor of B₁₂ vitamin. On the surface of the cell at rest, specific receivers of humoural substances such as IgA, IgG, C3b as well as several chemotactic factors have been identified.

The production of neutrophils is estimated in 10^{11} cells/day, which represents a stock 10 times higher than the usual daily request. During severe infections, neutrophils in the bone marrow are activated, and their depletion stimulates the cell availability by means of compensatory mechanisms such as the increase in mitosis and the reduction in maturity time. The average intravascular life of neutrophils ranges between 7 hours to 14 days. The increase of granulocyte count caused by severe infection, provokes a redistribution of neutrophils rather than an increase in their production, liberating granulocytes from the bone marrow reserve and from the marginal to the circulating pool.

PHAGOCYTTIC ACTIVITY

The phagocytic function of polymorphonuclear neutrophils is a complex mechanism, which is triggered by the detection of a pathogenic agent and ends with its elimination

TABLE 1

Causes of intrinsic neutropenia

• Congenital severe neutropenia or Kostmann's syndrome
• Congenital benign neutropenia
• Reticular dysgenesis
• Cyclic neutropenia
• Schwachman-Diamond syndrome
• Severe chronic neutropenias: <ul style="list-style-type: none"> a) Myelocatesis. b) Neutropenia related to immunoglobulinopathies. c) Neutropenia related to phenotypic abnormalities. d) Neutropenia related to metabolic alterations.

(Figure 1). There are several factors implied in this activity such as surface characteristics of the microorganism, liberation of seric opsonine, activation of specific membrane receptors, modulating effects of host cytokines and secreted products by the invading germ (2).

In the beginning of the process, the neutrophils move throughout the intravascular space towards the focus of infection, helped by the chemiotactic action of substances liberated from the microorganism and the host, like C5a, LTb4 and IL-8. At that moment, the neutrophil starts a process of adhesion to the vascular wall favoured by selectines. Although at the beginning it keeps its original form, it finally becomes flat to increase the contact surface with the endothelial cells, phenomenon which prevents it from being swept away by the bloodstream. Then, a firm adhesion to the vascular wall occurs, helped by β_2 -integrines and endothelial adhesion molecules (ICAM-1, ICAM-2). Transmigration is the final stage of the neutrophil movement towards the tissue and it is modulated by PECAM-3 and CD31 molecules which are selectively placed at intercellular joints.

In order to favour the identification and ingestion of a microorganism by neutrophils, thermo-stable opsonines (lectinophagocytosis) (3), specially IgG as well as thermolabile opsonines such as the complemente C3b fraction usually cover them.

The ingestion or endocytosis is the result of the interaction among opsonic ligates and membrane receptors, helped by calcium and magnesium ions and also energy coming from anaerobic glucolisis. The actine microfilament polimerization surrounding the opsonine-receiver union causes a circular flow of the cellular membrane placed around the opsonized particle. The pseudopods surround the microorganism until the extremes fuse together, becoming the phagosome (Figure 2). This process needs the correct interaction of neutrophil contractile proteins: the actin, the proteine which fixes the actin and the myosin. The opsonines, besides favouring the formation of the phagosome, modify the antiphagocytic characteristics of microorganisms surface by turning them more hydrophobic.

TABLE 2

Causes of acquired neutropenia

• Caused by drugs <ul style="list-style-type: none"> - Predictable: <ul style="list-style-type: none"> cytostatics and immunodepresants - Idiosyncratic: <ul style="list-style-type: none"> phenothiazide, aminopiridine, sulfas, quinidine, NSAIDs, procainamide, semisynthetic penicillins, etc.
• Postinfectious
• Bone marrow transplantation
• Radiation
• Nutritional deficiencies <ul style="list-style-type: none"> B₁₂ Vitamin Folates Copper

In a few seconds, the plasmatic and phagosomic membrane activation will develop a series of complex enzymatic reactions which require an oxygen consumption 100 times higher than the neutrophil at rest. The products in this metabolic process are reduced forms of molecular oxygen with germicide action such as the superoxyde anion (O_2^-); hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxile radical (OH) and singlete oxygen. The production of these oxygen reactive species needs electron transference which becomes incorporated to the molecular oxygen from the reduced phosphate-dinucleotide-adenin-nicotinamide (NADPH) derived from the glucose metabolism and producing the superoxide anion and $NADP^+$; this reaction being regulated by NADPH-oxydase. Two O_2 molecules and one H_2 become H_2O_2 and OH under the presence of superoxidodysmutase. The myeloperoxidase, coming from primary granules, helps the H_2O_2 reaction with CL radicals, producing hypochlorite ions (OCL). Oxygen free radicals resulting from the neutrophil metabolic activity have an intense cytotoxic action. In order to prevent damage in the host cells, a protecting mechanism regulated by enzymes like catalase and glutation is needed. The importance of this complex enzymatic mechanism has been clinically proved in patients diagnosed with chronic granulomatous disease (4) or myeloperoxidase deficiency (5).

The neutrophil metabolic activity is completed with an oxygen-free phase. Finally, the phagocytosis process ends with the invading germ destruction by polymorphonuclear cells.

QUANTITATIVE ALTERATIONS

Neutropenia is defined as an absolute circulating neutrophil count lower than 2000×10^6 /litre, even though these values vary according to race and sex. The appearance of infections in neutropenic patients is positively related to the degree,

length and speed of the neutropenic establishment (6-8). Some authors (9) have proved that frequency of severe opportunistic infections increases in exponential mode (10%, 19% and 28%), in relation to the decrease of the circulating neutrophil count (1000, 500 and 100 cellsx10⁶/litre respectively). According to their etiopathogenia, the neutropenia is classified as congenital or acquired (Tables 1 and 2).

Congenital neutropenias are included in a heterogeneous group characterized either by a decrease in the production or by defects in the neutrophils maturity process in the bone marrow. There are different degrees of severity depending on the entity which defines them and which includes processes such as benign chronic neutropenia without clinical repercussion and also other more severe manifestations of neutropenia, associated to serious infectious processes and which imply a high death rate.

Severe congenital neutropenia or Kostmann's syndrome

At first, it was classified as a recessive autosomal disease but the underlying mutation has not been found yet. It is often diagnosed within the first year of life and is characterized by severe neutropenia (<500 cellsx10⁶/litre), recurrent bacterial infections and failure in the maturation from promyelocytes into mielocytes (10). The most common clinical manifestations include cellulitis, perirectal abscesses, peritonitis, estomatitis and meningitis. The most commonly implied germs are *Staphylococcus aureus* and *Burkholderia aeruginosa* (10). Although these patients usually have high levels of stimulating granulocyte colonies, they often have a good response to the administration of recombinating stimulating factor (11).

Benign congenital neutropenia

Although it is a hereditary disease with dominant autosomal transmission (12), even though a family pattern has not been proved in many cases. In this group, several benign disorders are included. They present scarce generally mild mucocutaneous infections (13) (Figure 3). Neutropenia usually becomes chronic although spontaneous remissions during childhood (14) have been described. In any case, treatment is not needed.

Reticular dysgenesis

This is an autosomal recessive disorder. It is characterized by a defect in the differentiation of a precursor from myeloid and lymphoid cells. As a result, even though the development of the red series and platelets is normal, there is an important defect in the production of leukocytes that causes a deficiency of polimorphonuclears and B and T lymphocytes. These patients suffer from a hypoplastic thymus, absence of lymphocytes in the lymphoid tissue and, consequently, they usually die within the first months of life due to spread infections. Some of them can benefit from a bone marrow transplantation (15).

Cyclic neutropenia

This disease is transmitted following a dominant autosomal pattern. Recently, mutations in the neutrophil elastase gen (ELA2) (16) have been identified. It is characterized by a very severe neutropenia (<200 cellsx10⁶/litre) lasting from 3 to 6 days every 21 days, although in some cases the hematopoiesis cycles can vary from 2 to 5 weeks. It can be asymptomatic except in the neutropenic stage when aphthous ulcers, gingivitis, stomatitis and cellulitis appear (10, 17). During the neutropenic periods, a lack of maturity in the myeloid precursors of granulocytes in the bone marrow is observed; in the rest of the cycle, the patient usually suffers from myeloid hyperplasia. Occasionally, the neutropenia severity and the incidence of infectious complications decrease with age (10, 17). The stimulant factor of granulocyte colonies modulates the number of circulating neutrophils and, at the same time, the constant differentiation of hematopoietic stem cells, which explains the compensatory increase of circulating lymphocytes, reticulocytes and platelets, observed sometimes in patients suffering from cyclic neutropenia (18).

Schwachman-Diamond syndrome

It is a very uncommon recessive autosomal alteration, characterized by pancreas failure, bone abnormalities, bone marrow dysfunction and recurrent infections (10). The neutropenia can follow a cyclic or intermittent pattern. From 10 to 25% of the patients suffer from pancytopenia (19). The infections appear within the first year of life and usually affect the lungs, bones, sinus, skin and urinary tract (10). These patients have a special tendency to suffer from medullar aplasia, myelodysplasia and leukemia and so, their life expectancy is limited, usually dying before being 35 years-old (20).

Acquired neutropenias

Among the acquired neutropenias, those of postinfectious origin have special importance. It has been proven that previous exposure to certain viral agents favours the development of secondary bacterial infections (21). For instance, we can mention the high levels of morbi-mortality associated to the influenza A virus, generally related to infections of bacterial etiology such as *Streptococcus Pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* and occasionally, caused by other bacteria (*Haemophilus influenzae*, *Neiseria meningitidis*) or fungi (*Aspergillus fumigatus*).

FUNCTIONAL ALTERATIONS

Neutrophil dysfunctions are usually associated to hereditary intrinsic cell defects, although sometimes they are a consequence to extrinsic etiological factors such as prescription drugs, diabetes and certain infections.

Physiopathologically, the neutrophil functional alterations can be classified in adherence and chemotaxis defects, inges-

TABLE 3

Alterations in neutrophils function

1. Defects in the leukocytic adhesion
<ul style="list-style-type: none"> • Type 1: integrin deficiency • Type 2: E-selectin deficiency
2. Alteration in the chemotaxis
<ul style="list-style-type: none"> • C5a deficiency • C5 dysfunction (Leiner disease) • Hiper-IgE or Job Syndrome • Seric cell inactive factors • Chédiak-Higashi syndrome • Lazy leukocyte syndrome • Hypophosphatemia
3. Opsonization defects
<ul style="list-style-type: none"> • Complement deficiency • Antibodies deficiency
4. Granules alterations
<ul style="list-style-type: none"> • Chédiak-Higashi syndrome • Specific granule deficiencies • Myeloperoxidase deficiency
5. Oxidative activity deficiency
<ul style="list-style-type: none"> • Granulomatous chronic disease • NADPH deficiencies • G6PD deficiencies • Reductase and/or sintetase glutation deficiencies

tion abnormalities or endocytosis and deficiencies in the microbicida activity and the granule production (Table 3).

Clinical characteristics of infections in patients with alterations in neutrophil function are conditioned by the kind of functional alteration which defines them (22). Experiments carried out in animals have proven the existence of a critical period which lasts from 2 to 4 hours from the infectious agent aggression until the phagocytic cells response to prevent the bacterial invasion. In patients with leukocyte adhesion defects, the lesions have a less pus and are formed by necrotic tissues with scarce inflammatory components. On the contrary, in the case of moderate or intermittent defects in the neutrophil migration as Job's syndrome, the abscesses present abundant cells (neutrophils and macrophages), presumably due to the late arrival of neutrophils to the infected area. Nevertheless, patients who suffer from a decrease in the neutrophil bactericide activity as in the case of the chronic granulomatous disease, abscesses are spread out, affect to deep levels and have granulomas with or without purulent material. The skin and the affected tissues typically present pustules with a scarce inflammatory component (23).

Infections in patients who present alterations in the neutrophil function are often consequence of habitual microorganisms in skin and mucous membranes (Figure 3), like

Staphylococcus aureus, *Pseudomonas*, *Candida spp.* and *Aspergillus spp.* Unlike neutropenic patients who suffer from bacteraemias and dissemination of infectious in deep tissues as the bone marrow, these patients can commonly limit the infection to the lymphatic nodes and the liver, being the systemic involvement infrequent.

Leukocyte adhesion deficiency

This is a disease of autosomal recessive transmission. The neutrophils are incapable of adhering to the endothelial surface due to an alteration either in the integrins or the selectins or both. At a molecular level the absence or the reduced level of certain glycoproteins on the cell surface such as CD18 (Type 1 adhesion deficiency) (24) have been proven. A defect in the fucosilation of carbohydrates (Type 2 adhesion deficiency) (25) has been found as well. The polymorphonuclear cells are incapable of reaching the focus of infection and as a consequence, there is an increase in the number of circulating neutrophils whereas pus formation and wound healing are poor. Two phenotypes of adhesion deficiency type 1 have been identified: a severe manifestation where patients usually die throughout childhood due to the spread of infectious processes and a moderate phenotype which is clinically characterized by frequent mucocutaneous as well as digestive tract involvement. Cellulitis, sinusitis, recurrent otitis and mastoiditis are frequent infections in the maxillofacial area. Gingivitis and periodontitis become chronic and lead to premature lost of teeth and alveolar bone (26) (Figure 4). A bone marrow transplant has been successfully carried out in some patients while those suffering from type 2 deficiency have been administered fucosa.

Chédiak-Higashi Syndrome

This autosomal recessive disease is characterized by the presence of giant lysosomal granules in granulocytes, monocytes and lymphocytes (27). At the molecular level, a mutation in the *LYST* gene which encodes a cytoplasmic proteine involved in the vacuoles formation and the transportation of proteins has been detected (28). The neutrophils have altered their chemotaxis and bactericide capacity. The most common clinical manifestations are bacterial infections caused by *Streptococcus spp* and *Staphylococcus aureus*, peripheral neuropathia, moderate mental deficiency, eyes and skin involvement, albinism, platelet dysfunction and severe periodontal disease (27,29). The prognosis in these patients is almost invariably lethal (23). The most advanced phase of the disease is characterized by hystiocytic and lymphocytic tissue infiltration, pancytopenia and haemorrhagical disorders. Some patients have improved after a bone marrow transplantation and the administration of ascorbic acid.

Specific granule deficiency

It is a very rare congenital recessive disorder, first described in 1972 (30). Inside the neutrophils, these patients have a lack of

specific granules, necessary in the inflammatory processes. Instead, they present small elongated granules which lack lactoferrin, b cytochrome and vitamin B₁₂ (32). The azurophilic granules also present abnormalities like size reduction (33) and lack of defensins (34). The most consistent neutrophil dysfunctions are the impairment of chemotaxis and deficient bactericidal activity (31). They are specially susceptible to suffer from several infections owing to *Staphylococcus aureus* and *epidermidis*, *Pseudomona aeruginosa* and *Candida albicans*, affecting lungs, skin and mucous membranes (23). These patients may survive only when they are treated for their concomitant infections promptly and aggressively (35).

Myeloperoxidase deficiency

Myeloperoxidase deficiency is considered as the most common of neutrophil congenital disorders with a prevalence of 1 in 2,000 births (36). This enzyme is the main component of azurophilic granules and it is the catalyst in the production of hypochlorite. Currently, it is diagnosed using flow cytometry although myeloperoxidase can be also detected by histochemistry stain of peripheral blood. The neutrophils show supranormal oxydative burst and delayed bactericidal activity. Although it has been proven *in vitro* that hypochlorite acid has bactericidal action, myeloperoxidase deficiency is generally asymptomatic, except in patients with other immunological disorders as diabetes, since these patients often present disseminated candidiasis (37).

Chronic Granulomatous Disease

The first cases of Chronic Granulomatous Disease were described by Janeway *et al.* (38) in 1954, after observing several children presenting hypergammaglobulinemia and severe recurrent infections. The estimated incidence of this rare disorder is 1 in 1,000,000 births. There is an X-linked heritage, although a second variant, clinically identical, presents an automal recessive transmission (39). In these patients, neutrophils have a defect in the NADPH oxidase system, a necessary enzyme to produce oxygen reactive species and, as a consequence, to kill intracellular microorganisms. Most of the infections suffered by these patients come from catalase-positive organisms such as *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens* and *Aspergillus spp.*, which are usually developed within the first years of life and affect lungs, skin, lymphatic nodes and viscera (39). The most common clinical manifestations are severe acne, recurrent painful inflammatory narines, oral ulcers and granulomas which can cause oesophageal, antral or genitourinary tract obstruction. The most commonly prescribed treatment is gamma interferon (40), even though it is being currently tried T-cell-depleted hematopoietic allograft combined with gene therapy (41).

Functional alterations of extrinsic origin

Among the functional alterations suffered by neutrophils with extrinsic origin, the most important ones are those of consequence to exposure to certain viruses such as citomega-

lovirus, rubeola, influenza, herpes virus, hepatitis B, parvovirus, etc. (21, 42-46). This explains the high prevalence of bacterial processes suffered after certain viral infections. The ethiopatogenic mechanism that explains how the virus works against the neutrophil is not clear yet. Several pieces of research into the Influenza A virus proved that the leukocyte dysfunction could happen in pulmonary tissues even without viremia (47). These alterations happen a few minutes after the contact between the virus and the neutrophils. And it was even proved that it just happens in the presence of certain viral components like hemagglutinin (48). On the contrary, other authors attribute this action either to the virus neuraminidase (49) or to the G protein dysregulation (50).

ORAL MANIFESTATIONS AND DENTAL TREATMENT

The most common oral complications related to neutropenia are ulcers (Figure 5), severe gingivitis and periodontitis (51-59). Although these observations were done in a small number of patients (55-57), most authors consider the lost of periodontal insertion and premature edentulism as common problems in patients with neutrophil quantitative deficiency (60). It has been pointed out that these patients can more easily present caries and dental pulp pathology (61).

Paediatric patients with neutrophil functional alterations such as chronic granulomatous disease (62-63) and Chédiak-Higashi syndrome (64-68) often suffer from mucous ulcerations, recurrent sinusitis, cervical lymphadenitis and candidiasis. The generalized pre-puberal periodontitis has been defined as the oral expression of certain systemic diseases, including the leukocyte adhesion deficiency. The local pre-puberal periodontitis has been related to neutrophil chemotaxis defects (69). Tinanoff *et al.* (70) after carrying out for 15 years a follow-up in a patient suffering from the Papillon-Lefevre syndrome, observed that the periodontopathic bacteria disappeared after the neutrophil functionality regularization. Nevertheless, children suffering from polymorphonuclear primary dysfunctions do not have an important periodontal disease, while they have other dental anomalies such as enamel hypoplasia (18% of the cases) and retarded tooth eruption (12% of the cases) (71).

Preventive measures and control of intraoral infectious processes to minimize the necessity of surgical treatment must be a constant characteristic in the dental treatment of these patients (72). Conventional preventive measures like use of topic fluor, fissure sealants, dietetic advise and promotion of oral health become specially important. It has been proven that the periodic removal (monthly) of plaque and calculus as well as the use of antiseptics (clorhexidine 0.2%) and periodontal treatment in patients with cyclic neutropenia (61) and Kostmann's syndrome (73) help to keep the periodontal insertion. Nevertheless, other patients with neutrophil dysfunction suffer unavoidably from periodontitis and dental mobility even with adequate care (74). As a consequence, periodontal surgery started to be considered only recently (72). Other prophylactic measures to minimize the bacteraemia risk are:

antiseptic rinse (Clorhexidine) previous to any dental treatment, antibiotic administration before and after surgery and the primary closing of the surgical wound (72).

In 1966 Bradley and Metcalf (75) discovered the "colony stimulant factors", that are the glycoproteins which regulate the production and differentiation of myeloid progenitor cells as well as the function of mature blood cells. Several of these factors have been mollecularly characterized and are produced for therapeutical reasons applying DNA recombinant technology. Particularly, granulocyte (G-CSF), macrophage (GM-CSF) and both granulocyte and macrophage colonies stimulant factors (GM-CSF) as well as interleukine 3 (IL-3) have been developed as potential therapeutic agents (76, 77). Both the G-CSF and the GM-CSF have been applied in the context of neutropenia associated to AIDS, neutropenia caused by chemotherapy, bone marrow transplantation, myelodysplasia and aplastic anemia. In addition, the G-CSF treatment has been succesfully prescribed in patients suffering from cyclic and idiopathic congenital neutropenia (78).

In the last few years, G-CSF has allowed the fulfillment of diagnostic tests and therapeutic medical-surgical procedures, including dental treatment (78,79) in selected neutropenic patients. The neutrophils produced as an answer to G-CSF have normal and even increased chemotactic and phagocytic capacity, diminishing the prevalence and severity of infectious complications in these patients. Dose and length of treatment will be conditioned by etiology and severity of the neutropenia and also by the type of dental procedure. As a consequence, these patients should be treated under a close collaboration between physician and dental practitioner. The usual dose is 0.5 million units (5µg)/Kg weight/day by subcutaneous via or intravenous infusion. In patients suffering from light and moderate chronic neutropenia able to undergo surgical dental treatment, the administration of the drug for 3-5 days should be enough. Dental treatment in patients with

severe neutropenia (<500 cellsx10⁶/litre) should be carried out in the hospital. The use of G-CSF is not indicated in patients with Kostmann's syndrome showing an abnormal cytogenetic, myelodysplasic syndromes and chronic myeloid leukemia. Moreover, its administration is not recommended in temporary neutropenia like those related to some viral infections. Among their side effects, thrombopenia, splenomegalia and less frequently anemia, transitory increase of myeloid progenitors and haematuria/proteinuria have been described. Two days after the last dose of the pharmacological treatment, patients usually suffer a relevant decrease of their circulating neutrophils (up to 50%) and it takes 1-7 days to reach their normal level again. This has to be taken into account when planning the dental treatment. The administration of G-CSF has been related to the resolution of oral ulcers in neutropenic patients (78). Its use allows the carrying out of some dental treatments such as root scaling (79), preprothetic surgery and dental implants insertion (Figure 6) which had been very controversial until recently.

Acknowledgements: Special thanks to Dr. J. Fdez. Sanromán (Maxillofacial Surgery Service, POVISA, Vigo) who carried out the surgical treatment of the patient in Figure 5.

CORRESPONDENCIA/CORRESPONDENCE

Pedro Diz Dios
C/ Panamá 2; 2ºdcha.
36203 Vigo (España)
Tfno.: 981-563100 ext. 2344
Fax: 981-562226
E-mail: pdiz@usc.es

BIBLIOGRAFÍA/REFERENCES

- Gabrilovich DI. The neutrophils: new outlook for old cells. London: Imperial Collegue Press; 1999; preface.
- Diamond RD. Fungal surfaces: effects of interactions with phagocytic cells. Rev Infect Dis 1988; 10 Suppl 2: S428-31.
- Ofek I, Sharon N. Lectinophagocytosis: a molecular mechanism of recognition between cell surface sugars and lectins in the phagocytosis of bacteria. Infect Immun 1988; 56: 539-47.
- Cohen MS, Isturiz RE, Malech HL, Root RK, Wilfert CM, Gutman L, *et al.* Fungal infection in chronic granulomatous disease. The importance of the phagocyte in defense against fungi. Am J Med 1981; 71: 59-66.
- Rotrosen D, Gallin JI. Disorders of phagocyte function. Annu Rev Immunol 1987; 5: 127-50.
- Pizzo PA. After empiric therapy: what to do until the granulocyte comes back. Rev Infect Dis 1987; 9: 214-9.
- Gabrilove JL, Jakubowski A, Scher H, Sternberg C, Wong G, Grous J *et al.* Effect of granulocyte colony-stimulating factor on neutropenia and associated morbidity due to chemotherapy for transitional-cell carcinoma of the urothelium. N Engl J Med 1988; 318: 1414-22.
- Dale DC, Bonilla MA, Davis MW, Nakanishi AM, Hammond WP, Kurtzberg J *et al.* A randomized controlled phase III trial of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (filgrastim) for treatment of severe chronic neutropenia. Blood 1993; 81: 2496-502.
- Bodey GP, Buckley M, Sathe YS, Freireich EJ. Quantitative relationships between circulating leukocytes and infection in patients with acute leukemia. Ann Intern Med 1966; 64: 328-40.
- Berini JC. Diagnosis and management of chronic neutropenia during childhood. Pediatr Clin North Am 1996; 43: 773-92.
- Freedman MH. Safety of long-term administration of granulocyte colony-stimulating factor for severe chronic neutropenia. Curr Opin Hematol 1997; 4: 217-24.
- Nathan DG, Oski SH, eds. Hematology of infancy and childhood. 5th ed. Vol 1. Philadelphia: WB Saunders; 1998: 276-8.
- Weetman RM, Boxer LA. Childhood neutropenia. Pediatr Clin North Am 1980; 27: 361-75.

14. Dale DC, Guerry D, Wewerka JR, Bull JM, Chusid MJ. Chronic neutropenia. *Medicine* 1979; 58: 128-44.
15. Levinsky RJ, Tiedeman K. Successful bone marrow transplantation for reticular dysgenesis. *Lancet* 1983; 671-3.
16. Horwitz M, Benson KF, Person RE, Aprikyan AG, Dale DC. Mutations in ELA2, encoding neutrophil elastase, define a 21-day biological clock in cyclic haematopoiesis. *Nat Genet* 1999; 23: 433-6.
17. Dale DC, Hammond WP. Cyclic neutropenia: a clinical review. *Blood Rev* 1998; 2: 178-85.
18. Palmer SE, Stephens KB, Dale DC. Genetics, phenotype, and natural history of autosomal dominant cyclic hematopoiesis. *Am J Med Genet* 1996; 66: 413-22.
19. Haurie C, Dale DC, Mackey MC. Cyclic neutropenia and other periodic hematological disorders: a review of mechanisms and mathematical models. *Blood* 1998; 92: 2629-40.
20. Smith OP, Hann IM, Chessells JM, Reeves BR, Milla P. Haematological abnormalities in Schwachman-Diamond syndrome. *Br J Haematol* 1996; 94: 279-84.
21. Abramson JS, Mills EL. Depression of neutrophil function induced by viruses and its role in secondary microbial infections. *Rev Infect Dis* 1988; 10: 326-41.
22. Howard MW, Strauss RG, Johnston RB, Jr. Infections in patients with neutropenia. *Am J Dis Child* 1977; 131: 788-90.
23. Mills EL, Noya F, J.D. Congenital neutrophil deficiencies. En: J.S. Abramsson and J.G. Wheeler eds. *The Neutrophil*; New York: 1993; 183-215.
24. Etzioni A, Doerschuk CM, Harlan JM. Of man and mouse: leukocyte and endothelial adhesion molecule deficiencies. *Blood* 1999; 94: 3281-8.
25. Marquardt T, Brune T, Luhn K, Zimmer KP, Korner C, Fabritz L *et al.* Leukocyte adhesion deficiency II syndrome, a generalized defect in fucose metabolism. *J Pediatr* 1999; 134: 681-8.
26. Brown E. Neutrophil adhesion and the therapy of inflammation. *Semin Hematol* 1997; 34: 319-26.
27. Introne W, Boissy RE, Gahl WA. Clinical, molecular, and cell biological aspects of Chediak-Higashi syndrome. *Mol Genet Metabol* 1999; 68: 283-303.
28. Nagle DL, Karim MA, Woolf EA, Holmgren L, Bork P, Misumi DJ *et al.* Identification and mutation analysis of the complete gene for Chediak-Higashi syndrome. *Nat Genet* 1996; 14: 307-11.
29. Blume RS, Wolff SM. The Chédiak-Higashi syndrome: Studies in four patients and a review of the literature. *Medicine* 1972; 51: 247-80.
30. Spitznagel JK, Cooper MR, McCall AE, DeChatelet LR, Welsh IRH. Selective deficiency of granules associated with lysozyme and lactoferrin in human polymorphonuclear leukocytes with reduced microbicidal capacity. *J Clin Invest* 1972; 51: 93a.
31. Gallin JI. Neutrophil specific granule deficiency. *Annu Rev Med* 1985; 36: 263-74.
32. Rosenberg HF, Gallin JI. Neutrophil-specific granule deficiency includes eosinophils. *Blood* 1993; 82: 268-73.
33. Parmley RT, Gilbert CS, Boxer LA. Abnormal peroxidase-positive granules in "specific granule" deficiency. *Blood* 1989; 73: 838-44.
34. Ganz T, Metcalf JA, Gallin JI, Boxer LA, Lehrer RI. Microbicidal/cytotoxic proteins of neutrophils are deficient in two disorders: Chédiak-Higashi syndrome and "specific" granule deficiency. *J Clin Invest* 1988; 82: 552-6.
35. Strauss RG, Bove KE, Jones JF, Mauer AM, Fulginiti VA. An anomaly of neutrophil morphology with impaired function. *N Engl J Med* 1974; 290: 478-84.
36. Nauseef WM. Myeloperoxidase deficiency. *Hematol Pathol* 1990; 4: 165-78.
37. Lanza F. Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency. *J Mol Med* 1998; 76: 676-81.
38. Janeway CA, Craig J, Davidson M, Downey W, Gitlin D, Sullivan JC. Hypergammaglobulinemia associated with severe recurrent and chronic nonspecific infection. *Am J Dis Child* 1954; 88: 388-9.
39. Winkelstein JA, Marino MC, Johnston RB JR, Boyle J, Curnutte J, Gallin JI *et al.* Chronic granulomatous disease: report on a national registry of 368 patients. *Medicine (Baltimore)* 2000; 79: 155-69.
40. The International Chronic Granulomatous Disease Cooperative Study Group. A controlled trial of interferon gamma to prevent infection in chronic granulomatous disease. *N Engl J Med* 1991; 324: 509-16.
41. Horwitz ME, Barrett AJ, Brown MR, Carter CS, Childs R, Gallin JI *et al.* Treatment of chronic granulomatous disease with nonmyeloablative conditioning and a T-cell-depleted hematopoietic allograft. *N Engl J Med* 2001; 344: 881-8.
42. Maggiore G, De Giacomo C, Marconi M, Sacchi F, Scotta MS. Defective neutrophil motility in children with chronic liver disease. *Am J Dis Child* 1983; 137: 768-70.
43. Davies DH, McCarthy AR, Keen DL. The effect of parainfluenza virus type 3 and *Pasteurella haemolytica* on oxygen-dependent and oxygen-independent bactericidal mechanisms of ovine pulmonary phagocytic cells. *Vet Microbiol* 1986; 12: 147-59.
44. Roilides E, Mertins S, Eddy J, Walsh TJ, Pizzo PA, Rubin M. Impairment of neutrophil chemotactic and bactericidal function in children infected with human immunodeficiency virus type 1 and partial reversal after in vitro exposure to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Pediatr* 1990; 117: 531-40.
45. Abramson JS, Wheeler JG. Virus-induced neutrophil dysfunction: role in the pathogenesis of bacterial infections. *Pediatr Infect Dis J* 1994; 13: 643-52.
46. McClain K, Estrov Z, Chen H, Mahoney DH, Jr. Chronic neutropenia of childhood: frequent association with parvovirus infection and correlations with bone marrow culture studies. *Br J Haematol* 1993; 85: 57-62.
47. Lipscomb MF, Yeakel-Houlihan D, Lyons CR, Gleason RR, Stein-Streilein J. Persistence of influenza as an immunogen in pulmonary antigen-presenting cells. *Infect Immun* 1983; 42: 965-72.
48. Cassidy LF, Lyles DS, Abramson JS. Depression of polymorphonuclear leukocyte functions by purified influenza virus hemagglutinin and sialic acid-binding lectins. *J Immunol* 1989; 142: 4401-6.
49. Kiyotani K, Takei N, Matsuo Y. Depression of luminol-enhanced chemiluminescence of guinea pig polymorphonuclear leukocytes by influenza virus with special reference to neuraminidase. *Hiroshima J Med Sci* 1985; 34: 81-6.
50. Abramson JS, Hudnor HR. Decreased binding of specific monomeric and trimeric G-proteins with the plasma membrane of polymorphonuclear leukocytes exposed to influenza A virus. *J Immunol* 1995; 155: 2571-8.
51. Lekstrom-Himes JA, Gallin JI. Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. *N Eng J Med* 2000; 343: 1703-14.
52. Degnan EJ, Perlov AW. Infected oral lesions of cyclic neutropenia. *J Oral Med* 1973; 28: 29-31.
53. Vann WF, Oldenberg TR. Atypical hereditary neutropenia: case reports of two siblings. *J Dent Child* 1976; 49: 265-9.
54. Wade AB, Stafford JL. Cyclical neutropenia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1963; 16: 1443-8.
55. Lampert F, Fessler A. Periodontal changes during chronic benign granulocytopenia in childhood. A case report. *J Clin Periodontol* 1975; 2: 105-10.
56. Cohen WD, Morris AT. Periodontal manifestations of cyclic neutropenia. *J Periodontol* 1961; 32: 154-68.
57. Rylander H, Ericsson I. Manifestations and treatment of periodontal

- disease in a patient suffering from cyclic neutropenia. *J Clin Periodontol* 1981; 8: 77-87.
58. Scully C, McFadyen EE, Campbell A. Orofacial manifestations in cyclic neutropenia. *Br J Oral Surg* 1985; 20: 96-101.
 59. Wright DG, Dale DC, Fauci AS, Wolff SM. Human cyclic neutropenia: clinical review and long term follow-up. *Medicine (Baltimore)* 1981; 60: 1-13.
 60. Da Fonseca MA, Fontes F. Early tooth loss due to cyclic neutropenia: long-term follow-up of one patient. *Spec Care Dentist* 2000; 20: 187-90.
 61. Pernu HE, Pajari UH, Lanning M. The importance of regular dental treatment in patients with cyclic neutropenia. Follow-up of 2 cases. *J Periodontol* 1996; 67: 454-9.
 62. Johnston RB, Newman SL. Chronic granulomatous disease. *Pediatr Clin N Am* 1977; 24: 365-75.
 63. Cohen MS, Leong P, Simpson DM. Phagocyte cells in periodontal defence. Periodontal status of patients with chronic granulomatous disease of childhood. *J Periodontol* 1985; 56: 611-7.
 64. Donohue WA, Bain HW. Chediak-Higashi syndrome. A lethal familial disease with anomalous inclusions in the leukocytes and constitutional stigmata. Report of a case with necropsy. *Pediatr* 1957; 20: 416-30.
 65. Gillig JL, Caldwell CH. The Chediak-Higashi syndrome: case report. *J Dent Child* 1970; 37: 527-9.
 66. Weary PE, Bender AS. The Chediak-Higashi syndrome with severe cutaneous involvement. *Archs Int Med* 1967; 110: 381-6.
 67. Blume RS, Wolff SM. The Chediak-Higashi syndrome; studies in few patients and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 1972; 51: 247-80.
 68. Hamilton RE, Giansanti JS. The Chediak-Higashi syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1974; 37: 754-61.
 69. Watanabe K. Prepubertal periodontitis: a review of diagnostic criteria, pathogenesis, and differential diagnosis. *J Periodontol Res* 1990; 25: 31-48.
 70. Tinanoff N, Tempro, Maderazo EG. Dental treatment of Papillon-Lefevre syndrome: 15-year follow-up. *J Clin Periodontol* 1995; 22: 609-12.
 71. Porter SR, Scully C. Orofacial manifestations in primary immunodeficiencies: polymorphonuclear leukocyte defects. *J Oral Pathol Med* 1993; 22: 310-1.
 72. Mishkin DJ, Akers JO, Darby CP. Congenital neutropenia. Report of a case and a biorationale for dental management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1976; 42: 738-45.
 73. Saglam F, Atamer T, Onan U, Soydinc M, Kirac K. Infantile genetic agranulocytosis (Kostmann type). A case report. *J Periodontol* 1995; 66: 808-10.
 74. Shibutani T, Gen K, Shibata M, Horigucki Y, Kondo N, Iwayama Y. Long-term follow-up of periodontitis in a patient with Chediak-Higashi syndrome. A case report. *J Periodontol* 2000; 71: 1024-8.
 75. Bradley TR, Metcalf D. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1966; 44: 287-94.
 76. Dale DC, Nelson S. Use of colony-stimulating factors for treatment of neutropenia and infectious diseases. En: Gabrilovich DI. *The neutrophils: new outlook for old cells*. London: Imperial College Press; 1999: 319-44.
 77. Boxer LA, Todd III RF. Therapeutic modulation of neutrophil number and function. En: Abramson JS, Wheeler JG eds. *The neutrophil*. New York: Oxford University Press; 1993: 275-83.
 78. Hasturk H, Tezcan I, Yel L, Ersoy F, Sanal O, Yamalik N *et al*. A case of chronic severe neutropenia: oral findings and consequences of short-term granulocyte colony-stimulating factor treatment. *Aust Dent J* 1998; 43: 9-13.
 79. Goultschin J, Attal U, Goldstein M, Boyan BD, Schwartz Z. The relationship between peripheral levels of leukocytes and neutrophils and periodontal disease in a patient with congenital neutropenia. *J Periodontol* 2000; 71: 1499-505.