

U. A. N. L.

**FACULTAD DE MEDICINA
SUBDIRECCION DE ESTUDIOS SUPERIORES**



MAESTRIA EN MICROBIOLOGIA MEDICA

**"EFECTO DE LAS TETRACICLINAS SOBRE LA
QUIMIOTAXIS LEUCOCITARIA. ESTUDIO DOBLE
CIEGO EN PACIENTES CON ACNE VULGARIS."**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS
PRESENTADO POR**

ALMA YOLANDA ARCE MENDOZA

MONTERREY, N. L., JULIO 1983

FM

RS43

.T4

A7

c.1



1080071360

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA
SUBDIRECCION DE ESTUDIOS SUPERIORES

MAESTRIA EN MICROBIOLOGIA MEDICA

"EFECTO DE LAS TETRACICLINAS SOBRE LA QUIMIOTAXIS
LEUCOCITARIA. ESTUDIO DOBLE CIEGO EN PACIENTES
CON ACNE VULGARIS".

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS
PRESENTADO POR

ALMA YOLANDA ARCE MENDOZA

MONTERREY, N.L., JULIO, 1983

TM
R 43
.T4
A7



El presente trabajo se llevó a cabo en el
Depto. de Microbiología de la Facultad de
Medicina de la U.A.N.L.

Bajo la asesoría del

DR. MANUEL A. RODRIGUEZ QUINTANILLA
Jefe del Departamento

DEDICATORIA

A DIOS NUESTRO SEÑOR

Creador de mi existencia, por
su infinita bondad.

Con todo mi amor a mis Padres:

SR. JESUS ARCE MOCTEZUMA

y

SRA. MA.DEL CONSUELO MENDOZA DE ARCE

Creadores de mi persona, por su infinito cariño,
confianza, paciencia y estímulos constantes por
mi superación personal y académica, haciendo ca
so omiso de su dolor cuando he tenido que estar
lejos de ellos.

A mi Hermano:

JESUS ARMANDO

Por su cariño, respeto
y ayuda en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

A mi Asesor Académico:

DR. MANUEL A. RODRIGUEZ Q.
Guía incansable de los que
tratamos de seguir su ejemplo.

A mis Maestros:

Compañeros del Depto. de Micro
biología, por sus enseñanzas y
ayuda en todo momento.

A mis Colaboradores:

MSc. VIOLETA C. TINOCO CABRIALES
Q.C.B. ROSA MA. HINOJOSA ROBLES
Sin cuya ayuda incondicional no
hubiera realizado este trabajo
tan eficazmente.

Al DR. OLIVERIO WELSH LOZANO:

SubJefe del Depto. de Dermatología del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González".
Por su apoyo, cooperación y entusiasmo para la realización de esta investigación.

Al Personal Administrativo del Depto. de Microbiología:

SRA. JUANY NIÑO DE GUZMAN

SRA. MARYCELA A. DE LA PEÑA DE SALINAS

SRA. ROSALBA DE LEON DE ESTRADA

Por su apoyo y paciencia en la transcripción de esta tesis.

En forma especial al DR. MARIO CESAR SALINAS CARMONA

Cuya imagen me estimula a seguirme superando

A todos aquellos que me rodean y me brindan su amistad, apoyándome a seguir adelante.

INTRODUCCION

Desde 1882, el zoólogo ruso Elias Metchnikoff hizo sus primeras observaciones estudiando el papel de las células móviles de la estrella de mar en la protección contra de algún agente extraño. Este experimento puede considerarse el punto de partida de la inmunología celular. Koch y Neisser ya habían establecido que ciertas bacterias podían invadir a ciertos tejidos y a leucocitos y posteriormente Metchnikoff demostró que estos eran los que habían enguido a los microorganismos en el afán de proteger el organismo, fenómeno que denominó "fagocitosis", por lo cual concluyó que este era el principal mecanismo de defensa (1). En 1895, Jules Bordet en su reporte sobre las propiedades del suero inmune (de animales inmunizados con varias cepas de vibrio) y del suero no inmune, mencionaba que la fagocitosis constituía un proceso regular de defensa del huésped pero cuya capacidad para matar a los microorganismos era secundaria a la acción primaria de las sustancias con capacidad bactericida presentes en los sueros de los animales (2).

Metchnikoff que había observado esta misma acumulación de células en los organismos inferiores, afirmó en 1892 que en los organismos superiores, la diapedesis era un proceso de penetración o paso de estas células a través de la pared de los vasos. Quizá en este momento se inicia también el estudio de la locomoción dirigida que se llama actualmente quimiotaxis (1).

El estudio de la quimiotaxis data desde aquellos tiempos y estimularon a los investigadores a iniciar los primeros intentos para evaluar este mecanismo.

Como es sabido en la actualidad, los leucocitos polimorfonucleares son la primera línea de defensa celular que entra en juego cuando un organismo es invadido por un agente extraño. Todo el fenómeno involucra una serie de eventos que deben funcionar en el momento y sitio adecuado para llevar a cabo bien su función. Así el estudio de todo este mecanismo que abarca cuatro fases importantes, quimiotaxis, fagocitosis, digestión intracelular y eliminación, deben constatarse, ya que cualquier factor que altera alguno de estos procesos, puede conducir a una falla en su función, que se expresaría en los casos de cuadros clínicos infecciosos como una mala resolución de ellos; tal vez influyendo también en la producción y aparición de la respuesta inmune adquirida. En esta forma la respuesta inmunológica se comporta como un Estado Totalitario en el cual se expulsa a los "extranjeros", se tolera a los "ciudadanos" que se comportan bien y se elimina a aquellos que muestran alteración de su conducta normal, siendo este un complejo mecanismo de Vigilancia de la Integridad Biológica en la naturaleza.

La quimiotaxis es el proceso por el cual los leucocitos se movilizan a la vecindad de los tejidos invadidos por los microorganismos. Esta movilidad dirigida puede ser ocasionada por diferentes tipos de factores quimiotácticos y se pueden dividir en varias categorías según Gadebusch (3):

- a) Factores que son liberados por microorganismos cuya composición química de unos parece ser la de una proteína de bajo peso molecular, de aproximadamente 4,000 daltons.
- b) Factores séricos entre los que se encuentran los componentes de C₃ y C₅ del complemento, que activados por ambas vías, la clásica y la alterna, tiene una gran potencialidad. La vía clásica -

se puede activar con complejo antígeno-anticuerpo, por la proteína C reactiva que unida a los carbohidratos de algunas bacterias, forman un complejo capaz de activarlo. La vía alterna puede ser activada por polisacáridos, lipopolisacáridos o endotoxinas é inmunoglobulinas agregadas que interactúan con la properdina para activarla. También las prostaglandinas E_2 parecen tener esta actividad.

- c) Factores generados de los mismos leucocitos o de las células del tejido dañado y de los linfocitos T sensibilizados. Esta aparentemente, es una proteína de un peso molecular aproximado de - - 140,000 Daltons.
- d) Finalmente pequeños péptidos sintéticos principalmente la formil metionil-fenilalanina o productos naturales como el glucógeno, - caseína, etc. también pueden activarlo.

La quimiotaxis requiere de energía y es iniciada por el -- contacto de la sustancia quimioattractante sobre la membrana celular, lo que conduce a la producción de ella por la glucólisis y el ciclo de desviación de hexosamonofosfato, de manera que activan los microfilamentos que contienen actina y los microtúbulos que poseen tubulina - - (probablemente sea un compuesto de miosina) que proporcionan la movi-lidad requerida para impulsar a las células hacia el foco attractante. Raven y colaboradores (4) estudiaron estas estructuras en macrófagos y su papel en el movimiento que necesitan para llevar a cabo la inges-tión.

El efecto hace recordar a lo que ocurre con el movimiento muscular de los organismos superiores para su locomoción, sobre todo - la miosina hallada en los fagocitos puede tener una íntima relación mo

lecular con la encontrada en el movimientos muscular.

Una vez que los leucocitos han llegado al sitio del llamado - quimiotáctico, se inicia el proceso de la fagocitosis. Najjar (5) menciona la presencia de una enzima en la membrana denominada leucocinasa que - rompe una gamaglobulina secretada por el bazo en pequeños tetrapéptidos - llamados proteína de Tuftsin y que estimulan la fagocitosis. Lo mismo hacen los receptores para C3b y Fc de las inmunoglobulinas IgG1 é IgG3 propuesto desde 1968 por Janeway donde él menciona el papel de los anticuerpos y el complemento en la fagocitosis (6).

Independientemente de los receptores que le sirvan para recibir la señal del agente quimiotáctico y para la ingestión, Hatch y colab. (7) demostraron que varias substancias quimioattractantes estimulaban la - acumulación del GMPc de un 40% a un 70%, mientras que los quimiomoduladores producen un aumento menor de este nucleótido, lo que determina el movimiento de la célula.

DeChatelet (8) y Mandell (9) hacen una revisión de la actividad bactericida de los ^{*}PMN la cual puede variar dependiendo de las condiciones aeróbicas ó anaeróbicas en que se encuentren y del tipo de microorganismos a digerir. La presencia de los lisosomas que se han clasificado según su contenido, en gránulos primarios ó azurófilos que poseen lactoferrina, proteínas catiónicas y fagocitina y en gránulos secundarios ó específicos que contienen enzimas hidrolíticas, y los mecanismos bactericidas resultantes de los demás procesos bioquímicos dan a los leucocitos su carácter "asesino" destinado a la destrucción microbiana.

Todas las funciones del fagocito pueden estar alteradas, ya sea por factores extrínsecos tales como neutropenias, deficiencias del --

* PMN.- Polimorfonucleares

complemento, de inmunoglobulinas, por efectos de fármacos, etc., o por factores intrínsecos relacionados con deficiencias enzimáticas en la vía metabólica necesaria para la digestión (deficiencia de mieloperoxidasa, NADPH, etc.). Es decir, que la quimiotaxis puede estar alterada o ser defectuosa por disminución de los factores quimiotácticos en la sangre o por una falla o deterioro de la célula que no responde a los estímulos quimiotácticos normales. Baehner (10) menciona dentro de los factores sanguíneos, la presencia de un factor plasmático encontrado en un paciente con enfermedad granulomatosa crónica que inhibe la locomoción. Este factor carece de su inhibidor que se ha encontrado en el plasma de individuos sanos. Esto dá por resultado una falla en la locomoción y en la persistencia o recurrencia de las enfermedades infecciosas. Por otro lado, Kramer (11) ha identificado en pacientes con infecciones recurrentes de la piel, una IgG que inhibe la locomoción al azar y la dirigida, pero no afecta su actividad de adherencia, fagocítica, degradativa y de generación del anión superóxido. Esta proteína al inhibir la movilidad del leucocito específica é irreversiblemente afecta a la "defensa" del huésped.

Naturalmente otros factores encontrados en el suero son los componentes del complemento y particularmente una baja concentración de C₃ y C₅ dá por resultado un pobre movimiento de los polimorfonucleares. Los pacientes con desórdenes en la producción de anticuerpos al no formarse "in vivo" los complejos antígeno-anticuerpo no se desencadena la activación por esta vía y no se producen los factores quimiotácticos. También el uso de agentes anti-inflamatorios como la metil prednisona, el succinato de hidrocortisona, prednisolona, aspirina y otros afectan a la leucotaxis (12). No todos estos agentes lo hacen. Por ejemplo, el acetato de hidrocortisona y el fosfato de cloroquina no se ha obser-

vado que inhiban la locomoción. Aparentemente los grupos PO_4 y el acetato de hidrocortisona son impermeables a la célula y no producen el trastorno de su migración. Se han postulado dos mecanismos involucrados: a) Algún factor presente en los pacientes que unido a la droga produce el efecto supresor reversible sobre los leucocitos y b) un deterioro de la leucotaxis por la acción directa del agente quimioterapéutico mismo (13). Esto es válido para los antibióticos. Uno de los primeros en estudiar los efectos de los antibióticos sobre la función leucocitaria fué publicado en 1950 por Muñoz y Geister con la Aureomicina (14). Después de varios años Martin et al (15) midieron el efecto de las tetraciclinas sobre la quimiotaxis leucocitaria de las células de individuos que habían sido infectados experimentalmente con Mycoplasma pneumoniae. Los resultados revelaron que el antibiótico a las concentraciones usuales deprimían la leucotaxis durante la terapia. Se midió la concentración del antibiótico en el interior de las células encontrándose en mayor proporción que extracelularmente. Otros compuestos de las tetraciclinas, la Clorhidroxitetraciclina y la Deoxitetraciclina mostraron "in vitro" la capacidad de disminuir la fagocitosis al ser previamente incubados con las células. En ellas se observó que la síntesis de citocromo-oxidasas había sido deprimida lo cual hace pensar que éste sea uno de los efectos sobre el metabolismo intracelular, además del que puede causar a la membrana (16).

En los últimos años se han hecho experimentos con los antibióticos más usados por el médico, como la Gentamicina, Eritromicina, Polimixina B, Cloranfenicol, Penicilina, Ampicilina y otros, para determinar si muestran también efecto inhibitorio sobre alguna de las funciones de los leucocitos polimorfonucleares (17). Esto está siendo tomado en cuenta para ciertos padecimientos infecciosos y en este estudio en particular para el Acné vulgaris.

La etiopatogenia del acné aún no se ha clarificado completamente ya que en él se han implicado numerosos factores, entre los que se encuentran: el efecto de las hormonas androgénicas, la predisposición genética, los factores ambientales y nutricionales, el uso de cosméticos, la adhesividad celular de la región infrainfundibular del folículo pilosebáceo y, al parecer uno de los más importantes, la participación de -- Propionibacterium acnes y otras bacterias encontradas en el material comedogénico de los pacientes, que junto con la acción de factores solubles (ácidos grasos, componentes bacterianos, etc.) produce reacciones inflamatorias severas en los pacientes.

Las tetraciclinas han sido, durante muchos años, el antibiótico de elección para su tratamiento en forma sistémica. Se ha propuesto que la acción de las lipasas producidas por P. acnes sobre los lípidos superficiales de la piel generan ácidos grasos de cadena corta a los que se les ha atribuido capacidad irritante. El antibiótico al actuar sobre el microorganismo, no permitiría que este efecto se produjera (18). Sin embargo, Puhvel hizo una evaluación de los efectos inflamatorios de los diferentes componentes de los comedones, inyectando intradérmicamente cada uno de ellos en la piel de voluntarios sanos y en la piel de pacientes con acné (19). Entre los productos se incluyen: a) Lípidos superficiales de la piel, b) Ácidos grasos libres de escualeno, c) - Propionibacterium acnes, d) Pared celular del P. acnes, e) Staphylococcus epidermidis, f) Factores solubles de comedones, g) Material queratínico insoluble. Los resultados más sobresalientes después de la inyección demostraron que los lípidos y ácidos grasos en individuos sanos no producían ningún efecto inflamatorio; P. acnes en individuos produjo sólo una leve reacción inflamatoria que desapareció a las 24 horas, pero en pacientes con acné produjo una reacción más severa que se caracteri-

zó por eritema e induración que duró varios días.

También P. acnes mezclado con los lípidos superficiales de la piel e inyectados en pacientes, mostraron tener un efecto inflamatorio. Esto hizo pensar a Puhvel que P. acnes es el que causa una mayor reacción y no los lípidos por sí solos, como hasta el momento se creía -- (19) además se ha demostrado la presencia de factores quimiotácticos solubles producidos por P. acnes y que su atracción sobre los leucocitos polimorfonucleares pudiera explicar en parte su participación en la etiopatogenia de esta enfermedad. Tucker y colab. (20) además demostraron que -- los ácidos grasos y el material comedogénico tienen una gran citotoxicidad para MN y PMN y que puede también ser un mecanismo importante para el aumento de la inflamación.

Se ha evaluado la susceptibilidad de P. acnes a varios antibióticos (21) y como ya se mencionó, las tetraciclinas son ampliamente usadas en la terapia del acné. Por esta razón apoyados en los estudios de Martin et al (22) sobre su efecto inhibitorio de la quimiotaxis, nos hicieron pensar que este mecanismo dual (el inhibitorio y el antimicrobiano) diera por resultado un efecto notable en la disminución del proceso inflamatorio, lo cual probablemente conduzca a la desaparición de las lesiones comedogénicas en los pacientes.

El objetivo de este trabajo basado en lo anterior, fué el de confirmar "in vitro", que las concentraciones alcanzables a nivel sanguíneo por las tetraciclinas, inhibían la locomoción de los leucocitos -- PMN y MN de individuos sanos, y también el de evaluar la quimiotaxis de los leucocitos de pacientes con acné tratados con tetraciclinas, para determinar si estos antibióticos en este tipo de padecimiento tienen el --

* MN.- Mononucleares.

efecto inhibitorio y de esta manera confirmar nuestra hipótesis, de que las tetraciclinas puedan actuar como antiqumiotáctico, además de antimicrobianas en este tipo de pacientes y que probablemente ayuden a la evolución de este padecimiento.

MATERIAL Y METODOS

La primera parte del estudio consistió en tratar de corroborar el efecto inhibitorio "in vitro" del clorhidrato de tetraciclina a concentraciones que varían de 1 a 10 microgramos por mililitro que son las alcanzables en la sangre con dosis terapéuticas utilizadas en el acné. Se incubaron leucocitos obtenidos de diez voluntarios sanos con y sin clorhidrato de tetraciclina y se comparó la actividad quimiotáctica de las células.

La segunda parte consistió en un estudio de la quimiotaxis leucocitaria en doble ciego en 39 pacientes con diferentes grados de acné entre los 16 y 18 años (14 hombres y 15 mujeres). Una condición fué que no hubieran tomado medicamentos cuando menos un mes antes de iniciar el tratamiento. Los pacientes se dividieron en tres grupos al azar. El tratamiento consistió en la administración de cápsulas de 500 mg. de los productos denominados Acnesina I, II y III, durante un período de doce semanas. Se tomaron muestras de sangre para el estudio de la quimiotaxis leucocitaria antes de iniciar el tratamiento (testigo interno), a las seis semanas de haberlo iniciado y al término del mismo. En esta forma se evaluó si existían cambios o no en la actividad leucotáctica de las células polimorfonucleares de los pacientes y si estos cambios eran significativos o debidos al azar.

Los resultados fueron sometidos al análisis estadístico usando una prueba de t de Student, estableciéndose con anticipación -- que una p menor de 0.05 sería la indicación de que los cambios no eran debidos al azar sino al efecto del antimicrobiano.

De las técnicas que se han usado para medir la quimiotaxis, la más conocida es la de Boyden (23) y modificaciones de su técnica, como la cámara múltiple de Martín; la de Snyderman que usa filtros de policarbonato con porosidad de 5 micrómetros de diámetro (24) y otras más sofisticadas donde se emplean polimorfonucleares marcados con Cr 51 (25).

La técnica que se escogió para este estudio, fué la desarrollada por Martín y cols. (22), la cual consiste en una cámara múltiple de incubación con flujo continuo de agua a 37°C. donde se colocan las camaritas de Boyden para la quimiotaxis. Esta multicámara permite el procesado simultáneo de varias muestras con sus testigos correspondientes y por duplicado.

Los materiales usados para el montaje de la técnica se describen enseguida:

MATERIALES:

- 1) Suero y plasma sanguíneos ricos en leucocitos obtenidos por sedimentación en dextran al 3% (P.M. 184,000) de los pacientes con acné y de los voluntarios sanos.
- 2) Cámaras múltiples de incubación manufacturadas locamente (Ver Figura # 1).
- 3) Cámaras de quimiotaxis tipo Boyden consistentes en un tubo de polipropileno transparente cortado en el fondo donde se coloca el filtro "Millipore" y en la cámara de vidrio se coloca el quimioattractante (Ver Figura #2).
- 4) Filtros "Millipore" de 3 micrómetros de diámetro de porosidad -- (Catálogo No. SSWPO 1300).

- 5) Cemento Millipore # 1 para adherir los filtros en el tubo de polipropileno. (No. XX 70,0000).
- 6) Caseína (SIGMA) como quimioattractante.
- 7) Sol. Amortiguadora de TRIS ACM ajustado a pH 7.5 (0.2 M).
- 8) Alcohol Metílico para la fijación de las células sobre el filtro.
- 9) Colorante de Ehrlich de Hematoxilina-Eosina.
- 10) Resina para montar los filtros en los portaobjetos (SIGMA 7987)

PROCEDIMIENTO.

- 1.- Se tomaron de cada paciente aproximadamente 20 ml. de sangre que se dividieron en la forma siguiente:
 - 10 ml. para el fluido de sedimentación (glucosa-dextran 3% NaCl heparina).
 - 8 ml. de sangre coagulada para la separación de suero.
 - 2 ml. de sangre heparinizada.
- 2.- A la sangre con el fluido de sedimentación se le dejó reposar durante 30 minutos a una hora y se obtuvo el plasma rico en leucocitos.
- 3.- El plasma rico en células se centrifugó a 200 xg. y se retiró el sobrenadante. El paquete celular se lavó 2 veces con amortiguador TRIS-ACM.
- 4.- El paquete celular se resuspendió en 3 ml. de Amortiguador de TRIS-ACM y se ajustó a una concentración final de 3.9×10^6 leucocitos/ml.
- 5.- Se montaron las cámaras modificadas por Martin y se dispusieron en la siguiente manera: (Ver Figura # 3).

A) Leucocitos de individuos sanos incubados "in vitro" con las diferentes concentraciones del Clorhidrato de Tetraciclina.

Cámara a) Sol. amortiguadora + suero homólogo.

Cámara b) Sol. amortiguadora + suero homólogo + caseína.

Cámara c) Sol. amortiguadora + suero homólogo + Clorhidrato de tetraciclina.

Cámara d) Sol. amortiguadora + suero homólogo + Clorhidrato de tetraciclina + caseína.

B) Leucocitos de los pacientes con acné tratados con las "Acnesinas".

Cámara a) Sol. amortiguadora + suero homólogo.

Cámara b) Sol. amortiguadora + suero homólogo + caseína

La cámara a, nos dá los valores del movimiento al azar,

La cámara b, los valores del movimiento dirigido por el quimioattractante.

La cámara c, movimiento afectado por el antibiótico y

La cámara d, para ver el efecto del activador y del inhibidor juntos.

6.- En los tubos ó camaritas de Boyden se colocó el plasma rico en PMN del paciente a una concentración de $1.3 \times 10^6/0.35$ ml.

7.- Se montaron en la cámara múltiple de incubación y se pusieron en baño de agua corriente a 37°C. durante 2 horas.

8.- Se retiraron las cámaras y los filtros se fijaron con metanol. Se desprendieron los filtros y se tiñeron por la técnica de coloración de Ehrlich.

- 9.- Se montaron en portaobjetos con una gota de resina y se les puso un cubreobjetos.
- 10.- Se observaron al microscopio con objetivo "seco fuerte" (40x) y se contó el número de células por campo microscópico en diez -- campos.
- 11.- Se obtuvo el promedio (\bar{x}) de células por campo en cada filtro y se calcularon los índices quimiotácticos en la siguiente forma:

I).- Para los leucocitos de individuos sanos incubados "in vitro" con diferentes concentración del Clorhidrato de Tetraciclina:

Prueba A) $\frac{\bar{x} \text{ de células en la cámara b}}{\bar{x} \text{ de células en la cámara a}} = \text{I.Q. normal}$

INDICE QUIMIOTACTICO NORMAL: Se refiere a la relación entre la quimiotaxis por la caseína sobre el movimiento debido al azar. Este es el que se usó como testigo.

Prueba B) $\frac{\bar{x} \text{ de células en la cámara c}}{\bar{x} \text{ de células en la cámara a}} = \text{I.Qc. sin quimioattractante y con antibiótico.}$

INDICE QUIMIOCINESICO: Se refiere a la relación entre el movimiento afectado por el clorhidrato de tetraciclina y de movimiento al azar, para ver que tanto afecta el antibiótico a la célula, cuando no ha sido activada por el -- quimioattractante.

Prueba C) $\frac{\bar{x} \text{ de células en la cámara d}}{\bar{x} \text{ de células en la cámara a}} = \text{I.Q. Normal con antibiótico.}$

INDICE QUIMIOTACTICO SIN QUIMIOATTRACTANTE: Se refiere a la relación entre la quimiotaxis afectada tanto por el -- quimioattractante como por el clorhidrato de tetraciclina

y el movimiento al azar, para ver cual de los dos efectos predomina sobre la célula.

Prueba D) $\frac{\bar{x} \text{ en células en la cámara d}}{\bar{x} \text{ en células en la cámara c}} = \text{I.Q. con quimioattractante y con antibiótico.}$

INDICE QUIMIOTACTICO CON QUIMIOATRACTANTE: Se refiere a la relación entre la quimiotaxis afectada tanto por el quimioattractante como por el clorhidrato de tetraciclina y el movimiento celular afectado solo por el antibiótico, para ver si aún en presencia de agentes quimiotácticos se veía afectada la locomoción celular.

II).- Para los pacientes con acné.

$\frac{\bar{x} \text{ de células con quimioattractante}}{\bar{x} \text{ de células sin quimioattractante}} = \text{I.Q.}$

12.- Los dos mililitros de sangre heparinizada se obtuvieron para hacer una cuenta leucocitaria y una prueba diferencial de Schilling como testigo del número y tipo de leucocitos en sangre total periférica.

NOTA: Todo el procedimiento se practicó por duplicado y en presencia de testigos.

FIGURA 1

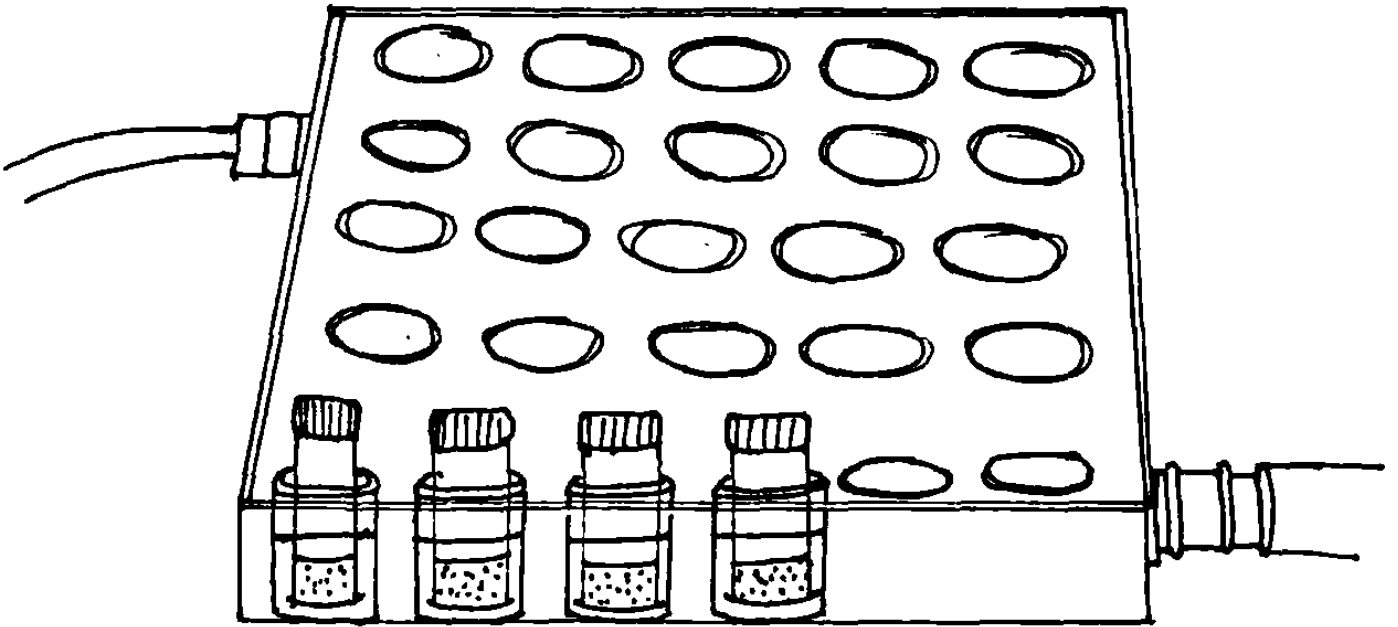


FIGURA 2

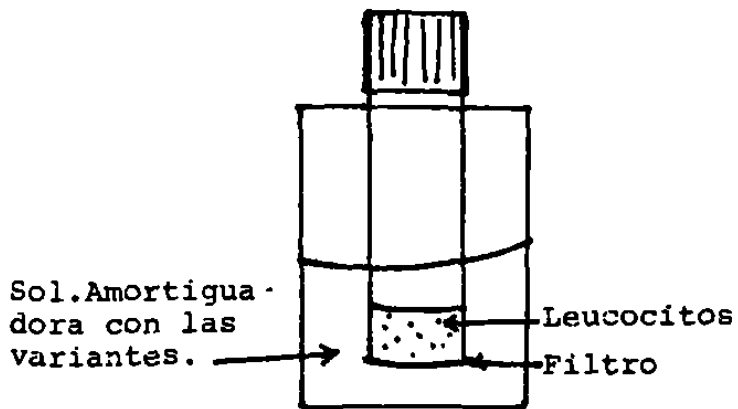
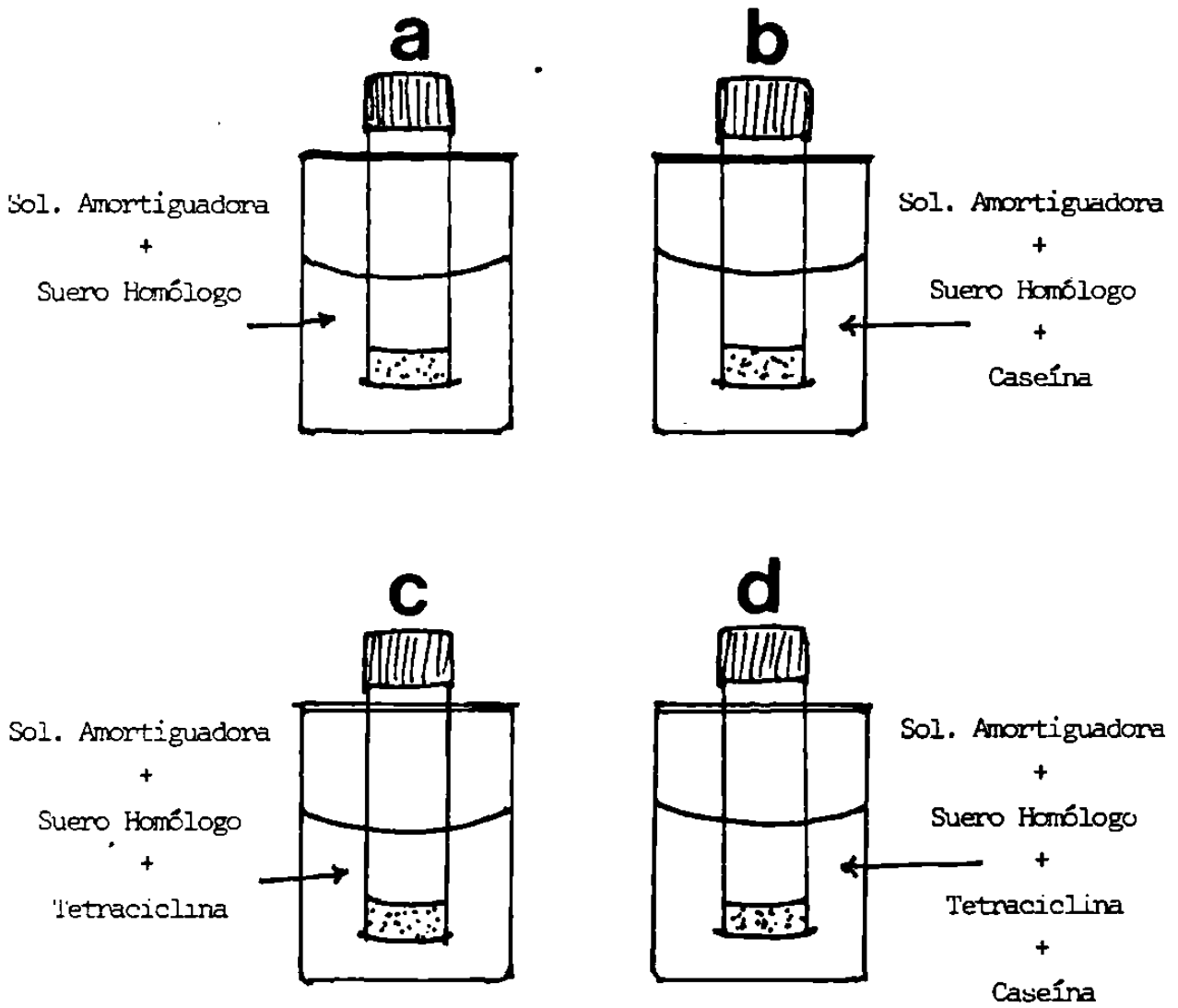


FIGURA 3



RESULTADOS

Los resultados obtenidos en los experimentos "in vitro" en los que se expusieron leucocitos de individuos sanos en contacto con 1, 5 y 10 microgramos de Clorhidrato de Tetraciclina, usando caseína como quimioattractante y como testigo, células no puestas en contacto con el antibiótico, son los siguientes:

En la Tabla No. 1, se muestran los efectos del Clorhidrato de Tetraciclina en microgramos. En la primera columna están los Índices Quimiotácticos de las células de cada paciente en ausencia del antibiótico (I.Q.N.) y en las siguientes columnas, los que se sometieron a la acción de las tetraciclinas, todos sin estimular la quimiotaxis, es decir, locomoción espontánea. (Índice quimiocinésico) Prueba B.

$$I.Q.c. = \frac{c}{a}$$

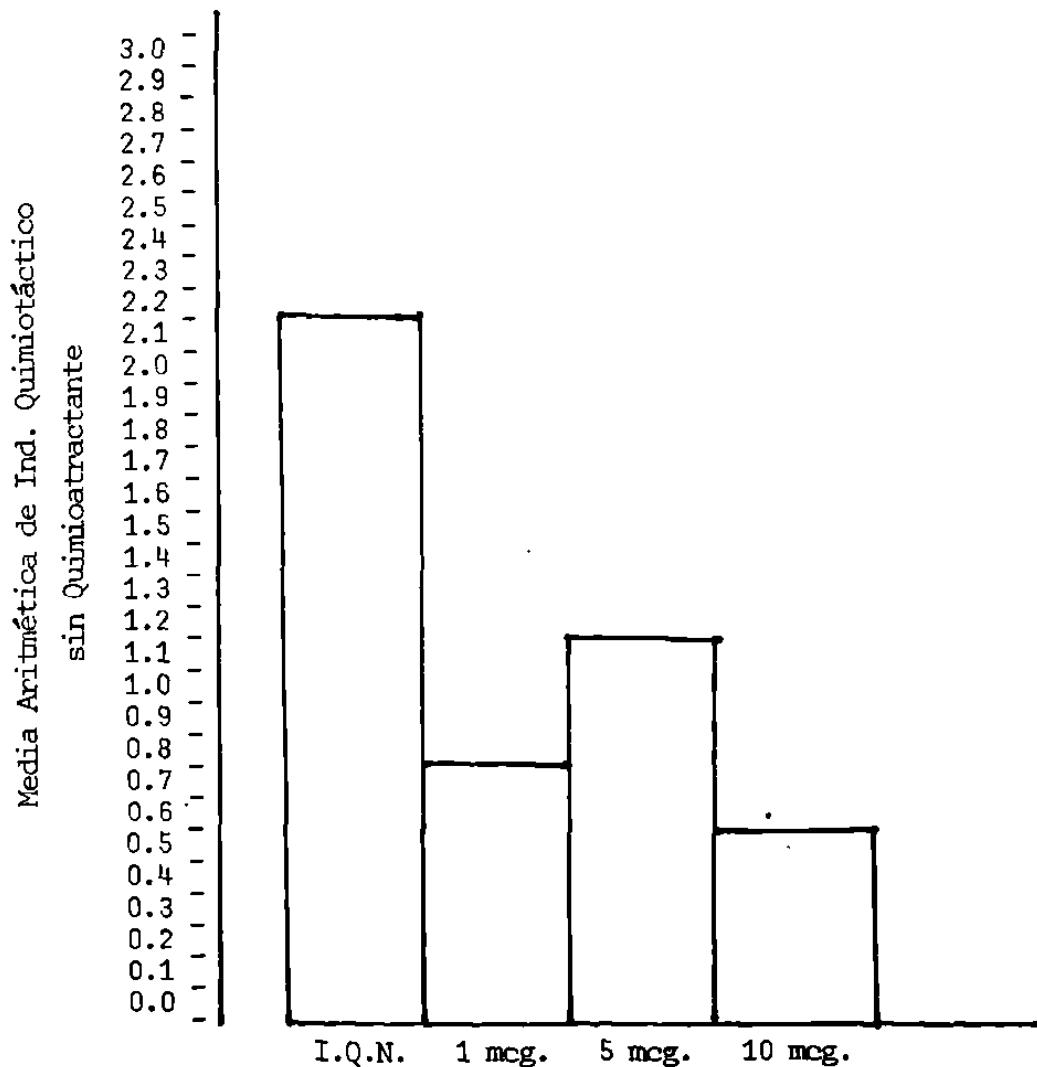
TABLA 1

Prueba B. I.Q.c. = $\frac{\text{Número de células con Antibiótico.}}{\text{Número de células movimiento al azar.}}$

Leucocitos de individuos normales puestas en contacto con diferentes concentraciones de Clorhidrato de Tetraciclina.				
	<u>I.Q.N.</u>	<u>I.Q.c. con 1 mcg.</u>	<u>I.Q.c. con 5 mcg.</u>	<u>I.Q.c. con 10 mcg.</u>
1.-	0.15	0.33	0.32	0.20
2.-	5.40	1.85	2.43	2.15
3.-	4.30	0.71	1.0	0.56
4.-	1.0	0.10	--	0.14
5.-	1.17	0.33	0.28	0.40
6.-	3.44	0.96	2.36	0.60
7.-	1.02	0.88	0.23	0.44
8.-	1.01	0.74	0.99	1.29
9.-	1.11	0.19	0.62	0.19
10.-	3.41	0.91	2.22	0.41
\bar{x}	2.2	.70	1.16	0.63

Obteniendo las medias aritméticas de las quimiotaxis individuales, se visualizan mejor los resultados. Véase una evidente disminución de la locomoción con las tres concentraciones del antibiótico, tal como lo demuestra la Gráfica I,

GRAFICA I



I.Qc. con Clorhidrato de Tetraciclina.

Los resultados de las células incubadas con el antibiótico y ahora con el quimioattractante (caseína), en relación con la locomoción al azar se muestran en la Tabla II. Prueba C $I.Q. = \frac{d}{a}$

TABLA II

Leucocitos de individuos normales puestos en contacto con diferentes concentraciones de clorhidrato de tetraciclina y con caseína como quimioattractante.

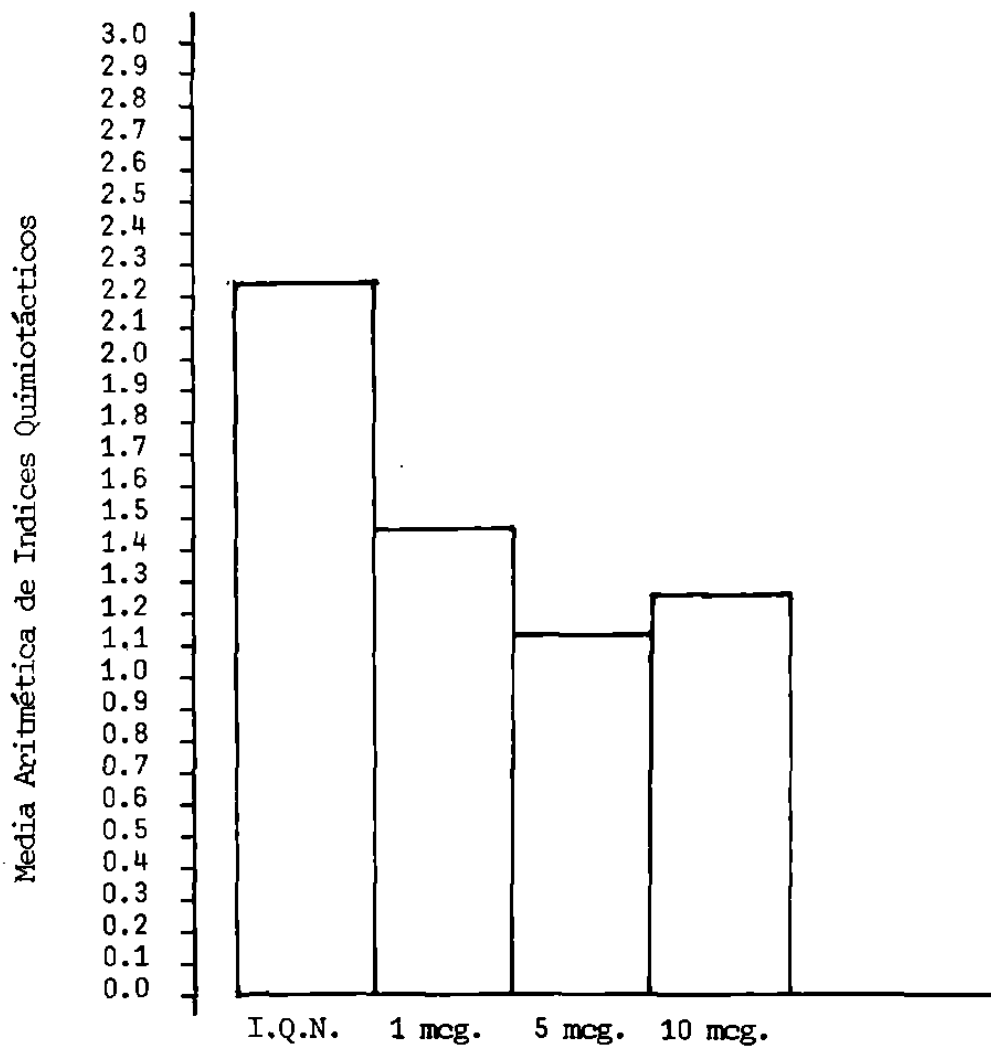
Prueba C. $I.Q. = \frac{\text{Número de células con antibiótico + caseína}}{\text{Número de células movimiento al azar.}}$

	I.Q.N.	I.Q.con 1 mcg.	I.Q.con 5 mcg.	I.Q.con 10 mcg.
1.-	0.15	0.82	0.83	0.56
2.-	5.40	1.27	1.60	1.06
3.-	4.30	0.56	0.81	0.71
4.-	1.00	0.94	0.58	0.52
5.-	1.17	0.33	1.19	0.69
6.-	3.44	1.13	1.65	4.38
7.-	1.02	0.53	0.46	0.59
8.-	1.01	0.70	1.33	0.61
9.-	1.11	0.97	0.94	0.74
10.-	3.40	7.18	1.90	2.40
\bar{X}	2.20	1.44	1.12	1.22

013730

Graficando de nuevo las medias aritméticas de los resultados, se puede observar también la disminución de la quimiotaxis con las tres concentraciones, aún en presencia del quimioattractante (Gráfica II).

GRAFICA II



I.Q. con Clorhidrato de Tetraciclina.

Los resultados de las células incubadas con el anti-biótico y el quimioattractante (caseína) en relación con las células puestas solo con el quimioattractante, se muestran en la Tabla III. Prueba D

$$I.Q. = \frac{d}{c}$$

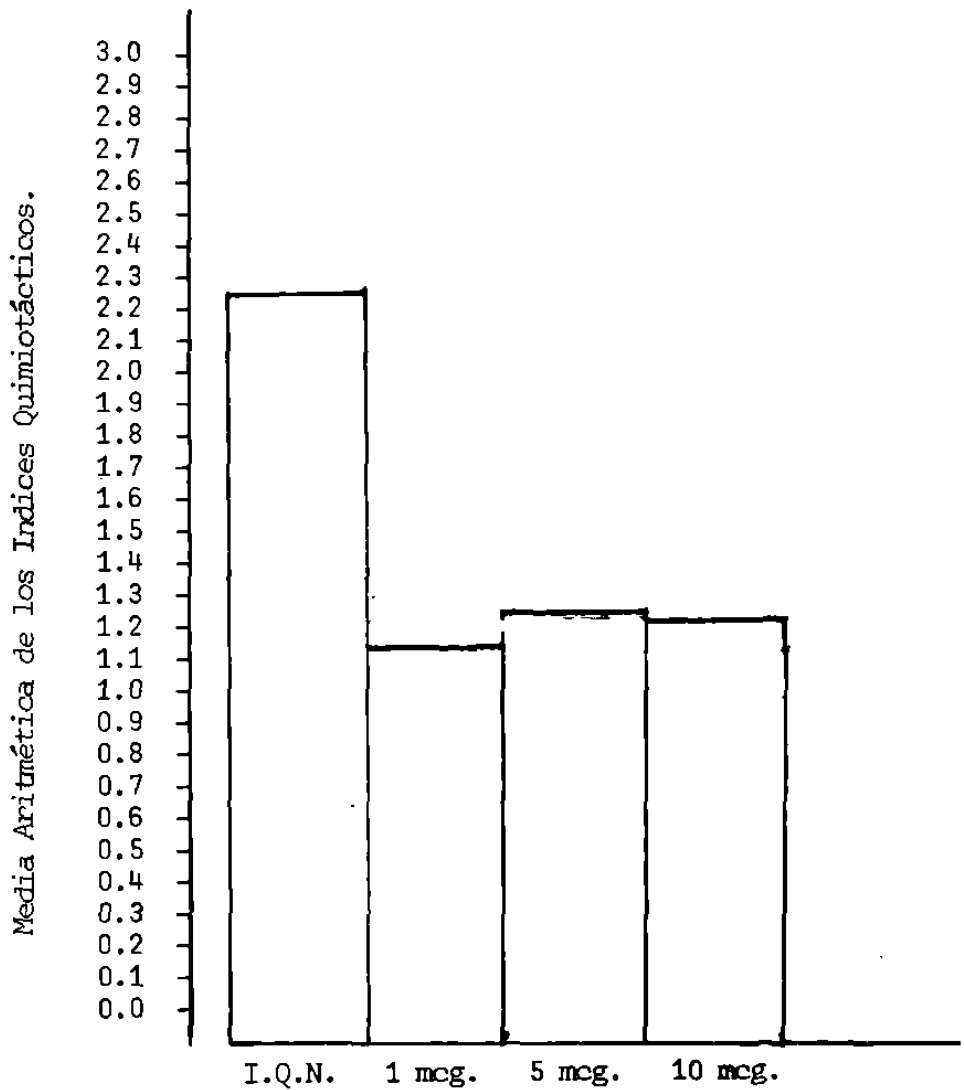
TABLA III

$$I.Q. = \frac{\text{Número de células con antibiótico + caseína}}{\text{Número de células + caseína (mov. dirigido)}}.$$

PAC.	I.Q.N.	I.Q. 1 mcg.	I.Q. 5 mcg.	I.Q. 10 mcg.
1.-	0.15	5.40	5.51	3.69
2.-	5.40	0.23	0.29	0.19
3.-	4.30	0.13	0.18	0.16
4.-	1.0	0.94	0.58	0.52
5.-	1.17	0.28	1.01	0.58
6.-	3.44	1.13	1.65	4.38
7.-	1.02	0.52	0.45	0.58
8.-	1.01	0.70	1.31	0.60
9.-	1.11	0.87	0.84	0.67
10.-	3.41	1.1	0.55	0.70
\bar{X}	2.2	1.13	1.23	1.20

Graficando de nuevo las medias aritméticas de los resultados se puede observar una leve disminución de la quimiotoxicidad con las tres concentraciones.

GRAFICA III



I.Q. con Clorhidrato de Tetraciclina.

Los tres resultados fueron sometidos al análisis estadístico de la prueba de t de Student entre el testigo y cada una de las pruebas con las diferentes concentraciones del antibiótico, obteniendo los siguientes valores de t. Recordando lo establecido en el protocolo que una P de 0.05 ó menor sería significativa.

TABLA IV

Resultados sometidos al análisis estadístico de la prueba t.

Prueba B) I.Q. = $\frac{\text{Número de células incub. con antibiótico.}}{\text{Número de células movimiento al azar.}}$		
Concentración del Clorhidrato de T.	"t" DE STUDENT	PROBABILIDAD
1 MCG.	$t_7 = 8.789$	$p = 0.001$
5 MCG.	$t_6 = 2.931$	$p = 0.02 > 0.01$
10 MCG.	$t_7 = 9.117$	$p = 0.001$
(Una probabilidad altamente significativa)		

TABLA IV

Prueba de t para la prueba C I.Q. = $\frac{\text{Número células + antibiótico + caseína}}{\text{Número células movimiento al azar.}}$		
Concentración del Clorhidrato de - Tetraciclina.	"t" DE STUDENT	PROBABILIDAD
1 MCG.	$t_7 = 2.028$	$p = 0.05 < 0.1$
5 MCG.	$t_7 = 2.529$	$p = 0.02 < 0.05$
10 MCG.	$t_7 = 2.116$	$p = 0.05 < 0.1$
Una probabilidad cerca del margen de lo establecido		

TABLA VI

Prueba de t para la prueba d		
$I.Q. = \frac{\text{Número cel. + antibiótico + caseína}}{\text{Número cel. con caseína}}$		
Conc. del Clorhidrato de Tetraciclina	Valor de "T" de Student	Probabilidad
1 MCG	$t_7 = 2.3984$	$p = 0.05 \ll 0.1$
5 MCG	$t_7 = 1.1059$	$p = 0.05 \ll 0.1$
10 MCG	$t_7 = 1.731$	$p = 0.05 \ll 0.1$

Una probabilidad cerca del margen de lo establecido.

De estos valores se puede deducir que en la prueba B el clorhidrato de tetraciclina afectó notoriamente el movimiento quimio cinético de los leucocitos y cuya quimiotaxis se ve también afectada en las pruebas C y D, aunque no de manera tan determinante, probablemente -- por el influjo del quimioattractante. Esto será discutido más adelante.

En la segunda prueba del estudio con los pacientes -- con acné, 11 de 13 pacientes que tomaron Acnesina I, terminaron satisfactoriamente el tratamiento; 12 de 13 pacientes que tomaron la Acnesina II también terminaron el tratamiento y solo 8 de 13 pacientes que tomaron -- Acnesina III terminaron correctamente el tratamiento. Todos los pacientes que no siguieron el protocolo fueron eliminados del estudio estadístico.

En la Tabla VII se muestran los resultados del índice quimiotáctico que se obtuvieron en las 3 muestras durante el tratamiento. Los números de los pacientes les fueron dados al azar, por lo cual no están en orden (Ver Tabla VII).

De la misma manera las medias aritméticas de los índices quimiotácticos leucocitarios de estos pacientes en tratamiento fueron graficadas (Ver gráfica IV), donde se puede observar la efectividad de la Acnesina II para inhibir la quimiotaxis. La Acnesina I mostró una ligera disminución del Índice Quimiotáctico al término del tratamiento y la Acnesina III, mostró también una disminución en el promedio de los índices.

Estos resultados también fueron sometidos al análisis estadístico como lo muestra la Tabla VIII.

TABLA VII

R E S U L T A D O S

TIPO DE ACNESINA ADMINISTRADA		INDICE QUIMIOTACTICO.		
	PACIENTE	IQ. Antes del tratamiento	IQ. Durante el tratamiento	IQ. Al término del tratamiento.
I	2	3.0	8.0	2.7
	4	0.9	529.0	1.7
	7	6.5	25.1	2.8
	13	2.7	2.6	2.6
	17	0.8	0.8	18.5
	20	1.1	9.7	2.5
	29	1.3	1.0	3.5
	31	21.8	2.6	2.8
	35	0.3	3.1	1.0
	39	10.0	1.2	2.1
		\bar{X}	4.8	58.3
II	1	1.6	3.0	0.9
	6	9.6	1.1	2.6
	8	5.2	2.7	1.0
	10	4.0	1.2	5.5
	11	8.8	12.6	0.8
	15	1.1	25.1	1.9
	22	0.9	11.0	4.0
	24	16.7	2.7	6.9
	27	11.0	8.1	4.9
	30	18.2	12.9	4.7
	33	3.4	1.1	1.1
		\bar{X}	7.3	7.4
III	3	9.8	4.0	2.1
	5	2.9	10.6	6.5
	9	1.1	7.3	5.0
	12	4.8	8.6	2.2
	16	1.4	--	5.2
	21	1.2	6.8	2.9
	32	6.8	1.8	0.5
	38	20.8	--	1.3
	\bar{X}	6.1	6.5	3.2

XI Medias aritméticas de los Índices Quimiotácticos

G R A F I C A IV

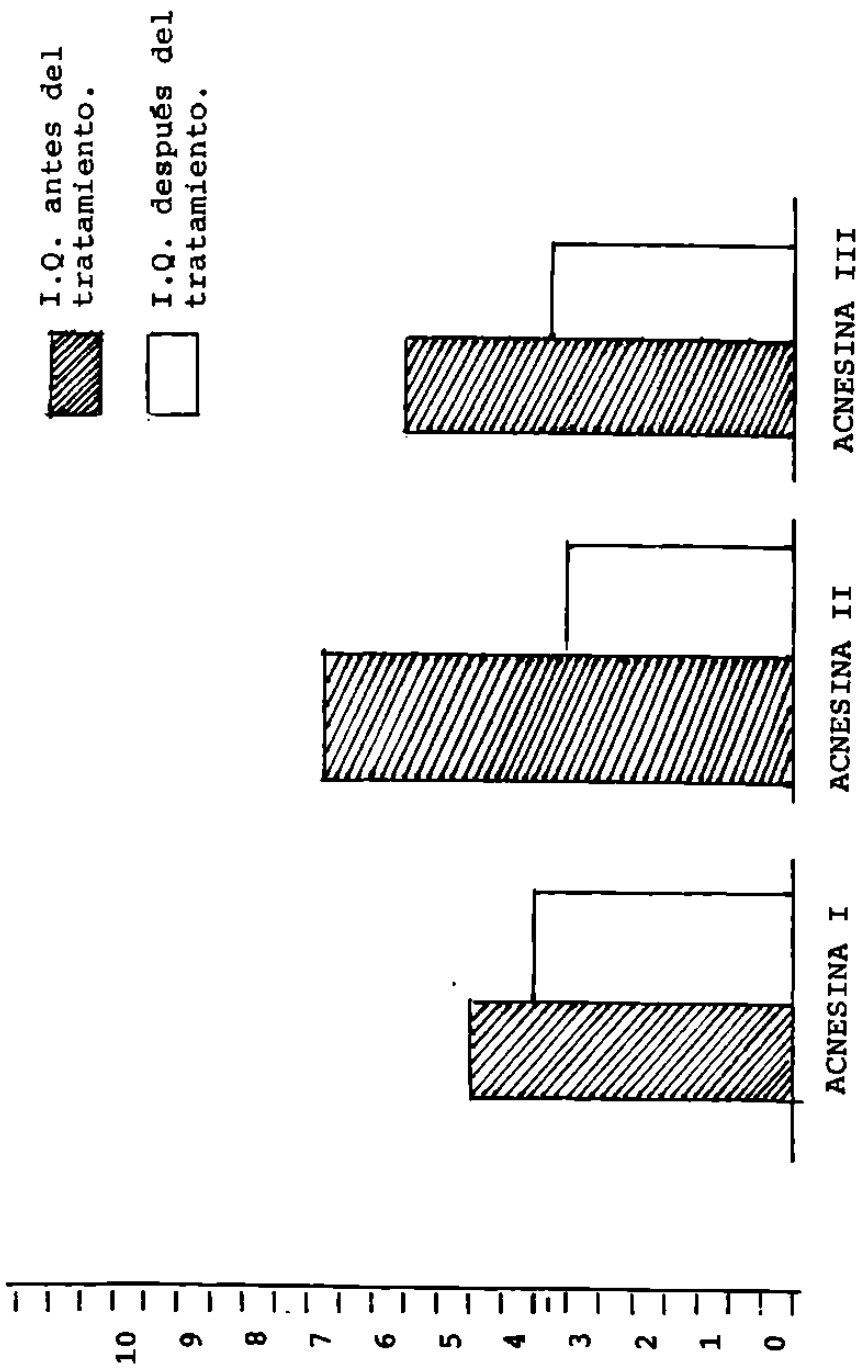


TABLA VIII

Análisis estadístico (Prueba de t) de Quimiotaxis leucocitaria en pacientes tratados con Acnesinas I, II y III.

TIPO DE ACNESINA	"T" STUDENT	PROBABILIDAD
ACNESINA I	$t_{10} = 0.351$	$p = 0.8 > 0.7$ (no significativa)
ACNESINA II	$t_{11} = 2.66$	$p = 0.05 > 0.02$ (significativa)
ACNESINA III	$t_7 = 0.122$	$p = 0.9$ (no significativa)

Los datos del análisis estadístico muestran que la ACNESINA I, las variaciones de la quimiotaxis caen dentro del azar y por lo tanto, no adjudicables al medicamento. Los datos de probabilidad con ACNESINA II están entre 0.05 y 0.02, por lo tanto, dentro del rango significativo estadístico pre-establecido. Las cifras de p obtenidas con ACNESINA III fue de 0.9 que demuestra que las variaciones en la quimiotaxis en presencia de este producto se deben totalmente al azar.

Al romper el secreto del estudio doble ciego se conoció que: La Acnesina I resultó ser el Placebo, la Acnesina II, Clorhidrato de tetraciclina y la Acnesina III, oxitetraciclina.

Las conclusiones viables obtenidas por inferencia deductiva del análisis estadístico es, como se esperaba, que la ACNESINA I (placebo) no influya en la disminución de la leucotaxis, lo cual fué confirmado. La Acnesina II (clorhidrato de tetr) demostró que disminuye signi-

ficativamente la leucotaxis; sin embargo, la ACNÉSINA III (oxitetraciclina, no se pudo demostrar en forma significativa que disminuya la leucotaxis, probablemente debido a que fué el grupo donde hubo más deserción de pacientes y que al interrogar a los que terminaron el tratamiento, -- algunos de ellos declararon que no habían seguido en forma constante las indicaciones dadas.

El resultado de las cuentas leucocitarias y diferenciales de Schilling de los individuos sanos y de los pacientes con acné resultaron normales.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La fisiología de la quimiotaxis ha sido estudiada considerablemente en los últimos años. Hay cuatro puntos básicos que deben considerarse bien: ¿Cuáles son los mecanismos estructurales celulares que es tan involucrados en la locomoción?, ¿Cuáles son los mecanismos bioquímicos participantes en el movimiento al azar (quimiocinésis) y el dirigido (quimiotaxis)?, ¿Cuáles son los sitios donde se induce y afecta la quimiotaxis?. ¿Cuál es la relación entre la quimiotaxis observada "in vitro" y la locomoción "in vivo"?

Se sabe que para que los leucocitos se muevan tienen microfilamentos y microtubulos en la membrana, cuyas interacciones de sus -- componentes químicos dan como resultado final la locomoción (26, 4, 27, - 28). Así mismo, otros eventos bioquímicos como mecanismos enzimáticos -- (30, 31, 32) bioenergéticos (29) y al parecer el más importante es el de los niveles de los nucleótidos cíclicos AMP y GMP, donde se ha visto que cuando el leucocito es estimulado por algún quimioattractante se detecta - un aumento del GMP en cambio, los agentes que inhiben la locomoción amentan los niveles del AMPc (33, 34). El sitio de la célula donde es estimulada para su movimiento está siendo explicado a base de receptores superficiales de membrana de los leucocitos cuya presencia y localización ha - sido demostrada por Schiffman Becker y Sullivan (35, 36, 37), por lo que se puede decir que los mecanismos de la movilidad al azar son relativamente sencillos de entender. Sus estructuras de locomoción situadas en la - superficie de la membrana junto con sus componentes bioquímicos, están en constante estimulación bioenergética y reguladora. Pero qué pasa cuando

se estimula esta locomoción por algún quimioattractante. Este en primer lugar debe aparecer en concentraciones y a distancia adecuada para que llegue a estimular a la célula. Segundo, debe encontrar su receptor libre en la membrana para que en tercer lugar se inicie la señal para el aumento -- del GMPc, la liberación de energía y se lleve a cabo la quimiotaxis.

Ahora bien, tomando como base ésto se puede deducir que el efecto inhibitorio quimiotáctico por los anti-inflamatorios, antibióticos y otras drogas se localizan en cualquiera de estos puntos. Con lo que respecta al clorhidrato de tetraciclina mi opinión es que su efecto inhibitorio más que inactivar a las sustancias quimioattractantes o a nivel de bloquear o alterar el receptor sea debido al aumento de los niveles del AMPc. Esto último lo baso en los resultados mostrados en las tablas II y III, -- cuando se incubaron las células con el antibiótico junto con la caseína, -- donde se puede deducir que el receptor para la caseína no fué bloqueado -- por el clorhidrato de tetraciclina, ya que si esto hubiera sucedido, sí -- habría una inhibición significativa, por lo que me hace suponer que los -- leucocitos fueron afectados por ambos estímulos, predominando no obstante el efecto inhibitorio del antibiótico como lo demuestran los I.Q., en las pruebas C y D comparándolos con el I.Q. normal como testigo y de donde la baja en la quimiotaxis, podría ser debida a una pequeña alteración en los niveles del AMPc y GMPc que no se manifestaron de manera contundente por -- estar presente también el quimioattractante.

Para contestar el último punto que se planteo de cuál es -- la relación entre la quimiotaxis observada "in vitro" y la quimiotaxis ob -- servada "in vivo", se puede decir que en ocasiones una quimiotaxis "in vi -- tro" reproducida en las condiciones lo más cercanas a los procesos "in vi

vo" hay que tomarlas con cierto cuidado, pues el circuito de inducción-inactivación está sujeto a muchos factores en el huésped y que en el laboratorio no se pueden manejar. Incluso Walter y colab. (38) reportan que las tetraciclinas en pacientes con diferentes grados de reacción inflamatoria en cavidad oral no mostraron ningún cambio, lo cual contradice nuestros hallazgos a nivel de piel. Por lo que respecta a lo que ocurre con los pacientes con acné la relación entre la inhibición de la quimiotaxis demostrada "in vitro" y lo que está pasando en el paciente, es estrecha, ya que también se puede observar una recurrencia de la enfermedad al eliminarse el tratamiento, debido muy probablemente a la persistencia de los estímulos quimiotácticos y que de hecho en aquellos pacientes donde no hubo una mejoría clínica, sea debido a que entre el clorhidrato de tetraciclina y los factores quimiotácticos de la infección comedogénica, estén en competencia para aumentar o disminuir los niveles de los nucleótidos cíclicos y que al ganar los quimioattractantes no hay mejoría en las lesiones inflamatorias cutáneas.

Según los resultados obtenidos concuerdan con los inicialmente reportados por Martin (15) acerca de la inhibición de la quimiotaxis por las tetraciclinas y probablemente con otras funciones del fagocito (16). Se mencionó que en la actualidad se ha encontrado este mismo efecto con otros antibióticos (17, 39, 40), con drogas antimetólicas (41), otros agentes quimioterapéuticos (13) y los inicialmente descritos en 1950 por Muñoz y Geister (14).

En la primera parte del estudio se trató de comprobar si la inhibición de la locomoción "in vitro" se llevaba a cabo con las concentraciones que se alcanzan a niveles sanguíneos, de 1 hasta 10 micro

gramos de tetraciclina, lo cual se confirmó, pues las tres concentraciones usadas (1, 5, 10 mc.) del antibiótico, inhibieron la quimiotaxis. Con estos datos se trabajó la segunda parte del estudio con la seguridad de que el tratamiento dado a los pacientes con las concentraciones del antibiótico que tenían las Acnesinas, darían los niveles sanguíneos demostrados ser inhibitorios "in vitro".

Los resultados presentados en la Tabla VII y Gráfica IV, demostraron que la Acnesina II (clorhidrato de tetr.) presentaron una disminución significativa de la quimiotaxis y junto con la evaluación clínica de sus lesiones que se hizo en otro trabajo con estos mismos pacientes -- confirmaron nuestra hipótesis, de la posible acción anti-inflamatoria, además de la antimicrobiana de este producto en los pacientes con Acné vulgaris, y más aún confirmados con el primer grupo de pacientes que se les -- administró la Acnesina I, que resultó ser el placebo quedando estos como -- testigos. La Acnesina III, siendo también un derivado de la tetraciclina (oxitetraciclina) no se corroboró este efecto y como se mencionó anteriormente, fué el grupo que hubo más deserción, además de la no continuidad -- del tratamiento durante el tiempo que se señaló para el estudio. Esto hizo obviamente que los resultados no pudieran ser tomados como concluyentes para nuestra hipótesis.

Por otro lado el reporte de Puhvel (19) acerca de la evaluación de los diferentes componentes del comedón como los causantes de la reacción inflamatoria, de los de Tucker (20) sobre el efecto de este material comedogénico en la quimiotaxis y la citotoxicidad para las células MN y PMN --

y la participación del Propionibacterium acnes y otras bacterias aisladas de los comedones, tratan de esclarecer más la fisiopatología de este cuadro clínico. Si tomamos en cuenta estos estudios podemos concluir lo siguiente:

El proceso inflamatorio se inicia por la instalación de -- los microorganismos en la piel, cuyos metabolitos tóxicos al ser liberados, comienzan el daño tisular. Se acumulan ácidos grasos de las glándulas pilosebáceas que favorecen por un lado, al enriquecimiento del medio para las bacterias, y por otro, a producir directamente daño tisular. Se liberan sustancias quimiotácticas intrínsecas y extrínsecas que atraen a gran cantidad de PMN y MN, en donde al acumularse bacterias, ácidos grasos y leucocitos dan por resultado la lesión comedogénica local. Esta -- reacción inflamatoria se puede ver afectada por factores del huésped, entre los cuales, el hormonal juega un papel importante y que junto con la participación aún no bien esclarecida de las condiciones de stress, dietéticas, higiénicas, etc., pueden conducir a la severidad de la lesión. El tratamiento en estos pacientes es entonces difícil. Las tetraciclinas lo -- grarían en parte resolver el problema, inhibiendo la afluencia y acumulación de los leucocitos en el tejido dañado, y también por su acción antimicrobiana, eliminando al P. acnes, evitando así la citotoxicidad y la -- reacción inflamatoria local.

Realmente este problema es crítico, porque la gravedad en sí de la enfermedad no es el daño dermatológico sino las secuelas psicológicas que esto puede dejar al paciente joven en etapa de desarrollo mental, sexual y social.

RESUMEN

El objetivo del trabajo fué el de demostrar el efecto anti quimotáctico y por ende el anti-inflamatorio como un mecanismo asociado - al antimicrobiano, de las Tetraciclinas en pacientes con Acné vulgaris y que se demostrara tanto clínicamente como en el laboratorio.

El trabajo fué realizado en dos etapas. La primera consistió en corroborar que las concentraciones sanguíneas que se alcanzaban -- con el clorhidrato de tetraciclina puestas "in vitro" tenían el efecto in hibitorio sobre la quimiotaxis leucocitaria. Se trabajó con las concen traciones de 1, 5 y 10 microgramos y con leucocitos obtenidos de diez in dividuos sanos. El resultado mostró que las tres concentraciones fueron capaces de inhibir la quimiotaxis leucocitaria.

La segunda parte se trabajó con leucocitos de pacientes -- con diferentes grados de Acné vulgaris de un estudio doble ciego, practi cado a un total de 39 pacientes divididos en tres grupos, administrándos les en forma correspondiente tres tipos de diferentes compuestos denomina dos: Acnesina I, Acnesina II y Acnesina III. De estos, únicamente el -- grupo II demostró una inhibición significativa de la quimiotaxis y que re sultó ser el tratado con el clorhidrato de tetraciclina. El grupo III - no hubo una disminución significativa aunque después se aclaró que había sido tratado con Oxitetraclina (Acnesina III), probablemente porque fué el grupo donde hubo más deserción de pacientes y los que terminaron el -- tratamiento declararon no haberlo seguido según las indicaciones dadas. Por último el grupo I, resultó ser al que se le administró el Placebo y - no hubo disminución de la quimiotaxis.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Fudenberg, H.H.; Stites, D.P. y colab.- Manual de Inmunología Clínica Diagnóstica. 2a. Ed. Manual Moderno. 1980. 887 p.
- 2.- Bordet, J.- Leukocytes and the active property of serum vaccinated animals. Annales de l'Inst. Pasteur. 1895. 9: 462-506.
- 3.- Gadebusch, H.H.- Phagocytes and cellular immunity. Florida, CRC Press. Inc., 1979.
- 4.- Reaven, E.P. and Acline, S.G.- Subplasmalemmal microfilaments and microtubules in resting and phagocytizing cultivated - macrophages. J. Cell. Biol., 1973. 59: 12-27.
- 5.- Najjar, V.A. and Mishioka, K.- Tuftsin a natural phagocytosis stimulating peptide. Nature, 1970. 278: 672-276.
- 6.- Janeway, Ch. M.D.- Progress in immunology.- Syndromes of diminished resistance to infection.- J. Ped., 1968. 72(6): 885-903.
- 7.- Hatch, G.E.; Nichols, W.K., and Hill, H.R.- Cyclic nucleotide changes in human neutrophils induced by chemoattractants and chemotactic modulators.- J. Immunol. 1977, 119: 450-456.
- 8.- DeChatelet, L.R.- Review.- Oxidative bactericidal mechanisms of polymorphonuclear leukocytes.- J. Infect. Dis. 1975, 131(3): 295-301.
- 9.- Mandell, G.L.- Bactericidal activity of aerobic and anaerobic polymorphonuclear neutrophils.- Infect. and Imm. 1974, 9(2): 337-341.

- 10.- Baehner, R.L.- Molecular basis for functional disorders of phagocytes. *J. Pediat.*, 1974. 84(3): 371-327.
- 11.- Kramer, N.; Pérez, H.D. and Goldstein, I.M.- An immunoglobulin (IgG) inhibitor of polymorphonuclear leukocyte motility in a patient with recurrent infection.- *N. Eng. J. Med.* 1980. 303(22): 1253-1258.
- 12.- Rivkin, I.; Foschi, G., and Rosen, C.A.- Inhibition of in vitro neutrophil chemotaxis and spontaneous motility by Anti-inflammatory agents. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1976, 153: 236-240.
- 13.- Warden, G.I.D., McArthus, M. et al.- Suppression of leukocyte chemotaxis in vitro by ~~dermotherapeutic agent used in the manage~~ment of thermal injuries. *Ann. Surg.* 1975, 180: 232-236.
- 14.- Muñoz, J. and Geister, R.- Inhibition of phagocytosis by aureomycin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1950, 75: 367-370.
- 15.- Martin, R.; Warr, G.A.; Couch, R.B., et al.- Effects of tetracycline on leukotaxis. *J. Inf. Dis.* 1974. 129(2): 110-115.
- 16.- Forsgren, A.; Schmeling, D.; and Quie, P.G.- Effect of tetracycline on the phagocytic function of human leukocytes.- *J. Infect. Dis.*, 1974. 130(4): 412-415.
- 17.- Esterly, N.L.; Furey, N.L. and Flanagan, L.E.- The effect of antimicrobial agents on leukocyte chemotaxis. *J. Invest. Dermatol.* 1978. 70(1): 51-55.
- 18.- Voss, J.G.- Acne vulgaris and free fatty acids. A review and criticism. *Arch. Dermatol.* 1974. 109: 894-898.

- 19.- Puhvel, S.M., and Sakamoto, M.- An in vivo evaluation of the inflammatory effect of purified comedonal components in human skin. J. Inv. Dermatol. 1977. 69(4): 401-406.
- 20.- Tucker, S.B.; Rogers, R.S.; Winkelmann, R.K.; Privett, O.S. and Jordan, R.E.- Inflammation in acne vulgaris: Leukocyte attraction and cytotoxicity by comedonal material. J. Inv. Dermatol. 1980. 74(1): 25-26.
- 21.- Hoeffler, U.; Ko, H.L. and Pulverer, G.- Antimicrobial susceptibility of Propionibacterium acnes and related microbial species. Antimicrob. Agents. Chemoter. 1976. 10(3): 387-394.
- 22.- Martin, R.R. et al.- Chemotaxis of human leukocytes: Responsiveness to Mycoplasma pneumoniae. J. Lab. Clin. Med.; 1973, 81: 520-529.
- 23.- Boyden, S.V.- The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes.- J. Exp. Med., 1962 115: 453-466.
- 24.- Snyderman, R.; Altman, L.C.; Hausman, M.S. and Mergenhagen, S.E.- Human mononuclear leukocyte chemotaxis: A quantitative - assay for humoral and cellular chemotactic factors. J. Immunol., 1972. 108(3): 857-860
- 25.- Gallin, J.I.; Clark, R.A. and Kimbal, H.R.- Granulocyte chemotaxis An improved in vitro assay employing Cr^{51} labeled granulocytes. J. Immunol. 1973. 110(1): 233-240.
- 26.- Malawista, S.E. and Bensch, K.G.- Human polymorphonuclear leukocytes: Demonstration of microtubules and effect of Colchicine.- Science, 1967. 156: 521-522.

- 27.- Boxer, L.A.; Hedleywhyte, E. and Stossen, T.H.- Neutrophil actin - dysfunction and abnormal neutrophil behavior N. Eng. J. Med., 1974. 291(21): 1093-1099.
- 28.- Boxer, L.B. and Stossel, T.P.- Interactions of actin miosin and an actinbinding protein of chronic myelogenous leukemia - leukocytes.- J. Clin. Inv. 1976, 57: 964-976.
- 29.- Goetzl, E.J., Austen, K.F.- Stimulation of human neutrophil leukocytes aerobic glucose metabolism by purified chemotactic factors. J. Clin. Invest.; 1974. 53: 591-599.
- 30.- Ward, P.A. and Becker, E.L.- Mechanism of the inhibition of chemotaxis by phosphonate esters. J. Exp. Med., 1967. 125: 1001-1020.
- 31.- Becker, E.L. and Ward, P.A.- Partial biochemical characterization of the activated esterase required in the complement-dependent chemotaxis of rabbit polymorphonuclear leukocytes J. Exp. Med., 1967. 125: 1021-1030.
- 32.- Keller, H.U.; Hess, M.W. and Cottier, H.- Physiology of chemotaxis and Random motility.- Sem in Hematol. 1975. 12(1): 47-57.
- 33.- Rose, L. Tse, Paulding, P. and Urban, D.- Polymorphonuclear leukocyte motility in vitro. VI. Effect of purine and pyrimidine analogs: Possible role of cyclic AMP. J. Lab. Clin. Med., 1972. 80(2): 264-274.
- 34.- Estensen, R.D.; Hill, H.R.; Quie, P.G.; Hogan, N. and Goldberg, N.D. Cyclic GMP and cell movement, Nature, 1973. 245: 458-460.
- 35.- Schiffmann, E.; Corcoran, B.A. and Wahl, S.M.- N-Formylmethionine peptides as chemoattractants for leukocytes. Proc. Natl. Acad. Sci.; 1975. 72: 1059-1062.

- 36.- Becker, E.L.- Some interrelation of neutrophil chemotaxis. Lysosomal enzyme secretion and phagocytosis as revealed by synthetic peptides. *Am. J. Path.*, 1976. 85(2): 385-394.
- 37.- Sullivan, S.J. and Zigmond, S.H.- Chemotactic peptide receptor modulation in polymorphonuclear leukocytes. *J. Cell. Biol.* 1980, 85(3): 703-711.
- 38.- Walter, S.I.; Froum, S.J.; Sullivan, M. et al.- Tetracycline: A clinical study to determine its effectiveness as long-term adjuvant.- *J. Periodontology*, 1980. 51(6): 328-330.
- 39.- Lehrer, R.I.- Effects of colchicine and Chloramphenicol on the Oxidative Metabolism and Phagocytic activity of Human Neutrophils. *J. Infect. Dis.* 1973. 127(1): 40-48.
- 40.- Desimone, C.; Manganaro, M.; Meli, D.; Ricca, D.; and Capozzi, C. Influence of antibiotics on leukocyte migration. *Boll. Ist. Sierot., Milano.* 1980, 57(6): 612-8
- 41.- Ramsey, W.S. and Harris, A.- Leukocyte locomotion and its inhibition by antimitotic drugs. *Exp. Cell. Resear.* 1972. 82: 266-270.

013730

