

11212 29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

HOSPITAL GENERAL "DR MANUEL GEA GONZALEZ"

EFFECTIVIDAD DEL TACALCITOL PARA INHIBIR
(RANTES) EN DERMATITIS ATOPICA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
ESPECIALISTA EN DERMATOLOGIA

PRESENTA:

DRA. OLGA NAVARRETE PRIDA



MEXICO, D. F.

NOVIEMBRE 2000

285996



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



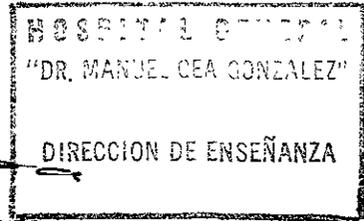
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Autorizaciones



Dr. Héctor Villarreal Velarde
Director de Enseñanza



Dra. María Dolores Saavedra Ontiveros
Directora de Investigación

Dra. Ma. Teresa Velasco Jiménez
Subdirectora de Enseñanza

Dr. Luciano Domínguez Soto
Jefe del Departamento de Dermatología

Dra. María Elisa Vega Memije
Director de Tesis

Colaboradores:

**Dr. en Investigación Básica:
Edgar Fernando Krötzsch Gómez**

QFB. Nora Angélica Islas Rojas

Agradecimientos:

Dra. Elena Monroy

Dra. Dora Molina de Soschin

Dra. Judith Domínguez

Dr. Heriberto Vazquez Flores

Dra. Patricia Pichardo

Dra. Celeste Valiente

Dr. Luciano Domínguez Soto

Dr. Luis Villanueva

Por su invaluable ayuda y apoyo incondicional

A Ricardo

Por el apoyo, paciencia y amor que siempre me ha brindado

A mis padres Alfonso y María Elena

Por el apoyo y los consejos acertados

A mis hermanos Leonora, Alfonso y Marco Antonio

Por el estímulo y el ejemplo a seguir

A Xymena

Por existir

INDICE

	Página
1.- Antecedentes	1
2.- Marco de Referencia	6
3.- Material y Método	9
4.- Resultados	13
5.- Discusión	15
6.- Conclusiones	17
7.- Bibliografía	18
8.- Anexos	20
9.- Figuras y fotos	23

ANTECEDENTES

Las quimocinas representan una familia de polipéptidos que tienen la habilidad de inducir migración y activación de diferentes tipos de leucocitos. Fueron aisladas a mediados de los años sesenta, y la primera que se descubrió fue el factor plaquetario 4 (FP 4), aunque entonces aún se desconocía su función. Al finales de los ochenta se descubren otros dos péptidos: la interleucina 8 (IL 8) y el péptido quimiotáctico para monocitos (MCP-1), con una capacidad quimiotáctica para neutrófilos y monocitos respectivamente. Posteriormente se clonaron homólogos de estas moléculas y se descubrieron otra serie de polipéptidos. El término quimocinas se acuñó por contracción de dos palabras: quimiotaxis y citoquina, ya que se trataba de citoquinas con capacidad de quimiotaxis (1,2).

Se conocen actualmente más de sesenta tipos de quimocinas y se dividen en superfamilias, las cuales reciben su nombre dependiendo de la secuencia de aminoácidos, localizada entre los residuos de cisteínas, que son aminoácido principal. Cada quimocina puede tener funciones diferentes aunque se encuentren dentro de la misma familia (1,3). Las quimocinas se codifican en el brazo largo del cromosoma 14 en la región 1221 y en el brazo largo del cromosoma 17 en la región 11.2-12, y tienen un peso molecular es de 12-14 kd.

Las familias se dividen por su estructura similar y dependiendo de los residuos cisteína (C) y los aminoácidos que se encuentran entre estos, y que se denominan (X).

Subfamilias

La familia **CXC**, también llamada **alfa**, se divide en dos subfamilias:

-ELR → que contienen grupos de glutamina, leucina y arginina, y que se subdivide en seis grupos que se denominan:

IL8 → -su función es atraer neutrófilos, monocitos, linfocitos, fibroblastos, células endoteliales y epiteliales.

-además tiene gran actividad angiogénica.

-y estimula el incremento de histamina en los mastocitos.

GRO α → -es conocida también MGSA por "melanoma growth stimulator activity", ya que tiene actividad mitogénica similar a la de las células del melanoma
-tiene una potente actividad quimiotáctica para neutrófilos
-y se divide en dos subtipos: -GRO β ó MIP-2 α
 -GRO γ ó MIP-2 β

ENA78 → -posee actividad quimiotáctica para neutrófilos
-se conoce que es secretada en neumocitos tipo 2

GCP-2 → -tiene importancia actividad para atraer neutrófilos

β -TG → -su principal acción es ser quimiotáctica para fibroblastos

NAP-2 → también posee actividad quimiotáctica para neutrófilos

-**No ERL** → ésta a diferencia de la anterior no contienen glutamina, arginina y leucina y se subdivide en:

PF 4 → -es también llamado factor plaquetario 4
-fue la primera en descubrirse
-posee actividad quimiotáctica para neutrófilos y fibroblastos.
-es un potente inhibidor de angiogénesis, porque inhibe proliferación de células endoteliales.

IP-10 → -es llamada proteína inducible de interferón y es producto de éste i
-se expresa en células mononucleares, fibroblastos, células endoteliales, queratinocitos y linfocitos T
-su actividad quimiotáctica es pobre para neutrófilos, pero es potente para linfocitos T.

MIG → - es una proteína inducible de interferón γ
-se expresa en macrófagos
-se activa por monocitos y por fitohemaglutinina
-es atraída por otras quimocinas

CDF-1 α , y CDF-1 β → -son factores derivados del estroma o de la médula ósea

-su función es atraer linfocitos T, sobre todo CD34, y células progenitoras hematopoyéticas
-es necesaria para organogénesis cardíaca
-y posee una función preventiva frente infecciones

Otra familia es la **CC** o familia **beta** su estructura son dos cisteínas unidas y está compuesta por varias subfamilias que son:

MCP-1→-es llamada proteína 1 quimiotáctica para monocitos
-su función es atraer monocitos
-se expresa en algunas células tumorales e induce la expresión de integrinas
-activa a linfocitos T de memoria, a L selectina, linfocitos B, células "natural killer", aumenta histamina en basófilos

MCP-2, MCP-3→-atraen monocitos, células dendríticas y eosinófilos

MCP-4, MCP-5→-atraen monocitos, linfocitos T y eosinófilos

MIP 1 α , MIP 1 β →-son llamadas proteínas inflamatorias de macrófagos
-promueven la exocitosis de monocitos
-atraen neutrófilos y linfocitos T CD8
-inhiben la proliferación celular hematopoyética
-posee otros sitios de acción como son células dendríticas, eosinófilos, basófilos
-siendo menos potentes que otras quimocinas especializadas para estas funciones.

RANTES→-es conocida como "regulated upon activation normal T expressed and secreted"
-su función principal es atraer linfocitos T circulantes, monocitos, además estimula exocitosis celular de linfocitos CD4 y CD8 y "natural killer"
-es potente su acción quimiotáctica para eosinófilos
-además incrementa los niveles de histamina en basófilos

EOTAXINA→-posee actividad quimiotáctica muy potente para eosinófilos

HCC-1→-se ha observado que se expresa en pacientes con insuficiencia renal, aumentando el flujo a través de los canales de calcio
-atrae pobremente linfocitos T

TARC→-es llamada también "timus activation regulated chemokine"
-su función consiste en atraer linfocitos T, pero su actividad para esto es muy pobre

Existe otra familia, llamada **C- γ** , y únicamente se ha descubierto una quimocina para esta familia:

Linfotaxina→-su función es atraer pobremente linfocitos T y monocitos

Hay otra familia, que contiene tres aminoácidos entre las dos cisteínas, y es denominada **CXXXC**, y sólo posee una quimocina:

Neurotoxina → su función es atraer células "natural killer" (1,2,3,4).

Todas las quimocinas tienen estructura tridimensional y se pueden formar dímeros para obtener sinergismo. Las diferentes quimocinas pueden atraer diversos tipos celulares y es lo que se ha llamado "promiscuidad" (1).

Las quimocinas para poder actuar necesitan receptores transmembrana que se encuentran en las diferentes células. Para la familia CXC existen 5 receptores (R), para la familia CC hay 9, y para las dos últimas hay uno para cada uno. Un receptor puede captar a varios de una misma familia pero no de familias diferentes. Entre los más promiscuos están CXCR3 y CXCR4 y de la familia CC están CCR1, CCR2, CCR3 y CCR5 que pueden captar a casi toda la familia (1).

Existen mutaciones a nivel de receptores en algunas personas, lo cual puede otorgar inmunidad ante algunas infecciones como VIH, específicamente en el receptor CXCR5 (1).

Las quimocinas se expresan ante cualquier respuesta inflamatoria y dependiendo de la combinación de la quimocina con su receptor será la respuesta que se obtendrá, pudiendo haber cientos de combinaciones diferentes.

Cuando hay un estímulo (trauma, antígeno, autoantígeno, agente infeccioso) éste activa al núcleo de las células endoteliales para que expresen quimocinas, éstas salen del núcleo y migran al torrente sanguíneo, desde ahí activan a una quimocina específica de eritrocitos (DARC) para que se expresen moléculas de adhesión como E-selectina o L-selectina para que el leucocito se adhiera al endotelio, y que este leucocito ruede sobre el endotelio, y mediante gradientes de concentración hace que se expresen integrinas para que la célula pueda extravasarse y llegar al sitio requerido (4).

Sus principales funciones son: (1)

1. quimiotaxis de neutrófilos
2. activan células mediadoras de inflamación en asma, glomerulonefritis, dermatitis atópica, psoriasis
3. a través de sus receptores algunos agentes infecciosos (virus, bacterias o parásitos) pueden introducirse a las células, ejemplos: VIH, plasmodium, *Schistosoma mansoni*
4. actividad angiogénica
5. funciones hematopoyéticas, estimulando factor de crecimiento de colonias
6. actividad antitumoral

La dermatitis atópica es un síndrome clínico caracterizado por lesiones pruriginosas y eccematosas en pliegues y cuello. Existen diferentes factores que se han propuesto como responsables de la patogenia de la dermatitis atópica, entre

ellos inmunológicos, psicológicos, infecciosos y genéticos, pero su patogenia aún no está clara. Se caracteriza por presentar un infiltrado inflamatorio mixto por linfocitos, monocitos, eosinófilos, macrófagos y mastocitos; se ha observado también que existe un aumento de las células dendríticas y células de Langerhans. Al parecer el reclutamiento de estas células es inducido por quimocinas.

MARCO DE REFERENCIA

En experimentos realizados con ratones NC-Nga, a los que se les administró TARC desarrollaron lesiones semejantes a la dermatitis atópica y estas expresaban los receptores de las quimocinas CXCR3 y CCR4. Se observó que estas lesiones eran idénticas clínica e histológicamente a las de dermatitis atópica y presentaban una respuesta similar al tratamiento con esteroides (5).

En otros estudios en ratones se ha encontrado que las quimocinas de la familia CC, dentro de las que se encuentran RANTES y eotaxina, pueden atraer eosinófilos en enfermedades inflamatorias como la dermatitis atópica (6).

En estudios en humanos se ha encontrado que en dermatitis atópica y psoriasis hay un aumento de las quimocinas RANTES e IL-8 (7). Y otros autores muestran que en enfermedades inflamatorias y alérgicas se elevan los niveles de eotaxina, MCP-4, MCP-3 y RANTES (8).

Se ha estudiado que los niveles de quimocinas están aumentados y esto correlaciona con el número de eosinófilos en la respuesta inflamatoria en pacientes con dermatitis atópica. Se demostró que durante la fase tardía de la respuesta inflamatoria en ésta, hay niveles elevados de IL-8 y RANTES lo que prueba que juegan un papel trascendental en la atracción de eosinófilos y la activación de leucocitos para aumentar los niveles de histamina en esos sitios (9).

Se ha encontrado que los niveles de RANTES son directamente proporcionales al infiltrado de basófilos del área, lo que se demostró luego de la administración intradérmica de RANTES ya que se produjo un infiltrado masivo de basófilos en los tejidos (10).

En monos *rhesus* luego de la aplicación intradérmica de eotaxina se demostró que ésta tiene una potente actividad quimiotáctica para neutrófilos (11).

Estos estudios abren líneas de investigación en las que la inhibición de quimocinas a través de evitar el acoplamiento con sus receptores pueda representar una terapéutica eficaz en enfermedades inflamatorias, como psoriasis y dermatitis atópica.

Desde que Morimoto *et al* (12) reportó los efectos de la vitamina D, se han desarrollado análogos de ésta, para disminuir los efectos hormonales en la homeostasis del fosfato de calcio y para mantener los efectos en la diferenciación y proliferación del queratinocito. El primero fue el calcipotriol como terapia tópica, y posteriormente se introdujo el tacalcitol (1 alfa, 24 [R] dihidroxivitamina D3) para el tratamiento de psoriasis. Su mecanismo de acción consiste en inhibir la proliferación del queratinocito induciendo la diferenciación terminal, probablemente por su unión a los receptores específicos de vitamina D3 que es un receptor intracelular de 50 a 60 kDa, dichos receptores están ampliamente distribuidos y

están presentes tanto en los queratinocitos como en las células del sistema inmune. También posee propiedades antiinflamatorias, al inhibir al factor proteico linfocitario $\text{NF-}\gamma\text{B}$, al $\text{FNT}\alpha$, a la transcripción de IL-2, a la producción de IL-6 y la función de las células de Langerhans como presentadoras de antígeno. Esta última tiene una función dependiente de quimocinas (13).

Se absorbe en forma mínima después de la aplicación tópica, y en estudios realizados se demuestra una absorción sistémica menor de 0.5% a través de piel enferma, por lo que las concentraciones de tacalcitos son de 10-8M (13,14).

En estudios en psoriasis se demostró que el tacalcitol inhibe la producción de RANTES e IL-8 en queratinocitos epidérmicos cultivados, estos resultados indican que este análogo de la vitamina D3 es efectivo en la regulación de la producción de quimocinas por los queratinocitos epidérmicos, lo que puede apoyar su uso para tratamiento de psoriasis (14), donde hasta el momento, los diversos artículos publicados mencionan una respuesta excelente (14).

Aunque no se ha reportado elevaciones de calcio sérico, se recomienda la monitorización de calcio y fosfato. Puede emplearse con seguridad durante la lactancia, ya que su absorción percutánea es mínima. Se han reportado reacciones adversas en aproximadamente el 7% de los pacientes, que incluye: ardor, prurito, eritema e irritación cutánea, ya sea en forma leve o transitoria. No se han registrado casos de reacción sistémica adversa. No tiene efectos sobre la fertilidad y cada 100 gr de ungüento contiene monohidrato de tacalcitos 0.417 mg y excipiente c.b.p. 100 gr. Existe una presentación de 15 gr en crema. En cada aplicación, se calcula una dosis de 4ng/gr al día.

En un estudio reciente de Fukuoka M *et al* (15) se compara el uso de tacalcitol, calcipotriol, valerato de betametasona y ciclosporina A, para inhibir la producción de RANTES e IL-8 en fibroblastos dérmicos cultivados, y se encontró que los análogos de la vitamina D son los más potentes inhibidores de estas quimocinas. Este estudio sugiere que estos compuestos pueden tener efectos benéficos en enfermedades inflamatorias, como la dermatitis atópica, que en su fisiopatogenia incluyan la vía de la regulación de la producción de las quimocinas (15).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿El tacalcitol inhibe la producción de RANTES y mejora las manifestaciones clínicas en pacientes con dermatitis atópica?

JUSTIFICACION

La dermatitis atópica es un problema frecuente que afecta del 3-20% de la población, se encuentra entre los 10 primeros motivos de consulta dermatológica, puede afectar a cualquier raza y no existe un tratamiento específico para su control (16). El tacalcitol podría representar una nueva opción terapéutica para el control de esta enfermedad, ya sea inhibiendo la presentación de antígenos por células de Langerhans así como, disminuyendo la producción de factores de la inflamación, como las quimocinas.

OBJETIVO

- Determinar los niveles de quimocinas (RANTES) en pacientes con dermatitis atópica
 - Evaluar eficacia de tacalcitol en las disminución de los niveles de quimocinas
 - Evaluar eficacia de tacalcitol en las manifestaciones clínicas de la dermatitis atópica
 - Conocer los efectos adversos del tacalcitol en pacientes con dermatitis atópica
- ### **HIPOTESIS**

Si el tacalcitol inhibe la producción de RANTES, y estas quimocinas participan en la fisiopatogenia de la dermatitis atópica, entonces el tacalcitol inhibirá la producción de RANTES lo que provocará una mejoría clínica en pacientes con dermatitis atópica.

MATERIAL Y METODO

DISEÑO

Se trata de un estudio abierto de intervención sin grupo control, del tipo antes-después

Universo→ pacientes con dermatitis atópica
Consulta Externa del Servicio de Dermatología
Hospital General Dr Manuel Gea González

Tamaño de la Muestra→ Con una diferencia esperada del 50% entre los pacientes tratados con tacalcitol y vehículo y un nivel de confianza bilateral $(1-\alpha)$ de 0.95 y un poder de la prueba $(1-\beta)$ de 0.80 se obtiene un tamaño de muestra mínimo de 12 individuos. Se seleccionaron 12 pacientes con dermatitis atópica que acudieron de manera aleatoria a la Consulta Externa de Dermatología del Hospital General Dr. Manuel Gea González, quienes recibieron tratamiento con tacalcitol. El grupo control lo formaron 10 voluntarios sanos.

Características:

Los pacientes reunieron por lo menos 3 criterios de Hanifin y Rajka para dermatitis atópica (17), y se determinaron los siguientes parámetros de severidad de TBSA, cuya puntuación máxima es 108: (18)

6 criterios→ eritema
infiltración
vesiculación/pápulas
resequedad/escamas
fisuras
excoriaciones/costras

severidad→ 0-ausente
1-leve
2-moderada
3-severo

localización→ brazos

manos
piernas
pies
cabeza/cuello
tronco

Se identificaron las siguientes características clínicas:

- Liquenificación flexural
- compromiso de superficies extensoras
- eritema facial
- hiperpigmentación periorbital
- xerosis
- ictiosis
- acentuación de los pliegues palmares
- queratosis pilar
- pliegue de Dennie Morgan
- Pitiriasis alba
- queilitis
- eccema de manos
- eccema de pies
- eccema de pezón
- pliegues cervicales anteriores
- conjuntivitis
- cataratas

Criterios de selección:

Criterios de inclusión→

Pacientes→ > de 15 a 25 años con dermatitis atópica de leve a moderada

Firma de carta de consentimiento por paciente si era mayor de 18 años o por sus padres si era menor de edad

voluntarios sanos→ 15-25 años de edad sin afecciones cutáneas relacionadas a dermatitis atópica.

Criterios de exclusión→

Lesiones impetiginizadas o eccematizadas

Uso esteroides sistémicos durante un mes previo al estudio

Uso esteroides tópicos durante las dos semanas previas al estudio

Embarazo y lactancia

Alteraciones neuropsiquiátricas
Uso de antihistamínicos durante las dos semanas previas al estudio

Criterios de eliminación→

Falta de apego al tratamiento
Uso de antihistamínicos o esteroides durante el estudio
Efectos adversos al tacalcitol durante el estudio

VARIABLES

Independientes→

Sexo: escala nominal
Edad: escala cuantitativa
Tipo de tratamiento: tacalcitol
Tratamientos previos
Sitios afectados
Tiempo de evolución

Dependientes→

Grado de severidad : ausente, leve, moderado, severo : escala cualitativa ordinal.
Sitios afectados: escala cualitativa nominal
Niveles de quimocinas RANTES: escala cuantitativa nominal
Mejoría clínica: escala cualitativa

Grupo de estudio: dermatitis atópica con tacalcitol: medición de RANTES pre y post-tratamiento.

Grupo control en voluntarios sanos: medición de RANTES en dos ocasiones con un intervalo de dos semanas sin tratamiento con tacalcitol.

ANALISIS ESTADISTICO

Se emplearon pruebas de estadística descriptiva, del tipo media y desviación estándar para variables medidas en escala cuantitativa y porcentajes para variables medidas en escala cualitativa.

Para el análisis de los resultados medidos en escala ordinal, se empleó la Prueba de Wilcoxon de rangos señalados y pares igualados para dos muestras

dependientes, considerando una diferencia como estadísticamente significativa con valor de $p < 0.05$.

PROCEDIMIENTO DE CAPTACION DE LA INFORMACION

1. Cuestionario
2. Entrevista y toma de muestra para exámenes de laboratorio
calcio sérico: aunque no se ha reportado alteración en los niveles séricos de calcio, se aconseja la medición del mismo durante el empleo de tacalcitol.
Biometría hemática: para descartar probable infección sistémica agregada.
3. Toma de biopsia (antes de y después de tratamiento)
Procedimiento: -se infiltró la lesión con xilocaína + epinefrina al 2% (0.4cc)
-se tomó una biopsia con sacabocado de 5mm
-se suturó con nylon 5-0
-se colocó vaselina sólida y se cubre con gasa estéril
-se retiraron puntos en 7 días.
4. Inicio de tratamiento: aplicación de ungüento de tacalcitol cada 12 hrs durante 2 semanas, la dosis empleada correspondió a la gravedad y extensión de la lesión. La concentración de tacalcitol en crema es de 8ng/gr. Con evaluación al final del tratamiento (examen físico y toma de muestras para nueva determinación de calcio sérico y biometría hemática)
5. Se realizó la determinación de RANTES pre y postratamiento, empleando el método de ELISA (RID Systems)
6. Se realizó cultivo de tejido completo por medio de membranas de alimentación e incubación en atmósfera de CO₂ durante 24 horas, con la finalidad de obtener sobrenadante .

Cultivos celulares.

Los cultivos de tejido de pacientes con dermatitis atópica y de controles sanos, se generaron de biopsias de piel. Éstas se lavaron tres veces con D-MEM suplementado con 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. El tejido se fragmentó en piezas de aproximadamente 8 mm³, dos de ellas se colocaron sobre una membrana de policarbonato con poro de 1 µm (Costar) y ésta se

mantuvo flotando en 0.5 ml de D-MEM suplementado con 10% de suero de bovino fetal, 2mM de glutamina y antibióticos en un pozo de 2 cm² (Placas de 24 pozos, Costar). Los cultivos se incubaron por 24 horas a 37 °C, 5% de CO₂ en una atmósfera húmeda. Después del tiempo mencionado se colectaron los sobrenadantes del cultivo y se congelaron a -70 °C hasta su utilización. Por su parte, los fragmentos del tejido se pesaron en una balanza analítica, para realizar el ajuste de actividad por peso.

ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO (ELISA).

Los sobrenadantes fueron descongelados dejando los tubos a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugaron a 1000 rpm por 5 minutos para eliminar sedimento.

De la solución centrifugada se tomaron 100 ml para realizar la prueba.

El ensayo se llevó a cabo de la siguiente manera:

Se agregaron 100 µl de la solución diluyente a cada pozo de una placa previamente adsorbida con el receptor para RANTES humano y 100 µl de muestra, la placa se incubó por 2 horas a temperatura ambiente.

Después del tiempo mencionado se eliminó la solución de cada pozo y se realizaron 3 lavados.

A cada pozo se le agregaron 200 µl del anticuerpo anti-RANTES humano conjugado con peroxidasa y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó nuevamente la placa por 3 veces y se agregaron 200 µl por pozo de una solución de tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno y se incubó por 20 minutos. Finalmente, se adicionaron 50 µl de ácido sulfúrico 1 N para detener la reacción.

La placa se colocó en un lector colorimétrico y se leyó a 450 nm. Los datos de las muestras fueron interpolados de una curva estándar realizada con RANTES humanos y procesado en las mismas condiciones.

Resultados

Para mayor comprensión, dividiremos los resultados en clínicos y básicos. En el primer grupo se analizaron las manifestaciones cutáneas y sintomatología. En los pacientes el eritema presentó una mejoría del 34% al finalizar el tratamiento, la infiltración de las lesiones tuvo una mejoría del 55%, las pápulas presentaron una mejoría del 48%, las escamas de las lesiones presentó una mayoría del 56%, las fisuras tuvieron una mejoría del 57%, las escoriaciones, presentaron una mejoría del 46%. El prurito, único síntoma estudiado, obtuvo una mejoría de 44%.

Por lo que respecta a la topografía, observamos una mayor respuesta cuando las lesiones se presentaban cuello, con un 50% de mejoría. Piernas representó una mejoría del 32%. En el sitio en el cual se observó una respuesta menor (28%) fue pliegues.

La mejoría global (lesiones + topografía + prurito) representó un 50.71%.

La respuesta clínica se evaluó de la siguiente manera:
Buena cuando la mejoría representaba del 50 al 100%
Moderada: 25 al 50% de mejoría
Mala: mejoría menor del 25 %

El primer grupo estuvo constituido por 5 pacientes, el segundo por 4 y el tercero por 2 pacientes. Estos últimos presentaron exacerbación del prurito, con incremento del prurito y eccematización de las lesiones previas, sin embargo, presentaron una disminución importante de la liquenificación y las fisuras.

A continuación, se presentan los resultados del tratamiento con tacalcitol en 11 pacientes con dermatitis atópica, en la que cada individuo actuó como su propio control. (Tabla I).

Tabla I. Efectos del tacalcitol sobre la intensidad de las manifestaciones clínicas en pacientes con dermatitis atópica.

<i>VARIABLE</i>	<i>MEDIANA ANTES</i>	<i>MEDIANA DESPUÉS</i>	<i>p</i>
Prurito	3	1	0.016*
Eritema	1	1	0.250
Infiltración	2	1	0.014*

Pápulas	2	1	0.008**
Escama	3	1	0.010*
Fisuras	2	1	0.008**
Escoriación	2	1	0.084
Brazos	2	2	0.125
Piernas	2	1	0.125
Cuello	2	1	0.063

*Prueba de Wilcoxon; $p < 0.05$

**Prueba de Wilcoxon; $p < 0.01$

En cuanto a los resultados obtenidos al hacer la medición de RANTES se encontró que esta quimocina tuvo una expresión basal promedio en pacientes normales de 1.6 pgr/mg de tejido húmedo , en pacientes antes de tratamiento la expresión de RANTES promedio fue de 3.7 pgr/mg de tejido húmedo , posterior a tratamiento con tacalcitol fue de 10.6 pgr/mg de tejido húmedo . Encontramos que RANTES se elevó en una proporción 3 veces mayor en relación a los niveles basales.

DISCUSIÓN

Se ha reportado que los pacientes con dermatitis atópica, cursan con trastornos en la queratinización. Inicialmente, el tacalcitol ha sido empleado en padecimientos que tienen este trastorno de base, ya que es un fármaco capaz de modular la proliferación celular, diferenciación y queratinización. Esto puede estar relacionado con los datos que obtuvimos, ya que se observó una clara mejoría y una respuesta más rápida en aquellas lesiones constituidas por liquenificación, fisuras y escamas, lo que no ocurrió con el eritema, el cual tiende a persistir.

Por lo que respecta a los 2 pacientes en los cuales la dermatosis se acentuó, cursando los mismos con eccematización, podríamos cuestionarnos si esta respuesta fue secundaria al fármaco por sí mismo, o bien al vehículo empleado, ya que hasta la fecha no existe ningún estudio reportado comparando vehículo con sustancia activa.

Nuestros resultados en la medición de quimocina RANTES nos sorprendieron, ya que, contrario a los resultados esperados, las cifras se incrementaron hasta 5 veces en relación a la basal, posterior al tratamiento, siendo más evidentes en aquellos pacientes que presentaron una mejoría mayor al 50%. Al parecer, la expresión de la misma es directamente proporcional a la mejoría clínica.

Se ha descrito la dualidad que tienen algunas quimocinas. En el linfoma cutáneo, la expresión de la quimocina IP-10 se traduce en mayor epidermotropismo y agresividad tumoral. Por el contrario, si esta misma quimocina se encuentra en melanoma maligno, ésta favorece la reducción tumoral al actuar como modulador. (19 , 20), lo que nos lleva a sugerir que probablemente RANTES adopte el rol de inmunomodulador en dermatitis atópica, estimulado por tacalcitol, efecto contrario a lo que sucede en pacientes con psoriasis, en los cuales se observa disminución de RANTES con relación directamente proporcional a la mejoría clínica.

En estudios in vitro e in vivo, se ha reportado que RANTES se encuentra elevada en pacientes con dermatitis atópica (5,7,8); sin embargo, no hacen mención a pacientes sanos. En este estudio, observamos, que tanto en los pacientes problema antes del tratamiento como en los controles sanos la expresión de RANTES era similar para ambos grupos.

La mayor parte de los estudios realizados, se han enfocado en la medición de la expresión del RNAm empleando el método de RT-PCR, que proporciona información sobre la transcripción relativa y arroja resultados medidos en escala semicuantitativa. (7 , 8 , 15); sin embargo, puede hacerse una prueba cuantitativa por el método de ELISA que nos daría datos más fidedignos sobre la expresión de esta quimocina. Es importante resaltar que los diferentes niveles de expresión requieren de diferentes pruebas para su medición. La información vertida por el RT-PCR está relacionada exclusivamente con la transcripción, lo que no asegura que la proteína se exprese. Por lo anterior, es importante medir tanto la transcripción como la expresión de la proteína y su nivel de actividad. Lo anterior se alcanzará realizando estudios que incorporen el estudio clínico de los pacientes y los abordajes celulares y moleculares.

Fukuoka reporta que en estudios *in vitro* llevados a cabo en ratas con dermatitis atópica // la expresión de RANTES era mayor a los datos basales normales. Este mismo autor, al trabajar con fibroblastos cultivados, estimulados con Factor de Necrosis Tumoral- α (FNT alfa) y tratados con tacaicitol, encontró la disminución del RANTES posterior al tratamiento. Sin embargo, en nuestro estudio, que fue realizado *in vivo*, observamos lo contrario. (14, 15)

Aun no se han dilucidado todos los factores inmunológicos que están involucrados en la fisiopatología de la dermatitis atópica, sin embargo, en lo que respecta a RANTES, este estudio ha permitido observar que el comportamiento de esta quimocina es diferente en pruebas *in vitro* e *in vivo*.

Con este estudio, se valida la prueba empleada para cuantificación de proteínas proinflamatorias en cultivo completo de piel, siendo la primera ocasión que se emplea en este tipo de sustrato. Siendo un método rápido y económico, cuya utilidad puede ser ampliamente aprovechada en el área inmunológica y de biología celular.

CONCLUSIONES

Es necesaria la realización de más estudios para evaluar la efectividad del uso de tacalcitol en pacientes con dermatitis atópica.

De acuerdo a nuestros resultados, sería conveniente la realización de estudios doble ciego, comparando vehículo con sustancia activa para poder determinar si la eccematización que presentaron nuestro pacientes fue debida al vehículo o al fármaco.

La mayor efectividad de tacalcitol se obtiene en los primeros días de aplicación, observándose una respuesta rápida del cuadro, lo que permitiría tratar los cuadros de exacerbación de la enfermedad por periodos mas cortos, redundando en beneficio del paciente.

Es necesaria la medición de las concentraciones y del nivel de actividad de otras proteínas inflamatorias como IL-1 y FNT- α para determinar el blanco específico de acción de tacalcitol en dermatitis atópica.

Carta de consentimiento informado

Hospital General "Dr. Manuel Gea González

México D.F. a _____ de _____ de 2000

YO _____

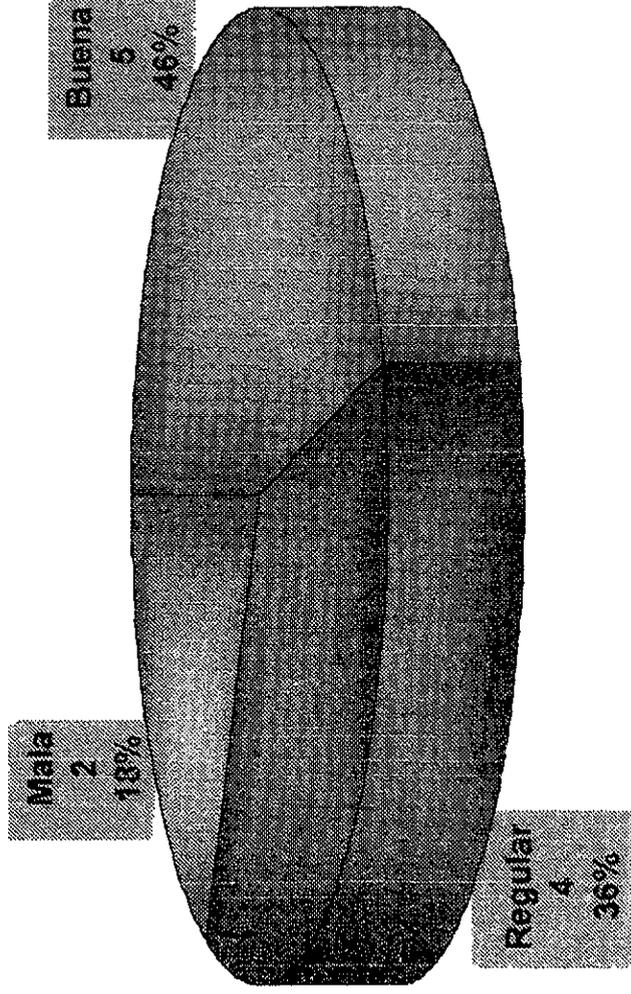
Después de haber sido informado del Protocolo "Efectividad del tacalcitol para inhibir quimocinas RANTES en Dermatitis Atópica", autorizo mi ingreso a dicho estudio, tomando en cuenta que se me ha explicado ampliamente el procedimiento al que me someteré, que será:

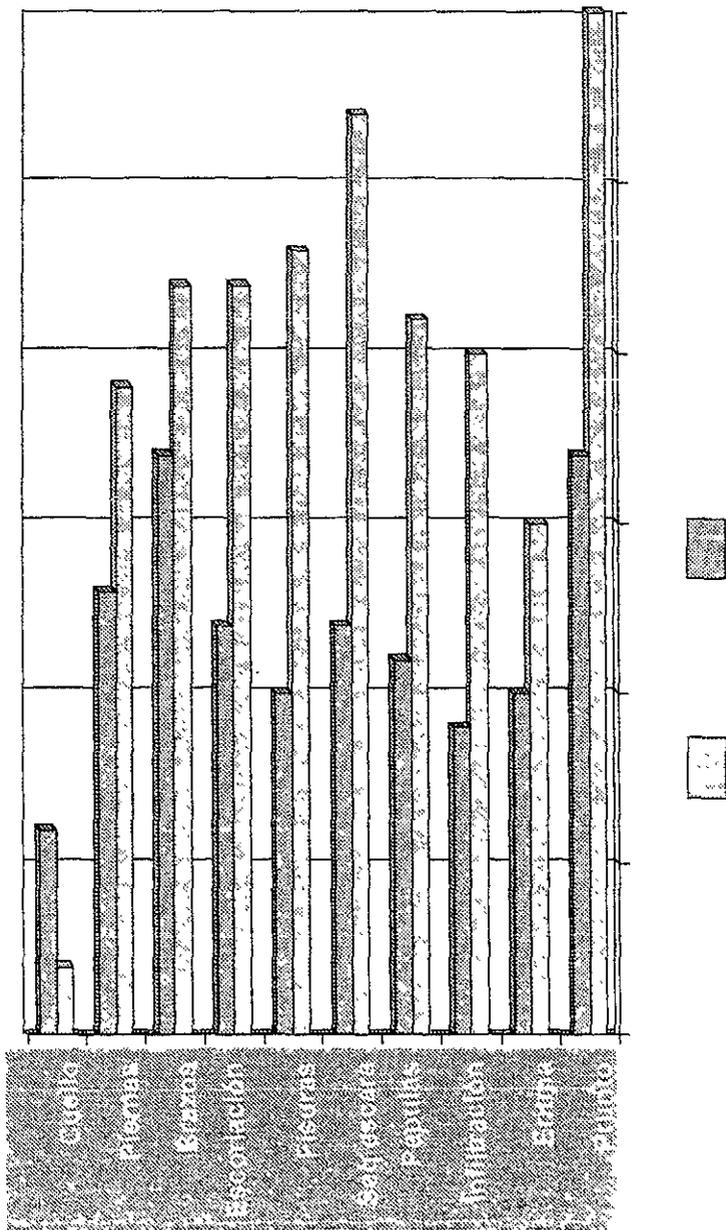
- 1.- Toma de fotografías antes y después del tratamiento.
 - 2.- Toma de biopsia con sacabocado de 4 mm antes y después del tratamiento
 - 3.- Medición de niveles séricos de calcio y biometría hemática antes y después del tratamiento.
 - 4.- Uso de ungüento de tacalcitol c/12 hrs. durante 2 semanas en las áreas donde presente lesiones de dermatitis atópica.
 - 5.- Además, se me ha informado, que hasta el 7% de los pacientes que emplean tacalcitol pueden llegar a presentar efectos adversos como: ardor, comezón, enrojecimiento e irritación de la piel, siendo éstos leves y transitorios. Y que el uso de este fármaco no tiene efecto alguno sobre la fertilidad, que no produce malformaciones congénitas y que no puede causar cáncer.
 - 6.- Tanto la consulta, como los procedimientos quirúrgicos, exámenes de laboratorio y fármaco empleado serán gratuitos.
 - 7.- Tengo derecho a que se me explique cualquier duda, aclaración o pregunta que surja durante el estudio. También soy consciente de que puedo abandonar el protocolo de estudio en el momento en que yo lo decida, sin que esta decisión afecte mi atención médica.
 - 8.- Toda la información que proporcione será estrictamente confidencial.
 - 9.- Todos los procedimientos estarán de acuerdo con lo estipulado en el reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la Salud.
- Título II. Capítulo I, artículo 17, fracción III.

Nombre y firma del paciente
Nombre y firma testigo paciente

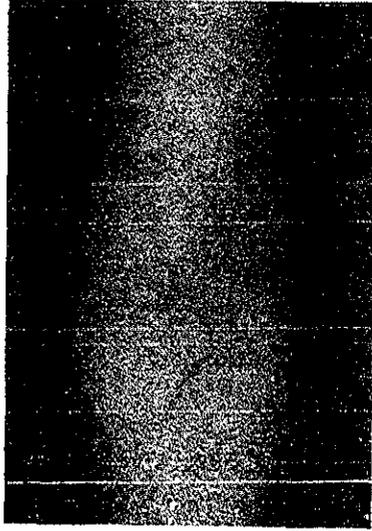
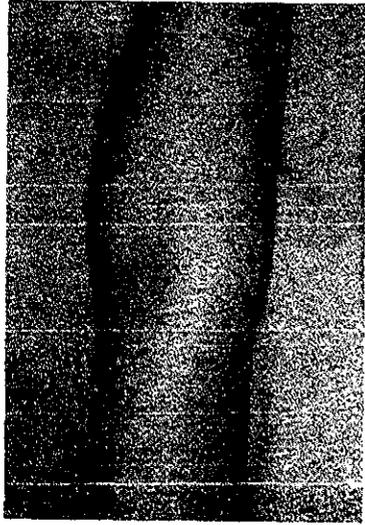
Nombre y firma del investigador
Nombre y firma testigo paciente

Porcentaje de mejora

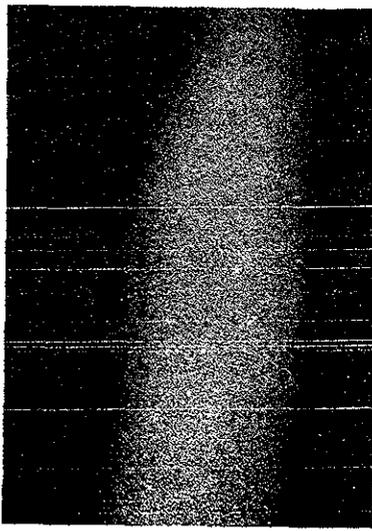
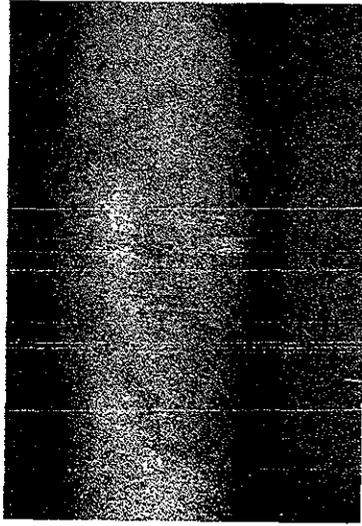




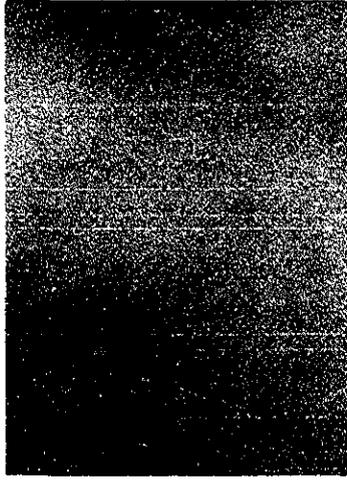
Antes



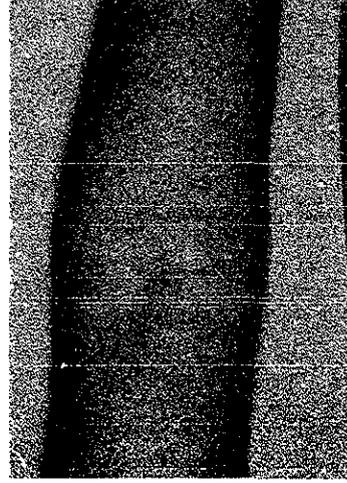
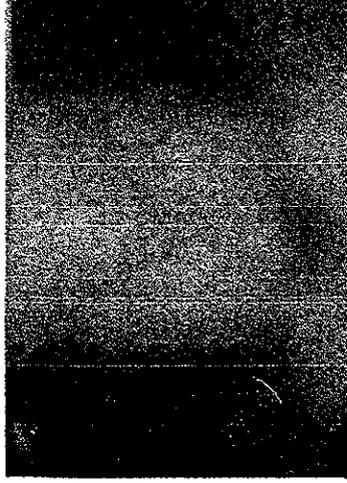
Después



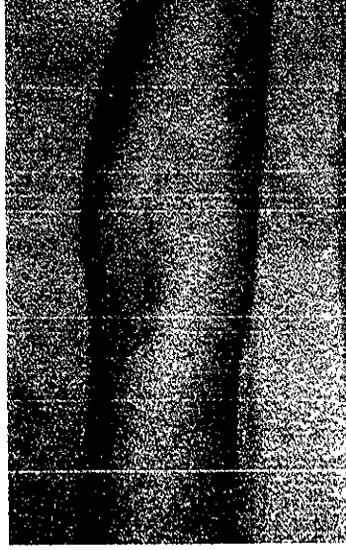
Antes



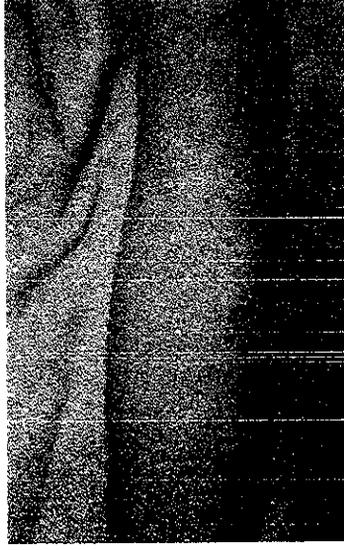
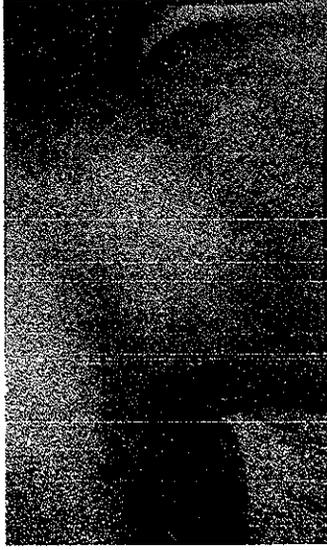
Después



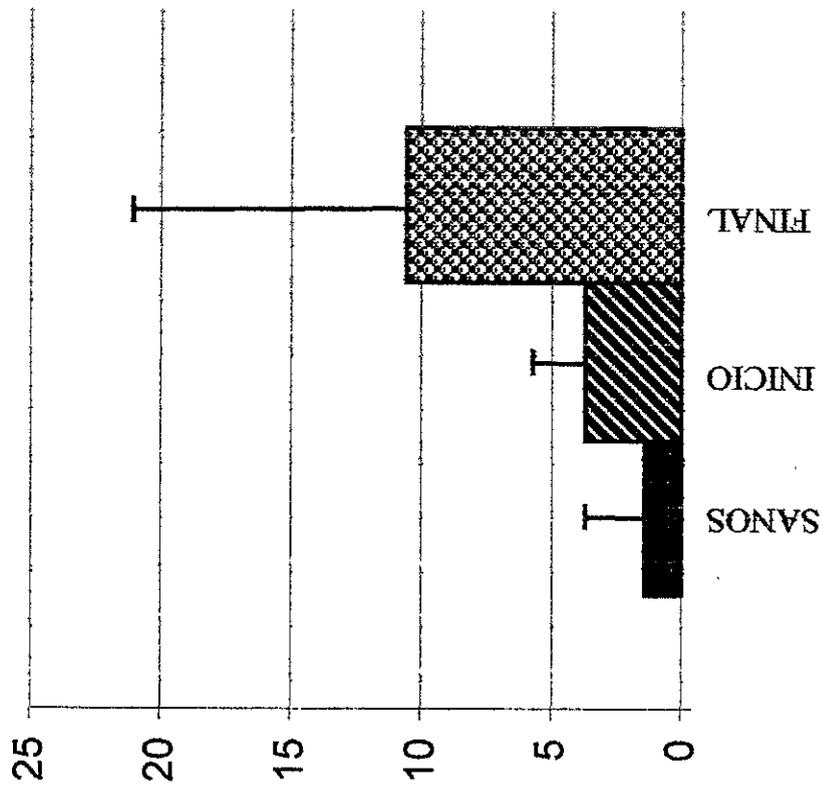
Antes



Después



EXPRESIÓN DE RANTES EN CULTIVOS DE TEJIDOS



**ESTA TESIS NO SALE
BIBLIOGRAFIA DE LA BIBLIOTECA**

1. Rollings B. Chemokines. *Blood*. 1997; 90: 909-928.
2. Adams D, Lloyd A. Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines. *Lancet*. 1997; 349 (9050): 490-95.
3. Gale L, McColl S. Chemokines: extracellular messengers for all occasions? *BioEssays* 1999; 21:17-28.
4. Bonecchi R. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and (Th2s). *J Exp Med* 1998; 187: 129-134.
5. Christian V, Hiroyuki Y, Masako M *et al*. Overproduction of Th2-specific chemokines in NC/Nga mice exhibiting atopic dermatitis-like lesions. *J Clin Invest* 1999; 104(8): 1097-1105
6. Teixeira M, Wells T, Lukacs N *et al*. Chemokine-induced eosinophil recruitment. *J Clin Invest* 1997; 100(7): 1657-1666.
7. Schroder JM. Identification and structural characterization of chemokines in lesional skin material of patients with inflammatory skin disease. *Methods enzymol* 1997; 288; 266-97.
8. Elsner J, Petering H, Kimmig D *et al*. The CC chemokine receptor antagonist met-RANTES inhibits eosinophil effector functions. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 118 (2): 462-465.
9. Zweimen B, Kaplan AP, Tong L *et al*. Cytokine levels and inflammatory responses in developing late-phase allergic reactions in the skin. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100 (1): 104-9.
10. Conti P, Reale M, Barbacane RC *et al*. Massive infiltration of basophilic cells in inflamed tissue after injection of RANTES. *Immunol Lett* 1997; 58 (2): 101-6.
11. Forssmann U, Ugucconi M, Loetscher P *et al*. Eotaxin -2, a novel CC chemokine that is selective for the chemokine receptor CCR3, and acts like eotaxin on human eosinophil and basophil leukocytes. *J Exp Med* 1997; 185 (12): 2171-2176.
12. Christophers E, Mrowietz U. Psoriasis in *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. 5ª Edition. Editorial International 1999. Cap 43, pag 514.
13. Wang B, Amerio P, Sauder DN. Role of cytokines in epidermal Langerhans cell migration. *J Leukoc Biol* 1999; 66 (1): 33-9.
14. Fukuoka M, Ogino Y, Sato H *et al*. RANTES expression in psoriatic skin, and regulation of RANTES and IL-8 production in cultured epidermal keratinocytes by active vitamin D3 (tacalcitol). *Br J Dermatol* 1998; 138 (1): 63-70.
15. Fukuoka M, Ogino Y, Sato H *et al*. Regulation of RANTES and IL-8 production in normal human dermal fibroblasts by active vitamin D3 (tacalcitol). *Br J Pharmacol* 1998; 124(7): 1433-8.
16. Arenas R. Dermatitis atópica en *Dermatología Atlas*. Diagnóstico y tratamiento. McGraw-Hill Interamericana. 2ª Edición.

17. Hanifin JM, Rajka. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Act Derm Venereol Suppl* 1980; 92: 44-7.
18. Sowden JM, Berth-Jones J, Ross JS *et al*. Double-blind, controlled, crossover study of cyclosporine A in adults with severe refractory atopic dermatitis. *Lancet* 1991; 338: 137-40.
- 19.- Tensen CP ,Vermeer MH ,Van der Stoop PM *et.al* Epidermal interferon – gamma inducible protein –10 (IP-10) and monokine induced by gamma-interferon (Mig) but not IL-8 mRNA expression is associated with epidermotropism in cutaneous T cell lymphomas . *J Invest Dermatol* 1998;111 :p.p 222-6 .
- 20 . Sarris AH ,Daliani D ,Ulmer R , Crow M *et.al* Interferon inducible protein –10 (IP-10) as a possible factor in the pathogenesis of cutaneous T – cell lymphomas . *Clin Cancer Res* 1997 ;3(2) :p 169-77 .